



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA CAROLINA GOMES MANTOVANI

**ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES NO
PROCESSO DE OXIDAÇÃO DE BIODIESEL DE DIFERENTES
MATÉRIAS-PRIMAS**

ANA CAROLINA GOMES MANTOVANI

**ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES NO
PROCESSO DE OXIDAÇÃO DE BIODIESEL DE DIFERENTES
MATÉRIAS-PRIMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Bioenergia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Di Mauro.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Mantovani, Ana Carolina Gomes.

Análise da formação de radicais livres no processo de oxidação de biodiesel de diferentes matérias-primas / Ana Carolina Gomes Mantovani. -

Londrina, 2018.

56 f. : il.

Orientador: Eduardo Di Mauro.

Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2018. Inclui bibliografia.

1. Ressonância Paramagnética Eletrônica - Teses. 2. Oxidação - Teses. 3. Biodiesel - Teses. 4. *Spin trapping* - Teses. I. Di Mauro, Eduardo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. III. Título.

ANA CAROLINA GOMES MANTOVANI

**ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES NO PROCESSO DE
OXIDAÇÃO DE BIODIESEL DE DIFERENTES MATÉRIAS-PRIMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Bioenergia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Di Mauro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Londrina, 23 de fevereiro de 2018.

Dedico essa dissertação aos meus pais, Madalena e Angelo, pelo apoio, presença e incentivo em minhas decisões e escolhas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por permitir a conquista desse projeto.

Ao meu orientador Eduardo Di Mauro pela oportunidade e apoio durante a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Aroldo Salviato pelos sábios ensinamentos, suportes com o equipamento e apoio na total realização do projeto.

Ao Prof. Dr. Dionísio Borsato por ter me acolhido como sua aluna e me orientado sempre que necessário.

A Letícia que sempre esteve presente me auxiliando na realização dos experimentos e elaboração do trabalho.

Ao Vinícius pela colaboração com a simulação dos espectros. À Universidade Estadual de Londrina.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram pela realização desse trabalho, meu muito obrigada.

"O segredo do sucesso é a constância do propósito"
Benjamin Disraeli.

MANTOVANI, Ana Carolina Gomes. **Análise da formação de radicais livres no processo de oxidação de biodiesel de diferentes matérias-primas**. 2018. 56 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A técnica de *spin trapping* quando utilizada em conjunto com a Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) tem se mostrado um poderoso recurso na quantificação de radicais livres que possuem curtos tempos de vida, que sejam instáveis e de difícil detecção, com vantagens de ter um uso experimental rápido e considerado simples quando comparada à outras técnicas. Essa técnica foi aplicada no presente trabalho a fim de analisar a formação de radicais livres gerados na reação oxidativa radicalar de amostras de biodiesel de óleo de milho, biodiesel de óleo de soja e biodiesel comercial. As amostras foram incubadas usando o *spin trap* PBN (N-t-Butyl-6-phenylnitrone) e analisadas por RPE a temperatura ambiente e sob aquecimento a 70 °C. Dois métodos de incubação com PBN foram testados. As amostras analisadas por RPE a temperatura ambiente foram incubadas com PBN uma única vez no dia inicial das medidas e, as amostras analisadas com o aquecimento de 70 °C foram incubadas com o PBN em todos os dias nos quais foram realizadas análises. As amostras analisadas com aquecimento térmico foram guardadas em estufa a 50 °C durante todo o período de análise, 21 dias e as a temperatura ambiente foram guardadas na ausência de luz e mantidas fechadas hermeticamente. As amostras a temperatura ambiente foram analisadas a aproximadamente cada 7 dias, enquanto que as sob aquecimento foram medidas nos dias 1, 6, 13 e 21 obtendo curvas dos radicais aprisionados. A partir dos dados obtidos foi possível caracterizar as etapas de degradação dos biodiesel pela técnica, além de ter possibilitado a caracterização dos radicais aprisionados no processo oxidativo.

Palavras-chave: RPE. *Spin Trapping*. Oxidação. Biodiesel.

MANTOVANI, Ana Carolina Gomes. **Analysis of free radical formation in the biodiesel oxidation process of different raw materials**. 2018. 56 p. Dissertation (Master's degree in Bioenergy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

The spin trapping technique used with the Electron Paramagnetic Resonance (EPR) has proven to be a powerful resource in the quantification of free radicals with short lifetimes, unstable and difficult to detect, with advantages in a fast experimental use and considered simple when compared to other techniques. This technique was applied in the present work to analyse the formation of free radicals generated in the radical reaction of biodiesel samples from corn oil, soybean oil and commercial biodiesel. The samples were incubated using the PBN (N-t-Butyl- α -phenylnitrone) spin trap and analysed by EPR at room temperature and under heating at 70 °C. Two methods of incubation with PBN were tested. Samples measured by EPR at room temperature were incubated with PBN only once on the initial day of measurements and the samples analyzed under heating of 70 °C were incubated with the PBN on all the days in which analyzes were performed. The samples analyzed with thermal heating were stored in an oven at 50 °C throughout the analysis period and the samples at room temperature were stored in the absence of light and kept tightly sealed. The samples at room temperature were measured at approximately every 7 days while those under heating were measured on days 1, 6, 13 and 21 obtaining curves of the entrapped radicals. From the obtained data it was possible to characterize the degradation stages of biodiesel by the technique besides of the characterization of the trapped radicals in the oxidative process.

Keywords: EPR. Spin Trapping. Oxidation. Biodiesel.

Lista de ilustrações

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Reação de transesterificação de triglicerídeos. | 16 |
| Figura 2 – Esquema geral do processo oxidativo de lipídeos. | 18 |
| Figura 3 – Esquema do mecanismo de ação de antioxidantes. | 19 |
| Figura 4 – Esquema do método de aquecimento acelerado usando o equipamento Rancimat. | 22 |
| Figura 5 – Separação eletrônica dos estados de spin m_s submetidos a campo um magnético. | 24 |
| Figura 6 – Esquema do desdobramento hiperfino da interação de um radical livre com um átomo de hidrogênio. | 25 |
| Figura 7 – Compostos nitrosos e nitronas. | 27 |
| Figura 8 – Estrutura química de alguns <i>spin traps</i> | 29 |
| Figura 9 – Reação do radical livre com o <i>spin trap</i> N-t-Butyl- α -phenylnitron. | 29 |
| Figura 10 – Espectro de EPR do spin aduto formado a partir do <i>spin trap</i> N-t-Butyl- α -phenylnitron e radical hidróxi. | 30 |
| Figura 11 – Fluxograma das etapas de purificação, desumidificação e filtração do biodiesel. | 34 |
| Figura 12 – Número de espécies aprisionadas no processo de degradação nos biodiesel de (a) milho, (b) soja, (c) comercial, em aquecimento de 70 °C. | 40 |
| Figura 13 – Determinação do período de indução da amostra de biodiesel de óleo de milho aquecida a 70 °C a partir da RPE. | 42 |
| Figura 14 – Determinação do período de indução das amostras de biodiesel de óleo de soja e biodiesel comercial aquecidas a 70 °C a partir da RPE. | 43 |
| Figura 15 – Contagem do número de espécies aprisionadas, a temperatura ambiente, no processo de degradação nas amostras de biodiesel de (a) milho, (b) soja e (c) comercial. | 45 |
| Figura 16 – Espectros de RPE dos biodiesel de milho, soja e comercial mostrando o spin aduto observado experimentalmente. | 47 |
| Figura 17 – Espectros experimental e simulado do biodiesel comercial mostrando o spin aduto formado. | 48 |

Lista de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Ácidos graxos insaturados presentes nos óleos de soja e milho. | 17 |
| Tabela 2 – Parâmetros do spin aduto formado a partir do <i>spin trap</i> N-t-Butyl- α -phenylnitrono. | 31 |
| Tabela 3 – Especificações do biodiesel comercial. | 34 |
| Tabela 5 – Períodos de indução obtidos por RPE das amostras submetidas a aquecimento de 70 °C. | 44 |
| Tabela 6 – Número de espécies aprisionadas nas amostras de biodiesel. | 46 |
| Tabela 7 – Determinação dos parâmetros químicos das amostras de biodiesel. | 49 |

Lista de abreviaturas e siglas

| | |
|------------------------|---|
| PG | Propil Galato |
| PA | Ácido Pirogálico |
| TBHQ | Terc-Butil-Hidroquinona |
| THC | Hidrocarbonetos Totais |
| KOH | Hidróxido de Potássio |
| UV | Ultravioleta |
| RPE | Ressonância Paramagnética Eletrônica |
| PBN | N-t-Butyl- α -phenylnitrone |
| DMPO | 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide |
| 4-POBN | α -pyridyl-1-oxide-N-tert-butyl nitrone |
| TEMPO | 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl |
| PBN-SO ₃ Na | N-tert-Butyl- α -(2-sulfofenyl)nitrona sodium salt |
| DBN BS | 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenesulfonate |
| MNP | 2-methyl-2-nitrosopropane |
| NB | Nitrosobenzene |
| PBN-NO ₂ | N-tert-Butyl- α -(4-nitrofenyl)nitrona |

Sumário

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Introdução | 15 |
| 1.1 | Biodiesel | 15 |
| 1.2 | Antioxidantes e Contaminantes Metálicos | 18 |
| 1.3 | Técnicas de Análise | 21 |
| 1.3.1 | Método de Aquecimento Acelerado | 21 |
| 1.3.2 | Índice de Acidez | 22 |
| 1.3.3 | Ponto de Névoa e Ponto de Fluidez | 23 |
| 1.3.4 | Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) | 23 |
| 1.3.4.1 | <i>Técnica de Spin Trapping</i> | 25 |
| 2 | Objetivos | 32 |
| 3 | Materiais e Métodos | 33 |
| 3.1 | Preparação das Amostras | 33 |
| 3.1.1 | Reação de Transesterificação | 33 |
| 3.1.2 | Incubação Com <i>Spin Trap</i> N-t-Butyl- α -phenylnitron | 35 |
| 3.2 | Análises | 35 |
| 3.2.1 | Ressonância Paramagnética Eletrônica | 35 |
| 3.2.1.1 | Quantificação de espécies do padrão marcador de campo de manganês dopado com óxido de magnésio (MgO:Mn ²⁺) | 35 |
| 3.2.1.2 | Análises com aquecimento a 70 °C | 35 |
| 3.2.1.3 | Análises em temperatura ambiente | 36 |
| 3.2.1.4 | Quantificação dos radicais e cálculo do fator g | 36 |
| 3.2.2 | Simulação computacional dos espectros de RPE | 37 |
| 3.2.3 | Estabilidade Oxidativa | 37 |
| 3.2.4 | Índice De Acidez | 37 |
| 3.2.5 | Ponto De Névoa e Ponto de Fluidez | 38 |
| 4 | Resultados e Discussões | 39 |
| 4.1 | Ressonância Paramagnética Eletrônica e Estabilidade Oxidativa | 39 |
| 4.1.1 | Biodiesel de óleo de milho, biodiesel de óleo de soja e biodiesel comercial aquecidos à 70 °C | 39 |
| 4.1.2 | Biodiesel de óleo de milho, biodiesel de óleo de soja e biodiesel comercial em temperatura ambiente | 44 |
| 4.1.3 | Caracterização dos radicais livres aprisionados | 47 |
| 4.2 | Análises Químicas | 49 |
| 5 | Conclusão | 51 |

Referências 52

1 Introdução

Atualmente, os maiores componentes da matriz energética mundial baseiam-se em produtos derivados do petróleo. Produtos como o óleo diesel, gasolina e gás natural, usados em massa, têm gerado diversos problemas ambientais, tais como a acentuação do efeito estufa, o aquecimento global, o aumento do nível dos oceanos, entre outros. Desse modo, nos últimos anos, a comunidade internacional tem buscado formas alternativas de energia que contribuam para a redução de poluentes, como o metano (CH_4), e os dióxido e monóxido de carbono (CO_2 e CO) [1], originados dos produtos derivados de petróleo. Além dos problemas acima citados, outros fatores políticos e sociais têm também contribuído para uma mudança de mentalidade da sociedade em geral. Assim, fatores como o crescimento populacional elevado, a crise do petróleo nas décadas de 70-80, a alta do preço do petróleo [2], e a possibilidade de esgotamento das fontes de combustíveis fósseis trazem à necessidade do uso de fontes alternativas de energia, principalmente as nomeadas como renováveis [3].

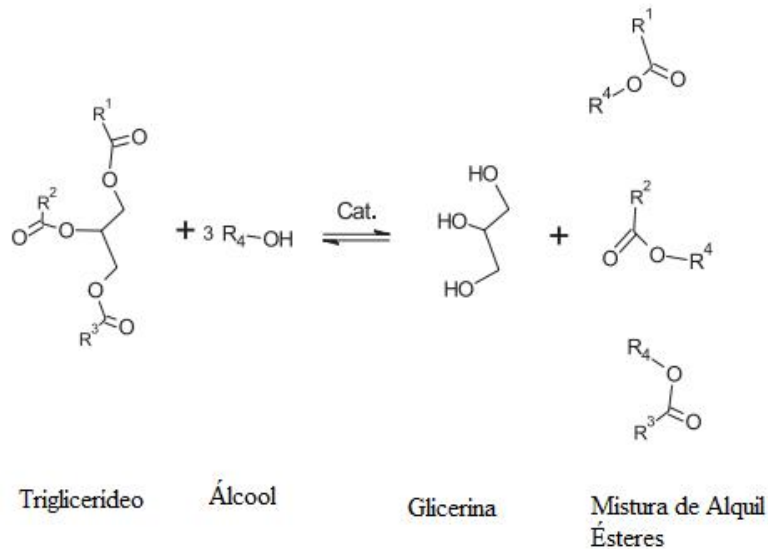
Estima-se que, nos dias atuais, cerca de 2,2 % das fontes usadas no planeta são consideradas limpas e renováveis [1]. Dentre as fontes alternativas estudadas destaca-se o biodiesel, considerado por muitos um substituto renovável, limpo e orgânico para o diesel de petróleo [1]. Evidências mostram que o primeiro uso de biodiesel ocorreu em 1900, com biodiesel oriundo de óleo de amendoim usado para movimentar um motor [3]. No Brasil, o álcool etílico obtido da fermentação de cana-de-açúcar tem sido usado como fonte de combustível desde 1970 [4].

Apesar do alto custo de fabricação do biodiesel quando comparado ao diesel de petróleo [5], a produção desse biocombustível propicia melhorias em questões sociais e econômicas, como a geração de empregos em zonas rurais carentes, diminuindo significativamente a migração para as cidades, atraindo profissionais especializados e gerando todo um apoio à agricultura de modo geral [1]. O álcool derivado da cana também possui característica importantíssima de emissão mínima de enxofre, conseqüentemente quase que negativa a emissão de seus óxidos como SO_2 e SO_3 que são grandes responsáveis pelo fenômeno da chuva ácida [4].

1.1 Biodiesel

O biodiesel é formado principalmente por ésteres [5, 3] produzido a partir do processo de transesterificação de óleos vegetais [6, 5], gorduras animais [5, 6], graxas residuais [7], ou, até mesmo, pela reciclagem de óleos domésticos [7]. Na Figura 1 é mostrado o esquema da reação de transesterificação dos óleos vegetais.

Figura 1 – Reação de transesterificação de triglicerídeos.



Fonte: adaptado de [8].

Diversos óleos vegetais podem ser usados para obtenção do biodiesel tais como: girassol [5], soja [9, 5], palma [5], milho [9], mamona [9], algodão [9], entre outros.

O biodiesel pode ser usado puro, denominado B100, ou em misturas com o diesel de petróleo como o B20, com 20 % de biodiesel em sua composição [10]. Devido à atenção mundial a qual o biodiesel tem atraído, principalmente pela sua sustentabilidade e o inevitável aumento de sua contribuição na matriz energética, faz-se necessário o seu estudo, assim como a análise de fatores que influenciam direta e indiretamente seu uso [5], desde o seu manuseio e processo, até questões logísticas e financeiras.

Os biodiesel obtido de diferentes culturas e matérias-primas apresentam diferenças em sua composição química e propriedades físico-químicas [5, 3]. Analisando as questões estruturais, diferentes tipos de biodiesel possuem diferenças no comprimento da cadeia, no número, posição, e configuração geométrica das duplas ligações [7]. As propriedades físico-químicas são diretamente influenciadas pelos ácidos graxos que compõe o material [11]. Grandes quantidades de ésteres graxos saturados promovem problemas no uso do biodiesel no fluxo a frio [3]. Para o biodiesel no qual a matéria-prima é o óleo de soja sabe-se que seu ponto de névoa é próximo de 0 °C, enquanto que para o proveniente de gorduras animais acontece em 15 °C [3]. Sua produção é feita através do processo de transesterificação devido à alta viscosidade dos óleos usados para a fabricação dos biodiesel. A principal razão para o uso desse processo é que se um líquido de alta viscosidade for usado diretamente em motores automobilísticos, ele pode ocasionar problemas de funcionamento

ou entupimentos [3, 5]. O processo de transesterificação reduz a viscosidade do óleo que varia de aproximadamente 28 a 40 mm² s⁻¹ para 4 a 5 mm² s⁻¹ deixando-o com propriedades similares ao diesel de petróleo [3].

O biodiesel possui baixa estabilidade quando comparado ao diesel de petróleo [5]. Sua estabilidade pode ser afetada por diversos fatores como temperatura [9, 2, 11, 5], contaminações [5, 9], contato com luz [9, 11, 5], contato com oxigênio do ar [2, 11]. Um dos principais problemas em estudo é quanto a suscetibilidade do biodiesel a processos de oxidação uma vez estocado [6, 11, 5]. Biodiesel provenientes de óleos e gorduras são facilmente afetados pela auto-oxidação ocasionada por altas temperaturas e contato com o oxigênio do ar devido a sua formação molecular [12]. A estabilidade do biodiesel depende da composição do seu óleo usado como matéria-prima pois ácidos graxos insaturados possuem maior probabilidade de oxidação quando comparado a componentes saturados [6].

Estima-se que aproximadamente 80 % do biodiesel brasileiro é originado do óleo de soja, cuja estrutura é composta, em maioria, por ácidos graxos insaturados, gerando maior tendência a oxidação, principalmente quando armazenado durante longos períodos [2]. Na Tabela 1 abaixo é mostrada a composição média dos ácidos graxos insaturados presentes nos óleos de soja e milho.

Tabela 1 – Ácidos graxos insaturados presentes nos óleos de soja e milho.

| Ácido Graxo | | Óleo de Soja %(w/w) | Óleo de Milho %(w/w) |
|--------------|------|---------------------|----------------------|
| Palmitoleico | 16:1 | 0,1 | 0,6 |
| Oleico | 18:1 | 24,9 | 65,6 |
| Linoleico | 18:2 | 53,0 | 25,2 |
| Linolênico | 18:3 | 6,1 | 0,1 |
| Gadoleico | 20:1 | 0,3 | 0,1 |
| Erúcico | 22:1 | 0,3 | 0,1 |

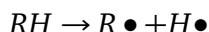
Fonte: [13].

Em relação à oxidação, o biodiesel é suscetível a dois principais processos dados como: auto-oxidação e foto-oxidação. O processo de auto-oxidação é o mais comum e a maior causa de oxidação nos biodiesel. Ele ocorre a partir do contato do biodiesel com o oxigênio. Baseia-se em uma reação radicalar em cadeia, não reversível, apresentando etapas de iniciação, propagação e término [14]. A foto-oxidação necessita da presença de luz e oxigênio. Nesse processo, a presença de luz ultravioleta (UV) decompõe os componentes de oxigênio no biodiesel, gerando radicais que dão início ao processo de oxidação pela formação de hidroperóxidos [5]. A formação de substâncias insolúveis apresenta dependência com as reações oxidativas [12]. Na Figura 2 é mostrado um esquema geral do processo de

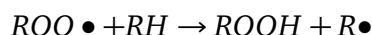
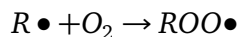
oxidação de lipídeos. Na etapa de iniciação ocorre, devido influências de luz e calor, a formação de radicais livres ($R\bullet$) do ácido graxo (RH). Na etapa de propagação, os radicais livres são transformados em outros tipos de radicais livres, tais como peróxidos ($ROO\bullet$) e hidroperóxidos (ROOH), que exercem a função de propagadores da reação oxidativa. Por fim, no processo de término dois radicais se combinam formando produtos estáveis [14].

Figura 2 – Esquema geral do processo oxidativo de lipídeos.

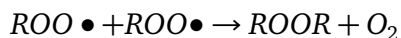
Iniciação:



Propagação:



Término:



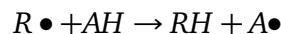
Fonte: adaptado de [14].

1.2 Antioxidantes e Contaminantes Metálicos

Pela grande dificuldade em se evitar a oxidação do biodiesel, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de preveni-la, visando minimizar fatores que possam dar início à reação de degradação, como luz, temperatura, entre outros citados previamente. O uso de antioxidantes têm se mostrado atualmente o método de maior eficácia no retardamento

do processo oxidativo pelo aumento do período de indução [5]. Sua principal função é retardar o processo de degradação. O efeito depende do tipo de matéria-prima usada para produção do biodiesel [11]. A concentração e tipo de antioxidantes empregados influenciam diretamente na estabilidade do material [5], apresentando crescimento linear entre estabilidade e concentração usada [11]. Na Figura 3 é mostrado um mecanismo geral da ação de antioxidantes, onde, os radicais livres ($R\bullet$) estão submetidos a ação de um antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo (AH), gerando um ácido graxo insaturado (ROH) juntamente com um radical inerte ($A\bullet$) [14].

Figura 3 – Esquema do mecanismo de ação de antioxidantes.



Fonte: adaptado de [14].

Por outro lado, o emprego de antioxidantes pode alterar algumas características do biodiesel como a densidade, viscosidade cinemática, acidez, entre outras [11]. Estudos com blendas de diesel de petróleo e biodiesel mostraram que conforme há aumento na quantidade de biodiesel presente na blenda, a instabilidade da mesma também cresce. Os antioxidantes sintéticos PG (propil galato) e PA (ácido pirogálico) tem apresentado bom desempenho nas misturas. Embora o antioxidante TBHQ (terc-butil-hidroquinona) seja eficaz para retardar processos oxidativos no biodiesel, sua performance não se mantém quando usado na mistura biodiesel/diesel de petróleo [6].

A maioria dos antioxidantes usados são produtos comercialmente disponíveis e sintéticos. Entretanto, em sua maioria, estes produtos apresentam características não favoráveis ao processo, como alto custo. Por esse motivo, diversos estudos sobre antioxidantes naturais têm sido conduzidos, uma vez que auxiliam na estabilidade oxidativa do biodiesel e possuem custo inferior. O uso de cúrcuma como antioxidante natural, mais conhecida como açafrão-da-terra, já foi testado de maneira eficiente. Dados mostraram que o material teve desempenho semelhante ao antioxidante sintético TBHQ, comumente usado no meio industrial. Uma melhora de 83 % no período de indução do biodiesel de soja foi obtido. Dessa forma, a cúrcuma mostrou-se com grande potencial do uso como antioxidante devido a sua eficiência, além de ser natural e apresentar baixo custo para produção [2]. Outro exemplo de antioxidante natural investigado é o alecrim. Um estudo conduzido por Abramović et al [15], apontou que a mistura do extrato de alecrim com óleo de camelina manteve a estabilidade oxidativa do óleo de modo satisfatório.

Os óleos que apresentam grande quantidade de vitamina E e betacaroteno apresentam menor suscetibilidade à oxidação, uma vez que esses compostos são considerados antioxidantes naturais. O óleo de palma bruto obtido a partir do processo de transesterificação com ésteres metílicos possui essa vantagem. Experimentos mostraram que a quantidade de 600 ppm de vitamina E proporcionaram um período de indução maior que 6 horas [16]. O extrato de castanha de caju mostrou-se eficaz quando usado como antioxidante no biodiesel de *Jatropha*¹. O período de indução apresentou aumento com a presença do extrato mas, em temperaturas altas, há decréscimo na variável. O uso desse antioxidante se mostra economicamente viável nas regiões em que seu plantio é favorecido a partir das condições ambientais propícias. A partir dos métodos de extrapolação aplicados no trabalho pode-se concluir que o biodiesel de *Jatropha* pode permanecer estocado pelo período de 6 meses em temperatura ambiente com adição de 1655 ppm do antioxidante natural extraído das castanhas de caju [17]. O biodiesel de soja hidrogenado, com a ação do antioxidante extraído do núcleo da semente de manga, apresentou um período de indução de aproximadamente 13,53 horas, extrapolando o limite internacional que recomenda um mínimo de 6 horas [18].

A presença de contaminantes de origem metálica é também um dos grandes responsáveis pela degradação do biodiesel no processo de estocagem. Esses metais apresentam efeito catalítico quando em contato com o biodiesel, proporcionando a formação de sedimentos insolúveis [5]. Dados mostraram que Cobre (Cu) é o material com maior efeito catalítico no biodiesel enquanto que Alumínio (Al) não apresenta qualquer influência [5]. Alguns estudos com biodiesel de mamona também foram realizados para avaliação do efeito catalítico dos metais Ferro (Fe), Níquel (Ni), Manganês (Mn) e Cobalto (Co). Tais metais foram escolhidos devido a sua comum utilização na fabricação de tanques para armazenamento. Os resultados mostraram que Cobre é o material com maior efeito catalítico, seguido de Cobalto, Manganês, Níquel e Ferro [9].

Quando puro, o biodiesel aumenta cerca de 10 % a emissão de compostos poluentes do tipo NO_x , em comparação ao diesel de petróleo. Entretanto, há eficiente redução na emissão de hidrocarbonetos, CO e matéria particulada [3]. Outros pesquisadores afirmam que o uso de antioxidantes no biodiesel favorece a redução na emissão de compostos de NO_x , e aumentam a emissão de CO e THC (hidrocarbonetos totais). Entretanto, esses índices de poluição são menores que os apresentados pelo diesel de origem fóssil [5].

¹ *Jatropha* é um gênero botânico pertencente a família Euphorbiaceae que inclui a mamona.

1.3 Técnicas de Análise

1.3.1 Método de Aquecimento Acelerado

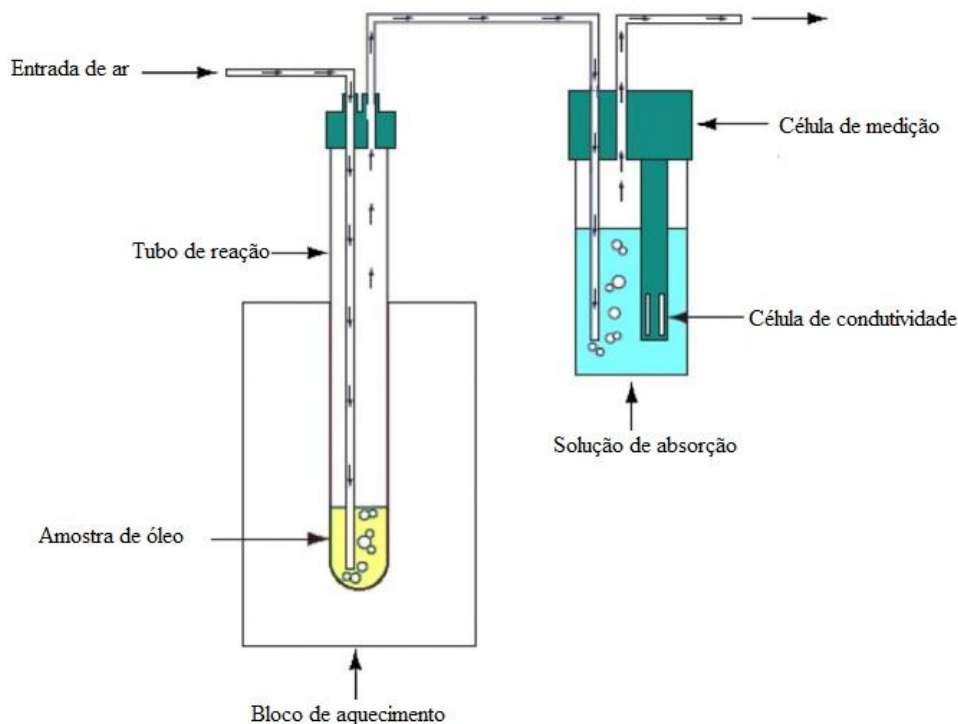
Um dos fatores mais importante para avaliar o processo de oxidação de biodiesel é chamado de estabilidade oxidativa ou período de indução. Ele é determinado como o tempo ao qual a formação de hidroperóxidos é pequena, uma vez o biodiesel já estocado. Tal tempo pode variar dependendo de algumas condições em que o biodiesel é submetido como período de estocagem [5], presença ou ausência de aditivos [5], grau de insaturações dos ésteres [8], e até mesmo a posição das duplas ligações. Uma vez que o processo oxidativo é iniciado ele é irreversível [5].

O método de aquecimento acelerado ou método Rancimat é considerado o método oficial para determinar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras [5] e o único aceito internacionalmente [19]. No método, a estabilidade oxidativa do biodiesel é alcançada acelerando o processo oxidativo através do aquecimento à temperaturas fixas [20]. Assim, a oxidação é induzida por um fluxo contínuo de ar através das amostras de biodiesel [19], que devem conter aproximadamente 3 g de massa, mantidas a temperaturas constantes, que podem ser 100 °C, 110 °C ou 120 °C [21]. É possível realizar a análise de até oito amostras ao mesmo tempo [19].

Os vapores produzidos no processo de oxidação que saem das amostras, são capturados em frascos que possuem água deionizada, conectados a um eletrodo a fim de medir a condutividade do meio [21]. O eletrodo é conectado a um sistema eletrônico que captura os dados informados e obtém, automaticamente, o período de indução das amostras a partir do ponto de inflexão da curva de condutividade [21, 20]. O crescimento da curva é causado pela dissociação de produtos voláteis, como ácido carboxílico, produzidos durante o processo de oxidação e que são absorvidos pela água [21].

Na Figura 4 é mostrado o esquema do método de aquecimento acelerado Rancimat.

Figura 4 – Esquema do método de aquecimento acelerado usando o equipamento Rancimat.



Fonte: adaptado de [21].

A norma europeia EN 14214 [22] regulamenta os valores ideais a serem obtidos pelo teste Rancimat para combustíveis automotivos. Ela indica que o período de indução ideal deve ser igual ou superior a 6 h para testes realizados em temperatura de 110 °C.

Uma das principais desvantagens do uso desse método é a sua demora para realização das análises, podendo ser superior a 6 h [23], dependendo da qualidade do produto a ser avaliado.

Biodiesel oriundos de diferentes matérias-primas têm sido amplamente estudados a partir do método de aquecimento acelerado, tais como: colza [24], girasol [24], soja [25], sebo bovino [26], entre outros.

1.3.2 Índice de Acidez

O monitoramento dos valores de índice de acidez nos biodiesel, quando encontrados em armazenamento, é de suma importância para o controle da presença ou não de água no material. Os índices de acidez variam quando há a presença de água. Para aplicação do método, usa-se a fenoftaleína como indicador ácido-base e solução alcoólica de KOH como titulante. O método recomendado internacionalmente (EN 14104 [27]) para o controle desse parâmetro é dado pela norma EN 14214 [22], onde o limite máximo de acidez é determinado como sendo igual a 0,5 mg de KOH g⁻¹ [8].

1.3.3 Ponto de Névoa e Ponto de Fluidez

Biodiesel de diferentes matérias-primas possuem diferentes propriedades físico-químicas, assim como mencionado anteriormente. Por esse motivo, a temperatura pode interferir diretamente nas propriedades dos biodiesel. Em baixas temperaturas, biodiesel têm a tendência de perder sua fluidez assim como sofrerem solidificações parciais, podendo ocasionar problemas nos motores onde estão sendo usados como o entupimento do sistema de filtração [8].

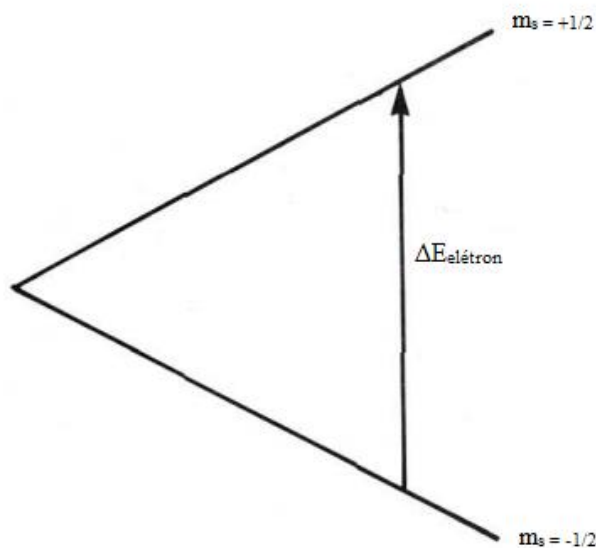
O método ASTM D2500 [28] avalia o ponto de névoa do material, onde é determinado pela temperatura na qual ocorre a formação inicial de cristais quando o biodiesel é resfriado [8].

O ponto de fluidez, determinado pelo método EN ISO 3016, é estabelecido como a temperatura na qual o biocombustível perde sua fluidez quando submetido a resfriamento [8].

1.3.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A Ressonância Paramagnética de Eletrônica (RPE) faz uso das interações entre radiação eletromagnética e momentos magnéticos provenientes dos elétrons. A técnica de espectroscopia pode ser aplicada para estudos de radicais orgânicos livres pois estes são considerados espécies paramagnéticas [29]. As amostras, depositadas em tubos de vidro, são submetidas a uma radiação com frequência constante e campo magnético variante, estimulando a condição ressonante no sistema. O sinal de energia absorvida é obtido, usando a segunda derivada, onde faz-se possível a determinação de componentes químicas [29], podendo assim rastrear a formação dos radicais livres que desencadeiam o processo oxidativo. A grande parte de informações sobre as moléculas dos materiais analisados é obtida a partir do espectro de absorção gerado [30].

Cientificamente sabe-se que os elétrons possuem dois estados de spin eletrônicos associados, determinados como $m_s = +\frac{1}{2}$ e $m_s = -\frac{1}{2}$. Ambos os estados possuem a mesma energia associada quando não sofrem influência de um campo magnético. Mas, quando há a aplicação de um campo magnético no sistema há a separação dos dois estados possíveis m_s , como mostrado na Figura 5.

Figura 5 – Separação eletrônica dos estados de spin m_s submetidos a campo um magnético.

Fonte: adaptado de [29].

A variação de energia ΔE é diretamente proporcional a intensidade do campo magnético (H_0), a frequência de operação do espectômetro (ν), do magnéton de Bohr (β) e do fator de proporcionalidade g , como mostrado na equação abaixo:

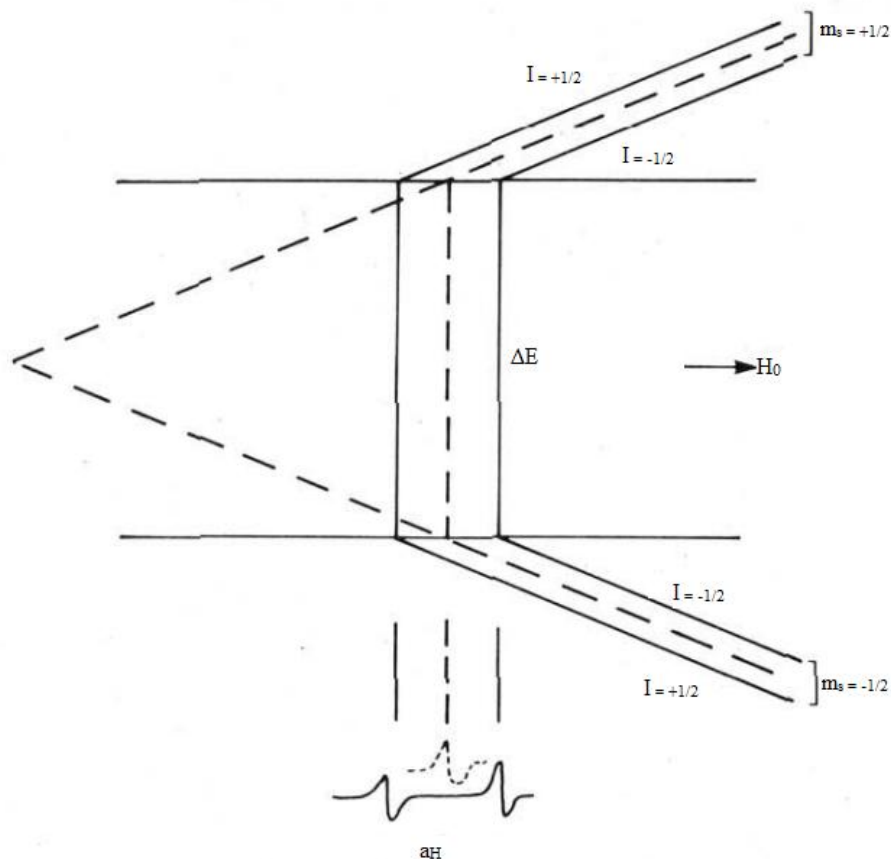
$$\Delta E = hg\beta H_0 \quad (1.1)$$

O fator de proporcionalidade g é um dos principais parâmetros para extrair informações acerca das espécies observadas. Radicais com rotação livre, possuem um par de elétrons desemparelhados, apresentando apenas um valor de g . Radicais livres orgânicos com carbono centrado possuem valores de g próximos ao do elétron livre de 2,0036. Para complexos metálicos, g pode variar dependendo da espécie observada, podendo gerar informações importantes acerca da estrutura eletrônica do metal [29].

O desdobramento hiperfino pode também determinar informações acerca dos radicais observados. Ele é o resultado da interação entre o elétron desemparelhado e os núcleos que estão perto deste elétron e que possuem momento nuclear intrínsecos [31]. O desdobramento dos níveis de energia do sistema é resultado das interações entre o elétron desemparelhado e os núcleos. O número de linhas geradas depende diretamente do número de spin nuclear I e do número de spin eletrônico S .

Na Figura 6 é mostrado um exemplo da interação hiperfina de um radical livre com um átomo de hidrogênio que apresenta constante de desdobramento $a_H = 507$ G. Para esse caso, há a presença de duas linhas de ressonância [29].

Figura 6 – Esquema do desdobramento hiperfino da interação de um radical livre com um átomo de hidrogênio.



Fonte: adaptado de [29].

A RPE permite acompanhar os radicais em processo de redução ou oxidação em compostos biológicos sendo empregada de forma positiva em estudos com quinóis [32]. O uso da técnica para análise do efeito de antioxidantes no glicerol já foi realizado [33] e a eficiência do estudo das propriedades de antioxidantes em glicerol previamente mostrada [34]. Um dos grandes problemas encontrados na detecção de radicais livres a partir da RPE é que a maioria desses radicais, como por exemplo $\bullet\text{OH}$ (radical hidróxi), $\bullet\text{CH}_3$ (radical metil), $\bullet\text{OCH}_3$ (radical metoxilo), possuem tempo de vida curto o que impossibilita a detecção direta no equipamento [35]. Desse modo o uso da técnica de *spin trapping* faz-se necessário.

1.3.4.1 Técnica de Spin Trapping

A RPE é considerada um dos métodos que apresenta menor ambiguidade na detecção de radicais livres [36]. Mas, os radicais livres de interesse a serem pesquisados nem sempre são possíveis de serem detectados, pois suas concentrações podem estar abaixo do limite de detecção do equipamento ou até mesmo pelo fato de seu tempo de vida ser muito curto

[36]. Alguns radicais com essas características são $\bullet\text{O}_2$, $\bullet\text{OH}$, radicais alcóxi, radicais livres centrados em enxofre, entre outros. Desse modo, o uso de *spin traps* tenta superar esses problemas [36].

A técnica de *spin trapping* baseia-se na utilização de espécies diamagnéticas² para o estudo de sistemas paramagnéticos, assim como radicais livres com curtos tempos de vida [37, 36]. A espécie diamagnética, *spin trap*, é adicionada ao sistema de estudo formando um radical com maior estabilidade, denominado de spin aduto [38]. Os *spin traps* não possuem elétrons desemparelhados, portanto, não são detectados por RPE, apenas o spin aduto formado apresenta sinal de ressonância [39]. O uso da técnica só é eficiente quando o spin aduto formado adquire maior estabilidade que o radical aprisionado [37]. O spin aduto pode fornecer pelo menos uma indicação qualitativa da presença de radicais, o tipo de radical livre observado e até mesmo, em alguns casos, informações quantitativas sobre os mesmos [39]. Tais informações, assim como características presentes nos espectros obtidos de absorção, podem levar a indentificação dos tipos de radicais livres [39].

A técnica de *spin trapping* é considerado uma ferramenta valiosa no estudo de radicais livres pois possui um uso experimental considerado simples, menor demanda de tempo quando comparado à outras técnicas de estudo de radicais livres com curtos tempos de vida [37], além de permitir a observação indireta de radicais, nos quais é impossível sua observação direta por RPE [36]. Essa técnica tem sido aplicada eficientemente na detecção e identificação de vários tipos de radicais livres em amostras *in vivo* [39] assim como em análises de óleos e gorduras [40, 41], estudos biomédicos [42], entre outros. Pode ser dada como um método rápido de análise oxidativa de óleos [40].

Os spin adutos detectados por RPE nem sempre são os primeiros formados no sistema pois, diversas reações podem acontecer caso os radicais formados inicialmente sejam muito reativos, assim como o radical hidroxila que reage facilmente com moléculas orgânicas [39].

Dois principais tipos de *spin traps* são comumente usados, os compostos nitrosos e as nitronas [36, 38]. Os compostos nitrosos podem fornecer uma maior quantidade de informações acerca do radical, quando comparado com as nitronas, podendo então fornecer informações quanto aos parâmetros de desdobramento hiperfino [36] de maneira mais simples. Os compostos nitrosos podem ser usados para detecção de radicais em locais não acessíveis a observação direta por RPE como por exemplo em órgãos de animais ou humanos [38]. A eficiência do aprisionamento de radicais livres usando compostos nitróxidos depende de inúmeros fatores.

Alguns reagentes presentes no sistema de estudo podem competir com o *spin trap* nitroso na captura dos radicais livres, ou até mesmo competir com os radicais nitróxidos já formados, fazendo com que sua concentração decresça. Desse modo, podemos dizer que, um resultado negativo na observação de radicais livres não pode levar a conclusão da não existência dos mesmos no meio estudado [43].

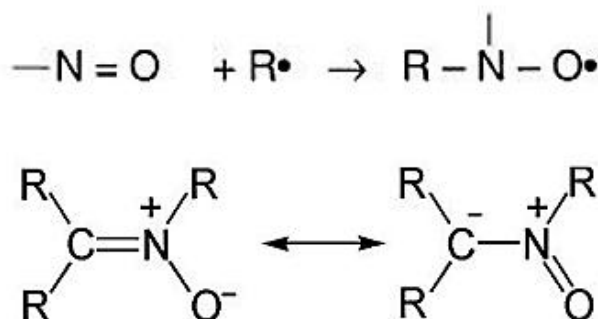
² Espécies diamagnéticas são materiais que são repelidos quando na presença de fortes campos magnéticos.

A escolha do solvente, quando em uso de um *spin trap* nitroso, é um dos fatores de maior importância. Em alguns casos os radicais aprisionados podem ter origem das moléculas do solvente. Desse modo, não é recomendado o uso de metanol, etanol, acetona, ácido acético como solventes em reações envolvendo a geração de radicais $\bullet\text{OH}$. O não uso de solventes é uma boa escolha quando a substância usada apresenta-se em estado líquido a temperatura ambiente [43].

As nitronas apresentam melhor eficiência como *spin trap* para o estudo de radicais de oxigênio centrado mas, perdem alguma informação pois o radical aprisionado se liga ao carbono adjacente ao nitrogênio [36]. As nitronas e seus spin adutos apresentam maior estabilidade térmica e fotolítica [43, 38], mas seus radicais apenas podem ser identificados a partir das constantes de acoplamento do nitrogênio e próton beta, a_N e a_H , tornando a identificação do radical imprecisa [38, 43].

Na Figura 7 são mostradas as estruturas químicas dos compostos nitrosos e compostos nitronas.

Figura 7 – Compostos nitrosos e nitronas.



Fonte: adaptado de [44],[45].

A maioria dos *spin traps* nitronas usados, como o PBN (N-t-Butyl- α -phenylnitron) e o DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) possuem um hidrogênio beta que pode fornecer informações sobre o radical aprisionado [36, 38].

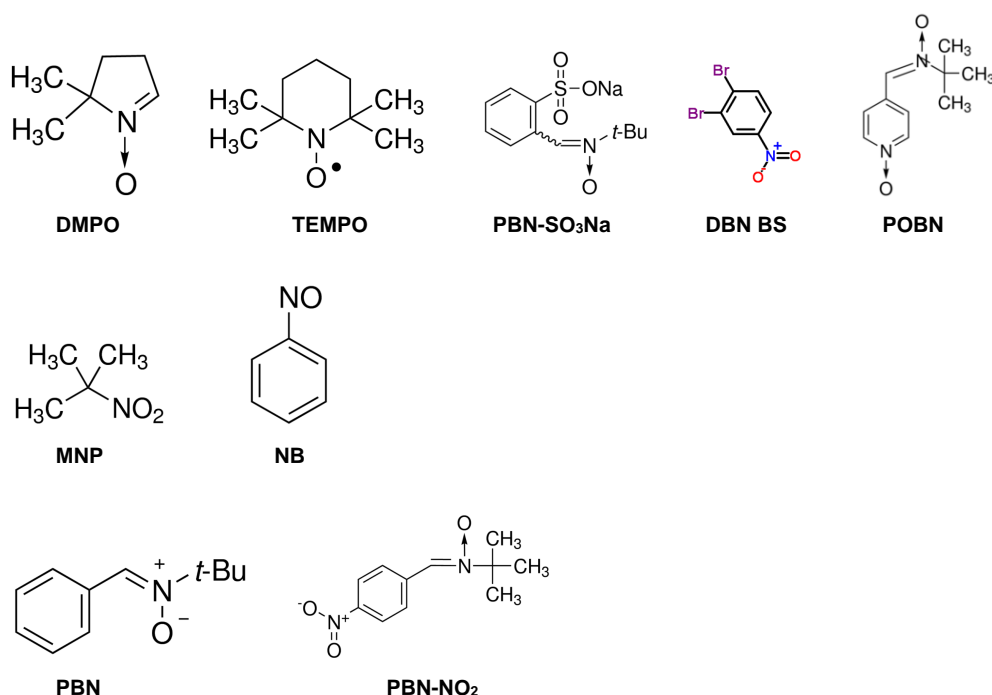
A formação de spin adutos e suas propriedades estão diretamente relacionadas com o tipo de *spin trap* utilizado pois, quanto mais reativo o radical, principalmente o $\bullet\text{OH}$, diferentes reações podem ocorrer com o uso de determinado *spin trap*, possuindo variações significativas em sua estrutura. Considerando a reação de aprisionamento do radical $\bullet\text{OH}$ com diferentes *spin traps* como DMPO, PBN e 4-POBN (α -pyridyl-1-oxide-N-tert-

butyl nitrone) estudos mostraram que a constante de taxa da reação de $\bullet\text{OH}$ com DMPO apresentou valor igual a $4,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, com taxa de formação de spin adutos de $3,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, ou seja, a maior parte da reação foi transformada em spin adutos. Dados de radicais $\bullet\text{OH}$ com 4-POBN apresentaram resultados semelhantes ao DMPO, com aproximadamente 25 % da reação gerando spin adutos. Mas, quanto ao PBN, apenas uma pequena quantidade das reações levou à formação de spin adutos, apresentando uma taxa de $7,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, enquanto que a taxa de toda a reação foi de $7,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Tais discrepâncias mostraram que para cada spin aduto formado nas reações com radicais $\bullet\text{OH}$ pode-se prever que exista uma proteção antioxidante de cerca de 85 vezes para os spin PBN e DMPO enquanto que uma de 20 vezes para o 4-POBN [42].

Em diversos estudos o PBN tem sido apontado como um dos mais comuns *spin traps* usados [41]. Ele é preferencialmente escolhido no estudo de radicais livres que possuem fases lipofílicas³ [42]. O DMPO é geralmente escolhido para detecção de radicais em meio aquoso e sistemas biológicos sendo o preferido em estudos bioquímicos envolvendo radicais $\bullet\text{OH}$ [42], pois possui grande eficiência na captura de radicais $\bullet\text{O}_2$ e $\bullet\text{OH}$ além de apresentar spin adutos mais estáveis [46].

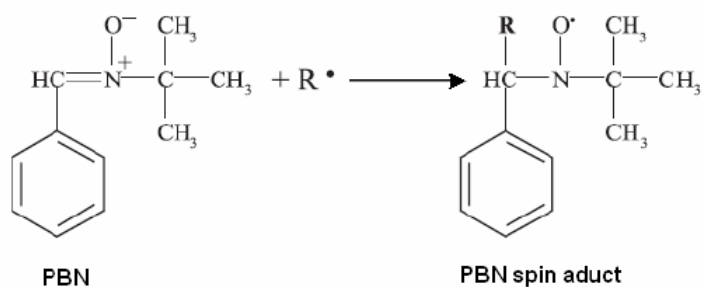
Na Figura 8 é mostrado a cadeia química de alguns *spin traps*. DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide), TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl), PBN- SO_3Na (N-tert-Butyl- α -(2-sulfophenyl)nitron sodium salt), DBN BS (3,5-dibromo-4-nitrosobenzenesulfonate) e 4-POBN (α -pyridyl-1-oxide-N-tert-butyl nitron) são *spin traps* solúveis em água. MNP (2-methyl-2-nitrosopropane) e NB (nitrosobenzene) são solúveis apenas em lipídeos enquanto que PBN e PBN- NO_2 (N-tert-Butyl- α -(4-nitrophenyl)nitron) são solúveis tanto em água quanto em lipídeos.

³ Substâncias lipofílicas são substâncias solúveis em lipídios.

Figura 8 – Estrutura química de alguns *spin traps*.

Fonte: adaptado de [42].

Na Figura 9 é mostrado a reação de formação do spin aduto a partir do uso do *spin trap* PBN.

Figura 9 – Reação do radical livre com o *spin trap* N-t-Butyl-α-phenylnitrone.

Fonte: [38].

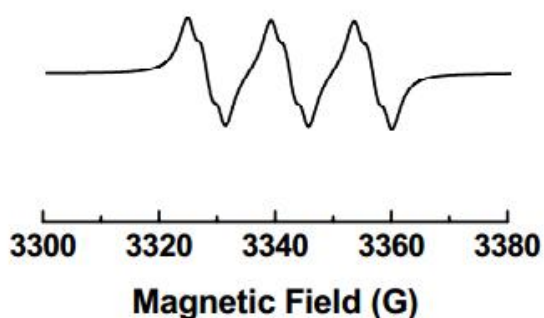
Ao longo dos anos, inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos sobre a observação por RPE das reações de radicais livres $\bullet\text{OH}$ com diferentes substâncias orgânicas. Lagercrantz e Forshult [47] realizaram experimentos de radicais $\bullet\text{OH}$ gerados fotoliticamente em sulfóxidos e sulfonas. Os resultados indicaram que os radicais alquilo são facilmente

aprisionados pelo método nitróxido quando aplicados em sulfóxidos. Em estudos realizados com óleos, o *spin trap* comumente usado é o PBN [40, 48, 35]. Velasco e seus colaboradores [40] mostraram que a técnica é eficiente em estudos de lipídios, mostrando boa correlação entre RPE e o método Rancimat. Estudos da estabilidade oxidativa de bioglicerol, proveniente da fabricação de biodiesel, também foram realizados, mostrando eficácia na análise de decomposição do material [35].

Alguns fatores são cruciais no sucesso do uso do *spin trap* em experimentos, entre eles estão as taxas de aprisionamento dos radicais e as taxas de decaimento do spin aduto. Sabe-se que alguns spin adutos podem ser destruídos a partir de interferências externas do ambiente, e outros, são naturalmente instáveis. Desse modo, a intensidade do sinal do spin aduto obtido por RPE apresenta variações. É frequentemente observado que a intensidade cresce inicialmente, estabiliza e posteriormente decai, tanto em experimentos *in vitro* e *in situ*. A taxa de decaimento do sinal dos radicais adutos é diretamente dependente da estrutura do *spin trap* usado, natureza do solvente da amostra e pH [42]. Dados experimentais indicam que a taxa de decaimento de primeira ordem em água do spin aduto PBN/•OH cresce cerca de 10 vezes quando o pH da amostra está entre 6 e 8,5 [42]. Janzen e colaboradores [49] também mostraram que a estabilidade do spin aduto formado a partir do radical livre hidroxila com o *spin trap* PBN varia de acordo com o pH da amostra.

O espectro do spin aduto simulado de PBN/•OH é mostrado na Figura 10. Essa espécie formada possui valores característicos de $a_N = 14,6$ G e $a_H = 3,1$ G [38].

Figura 10 – Espectro de EPR do spin aduto formado a partir do *spin trap* N-t-Butyl- α -phenylnitron e radical hidróxi.



Fonte: adaptado de [38].

Buettner [50] apresentou dados sobre parâmetros característicos dos spin adutos formados a partir do PBN com inúmeros diferentes radicais e solventes. Alguns desses dados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros do spin aduto formado a partir do *spin trap* N-t-Butyl- α -phenylnitrone.

| Spin aduto | Solvente | a_N (G) | a_H (G) |
|------------|-----------------|-----------|-----------|
| •H | Benzeno | 14,25 | 7,13 |
| •H | Água | 16,80 | 10,90 |
| •OH | Água | 15,30 | 2,75 |
| •OH | Acetáto etílico | - | 2,10 |
| •OH | Benzeno | 14,12 | 2,01 |
| •OOH | Água | 14,80 | 2,75 |
| •OOH | Benzeno | 14,28 | 2,75 |

Fonte: adaptado de [50].

2 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo adaptar e desenvolver uma metodologia para a quantificação de radicais livres na degradação oxidativa de biodiesel a partir do uso da técnica de *spin trapping*. Também visou o monitoramento por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) da formação de radicais livres em amostras de biodiesel sintetizados a partir de diferentes matérias-primas e correlacionar as informações obtidas com as técnicas e normas vigentes previamente existentes.

3 Materiais e Métodos

3.1 Preparação das Amostras

3.1.1 Reação de Transesterificação

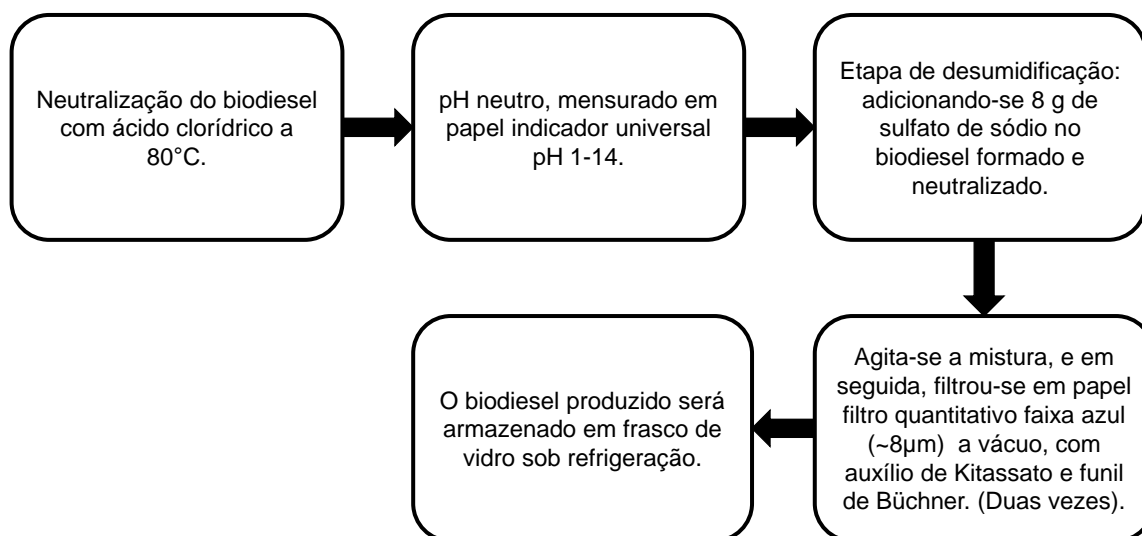
Foram usados 100 g de óleo de soja e óleo de milho comerciais como matéria prima para a síntese do biodiesel. O biodiesel foi produzido pela reação de transesterificação por rota metílica com 50 mL de metanol grau P. A. com 0,8 g de hidróxido de sódio (NaOH) como catalisador. As misturas foram submetidas a agitação lenta, com aquecimento sob refluxo, a uma temperatura de 65 °C durante 2 horas. Para promover uma melhor separação dos triglicerídeos, glicerol e o álcool presentes nos ésteres obtidos, as amostras de biodiesel foram neutralizadas com uma solução de ácido clorídrico 1 % (v/v) a 80 °C, a fim de minimizar a formação de emulsões. Posteriormente, os mesmos foram lavados com água destilada a 80 °C até que a água de lavagem alcançasse o pH 7, aferido em papel indicador universal pH 1-14 (Macherey Nagel®, Alemanha). Após a neutralização, a desumidificação das amostras foi realizada adicionando-se 8 g de sulfato de sódio anidro P. A. (Na₂SO₄) sendo que o sulfato de sódio foi previamente seco em estufa por 30 min a 120 °C. As misturas foram agitadas e, em seguida, filtradas em papel de filtro quantitativo faixa azul (~8 µm) a vácuo. As etapas de desumidificação e neutralização foram repetidas por mais duas vezes. As amostras de biodiesel produzidos foram armazenados em frasco de vidro sob refrigeração e em ausência de luz.

Na Figura 11 é mostrado um fluxograma sobre os processos nos quais os biodiesel foram submetidos.

O biodiesel comercial (BS - BIOS/ Marialva –PR) usado estava dentro das especificações conforme regulamento técnico ANP N° 3/2014. Seus dados são mostrados na Tabela 3.

Todas as amostras de biodiesel usadas não apresentam adição de antioxidantes.

Figura 11 – Fluxograma das etapas de purificação, desumidificação e filtração do biodiesel.



Fonte: a própria autora.

Tabela 3 – Especificações do biodiesel comercial.

| Item Analítico | Unidade | Método | Especificações* | Resultados |
|--------------------------------|--------------------|-------------|-----------------|------------|
| Teor de água | mg/kg | ASTM D 6304 | máx. 200,0 | 191,8 |
| Viscosidade Cinemática a 40 °C | mm ² /s | ASTM D 445 | 3,000 - 6,000 | 4,467 |
| Ponto de Fulgor | °C | ASTM D 93 | mín. 100,0 | 157 |
| Teor de Éster | g/100g | EN 14103 | mín. 96,5 | 96,6 |
| Índice de Acidez | mg/g | ASTM D 664 | máx. 0,50 | 0,44 |

*Conforme regulamento técnico ANP N° 3/2014.

3.1.2 Incubação Com *Spin Trap* N-t-Butyl- α -phenylnitrone

As amostras de biodiesel foram incubadas usando o *spin trap* N-t-Butyl- α -phenylnitrone (PBN) com pureza $\geq 98\%$ adquirido da empresa Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemanha) e usado como recebido. Foi coletada 1 g de cada amostra de biodiesel e adicionado 0,1 mg de *spin trap* PBN. As amostras foram agitadas manualmente por aproximadamente 2 min até a total solubilização do PBN. Após a solubilização, cerca de 0,05 g de cada amostra incubada foram pesadas nos tubos de quartzo próprios para análise no equipamento de RPE com 4 mm de diâmetro. A metodologia de incubação foi adaptada a partir de Velasco et al [40].

A escolha do *spin trap* usado deve-se ao fato de o material ser solúvel em óleos e água, facilitando sua solubilização no processo de incubação.

3.2 Análises

3.2.1 Ressonância Paramagnética Eletrônica

3.2.1.1 Quantificação de espécies do padrão marcador de campo de manganês dopado com óxido de magnésio (MgO:Mn²⁺)

Previamente a esse estudo, foi realizada uma análise entre dois padrões do equipamento. Foram colocados na cavidade ressonante dois padrões paramagnéticos de parâmetros espectroscópicos conhecidos. O marcador de campo de cromo dopado com óxido de magnésio (Cr³⁺:MgO) cujo número de espécies paramagnéticas é conhecido e, o marcador de campo de manganês dopado com óxido de magnésio (MgO:Mn²⁺), fornecido pelo fabricante do equipamento. Desse modo, em medidas realizadas previamente, foram gerados espectros desses dois marcadores simultaneamente. Por comparação entre as áreas obtidas por integração matemática dos espectros adquiridos, fez-se possível a determinação do número de espécies existentes no padrão de manganês (MgO:Mn²⁺). Após essa determinação, o marcador de campo de manganês dopado com óxido de magnésio (MgO:Mn²⁺) foi usado em todas as medidas de RPE realizadas, obtendo seu espectro juntamente com os dos biodiesel a fim de proporcionar a padronização necessária para realizar a quantificação das espécies aprisionadas nas amostras de biodiesel.

3.2.1.2 Análises com aquecimento a 70 °C

As medidas de RPE foram realizadas em um espectrômetro JEOL (JES-PE-3X), operando em banda X (~9,5 GHz), pertencente ao Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética Eletrônica (LAFLURPE), Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Foi adotado um centro de campo magnético de 3290 G com varredura de 250 G, tempo de resposta de 0,1 s, frequência de 100 KHz e scans de 4 min. As amostras

de biodiesel foram analisadas por RPE imediatamente após o processo de incubação com *spin trap* PBN. As amostras controle foram armazenadas em estufa durante 21 dias a uma temperatura de 50 °C e retiradas para realização das análises e incubação com PBN nos dias necessários. Dados de RPE foram coletados a temperatura constante de 70 °C em intervalos de tempo de 5 min, durante aproximadamente 2 h. Foram coletados dados nos dias 1, 6, 13 e 21. Em todas as medidas foi usado o padrão de manganês (MgO:Mn²⁺) para possibilitar a quantificação dos radicais aprisionados nas amostras analisadas.

3.2.1.3 Análises em temperatura ambiente

Em todas as medidas de RPE foi usado o padrão marcador de campo e a mesmas configurações das análises com aquecimento. As amostras de biodiesel foram incubadas com *spin trap* PBN uma única vez, no primeiro dia de análise, e acompanhadas por RPE a aproximadamente cada 7 dias em temperatura ambiente. As amostras foram mantidas fechadas hermeticamente e na ausência de luz.

3.2.1.4 Quantificação dos radicais e cálculo do fator g

Em todas as medidas de RPE realizadas o marcador de campo de manganês dopado com óxido de magnésio (MgO:Mn²⁺) foi utilizado. Sabe-se que esse padrão possui um momento de spin resultante de $\frac{5}{2}$ e apresenta um espectro característico com seis linhas de ressonância [51] e sua quarta linha espectral apresenta valor de g de 1,981. A partir do valor de g conhecido referente a quarta linha do padrão, foi calculado o valor do fator espectroscópico do radical detectado de acordo com a equação abaixo.

$$g = \frac{g_4(H_4 - H) + H}{H}$$

Onde:

g é o fator espectroscópico do radical detectado;

g₄ é o fator espectroscópico referente a quarta linha espectral do padrão de manganês;

H é o campo magnético do centro da linha do radical;

H₄ é o campo magnético do centro da quarta linha do padrão de manganês.

A partir do *software* Origin 9.0 realizou-se a integração matemática dos espectros de RPE de cada biodiesel a fim de determinar a quantidade de radicais livres aprisionados pelo *spin trap* PBN, uma vez que se sabe que a área sob uma curva de absorção é proporcional ao número de spins desemparelhados que uma amostra venha a ter [52]. Com base nisso, o número de espécies paramagnéticas dos biodiesel foi determinado pela comparação entre as áreas do radical detectado e da quarta linha espectral do padrão de manganês conforme a equação abaixo.

$$N_{biodiesel} = \frac{A_{radical} * N_{manganês}}{A_{manganês}}$$

Sendo que:

$N_{\text{biodiesel}}$ corresponde ao número de espécies aprisionadas nas amostras de biodiesel;

$N_{\text{manganês}}$ é o número de espécies do padrão de manganês;

A_{radical} é a área do radical detectado;

$A_{\text{manganês}}$ é a área da quarta linha do padrão de manganês.

Para a determinação do número de espécies aprionadas pelo PBN por grama de biodiesel, o valor $N_{\text{biodiesel}}$ foi dividido pela massa de cada amostra colocada nos tubos de RPE.

3.2.2 Simulação computacional dos espectros de RPE

Os espectros de RPE foram simulados no software MATLAB [53], usando a função *garlic* da ferramenta EasySpin [54], disponível gratuitamente online.

3.2.3 Estabilidade Oxidativa

As amostras de biodiesel sintetizadas e a amostra comercial foram submetidas ao aquecimento acelerado a 110 °C de acordo com a norma EN 14112, apenas no primeiro dia de análise (Dia 1), utilizando-se o equipamento RANCIMAT da marca METROHM, modelo 837. Para realização das análises foram usadas 3 g de cada amostra. O aquecimento acelerado foi realizado a 110 °C com taxa de inflação de ar de 10 L h⁻¹, a fim de se determinar a estabilidade oxidativa, fornecido pelo ponto de inflexão da curva entre a condutividade elétrica em μs e o tempo em horas.

3.2.4 Índice De Acidez

As amostras apresentaram-se homogêneas e completamente líquidas. Conforme a norma ABNT NBR 14448 [55], 2 g das amostras foram pesadas em frasco erlenmeyer de 125 mL. Foram adicionados 25 mL de solução de éter etílico-álcool etílico (2:1). Duas gotas do indicador fenolftaleína foram adicionadas. Titulou-se com a solução de hidróxido de sódio 0,01 m padronizada até o aparecimento da coloração rósea, persistindo por mais de 30 segundos.

O índice de acidez foi calculado a partir da equação abaixo:

$$I.A.(%) = \frac{[(Volume_{\text{gasto}} - Volume_{\text{branco}}) * 0,01 * fatordecorreção * 56,1]}{m_{\text{biodiesel}}}$$

3.2.5 Ponto De Névoa e Ponto de Fluidez

Os testes de ponto de névoa e de fluidez foram realizados em conformidade com a norma ASTM D2500 [28].

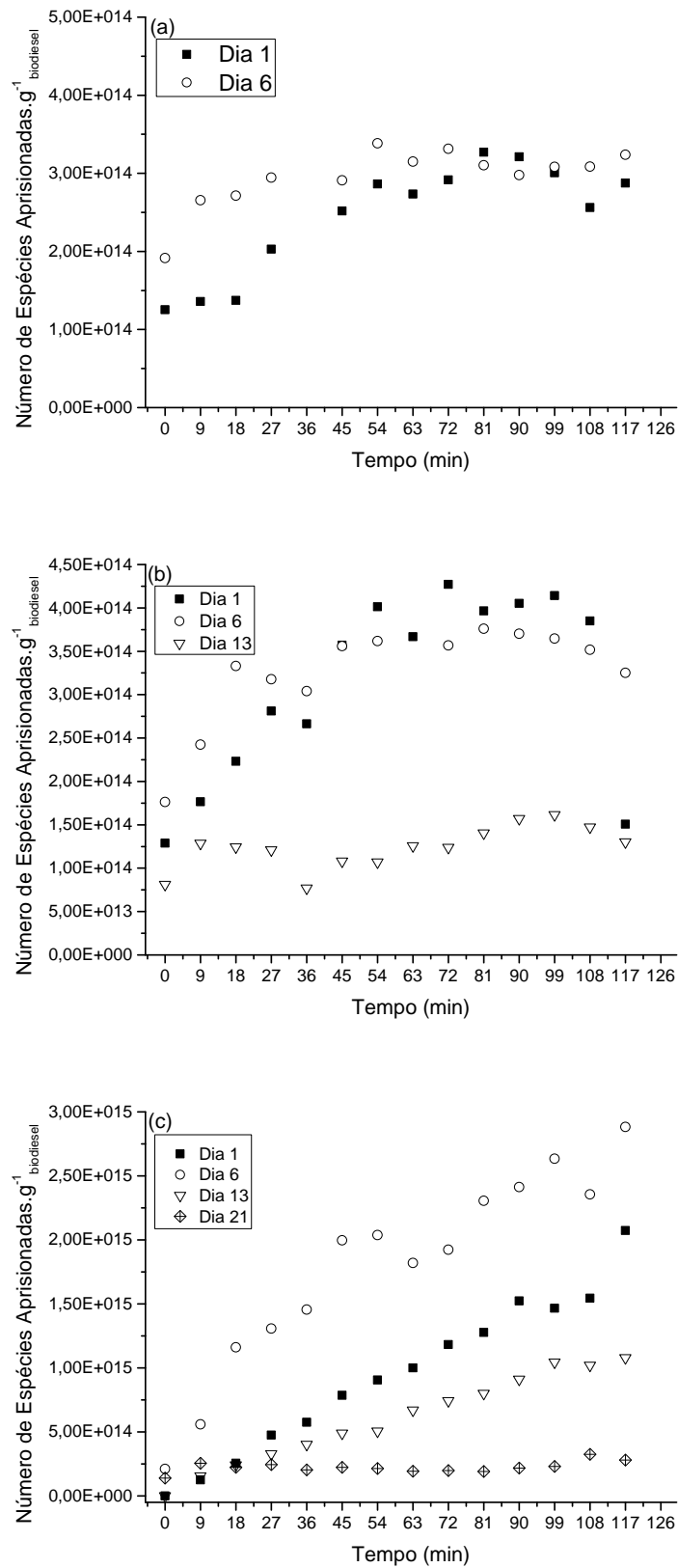
4 Resultados e Discussões

4.1 Ressonância Paramagnética Eletrônica e Estabilidade Oxidativa

4.1.1 Biodiesel de óleo de milho, biodiesel de óleo de soja e biodiesel comercial aquecidos à 70 °C

Na Figura 12, em diferentes escalas, são mostrados os gráficos do número de espécies aprisionadas nos biodiesel de milho (a), soja (b) e comercial (sem adição de antioxidante) (c) obtidos por RPE com o uso da técnica *spin trapping*.

Figura 12 – Número de espécies aprisionadas no processo de degradação nos biodiesel de (a) milho, (b) soja, (c) comercial, em aquecimento de 70 °C.



Fonte: a própria autora.

Na Figura 12-a, nota-se que a formação de spin adutos ocorreu até o 6º dia de análise, não apresentando nenhum radical aprisionado após esse período. A partir de tal informação, pode-se inferir que a reação radicalar do biodiesel de milho ocorreu completamente em 13 dias de análise, não produzindo nenhuma outra molécula de radical livre após esse período.

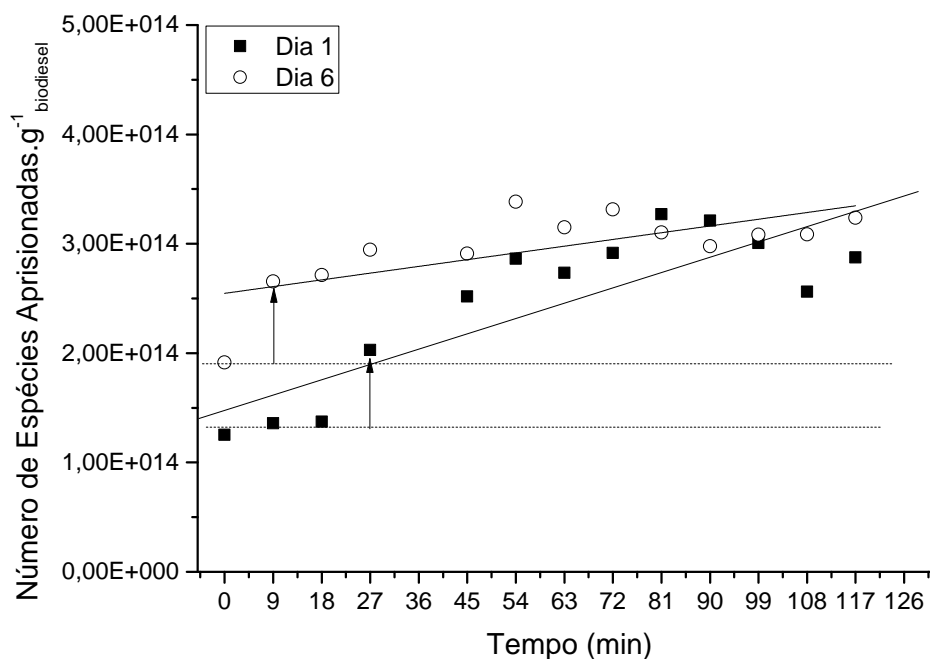
Na figura 12-b observa-se que o aprisionamento de radicais livres pelo *spin trap* se deu até o 13º dia de análise no biodiesel de soja. Além disso, pode-se concluir que seu processo de degradação se deu por completo em 21 dias, pois não foi possível de realizar a quantificação de radicais livres após esse dia. A amostra de biodiesel obtido comercialmente, figura 12-c, mostrou a presença de spin adutos até o 21º dia de análise, perdurando por um maior período quando comparada às demais. Nos gráficos apresentados, é possível observar as três etapas do processo de degradação das amostras: iniciação, propagação e término. Com base em 12-c nota-se que o processo de iniciação da degradação começa desde o primeiro dia de análise, dia 1, indicando a propagação no 6º dia devido ao aumento de spin adutos formados, conseqüentemente, maior número de radicais livres aprisionados pelo *spin trap*. A partir do 13º dia de análise há uma queda na contagem de spin adutos formados, apontando a fase de término da reação. Em 12-b nota-se a iniciação e propagação da reação oxidativa no primeiro dia de análise e, após esse período, a fase de término, com queda na contagem de spin adutos. Na figura 12-a somente foi possível observar as etapas de iniciação e propagação, no 1º e 6º dia de análise, respectivamente. A partir do 13º dia a amostra não mais mostrou sinal de radicais aprisionados, indicando o término da reação radicalar. Desse modo, podemos inferir que o término da degradação no biodiesel de milho se deu entre o 6º e 13º dias de análise. De modo geral, a contagem de spin adutos na amostra de biodiesel comercial mostrou-se maior quando comparado com as demais, além de seu processo de degradação ter perdurado por um maior tempo. Com base nessas informações, pode-se deduzir que os ésteres presentes na amostra são mais estáveis.

As informações obtidas a partir da análise de RPE concordam com os valores de período de indução das amostras obtidos pelo equipamento Rancimat. O biodiesel de milho apresentou período de indução de 0,25 h e um menor tempo de contagem de radicais livres aprisionados, enquanto que o biodiesel de soja mostrou um período de indução de 0,45 h e o comercial de 9,53 h, sendo que esta última amostra perdurou por mais tempo a formação de radicais livres. Com isso, pode-se estabelecer uma relação direta entre o período de indução e tempo de detecção de spin adutos por RPE. Quanto maior a estabilidade oxidativa da amostra maior será o período de aprisionamento de radicais livres, conseqüentemente maior o tempo para degradação total da amostra, enquanto que, quanto menor a estabilidade oxidativa, menor o período de detecção de radicais adutos formados, mostrando uma degradação mais rápida. Os dados também concordam com a porcentagem de ácidos graxos insaturados presentes nas amostras. A partir da Tabela 1, em referência aos biodiesel de óleo de milho e óleo de soja, observa-se que quanto maior a concentração de ácido graxo oleico, menor a estabilidade da amostra e, quanto maior a concentração de ácido graxo linoleico

maior é a estabilidade oxidativa.

Um método para estimativa do período de indução característico dos dados obtidos por RPE foi desenvolvido por Thomsen e colaboradores [56]. O período de indução foi definido como o período de tempo no qual há a formação lenta de radicais, antes de apresentar um crescimento linear significativo. Assim, foram obtidos os períodos de indução dos dados coletados por RPE das amostras de biodiesel submetidas ao aquecimento a 70 °C. A caracterização do período de indução por RPE apenas foi possível de ser realizada para a amostra menos estável, o biodiesel de óleo de milho. A amostra apresentou um período de indução de 27 min para o dia 1 e de 9 min para o dia 6, como mostrado na Figura 13. Os períodos de indução obtidos são os indicados pelas setas.

Figura 13 – Determinação do período de indução da amostra de biodiesel de óleo de milho aquecida a 70 °C a partir da RPE.

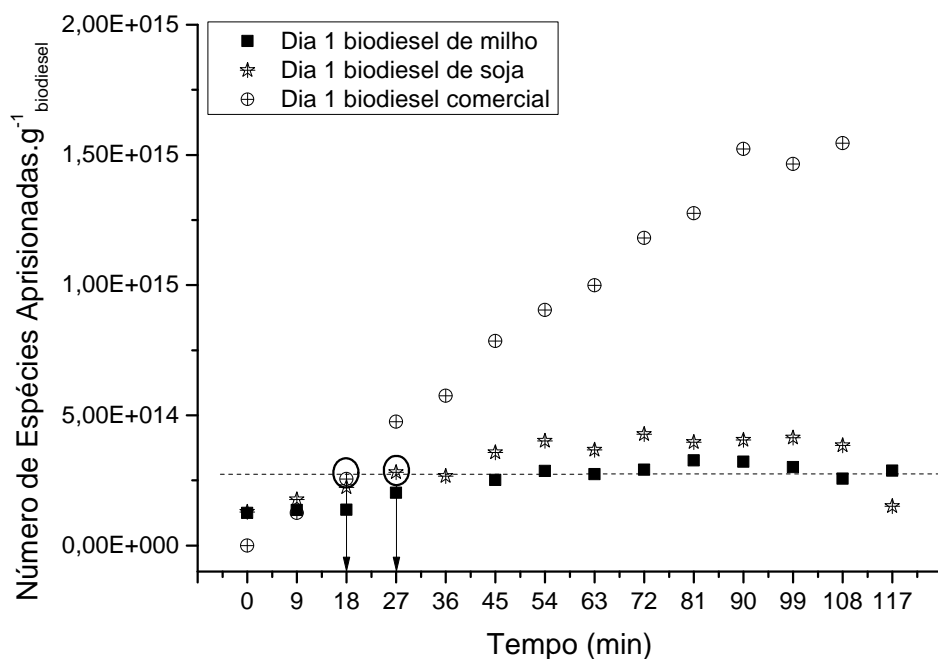


Fonte: a própria autora.

Velasco e seus colaboradores [57] realizaram análises de período de indução por RPE em diferentes amostras de óleo. Nas amostras mais estáveis, a determinação do período de indução pelo método de Thomsen et al [56] não foi possível de ser realizada. Assim, observou-se que nas amostras que possuíam um período de indução bem definidos a quantidade final de radicais detectados era aproximadamente a mesma. Desse modo, Velasco et al [57] realizaram a determinação dos períodos de indução das amostras mais estáveis como sendo o tempo no qual era necessário para atingir a quantidade de radicais

detectados no final do período de indução das outras amostras. O mesmo comportamento pode ser observado nas amostras analisadas no presente trabalho. Portanto, os períodos de indução das amostras mais estáveis, biodiesel de óleo de soja e biodiesel comercial, foram obtidos pelo método adotado por Velasco et al [57]. Um exemplo de como os valores foram obtidos é mostrado na Figura 14. Os períodos de indução obtidos são os indicados pelas setas.

Figura 14 – Determinação do período de indução das amostras de biodiesel de óleo de soja e biodiesel comercial aquecidas a 70 °C a partir da RPE.



Fonte: a própria autora.

Na Tabela 5 são mostrados os valores obtidos para os períodos de indução característicos das amostras de biodiesel por RPE.

Tabela 5 – Períodos de indução obtidos por RPE das amostras submetidas a aquecimento de 70 °C.

| Amostra | Dia 1 (min) | Dia 6 (min) | Dia 13 (min) | Dia 21 (min) |
|----------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| Biodiesel de óleo de milho | 27 | 9 | n.d.* | n.d.* |
| Biodiesel de óleo de soja | 27 | 9 | n.d.* | n.d.* |
| Biodiesel comercial | 18 | n.d.* | 18 | 9 |

*n.d.: não determinado.

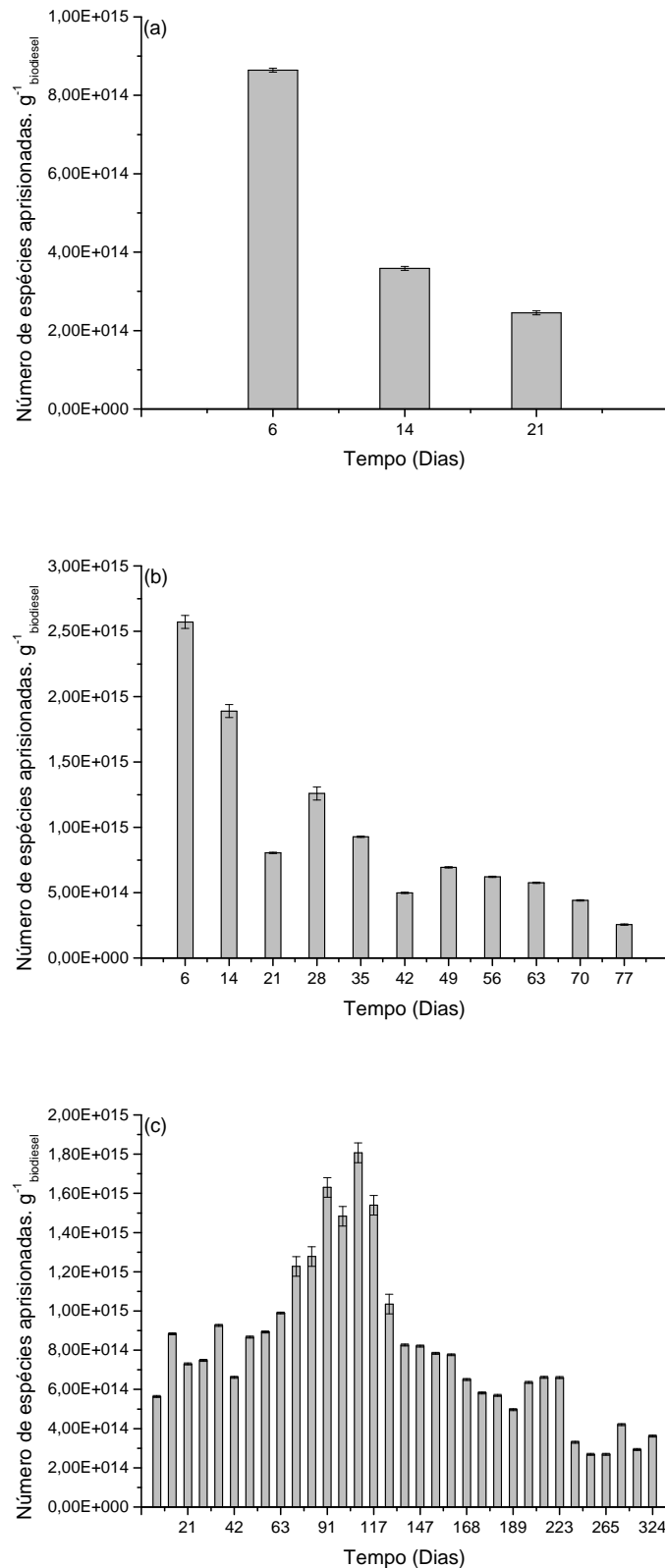
Pode-se observar que quanto maior a degradação da amostra menor é o valor do período de indução, o mesmo acontece com o método de aquecimento acelerado pelo equipamento Rancimat. Alguns valores de período de indução não foram possíveis de se obter principalmente devido à determinação gráfica dos pontos e na mudança das inclinações das retas [57]. O problema da caracterização dos períodos de indução das amostras mais estáveis pode estar relacionado à temperatura ideal que deve ser aplicada a cada óleo [56].

É importante ressaltar que o período de indução empregando o equipamento Rancimat é obtido a partir da aceleração da reação de oxidação, com a formação de espécies voláteis, enquanto que o período de indução de RPE é obtido nos estágios iniciais da degradação. E por esse fato, espera-se que os períodos de indução obtidos por RPE sejam menores que os obtidos pelo método de aquecimento acelerado [57].

4.1.2 Biodiesel de óleo de milho, biodiesel de óleo de soja e biodiesel comercial em temperatura ambiente

Na Figura 15, em diferentes escalas, são mostradas as contagens do número de espécies aprisionadas a partir da análise por RPE dos biodiesel de (a) milho, (b) soja e (c) comercial (sem adição de antioxidante), analisados a temperatura ambiente.

Figura 15 – Contagem do número de espécies aprisionadas, a temperatura ambiente, no processo de degradação nas amostras de biodiesel de (a) milho, (b) soja e (c) comercial.



Fonte: a própria autora.

Pode-se observar que o biodiesel de milho apresentou sinal de radicais livres aprisionados apenas durante os 21 dias iniciais de análise, com um pico na primeira semana de análise. A amostra de biodiesel de soja mostrou um comportamento parecido, com um máximo aprisionamento de radicais na primeira semana de análise, entretanto apresentou um maior período de análise, perdurando por até 77 dias. A amostra de biodiesel comercial apresentou um maior período de análise quando comparada as demais, ultrapassando os 300 dias e, atingindo um pico máximo na contagem de radicais aprisionados no 105º dia de análise. Na Tabela 6 são mostrados os valores máximos de radicais adutos detectados em cada amostra. Ressalta-se que a amostra de biodiesel de óleo de soja apresentou o maior valor.

Tabela 6 – Número de espécies aprisionadas nas amostras de biodiesel.

| Amostras | Número de espécies aprisionada.g ⁻¹ _{biodiesel} |
|----------------------------|---|
| Biodiesel de óleo de milho | $(8,64 \pm 0,05) \times 10^{14}$ |
| Biodiesel de óleo de soja | $(2,57 \pm 0,05) \times 10^{15}$ |
| Biodiesel comercial | $(1,80 \pm 0,05) \times 10^{15}$ |

A partir das figuras podemos inferir que a amostra com maior período de análise, a comercial, apresenta-se como a amostra de maior estabilidade. Pode-se entender que, quanto maior o período no qual há a presença de radicais livres aprisionados, maior é o tempo no qual a amostra leva para se degradar.

Na Figura 15-c é possível de observar um pico máximo no 110º dia. Desse modo, deduz-se que o processo de propagação da reação de oxidação se deu até esse dia, apresentando comportamento crescente no número de radicais aprisionados e, após esse período, inicia-se a etapa de término da reação, com queda do número de radicais livres.

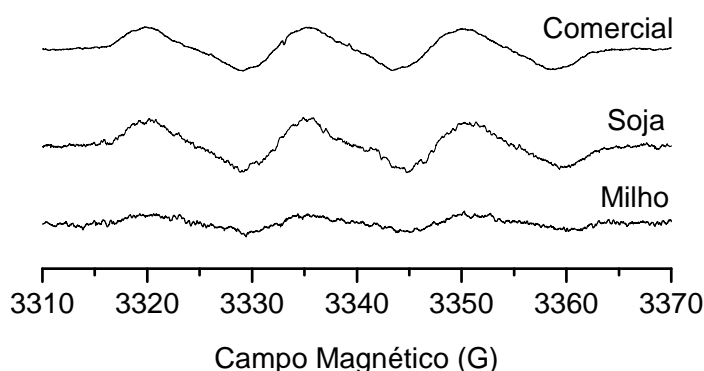
Segundo Davies [42] o *spin trap* PBN possui uma taxa de aprisionamento de radicais livres inferior a produção real desses radicais livres nas amostras analisadas. Isso nos informa que, a quantidade de radicais adutos formados nas amostras de biodiesel e detectadas por RPE podem não representar a quantidade total de radicais livres produzidos no processo de degradação. Na Figura 15 podemos observar ainda uma variação na contagem de spin adutos aprisionados. Davies [42] informa que o sinal de RPE de spin adutos apresenta essa variação, frequentemente sendo observada com um crescimento inicial, estabilização e por fim, decaimento dessas moléculas de spin adutos.

Swartz et al [39] afirmaram que os radicais adutos primeiramente detectados nem sempre são os primeiros radicais formados no sistema pois, os radicais são espécies muito reativas, podendo assim interagir facilmente com espécies orgânicas.

4.1.3 Caracterização dos radicais livres aprisionados

Na Figura 16 são mostrados os espectros do radical aduto obtido para os biodiesel de milho, soja e comercial.

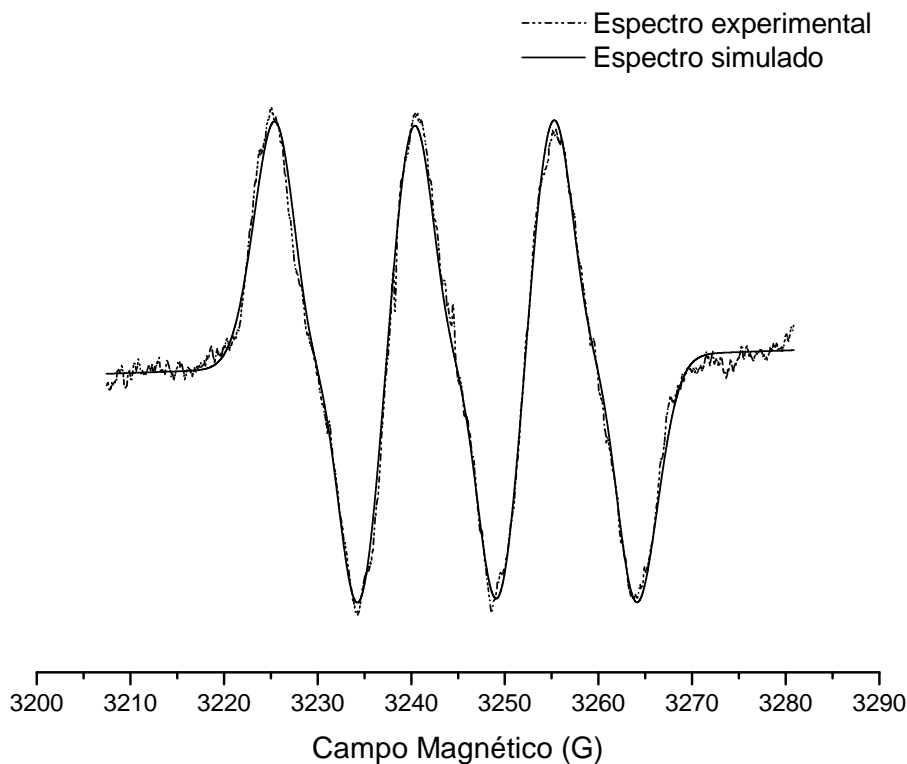
Figura 16 – Espectros de RPE dos biodiesel de milho, soja e comercial mostrando o spin aduto observado experimentalmente.



Fonte: a própria autora.

A simulação computacional foi realizada a fim de proporcionar a caracterização do radical aduto formado no processo de oxidação dos biodiesel. Todas as amostras apresentaram a formação do mesmo spin aduto. Na Figura 17 são mostrados os espectros simulado e medido experimentalmente da amostra de biodiesel comercial a temperatura ambiente. As constantes de desdobramento obtidas a partir da simulação foram de $a_N = 14,86$ G, $a_H = 4,59$ G e fator g de 2,007. Na literatura, esses valores são atribuídos ao radical $\bullet\text{CHOHCH}_3$ quando medidos com o uso do solvente tolueno [58].

Figura 17 – Espectros experimental e simulado do biodiesel comercial mostrando o spin aduto formado.



Fonte: a própria autora.

O radical OH detectado na degradação do biodiesel concorda com mecanismo conhecido sobre oxidação de lipídeos [59] onde a degradação de óleos forma radicais hidróxi na presença de oxigênio. Durante a etapa de propagação, ocorre a ruptura das moléculas de hidroperóxidos em radicais alcóxi e hidróxi, conduzindo à formação de uma grande variedade de aldeídos, cetonas, ácidos, aumentando a acidez do óleo degradado [6]. Como o biodiesel é composto por ésteres de metila, os radicais detectados são resultantes de rearranjos originados da degradação oxidativa [60].

Velasco et al [40] examinaram o processo de oxidação no óleo de girassol, óleo de canola e óleo de peixe. Neste estudo, eles também encontraram apenas três linhas de desdobramento no espectro de absorção do radical aduto. De acordo com os autores, o motivo da não visualização de todas as linhas de ressonância deve-se à ampliação das linhas pelo alto volume molecular dos radicais presos pelo PBN. Além disso, de acordo com Pingret et al [61] o acúmulo de radicais detectados gera mudanças nas formas das linhas de ressonância, sugerindo uma sobreposição de linhas.

4.2 Análises Químicas

Na Tabela 7 são mostrados os parâmetros químicos das amostras de biodiesel analisadas tais como índice de acidez, ponto de névoa e ponto de fluidez.

Tabela 7 – Determinação dos parâmetros químicos das amostras de biodiesel.

| Amostra | Índice de | Ponto de | Ponto de |
|----------------------------|---|---------------|-----------------|
| | Acidez (mg KOH/g) | Névoa (°C) | Fluidez (°C) |
| | Inicial ^a / Final ^b | | |
| Biodiesel de óleo de milho | 0,23/ 0,47 | 0 | -7 |
| Biodiesel de óleo de soja | 0,38/ 0,57 | 3 | -2 |
| Biodiesel comercial | 0,40/ 0,56 | 6 | 2 |

^a: Realizada no primeiro dia de análises (Dia 6).

^b: Realizada no último dia de análise de cada amostra.

Os índices de acidez das amostras estão de acordo com a norma EN 14104 [27] apresentando valores inferiores a 0,50 mg KOH g⁻¹. Todas as amostras de biodiesel apresentaram um aumento no índice de acidez indicando que as mesmas foram degradadas.

Como mencionado anteriormente, o ponto de névoa do biodiesel é dado como a temperatura na qual há o início da formação de cristais na amostra quando ela é resfriada [8].

Imahara et al [62] realizaram estudos analisando a mudança do ponto de névoa para biodiesel de diferentes matérias-primas. Observaram que, os menores valores encontrados pertenciam a materiais que continham cadeias carbônicas insaturadas, enquanto que os maiores valores foram associados aos materiais com cadeias carbônicas saturadas. Em suas análises, concluíram que os pontos fluidez e névoa concordaram com a composição dos óleos de soja e milho onde, no óleo de milho há 91,7 % de presença de ácidos graxos insaturados enquanto que no óleo de soja há a presença de 84,7 % [13]. Um menor teor de insaturações no biodiesel implicada em uma melhor estabilidade oxidativa mas, os pontos de névoa e fluidez são maiores, podendo impossibilitar o uso do biodiesel em temperaturas mais amenas [63].

A partir da Tabela 7 pode-se observar que os dados apresentados concordam com o teor de moléculas insaturadas nas amostras, uma vez que o menor período de indução

obtido foi referente a amostra de biodiesel de óleo de milho, material que possui maior quantidade de moléculas susceptíveis à oxidação.

Para a amostra de biodiesel comercial nota-se que os valores dos pontos de névoa e fluidez são superiores quando comparados às demais amostras. Isso se deve ao fato de que esse biodiesel é obtido a partir da mistura de matérias-primas como óleos e gorduras animais, assim, possui uma maior quantidade de ácidos graxos saturados, menos susceptíveis a processos oxidativos [63]. Tais informações concordam com os obtidos por RPE uma vez que a composição do óleo ou gordura usados e os períodos de indução obtidos são diretamente relacionados ao período de aprisionamento de radicais livres e ao tempo de degradação total das amostras.

5 Conclusão

O monitoramento por Ressonância Paramagnética Eletrônica se apresentou como uma ferramenta importante no estudo de reações radicalares em biodiesel e amostras que envolvam óleos e gorduras, uma vez que radicais livres são instáveis e de difícil detecção.

A metodologia utilizada mostrou-se útil no estudo da geração de radicais pela degradação oxidativa desses biocombustíveis em relação ao tempo, sendo que a partir das análises realizadas fez-se possível a observação das fases características de degradação de biodiesel determinando as etapas de iniciação, propagação e término pela técnica de *spin trapping* além de ter-se obtido períodos de indução característicos da técnica de RPE para as amostras submetidas ao aquecimento térmico de 70 °C.

Notou-se que a amostra de biodiesel comercial mostrou um maior tempo de reação até atingir sua total degradação indicando ter uma maior estabilidade que as demais amostras. Foi possível observar a presença do radical hidróxi através das constantes de desdobraimento obtidas pela simulação computacional, concordando com o mecanismo de reação de oxidação proposto na literatura.

Com base em dados da literatura, pode-se inferir que os pontos de névoa e fluidez concordaram com a quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados presentes nas amostras.

Referências

- [1] RAMOS, L. P. et al. Biodiesel. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento-Edição nº*, v. 31, p. 29, 2003.
- [2] SOUSA, L. S. de et al. Use of natural antioxidants in soybean biodiesel. *Fuel*, Elsevier, v. 134, p. 420–428, 2014.
- [3] KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: a comparison. *Progress in Energy and Combustion Science*, Elsevier, v. 36, n. 3, p. 364–373, 2010.
- [4] MOTA, C. J.; SILVA, C. D.; GONCALVES, V. L. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Química Nova*, SciELO Brasil, v. 32, n. 3, p. 639–648, 2009.
- [5] YAAKOB, Z. et al. A review on the oxidation stability of biodiesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Elsevier, v. 35, p. 136–153, 2014.
- [6] KARAVALAKIS, G.; STOURNAS, S. Impact of antioxidant additives on the oxidation stability of diesel/biodiesel blends. *Energy & Fuels*, ACS Publications, v. 24, n. 6, p. 3682–3686, 2010.
- [7] FATTAH, I. R. et al. Experimental investigation of performance and regulated emissions of a diesel engine with calophyllum inophyllum biodiesel blends accompanied by oxidation inhibitors. *Energy Conversion and Management*, Elsevier, v. 83, p. 232–240, 2014.
- [8] LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. d. Biodiesel: quality parameters and analytical methods. *Química nova*, SciELO Brasil, v. 32, n. 6, p. 1596–1608, 2009.
- [9] JAIN, S.; SHARMA, M. Oxidation, thermal, and storage stability studies of jatropha curcas biodiesel. *ISRN Renewable Energy*, Hindawi Publishing Corporation, v. 2012, 2012.
- [10] FU, J.; TURN, S. Q. Effects of biodiesel contamination on oxidation and storage stability of neat and blended hydroprocessed renewable diesel. *Energy & Fuels*, ACS Publications, v. 29, n. 8, p. 5176–5186, 2015.
- [11] FATTAH, I. R. et al. Effect of antioxidants on oxidation stability of biodiesel derived from vegetable and animal based feedstocks. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Elsevier, v. 30, p. 356–370, 2014.
- [12] JAIN, S.; SHARMA, M. Correlation development between the oxidation and thermal stability of biodiesel. *Fuel*, Elsevier, v. 102, p. 354–358, 2012.

- [13] RAMOS, M. J. et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource technology*, Elsevier, v. 100, n. 1, p. 261–268, 2009.
- [14] RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, SciELO Brasil, p. 755–760, 2006.
- [15] ABRAMOVIĆ, H.; ABRAM, H. Effect of added rosemary extract on oxidative stability of camelina sativa oil. *Acta agriculturae Slovenica*, v. 87, n. 2, p. 255–261, 2006.
- [16] LIANG, Y. C. et al. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel. *Fuel*, Elsevier, v. 85, n. 5, p. 867–870, 2006.
- [17] SÁNCHEZ, L. et al. Evaluación de un antioxidante natural extraído del marañón (*anacardium occidentale* l.) para mejorar la estabilidad oxidativa del biodiesel de jatropha. *Información tecnológica*, SciELO Chile, v. 26, n. 6, p. 19–30, 2015.
- [18] ALEXANDRINO, C. D. et al. Influence of hydrogenation and antioxidants on the stability of soybean oil biodiesels. *European Journal of Lipid Science and Technology*, Wiley Online Library, v. 115, n. 6, p. 709–715, 2013.
- [19] CARVALHO, A. L. de et al. Carboxylic acid emissions from soybean biodiesel oxidation in the en14112 (rancimat) stability test. *Fuel*, Elsevier, v. 173, p. 29–36, 2016.
- [20] PULLEN, J.; SAEED, K. An overview of biodiesel oxidation stability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Elsevier, v. 16, n. 8, p. 5924–5950, 2012.
- [21] JAIN, S.; SHARMA, M. Review of different test methods for the evaluation of stability of biodiesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Elsevier, v. 14, n. 7, p. 1937–1947, 2010.
- [22] FUELS, A. *Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines. Requirements and Test Methods, DIN EN 14214*. [S.l.]: Beuth Verlag, Berlin, 2003.
- [23] MAIA, E. C. R. et al. Study of the biodiesel b100 oxidative stability in mixture with antioxidants. *Fuel processing technology*, Elsevier, v. 92, n. 9, p. 1750–1755, 2011.
- [24] LACOSTE, F.; LAGARDERE, L. Quality parameters evolution during biodiesel oxidation using rancimat test. *European journal of lipid science and technology*, Wiley Online Library, v. 105, n. 3-4, p. 149–155, 2003.
- [25] BORSATO, D. et al. Oxidation kinetics of biodiesel from soybean mixed with synthetic antioxidants BHA, BHT and TBHQ: Determination of activation energy. *Fuel Processing Technology*, Elsevier, v. 127, p. 111–116, 2014.

- [26] GALVAN, D. et al. Determination of the kinetics and thermodynamics parameters of biodiesel oxidation reaction obtained from an optimized mixture of vegetable oil and animal fat. *Energy & Fuels*, ACS Publications, v. 27, n. 11, p. 6866–6871, 2013.
- [27] CODE, P. Fat and oil derivatives-fatty acid methyl esters (fame)-determination of oxidation stability (accelerated oxidation test). 2003.
- [28] STANDARD, A. D2500: Standard test method for cloud point of petroleum products. *American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA (USA)*, 2002.
- [29] BUNCE, N. J. Introduction to the interpretation of electron spin resonance spectra of organic radicals. *J. Chem. Educ*, ACS Publications, v. 64, n. 11, p. 907, 1987.
- [30] WEIL, J. A.; BOLTON, J. R. *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2007.
- [31] LUND, A.; LIU, W. Continuous wave epr of radicals in solids. In: *EPR of Free Radicals in Solids I*. [S.l.]: Springer, 2013. p. 1–49.
- [32] PEDERSEN, J. A. On the application of electron paramagnetic resonance in the study of naturally occurring quinones and quinols. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Elsevier, v. 58, n. 6, p. 1257–1270, 2002.
- [33] JERZYKIEWICZ, M. et al. Epr spin trapping and dft studies on structure of active antioxidants in bioglycerol. *Chemical Physics Letters*, Elsevier, v. 497, n. 1, p. 135–141, 2010.
- [34] JERZYKIEWICZ, M.; CWIELAG, I.; JERZYKIEWICZ, W. The antioxidant and anticorrosive properties of crude glycerol fraction from biodiesel production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Wiley Online Library, v. 84, n. 8, p. 1196–1201, 2009.
- [35] JERZYKIEWICZ, M. et al. α -tocopherol impact on oxy-radical induced free radical decomposition of dmsO: spin trapping epr and theoretical studies. *Chemical Physics*, Elsevier, v. 383, n. 1, p. 27–34, 2011.
- [36] DUBOSE, C. et al. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free radical biology & medicine*, v. 5, n. 1, p. 55–56, 1987.
- [37] HARTGERINK, J. W. *Spin Trapping by Nitrosoalkanes: Mechanisms of Some Photochemically Induced Reactions*. [S.l.]: Springer, 2012.
- [38] DAMIAN, G.; PETRISOR, D.; MICLAUS, V. Free radicals detection by esr pbn spin-trap technique. *Journal of optoelectronics and advanced materials*, INOE 2000, v. 9, n. 4, p. 1010–1013, 2007.

- [39] SWARTZ, H. M.; KHAN, N.; KHRAMTSOV, V. V. Use of electron paramagnetic resonance spectroscopy to evaluate the redox state in vivo. *Antioxidants & redox signaling*, Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA, v. 9, n. 10, p. 1757–1772, 2007.
- [40] VELASCO, J.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Electron spin resonance spin trapping for analysis of lipid oxidation in oils: inhibiting effect of the spin trap α -phenyl-n-tert-butyl nitron on lipid oxidation. *Journal of agricultural and food chemistry*, ACS Publications, v. 53, n. 5, p. 1328–1336, 2005.
- [41] FUJINO, H.; UKAI, M. Fat and oil oxidation by electron spin resonance (esr) spin-trapping method. *Journal of Food Science and Engineering*, David Publishing Company, Inc., v. 3, n. 11, p. 584, 2013.
- [42] DAVIES, K. J. *Oxidative damage & repair: Chemical, biological and medical aspects*. [S.l.]: Elsevier, 2013.
- [43] LAGERCRANTZ, C. Spin trapping of some short-lived radicals by the nitroxide method. *The Journal of Physical Chemistry*, ACS Publications, v. 75, n. 22, p. 3466–3475, 1971.
- [44] HARMAN, D. Extending functional life span. *Experimental Gerontology*, Elsevier, v. 33, n. 1, p. 95–112, 1998.
- [45] LEE, J.; TWAMLEY, B.; RICHTER-ADDO, G. B. Nitrones are suitable ligands for heme models: X-ray crystal structure of the first metalloporphyrin nitron complex. *Chemical Communications*, Royal Society of Chemistry, n. 4, p. 380–381, 2002.
- [46] BRITIGAN, B. E.; COFFMAN, T. J.; BUETTNER, G. R. Spin trapping evidence for the lack of significant hydroxyl radical production during the respiration burst of human phagocytes using a spin adduct resistant to superoxide-mediated destruction. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 265, n. 5, p. 2650–2656, 1990.
- [47] LAGERCRANTZ, C.; FORSHULT, S. Trapping of short-lived free radicals as nitroxide radicals detectable by esr spectroscopy. the radicals formed in the reaction between oh-radicals and some sulphoxides and sulphones. *Acta Chem. Scand*, v. 23, n. 3, 1969.
- [48] RAITIO, R.; ORLIEN, V.; SKIBSTED, L. H. Electron spin resonance spectroscopy for evaluation of early oxidative events in semisolid palm oil. *European journal of lipid science and technology*, Wiley Online Library, v. 113, n. 2, p. 208–213, 2011.
- [49] JANZEN, E. G.; KOTAKE, Y. et al. Stabilities of hydroxyl radical spin adducts of pbn-type spin traps. *Free Radical Biology and Medicine*, Elsevier, v. 12, n. 2, p. 169–173, 1992.
- [50] BUETTNER, G. R. Spin trapping: Esr parameters of spin adducts 1474 1528v. *Free Radical Biology and Medicine*, Elsevier, v. 3, n. 4, p. 259–303, 1987.

- [51] EIDELS-DUBOVOI, S.; BELTRÁN-LÓPEZ, V. Powder pattern effects in the esr spectrum of polycrystalline mgo: Mn²⁺. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, Elsevier, v. 74, n. 1, p. 94–104, 1987.
- [52] JONAS, J. *Electron spin resonance. A Comprehensive treatise on experimental techniques*. [S.l.]: Amer Chemical Society, 1967.
- [53] SPIN, E. A comprehensive software package for spectral simulation and analysis. *EPR. J. Magn. Reson.*, v. 178, n. 1, p. 42–55, 2006.
- [54] MATHWORKS, I. Matlab and statistics toolbox release. *Natick, MA: The MathWorks*, 2012.
- [55] ABNT. Nbr 14448: Produtos de petróleo à determinação do número de acidez pelo método de titulação potenciométrica. *Rio de Janeiro, Brasil*, 2009.
- [56] THOMSEN, M. K.; KRISTENSEN, D.; SKIBSTED, L. H. Electron spin resonance spectroscopy for determination of the oxidative stability of food lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Springer, v. 77, n. 7, p. 725–730, 2000.
- [57] VELASCO, J.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. a comparison of electron spin resonance spectroscopy with the rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, Elsevier, v. 85, n. 4, p. 623–632, 2004.
- [58] KOTAKE, Y.; KUWATA, K.; JANZEN, E. G. Electron spin resonance spectra of diastereomeric nitroxyls produced by spin trapping hydroxylalkyl radicals. *Journal of Physical Chemistry*, ACS Publications, v. 83, n. 23, p. 3024–3029, 1979.
- [59] FRANKEL, E. N. *Lipid oxidation*. [S.l.]: Elsevier, 2014.
- [60] KARAVALAKIS, G.; STOURNAS, S.; KARONIS, D. Evaluation of the oxidation stability of diesel/biodiesel blends. *Fuel*, Elsevier, v. 89, n. 9, p. 2483–2489, 2010.
- [61] PINGRET, D. et al. Degradation of edible oil during food processing by ultrasound: electron paramagnetic resonance, physicochemical, and sensory appreciation. *Journal of agricultural and food chemistry*, ACS Publications, v. 60, n. 31, p. 7761–7768, 2012.
- [62] IMAHARA, H.; MINAMI, E.; SAKA, S. Thermodynamic study on cloud point of biodiesel with its fatty acid composition. *Fuel*, Elsevier, v. 85, n. 12, p. 1666–1670, 2006.
- [63] CHENDYNSKI, L. T. et al. Modelagem matemática aplicada a síntese do produtos da reação de transesterificação a partir de gordura animal e Óleo vegetal. *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 3, p. 823–837, 2016.