



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KELLY ROBERTA SPACINO

**EFEITO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS NOS  
PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS DO  
BIODIESEL B100 OBTIDO DE ÓLEO DE SOJA**

---

Londrina  
2016

KELLY ROBERTA SPACINO

**EFEITO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS NOS  
PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS DO  
BIODIESEL B100 OBTIDO DE ÓLEO DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pós Graduação em Bioenergia, com área de concentração em Biocombustíveis, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Dionisio Borsato

Londrina  
2016

KELLY ROBERTA SPACINO

**EFEITO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS NOS PARÂMETROS  
CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS DO BODIESEL B100 OBTIDO DE  
ÓLEO DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, com área de concentração em Biocombustíveis, para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Dionisio Borsato  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr<sup>a</sup>. Ivanira Moreira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Eduardo Dimauro  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de janeiro de 2016.

Dedico este trabalho aos meus pais,  
irmã e orientador, por sempre  
acreditarem em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pois ele é a razão de tudo o que existe.

Agradeço aos meus pais e irmã por todo amor e dedicação em todos os momentos, são meu porto seguro.

Agradeço ao meu mestre Dionisio Borsato, por todo carinho, incentivo, companheirismo e amizade desde a iniciação científica.

Ao professor Olívio Fernandes Galão por toda a ajuda e incentivo.

Ao pessoal do Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis (LPAC), Livia, Érica, Cezar, Bruna, Letícia, Elisangela, Gabriela, Karina e Hágata, por toda a ajuda durante a fase dos experimentos, nas traduções, trabalhos em geral e pelos momentos de descontração passados juntos.

A Sabrina do laboratório do Laboratório de Químiometria e Ciências Naturais (LQCN) pela ajuda na leitura de amostras e liofilização dos extratos.

Um agradecimento especial a Ivanira, que durante a fase experimental me ajudou muito sendo também uma grande companheira e incentivadora.

Enfim agradeço a todos que de uma forma direta ou indireta participaram da realização deste trabalho.

*“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencerá.”*

Albert Einstein

SPACINO, Kelly Roberta. **Efeito de antioxidantes naturais nos parâmetros cinéticos e termodinâmicos do biodiesel B100 obtido de óleo de soja**. 2016. 61 f. Dissertação de mestrado em Bioenergia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

O biodiesel utilizado foi obtido através da reação de transesterificação de óleo de soja com metanol e metóxido de sódio como catalisador. O óleo de soja é atualmente a matéria prima mais utilizada para a produção de biodiesel, porém seus principais ácidos graxos são insaturados, o que favorece o processo de oxidação que conduz a formação de peróxidos e hidroperóxidos que diminuem a estabilidade oxidativa do biocombustível. O processo de oxidação pode ser inibido ou diminuído com a adição de antioxidantes que inibem a iniciação ou a propagação das reações químicas indesejáveis. Extratos de plantas estão sendo utilizados como antioxidantes por possuírem entre seus compostos grupamentos fenólicos e o crescente interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado devido a capacidade antioxidante dessa substância por sequestrar radicais livres. O presente estudo utilizou extratos alcoólicos de antioxidantes naturais, alecrim, orégano e manjerição, em mistura com biodiesel, para avaliar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da reação de oxidação do biodiesel. As análises de teor de fenóis totais dos extratos mostraram que os maiores valores foram encontrados para o extrato de alecrim, seguido do orégano e manjerição. A análise termogravimétrica indicou que o extrato mais estável foi o de manjerição, alecrim e orégano respectivamente. Depois de secos, os extratos foram adicionados ao biodiesel B100 e as amostras foram submetidas ao ensaio acelerado de estabilidade oxidativa nas temperaturas 110, 115, 120 e 125 °C seguindo o delineamento experimental de misturas simplex-centroide. O período de indução a 110 °C das amostras contendo os antioxidantes naturais foram acima de 6 horas, limite mínimo estabelecido pela norma EN 14112, com destaque para o ensaio contendo 50% de alecrim e 50% de orégano que obteve o período de indução de 10,18 horas coincidindo com o valor da otimização conjunta. A partir dos períodos de indução obtidos foram determinadas as constantes de velocidade e as entalpias ( $\Delta H^\ddagger$ ), entropias ( $\Delta S^\ddagger$ ) e as energias livre de Gibbs ( $\Delta G^\ddagger$ ) no estado ativado para avaliação da eficiência dos antioxidantes naturais utilizados. Foi aplicado o delineamento de mistura, simplex-centroide e as equações preditivas obtidas foram otimizadas simultaneamente obtendo-se 85,89 kJ mol<sup>-1</sup> para  $\Delta H^\ddagger$ , -32,25 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> para  $\Delta S^\ddagger$  e 98,48 kJ K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> para  $\Delta G^\ddagger$  quando se utiliza 50% do extrato de alecrim, 25% do orégano e 25% do manjerição. Os resultados obtidos ( $\Delta H^\ddagger > 0$ ;  $\Delta S^\ddagger < 0$  e  $\Delta G^\ddagger > 0$ ) mostraram que a reação, em presença dos antioxidantes naturais utilizados, trata-se de um processo endotérmico e não espontâneo.

**Palavras-chave:** biodiesel, antioxidantes naturais, entalpia de ativação, entropia de ativação, energia livre de Gibbs de ativação, delineamento simplex-centroide.

SPACINO, K. R. **Effect of natural antioxidants in the kinetic and thermodynamic parameters of the B100 biodiesel obtained from soybean oil.** 2016. 61 f. Dissertação de mestrado em Bioenergia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

Biodiesel used was obtained by transesterification reaction of soybean oil with methanol, and sodium methoxide as catalyst. Soybean oil is currently the most commonly raw material used for biodiesel production, but the principal fatty acids are unsaturated, which favors the oxidation process and leads to the formation of peroxides and hydroperoxides that reduce the oxidative stability of biodiesel. The oxidation can be inhibited or decreased with the addition of antioxidants that inhibit the initiation or the propagation of unwanted chemical reactions. Plant extracts are being used as antioxidants for having among its phenolic groups compounds and the growing interest in the study of phenolic compounds has increased due to the antioxidant capacity of the substance to scavenge free radicals. This study used alcoholic extracts of natural antioxidants, rosemary, oregano and basil, mixed with biodiesel to evaluate the kinetic and thermodynamic parameters of biodiesel oxidation reaction. The total phenolic content analysis of the extracts showed that the highest values were found to rosemary extract, followed by oregano and basil. Thermogravimetric analysis indicated that the most stable extract was basil, rosemary and oregano respectively. When dried, the extracts were added to the B100 biodiesel and the samples were subjected to accelerated oxidative stability test at the temperatures 110, 115, 120 and 125 °C following the experimental simplex centroid design for mixtures. The induction period at 110 °C of the samples containing natural antioxidants have been up 6 hours, limit set by the standard EN14112, highlighting the test containing 50% of rosemary and 50% of oregano who got the induction period of 10,18 hours coinciding with the value of the joint optimization. From the obtained induction periods were determined constant velocity, and the enthalpy ( $\Delta H^\ddagger$ ), entropies ( $\Delta S^\ddagger$ ) and Gibbs free energy ( $\Delta G^\ddagger$ ) in the activated state for evaluating the efficiency of natural antioxidants used. Design mixture simplex-centroid was applied and the obtained predictive equations were optimized simultaneously, obtaining 85.89 kJ mol<sup>-1</sup> for  $\Delta H^\ddagger$ , -32.25 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> for  $\Delta S^\ddagger$  and 98.48 kJ mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> for  $\Delta G^\ddagger$  when using 50% of rosemary extract, 25% of oregano and 25% of basil. The results obtained ( $\Delta H^\ddagger > 0$ ;  $\Delta S^\ddagger < 0$  and  $\Delta G^\ddagger > 0$ ) showed that the reaction in the presence of natural antioxidants used, is an endothermic process and not spontaneous.

**Key words:** biodiesel, natural antioxidants, enthalpy of activation, entropy of activation, Gibbs free energy of activation, simplex-centroid design.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Reação de oxidação.....	16
<b>Figura 2</b> – Esquema de Funcionamento do Rancimat® .....	17
<b>Figura 3</b> – Estrutura química dos compostos fenólicos presentes em especiarias..	20
<b>Figura 4</b> – Reação de redução do DPPH em presença de compostos fenólicos. .....	28
<b>Figura 5</b> – Delineamento simplex-centroide para as variáveis alecrim, orégano e manjerição.....	31
<b>Figura 6</b> – Curva de calibração para a determinação dos fenóis totais.....	34
<b>Figura 7</b> – Curva de calibração para a determinação da atividade antioxidante. ....	35
<b>Figura 8</b> – Região de combinação das variáveis alecrim, orégano e manjerição nas temperaturas 110 °C (a), 115 °C (b), 120 °C (c) e 125 °C (d).....	39
<b>Figura 9</b> – Otimização conjunta para o período de indução nas temperaturas analisadas.....	40
<b>Figura 10</b> – Análise termogravimétrica do extrato de alecrim.....	41
<b>Figura 11</b> – Análise termogravimétrica do extrato de orégano .....	41
<b>Figura 12</b> – Análise termogravimétrica do extrato de manjerição.....	41
<b>Figura 13</b> – Superfície de resposta para (a) Entalpia ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) ( $\Delta H^\ddagger$ ), (b) Entropia ( $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ) ( $\Delta S^\ddagger$ ) e Energia livre de Gibbs ( $\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ) ( $\Delta G^\ddagger$ ) obtidas pelos modelos matemáticos .....	46
<b>Figura 14</b> – Otimização conjunta dos parâmetros termodinâmicos .....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Diluições do reagente padrão ácido gálico para a curva analítica .....	26
<b>Tabela 2</b> – Diluições do reagente padrão Trolox para a curva analítica. ....	29
<b>Tabela 3</b> – Período de indução em horas, obtido das análises preliminares do biodiesel contendo os extratos dos antioxidantes naturais. ....	33
<b>Tabela 4</b> – Diluição, leitura e teor de fenóis totais nos extratos de alecrim, orégano e manjeriço.....	34
<b>Tabela 5</b> – Diluição, leitura e medida da atividade antioxidante nos extratos de alecrim, orégano e manjeriço .....	35
<b>Tabela 6</b> – Parâmetros de conformidade do biodiesel utilizado, segundo ANP .....	36
<b>Tabela 7</b> – Delineamento de mistura simplex centroide e período de indução nas diferentes temperaturas utilizadas.....	37
<b>Tabela 8</b> – Constante de velocidade e energia de ativação dos extratos de alecrim, orégano e manjeriço nas diversas temperaturas de ensaio .....	43
<b>Tabela 9</b> – Valores dos parâmetros termodinâmicos da reação de oxidação do biodiesel. ....	44
<b>Tabela 10</b> – Intervalo de confiança dos parâmetros e das variáveis de mistura no ponto ótimo.....	48

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1</b> – Modelo matemático .....	31
<b>Equação 2</b> – Lei de velocidade para reação de primeira ordem.....	32
<b>Equação 3</b> – Equação de Arrhenius .....	32
<b>Equação 4</b> – Equação de Eyring .....	32
<b>Equação 5</b> – Equação da Energia Livre de Gibbs .....	32
<b>Equação 6</b> – Equação do Período de Indução a 110 °C .....	38
<b>Equação 7</b> – Equação do Período de Indução a 115 °C. ....	38
<b>Equação 8</b> – Equação do Período de Indução a 120 °C. ....	38
<b>Equação 9</b> – Equação do Período de Indução a 125 °C. ....	38
<b>Equação 10</b> – Equação da Entalpia no estado ativado. ....	45
<b>Equação 11</b> – Equação da Entropia no estado ativado.....	45
<b>Equação 12</b> – Equação da Energia livre de Gibbs no estado ativado .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
DTG	Termogravimetria derivada
$E_a$	Energia de ativação
FAME's	Fatty Acid Methyl Esters – Ésteres metílicos de ácidos graxos
k	Constante de velocidade
min	minuto
mg	miligramas
mL	mililitros
L	litros
nm	nanômetros
PI	Período de indução
TG	Termogravimetria
$\Delta H^\ddagger$	Entalpia no estado ativado
$\Delta S^\ddagger$	Entropia no estado ativado
$\Delta G^\ddagger$	Energia Livre de Gibbs no estado ativado

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1	O BIODIESEL .....	14
2.2	ESTABILIDADE OXIDATIVA .....	15
2.3	ANTIOXIDANTES .....	18
2.4	DELINEAMENTO DE MISTURAS .....	20
2.5	PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS .....	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>24</b>
4.1	REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO .....	24
4.2	PURIFICAÇÃO DO BIODIESEL .....	24
4.3	ANÁLISE FÍSICO QUÍMICA .....	24
4.4	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....	24
4.5	EXTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES .....	25
4.5.1	Extratos Adicionados ao biodiesel .....	25
4.5.2	Extrato dos antioxidantes para Liofilização .....	25
4.6	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS .....	26
4.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	27
4.8	LIOFILIZAÇÃO DOS EXTRATOS .....	30
4.9	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA .....	30
4.10	TESTE RANCIMAT .....	30
4.11	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA MISTURA .....	30
4.12	MODELO MATEMÁTICO .....	31
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
4.14	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS .....	32
4.15	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS .....	32

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
5.1	ENSAIOS PRELIMINARES PARA A ESCOLHA DA CONCENTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES .....	33
5.2	QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE .....	33
5.3	CARACTERIZAÇÃO DO BIODIESEL.....	35
5.4	AValiação DA ESTABILIDADE OXIDATIVA .....	36
5.5	ANÁLISE TÉRMICA DOS EXTRATOS (TG) .....	40
5.6	CONSTANTE DE VELOCIDADE (k) E ENERGIA DE ATIVAÇÃO (E <sub>a</sub> ) .....	42
5.7	PARÂMETROS TERMODINÂMICOS: ENTALPIA ( $\Delta H^\ddagger$ ), ENTROPIA ( $\Delta S^\ddagger$ ) E ENERGIA LIVRE DE GIBBS ( $\Delta G^\ddagger$ ) .....	44
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O biodiesel é uma denominação genérica para combustíveis produzidos a partir de fontes de energia sustentáveis e renováveis para serem utilizados em veículos de ignição por compressão, podendo ser usado diretamente em motores existentes uma vez que as suas propriedades são em geral semelhantes às do diesel (CUNHA Jr *et al.*, 2013; BORSATO *et al.*, 2014).

Apesar do futuro promissor do biodiesel existem alguns entraves técnicos como os problemas ambientais e os preços elevados do petróleo e seus derivados, que devem ser vencidos para a produção do biocombustível, que vai desde a necessidade de encontrar uma matéria-prima, para extração do óleo, que seja viável econômica e tecnologicamente até a preocupação com a caracterização do produto final que deve estar de acordo com as normas de comercialização (CUNHA Jr *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2014).

Ao contrário dos combustíveis fósseis, que são relativamente inertes o biodiesel deve manter as suas características essenciais pouco alteradas durante o período de armazenamento, assim a manutenção da sua qualidade durante um tempo de armazenamento maior tem sido uma grande preocupação para produtores e fornecedores do biodiesel, pois ele se degrada ao longo do tempo e pode alterar-se quando exposto a presença do oxigênio do ar, luz, temperatura, enzimas, íons de elementos metálicos e umidade (DAMASCENO *et al.*, 2013; BORSATO *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2014).

Atualmente a maior parte de biodiesel produzido utiliza, como matéria-prima, o óleo de soja que apresenta alto grau de insaturação, característica química indesejável que é incorporada ao biocombustível, favorecendo os processos de oxidação que conduz a formação de peróxidos e hidroperóxidos que diminuem a sua estabilidade, promovendo a formação de gomas, gerando com isso dificuldades em seu armazenamento (KREIVAITIS *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2015).

O processo de oxidação pode ser inibido ou retardado eliminando as condições que favorecem o início da oxidação ou com adição de antioxidantes que inibem a iniciação e propagação das reações químicas indesejáveis. Os antioxidantes ocorrem naturalmente em óleos vegetais e os mais comuns são os tocoferóis. No entanto, alguns processos para a produção de óleos vegetais incluem a refinação para a purificação do óleo e, o biodiesel obtido a partir destes óleos tem

geralmente pouco ou nenhum antioxidante natural. Assim, surge a necessidade de aplicação de antioxidantes, a fim de manter as características físico-químicas do biodiesel, até ao seu uso (MCCORMICK *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2014).

Antioxidantes sintéticos têm sido usados para evitar a oxidação em biodiesel, mas apesar da sua eficiência, a maioria deles apresenta uma baixa biodegradabilidade e, além disso, são tóxicos e caros. Alguns estudos tem demonstrado que vários condimentos apresentam compostos fenólicos que inibem ou retardam processos oxidativos em óleos e biodiesel, podendo melhorar a estabilidade à oxidação sendo facilmente biodegradável e não tóxico. No entanto, eles ainda não são amplamente utilizados na prática (SOUSA *et al.*, 2014; COPPO *et al.*, 2014).

A maioria dos trabalhos publicados mostra o efeito dos antioxidantes naturais em óleos comestíveis (AMAROWICZ; PEGG, 2008; CORDEIRO *et al.*, 2013; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; POKORNÝ, 2007) porém, até onde se sabe, poucos autores tem empregado os antioxidantes naturais em biodiesel. Luo e colaboradores (2012), apresentaram um estudo sobre antioxidantes naturais incorporados no biodiesel de soja comparando seu efeito com os antioxidantes sintéticos. Coppo e colaboradores (2014) estudou o efeito dos antioxidantes naturais na estabilidade oxidativa do biodiesel produzido através do óleo de soja, onde foi estimado o tempo de estocagem através do monitoramento de reação de oxidação em diferentes temperaturas.

O estudo da estabilidade oxidativa em diferentes temperaturas tem propiciado a determinação de parâmetros cinéticos tais como constante de velocidade ( $k$ ) e parâmetros termodinâmicos como entalpia ( $\Delta H^\ddagger$ ), entropia ( $\Delta S^\ddagger$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\ddagger$ ) no estado ativado, que tem permitido avaliar a eficiência do uso de antioxidantes em biodiesel bem como estabelecer uma estimativa mais precisa do tempo de estocagem (GALVAN *et al.*, 2013).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O BIODIESEL

No cenário da matriz energética no ano de 2014, conforme a repartição da oferta interna de energia, o Brasil utiliza 39,4 % provenientes das fontes renováveis e 60,4 % das não renováveis valor que está acima da média mundial que foi de 13,2 % em 2012 (BEN, 2015).

Dentre os combustíveis obtidos de fontes renováveis, encontra-se o biodiesel, conhecido como uma mistura de ésteres mono-alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa (FAMES – *Fatty Acid Methyl Esters*) obtido por transesterificação de um óleo ou gordura com um álcool e catalisador (MARTINEZ *et al.*, 2014, DAUD *et al.*, 2015). Este combustível tem sido produzido com a finalidade de ser utilizado em veículos de ignição por compressão, podendo ser usado diretamente em motores existentes uma vez que as suas propriedades são em geral semelhantes às do diesel (CUNHA Jr *et al.*, 2013; BORSATO *et al.*, 2014).

No Brasil como em muitos outros países, a produção de energia tem provocado graves problemas ambientais devido ao uso, em larga escala, de combustíveis fósseis e seus derivados (KAERCHER *et al.*, 2013). Portanto, o uso desse biocombustível torna-se importante, pois é biodegradável e não tóxico, reduz a emissão de gases de escape dos motores diesel, tais como material particulado, hidrocarbonetos não queimados e monóxido de carbono, tornando-o ambientalmente amigável (BOUAD *et al.*, 2012; DAUD *et al.*, 2015).

Apesar do futuro promissor do biodiesel existem alguns entraves técnicos que devem ser vencidos para a produção do biocombustível, que vai desde a necessidade de encontrar uma matéria-prima, para extração do óleo, que seja viável econômica e tecnologicamente até a preocupação com a caracterização do produto final que deve estar de acordo com as normas de comercialização (CUNHA Jr *et al.*, 2013; SOUSA *et al.*, 2014).

Várias culturas de oleaginosas vêm sendo estudadas para serem empregadas na produção de biodiesel, algumas com maior eficiência, contudo fatores como o clima e a região do país, podem determinar e influenciar na escolha da melhor para a produção de biodiesel (CREMONEZ *et al.*, 2015).

Atualmente, a soja é a principal das oleaginosas no que se refere a

produção e comércio internacional e o seu óleo é o mais utilizado na produção de biodiesel (ISSARIYAKUL *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2015). De acordo com o Ministério de Minas e Energia, em 2014 a principal matéria-prima para a produção do biocombustível foi o óleo de soja (69,2 %), seguido do sebo bovino (17,0 %) e de outras tais como gordura de ave, óleo residual, gordura suína, dentre outras (ORIVES *et al.*, 2014; BEN, 2015).

No entanto 84 % dos ácidos graxos do óleo de soja são insaturados como ácido oleico (C18: 1), ácido linoleico (C18: 2) e linolênico (C18:3). Essa característica indesejável é incorporada ao biocombustível, favorecendo os processos de oxidação, o que conduz a formação de peróxidos e hidroperóxidos que diminuem a sua estabilidade, promovendo a formação de gomas, gerando com isso dificuldades em seu armazenamento (FERRARI *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2011; KREIVAITIS *et al.*, 2013; ISSARIYAKUL *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2015).

Para ser comercializado, o biodiesel deve manter as suas características essenciais pouco alteradas durante o período de armazenamento, assim a manutenção da sua qualidade durante um tempo de armazenamento maior tem sido uma grande preocupação para produtores e fornecedores do biodiesel (ALMEIDA *et al.*, 2015).

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) regulamenta parâmetros de conformidade no qual o biodiesel deve estar adequado através da Resolução nº 14, de 11.5.2012 para produto comercializável. A estabilidade à oxidação expressa através do Período de Indução (PI) refere-se ao processo de degradação que modifica as propriedades químicas e físicas do biocombustível é uma das especificações de grande importância na análise do biodiesel (PULLEN; SAEED, 2012).

## 2.2 ESTABILIDADE OXIDATIVA

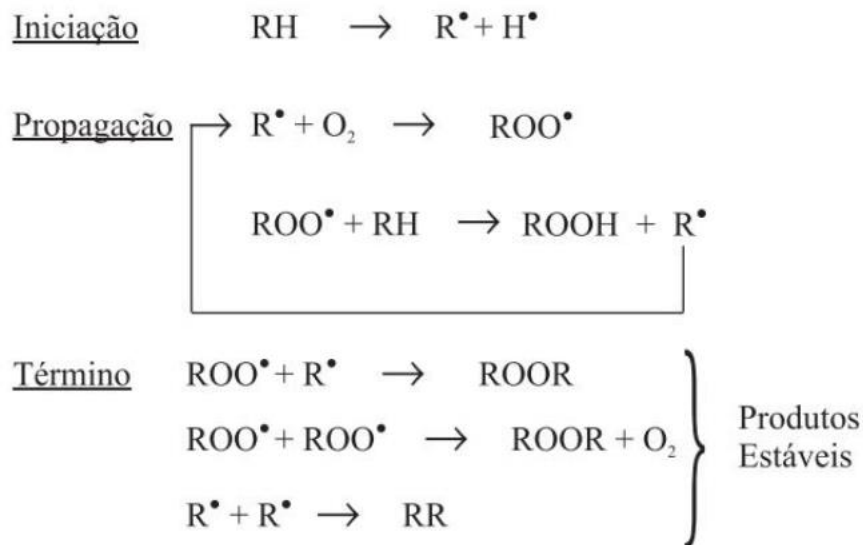
Diferentemente dos combustíveis fósseis que são relativamente inertes, o biodiesel devido à variedade de óleos e gorduras utilizados na sua fabricação, tende a degradar-se e alterar-se quando exposto a presença do oxigênio do ar, luz, temperatura, enzimas, íons de elementos metálicos e umidade, tornando difícil garantir sua qualidade, de forma a atender a todos os parâmetros de

conformidade obrigatórios para a sua comercialização (DAMASCENO *et al.*, 2013; BORSATO *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2015).

A degradação do biodiesel devido a oxidação, pode alterar significativamente propriedades como ponto de fulgor, teor de esteres, índice de acidez, viscosidade cinemática, densidade entre outros. No entanto mudanças em suas propriedades como a coloração de amarelo para marrom, pode indicar o progresso da oxidação (PULLEN; SAEED, 2014).

A auto-oxidação do biodiesel ocorre devido a presença de insaturações na cadeia do ácido graxo que oferece uma grande reatividade com o oxigênio (JAINN; SHARMA, 2011). O maior número de insaturações e a posição das duplas ligações, influenciam e torna a reação de oxidação dos FAMES mais susceptíveis. Essa reação ocorre em três etapas: a iniciação, propagação e terminação como descrito na Figura 1 (YAAKOB *et al.*, 2014).

**Figura 1** – Reação de oxidação



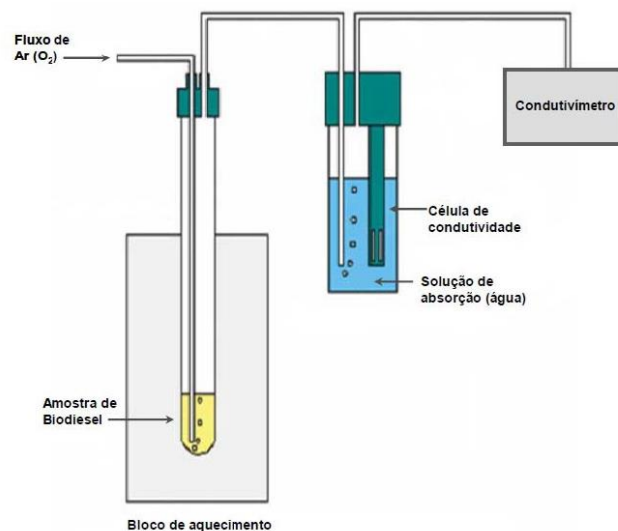
**Fonte:** Ramalho; Jorge (2006)

Na iniciação o hidrogênio alílico ou bis-alílico dos FAMES insaturados é facilmente removido para formar um radical ( $R^{\bullet}$ ), que em seguida reage com o oxigênio formando um peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ) e/ ou um hidroperóxido ( $ROOH$ ). Este radical peróxido cria imediatamente um novo radical ( $R^{\bullet}$ ) dos FAMES, que por sua vez se liga a outro oxigênio do ar, dando início a uma reação em cadeia, com uma taxa de decomposição exponencial. Ao término, dois radicais livres

combinam-se resultando na formação de uma série de produtos secundários (PULLEN; SAEED, 2012).

O método Rancimat<sup>®</sup> tem sido utilizado para determinar a estabilidade oxidativa do biodiesel como padrão na norma EN 14214 e tem sido utilizado para avaliar diferentes tipos de óleos como também a eficiência da adição de antioxidantes (EN 14214). A Figura 2 ilustra o funcionamento do Rancimat<sup>®</sup>.

**Figura 2** – Esquema de Funcionamento do Rancimat<sup>®</sup>



**Fonte:** Adaptado de Rancimat Metrohm (2013)

O método de ensaio acelerado, consiste em expor a aproximadamente 3 gramas de amostra a um fluxo de ar ( $10 \text{ L h}^{-1}$ ) na temperatura de  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nesse momento começa a formação dos produtos da primeira etapa da oxidação, os peróxidos. com a continuidade do processo, são formados compostos orgânicos voláteis que são transportados para o recipiente contendo solução de absorção (água destilada). A presença dessas moléculas é detectada através da célula de condutividade no sistema (LÔBO *et al.*, 2009).

A norma EN14112 determina que para um biodiesel estar em conformidade para comercialização, o período de indução mínimo deve ser de 6 horas.

## 2.3 ANTIOXIDANTES

O processo de oxidação pode ser inibido ou diminuído eliminando as condições que favorecem o início da oxidação ou com adição de antioxidantes que inibem a iniciação e propagação das reações químicas indesejáveis. Assim, surge a necessidade de aplicação de antioxidantes, a fim de manter as características físico-químicas do biodiesel, até ao seu uso (MCCORMICK *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2014).

De acordo com a forma de inibição, os antioxidantes são classificados em primários, sinérgicos, removedores de oxigênio singlete, agentes quelantes e mistos. Os grupamentos fenólicos são classificados como antioxidantes primários (BERNARDES *et al.*, 2011; RIZWANUL FATTAH *et al.*, 2014). O interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado devido a capacidade antioxidante dessa substância por sequestrar radicais livres (ASOLINI *et al.*, 2006).

A estrutura química dos fenóis é composta por uma ou mais hidroxilas ligadas a um dos carbonos de um anel aromático e, de acordo com o número de anéis aromáticos e grupamentos hidroxilas, são classificados como flavonóides, ácidos fenólicos, entre outros (DEL RÉ; JORGE, 2012).

A família *Labiatae* compreende 150 gêneros com aproximadamente 3500 espécies, sendo as principais o alecrim (*Rosmarinus* sp.), a sálvia (*Salvia* sp.), o orégano (*Oreganum* sp.), o tomilho (*Thymus* sp.), o manjeriço (*Ocimum* sp.), a manjerona (*Majorana* sp.) e a menta (*Mentha* sp.) (JUSTO *et al.*, 2008). Essas plantas possuem uma grande diversidade de compostos fenólicos.

O alecrim dentre as ervas da família *Labiatae*, é o mais estudado e seus extratos são os mais conhecidos como antioxidantes naturais. Essa atividade é decorrente da presença de compostos fenólicos tais como tocoferóis, ácidos fenólicos, flavonóides, diterpenos fenólicos, ácido carnósico e o carnosol, ácido rosmarínico e o rosmanol (JUSTO *et al.*, 2008; DEL RÉ; JORGE, 2012).

O orégano tanto em forma seca como óleo essencial, tem sido estudado como um potente antioxidante para sistemas lipídicos, tendo como fenóis os grupos dos ácidos fenólicos e os fenilpropanóides como timol e carvacrol (DEL RÉ; JORGE, 2012).

O manjeriço é outra especiaria que tem chamado atenção de pesquisadores. Possui os fenilpropanóides como timol, eugenol e carvacrol como

potenciais agentes antioxidantes (DEL RÉ; JORGE, 2012). No entanto, Lee e Scagel (2009) identificaram em sua pesquisa compostos como ácido chicórico e ácido caftárico também conhecidos por possuir atividade antioxidante.

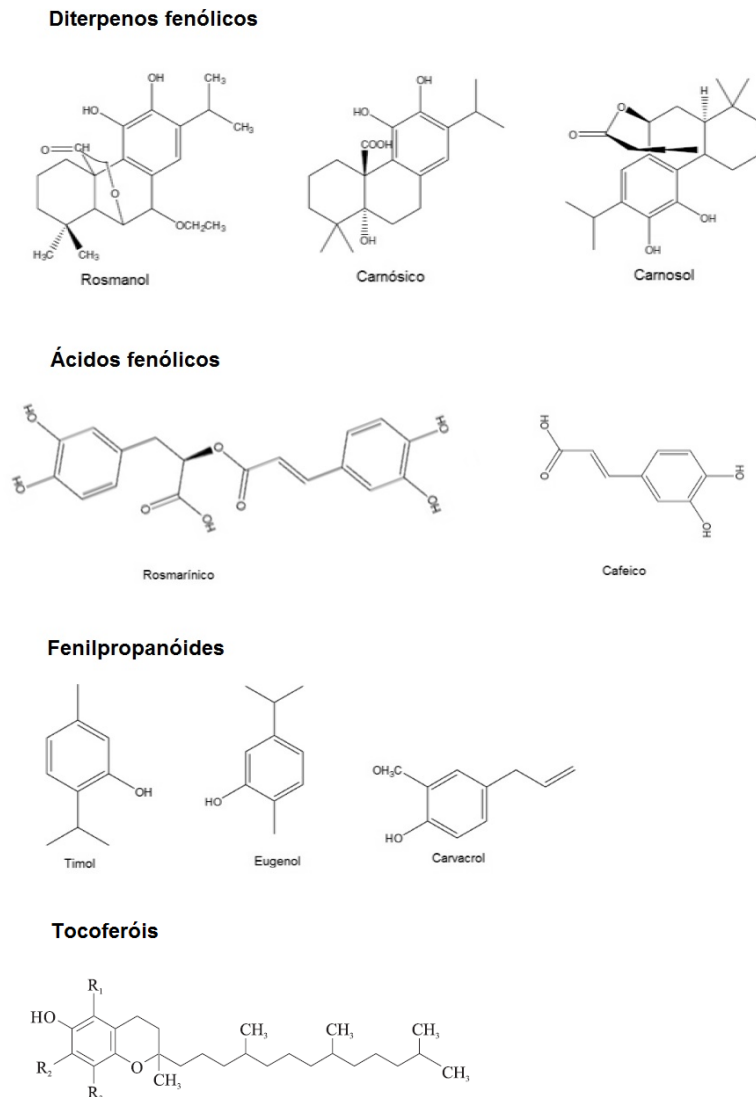
Dentre os condimentos o que mais tem sido estudado como antioxidante natural é o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) (DEL RÉ; JORGE, 2012) Além de ser utilizado em óleos comestíveis e biodiesel, estudos vem sendo realizados para a utilização de alecrim como antioxidante de óleos lubrificantes minerais (DELGADO *et al.*, 2014). Segundo Justo e colaboradores (2008) o gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) apresenta uma boa fonte de compostos fenólicos.

Del Ré e Jorge (2011) mostram que aplicando óleos de orégano e tomilho na concentração de 3000 mg kg<sup>-1</sup> pode substituir os antioxidantes sintéticos em óleo de soja. Coppo e colaboradores (2014) estudaram a estabilidade oxidativa e a estimativa do tempo de estocagem de biodiesel utilizando extrato alcoólico de manjerição. Luo *et al.* (2012), apresentaram um estudo sobre antioxidantes naturais incorporados no biodiesel de soja comparando seu efeito com os antioxidantes sintéticos. Coppo e colaboradores (2014) estudaram o efeito dos antioxidantes naturais na estabilidade oxidativa do biodiesel produzido através do óleo de soja, onde foi estimado o tempo de estocagem através do monitoramento de reação de oxidação em diferentes temperaturas.

A maioria dos trabalhos publicados mostra o efeito dos antioxidantes naturais em óleos comestíveis (AMAROWICZ; PEGG, 2008; CORDEIRO *et al.*, 2013; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; POKORNÝ, 2007) porém, até onde se sabe, poucos autores tem empregado os antioxidantes naturais em biodiesel (COPPO *et al.*, 2014).

A Figura 3 mostra as estruturas químicas dos principais compostos fenólicos presentes em especiarias.

**Figura 3 – Estrutura química dos compostos fenólicos presentes em especiarias.**



**Fonte:** Del Ré; Jorge (2012)

## 2.4 DELINEAMENTO DE MISTURAS

Para verificar a eficiência dos antioxidantes utilizados isoladamente ou em misturas, aplicados ao biodiesel, tem-se utilizado vários tipos de delineamentos e, dentre eles destaca-se o de mistura, que tem sido amplamente empregado como uma ferramenta para desenvolver novos produtos, otimizar formulações, reduzir os custos, solucionar problemas de fabricação, além de contribuir para interpretação dos dados (CINI *et al.*, 2013).

O simplex-centroide é um método muito conveniente de ser utilizado por não apresentar problemas que os delineamentos fatoriais apresentam nos casos

dos experimentos que envolvem misturas de componentes (SPACINO *et al.*, 2015). No entanto, é importante que a variação da soma dos componentes seja sempre igual a um, não sendo possível variar um dos itens e não variar os outros, pois as variáveis preditivas não são independentes (CINI *et al.*, 2013).

A metodologia é uma técnica eficiente para a otimização de processos, pois ela baseia-se na variação simultânea de fatores chamados de variáveis independentes que influenciam as respostas a serem obtidas, chamadas de variáveis dependentes. Através de técnicas matemáticas e estatísticas os resultados geram um gráfico de melhor combinação dentro de uma região ótima (GRIZOTTO *et al.*, 2005). A superfície de resposta obtida tem sido utilizada de forma a obter formulações ótimas determinando os efeitos das interações entre as variáveis independentes (CHEN *et al.*, 1993; GRIZOTTO *et al.*, 2005).

No entanto, muitos experimentos envolvendo misturas estão sujeitos a limites superior e inferior, o que se torna um problema, pois esses limites podem produzir respostas em regiões do delineamento com formas diferenciadas tornando impossível a utilização de alguns delineamentos (MCLEAN; ANDERSON, 1966).

Para resolver esse entrave foi proposta uma solução da realização dos experimentos em pontos extremos e vários centroides na região de restrição do delineamento. Conhecido como delineamento de vértices extremos, assim como os delineamentos de Scheffé, essa proposta permite explorar toda a região experimental (STEINBERG; HUNTER, 1984).

Vários autores têm utilizado essa ferramenta de otimização em seus trabalhos. Borsato e colaboradores (2014) apresentaram uma análise da cinética da oxidação de biodiesel B100 aplicando o delineamento simplex-centroide. Maia e colaboradores (2011) utilizando o mesmo delineamento, estudaram a eficiência de antioxidantes sintéticos, quando adicionados ao biodiesel B100 derivado de óleo de soja. Porém, não somente em biodiesel, outros autores tem utilizado essa ferramenta de otimização nos mais variados campos da ciência (SCHAMNE *et al.*, 2010; BORSATO *et al.*, 2014; DICIAULA *et al.*, 2014).

## 2.5 PARÂMETROS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS

A determinação da estabilidade oxidativa em diferentes temperaturas tem propiciado o estudo do efeito dos antioxidantes naturais na conservação do biodiesel, estimando o tempo de estocagem. A determinação de parâmetros cinéticos tais como constante de velocidade ( $k$ ) e energia de ativação ( $E_a$ ) bem como os parâmetros termodinâmicos como entalpia ( $\Delta H^\ddagger$ ), entropia ( $\Delta S^\ddagger$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\ddagger$ ) no estado ativado tem permitido avaliar a eficiência do uso de antioxidantes em biodiesel e estabelecer uma estimativa mais precisa do tempo de estocagem, usando o delineamento experimental de mistura (MAIA *et al.*, 2011; GALVAN *et al.*, 2013).

Galvan e colaboradores (2014) analisaram a influência dos antioxidantes sintéticos na energia de ativação na reação de oxidação do biodiesel e concluíram que a adição de antioxidantes eleva a energia de ativação, causando uma desaceleração na reação de oxidação. Borsato e colaboradores (2014) estudaram os parâmetros termodinâmicos da oxidação biodiesel produzido através de gordura de porco e óleo de soja com adição de antioxidantes sintéticos como butil hidroxianisol (BHA), butil hidróxitolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e propilgalato (PG). Os resultados obtidos mostraram um processo não espontâneo para  $\Delta H^\ddagger$ ,  $\Delta S^\ddagger$  e  $\Delta G^\ddagger$ . Spacino e colaboradores (2015) verificaram a eficiência dos antioxidantes naturais nos parâmetros termodinâmicos do biodiesel obtido através de óleo de soja e concluíram que o processo de oxidação é inibido quando utilizado uma mistura 50% de extrato etanólico de alecrim, 25% de extrato etanólico de orégano e 25% de extrato etanólico de manjeriço.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos do biodiesel B100 em mistura com antioxidantes naturais.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o teor de compostos fenólicos totais nos extratos alcoólicos de antioxidantes naturais.
- Determinar a atividade dos compostos fenólicos dos extratos alcoólicos de antioxidantes naturais.
- Determinar a estabilidade oxidativa do biodiesel pelo método Rancimat®.
- Determinação da constante de velocidade e energia de ativação da reação de oxidação do biodiesel obtido.
- Determinação da entalpia e entropia do estado ativado através da equação derivada da teoria complexo ativado (equação de Eyring).
- Avaliar a eficiência dos antioxidantes naturais em biodiesel B100 obtido a partir de óleo de soja.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO

O biodiesel utilizado, foi obtido através da reação de transesterificação dos triglicerídeos do óleo de soja, utilizando metanol e como catalisador metóxido de sódio na concentração de 0,8 g 50 mL<sup>-1</sup> de álcool metílico em 100 g de óleo de soja.

Os reagentes foram colocados no balão e aquecidos, sob refluxo, em chapa aquecedora a 60 °C durante 2 horas em agitação lenta.

Depois do tempo reacional, os produtos obtidos foram transferidos para um funil de separação e então foi deixado por 2 horas em repouso para obter a separação entre a glicerina e o biodiesel (DIAS *et al.*, 2014).

### 4.2 PURIFICAÇÃO DO BIODIESEL

Para promover a separação do glicerol, triglicerídeos e os álcoois presentes, os ésteres obtidos foram lavados primeiramente com solução de ácido acético glacial em água a 1 % e em seguida lavados com água, ambos à 80 °C e, a cada lavagem era medido o pH da água até o pH neutro. Após a neutralização, o biodiesel obtido foi desumidificado com sulfato de sódio anidro e filtrado a vácuo (DIAS *et al.*, 2014).

### 4.3 ANÁLISE FÍSICO QUÍMICA

Massa específica a 20 °C foi determinada de acordo com a norma ABNT NBR 7148, o ponto de fulgor de acordo com ABNT NBR 14598, o índice de acidez pela norma ABNT NBR 14448 e o teor de éster de acordo com EN 14110.

### 4.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chamas (CG-FID) modelo Thermo Ultra 3300 e coluna CP-7420 (100% cianopropil / polissiloxano com 100 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de

espessura do filme interno. O aquecimento do forno inicializado a 165 °C durante 7 minutos, e, em seguida, aquecido a uma velocidade de 4 °C min<sup>-1</sup> até 185 °C, mantida esta temperatura durante 4,67 min e, finalmente, aqueceu-se a uma taxa de 6 °C min<sup>-1</sup> até atingir 235 °C, onde foi mantida durante 5 min. Os fluxos de H<sub>2</sub> foi de 1,2 mL min<sup>-1</sup>, de N<sub>2</sub> de 30 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção foi de 2,0 µL.

#### 4.5 EXTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES

Foram utilizados extratos alcoólicos de três condimentos naturais adquiridos na forma desidratada: alecrim (*Rosmarinus sp*), orégano (*Origanum vulgare sp*) e manjerição (*Ocimum sp*).

##### 4.5.1 EXTRATOS ADICIONADOS AO BIODIESEL

Foram pesados 10 g de cada condimento e adicionados separadamente em 250 mL de etanol absoluto misturando com auxílio de um bastão de vidro; as três misturas foram mantidas durante 48 h em repouso e os extratos foram submetidos à filtração (COPPO *et al.*, 2014; SPACINO *et al.*, 2015).

Os filtrados foram evaporados com auxílio de uma chapa aquecedora até a obtenção de aproximadamente 50 mL a 60 °C, então foram transferidos para balões volumétricos de 50 mL e então completados o volume com etanol absoluto. A proporção dos extratos adicionados em cada amostra foi estabelecida pelo delineamento de mistura utilizado e adicionados ao biodiesel, na concentração de 0,8 % (v/v), após total evaporação do álcool etílico e antes da avaliação da estabilidade oxidativa (COPPO *et al.*, 2014).

##### 4.5.2 EXTRATO DOS ANTIOXIDANTES PARA LIOFILIZAÇÃO

Foram pesados 10 g de cada condimento e adicionados separadamente em 250 mL de etanol absoluto misturando com auxílio de um bastão de vidro; as três misturas foram mantidas durante 48 h em repouso e os extratos foram submetidos à filtração (COPPO *et al.*, 2014; SPACINO *et al.*, 2015).

Os filtrados foram evaporados a 60°C com auxílio de uma chapa aquecedora até quase secura dos extratos. O extrato foi retirado com auxílio de uma

espátula e colocado em pequenos potes de vidro e depois levados ao freezer até o momento da liofilização.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A quantificação de compostos fenólicos totais nos extratos foi realizada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (KUMAZAWA *et al*, 2004). Esse reagente consiste na mistura de ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico que possuem estado de oxidação 6+. Porém, quando em contato com compostos fenólicos, os metais mudam para estado de oxidação para 5+, passando a apresentar coloração azul, o que permite determinar a presença de agentes redutores no meio (SOUSA *et al.*, 2007). O conteúdo total de compostos fenólicos em cada extrato foi determinado por espectrofotometria utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, segundo a metodologia descrita por Kumazawa e colaboradores (2004).

Foram preparadas duas soluções para a obtenção da curva analítica (solução A e B) utilizando como reagente padrão o ácido gálico (ácido 3, 4, 5-triidroxibenzóico). Para o preparo da solução A, foram pesados 0,0100 g de ácido gálico, transferido para um balão de 5 mL e completado o volume com etanol 80%.

A solução B, foi feita transferindo-se 1 mL da solução A para um balão de 5 mL e então foi completado o volume com água destilada.

A diluição para a curva foi realizada utilizando balões volumétricos de 5mL segundo a Tabela 1.

**Tabela 1-** Diluições do reagente padrão ácido gálico para a curva analítica.

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Solução B ( $\mu\text{L}$ )	Água destilada (mL)
4	50	4,95
6	75	4,93
8	100	4,90
12	150	4,85
16	200	4,80
20	250	4,75
24	300	4,70

**Fonte:** Kumazawa et al., 2004.

Foi realizada a diluição do reagente Folin Ciocautau 2 N (SIGMA-ALDRICH) para a concentração 0,6 N e preparada uma solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 10 % (m/v) ambos em água destilada.

As leituras da curva padrão, amostras e branco foram realizadas no espectrofotômetro PerkinElmer modelo UV/VIS Lambda 25, seguindo o modelo:

Para o branco foram adicionados ao tubo de ensaio:

- 0,5 mL de água destilada
- 0,5 mL do reagente Folin Ciocautau 0,6 N
- 0,5 mL da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 %.

Para os padrões ou amostras foram adicionados aos tubos de ensaio:

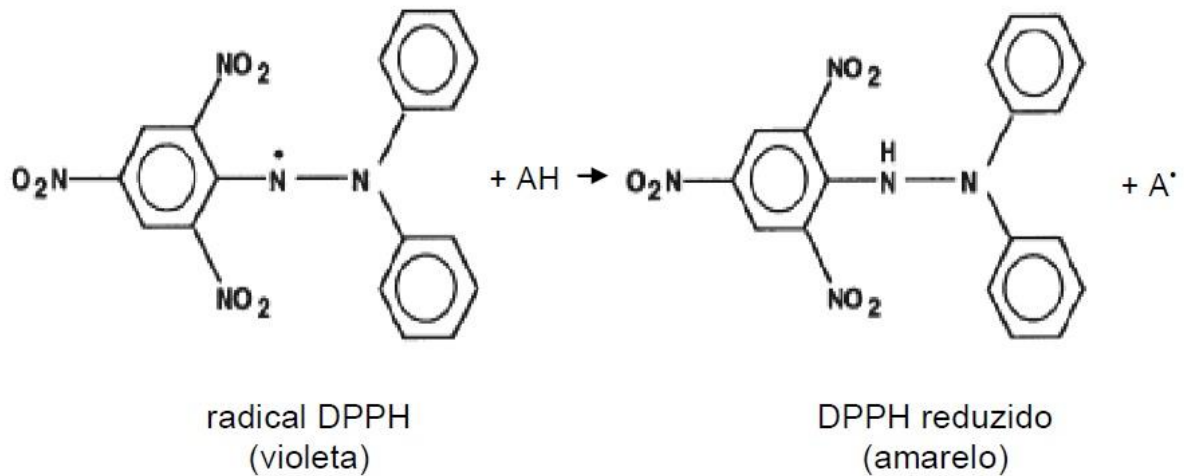
- 0,5 mL de padrão ou amostra
- 0,5 mL do reagente Folin Ciocautau 0,6 N
- 0,5 mL da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 %.

Em seguida os tubos de ensaios foram colocados em banho termostático a 50 °C por 7 minutos. Decorrido o tempo, as amostras foram retiradas e resfriadas por mais 7 minutos, então foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 760 nm.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O método do DPPH (*2, 2 – Diphenyl – 1 – picrylhydrazyl*) consiste em um radical estável que mesmo em solução apresenta uma coloração violeta intensa que, quando em contato com outra substância capaz de sequestrar o radical livre do DPPH a cor da solução começa a perder sua intensidade. A equação da reação do DPPH é apresentada na Figura 4.

**Figura 4** – Reação de redução do DPPH em presença de compostos fenólicos.



**Fonte:** OLIVEIRA, 2015.

A atividade antioxidante em cada extrato foi determinada por espectrofotometria utilizando o reagente de coloração DPPH e reagente padrão o Trolox (ácido 6 - hidróxi - 2, 5, 7, 8- tetrametilcromano - 2- carboxílico), segundo a metodologia descrita por Casagrande e colaboradores (2007).

Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos foram preparadas as seguintes soluções:

- *Tampão acetato 0,1 M com pH 5,5 em água destilada.* Para o preparo de 100 mL da solução tampão, foram feitas soluções de acetato de sódio e ácido acético ambas na concentração 0,1 M. As soluções foram misturadas de modo a obter o pH próximo de 5,5 utilizando aproximadamente 85 mL da solução de acetato de sódio 0,1M e 15 mL de ácido acético. O pH foi conferido utilizando-se fitas de pH.
- *Solução de DPPH 1000 µM em etanol.* Foi preparada uma solução estoque do reagente DPPH na concentração 1000 µM. Para o uso na análise, foi realizada diluição da solução estoque para concentração de 250 µM.
- *Solução padrão de Trolox 10 mM em etanol.* Foi preparada uma solução de Trolox como reagente padrão na concentração de 10 mM em etanol absoluto.

As leituras da curva padrão, amostras e branco foram realizadas no espectrofotômetro PerkinElmer modelo UV/VIS Lambda 25.

Para fazer a curva analítica foram utilizadas as proporções de reagentes seguindo as informações da Tabela 2.

**Tabela 2** - Diluições do reagente padrão Trolox para a curva analítica.

Trolox 10 mM (mL)	Etanol absoluto (mL)	Volume final (mL)	Concentração (mM)
0,2	9,8	10	0,2
0,4	9,6	10	0,4
0,3	4,7	5	0,6
0,4	4,6	5	0,8
0,5	4,5	5	1,0

**Fonte:** Casagrande *et al.*, (2007).

A leitura da curva padrão, amostras e branco foi realizada no espectrofotômetro seguindo o modelo:

Para o branco foram adicionados ao tubo de ensaio:

- 1,0 mL de tampão acetato 0,1 M
- 1,5 mL de etanol absoluto
- 0,5 µL de solvente extrator.

Para os padrões ou amostra foram adicionados aos tubos de ensaio:

- 1,0 mL de tampão acetato 0,1 M
- 1,0 mL de etanol absoluto
- 0,5 µL de padrão ou amostra
- 0,5 mL de DPPH 250 µL.

Logo após adicionar o reagente DPPH nos tubos, eles foram vedados e levados ao abrigo da luz por 15 minutos e então feita a leitura no espectrofotômetro a 517 nm.

#### 4.8 LIOFILIZAÇÃO DOS EXTRATOS

As amostras dos extratos dos antioxidantes naturais congeladas a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  em refrigerador (Consul) foram secas em liofilizador modelo 4KBTXL-75 (Vertis SP Scientific – Sentry 2.0). A temperatura do início da liofilização foi de  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  e as amostras permaneceram 12 horas no equipamento até secagem.

#### 4.9 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

A caracterização térmica das amostras foi realizada no aparelho Thermometric Analyzer PerkinElmer, modelo TGA 4000. Uma massa de aproximada de 10 mg de cada amostra dos extratos secos dos antioxidantes naturais utilizados, foi analisada em atmosfera de nitrogênio com fluxo de gás de  $20\text{ mL min}^{-1}$ , com razão de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , na faixa de temperatura de 25 a  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

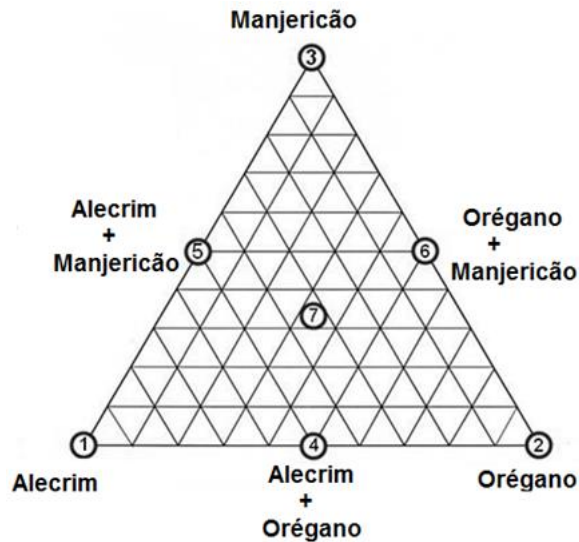
#### 4.10 TESTE RANCIMAT

Três gramas das amostras de biodiesel contendo as proporções de antioxidantes naturais estabelecidas pelo delineamento simplex centroide, assim como as amostras controle foram levadas ao aparelho Rancimat modelo 873 (Metrohm® - Herisau / Switzerland) seguindo a norma EN 14112. As amostras foram aquecidas a 110, 115, 120 e  $125\text{ }^{\circ}\text{C}$  com taxa de insuflação de ar de  $10\text{ L h}^{-1}$  para determinação do período de indução (PI).

#### 4.11 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA MISTURA (STATISTICA, 2009)

Foi utilizado o planejamento simplex-centroide (Figura 5), com duas repetições no ponto central com  $2^q-1$  combinações onde q é igual a 3 que é o número de variáveis independentes (extratos de alecrim, orégano e manjeriço) (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

**Figura 5** – Delineamento simplex-centroide para as variáveis alecrim, orégano e manjeriço.



**Fonte:** Próprio autor

#### 4.12 MODELO MATEMÁTICO

A função utilizada foi do tipo:

$$Y = \sum_{1 \leq i \leq q} \gamma_i^{\circ} x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq q} \gamma_{ij}^{\circ} x_i x_j + \gamma_{123}^{\circ} x_1 x_2 x_3 \quad \text{Eq (1)}$$

Na equação, Y representa a função resposta dos dados experimentais (entalpia, entropia do estado ativado e energia livre de Gibbs) e  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  são as variáveis independentes e correspondem, respectivamente a proporção do extrato seco de alecrim, orégano e manjeriço na mistura e  $\gamma$  os coeficientes estimados (CORNELL, 1990).

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros estatísticos dos modelos, os coeficientes de determinação ( $R^2$ ), a análise de variância (ANOVA) e a otimização multirresposta foram obtidos por meio do software Statistica v.9.0 (2009).

#### 4.14 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

As constantes de velocidade ( $k$ ), nas temperaturas de 110, 115, 120 e 125°C, foram determinadas considerando-se a reação como de primeira-ordem de acordo com a equação 1 (CHEN; LUO, 2011).

$$\ln \sigma = \ln \sigma_0 - kt \quad \text{Eq (2)}$$

A energia de ativação da reação foi obtida utilizando a equação de Arrhenius para diferentes temperaturas (LEVENSPIEL, 1999).

$$\ln(k) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad \text{Eq (3)}$$

Em que  $k$  é a constante de velocidade da reação,  $A$  é o fator pré-exponencial,  $E_a$  é a energia de ativação ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ),  $R$  é a constante molar dos gases ( $8,314510 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) e  $T$  é a temperatura absoluta (K).

#### 4.15 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS TERMODINÂMICOS

A Entalpia ( $\Delta H^\ddagger$ ) e a Entropia ( $\Delta S^\ddagger$ ) dos estados ativados foram determinadas pela regressão de  $\ln(k/T)$  vs.  $1/T$  por meio da equação 4, que é derivada da teoria do complexo ativado, equação de Eyring (EYRING, 1935; LABUZA, 1980):

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \left(\frac{S^\ddagger}{R}\right) - \left(\frac{H^\ddagger}{R}\right)\left(\frac{1}{T}\right) \quad \text{Eq (4)}$$

Onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann ( $1,380658 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ) e  $h$  é a constante de Planck ( $6,6260755 \times 10^{-34} \text{ J s}$ ).  $\Delta H^\ddagger$  e  $\Delta S^\ddagger$  foram então obtidos pelas inclinações e intersecções das curvas.

A energia Livre de Gibbs foi obtida da relação entre entropia, entalpia e temperatura através da equação:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger \quad \text{Eq (5)}$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ENSAIOS PRELIMINARES PARA A ESCOLHA DA CONCENTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES

Para iniciar os experimentos foi realizado um ensaio preliminar com diferentes concentrações dos extratos contendo os antioxidantes naturais em biodiesel nas concentrações 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 % (v/v) e amostra controle que é a amostra de biodiesel sem a adição de antioxidantes. A média dos resultados é apresentada na Tabela 3.

**Tabela 3** - Período de indução em horas, obtido das análises preliminares do biodiesel contendo os extratos dos antioxidantes naturais.

Antioxidantes	Período de indução (h)					
	0,0 <sup>a</sup>	0,2 <sup>b</sup>	0,4 <sup>c</sup>	0,6 <sup>d</sup>	0,8 <sup>e</sup>	1,0 <sup>f</sup>
e Controle	0,0 <sup>a</sup>	0,2 <sup>b</sup>	0,4 <sup>c</sup>	0,6 <sup>d</sup>	0,8 <sup>e</sup>	1,0 <sup>f</sup>
Alecrim	--	4,95	7,16	8,41	10,02	10,35
Orégano	--	6,12	6,84	6,99	7,03	7,51
Manjeriçã	--	--	5,82	6,04	6,08	6,03
Controle	2,16	--	--	--	--	--

a, b, c, d, e, f Concentração em % (v/v) dos extratos dos antioxidantes naturais utilizados

**Fonte:** Próprio autor

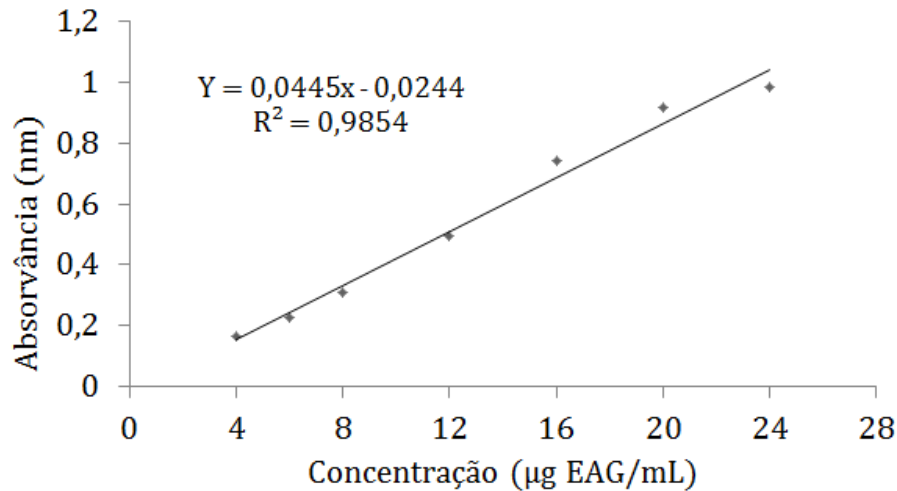
Para escolher a concentração dos antioxidantes levamos em consideração a norma EN 14112 que estabelece um período de indução (PI) mínimo de 6 horas. Na concentração 0,2 % (v/v) o PI do alecrim foi inferior a norma, em 0,4 % (v/v) o extrato de manjeriçã não alcançou o valor mínimo. A partir da concentração 0,6 % (v/v) todos os extratos apresentaram PI maior que 6 horas, então para garantir o valor mínimo estabelecido pela norma EN 14112 foi escolhida a concentração de 0,8 % (v/v).

### 5.2 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE

Para quantificar o teor de compostos fenólicos totais, primeiramente foi estabelecida uma curva analítica de calibração utilizando como reagente padrão

o ácido gálico. Com os dados foi gerado um gráfico, com reta ascendente e, através do ajuste linear foi obtida a equação da reta com  $R^2$  de 0,9854 (Figura 6).

**Figura 6** - Curva de calibração para a determinação de fenóis totais.



**Fonte:** Próprio autor

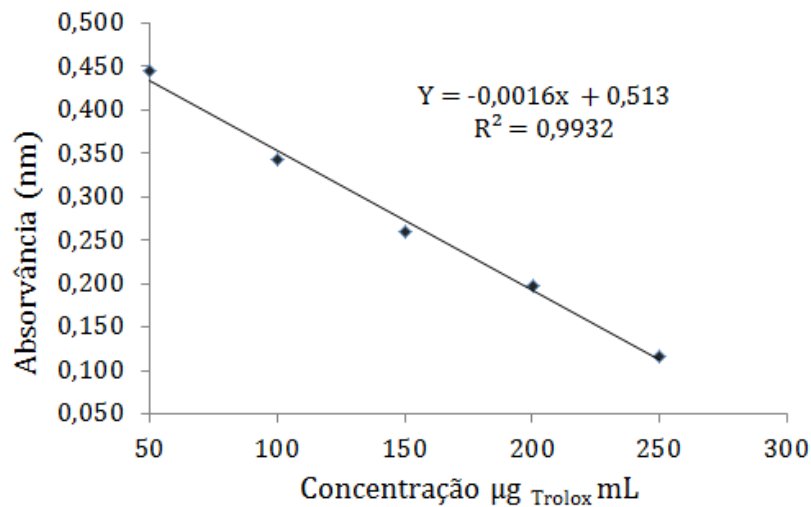
Com a equação da reta estabelecida, foram realizadas as leituras dos extratos de alecrim, orégano e manjerição. Os resultados da leitura em espectrofotômetro, diluição e o teor de fenóis totais estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** - Diluição, leitura e teor de fenóis totais nos extratos de alecrim, orégano e manjerição.

Extratos	Diluição	Absorvância (nm)	Teor de Fenóis Totais $\text{mg}_{\text{EAG}} \text{g}^{-1}_{\text{massa seca}}$
Alecrim	1/200	0,688	17,662
Orégano	1/200	0,632	16,306
Manjerição	1/25	0,583	1,939

**Fonte:** Próprio autor

Para a análise da atividade antioxidante dos extratos, também foi estabelecida uma curva de calibração utilizando como reagente padrão o Trolox. Com os dados foi gerado um gráfico linear, com reta descendente, através do ajuste linear foi obtida a equação da reta com  $R^2$  de 0,9932 (Figura 7).

**Figura 7** - Curva de calibração para a determinação da atividade antioxidante.

**Fonte:** Próprio autor

Após a leitura da curva, foram realizadas as leituras dos extratos de alecrim, orégano e manjeriço. Os resultados da leitura em espectrofotômetro, diluição e a atividade antioxidante de cada extrato estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Diluição, leitura e medida da atividade antioxidante nos extratos de alecrim, orégano e manjeriço.

Extratos	Diluição	Absorvância (nm)	Atividade antioxidante ( $\text{mgEAG g}^{-1}\text{massa seca}$ )
Alecrim	1/50	0,225	49,647
Orégano	1/50	0,393	20,727
Manjeriço	1/10	0,422	3,232

**Fonte:** Próprio autor

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DO BIODIESEL

O biodiesel utilizado para avaliar a eficiência dos antioxidantes naturais apresentou ponto de fulgor de 178,5 °C, massa específica a 20 °C de 872 kg/m<sup>3</sup>, índice de acidez de 0,10 mgKOH/g e teor de ésteres igual 98,69 %<sub>massa</sub> estando, para estes parâmetros, de acordo com a Resolução ANP 14, de 11/05/2012 – DOU 18/05/2012 (BRASIL, 2012). O período de indução a 110 °C para a amostra de

biodiesel B100, sem a presença de antioxidantes, foi de 2,16 h estando, portanto, fora das especificações estabelecidas pela mesma resolução que prevê um valor mínimo de 6 h (Tabela 6).

**Tabela 6** – Parâmetros de conformidade do biodiesel utilizado, segundo ANP.

Característica	Método de ensaio	Unidade	Limite	Resultado
Massa específica a 20 °C	ASTM D1298	kg/m <sup>3</sup>	850-900	872
Ponto de fulgor	ASTM D93	°C	Min.100	178,5
Índice de acidez	ASTM D664	mg <sub>KOH</sub> /g	Max. 0,50	0,10
Estabilidade Oxidativa a 110 °C	EN 14112	hora	Min 6 h	2,16
Teor de éster	EN 14103	% <sub>massa</sub>	Min. 96,5	98,69

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA

Antes da avaliação da estabilidade oxidativa, as amostras do biodiesel B100 foram misturadas com os extratos dos três condimentos contendo os antioxidantes naturais, isentos de álcool, e então foi realizado o teste de estabilidade oxidativa pelo método Rancimat (EN 14214).

Para nortear o experimento e avaliar o efeito dos antioxidantes naturais, foi utilizado o delineamento de misturas simplex centroide composto por 7 experimentos e 2 repetições no ponto central contendo as variáveis individuais alecrim ( $x_1$ ), orégano ( $x_2$ ) e manjeriço ( $x_3$ ) juntamente com as misturas binárias e ternárias adicionados ao biodiesel.

A Tabela 7 mostra os valores do período de indução (PI) que correspondem ao ponto de inflexão das curvas de condutividade *versus* tempo dos 9 ensaios realizados através do delineamento de misturas (Figura 5) e o controle, obtidos através do teste de estabilidade oxidativa nas temperaturas 110, 115, 120 e 125 °C.

**Tabela 7** - Delineamento de mistura simplex centroide e período de indução nas diferentes temperaturas utilizadas.

Ensaio	Misturas*	Período de indução (h)			
		110 °C	115 °C	120 °C	125 °C
1	(1; 0; 0)	9,40	6,79	4,92	3,59
2	(0; 1; 0)	9,20	6,65	4,74	3,25
3	(0; 0; 1)	8,02	5,41	3,88	2,63
4	(½; ½; 0)	10,18	7,49	5,14	3,58
5	(½; 0; ½)	9,43	6,07	4,47	3,09
6	(0; ½; ½)	9,44	6,03	4,17	2,80
7	(⅓; ⅓; ⅓)	9,68	6,75	4,82	3,45
8	(⅓; ⅓; ⅓)	9,56	6,83	4,75	3,38
9	(⅓; ⅓; ⅓)	9,10	6,80	4,80	3,42
Controle	(0; 0; 0)	2,73	2,11	1,51	1,11

\* Proporção (alecrim, orégano e manjeriço).

**Fonte:** Próprio autor

Segundo a literatura, o biodiesel é suscetível à degradação devido a diversos fatores, sendo um deles o térmico (DAMASCENO *et al.*, 2013; BORSATO *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2015). A Tabela 6 mostra que o PI decresce com o aumento da temperatura em todos os ensaios mostrando realmente a influência da temperatura no processo de oxidação do biodiesel. No entanto, os valores de PI nos 9 ensaios contendo os antioxidantes, foram maiores que o valor obtido pelo controle, sendo assim, o uso dos antioxidantes foi importante na proteção do biodiesel, quando comparado o período de indução do controle e das amostras contendo os antioxidantes.

A Tabela 7 nos mostra que a 110 °C, em todos os ensaios contendo os extratos dos antioxidantes, o PI foi maior que 6 h, valor mínimo estipulado pela norma EN 14112 e, entre os tratamentos, o que apresentou maior valor de PI em todas as temperaturas foi o ensaio 4 contendo extratos de alecrim e orégano e o ensaio com menor PI foi o ensaio 3 contendo somente manjeriço. O período de indução do controle a 110 °C foi menor que o estabelecido pela norma mostrando a eficácia dos antioxidantes naturais no processo de inibição à oxidação do biodiesel.

Os modelos representados pelas equações 6, 7, 8 e 9 foram obtidos através do período de indução a 110, 115, 120 e 125 °C respectivamente. Nas equações estão apresentados somente os termos significativos em nível de 5 %.

$$Y_{110^{\circ}\text{C}} = 9,8531x_1 + 9,6971x_2 + 8,4531x_3 \quad \text{Eq (6)}$$

$$Y_{115^{\circ}\text{C}} = 6,7797x_1 + 6,6517x_2 + 5,4014x_3 + 3,0971x_1x_2 + 4,6328x_1x_2x_3 \quad \text{Eq (7)}$$

$$Y_{120^{\circ}\text{C}} = 4,9433x_1 + 4,7400x_2 + 3,9033x_3 + 1,1933x_1x_2 - 0,60667x_2x_3 + 5,2900x_1x_2x_3 \quad \text{Eq (8)}$$

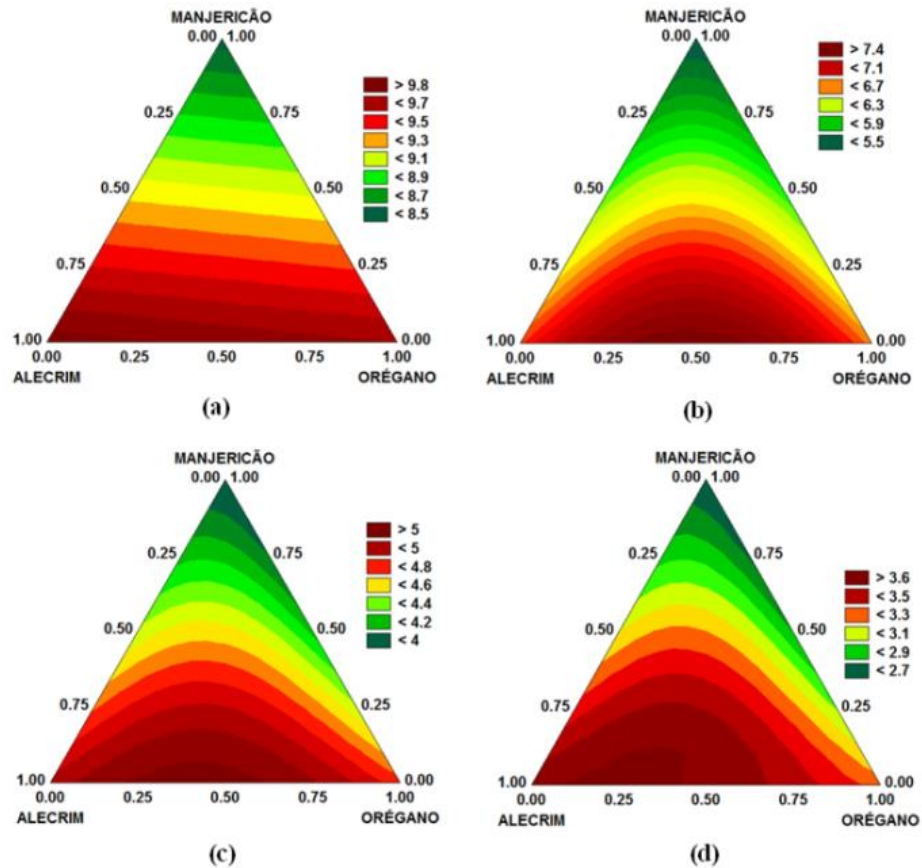
$$Y_{125^{\circ}\text{C}} = 3,5833x_1 + 3,2500x_2 + 2,6233x_3 + 0,6533x_1x_2 - 0,5466x_2x_3 + 6,8200x_1x_2x_3 \quad \text{Eq (9)}$$

Todos os termos lineares apresentaram o coeficiente positivo indicando que eles influenciam positivamente o período de indução, na equação 6 somente os termos lineares foram significativos, nas equações 8 e 9, o termo  $x_2x_3$  mostrou uma influência negativa no resultado. O termo  $x_1x_2$  positivo nas equações 7, 8 e 9 indica sinergismo entre alecrim e orégano, pois o PI da mistura alecrim e orégano foi maior do que quando comparados isoladamente (Tabela 7).

As regiões de contorno que representam as proporções das variáveis independentes alecrim, orégano e manjerição no biodiesel, nas temperaturas analisadas, podem ser observadas por meio das curvas de nível apresentadas na Figura 8.

A Figura 8 (a) mostra a linearidade da equação apresentada pelo modelo matemático obtido indicando que para obter melhor proteção do biodiesel é indicada uma maior proporção de alecrim. Nas Figuras 8 (b) e 8 (c) observa-se que o ótimo para a estabilidade oxidativa situa-se na região que apresenta uma proporção de 0,5 de alecrim e 0,5 de orégano. A Figura 8 (d) mostra um desvio da região ótima para o extrato de alecrim e as curvas de nível se direcionando para a inclusão do extrato de manjerição.

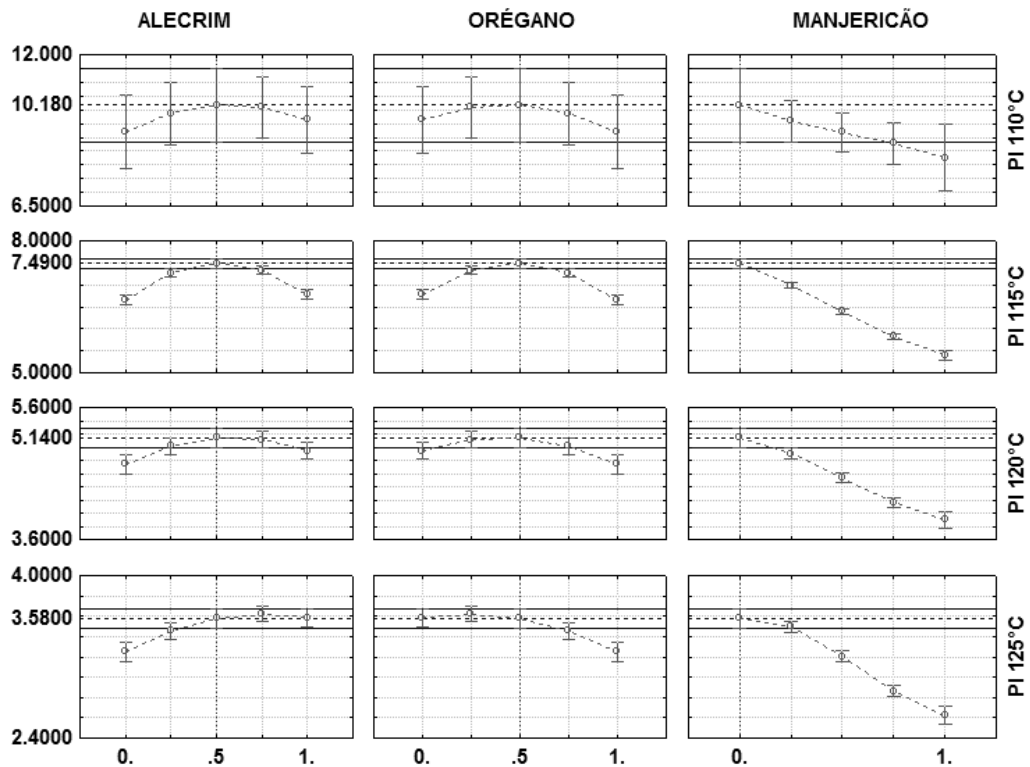
**Figura 8** - Região de combinação das variáveis alecrim, orégano e manjerição nas temperaturas 110 °C (a), 115 °C (b), 120 °C (c) e 125 °C (d)



Fonte: Próprio autor

A Figura 9 mostra que para se obter a melhor proteção do biodiesel em todas as temperaturas na otimização conjunta dos extratos dos antioxidantes naturais utilizados, a melhor proporção foi aquela contendo 50 % de alecrim e 50 % de orégano, com destaque para o tratamento a 110 °C que apresentou um PI de 10,28 h que foi o mesmo valor obtido experimentalmente, mostrando assim a eficiência do delineamento de misturas e a validade dos modelos obtidos.

**Figura 9** - Otimização conjunta para o período de indução nas temperaturas analisadas.



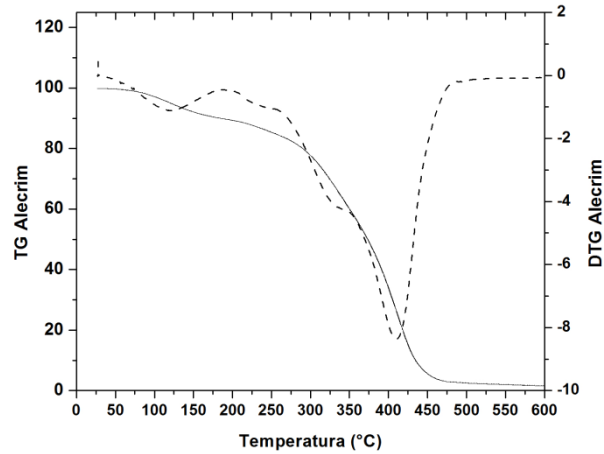
Fonte: Próprio autor

### 5.5 ANÁLISE TÉRMICA DOS EXTRATOS (TG)

Para maior entendimento do comportamento de estabilidade térmica dos extratos contendo os antioxidantes naturais, foi realizada a análise termogravimétrica, que é uma técnica que relaciona a perda ou ganho de massa da amostra em função do tempo ou da temperatura.

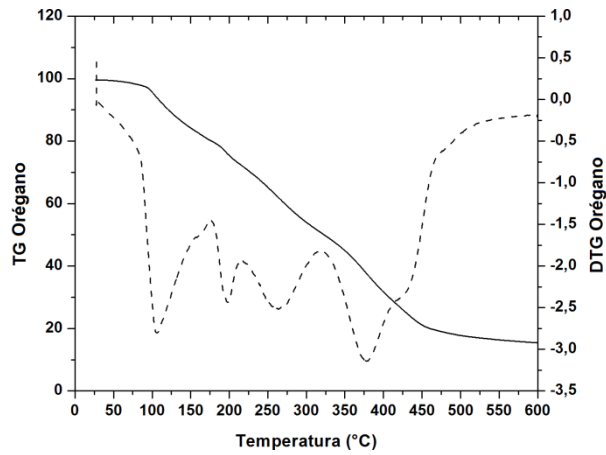
Para a TG os extratos de alecrim, orégano e manjeriço foram liofilizados e então, realizada a análise térmica como mostram as Figuras 10, 11 e 12 contendo as curvas termogravimétricas (TG) e suas respectivas derivadas (DTG).

**Figura 10** - Curvas TG e DTG para o extrato de alecrim.



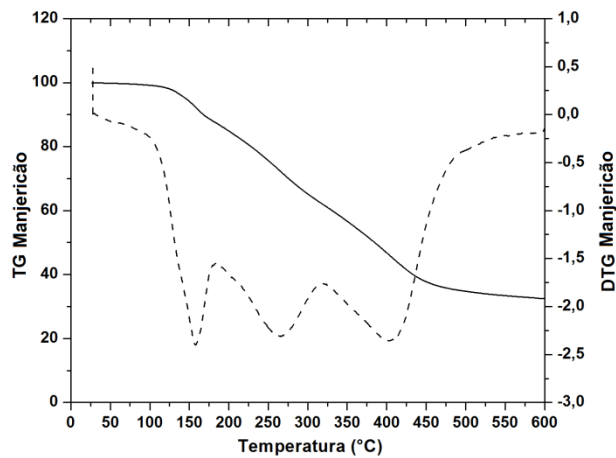
Fonte: Próprio autor

**Figura 11** - Curvas TG e DTG para o extrato de orégano.



Fonte: Próprio autor

**Figura 12** - Curvas TG e DTG para o extrato de manjeriço.



Fonte: Próprio autor

A análise termogravimétrica dos extratos secos por liofilização mostrou que o primeiro evento de decomposição térmica ocorreu em 121,26 °C para o alecrim, 106,7 °C para o orégano e 157,93 °C para o manjeriço, com perda de massa de 10,19 %, 12,70 % e 19,66 % para alecrim, orégano e manjeriço respectivamente.

A termogravimetria mostrou que o alecrim teve seu primeiro evento de decomposição próximo a última temperatura de ensaio pelo método Rancimat, isto é 125 °C. Para o orégano ocorreu antes de atingir 110 °C, e para o manjeriço a 157,93 °C, temperatura bem acima daquela verificada no último ensaio.

O extrato de manjeriço apresentou menor valor de concentração de fenóis totais bem como menor atividade, no entanto, a TG mostrou maior estabilidade térmica quando comparado com os outros extratos. Esta maior estabilidade pode ter contribuído, como forma de compensação, para que o valor do PI desse extrato fosse semelhante a dos demais (Tabela 6). Além disso, esta compensação é mais evidente nas misturas contendo alecrim e manjeriço e, orégano e manjeriço (ensaios 5 e 6).

O orégano possui o primeiro evento de perda mássica maior que os demais antioxidantes (19,66 %), em uma temperatura abaixo de 110 °C que é a temperatura mínima do ensaio Rancimat. Embora tenha o menor valor da temperatura de decomposição, o valor de PI é compensado pelo maior valor de fenóis e atividade quando comparado com os valores apresentados pelo extrato de manjeriço.

## 5.6 CONSTANTE DE VELOCIDADE ( $k$ ) E ENERGIA DE ATIVAÇÃO ( $E_a$ )

Com o ajuste linear dos dados do logaritmo neperiano da condutividade *versus* o tempo em horas, para cada temperatura de ensaio, foi obtido o coeficiente angular que corresponde à constante de velocidade da reação de oxidação do biodiesel ( $k$ ). A energia de ativação ( $E_a$ ) é obtida através da equação de Arrhenius que expressa a relação existente entre a temperatura e a constante de velocidade (Tabela 8).

**Tabela 8** - Constante de velocidade e energia de ativação dos extratos de alecrim, orégano e manjeriço nas diversas temperaturas de ensaio.

Ensaio	Misturas*	k (h <sup>-1</sup> )				E <sub>a</sub> (kJ mol <sup>-1</sup> )
		110 °C	115 °C	120 °C	125 °C	
1	(1; 0; 0)	0,3371	0,4513	0,5799	0,8201	73,92
2	(0; 1; 0)	0,3669	0,485	0,6078	0,9171	75,29
3	(0; 0; 1)	0,4179	0,6049	0,6503	1,0825	74,11
4	(½; ½; 0)	0,3407	0,3964	0,596	0,8774	82,11
5	(½; 0; ½)	0,3535	0,464	0,5202	1,0724	86,99
6	(0; ½; ½)	0,3733	0,5309	0,6163	0,8814	69,10
7	(⅓; ⅓; ⅓)	0,3374	0,4591	0,6258	0,9583	87,15
8	(⅓; ⅓; ⅓)	0,3319	0,424	0,6716	0,9200	89,13
9	(⅓; ⅓; ⅓)	0,3346	0,4416	0,6487	0,9392	88,26
Controle	(0; 0; 0)	1,1696	1,5298	1,9498	2,2204	54,98

\* Proporção (alecrim, orégano e manjeriço).

**Fonte:** Próprio autor

Em todas as temperaturas as amostras mantiveram o mesmo comportamento no que se refere a  $k$ , isto é, as amostras de biodiesel contendo extrato de alecrim apresentaram menor valor de  $k$ , o orégano se manteve no valor intermediário e o manjeriço com o maior valor de  $k$ , mostrando que o extrato de alecrim foi o que mais ofereceu proteção à oxidação às amostras.

Pullen e Saeed (2012) mostraram que a taxa de oxidação é exponencialmente relacionada com a temperatura, e consequentemente  $k$  é dependente de  $T$ . Além disso, que a adição de antioxidantes elevam a  $E_a$  e diminuem as constantes de velocidade, prevenindo a reação de oxidação por mais tempo. A Tabela 8 mostra que a  $E_a$  do controle foi 54,98 kJ mol<sup>-1</sup> valor inferior ao encontrado nos ensaios contendo os antioxidantes naturais. O maior valor de  $E_a$  foi no ensaio 8 contendo a mistura ternária dos extratos de alecrim, orégano e manjeriço com valor de 89,13 kJ mol<sup>-1</sup>, e o menor valor foi o ensaio 6 contendo a mistura binária entre orégano e manjeriço com valor de 69,10 kJ mol<sup>-1</sup>.

### 5.7 PARÂMETROS TERMODINÂMICOS: ENTALPIA ( $\Delta H^\ddagger$ ), ENTROPIA ( $\Delta S^\ddagger$ ) E ENERGIA LIVRE DE GIBBS ( $\Delta G^\ddagger$ )

A Tabela 9 mostra os valores dos parâmetros termodinâmicos entalpia ( $\Delta H^\ddagger$ ), entropia ( $\Delta S^\ddagger$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\ddagger$ ) todas no estado ativado. Os valores de  $\Delta H^\ddagger$  e  $\Delta S^\ddagger$  foram obtidos através da equação de Eyring (Eq. 4) e  $\Delta G^\ddagger$  pela equação de Gibbs (Eq. 5).

**Tabela 9** - Valores dos parâmetros termodinâmicos da reação de oxidação do biodiesel.

Ensaio	Misturas*	$\Delta H^\ddagger$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\ddagger$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\ddagger$ (kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
1	(1; 0; 0)	70,67	-71,60	98,63
2	(0; 1; 0)	72,05	-67,43	98,38
3	(0; 0; 1)	70,87	-69,15	97,87
4	(½; ½; 0)	78,87	-50,68	98,65
5	(½ ;0; ½)	83,74	-37,64	98,44
6	(0; ½; ½)	65,86	-83,11	98,31
7	(⅓; ⅓; ⅓)	83,90	-37,20	98,43
8	(⅓; ⅓; ⅓)	85,89	-32,25	98,48
9	(⅓; ⅓; ⅓)	84,92	-34,67	98,45
Controle	(0; 0; 0)	51,73	-110,40	94,85

\* Proporção (alecrim, orégano e manjeriço).

**Fonte:** Próprio autor

A entalpia de ativação representa a energia consumida pelas reações que ocorrem durante a oxidação, ou seja, quanto maior esse valor, menos reativo o meio se torna. A amostra controle apresentou o menor valor de  $\Delta H^\ddagger$  indicando que a adição dos extratos dos antioxidantes naturais desfavoreceu a reação de oxidação do biodiesel. Entre os tratamentos envolvendo misturas de extratos, o ponto central se destaca (tratamentos 7, 8 e 9), sendo a mistura que proporciona uma maior proteção do biodiesel.

A entropia de ativação da reação de oxidação é associada à formação de espécies de complexo ativado. O sinal negativo indica que quando as espécies se unem no estado de transição há um decréscimo de moléculas no meio,

por outro lado, quanto mais componentes estiverem presentes na reação, mais desordenado será o estado de transição e menos negativo será o valor de  $\Delta S^\ddagger$  (CHOI *et al.*, 2011; ONG *et al.*, 2013). De acordo com o esperado, a amostra controle apresentou o valor mais negativo de entropia de ativação, e os tratamentos contendo mistura ternária (ponto central) apresentaram entropia menos negativa em virtude do maior número de espécies no meio reacional e consequentemente maior desordem do estado de transição.

O parâmetro  $\Delta G^\ddagger$  representa a energia livre consumida na reação de oxidação e, como indicado na Tabela 9, é menor para a amostra controle em comparação aos tratamentos com adição de antioxidantes. Valores mais positivos indicam que o processo é mais endergônico, ou seja, menos favorável. Nos ensaios com antioxidantes, não é possível se observar uma grande diferença entre os valores de  $\Delta G^\ddagger$ , o que significa que esta energia não é um parâmetro relevante na diferenciação dos tratamentos.

Com a aplicação do delineamento experimental de mistura simplex-centroide, foram obtidos os modelos matemáticos (Equações 10-12), contendo os termos lineares, interações binárias e ternárias. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) variaram de 0,9957 a 0,9963, os coeficientes de determinação ajustados ( $R^2_{aj}$ ) de 0,9829 a 0,9852 e a análise de variância mostrou que todos os termos foram significativos em nível de 5 % ( $0,0110 \leq p \leq 0,0127$ ) com exceção da interação ternária da equação 11 que modela a energia livre de Gibbs mostrando que eles podem ser utilizados para fins preditivos, pois para reações de oxidação de biodiesel pelo método acelerado, os valores de  $R^2$  obtidos devem ser superiores a 90 %.

$$Y_{\Delta H^\ddagger} = 70.6700x_1 + 72.0490x_2 + 70.8709x_3 + 30.0229 x_1 x_2 + 51.8782x_1 x_3 + 22.4075x_2 x_3 + 191.5591 x_1 x_2 x_3 \quad \text{Eq (10)}$$

$$Y_{\Delta S^\ddagger} = -71.6000x_1 - 67.4302x_2 - 69.1513x_3 + 75.3543 x_1 x_2 + 130.9425x_1 x_3 - 59.2822x_2 x_3 + 495.4950 x_1 x_2 x_3 \quad \text{Eq (11)}$$

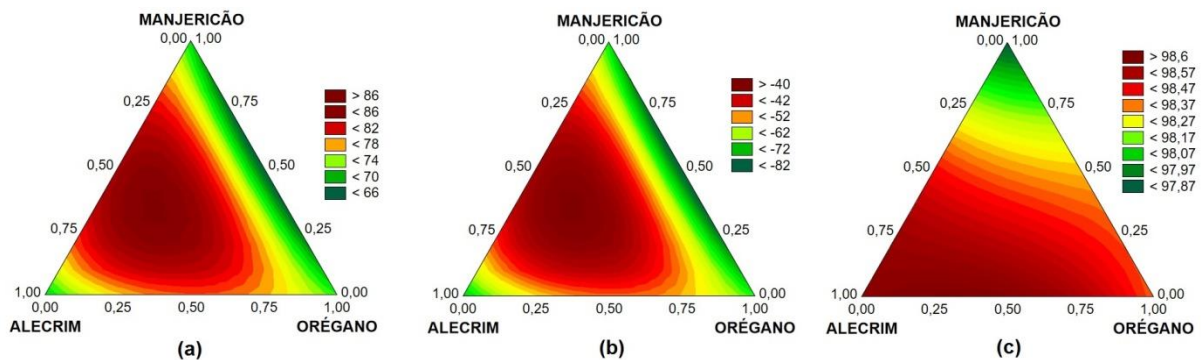
$$Y_{\Delta G^\ddagger} = 98.6630x_1 + 98.3805x_2 + 97.8744x_3 + 0.5966x_1 x_2 + 0.7511x_1 x_3 + 0.7422x_2 x_3 + 495.4950 x_1 x_2 x_3 \quad \text{Eq (12)}$$

As regiões de combinação entre as variáveis que representam as proporções de alecrim, orégano e manjerição no biodiesel podem ser observadas

por meio das curvas de nível apresentadas na Figura 13 (a, b, c). As Figuras mostram as regiões de contorno para as variáveis dependentes, entalpia (Figura 13 a), entropia (Figura 13 b) e energia livre de Gibbs (Figura 13 c), obtidas pelos modelos matemáticos propostos.

Com base nas Figuras 13 (a) e 13 (b) observa-se que a região ótima para a entalpia e entropia situa-se próximo ao ponto central do delineamento que corresponde a mistura ternária e, a Figura 13 (c) mostra que não há uma proporção bem definida de mistura, no entanto, a região ótima está próxima ao extrato de alecrim.

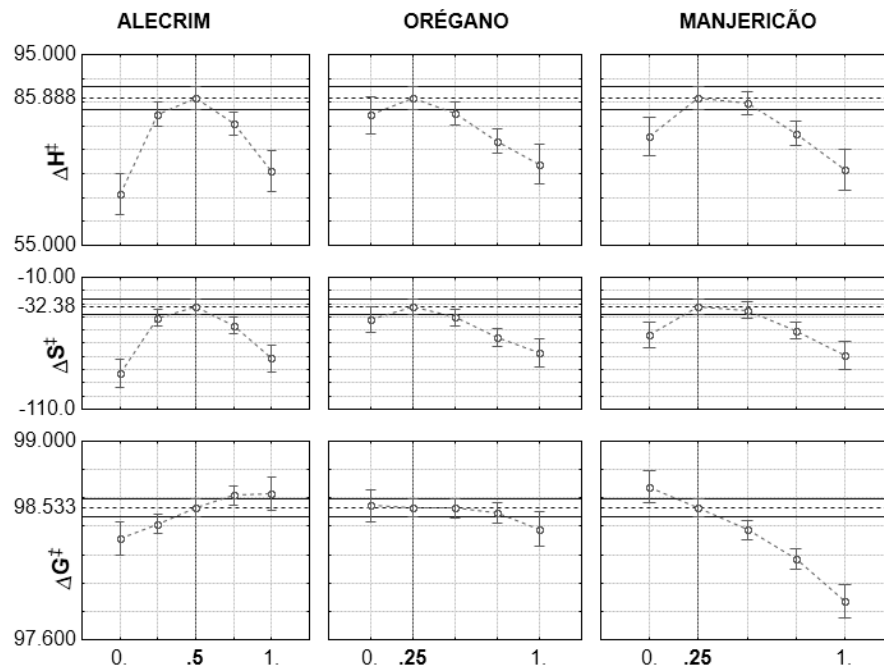
**Figura 13** - Superfície de resposta para (a) Entalpia ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) ( $\Delta H^\ddagger$ ) , (b) Entropia ( $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ) ( $\Delta S^\ddagger$ ) e (c) Energia livre de Gibbs ( $\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ) ( $\Delta G^\ddagger$ ) obtidas pelos modelos matemáticos.



Fonte: Próprio autor

A Figura 14 mostra a otimização conjunta dos extratos de antioxidantes naturais utilizados. Nela podemos observar que um  $\Delta H^\ddagger$  igual a  $85,89 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta S^\ddagger$  de  $-32,38 \text{ J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$  e  $\Delta G^\ddagger$  de  $98,53 \text{ kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ , pode ser obtido quando se utiliza uma mistura contendo 50 % de alecrim, 25 % de orégano e 25% de manjeriçcão, valores muito próximos dos estabelecidos experimentalmente no ponto central do delineamento utilizado.

**Figura 14** - Otimização conjunta dos parâmetros termodinâmicos.



**Fonte:** Próprio autor

A Tabela 10 apresenta o intervalo de confiança dos parâmetros estudados bem como das variáveis independentes utilizadas. É possível verificar que os intervalos apresentados nos indicam uma faixa que independente do valor das proporções utilizadas continua-se obtendo uma resposta aceitável sempre lembrando que a soma das proporções dos componentes de mistura precisa ser igual a 1 (CALADO; MONTGOMERY, 2003; MAIA *et al.*, 2011). O valor ótimo obtido (0,5; 0,25; 0,25) com  $\Delta H^\ddagger = 85,89 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta S^\ddagger = -32,38 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  e  $\Delta G^\ddagger = 98,53 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  está dentro do intervalo de confiança para cada variável independente de todos os parâmetros utilizados. Dentro desse mesmo intervalo de confiança está o ensaio 8 do ponto central (Tabela 9) cujas respostas  $\Delta H^\ddagger = 85,89 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta S^\ddagger = -32,25 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  e  $\Delta G^\ddagger = 98,48 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  são semelhantes as respostas encontradas na Figura 14. Isto indica que os modelos matemáticos obtidos para as três respostas são válidos e podem ser utilizados para fins preditivos.

**Tabela 10** - Intervalo de confiança dos parâmetros e das variáveis de mistura no ponto ótimo.

Parâmetros Termodinâmicos	Intervalo de confiança	Variáveis Independentes		
		x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>
	83,913	0,3783	0,1250	0,1845
$\Delta H^\ddagger$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	88,549	0,6036	0,4411	0,5593
	-26,893	0,3125	0,0860	0,1741
$\Delta S^\ddagger$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	-38,431	0,6036	0,4506	0,5593
	98,469	0,0892	0,0000	0,1248
$\Delta G^\ddagger$ (kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	98,616	0,3783	0,5494	0,3715

**Fonte:** Próprio autor

## 6 CONCLUSÕES

Todos os antioxidantes naturais estudados, quando utilizados isoladamente ou em misturas, se mostraram eficazes na prevenção oxidativa do biodiesel, pois apresentaram período de indução superior a seis horas conforme estabelecido pela norma.

O método acelerado de estabilidade oxidativa pelo Rancimat mostrou-se eficaz na avaliação de qualidade do biodiesel tanto através do período de indução, quanto pelo uso da equação de Eyring e da equação fundamental da termodinâmica utilizando os dados obtidos na determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos.

Através do delineamento de mistura simplex-centroide, utilizado em várias temperaturas, foi possível observar a dependência do processo oxidativo com a temperatura, quando analisamos o período de indução, a constante de velocidade e os parâmetros termodinâmicos.

Os valores obtidos para entalpia, entropia e energia livre de Gibbs no estado ativado, indicaram um processo endotérmico, não espontâneo, mostrando que o uso de antioxidantes naturais, como forma a retardar ou inibir a oxidação, foi bastante eficaz.

O uso dos extratos de alecrim, orégano e manjerição, possuem grande potencial de proteção do biodiesel B100 e merece interesse da indústria de biocombustíveis principalmente por serem provenientes de fontes naturais e renováveis, não poluidoras e ecologicamente correta.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V. F.; GARCÍA-MORENO, P. J.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Biodiesel production from mixtures of waste fish oil, palm oil and waste frying oil: Optimization of fuel properties. **Fuel Processing Technology**, v. 133, p. 152–160, 2015.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Legumes as a source of natural antioxidants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, n.10, p. 865-878, 2008.

ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T. Antioxidant and Antibacterial Activities of Phenolic Compounds from Extracts of Plants Used as Tea. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, n.3, p. 209-215, 2006.

ASTM D93 – 10a **Standard Test Methods for Flash Point by Pensky-Martens Closed Cup Tester**, 2001.

ASTM D664 – 11a **Standard Test Method for Acid Number of Petroleum Products by Potentiometric Titration**, 2001.

ASTM D1298 – 12b **Standard Test Method for Density, Relative Density, or API Gravity of Crude Petroleum and Liquid Petroleum Products by Hydrometer Method**, 2012.

BEN 2015 - **Balanço Energético Nacional 2015**: Ano base 2014. Empresa de Pesquisa Energética. – Rio de Janeiro : BEN, 2015. 292 p.

BERNARDES, N. R.; TALMA, S. V.; SAMPAIO, S. H.; NUNES, C. R.; ALMEIDA, J. A. R.; OLIVEIRA, D. B. Atividade antioxidante e fenóis totais de frutas de Campos dos Goytacazes-Rj. **Perspectivas online – Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 1, n. 1, 2011.

BORSATO, D.; CINI, J. R. M.; SILVA, H. C.; COPPO, R.; ANGILELLI, K. G.; MOREIRA, I.; MAIA, E. C. R. Oxidation kinetics of biodiesel from soybean mixed

with synthetic antioxidants BHA, BHT and TBHQ: Determination of activation energy. **Fuel Processing Technology**, v. 127, p. 111-116, 2014.

BORSATO, D.; GALVAN, D.; PEREIRA, J. L.; ORIVES, J. R.; ANGILELLI, K. G.; COPPO, R. L. Kinetic and thermodynamic parameters of biodiesel oxidation with synthetic antioxidants: simplex centroid mixture design. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1984-1992, 2014.

BOUAID, A.; EL BOULIFI, N.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Optimization of a two-step process for biodiesel production from *Jatropha curcas* crude oil. **International Journal of Low-Carbon Technologies**, v. 7, p. 331–337, 2012.

BRASIL. Resolução nº14, de maio de 2012 - ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Estabelece a especificação para a comercialização de biodiesel que poderá ser adicionado ao óleo diesel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18/05/2012.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando Statistica**. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003. 260p.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI JR; W. A.; BORIN, M. F.; LOPEZ, R. F. V.; FONSECA, M. J. V. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 183–190, 2007.

CHEN, J. S.; LEE, C. M.; CRAPO, C. Linear programming and response surface methodology to optimize surimi gel texture. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 535, 538, 1993.

CHEN, Y. H.; LUO, Y. M. Oxidation stability of biodiesel derived from free fatty acids associated with kinetics of antioxidants. **Fuel Processing Technology**, v. 92, p. 1387-1393, 2011.

CHOI, C. S.; KIM, J. W.; JEONG, C. J.; KIM, H.; YOO, K. P. Transesterification kinetics of palm olein oil using supercritical methanol. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 58, n. 3, p. 365–370, 2011.

CINI, J. R. M.; BORSATO, D., GUEDES, C. L. B.; SILVA, H. C.; COPPO, R. L. Comparison of methods for determination of oxidative stability of B100 biodiesel mixed with synthetic antioxidants. Application of simplex-centroid design with process variable. **Quimica Nova**, v. 36, p. 79-84, 2013.

COPPO, R. L.; PEREIRA, J. L.; SILVA, H. C.; ANGILELLI, K. G.; RODRIGUES P. R. P.; GALVAN, D. ; BORSATO, D . Effect of Natural Antioxidants on Oxidative Stability of Biodiesel from Soybean Oil. Applying Simplex-Centroid Design. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 8, p. 545-551, 2014.

CORDEIRO, A. M. T. M.; MEDEIROS M. L.; SILVA, M. A. A. D.; SILVA, I. A. A.; SOLEDADE, L. E. B.; SOUZA, A. L.; QUEIROZ, N.; SOUZA, A. G. Rancimat and PDSC accelerated techniques for evaluation of oxidative stability of soybean oil with plant extracts. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 114, n. 2, p.827-832, 2013.

CORNELL, J. A. **Experiments with mixtures - designs, models and the analysis of mixture data**. 2. ed. New York: John Wiley and Sons, 1990. 632p.

CREMONEZ, P. A.; FEROLDI, M.; NADALETI, W. C.; ROSSI, E.; FEIDEN, A.; CAMARGO, M. P.; CREMONEZ, F. E.; KLAJN, F.F. Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 415–428, 2015.

CUNHA Jr, A.; FEDDERN, V.; DE PRÁ, M. C.; HIGARASHI, M. M.; ABREU, P. G.; COLDEBELLA, A. Synthesis and characterization of ethylic biodiesel from animal fat wastes. **Fuel**, v. 105 p. 228 –234, 2013.

DAMASCENO, S. S.; SANTOS, N. A.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. L.; SOUZA, A. G.; QUEIROZ, N. Caffeic and ferulic acids: An investigation of the effect of

antioxidants on the stability of soybean biodiesel during storage. **Fuel**, v. 107, p.641 – 646, 2013.

DAUD, N. M.; ABDULLAH, S. R. S.; HASAN, H. A.; YAAKOB, Z. Production of biodiesel and its wastewater treatment technologies: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 94, p. 487 – 508, 2015.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Antioxidant potential of oregano (*Oreganum vulgare* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.): application of oleoresins in vegetable oil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, 955 - 959, 2011.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Revisão: Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 389 - 399, 2012.

DELGADO, M. A.; GARCÍA-RICOA, C.; FRANCO, J. M. The use of rosemary extracts in vegetable oil-based lubricants. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 474 – 480, 2014.

DIAS, G. H.; GUEDES, C. L. B.; SILVA, E. T.; ANGILELLI, K. G. ; COPPO, R. L.; BORSATO, D. Application of the simplex-centroid design with process variable in the optimization of production conditions of B100 biodiesel from sunflower oil. **Acta Scientiarum Technology**, v. 36, n. 3, p. 505 - 512, 2014.

DICIAULA, M. C.; LOPES, G. C.; SCARMINIO, I. S.; MELLO, J. C. P. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a uv-vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. **Química Nova**, v. 37, p. 158-163, 2014.

EN 14103 - **EN 14103 (2011)**; Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents (2011).

EN 14112 - **EN 14112 (2003)**; Fat and Oil Derivatives. Fatty Acid Methyl Esters (FAME), Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test) (2003).

EN 14214 - **EN 14214 (2008)**; Automotive Fuels. Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for diesel engines, Requirements and test methods (2008).

EYRING, H. The activated complex in chemical reactions. **Journal of Chemical Physics**, v. 3, p. 107-115, 1935.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Oxidative stability of biodiesel from soybean oil fatty acid ethyl esters. **Scientia Agricola**, v.62, n.3, p.291-295, 2005.

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

GALVAN, D.; ORIVES, J. R.; COPPO, R. L.; RODRIGUES, C. H. F.; SPACINO, K. R.; PINTO, J. P.; BORSATO, D. Study of oxidation kinetics of B100 biodiesel from soybean and pig fat: activation energy determination. **Química Nova**, v. 37, p. 244-248, 2014.

GRIZOTTO, R. K.; BRUNS, R. E.; AGUIRRE, J. M.; BATISTA, G. Otimização via metodologia de superfície de respostas dos parâmetros tecnológicos para produção de fruta estruturada e desidratada a partir de polpa concentrada de mamão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 158-164, 2005.

HE, B.; SHAO, Y.; REN, Y.; LI, J.; CHENG, Y. Continuous biodiesel production from acidic oil using a combination of cation- and anion-exchange resins. **Fuel Processing Technology**, v. 130, p. 1–6, 2015.

ISSARIYAKUL, T.; DALAI, A. K. Biodiesel from vegetable oils. **Renewable and Sustainable Energy: Reviews**, v. 31p. 446 – 471, 2014.

JAIN, S.; SHARMA, M. P. Optimization of long-term storage stability of *Jatropha curcas* biodiesel using antioxidants by means of response surface methodology. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, p. 4008-4014, 2011.

JUSTO, O. R.; MORAES, A. M.; BARRETO, G. P. M.; MERCADANTE, A. Z.; VIEIRA E ROSA P. T. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Química Nova**, v. 31, p. 1699-1705, 2008.

KAERCHER, J. A.; SCHNEIDER, R. C. S.; KLAMT, R. A.; SILVA, W. L. T.; SCHMATZ, W. L.; SZARBLEWSKI, M. S.; MACHADO, E. L. Optimization of biodiesel production for self-consumption: considering its environmental impacts. **Journal of Cleaner Production**, v.46, p. 74-82, 2013.

KREIVAITIS, R.; GUMBYTE, M.; KAZANCEV, K.; PADGURSKAS, J.; WAKAREVICIENE, V. A. Comparison of pure and natural antioxidant modified rapeseed oil storage properties. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 511–516, 2013.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329–339, 2004.

LABUZA, T. P. Enthalpy/Entropy Compensation in Food Reactions, **Food Technology**, v. 34, n. 2, p.67–77, 1980.

LEE, J.; SCARAGEL, C. F. Chicoric acid found in Basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 650- 656, 2009.

LEE, K. W., LI, J., KIM, Y. W., CHUNG, K. W., LEE, Y. J., OH, H. B. Synergetic and antagonistic role of natural antioxidant in the autoxidation of soybean oil. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.17, p. 537–542, 2011.

LEVENSPIEL, O. **Chemical Reaction Engineering**, 3rd ed.; John Wiley and Sons Inc: New York, 1999.

- LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.
- LUO, M.; ZHANG, R.; ZHENG, Z.; WANG, J.; JI, J. Impact of some natural derivatives on the oxidative stability of soybean oil based biodiesel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23 n. 2, p. 241-246, 2012.
- MAIA, E. R.; BORSATO, D.; MOREIRA, I.; SPACINO, K. R.; RODRIGUES P. R. P.; GALLINA, A. L. Study of the biodiesel B100 oxidative stability in mixture with antioxidants. **Fuel Processing Technology**, v. 92, p. 1750-1755, 2011.
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.
- MARTÍNEZ, G.; SÁNCHEZ, N.; ENCINAR, J.M.; GONZÁLEZ, J.F. Fuel properties of biodiesel from vegetable oils and oil mixtures. Influence of methyl esters distribution. **Biomass and Bioenergy**, v. 63, p. 22-32, 2014.
- MARTINS, G. I.; SECCO, D.; ROSA, H. A.; BARICCATTI, R. A.; DOLCI, B. D.; SOUZA, S. N. M.; SANTOS, R. F.; SILVA, T. R. B.; GURGACZ, F.; Physical and chemical properties of fish oil biodiesel produced in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy: Reviews**, v. 42, p. 154 – 157, 2015.
- MCCORMICK, R. L.; RATCLIFF, M. M.; MOENS, L.; LAWRENCE, R. Several factors affecting the stability of biodiesel in standard accelerated tests. **Fuel Processing Technology**, v. 88, n. 7, p. 651-657, 2007.
- MCLEAN, R. A.; ANDERSON, V. L. Extreme vertices designs of mixture experiments. **Technometrics**, v.8 n.3, p. 447 – 454, 1966.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.17, n.1, p. 36-44, 2015.

ONG, L. K.; KURNIAWAN, A.; SUWANDI, A. C. ; LIN, C. X.; ZHAO, X. S.; ISMADJI, S. Transesterification of leather tanning waste to biodiesel at supercritical condition: kinetics and thermodynamics studies. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.75, p. 11–20, 2013.

ORIVES, J. R.; GALVAN, D.; COPPO, R. L.; RODRIGUES, C. H. F.; ANGILELLI, K.; BORSATO, D. Multiresponse optimisation on biodiesel obtained through a ternary mixture of vegetable oil and animal fat: Simplex-centroid mixture design application. **Energy Conversion and Management**, v. 79, p. 398-404, 2014.

POKORNÝ, J. Are natural antioxidants better - and safer - than synthetic antioxidants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, n. 6, p. 629-642, 2007.

PULLEN, J.; SAEED, K. Experimental study of the factors affecting the oxidation stability of biodiesel FAME fuels. **Fuel Processing Technology**, v.125, p. 223–235, 2014.

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

RAMALHO, V. C.; JORGE N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 20, p. 775-760, 2006.

RIZWANUL FATTAH, I. M.; MASJUKI, H. H.; KALAM, M. A.; HAZRAT, M. A.; MASUM, B. M.; IMTENAN, S.; ASHRAFUL, A. M. Effect of antioxidants on oxidation stability of biodiesel derived from vegetable and animal based feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 356–370, 2014.

SCHAMNE, C.; DUTCOSKY, S. D.; DEMIATE, I. M. Obtention and characterization of gluten-free baked products. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 741-750, 2010.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, L. S.; MOURA, C. V. R.; OLIVEIRA, J. E.; MOURA, E. M. Use of natural antioxidants in soybean biodiesel. **Fuel**, v. 134, p.420–428, 2014.

SPACINO, K. R.; BORSATO, D.; BUOSI, G. M.; CHENDYNSKI, L. T. Determination of kinetic and thermodynamic parameters of the B100 biodiesel oxidation process in mixtures with natural antioxidants. **Fuel Processing Technology**, v. 137, p. 366–370, 2015.

STATISTICA. **Statistica for Windows Software v.9.0**. Statsoft Inc., Tulsa, OK, United States (2009).

STEINBERG, D. M.; HUNTER, W. G. Experimental design: review and comment. **Technometrics**, v. 26, n. 2, p. 71 – 97, 1984.

YAAKOB, Z.; NARAYANAN, B. N.; PADIKKAPARAMBIL, S.; SURYAUNNI, K.; AKBAR, P. M. A review on the oxidation stability of biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 136–153, 2014.