



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RODOLFO LOPES COPPO

**DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE ESTOCAGEM DE  
BIODIESEL COMERCIAL EM MISTURA OTIMIZADA DE  
ANTIOXIDANTES NATURAIS**

---

Londrina  
2013

RODOLFO LOPES COPPO

**DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE ESTOCAGEM DE  
BIODIESEL COMERCIAL EM MISTURA OTIMIZADA DE  
ANTIOXIDANTES NATURAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Dionisio Borsato

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

C785d Coppo, Rodolfo Lopes.

Determinação do tempo de estocagem de biodiesel comercial em mistura otimizada de antioxidantes naturais / Rodolfo Lopes Coppo. – Londrina, 2013.  
54 f. : il.

Orientador: Dionísio Borsato.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Físico-química – Teses. 2. Biodiesel – Controle de qualidade – Teses. 3. Mistura (Química) – Teses. 4. Condimentos – Antioxidantes – Teses. I. Borsato, Dionísio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 541.1

RODOLFO LOPES COPPO

**DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE ESTOCAGEM DE BIODIESEL  
COMERCIAL EM MISTURA OTIMIZADA DE ANTIOXIDANTES  
NATURAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Dionisio Borsato  
UEL – Londrina - PR

---

Profa. Dra. Keiko Takashima  
UEL – Londrina - PR

---

Prof. Dr. Paulo Rogério P. Rodrigues  
UNICENTRO – Guarapuava - PR

Londrina - PR, 08 de fevereiro de 2013.

Dedico este trabalho a Deus, a minha  
família e amigos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o qual dispensa predicados.

Ao meu querido amigo e orientador Prof. Dr. Dionisio Borsato pela dedicação, tolerância, paciência e consideração na realização deste projeto, o qual com certeza faz jus ao título de “orientador”.

A minha amada família, de modo especial aos meus pais Helena e Antonio, e minha irmã Taciana, os quais são exemplos em minha formação pessoal, além do apoio e estímulo constantes.

Aos docentes do programa de Mestrado em Química pela formação profissional capacitada; ao Jurandir Pereira Pinto pela análise cromatográfica, aos membros do laboratório de combustíveis da UNICENTRO pelo auxílio nas análises no Rancimat; a Fernanda Delarosa, pelo auxílio nas análises de infravermelho, aos membros do LPAC /UEL (Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis) que auxiliaram direta ou indiretamente no andamento da pesquisa.

Aos colegas e amigos, cuja amizade, no Departamento de Química, fiz e cultivei, os quais serão citados brevemente, em ordem cronológica: Talita Fogaça e Eduardo Duarte, grandes amigos cuja parceria e cumplicidade perduram intactos por mais de 6 anos; Paula Vanzela, por seu jeito ímpar e pela alegria que esbanja diariamente; Jaqueline Pereira, Ronaldo Galdino, Matheus Bofinger, Fabiano Bueno, pelos grandes e cômicos momentos já vividos; Juliane Orives, simplesmente pelo seu jeito de ser; Hágata Cremasco, pela grande ajuda disponibilizada durante a realização deste projeto; Karina Angilelli, pelas conversas e discussões de “trabalho” em laboratório (e também as musicais); Thiago Orcelli, um amigo o qual divido as histórias de vida e de “profissão professor”, e por fim, mas não menos importante, Felipe Hudari, o qual entrou recentemente para o ciclo de amizades, mas já se mostrou uma grande pessoa e também um grande amigo.

“Temos o destino que merecemos. O nosso destino está de acordo com os nossos méritos”.

Albert Einstein

COPPO, Rodolfo Lopes. **Determinação do tempo de estocagem de biodiesel comercial em mistura otimizada de antioxidantes naturais**. 2013. 54 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

O biodiesel é um combustível que vem ganhando espaço no cenário energético contemporâneo, pois é um substituto adequado ao diesel de petróleo, que apresenta problemas progressivos de escassez, além de ser um grande poluidor atmosférico. No entanto, ao contrário dos combustíveis fósseis que são relativamente inertes e mantêm as suas características essenciais pouco alteradas ao longo da estocagem, o biodiesel degrada com o tempo e pode alterar-se devido à ação do ar, da luz, calor e umidade. O estudo da estabilidade oxidativa do biodiesel B100, bem como a sua conservação, é de fundamental importância para o controle de qualidade, principalmente no que diz respeito ao armazenamento. Com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação dos componentes do biodiesel B100 são empregados compostos químicos conhecidos como antioxidantes e/ou estabilizadores. Os principais antioxidantes e mais conhecidos são os compostos fenólicos sintéticos, porém muitos condimentos têm apresentado efeito antioxidante e alguns estudos demonstraram que o alecrim e o orégano apresentam componentes químicos com uma boa ação protetora contra a oxidação. Resultados obtidos após a avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel B100 de óleo de soja em mistura de extratos etanólicos de alecrim, orégano e manjeriço mostraram que, de acordo com o método acelerado de estufa, o biodiesel pode atingir um tempo de estocagem (TE) estimado de 535,20 d sem sofrer oxidação evidente, quando misturado com 100% de extrato de orégano. A análise estatística comprovou que tanto a equação com as variáveis experimentais e o modelo são significativos em nível de 5%. Por outro lado, de acordo com os resultados obtidos pelo método Rancimat, a mistura ideal é composta de 100% de extrato de alecrim, resultando em 483,33 d de estocagem. Além disso, em ambos os métodos estudados observou-se um possível efeito antagônico do manjeriço quando em mistura binária sugerindo que o mesmo não apresenta bom efeito antioxidante. Por fim, a aplicação da variável de processo mostrou que o método acelerado em estufa é o mais realista para o estudo em questão.

**Palavras-chave:** Método acelerado em estufa. Rancimat. Alecrim. Orégano. Manjeriço. Delineamento de misturas. Variável de processo.

COPPO, Rodolfo Lopes. **Determination of comercial B100 biodiesel storage time in a natural antioxidants optimized mixture.** 2013. 54 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

### **ABSTRACT**

Biodiesel is a fuel which has won space in contemporary energetic scenario, because is a suitable substitute of diesel, that presents progressive problems of lacking, and also is a great atmospheric polluter. Differently of fossil fuels, that are relatively inert and maintain their characteristics little changed along storage, biodiesel degrades with time and can change itself in contact with air, light, heat and humidity. B100 biodiesel oxidative stability study, also its conservation, is important for its quality control, especially regarding storage. In order to inhibit or retard the oxidation of biodiesel compounds, chemical compounds are employed, known as antioxidants and/or stabilizers. The main and most known antioxidants are the synthetic phenolic compounds, but, many seasonings have presented antioxidant effect and some research demonstrated that rosemary and oregano present chemical compounds with good protective action against oxidation. The results obtained after assessment of B100 biodiesel oxidative stability from soybean mixed with rosemary, oregano and basil ethanol extracts, showed that, according to accelerated stove method, biodiesel can reach an estimated storage time of 535,20 d without evident oxidation, when mixed with 100% of oregano extract. Statistical analysis proved that even the equation with experimental variables and also the model are significative, at 5% level. On the other hand, according to Rancimat method, the ideal mixture is composed of 100% of rosemary extract, which results in a 483,33 d storage. Besides, through both methods, it was possible to observe a possible antagonistic effect provoked by basil, when in binary mixture, suggesting that the one does not present a good antioxidant capacity. Finally, the process variable application showed that accelerated stove method is the most realistic in this study.

**Keywords:** Accelerated stove method. Rancimat. Rosemary. Oregano. Basil. Mixture design. Process variable.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Esquema da reação de transesterificação de óleos vegetais ou gorduras em meio ácido ou alcalino (RAMOS et al., 2003).....	13
<b>Figura 2</b> – Esquema de funcionamento do Rancimat (SANTOS, 2008).....	15
<b>Figura 3</b> – Estrutura do (a) ácido carnósico e (b) ácido rosmarínico .....	17
<b>Figura 4</b> – Exemplo da curva exponencial obtida após avaliação do IP em relação ao tempo.....	22
<b>Figura 5</b> – Exemplo do gráfico gerado pelo Rancimat 873.....	23
<b>Figura 6</b> – Delineamento simplex-centroide para os componentes alecrim, orégano e manjeriço.....	23
<b>Figura 7</b> – Perfil cromatográfico do biodiesel de óleo de soja.....	25
<b>Figura 8</b> – Espectros de IV dos extratos etanólicos de (a) alecrim, (b) orégano e (c) manjeriço.....	28
<b>Figura 9</b> – Relação entre o logaritmo natural dos períodos de indução (em dias) e as temperaturas de ensaio do biodiesel estabilizado com antioxidantes naturais e amostra controle, obtidos pelo método acelerado em estufa. ....	32
<b>Figura 10</b> – Diagrama de Pareto para os termos da Equação (7) com os dados experimentais obtidos pelo método de estufa (em que A: alecrim; B: orégano; C: manjeriço) .....	34
<b>Figura 11</b> – Correlação entre os valores dos tempos de estocagem experimentais e os previstos determinados pelo método acelerado em estufa .....	36
<b>Figura 12</b> – Superfície de resposta para o período de indução a temperatura ambiente.....	37
<b>Figura 13</b> – Perfil das condições ótimas para as variáveis (extratos) estudadas.....	38
<b>Figura 14</b> – Relação entre o logaritmo natural dos períodos de indução (em dias) e temperaturas de ensaio do biodiesel de soja estabilizado com antioxidantes e controle, obtidos pelo método Rancimat.....	40
<b>Figura 15</b> – Diagrama de Pareto ilustrando três termos significativos da Equação (8) (em que A: alecrim; B: orégano; C: manjeriço) .....	42

<b>Figura 16</b> – Correlação entre os valores dos tempos de estocagem experimentais e os previstos determinados pelo método Rancimat .....	43
<b>Figura 17</b> – Região de contorno da resposta “tempo de estocagem” obtida pelo método Rancimat.....	44
<b>Figura 18</b> – Condições ótimas para as misturas de antioxidantes naturais avaliadas pelo método Rancimat.....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Parâmetros de conformidade do biodiesel utilizado, segundo ANP .....	27
<b>Tabela 2</b> – Períodos de indução (em dias) obtidos a partir do teste de oxidação acelerado em estufa, segundo o delineamento experimental de mistura simplex-centroide .....	31
<b>Tabela 3</b> – Tempos de estocagem, em dias, obtidos através da extrapolação dos valores de PIn, de acordo com o delineamento simplex-centroide aplicado às misturas com alecrim, orégano e manjerição, segundo método acelerado em estufa .....	33
<b>Tabela 4</b> – Análise de variância para o modelo gerado a partir das amostras submetidas ao teste acelerado em estufa .....	35
<b>Tabela 5</b> – Valores experimentais, previstos e residuais de tempo de estocagem apresentados pelos ensaios de 1 a 9, de acordo com o método acelerado em estufa .....	35
<b>Tabela 6</b> – Períodos de indução (dias) obtidos através do método Rancimat de oxidação acelerada, seguindo o delineamento simplex-centroide .....	39
<b>Tabela 7</b> – Tempos de estocagem, em dias, obtidos através da extrapolação dos valores de PIn, de acordo com o delineamento simplex-centroide aplicado às misturas com alecrim, orégano e manjerição segundo método Rancimat .....	41
<b>Tabela 8</b> – Análise de variância para o modelo gerado a partir das amostras submetidas ao teste Rancimat .....	42
<b>Tabela 9</b> – Valores experimentais, previstos e residuais de tempo de estocagem apresentados pelos ensaios de 1 a 9, de acordo com o método Rancimat.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANP</b>	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis;
<b>AOCS</b>	American Oil Chemists' Society;
<b>ASTM</b>	American Society for Testing and Materials;
<b>BHA</b>	Butilhidroxianisol;
<b>BHT</b>	Butilhidroxitolueno;
<b>Biodiesel B100</b>	Biodiesel puro, sem mistura com diesel de petróleo;
<b>d</b>	dia(s);
<b>EN</b>	European Norm;
<b>F<sub>calc</sub></b>	teste F calculado;
<b>F<sub>tab</sub></b>	teste F tabelado;
<b>G.L.</b>	graus de liberdade;
<b>H</b>	hora(s);
<b>IP</b>	índice de peróxido;
<b>Min</b>	minuto(s);
<b>Pin</b>	período de indução;
<b>Q.M.</b>	quadrado médio;
<b>S.Q.</b>	soma dos quadrados;
<b>TBHQ</b>	Tercbutilhidroquinona;
<b>TE</b>	tempo de estocagem.

## SUMÁRIO

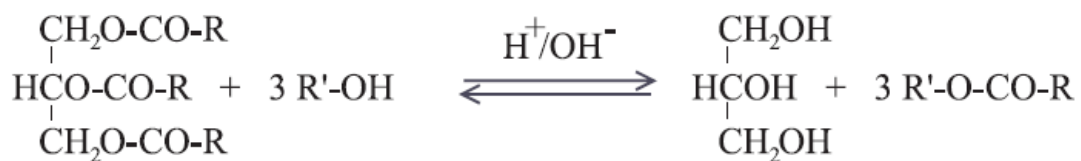
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	19
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	20
3.1	BIODIESEL.....	20
3.1.1	Análise de Conformidade .....	20
3.1.2	Análise Cromatográfica .....	20
3.2	ANTIOXIDANTES.....	21
3.2.1	Avaliação dos Antioxidantes por Espectrometria no Infravermelho (IV).....	21
3.3	ESTABILIDADE OXIDATIVA DETERMINADA PELO MÉTODO ACELERADO EM ESTUFA .....	21
3.4	ESTABILIDADE OXIDATIVA DETERMINADA PELO MÉTODO RANCIMAT .....	22
3.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA MISTURA (STATISTICA, 2009).....	23
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	24
3.6.1	Modelo Matemático Combinado.....	24
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO BIODIESEL .....	25
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES .....	27
4.3	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DETERMINADA PELO TESTE ACELERADO EM ESTUFA.....	29
4.4	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DETERMINADA PELO TESTE RANCIMAT.....	38
4.5	APLICAÇÃO DA VARIÁVEL DE PROCESSO: MODELO MATEMÁTICO COMBINADO.....	46
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	48
	<b>SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS</b> .....	49
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50

## 1 INTRODUÇÃO

Durante muitas décadas os combustíveis fósseis têm suprido a demanda energética mundial, principalmente os que utilizam o petróleo como matéria-prima. Entretanto, por se tratar de um recurso não renovável, a comunidade científica tem sido instigada a pesquisar novos recursos energéticos com a finalidade de substituir os derivados de petróleo. Além disso, sabe-se que esses combustíveis liberam gás carbônico, principal causador do efeito estufa, e enxofre, associado ao fenômeno da chuva ácida. Tais contribuições negativas ao ambiente alavancaram a busca por fontes de energias limpas e renováveis em que o estudo de biocombustíveis tem se apresentado como alternativa viável para solução destes problemas (KNOTHE, 2007). Até 2003, apenas 2,2% da energia consumida era proveniente de fontes renováveis sugerindo a existência de um grande potencial para exploração de outras fontes energéticas. Dentre essas fontes, o uso de biomassa – que em 2006 passou a contribuir com 11,3% da matriz energética brasileira – figura como uma boa estratégia tanto em termos de preservação ambiental como também econômicos, pois favorece a geração de renda com o fortalecimento da agricultura familiar na produção de oleaginosas (RAMOS et al., 2003; BELTRÃO; VALE; COSTA, 2006).

Neste contexto destaca-se o biodiesel, que pode ser definido como um mono-álquil éster de ácido graxo e produzido a partir da reação de óleos vegetais ou gordura animal com álcool (Figura 1), geralmente metanol, na presença de catalisador, normalmente uma base forte como o hidróxido de sódio ou de potássio, ou ainda um ácido. A reação de produção do biodiesel é conhecida como transesterificação (FERRARI et al., 2005; MEHER et al., 2006).

**Figura 1** – Esquema da reação de transesterificação de óleos vegetais ou gorduras em meio ácido ou alcalino (RAMOS et al., 2003).



A alta compatibilidade do biodiesel com o diesel de petróleo o caracteriza como alternativa capaz de atender a maior parte da frota a diesel já

existente sem necessidade de grandes adaptações. Além disso, por ser biodegradável e renovável, possui uma inerente lubricidade na forma pura e apresenta competitividade com o diesel em termos de propriedades combustíveis (KNOTHE, 2007). O uso do biodiesel pode reduzir emissão de CO em até 78% e a sua substituição no lugar de óleo diesel mineral reduz as emissões de enxofre em 20%, 9,8% de gás carbônico, 14,2% de hidrocarbonetos não queimados, 26,8% de material particulado e 4,6% de óxido de nitrogênio. Contudo, no que diz respeito a este último, há controvérsias, tendo em vista que alguns estudos realizados na União Europeia apontam aumento na emissão de NOx quando o diesel de petróleo é substituído pelo biodiesel, acarretando em um problema ambiental, pois tais óxidos são precursores do ozônio troposférico. No entanto, esse problema pode ser resolvido com a escolha de catalisadores adequados para os motores (GAZZONI, 2012).

Ao contrário dos combustíveis fósseis, que são relativamente inertes e mantêm as suas características essenciais pouco alteradas ao longo da estocagem, o biodiesel degrada com o tempo e pode alterar-se devido à ação do ar, da luz, temperatura e umidade. O seu contato com contaminantes, tanto de natureza inorgânica quanto microbiana, também tende a introduzir variações na qualidade do produto, sendo a oxidação decorrente da sua exposição ao ar atmosférico um dos principais problemas de degradação a que o biodiesel está sujeito (MEHER et al., 2006).

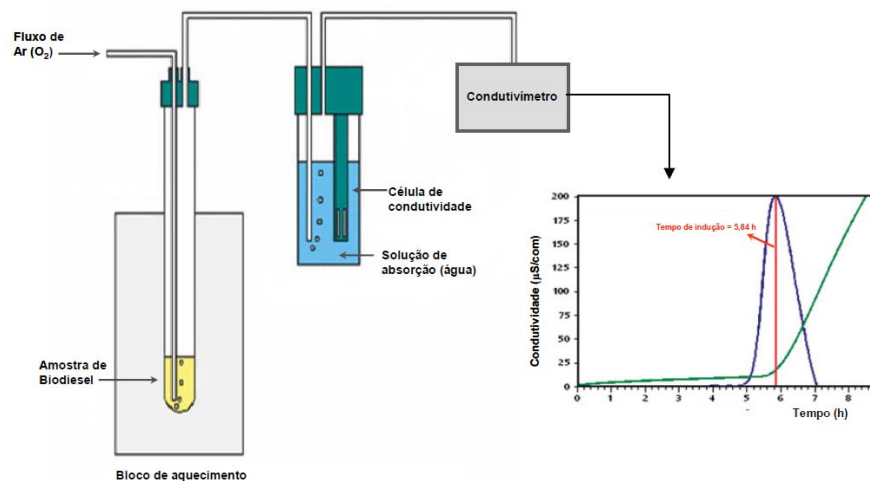
Recentemente, a estabilidade oxidativa vem sendo bastante investigada. Algumas oleaginosas são portadoras de características químicas indesejadas, as quais são incorporadas ao biodiesel durante o processo de obtenção. Alguns exemplos são as oleaginosas com alto conteúdo de ésteres insaturados, especialmente os poli-insaturados, os quais podem ser facilmente oxidados levando a formação de produtos de decomposição como ácidos, aldeídos, ésteres, cetonas, peróxidos e alcoóis (XIN et al., 2009). Estes produtos não afetam apenas as propriedades do biodiesel, mas também trazem problemas de funcionamento ao motor (MONYEM & VAN GERPEN, 2001), além de dificultar a armazenagem do mesmo (FERRARI et al., 2005; KNOTHE, 2007; FERRARI & SOUZA, 2009).

Uma das formas de se avaliar a oxidação do biodiesel é pelo método acelerado em estufa. Segundo Frankel (1991), os métodos de estabilidade acelerada

apresentam validade restrita, pois o mecanismo de oxidação muda à medida que se submete a amostra ao aquecimento, à luz ou ao contato com metais enquanto que os testes efetuados em temperatura ambiente aproximam-se da estocagem real. Porém, por proporcionarem resultados mais rápidos, os métodos acelerados reduzem o tempo de trabalho e o consumo de reagentes.

Outro método amplamente utilizado é o Rancimat, que foi desenvolvido por Hadorn e Zürcher, e baseia-se no monitoramento da condutividade do biodiesel em exposição à oxidação acelerada através de um fluxo de ar (Figura 2). Durante este estágio, há formação de voláteis, especialmente ácido fórmico, que provoca aumento na condutividade do meio, sendo possível, a partir disso, detectar o período de indução (PIn), informado automaticamente pelo equipamento (MATTHÄUS, 1996). Atualmente, este método é oficial (segundo a ANP) e previsto na norma EN 14112 para avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras a temperatura de 110 °C.

**Figura 2** – Esquema de funcionamento do Rancimat (SANTOS, 2008).



A rancificação oxidativa não ocorre normalmente com ácidos graxos saturados, já que a formação de radicais livres, neste caso, é energeticamente desfavorável. A oxidação é proveniente de sucessivas reações radicalares que ocorrem nas insaturações dos ésteres das cadeias graxas, em contato com o oxigênio atmosférico, sendo acelerada pela presença de íons metálicos, luz, temperatura, radiação ionizante e outros agentes oxidantes, de modo a formar peróxidos e, conseqüentemente, outros produtos (BONDIOLI et al., 2003; FERRARI

& SOUZA, 2009). O processo de reações em cadeia ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação, o ácido graxo insaturado perde um átomo de hidrogênio e forma radical livre que reage com o oxigênio molecular (no estado tripleto) formando o hidroperóxido. Na fase da propagação, há continuação dessas reações com geração de mais radicais. Na etapa de terminação, os radicais se unem para formar produtos estáveis (BRAGAGNOLO & MARIUTI, 2007). O processo de oxidação pode também ocorrer via oxigênio singlete, estado mais energético e aproximadamente 1450 vezes mais reativo que o oxigênio tripleto (BRADLEY & MIN, 1992).

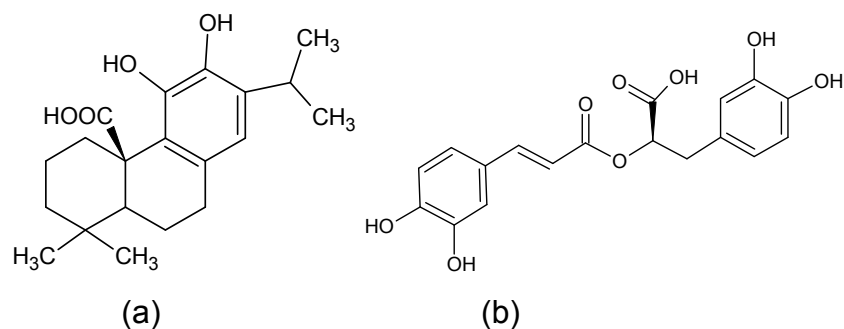
Com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos são empregados compostos químicos conhecidos como antioxidantes e/ou estabilizadores (RAMALHO & JORGE, 2006). Eles podem ser classificados em antioxidantes primários, quando reagem com radicais lipídicos de alta energia gerando produtos estáveis, ou ainda como antioxidantes secundários, que retardam a velocidade de iniciação, extinguindo os hidroperóxidos. Os antioxidantes fenólicos são classificados como terminadores de radicais livres, pois doam um átomo hidrogênio para os radicais lipídicos interrompendo a cadeia de radicais livres na etapa de iniciação do processo oxidativo, estabilizando o sistema reacional (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992). Os principais antioxidantes fenólicos sintéticos são o butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e propilgalato (PG), e dentre os antioxidantes fenólicos naturais, os mais conhecidos são os tocoferóis (RAMALHO & JORGE, 2006).

Óleos vegetais contêm grande quantidade de antioxidantes e os mais comuns são os tocoferóis. No entanto, alguns processos de produção desses óleos incluem uma etapa de destilação para purificação dos triglicerídeos e o biodiesel obtido a partir deles normalmente possui pouco ou nada de antioxidantes naturais, assim, torna-se menos estável (MCCORMICK et al., 2007) e por isso surge então a necessidade de aplicar antioxidantes para aumentar a estabilidade do biocombustível com a finalidade de manter suas propriedades por um período maior.

O uso de antioxidantes naturais apresenta-se como alternativa bastante viável para retardar o processo de degradação oxidativa do biodiesel, pois os compostos naturais não causam danos ao meio ambiente e são facilmente obtidos (POKORNY, 2007). Muitos condimentos têm apresentado efeito antioxidante (POKORNY, 2007; AMAROWICZ & PEGG, 2008). LUO et al. (2012) recentemente

estudaram o impacto de cinco derivados naturais (ácido ferúlico, polifenol de chá lipossolúvel, polifenol de chá hidrossolúvel, sesamol e ácido cafeico) na oxidação de biodiesel de óleo de soja. Os resultados confirmaram que o ácido cafeico apresentou melhor performance na concentração de 500-1500 ppm, e o polifenol de chá hidrossolúvel apresentou a maior atividade em uma concentração de 2000 ppm. Ademais, os ensaios realizados juntamente com antioxidantes sintéticos (alfa-tocoferol, BHT e BHA) demonstraram que todos os aditivos naturais utilizados, exceto o ácido ferúlico, ofereceram melhor proteção ao biodiesel em relação aos sintéticos. Alguns estudos têm demonstrado que o alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) e a sálvia (*Salvia officinalis L.*) são considerados os dois condimentos que apresentam os mais potentes antioxidantes naturais. O carnosol e o ácido carnosico, encontrados no alecrim, apresentam características antioxidantes (MADSEN & BERTELSEN, 1995) e, a atividade antioxidante desses compostos foi validada em uma emulsão contendo metil linoleato. De acordo com Nakatani e Inatani (1984), a adição de antioxidantes naturais como o carnosol e ácido carnosico, presentes no alecrim, a uma concentração de 0,01%, em uma emulsão contendo ácido linoleico, apresentaram níveis de atividade semelhantes às dos antioxidantes sintéticos BHA e BHT adicionados em uma mesma concentração. Cinco diferentes compostos fenólicos foram isolados do orégano (*Origanum vulgare L.*) e todos eles apresentaram atividade antioxidante sendo que um deles foi identificado como ácido rosmarínico (KIKUZAKI & NAKATANI, 1989). Além disso, o trabalho de BRAGAGNOLO & MARIUTI (2007) cita diversos compostos fenólicos que foram isolados de orégano, tais como a luteolina, ácido p-coumárico, carvacrol, timol, p-cimeno, e campferol. A Figura 3 apresenta a estrutura de dois ácidos com grupo fenólico que foram isolados dos condimentos.

**Figura 3** – Estrutura do (a) ácido carnosico e (b) ácido rosmarínico.



Tais constatações demonstram a grande possibilidade da utilização desses condimentos como bons antioxidantes e, possivelmente, serem substitutos dos antioxidantes sintéticos em misturas contendo compostos de carbono como substrato.

O desenvolvimento de qualquer produto envolvendo mais de um componente requer algumas formas particulares de experimentos para a mistura (THOMPSON, 1981). Delineamentos de mistura são empregados em vários experimentos para o desenvolvimento de produtos e as respostas dependem somente das proporções dos componentes presentes na mistura (CORNELL, 2002).

Muitos trabalhos que empregam delineamentos para experimentos com mistura têm seguido os modelos e delineamento de Scheffé que permitem explorar toda a região experimental (STEINBERG & HUNTER, 1984). A referência mais atual e completa, para os problemas com misturas, é a de Cornell (2002). Além disso, os métodos de otimização têm sido aplicados nos últimos 20 anos de maneira variada nos campos da engenharia, na indústria de processos químicos, térmicos e gerenciamento para redução de custos (DERRINGER & SUICH, 1980; MONTGOMERY, 1999).

## 2 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar a estabilidade oxidativa de biodiesel B100 de óleo de soja em mistura com antioxidantes naturais para estipular um período confiável de armazenamento do combustível, sem que o mesmo sofra alterações.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a estabilidade oxidativa do biodiesel B100 em mistura com extratos alcoólicos de alecrim, orégano e manjerição por meio de dois métodos: Rancimat e acelerado em estufa;
- Estipular um período confiável para a estocagem do combustível sem evidente degradação (tempo de estocagem) a temperatura ambiente;
- Determinar a mistura ótima de antioxidantes;
- Comparar ambos os métodos utilizados com a aplicação da variável de processo.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 BIODIESEL

A reação de transesterificação do óleo de soja refinado Salada® (1000 mL) foi efetuada com metanol, grau analítico, a 60 °C, sob agitação lenta, catalisada por metóxido de sódio Fluka® (8g / 500 mL de álcool). As fases foram separadas em um funil de separação de 250 mL. Os ésteres obtidos foram lavados com solução aquosa de ácido acético glacial (1,5%) a 80 °C, e, depois, lavados com água, a 80°C, até pH 7. O biodiesel foi desumidificado em estufa a 140 °C por 2 horas. (BORSATO et al., 2010a)

##### 3.1.1 Análise de Conformidade

A massa específica do biodiesel B100 foi determinada segundo o método ASTM D4052, o ponto de fulgor segundo o método ASTM D93, o índice de acidez por ASTM D664, teor de glicerina, mono, di e tri glicerídeos pelo método ASTM 6584 e o teor de álcool e de ésteres pela norma EN 14103.

##### 3.1.2 Análise Cromatográfica

Foi utilizado o cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17 A, com detector de ionização de chama, com coluna DB1 (J&W SCIENTIFIC) – 100 % polimetilsiloxano com 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme. Injetor on-column com temperatura igual à rampa da coluna. A rampa de aquecimento da coluna, inicialmente a 50 °C, permaneceu por 2 min e foi aquecida a razão de 10 °C min<sup>-1</sup> até 180 °C permanecendo por 2 min. Por fim, aquecida à razão de 15 °C min<sup>-1</sup> até 340 °C permanecendo por 10 min. A vazão do gás de arraste, N<sub>2</sub>, foi de 1,5 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção de 2,0 µL. Os dados foram adquiridos e tratados pelo Software CLASS-CR10 Shimadzu.

## 3.2 ANTIOXIDANTES

Foram utilizados extratos alcoólicos de três antioxidantes naturais: alecrim, orégano e manjeriço. Os três condimentos foram adquiridos na forma desidratada (*Sweet Sabor*®). Pesaram-se 10 g de cada amostra separadamente e adicionou-se em 250 mL de etanol absoluto misturando ambos com auxílio de um bastão de vidro. Esta mistura foi mantida durante 24 h em repouso e os extratos foram submetidos à filtração. Os filtrados foram evaporados com auxílio de uma chapa aquecedora até aproximadamente 50 mL a 60 °C depois transferidos para balões volumétricos e seus volumes completados para 50 mL com etanol absoluto (ALMEIDA-DORIA & REGITANO-D'ARCE, 2000). A concentração utilizada de cada antioxidante no biodiesel B100 foi de 0,7% (v/v). As proporções foram estabelecidas pelo delineamento de mistura (vide tópico 3.5) e incorporadas diretamente ao substrato antes da avaliação de sua estabilidade oxidativa.

### 3.2.1 Avaliação dos Antioxidantes por Espectrometria no Infravermelho (IV)

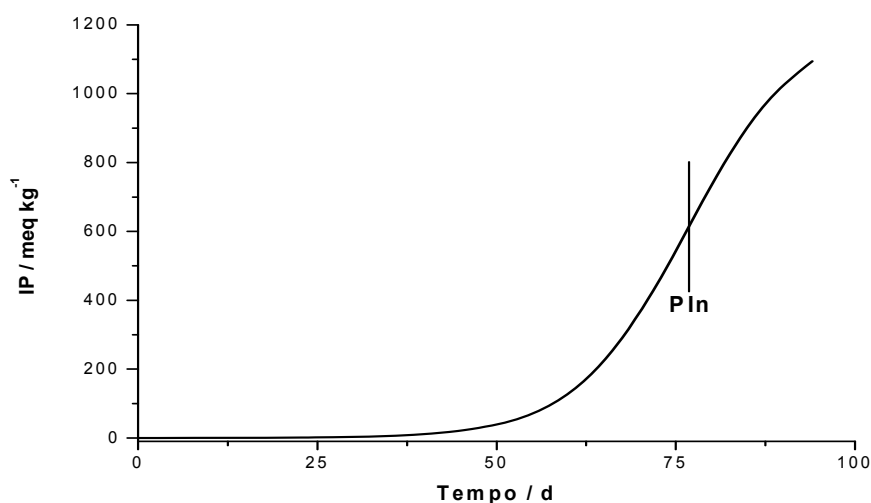
Os espectros dos extratos alcóolicos dos três antioxidantes foram registrados no espectrômetro Thermo Scientific Nicolet iS10 FT-IR, na região de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

## 3.3 ESTABILIDADE OXIDATIVA DETERMINADA PELO MÉTODO ACELERADO EM ESTUFA

As amostras de biodiesel contendo as proporções de antioxidantes, estabelecidas pelo delineamento simplex-centroide, bem como as amostras controle foram levadas a estufas em três temperaturas: 45, 55 e 70 °C em períodos de tempo que variaram de acordo com a temperatura de trabalho, sendo, no máximo por 90 dias (a 45 °C). O índice de peróxido (IP) correspondente à quantidade de peróxido formado no decorrer da reação de oxidação (expresso em meq  $\text{kg}^{-1}$  de amostra) foi monitorado periodicamente com tiosulfato de sódio 0,1 N, pelo método AOCS Cd 8-53, até cada ensaio atingir seu índice máximo (AOCS, 1998). Com esses dados, gerou-se a curva do índice de peróxido versus tempo de análise (em dias). O ponto de inflexão da curva para cada um dos tratamentos, representado pela segunda derivada dos dados ajustados, foi calculado por meio dos Freewares CurTiPot, Curve

Expert e Derive 6 e seu valor numérico indica o período de indução (PIn), que representa o tempo necessário para início das reações de propagação no mecanismo das reações radicalares de oxidação do biodiesel (CHEN & LUO, 2011). A Figura 4 apresenta um exemplo do perfil da curva obtido após análise dos resultados.

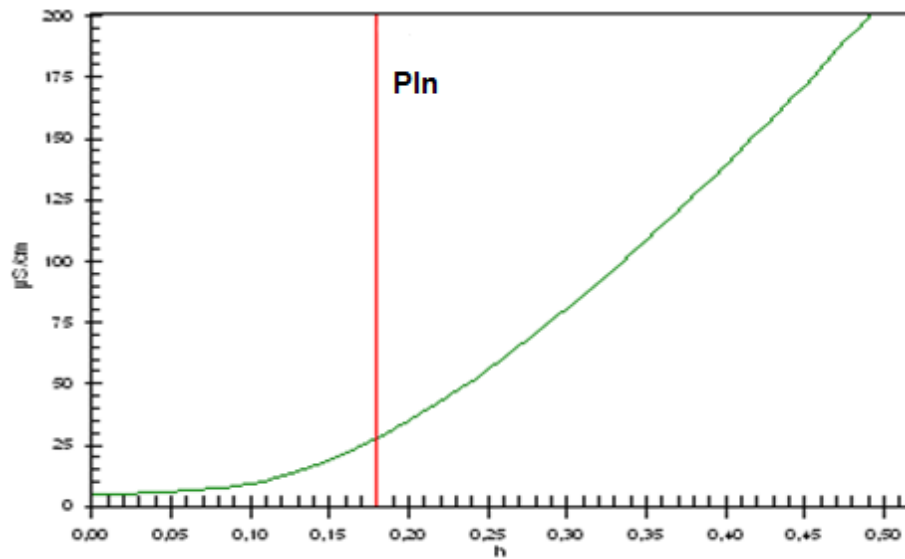
**Figura 4** – Exemplo da curva exponencial obtida após avaliação do IP em relação ao tempo.



### 3.4 ESTABILIDADE OXIDATIVA DETERMINADA PELO MÉTODO RANCIMAT

Amostras de 3 g de biodiesel contendo as quantidades de antioxidantes estabelecidas pelo delineamento simplex-centroide, bem como as amostras controle, foram levadas ao aquecimento acelerado a 110, 115, 120 e 130 °C, com taxa de insuflação de ar de 10 L h<sup>-1</sup>, para determinação do PIn. O teste foi efetuado utilizando o Rancimat 873 em concordância com a norma oficial (EN 14112, 2003). O equipamento informa o PIn automaticamente a partir de um gráfico de condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) versus tempo (h) de análise, conforme exemplificado na Figura 5.

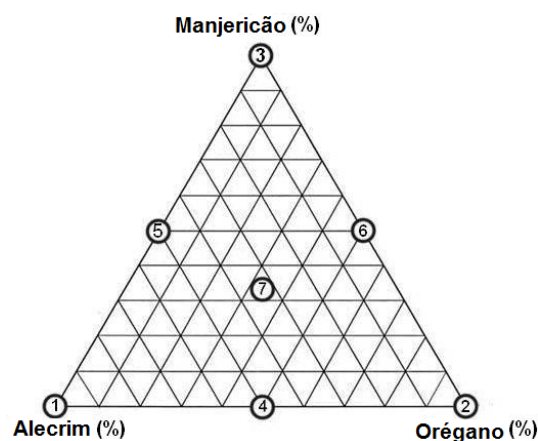
**Figura 5** – Exemplo do gráfico gerado pelo Rancimat 873.



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

Foi utilizado o planejamento simplex-centroide (Figura 6), com duas repetições no ponto central, com  $2^q - 1$  combinações de misturas, sendo  $q$  o número de componentes com soma igual a 1 ou 100% (CALADO & MONTGOMERY, 2003). Desta maneira, considerando-se sete tratamentos para cada temperatura de ensaio, o presente trabalho totalizou 21 tratamentos realizados em três temperaturas empregando o método de estufa, além de 28 tratamentos utilizando o método Rancimat.

**Figura 6** – Delineamento simplex-centroide para os componentes alecrim, orégano e manjeriço.



### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os coeficientes da regressão foram estimados utilizando o software Statistica v.9.0. (STATISTICA, 2009) e a função utilizada foi do tipo cúbica:

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

Sendo  $y$  a função resposta dos dados experimentais;  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  as variáveis independentes que correspondem à porcentagem de extratos de alecrim, orégano e manjerição, na mistura, respectivamente, e  $\gamma^{\circ}$  os parâmetros estimados (CORNELL, 2002).

#### 3.6.1 Modelo Matemático Combinado

O modelo combinado contendo os três componentes e a variável de processo  $z$ , que representa o método utilizado, codificada em  $z = +1$ , para método de estufa, e  $z = -1$ , para método Rancimat, é do tipo:

$$Y(x, z) = \sum_{1 \leq i \leq q} \gamma_i^{\circ} x_i + \sum_{1 \leq i \leq q} \gamma_i^1 x_i z + \sum_{1 \leq i < j \leq q} \gamma_{ij}^{\circ} x_i x_j + \sum_{1 \leq i < j \leq q} \gamma_{ij}^1 x_i x_j z + \gamma_{123}^{\circ} x_1 x_2 x_3 + \gamma_{123}^1 x_1 x_2 x_3 z \quad \text{Eq. (2)}$$

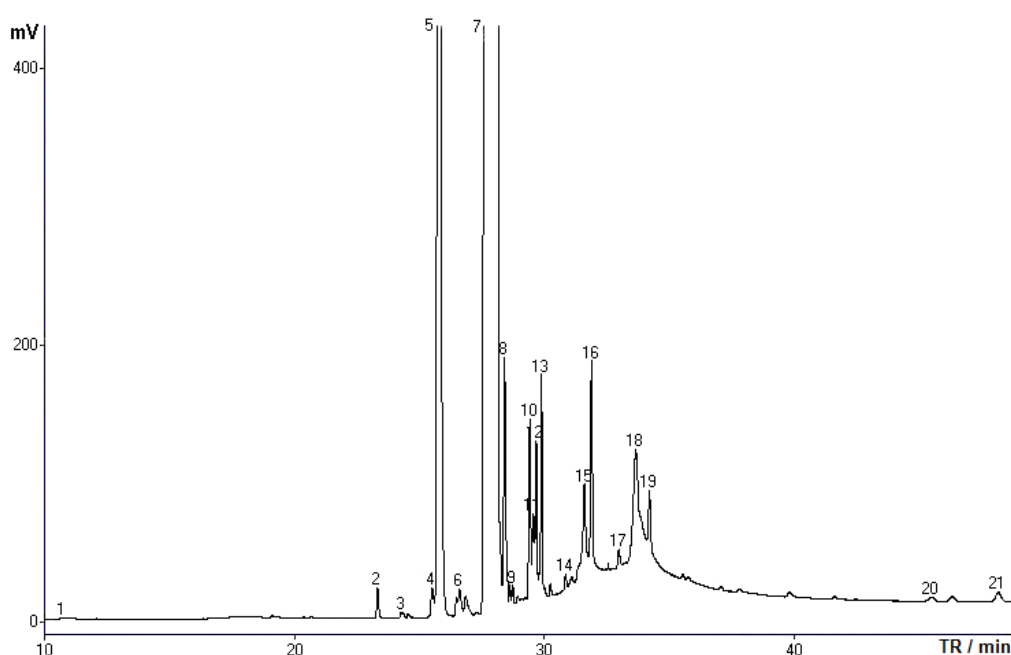
Em que  $\gamma^{\circ}$  representa os parâmetros estimados para os termos sem a variável de processo e  $\gamma^1$  os parâmetros estimados para os termos contendo a variável de processo (CORNELL, 1990).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO BODIESEL

De acordo com a análise cromatográfica (Figura 7), foi observado que o biodiesel B100 utilizado neste trabalho é constituído basicamente por ésteres metílicos com composição variando do C14:0 até C22:0.

**Figura 7** – Perfil cromatográfico do biodiesel de óleo de soja.



O primeiro pico obtido no cromatograma apresentou tempo de retenção de 10,6 min, e corresponde a 0,01% de glicerina livre. Os cinco picos subsequentes, com tempo de retenção variando de 23 a 26 min correspondem aos ésteres metílicos com composição química variando de C14 a C16 representando juntos 21,74%, sendo 21,18% de palmitato de metila. Os picos 7 a 8, com tempo de retenção de 27,6 até 28,4 min, representam a mistura de oleato de metila, linoleato de metila, estereato de metila e linoleato de metila somando juntos 73,34%, sendo 70,67% de oleato e linoleato de metila. Os demais picos (9-21) representam ésteres de massa molar maiores e correspondem 3,07%. Portanto, estes ésteres juntos somam 98,15% das substâncias presentes no biodiesel B100 utilizado, e tal valor encontra-se de acordo com a especificação da União Européia, em que os teores de

ácidos graxos livres, álcool, glicerina e água devem ser mínimos de modo que a pureza do biodiesel seja maior que 96,5% (KARAOSMANOGLU; BECKER, 1996).

Os teores de glicerina total e livre foram iguais a 0,16% (m/m) e 0,01% (m/m), respectivamente, valores inferiores ao da legislação brasileira que prevê teores máximos de glicerina total de 0,25% (m/m) e livre de 0,02% (m/m) (D.O.U. - BRASIL, 2012).

A glicerina residual é usada como parâmetro para avaliar a eficiência do processo de purificação do biodiesel. Altas concentrações de glicerina no biodiesel provocam problemas de armazenamento, pois quando o biodiesel é misturado com o diesel de petróleo, observa-se a separação da glicerina nos tanques de estocagem. Formação de depósitos, entupimento dos bicos injetores do motor e emissões de aldeídos também estão relacionados com a alta concentração da glicerina no biodiesel (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

Para assegurar a qualidade do biodiesel é necessário estabelecer padrões de qualidade, fixando teores limites dos contaminantes que não prejudiquem a qualidade das emissões da queima, bem como o desempenho, a integridade do motor e a segurança no transporte e manuseio. Devem ser monitoradas também possíveis degradações do produto durante o processo de estocagem (LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009). A Tabela 1 mostra os principais parâmetros de conformidade do biodiesel B100 utilizado, de acordo com a Resolução 14 da ANP (D.O.U. - BRASIL, 2012).

**Tabela 1** – Parâmetros de conformidade do biodiesel utilizado, segundo ANP.

<b>Característica</b>	<b>Método de ensaio</b>	<b>Unidade</b>	<b>Limite</b>	<b>Resultado</b>
<b>Massa específica (20 °C)</b>	ASTM D4052	kg m <sup>-3</sup>	850-900	890
<b>Ponto de fulgor</b>	ASTM D93	°C	Min.100	150,4
<b>Índice de acidez</b>	ASTM D664	mg KOH g <sup>-1</sup>	Máx. 0,50	0,19
<b>Glicerina livre</b>	ASTM D 6584	% massa	Máx. 0,02	0,013
<b>Glicerina total</b>	ASTM D 6584	% massa	Máx. 0,25	0,160
<b>Monoglicerídeos</b>	ASTM D 6584	% massa	Máx. 0,80	1,490
<b>Diglicerídeos</b>	ASTM D 6584	% massa	Máx. 0,20	0,251
<b>Triglicerídeos</b>	ASTM D 6584	% massa	Máx. 0,20	N.D.
<b>Metanol</b>	EN 14110	% massa	Máx. 0,20	N.D.
<b>Teor de Ésteres</b>	EN 14110	% massa	Min. 96,5	98,15
<b>Período de Indução (110° C)</b>	EN14112	h	Min. 6	3,56

N.D. = Não detectado.

Em relação às características físico-químicas tais como ponto de fulgor, massa específica, índice de acidez e conteúdo de metanol, o biodiesel utilizado apresentou valores em conformidade com a Resolução 14 da ANP (D.O.U. - BRASIL, 2012). Por outro lado, o PIn e teor de mono e diglicerídeos da amostra, na ausência de antioxidantes, apresentou resultados fora das especificações estabelecidas pela mesma resolução.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES

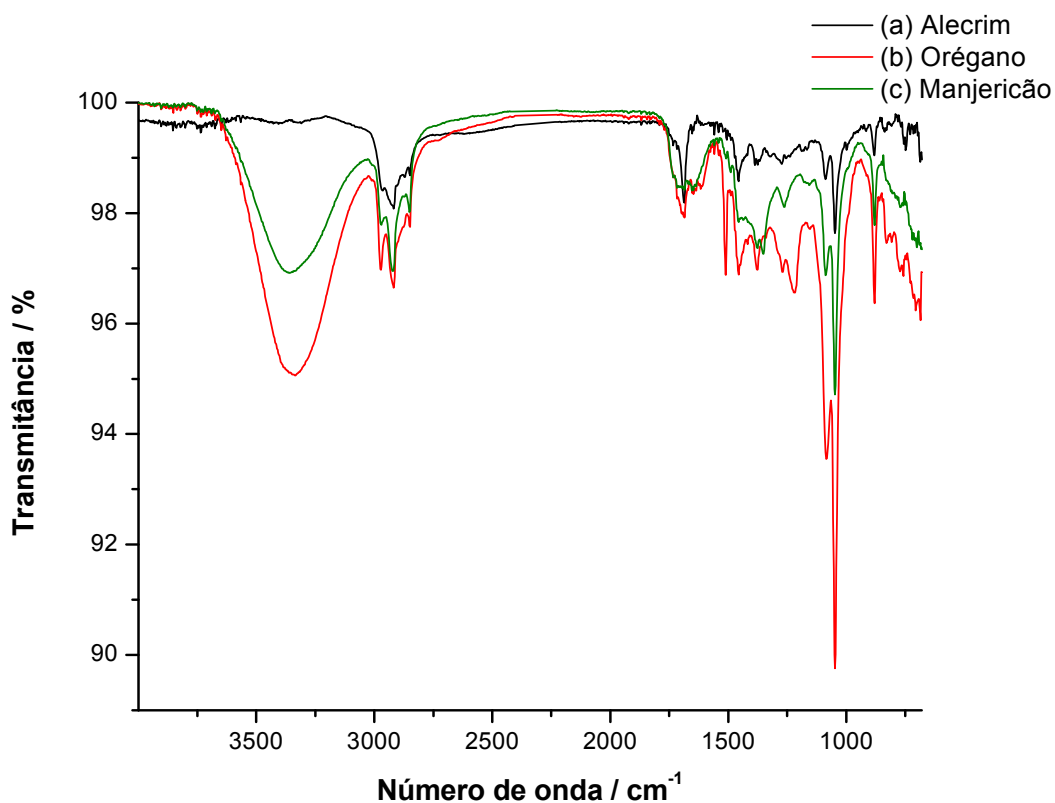
Os extratos etanólicos de alecrim (Figura 8a), orégano (Figura 8b) e manjerição (Figura 8c) foram submetidos à análise de espectroscopia no infravermelho (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

A primeira banda situa-se na região de 3300 cm<sup>-1</sup> e representa uma vibração característica de alcoóis e fenóis, conforme observado nas Figuras 8b e 8c. Já para os três espectros, na região de 2800 cm<sup>-1</sup>, foi constatada uma banda

correspondente à ligação C-H de aromáticos; em  $1750\text{ cm}^{-1}$  observaram-se bandas harmônicas (*overtones* de aromáticos). Duas bandas foram observadas entre  $1260\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  e podem ser vibrações de alceno, deformação axial C-O de álcool ou fenol. Em  $1420\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$  há um acoplamento com as vibrações de deformação angular simétrica fora do plano de C-H e deformação angular no plano, característico do grupamento OH, atribuídos a álcoois primários/secundários.

Conforme observado na Figura 8 (a) há uma banda relativamente intensa apenas no espectro de alecrim, na região de  $1600\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo a presença de um grupo carbonílico. Além disso, especificamente para o mesmo espectro, observou-se que a banda de OH (aproximadamente em  $3000\text{ cm}^{-1}$ ) não apresentou formato característico, atribuída à sobreposição com outra banda. Mesmo assim, por meio desta técnica foi possível observar o perfil dos compostos presentes nos extratos e, sobretudo, os compostos fenólicos, que particularmente são importantes neste trabalho.

**Figura 8** – Espectro de IV dos extratos etanólicos de (a) alecrim, (b) orégano e (c) de manjerição.

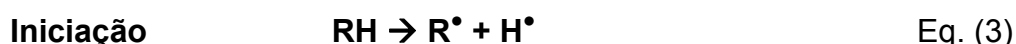


### 4.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DETERMINADA PELO TESTE ACELERADO EM ESTUFA

A oxidação do biodiesel é um processo complexo que consiste de numerosas reações elementares do tipo radicalar (XIN et al., 2009). Acredita-se que o mecanismo possa ser descrito por reações de iniciação, propagação e terminação.

A primeira reação, na etapa de iniciação, é termodinamicamente desfavorável, com energia de ativação de  $35 \text{ kcal mol}^{-1}$ ; acredita-se que a formação de radicais peróxidos é favorecida pela reação do biodiesel (RH) com oxigênio molecular no estado singleto, por metais catalisadores, ou ainda pela exposição à luz. A conversão do oxigênio tripleto para sua forma mais reativa (singleto) pode ocorrer por várias formas, dentre as quais, a mais importante é a fotossensibilização por substâncias fotodinâmicas presentes nas oleaginosas, como por exemplo, a clorofila. Dois caminhos são propostos para essa oxidação: um deles admite que o sensibilizador absorve luz e reage com o substrato formando intermediários, que, então reagem com o oxigênio tripleto dando os produtos de oxidação. Enquanto na outra abordagem, presume-se que o oxigênio molecular seja a espécie que reage com o sensibilizador (clorofila) sob absorção de luz, gerando os produtos (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992).

As reações de iniciação podem ocorrer pela perda de um átomo de hidrogênio do biodiesel (RH) na posição  $\alpha$  adjacente à insaturação na cadeia lipídica:



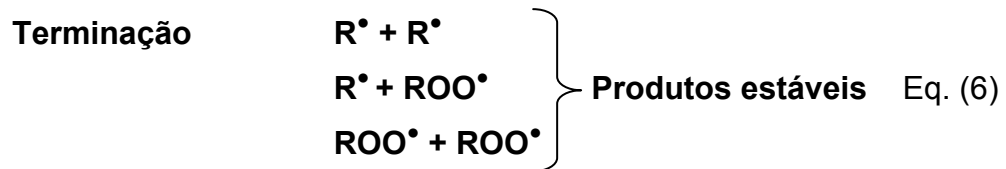
Na etapa de propagação, são formadas espécies denominadas hidroperóxidos de alquila (ROOH) os quais apresentam uma ligação oxigênio-oxigênio muito fraca, podendo ser rompida facilmente, originando radicais que podem iniciar outras cadeias (SOLOMONS & FRYHLE, 2005):



Segundo PORTER (1986), na etapa de propagação, a Eq. (5), que representa a transferência do hidrogênio, é a que possui menor constante de

velocidade nessa etapa do mecanismo, ao contrário da reação de oxigenação, Eq. (4), que é muito rápida e tem energia de ativação muito baixa, próxima a zero; isso implica que a concentração de radical peróxido ( $\text{ROO}^\bullet$ ) seja maior que a de radical alquil ( $\text{R}^\bullet$ ), o que contribui para a continuação da etapa de propagação. Devido à ressonância das espécies alquílicas, geralmente, observa-se uma mudança no local da insaturação o que pode resultar na formação de hidroperóxidos isoméricos que contêm grupos dienos conjugados (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992):

Na terminação (Eq. 6), há recombinação de radicais levando a formação de produtos estáveis (não radicalares):



Hidroperóxidos decompõem-se rapidamente apenas acima de  $160^\circ\text{C}$  levando a formação de polímeros, ou podem ainda decompor-se para produção de álcoois, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos etc (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992).

Para se avaliar a estabilidade oxidativa ou sua susceptibilidade à oxidação, o biodiesel B100, acrescentado de extratos alcoólicos de condimentos antioxidantes (além da amostra controle), foi submetido ao teste de oxidação acelerado em estufa (FRANKEL, 1993; BORSATO et al., 2010b) e os PIn foram determinados. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos de acordo com cada temperatura de trabalho.

**Tabela 2** – Períodos de indução (em dias) obtidos a partir do teste de oxidação acelerado em estufa, segundo o delineamento experimental de mistura simplex-centroide.

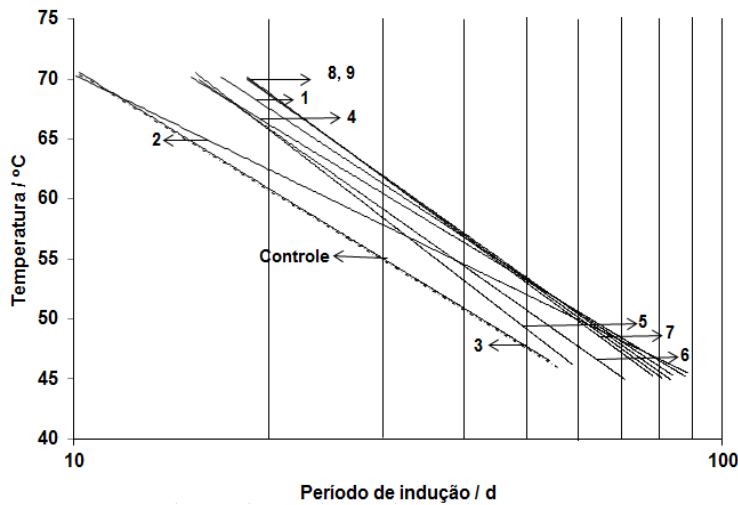
Tratamento	Mistura*	Período de Indução / d		
		45 °C	55 °C	70 °C
1	(1;0;0)	83,7240	46,4281	16,8686
2	(0;1;0)	88,3352	41,2323	10,0727
3	(0;0;1)	54,0752	34,7580	10,1899
4	( $\frac{1}{2}$ ; $\frac{1}{2}$ ;0)	87,5305	45,1774	15,1624
5	( $\frac{1}{2}$ ;0; $\frac{1}{2}$ )	58,6236	39,8595	15,4036
6	(0; $\frac{1}{2}$ ; $\frac{1}{2}$ )	70,8354	38,3464	15,5997
7	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	78,058	45,5937	18,5335
8	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	83,2958	45,1117	18,5335
9	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	80,6769	45,3527	18,5335
Controle	-	56,2004	32,3686	10,2181

\*(%alecrim;%orégano;%manjeriço)

Observa-se que com o aumento da temperatura de ensaio há diminuição do PIn e a maioria dos antioxidantes retardou a oxidação do biodiesel quando comparado com o controle.

A Figura 9 ilustra as retas entre o logaritmo natural (ln) dos três períodos de indução, de cada tratamento, versus as três temperaturas de ensaio trabalhadas, durante a avaliação da estabilidade oxidativa do biodiesel B100 de óleo de soja estabilizado com extratos alcoólicos de antioxidantes naturais, bem como a amostra controle. Em todas as retas representadas observaram-se altos valores de coeficiente de determinação ( $R^2 > 0,97$ ).

**Figura 9** – Relação entre o logaritmo natural dos períodos de indução (em dias) e as temperaturas de ensaio do biodiesel estabilizado com antioxidantes naturais e amostra controle, obtidos pelo método acelerado em estufa.



	Equação	R <sup>2</sup>
1	$T(^{\circ}\text{C}) = -15,52 \ln \text{PIn}_{(d)} + 114,04$	0,9987
2	$T(^{\circ}\text{C}) = -11,4 \ln \text{PIn}_{(d)} + 96,62$	0,9969
3	$T(^{\circ}\text{C}) = -14,39 \ln \text{PIn}_{(d)} + 103,96$	0,9776
4	$T(^{\circ}\text{C}) = -14,21 \ln \text{PIn}_{(d)} + 108,77$	0,9993
5	$T(^{\circ}\text{C}) = -18,15 \ln \text{PIn}_{(d)} + 120,14$	0,9846
6	$T(^{\circ}\text{C}) = -16,53 \ln \text{PIn}_{(d)} + 115,39$	1
7	$T(^{\circ}\text{C}) = -17,31 \ln \text{PIn}_{(d)} + 120,70$	0,9991
8	$T(^{\circ}\text{C}) = -16,65 \ln \text{PIn}_{(d)} + 118,56$	0,9999
9	$T(^{\circ}\text{C}) = -16,98 \ln \text{PIn}_{(d)} + 119,62$	0,9999
Controle	$T(^{\circ}\text{C}) = -14,41 \ln \text{PIn}_{(d)} + 103,89$	0,9926

É possível observar a sobreposição de retas, como no caso do tratamento 8 e 9 (repetições do ponto central) sugerindo uma baixa dispersão entre os dados experimentais das duas repetições. No caso do tratamento 3 (100% de manjeriço) há uma sobreposição na reta que representa os pontos experimentais do controle e isso pode ser comprovado pelo fato de os valores do PIn do tratamento 3 serem muito próximos aos do controle, conforme apresentados na Tabela 2.

Hasenhuettl e Wan (1992) também encontraram alta correlação linear entre o logaritmo natural do PIn em função da temperatura, quando estudaram a estabilidade oxidativa de seis diferentes tipos de óleos vegetais, sem o uso de antioxidantes. Xin et al. (2009) verificaram o mesmo comportamento quando estudaram a estabilidade de biodiesel de óleo de girassol, contendo diferentes concentrações do antioxidante galato de propila.

Por meio das equações dessas retas foi obtida a extrapolação dos períodos de indução a 25 °C, ou seja, o tempo de estocagem (TE) a temperatura ambiente (Tabela 3). Dessa maneira, verificaram-se que os ensaios contendo extratos alcoólicos de antioxidantes naturais apresentaram valores superiores a 238,57 d observados para o controle, exceto os tratamentos cinco e seis, representados, respectivamente, pela mistura binária alecrim e manjerição que renderam um Pln de 189,02 d, seguido da mistura orégano e manjerição que resultou em Pln de 237,04 d, valor próximo porém menor que o valor numérico da amostra controle. Dentre os demais ensaios, destacam-se o segundo tratamento, contendo 100% de extrato de orégano, que rendeu o maior Pln, de 535,20 d, seguido do tratamento quatro, alecrim e orégano (363,27 d) e por fim, o tratamento 1 (100% de alecrim) com Pln de 310,17 d; para os demais tratamentos, os valores apresentaram uma flutuação na faixa de 241,57 a 275,67 d.

**Tabela 3** – Tempos de estocagem, em dias, obtidos através da extrapolação dos valores de Pln, de acordo com o delineamento simplex-centroide aplicado às misturas com alecrim, orégano e manjerição, segundo método acelerado em estufa

Tratamento	Mistura*	Tempo de estocagem / d
1	(1;0;0)	310,17
2	(0;1;0)	535,20
3	(0;0;1)	241,57
4	( $\frac{1}{2}$ ; $\frac{1}{2}$ ;0)	363,27
5	( $\frac{1}{2}$ ;0; $\frac{1}{2}$ )	189,02
6	(0; $\frac{1}{2}$ ; $\frac{1}{2}$ )	237,04
7	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	251,79
8	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	275,67
9	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	263,07
Controle	-	238,57

\*(%alecrim;%orégano;%manjerição)

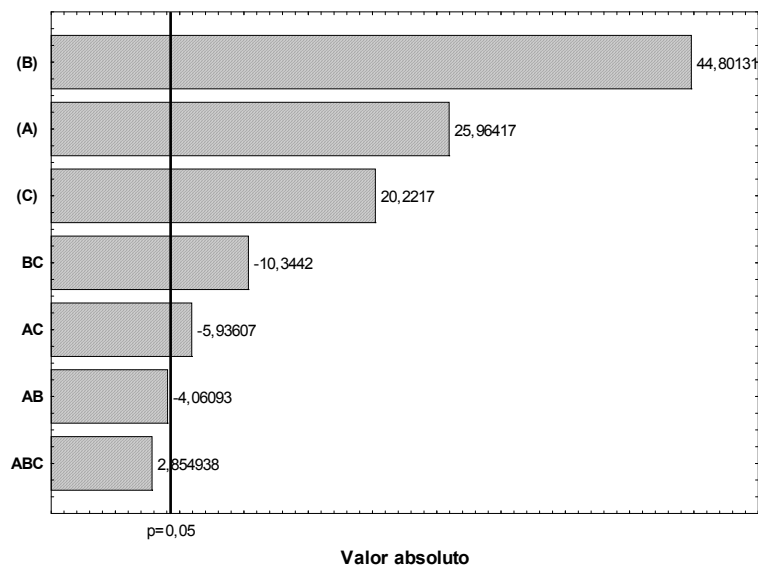
A equação canônica (7) foi ajustada aos dados experimentais e  $Y_{\text{Estufa}}$  representa o TE, em dias.

$$Y_{Estufa} = 310,17x_1^* + 535,20x_2^* + 241,57x_3^* - 237,66x_1x_2 - 347,40x_1x_3^* - 605,38x_2x_3^* + 903,63x_1x_2x_3 \quad \text{Eq. (7)}$$

A equação mostra que o primeiro, segundo, terceiro, quinto e sexto termos (com asterisco) são significativos em nível de 5%. Destes termos, a mistura binária alecrim e manjerição ( $x_1x_3$ ) e a mistura orégano e manjerição ( $x_2x_3$ ) apresentam coeficientes negativos e indicam contribuição negativa, ou seja, não são eficientes no processo de proteção contra oxidação do biodiesel.

A Figura 10 mostra com clareza os efeitos estatisticamente importantes. Os números ao lado de cada barra representam os valores estatísticos do teste  $t$  (CALADO & MONTGOMERY, 2003).

**Figura 10** – Diagrama de Pareto para os termos da Equação (7) com os dados experimentais obtidos pelo método de estufa (em que A: alecrim; B: orégano; C: manjerição).



O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo obtido a partir dos ensaios realizados através do método acelerado em estufa foi maior que 0,99 e o ajuste de 99%. Além disso, a falta de ajuste foi não significativa (10,39%), o que indica uma boa concordância do modelo com os dados experimentais. Além disso,  $F_{calc}$  apresentou um valor muito maior que  $F_{tab}$  (Tabela 4), dessa forma, esses parâmetros demonstram que o modelo é adequado para os procedimentos de otimização (MALI et al., 2001).

**Tabela 4** – Análise de variância para o modelo gerado a partir das amostras submetidas ao teste acelerado em estufa.

	<b>G.L.</b>	<b>S.Q.</b>	<b>Q.M.</b>	<b>F<sub>calc</sub></b>	<b>F<sub>tab</sub></b>
Modelo	6	82992,24	13832,04	96,92492*	19,33
Falta de ajuste	1	1163,17	1163,17	8,15067 <sup>(NS)</sup>	18,51
Resíduos	2	285,42	142,71		
Total	8	83277,66			

\*: significativo em nível de 5%; (NS): não significativo em nível de 5%.

A Tabela 5 mostra os valores experimentais, previstos pelo modelo (Eq. 7) e os resíduos de TE.

**Tabela 5** – Valores experimentais, previstos e residuais de tempo de estocagem apresentados pelos ensaios de 1 a 9, de acordo com o método acelerado em estufa.

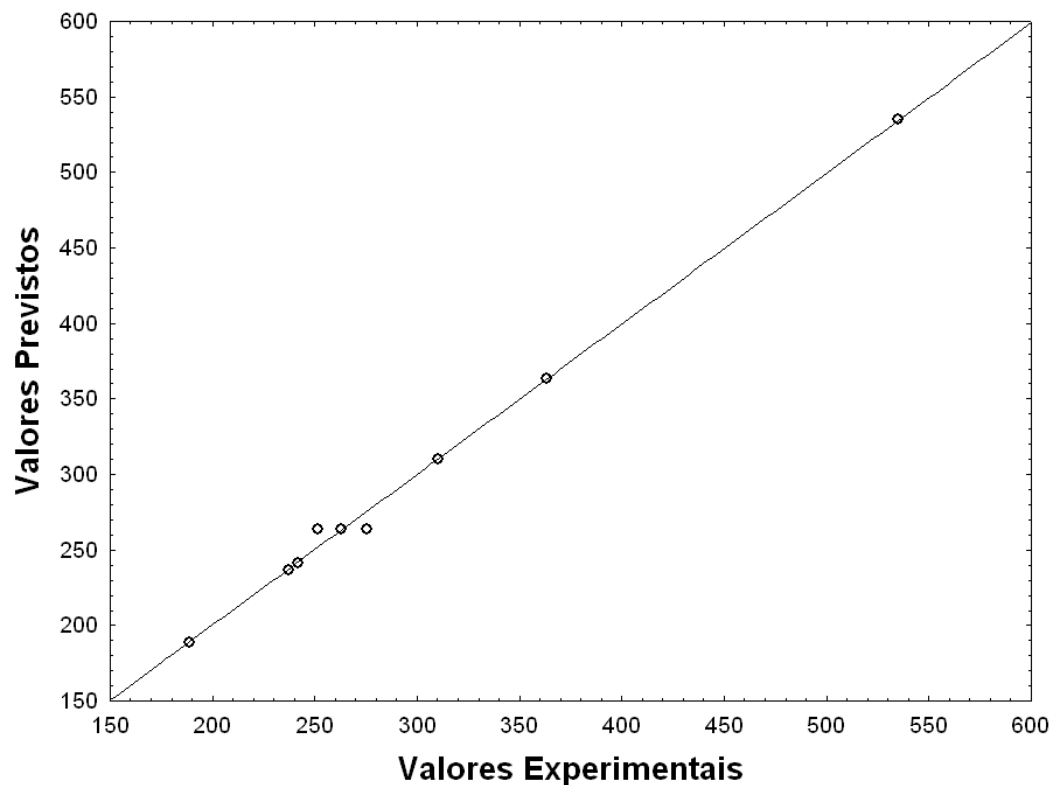
<b>Tratamento</b>	<b>Valores</b>	<b>Valores</b>	<b>Valores</b>
	<b>Experimentais / d</b>	<b>Previstos / d</b>	<b>Residuais / d</b>
<b>1</b>	310,1700	310,1700	0,0000
<b>2</b>	535,2000	535,2000	0,0000
<b>3</b>	241,5700	241,5700	0,0000
<b>4</b>	363,2700	363,2700	0,0000
<b>5</b>	189,0200	189,0200	0,0000
<b>6</b>	237,0400	237,0400	0,0000
<b>7</b>	251,7900	263,5100	-11,7200
<b>8</b>	275,6700	263,5100	12,1600
<b>9</b>	263,0700	263,5100	-0,4400

Um modelo bem ajustado deve ser capaz de representar toda a informação sistemática contida nos dados e os resíduos deixados por ele devem representar apenas os erros aleatórios embutidos nas medições. O comportamento dos resíduos deve ser muito próximo ao de uma amostra aleatória extraída de uma distribuição normal de média zero (BONA et al., 2002).

Conforme observado na Figura 11, há uma boa correlação entre os pontos experimentais preditos e observados. Esse alinhamento sugere, juntamente

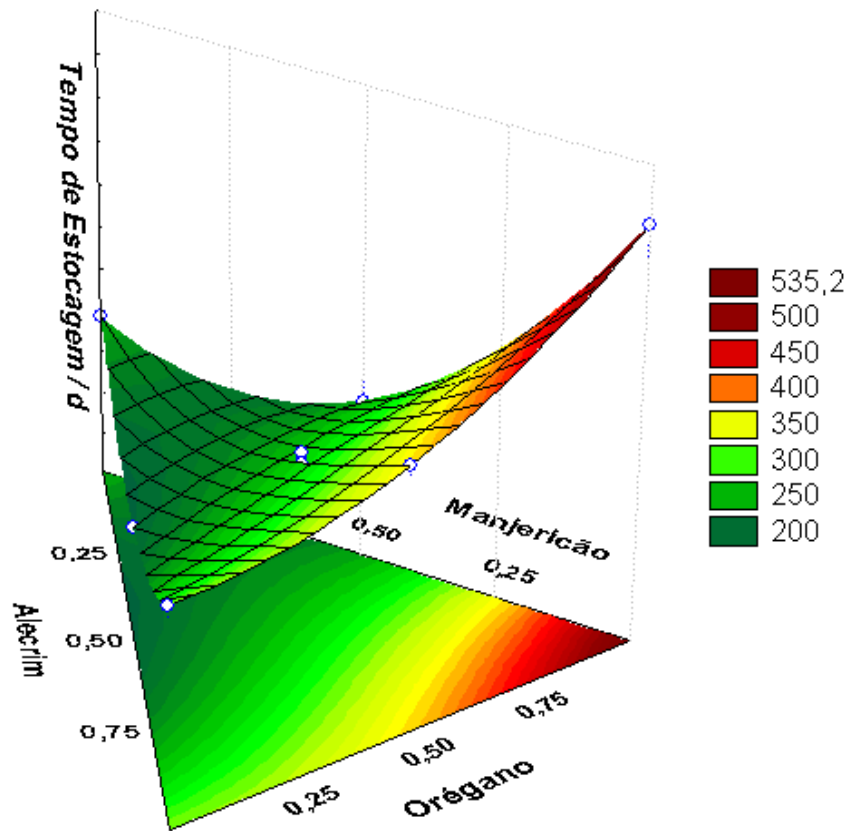
com os dados apresentados na Tabela 5, que o valor dos resíduos é baixo para o modelo. Os pontos acima ou abaixo da linha diagonal representam áreas que estão fora ou abaixo da previsão. Os tratamentos referentes ao ponto central apresentaram resíduos muito baixos. Desse modo, pode-se afirmar que não houve nenhuma violação significativa do modelo assumido (LEE & GILMORE, 2005).

**Figura 11** – Correlação entre os valores dos tempos de estocagem experimentais e os previstos determinados pelo método acelerado em estufa.



A região de combinação ternária entre as variáveis independentes  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  pode ser visualizada por meio da superfície de resposta representada na Figura 12. Observa-se que região que fornece maior período de indução está localizada em um dos vértices do simplex que representa a componente contendo 100% de extrato de orégano.

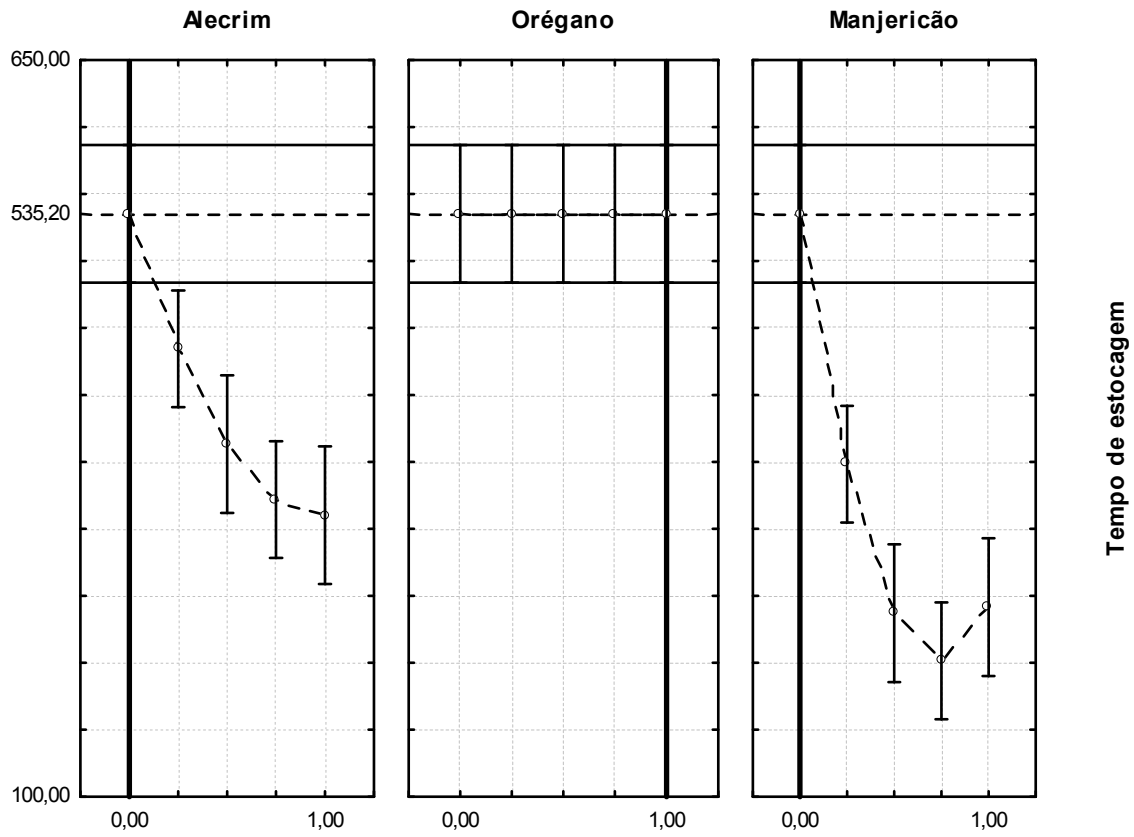
**Figura 12** – Superfície de resposta para o período de indução a temperatura ambiente.



A otimização do PIn, por meio da equação preditiva (7), é ilustrada na Figura 13. Ela mostra que o TE estimado de 535,20 d, a temperatura ambiente, pode ser alcançado quando o biodiesel é misturado com 100% de extrato alcoólico de orégano.

Dentre os ensaios realizados, observou-se que os valores de PIn para os tratamentos 2 e 4 a 45 °C (Tabela 2) foram os maiores. Conforme esperado, tal comportamento também foi observado para o TE (Tabela 3).

**Figura 13** – Perfil das condições ótimas para as variáveis (extratos) estudadas.



Aranha & Jorge (2011) também verificaram substancial atividade antioxidante de extrato etanólico de orégano (*Origanum vulgare L.*) na concentração de  $3000 \text{ mg kg}^{-1}$  em óleo de soja, levando-se em consideração os resultados de estabilidade oxidativa, compostos polares totais, tocoferóis e ácidos graxos. Em relação à estabilidade oxidativa do óleo, observou-se que o extrato foi o principal responsável pelo efeito protetor, tendo em vista que o mesmo ofereceu maior estabilidade que o antioxidante sintético TBHQ, na concentração de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ , além da ausência de efeito sinérgico na mistura contendo  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de TBHQ em  $3000 \text{ mg kg}^{-1}$  de extrato.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DETERMINADA PELO TESTE RANCIMAT

Outra maneira de se avaliar a estabilidade oxidativa do biodiesel B100 em mistura de antioxidantes naturais é por meio do método de oxidação acelerada Rancimat, previsto pela norma EN14112 (2003). A Tabela 6 apresenta os valores dos períodos de indução obtidos em cada ensaio.

**Tabela 6** – Períodos de indução (dias) obtidos através do método Rancimat de oxidação acelerada, seguindo o delineamento simplex-centroide.

Tratamento	Mistura*	Período de Indução / d			
		110 °C	115 °C	120 °C	130 °C
1	(1;0;0)	0,75	0,50	0,29	0,17
2	(0;1;0)	0,67	0,56	0,40	0,21
3	(0;0;1)	0,78	0,48	0,35	0,18
4	( $\frac{1}{2}$ ; $\frac{1}{2}$ ;0)	0,82	0,57	0,38	0,20
5	( $\frac{1}{2}$ ;0; $\frac{1}{2}$ )	0,69	0,49	0,36	0,18
6	(0; $\frac{1}{2}$ ; $\frac{1}{2}$ )	0,79	0,49	0,34	0,19
7	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	0,61	0,54	0,38	0,16
8	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	0,63	0,50	0,37	0,16
9	( $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ ; $\frac{1}{3}$ )	0,62	0,55	0,37	0,16
<b>Controle</b>	-	0,15	0,09	0,07	0,03

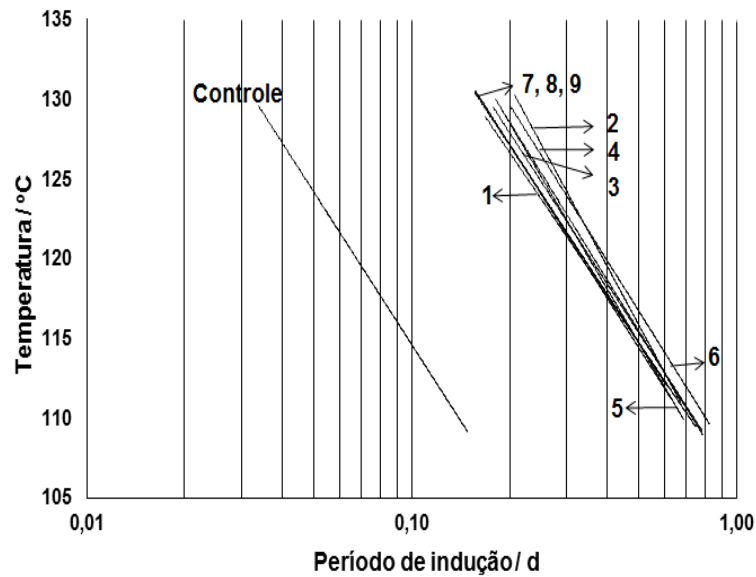
\*(%alecrim;%orégano;%manjeriçã)

A especificação estabelecida pelo método de ensaio EN 14112 indica que o PIn mínimo deve ser superior a 6 h (0,25 d) a 110 °C. De acordo com a Tabela 6, para esta temperatura, todos os tratamentos apresentaram PIn superior ao mínimo estabelecido, com destaque para o tratamento 4 (mistura binária alecrim e orégano) que rendeu o maior PIn, de 0,82 d, seguido do tratamento 6 (com 50% de orégano e 50% de manjeriçã) com PIn de 0,79 d. Os tratamentos 1 e 3, que consistem em misturas unitárias de alecrim e manjeriçã, respectivamente, assinalaram períodos de indução relativamente próximos, de 0,75 e 0,78 d, cada um deles. O ponto central figurou com o menor PIn, de 0,62 d, em média.

O PIn de 0,15 d para o controle a 110 °C foi inferior ao mínimo estabelecido para esta temperatura, mostrando a importância da presença dos antioxidantes na conservação do biodiesel B100 (D.O.U. - BRASIL, 2012). Valor semelhante foi obtido por MAIA et al. (2011) quando estudou a eficiência de antioxidantes sintéticos utilizando biodiesel B100 obtido do óleo de soja.

A Figura 14 mostra as temperaturas em função do logaritmo natural dos PIn para o biodiesel B100 de óleo de soja estabilizado com as misturas de antioxidantes naturais e controle. Todas as retas ilustradas apresentaram valores de coeficientes de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0,96.

**Figura 14** – Relação entre o logaritmo natural dos períodos de indução (em dias) e temperaturas de ensaio do biodiesel de soja estabilizado com antioxidantes e controle, obtidos pelo método Rancimat.



	Equação	R <sup>2</sup>
1	$T(^{\circ}\text{C}) = -13,06 \ln \text{PIn}_{(d)} + 105,72$	0,9808
2	$T(^{\circ}\text{C}) = -16,41 \ln \text{PIn}_{(d)} + 104,53$	0,9896
3	$T(^{\circ}\text{C}) = -13,73 \ln \text{PIn}_{(d)} + 105,89$	0,9936
4	$T(^{\circ}\text{C}) = -14,16 \ln \text{PIn}_{(d)} + 106,96$	0,9963
5	$T(^{\circ}\text{C}) = -15,11 \ln \text{PIn}_{(d)} + 104,30$	0,9997
6	$T(^{\circ}\text{C}) = -14,34 \ln \text{PIn}_{(d)} + 105,58$	0,9828
7	$T(^{\circ}\text{C}) = -13,61 \ln \text{PIn}_{(d)} + 105,34$	0,9621
8	$T(^{\circ}\text{C}) = -13,95 \ln \text{PIn}_{(d)} + 104,79$	0,9826
9	$T(^{\circ}\text{C}) = -13,5 \ln \text{PIn}_{(d)} + 105,46$	0,9653
Controle	$T(^{\circ}\text{C}) = -13,81 \ln \text{PIn}_{(d)} + 82,87$	0,9829

Os dados foram extrapolados para obtenção dos PIn à temperatura de 25 °C (TE). Todos os ensaios contendo antioxidantes (Tabela 7) apresentaram valores superiores a 66,04 d observados para o controle.

**Tabela 7** – Tempos de estocagem, em dias, obtidos através da extrapolação dos valores de Pln, de acordo com o delineamento simplex-centroide aplicado às misturas com alecrim, orégano e manjerição segundo método Rancimat.

Tratamento	Mistura*	Tempo de estocagem / d
1	(1;0;0)	483,33
2	(0;1;0)	127,29
3	(0;0;1)	361,94
4	(½;½;0)	326,40
5	(½;0; ½)	190,22
6	(0; ½;½)	275,68
7	(⅓;⅓;⅓)	366,14
8	(⅓;⅓;⅓)	304,82
9	(⅓;⅓;⅓)	387,61
<b>Controle</b>	-	66,04

\*(%alecrim;%orégano;%manjerição)

De acordo com os dados da Tabela 7, a Equação (8) foi obtida, onde  $Y_{Rancimat}$  representa o TE em dias. Os termos com asterisco apresentam significância em nível de 5%. Para este caso, três termos da equação foram significativos com destaque à contribuição positiva de 100% do componente alecrim ( $x_1$ ) e 100% do componente manjerição ( $x_3$ ), porém uma contribuição negativa quando ambos foram misturados na proporção de 50% ( $x_1x_3$ ), o que pode evidenciar efeitos antagônicos.

$$Y_{Rancimat} = 483,33x_1^* + 127,29x_2 + 361,94x_3^* + 228,36x_1x_2 - 929,66x_1x_3^* + 124,26x_2x_3 + 2505,21x_1x_2x_3 \quad \text{Eq. (8)}$$

A análise de variância (Tabela 8) mostra que o modelo não é significativo em nível de 5%. Porém, como a falta de ajuste foi não significativa ( $p=11,44\%$ ) e o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) experimental foi de 0,96 e o ajustado de 0,84 a Equação (8) pode ser considerada aceitável (JOGLEKAR & MAY, 1987).

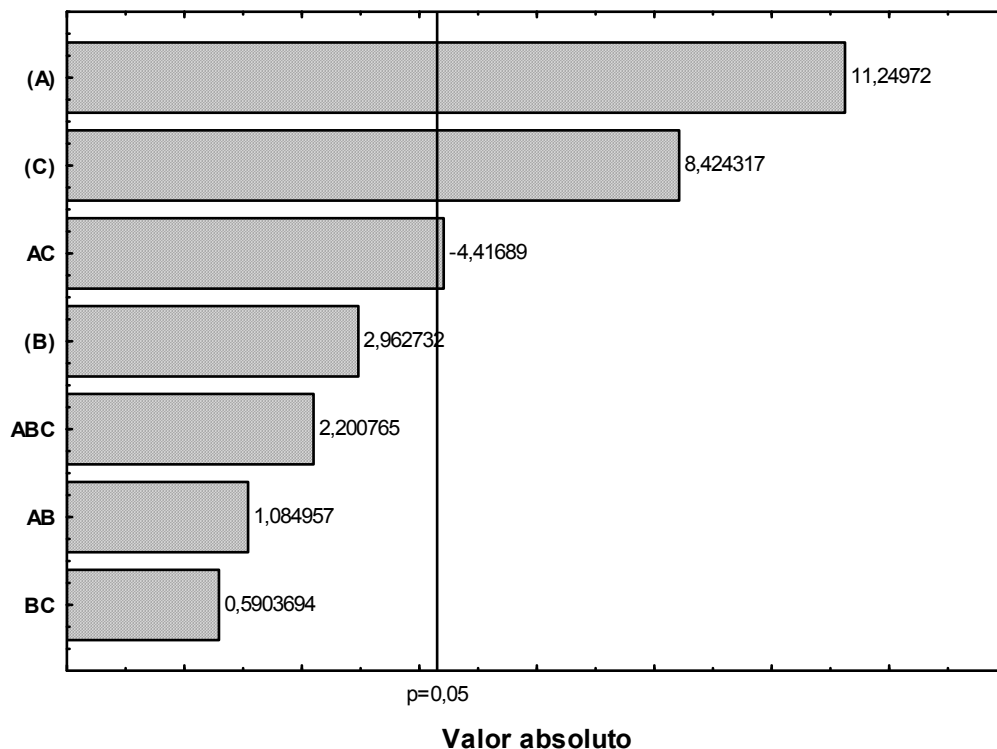
**Tabela 8** – Análise de variância para o modelo gerado a partir das amostras submetidas ao teste Rancimat.

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F <sub>calc</sub>	F <sub>tab</sub>
<b>Modelo</b>	6	89369,34	14894,89	8,069257 <sup>(NS)</sup>	19,33
<b>Falta de ajuste</b>	1	8940,28	8940,28	4,843367 <sup>(NS)</sup>	18,51
<b>Resíduos</b>	2	3691,76	1845,88		
<b>Total</b>	8	93061,10			

(NS): não significativo em nível de 5%.

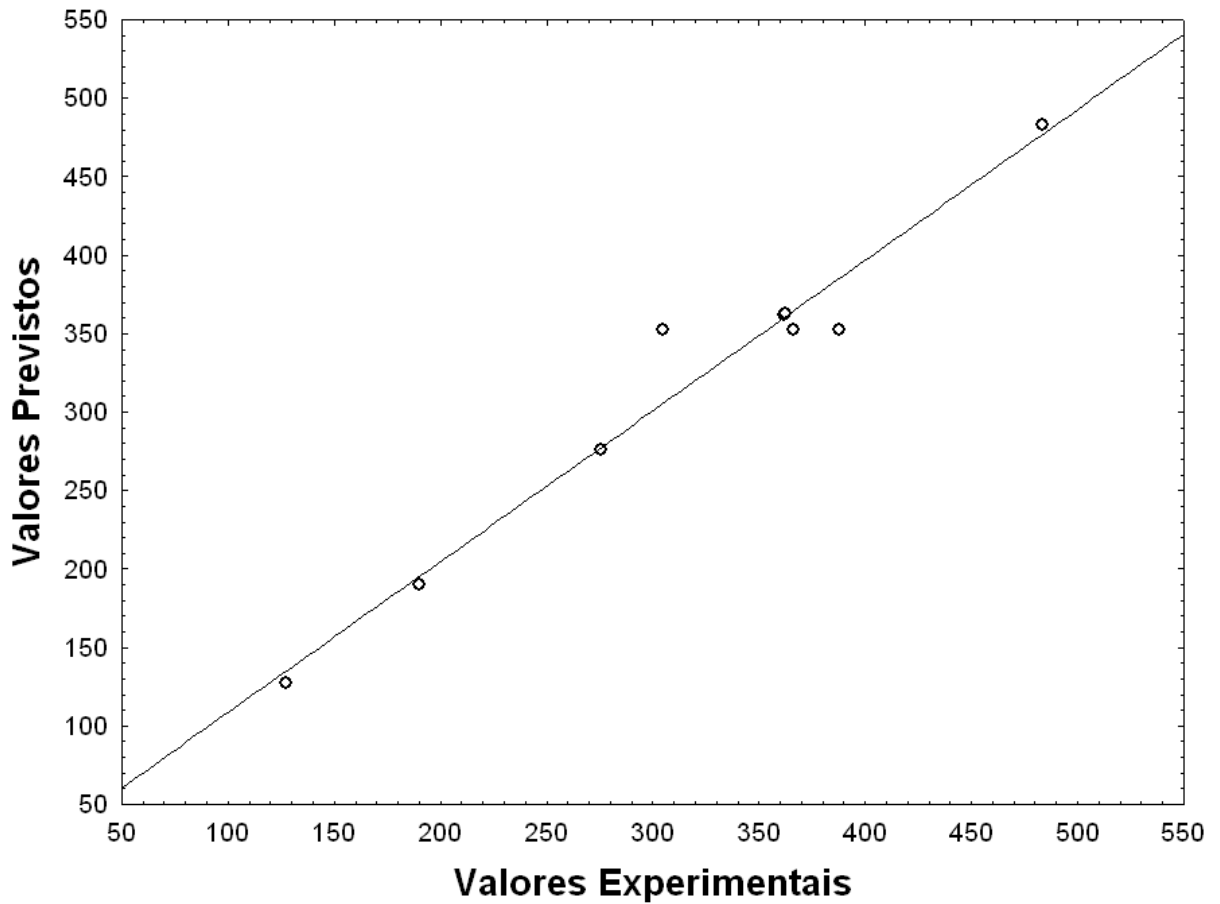
O diagrama de Pareto (Figura 15) auxilia na observação dos três termos significativos da Equação (8) e apresenta os valores do teste t para cada um dos 7 termos.

**Figura 15** – Diagrama de Pareto ilustrando três termos significativos da Equação (8) (em que A: alecrim; B: orégano; C: manjerição).



A Figura 16 mostra a relação entre os valores experimentais e os valores previstos. Os ensaios do ponto central para o teste Rancimat apresentaram uma dispersão maior que os mesmos apresentados no método acelerado em estufa.

**Figura 16** – Correlação entre os valores dos tempos de estocagem experimentais e os previstos determinados pelo método Rancimat.



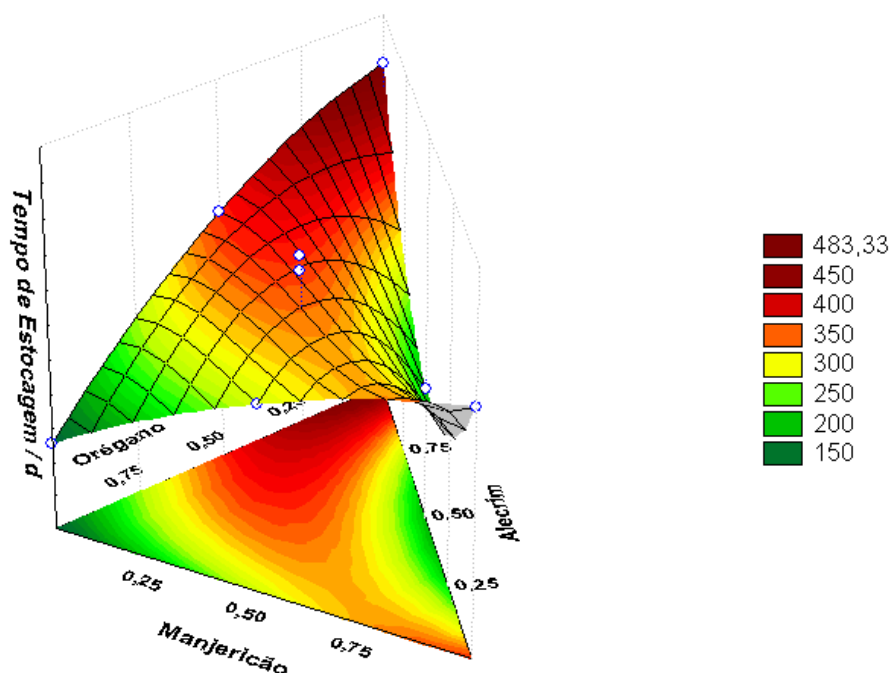
A Tabela 9 apresenta os valores experimentais, os valores previstos pelo modelo experimental (Eq. 8) e os valores residuais dos tempos de estocagem.

**Tabela 9** – Valores experimentais, previstos e residuais de tempo de estocagem apresentados pelos ensaios de 1 a 9, de acordo com o método Rancimat

Tratamento	Valores		Valores
	Experimentais / d	Previstos / d	Residuais / d
1	483,3300	483,3300	0,0000
2	127,2900	127,2900	0,0000
3	361,9400	361,9400	0,0000
4	362,4000	362,4000	0,0000
5	190,2200	190,2200	0,0000
6	275,6800	275,6800	0,0000
7	366,1400	352,8567	13,2833
8	304,8200	352,8567	-48,0367
9	387,6100	352,8567	34,7533

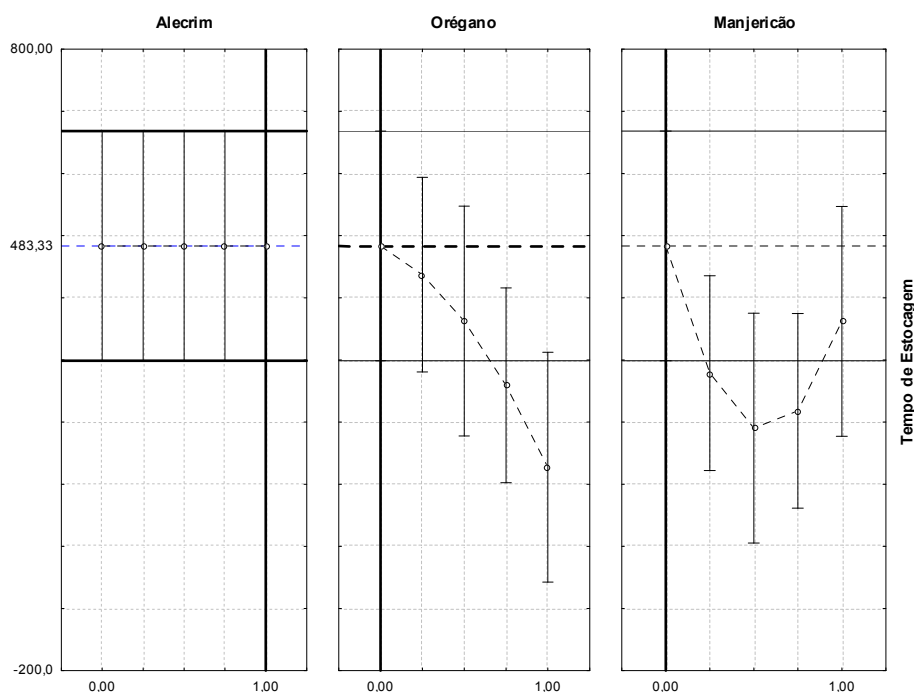
A Figura 17 foi obtida por meio da otimização do TE, baseando-se na equação preditiva, e apresenta a região ótima como sendo o vértice ocupado pelo extrato de alecrim (com sua componente em 100%), diferentemente do observado no método acelerado de estufa, que apresenta a melhor mistura com 100% de extrato de orégano.

**Figura 17** – Região de contorno da resposta “tempo de estocagem” obtida pelo método Rancimat.



A otimização do TE, por meio da equação preditiva, está ilustrada na Figura 18. De acordo com o perfil, o valor estimado do TE para o biodiesel é de 483,33 d e a mistura ótima tem a composição de 100% de extrato de alecrim.

**Figura 18** – Condições ótimas para as misturas de antioxidantes naturais avaliadas pelo método Rancimat.



Como observado em ambos os métodos utilizados, a mistura contendo 50% do extrato de alecrim e 50% de manjeriçao geraram termos negativos nas duas equações ajustadas aos dados experimentais (Equações 7 e 8). O efeito antagônico que surge pode ser ocasionado por contribuição da componente manjeriçao, visto que no teste de estufa é evidenciado que o PIn das amostras contendo manjeriçao são bastante próximos aos da amostra controle, destacando-se o ensaio realizado a temperatura de 70 °C, em que o PIn do tratamento 3 é menor que o próprio controle (Tabela 2).

O extrato etanólico de manjeriçao, muito embora apresente compostos fenólicos (conforme observado no espectro de IV) pode apresentar estruturas com ramificações em posições “para” do anel aromático, causando um efeito eletrônico na estrutura que pode reduzir a capacidade antioxidante. Esta particularidade mostra que a estrutura molecular do antioxidante tem um papel

determinante na capacidade antioxidante do composto (SHAHIDI & WANASUNDARA, 1992; LUO et al., 2012).

#### 4.5 APLICAÇÃO DA VARIÁVEL DE PROCESSO: MODELO MATEMÁTICO COMBINADO

A resposta predita para uma determinada formulação pode variar de acordo com a complexidade e variações durante o processo. Cornell e Deng (1982) desenvolveram uma proposta que combina as variáveis das componentes de uma mistura com as variáveis de processo, mostrando que é possível observar a influência das condições do processo sobre o comportamento das mistura (LEE & GILMORE, 2005).

A Equação 9 combina as variáveis discretas (ou variáveis de processo)  $z$ , codificadas como  $z = +1$  para o método de estufa, e  $z = -1$  para o método Rancimat.

$$Y = 396,75x_1^* + 331,25x_2^* + 301,76x_3^* - 86,58x_1z + 203,96x_2z - 60,19x_3z - 76,65x_1x_2 - 638,53x_1x_3 - 240,56x_2x_3 - 161,01x_1x_2z + 291,13x_1x_3z^* - 364,82x_2x_3z^* + 1921,37x_1x_2x_3 - 1017,20x_1x_2x_3z. \quad \text{Eq. (9)}$$

Aplicando o teste t para os parâmetros contendo a variável de processo, foi encontrado que os três termos lineares, os termos de interação binária entre extrato de alecrim e manjeriço e orégano e manjeriço foram significativos em nível de 5%. Cada um dos três primeiros termos significativos representa as componentes com 100 % de extrato de alecrim, orégano e manjeriço sem o efeito combinado com a variável  $z$ .

Substituindo-se na equação conjunta os valores otimizados dos tempos de estocagem obtiveram-se os mesmos valores, isto é, 535,20 d para o biodiesel B100 com extrato de orégano utilizando a estufa ( $z=1$ ) para determinar o PIn e 483,33 d, usando-se o extrato de alecrim com o Rancimat ( $z=-1$ ) mostrando que a equação que inclui a variável de processo pode ser utilizada para fins preditivos.

Contudo, o método acelerado em estufa pode ser considerado como aquele que expressa o resultado mais realista no presente estudo, tendo em vista que as temperaturas de trabalho são mais próximas a 25 °C, sendo assim, o erro

associado à extrapolação é menor. Além disso, o modelo matemático construído apresentou menor dispersão dos dados em relação ao método Rancimat.

## CONCLUSÕES

O delineamento de misturas simplex-centroide mostrou-se uma ferramenta estatística eficiente para o estudo da estabilidade oxidativa do biodiesel B100 de óleo de soja.

A aplicação do método acelerado de estufa indicou que o biodiesel em uma mistura com 100% de orégano pode apresentar o tempo de prateleira de 535,20 d sem sofrer oxidação evidente. Por outro lado, de acordo com o método Rancimat, a mistura ideal é composta de 100% de alecrim, apresentando 483,33 d de estocagem.

A equação obtida por incorporação de variáveis de processo, representadas pelo método acelerado em estufa e Rancimat, pode ser utilizada para finalidades preditivas, no entanto, o método acelerado em estufa mostrou-se mais realista para avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel a temperatura ambiente.

Em ambos os métodos utilizados foi observado efeito antagônico do manjeriço, em mistura binária, indicando que o extrato alcoólico deste condimento não apresenta efeito antioxidante satisfatório.

## SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Determinação da ordem de reação considerando  $n = 1$  e  $0 \leq n < 1$  e avaliar de acordo com o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

De acordo com a ordem escolhida, determinar a constante de velocidade e energia de ativação ( $E_a$ ).

Generalização das conclusões com a realização do experimento utilizando biodiesel B100 de óleo de girassol.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-DORIA, R.F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n.2, p.197-203, 2000.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, B. R. Legumes as a source of natural antioxidants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n.10, p. 865-878, 2008.
- American Oil Chemist's Society (A.O.C.S). **Official Methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**, 5<sup>th</sup> ed. Champaign: USA, 1998.
- ARANHA, C.P.M.; JORGE, N. Antioxidant potential of oregano extract (*Origanum vulgare L.*). **British Food Journal**, v.114, n.7, p.954-965, 2012.
- ASTM International – ASTM D4052 – 09 **Standard Test Method for Density, Relative Density, and API Gravity of Liquids by Digital Density Meter**, 2002.
- ASTM International – ASTM D6584 – 10 **Standard Test Method for Determination of Total Monoglyceride, Total Diglyceride, Total Triglyceride, and Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography**, 2003.
- ASTM International – ASTM D664 – 11 **Standard Test Method for Acid Number of Petroleum Products by Potentiometric Titration**, 2001.
- ASTM International – ASTM D93 – 10a **Standard Test Methods for Flash Point by Pensky-Martens Closed Cup Tester**, 2001.
- BELTRÃO, N. E. M.; VALE, L.S.; COSTA, S.G. **Bioenergia, Mamona e o Biodiesel no Brasil e no Mundo: Atualidades e Perspectivas**. 1. Ed. Campina Grande: Embrapa Algodão. 2006.
- BONA, E.; BORSATO, D.; SILVA, R.S.S.F.; BENETASSO, D. L.; SOUZA, D.A. Planejamento e otimização de sistemas mistos controlados por variáveis qualitativas e quantitativas. **Acta Scientiarum**, v.24, n.6, p.1843-1850, 2002.
- BONDIOLI, P.; GASPAROLI, A.; DELLA BELLA, L.; TAGLIABUE, S.; LACOSTE, F.; LAGARDERE, L. Biodiesel stability under commercial storage conditions over one year. **European journal of lipid science and technology**, v.105, n. 12, p.735-741, 2003.
- BORSATO, D.; GUEDES, C.L.B.; MOREIRA, I; PINTO, J.P.; DIAS, G.H.; SPACINO, K.R. Otimização das condições de obtenção de biodiesel de óleo de soja utilizando o delineamento experimental de mistura. **Semina**, v. 31, p.3-13, 2010a.
- BORSATO, D.; ANTONIA, L.H ; GUEDES, C. L. B. ; MAIA, E. R. ; FREITAS, H. R. ; MOREIRA, I. ; SPACINO, K. R. Aplicação do delineamento simplex-centroide no estudo da cinética de oxidação de biodiesel B100 em mistura com antioxidantes. **Química Nova**, v. 33, p.1726-1731, 2010b.

BRADLEY, D.G.; MIN, D.B. Singlet Oxygen Oxidation of Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.31, n.3, p.211-236, 1992.

BRAGAGNOLO, N.; MARIUTTI, L.R.B. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.10, n.2, p.96-103, 2007.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2003.

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

CORNELL, J.A. **Experiments with Mixtures — Designs, Models and the Analysis of Mixture Data**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: John Wiley and Sons, 2002.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality technology**, v.12, n.4, p.214-219, 1980.

D.O.U.-BRASIL. Resolução nº 14, de 11 de maio de 2012 da 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 de maio de 2012.

EN 14110: 2003, **Fat and oil derivatives. Fatty acid methyl Esters (FAME). Determination of methanol content**, 2003.

EN 14103:2003, **Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of ester and linolenic acid methyl esters content**, 2003.

EN 14112, **Fat and oil derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) – Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test)**, 2003.

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

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S., ESCABIO, A. Biodiesel de soja - Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, n.1, p.19-23, 2005.

FERRARI, R. A.; SOUZA, W.L. Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.1, p. 106-111, 2009.

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

FRANKEL, E.N.J.S. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science & Technology**, v.4, n.7, p.220-225, 1993.

GAZZONI, D.L. Emissão de Gases Poluentes e Biodiesel. Disponível em <<http://www.biodieselbr.com/efeito-estufa/gases/emissoes.htm>>. Acesso em 19 jan. 2013.

HASENHUETTL, G.L.; WAN, P.J. Temperature effects on the determination of oxidative Stability with the Metrohm Rancimat. **JAOCS**, v.69, p.525-527, 1992.

JOGLEKAR, A. M. ; MAY, A.T. Product excellence through design of experiments. **The American Association of Cereal Chemists**, v.32,n.12, p 857-868, 1987.

KARAOSMANOGLU, F.; BECKER. U.G. Used oil as a fuel oil alternative. **Energy Sources**, v. 18, n. 6, p.637-644, 1996.

KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Origanum vulgare L.*). **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, n.3, p.519-524, 1989.

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

LEE, K.; GILMORE, D.F. Formulation and process modeling of biopolymer (polyhydroxyalkanoates: PHAs) production from industrial wastes by novel crossed experimental design. **Process Biochemistry**, v.40, p.229-246, 2005.

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.Y.; ZHENG, Z.; WANG, J.; JI, J.B. Impact of some natural derivatives on the oxidative stability of soybean oil based biodiesel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, 2012.

MADSEN, H. L & BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, n.8, p. 271-277, 1995.

MAIA E.C.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 Process Technology**, v.92, p. 1750-1755, 2011.

MALI, S.; SILVA, R.A.S.; GROSSMANN, M.V.E.; SILVA, R.S.F.; BORSATO, D.Optimization of the production of acetylated distarch adipates using the novel software 'Multiplex'. **International Journal of Food Science and Technology**. v.36, p.641-647, 2001.

MATTHÄUS, B.W. Determination of the Oxidative Stability of Vegetable Oils by Rancimat and Conductivity and Chemiluminescence Measurements. **JAOCS**, v.73, n.8, p.1039-1043, 1996.

MCCORMICK, R. L.; RATCLIFF, M. M.; LAWRENCE, R. Several factors affecting the stability of biodiesel in standard accelerated tests. **Fuel Processing Technology**, v.88, n.7, p.651-657, 2007.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.10, n.3, p.248-268, 2006.

MONTGOMERY, D.C. Experimental design for product and process design and development. **The Statistician**. n.44 (part 2), p.159-177, 1999.

MONYEM, A.; VAN GERPEN, J.H. The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. **Biomass and Bioenergy** **Aberdeem**, v.20, n.4, p.317-325, 2001.

NAKATANI N.; INATANI, R. Two antioxidative diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) and a revised structure for rosmanol. **Agricultural Biological Chemistry**, v.48, n.8, p.2081-2085, 1984.

POKORNY, 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.

PORTER, N.A. Mechanisms for the Autoxidation of Polyunsaturated Lipids. **Accounts of Chemical Research**, v.19, p.262-268, 1986.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

RAMOS, L.P; KUCEK, K.T; DOMINGOS, A.K; WILHELM, H.M. BIODIESEL. Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.31, p.28-37, jul-dez, 2003.

SANTOS, J.R.J. **Biodiesel de babaçu: avaliação térmica, oxidativa e misturas binárias**. 2008. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic Antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.32, n.1, p.67-104, 1992.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. 8. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

STATISTICA for Windows Software. v.9.0, Tulsa, OK, USA, 2009.

STEINBERG, M.D., HUNTER, W.G. Experimental design: review and comment. **Technometrics**, v.26, n.2, p.71-130, 1984.

THOMPSON, D.R. Designing mixture experiments – a review. **Transactions of the Assae**, v.24, n.4, p.1077-1086, 1981.

XIN, J.; IMAHARA, H.; SAKA, S. Kinetics on the oxidation of biodiesel stabilized with antioxidants. **Fuel**, v.88, n.2, p.282-286, 2009.