



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA CAROLINA GOMES MANTOVANI

**ESTUDO DO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DE
BODIESEL COM O USO DA RESSONÂNCIA
PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE), RESSONÂNCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E TÉCNICAS
COMPLEMENTARES**

Londrina
2022

ANA CAROLINA GOMES MANTOVANI

**ESTUDO DO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DE
BIODIESEL COM O USO DA RESSONÂNCIA
PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE), RESSONÂNCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E TÉCNICAS
COMPLEMENTARES**

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutora em Física.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Di Mauro
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Letícia Thaís Chendynski

Londrina
2022

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

Mantovani, Ana Carolina Gomes .

ESTUDO DO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DE BIODIESEL COM O USO DA RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE), RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E TÉCNICAS COMPLEMENTARES / Ana Carolina Gomes Mantovani. - Londrina, 2022.
109 f. : il.

Orientador: Eduardo Di Mauro.

Coorientador: Letícia Thaís Chendynski.

Tese (Doutorado em Física) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Física, 2022.

Inclui bibliografia.

1. biodiesel - Tese. 2. RMN - Tese. 3. RPE - Tese. 4. degradação - Tese. I. Di Mauro, Eduardo . II. Chendynski, Letícia Thaís . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Física. IV. Título.

CDU 53

ANA CAROLINA GOMES MANTOVANI

**ESTUDO DO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DE
BIODIESEL COM O USO DA RESSONÂNCIA
PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE), RESSONÂNCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) E TÉCNICAS
COMPLEMENTARES**

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutora em Física.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Alexandre Urbano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dra. Karina Benassi Angilelli
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Edson Laureto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Vinicius Tadeu Santana
Universidade de Tecnologia de Brno

Londrina, 18 de março de 2022.

Dedico este trabalho aos meus pais Angelo e Madalena, pelo apoio, carinho, incentivo em todas as decisões e caminhos que segui até chegar aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me guiar nas minhas escolhas e decisões, permitindo a conquista desse projeto.

Agradeço ao meu orientador Eduardo Di Mauro pela orientação do projeto.

Agradeço ao professor Dionisio Borsato por ceder o uso do Laboratório de Combustíveis.

A Letícia por ser minha co-orientadora, me ajudar na realização, elaboração e estruturação de todos os projetos, sempre disponível para qualquer necessidade que tive, tornando-se uma amiga imprescindível.

Ao Diego Galvan que me ajudou na realização dos experimentos de RMN, me ensinando e auxiliando durante a pesquisa.

Ao Vinícius Santana pela parceria nos projetos de RPE, colaborando com as simulações dos espectros.

A Universidade Estadual de Londrina.

A CAPES pelo apoio financeiro da bolsa de estudos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram durante a realização desse trabalho, minha família, meu marido, meus amigos. O meu muito obrigada por sempre me apoiarem e me darem suporte quando necessário.

*“Os dias prósperos não vêm por acaso;
nascem de muita fadiga e persistência”*

Henry Ford

MANTOVANI, Ana Carolina Gomes. **Estudo do processo de degradação de biodiesel com o uso da ressonância paramagnética eletrônica (RPE), ressonância magnética nuclear (RMN) e técnicas complementares**. 2022. 106 f. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

O biodiesel é produzido a partir de fontes renováveis, podendo ser obtido a partir de óleos vegetais, gorduras animais e graxas residuais. Esse biocombustível é formado por ésteres de ácidos graxos facilmente degradados através do contato com oxigênio, variações de temperatura, contato com metais ou contaminantes. Assim, o processo de degradação oxidativa ocasionado pela reação radicalar irreversível é uma das grandes preocupações sobre esse biocombustível. Na primeira parte do trabalho investigou-se o processo oxidativo do biodiesel a partir da Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), juntamente com a técnica de aprisionamento de spin (*spin trapping*), usando a armadilha de spin *PBN*, acompanhando a formação de radicais livres em amostras de biodiesel e diferentes matérias-primas (soja, milho e canola), com antioxidantes sintéticos (TBHQ, BHT e BHA) e extratos naturais (alecrim, orégano e manjeriço). Através dos espectros obtidos por RPE percebeu-se a existência de um antioxidante adequado para cada biodiesel obtido por causa das diferentes matérias-primas, uma vez que o extrato de orégano mostrou melhor desempenho nas amostras de biodiesel de canola e soja, enquanto o extrato de alecrim apresentou maior eficiência no biodiesel de milho. O radical $\cdot\text{OH}$ foi caracterizado a partir das simulações computacionais dos espectros de RPE. Assim, a técnica de RPE, juntamente com a técnica de *spin trapping*, mostrou-se eficiente na avaliação da atuação de moléculas com propriedades antioxidantes no processo degradativo do biodiesel. Na segunda parte do trabalho foi investigado o processo de degradação do biodiesel comercial, a partir da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de prótons (^1H RMN), observando os sinais dos hidrogênios olefínicos, alílicos e bisalílicos das ligações químicas. As amostras foram analisadas na presença dos íons metálicos Fe^{3+} e Cu^{2+} e com extrato de alecrim. Observou-se que os metais catalisaram a reação de oxidação, enquanto o extrato de alecrim retardou o processo degradativo. As análises de RMN mostraram quedas nas intensidades dos sinais dos hidrogênios olefínicos, alílicos e bisalílicos e, foi possível realizar a identificação dos produtos de oxidação (aldeídos). A técnica de RMN, mostrou-se capaz de fornecer informações relevantes quanto ao processo degradativo do biodiesel a partir da detecção da formação de co-produtos da reação e das mudanças nas intensidades dos sinais dos hidrogênios alílicos, olefínicos e bisalílicos. Na terceira parte do trabalho foi investigada a termo-oxidação do biodiesel usando a ^1H RMN. Dois conjuntos de biodiesel foram analisados, um grupo foi degradado no equipamento Rancimat a 110 °C por 8 horas, e o segundo foi degradado em estufa durante 17 dias a 50 °C. A partir dos espectros foram observadas as variações das intensidades dos hidrogênios olefínicos, alílicos e bisalílicos, obteve-se as proporções dos grupos acil oleico, linoleico, linolênico e saturado, além de observar e caracterizar alguns produtos de oxidação. O biodiesel aquecido a 110 °C mostrou maior grau de oxidação. As amostras apresentaram aumento nas proporções de saturações e produtos como hidroperóxidos e aldeídos foram detectados. A RMN mostrou-se uma boa técnica alternativa para analisar a degradação do biodiesel.

Palavras-chave: biodiesel; oxidação; RPE; RMN; PBN.

MANTOVANI, Ana Carolina Gomes. **Study of the biodiesel degradation process using electronic paramagnetic resonance (EPR), nuclear magnetic resonance (NMR) and complementary techniques**. 2022. 106 p. Thesis (Physics Graduation Program) – State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Biodiesel is a renewable fuel. It can be obtained from vegetable oils, animal fats and residual oil. This biofuel is formed by fatty acids esters, easily degraded through contact with oxygen, temperature variations, contact with metals or contaminants. Thus, the process of oxidative degradation caused by the irreversible radical reaction is one of the major concerns about this biofuel. In the first part of the work, the oxidative process of biodiesel was investigated using Electronic Paramagnetic Resonance (EPR), together with the spin trapping technique, using the PBN spin trap, following the formation of free radicals in biodiesel samples from different raw materials (soy, corn and canola), with synthetic antioxidants (TBHQ, BHT and BHA) and natural extracts (rosemary, oregano and basil). Through the spectra obtained by EPR, it was noticed the existence of a suitable antioxidant for each biodiesel obtained from the different raw materials, since the oregano extract showed better performance in the canola and soybean biodiesel samples, while the extract of rosemary showed greater efficiency in the corn biodiesel. The $\cdot\text{OH}$ radical was characterized in the samples from computer simulations of the EPR spectra. Thus, the EPR proved to be efficient in the performance evaluation of the molecules with antioxidant properties in the biodiesel degradation. In the second part of the work, the degradation process of commercial biodiesel was investigated, using Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) spectroscopy, observing the chemical bonds signals of the olefinic, allylic and bisalilic hydrogens. The samples were analyzed in the presence of Fe^{3+} and Cu^{2+} metallic ions and with rosemary extract. It was observed that the metals catalyzed the oxidation reaction, while the rosemary extract delayed the degradative process. The NMR analyses showed decreases in the signal intensities of olefinic, allylic and bisalilic hydrogens, and it was possible to identify oxidation products as aldehydes. The NMR technique was able to provide relevant information regarding the degradative process of biodiesel from the detection of co-products formation and changes in the signals' intensities of the allylic, olefinic and bisalilic hydrogens. In the third part of the work, the thermo-oxidation of biodiesel was investigated using ^1H NMR. Two sets of biodiesels were analyzed, one group was degraded in the Rancimat equipment at 110 °C for 8 hours, and the second was degraded in an oven for 17 days at 50 °C. From the spectra, variations in the intensities of olefinic, allylic and bisalilic hydrogens were observed, the proportions of oleic, linoleic, linolenic and saturated acyl groups were obtained, in addition to observing and characterizing some oxidation products. The biodiesel heated at 110 °C showed a higher degree of oxidation. The samples showed an increase in the proportions of saturations and products such as hydroperoxides and aldehydes were detected. NMR spectroscopy proved to be a good alternative technique to analyze the biodiesel degradation.

Key words: biodiesel; oxidation; EPR; NMR; PBN.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	–	Reação global de transesterificação de triacilglicerídeos.....	19
Figura 2	–	Representação esquemática da separação dos estados de spin eletrônico submetidos a um campo magnético	26
Figura 3	–	Desdobramento hiperfino da interação entre um radical livre e um átomo de hidrogênio.....	28
Figura 4	–	Estrutura química dos compostos nitrosos (a) e nitronas (b)	29
Figura 5	–	Estrutura química de moléculas que atuam como armadilhas de spin.....	31
Figura 6	–	Reação de aprisionamento do radical livre usando a armadilha de spin PBN	32
Figura 7	–	Estrutura das cadeias de ácidos graxos do triacilglicerol onde (a) representa os hidrogênios olefínicos, (b) os hidrogênios gliceril metinos, (c) os hidrogênios gliceril metílicos, (d) os hidrogênios bisalílicos, (e) os hidrogênios metílicos na posição α em relação à carbonila, (f) os hidrogênios alílicos, (g) os hidrogênios metílicos na posição β em relação à carbonila e (h) os outros hidrogênios metílicos.....	34
Figura 8	–	Número de espécies aprisionadas detectadas por grama de biodiesel no processo de degradação das amostras de biodiesel de canola: (a) CC, (b) CTBHQ, (c) CBHT, (d) CBHA, (e) CA, (f) CM, (g) CO.....	45
Figura 9	–	Número de espécies aprisionadas detectadas por grama de biodiesel no processo de degradação das amostras de biodiesel de milho: (a) MC, (b) MTBHQ, (c) MBHT, (d) MBHA, (e) MO, (f) MM, (g) MA	46
Figura 10	–	Número de espécies aprisionadas detectadas por grama de biodiesel no processo de degradação das amostras de biodiesel de soja: (a) SC, (b) STBHQ, (c) SBHT, (d) SBHA, (e) SA, (f) SM, (g) SO.....	47
Figura 11	–	Espectros experimentais e simulados das amostras controle dos biodiesel de (a) canola, (b) milho e (c) soja.....	53
Figura 12	–	Reação de decomposição do hidroperóxido	55

Figura 13 – Espectro de 1H RMN do biodiesel (400 MHz, CDCL ₃ , temperatura ambiente) dos deslocamentos químicos dos hidrogênios olefínicos (a), hidrogênios bisalílicos (b) e hidrogênios alílicos (c). As regiões apresentadas são as que foram integradas	66
Figura 14 – Sinais iniciais (i) e finais (f) dos hidrogênios olefínicos (a), hidrogênios bisalílicos (b) e hidrogênios alílicos (c) detectados por 1H RMN (400 MHz, CDCL ₃ , temperatura ambiente) para as amostras B.C, B.E, B.Cu, B.Cu.E, B.Fe e B.Fe.E.	67
Figura 15 – Mudança nas intensidades dos sinais dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos para as amostras B.C, B.E, B.Cu, B.Cu.E, B.Fe e B.Fe.E: (a) gráfico em escala normal e (b) Escala ampliada em 3,5 h	68
Figura 16 – Sinais de 1H RMN (400 MHz, CDCL ₃ , temperatura ambiente) dos produtos de oxidação formados nas amostras de biodiesel com íons metálicos e extrato natural de alecrim durante o processo de degradação.....	71
Figura 17 – Sinal dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos das amostras controle e das duas amostras com maior grau de degradação dos dois conjuntos de experimentos	79
Figura 18 – Espectro de 1H RMN da amostra B100 (110°C-8h) e os produtos formados durante sua termo-oxidação.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos biodiesel de óleo de soja, biodiesel de óleo de milho e biodiesel de óleo de canola (%).....	20
Tabela 2 – Nomenclatura usada nas 21 amostras preparadas.....	40
Tabela 3 – Número máximo de radicais adutos detectados nas amostras de biodiesel de canola.....	48
Tabela 4 – Número máximo de radicais adutos detectados nas amostras de biodiesel de milho	48
Tabela 5 – Número máximo de radicais adutos detectados nas amostras de biodiesel de soja	48
Tabela 6 – Valores das constantes de acoplamento hiperfinas, fator g e largura de linha das espécies radicalares simuladas para todas as amostras de biodiesel.....	54
Tabela 7 – Tempos de correlação rotacional iniciais e finais (τ_c) para as amostras de biodiesel de canola.....	56
Tabela 8 – Tempos de correlação rotacional iniciais e finais (τ_c) para as amostras de biodiesel de milho.....	56
Tabela 9 – Tempos de correlação rotacional iniciais e finais (τ_c) para as amostras de biodiesel de soja.....	57
Tabela 10 – Valores dos períodos de indução (PI) e das constantes de velocidade (k) das amostras analisadas	65
Tabela 11 – Intensidade dos sinais dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos das amostras controle e das duas amostras com maior grau de degradação dos dois conjuntos de experimentos	78
Tabela 12 – Porcentagens das proporções dos grupos acil Linolênico (Ln), Linoleico (L), Oleico (O) e Saturado (S), períodos de indução (PI) e constantes de velocidade (k) das amostras degradadas a 50 °C	80
Tabela 13 – Porcentagens das proporções dos grupos acil Linolênico (Ln), Linoleico (L), Oleico (O) e Saturado (S), das amostras degradadas a 100 °C no equipamento Rancimat.....	81
Tabela 14 – Deslocamentos químicos dos produtos de oxidação presentes na amostra B100 (110°C-8h)	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
¹ H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de prótons
Cu ²⁺	Íons de Cobre 2+
Fe ³⁺	Íons de Ferro 3+
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
B2	2 % de Biodiesel Misturado ao Diesel
B7	7 % de Biodiesel Misturado ao Diesel
B8	8 % de Biodiesel Misturado ao Diesel
B11	11 % de Biodiesel Misturado ao Diesel
B12	12 % de Biodiesel Misturado ao Diesel
COVID-19	Coronavírus
UV	Radiação Ultravioleta
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
BHT	Butil Hidroxitolueno
BHA	Butil Hidroxianisol
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético
TBHQ	Terc-Butil-Hidroquinona
PG	Propil Galato
PY	Piragalol
PI	Período de Indução
k	Constantes de Velocidade da Reação
PBN	N-t-butil- α -fenilnitrona (N-T-Butyl- α -PhenylNitrona)
DMPO	5,5-dimetil- N-oxi- 1-pirrolina (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)
PBN-SO ₃ Na	N-tercbutil- α -(2-sulfofenil) Nitrona de sódio (N-Tertbutyl- α -(2-Sulfophenyl)Nitrona Sodium Salt)
DBN BS	3,5-dibromo-4-nitrosobenzenosulfonato (3,5-Dibromo-4-Nitrosobenzenesulfonate)
4-POBN	α -piridil-1-oxido-N-terc-butilnitrona (α -Pyridyl-1-Oxide-N-Tert-Butyl Nitrona)
MNP	2-metil-2-nitrosopropano (2-Methyl-2-Nitrosopropane)
NB	nitrosobenzeno (Nitrosobenzene)

PBN-NO2	N-terc-butil- α -(4-nitrofenil)nitrona (N-Tert-Butyl- α -(4-Nitrophenyl)Nitrone)
TMS	Tetrametilsilano
B100	100 % de Biodiesel
g	Gramas
mL	Mililitro
%	Porcentagem
° C	Graus Celsius
μ m	Micrômetro
h	Horas
min	Minutos
FPR	Fator de Proteção Relativa
mg	Miligramas
mm	Milímetro
GHz	Giga Hertz
G	Gauss
kHz	Kilo Hertz
mW	Mega Watts
τ c	Tempo de Correlação Rotacional
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
A (N)	Constante de Desdobramento Hiperfina em Relação ao Nitrogênio
A (H)	Constante de Desdobramento Hiperfina em Relação ao Hidrogênio
g	Fator de proporcionalidade
μ m	Microlitro
CDCI3	Clorofórmio Deuterado
s	Segundo
°	Graus
ppm	Partes por Milhão
kJ	Kilo Joule

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	16
1.1 BIODIESEL	17
1.2 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES NATURAIS E SINTÉTICAS.....	22
1.3 COMPOSTOS METÁLICOS.....	24
1.4 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA	25
1.4.1 Técnica de Spin Trapping.....	28
1.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	33
CAPÍTULO 2	36
2.1 OBJETIVOS	38
2.1.1 Objetivo Geral.....	38
2.1.2 Objetivos Específicos	38
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	39
2.2.1 Produção das Amostras de Biodiesel.....	39
2.2.2 Preparação dos Extratos Alcoólicos de Alecrim (Rosmarinus Officinalis), Orégano (Origanum Vulgare) e Manjeriço (Ocimum Basilicum).....	39
2.2.3 Preparação das Amostras	40
2.2.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	41
2.2.4.1 Incubação com a armadilha de spin	41
2.2.4.2 Análises de RPE a temperatura ambiente.....	41
2.2.4.3 Quantificação das espécies paramagnéticas do padrão marcador de campo de óxido de magnésio dopado com manganês (MgO:Mn ²⁺)	41
2.2.4.4 Quantificação das espécies paramagnéticas aprisionadas	42
2.2.4.5 Simulação computacional dos espectros	43
2.2.4.6 Cálculo do tempo de correlação rotacional (τ_c).....	43
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
2.4 CONCLUSÕES	57
CAPÍTULO 3	59
3.1 OBJETIVOS	61

3.1.1	Objetivo Geral.....	61
3.1.2	Objetivos Específicos	61
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	62
3.2.1	Amostras	62
3.2.2	Preparação do Extrato Alcoólico de Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	62
3.2.3	Preparação das Amostras	62
3.2.4	Determinação do Período de Indução e Constantes de Velocidade das Reações e Degradação das Amostras	63
3.2.5	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (1H RMN)	64
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.4	CONCLUSÕES	72
	CAPÍTULO 4	73
4.1	OBJETIVOS	75
4.1.1	Objetivo Geral.....	75
4.1.2	Objetivos Específicos	75
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	76
4.2.1	Amostras	76
4.2.2	Termo-Oxidação das Amostras	76
4.2.3	Determinação dos Períodos de Indução (PI) e Constantes de Velocidade (k).....	76
4.2.4	Análise de Ressonância Magnética Nuclear	77
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.4	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	86
	ANEXOS	95
	ANEXO A - Artigo publicado na revista Fuel referente ao Capítulo 2	96
	ANEXO B - Artigo publicado na revista Journal of the Brazilian Chemical Society referente ao Capítulo 3	97

ANEXO C - Depósito de patente	98
ANEXO D - Artigo publicado na revista Fuel referente ao Capítulo 4	102
ANEXO E - Relatório de Ensaio do Biodiesel Comercial Usado	103
ANEXO F - Patrimônio Genético	104

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente trabalho será dividido em capítulos, abordando o referencial bibliográfico sobre o biodiesel e as técnicas espectroscópicas aplicadas ao estudo da degradação oxidativa desse biocombustível, tais como a Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), assim como os resultados encontrados em diferentes tipos de experimentos.

No capítulo 1 será apresentada uma revisão bibliográfica sobre o biodiesel, as moléculas com propriedades antioxidantes e contaminantes metálicos, o processo de degradação do biocombustível e as técnicas espectroscópicas aplicadas (RPE e RMN) em sua análise. Essas técnicas são consideradas não convencionais, ou seja, não regulamentadas pelas normativas internacionais que regem as especificações do biodiesel mundialmente.

O capítulo 2 apresenta o estudo da degradação de biodiesel proveniente de diferentes matérias-primas, sob a ação de extratos alcóolicos com propriedades antioxidantes como alecrim, manjerição e orégano, durante o processo de estocagem a temperatura ambiente, aplicando análises de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) usando a técnica de *spin trapping*. Os dados do capítulo 2 foram publicados em um artigo na revista *Fuel* e suas informações são mostradas no anexo A.

No capítulo 3 é mostrada a avaliação do processo de oxidação de biodiesel comercial, com a ação de contaminantes metálicos como cobre (Cu^{2+}) e ferro (Fe^{3+}) e extrato de alecrim, aplicando a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os dados do capítulo 3 foram publicados em um artigo na revista *Journal of the Brazilian Chemical Society (JBACS)* e suas informações são mostradas no anexo 2. Além disso, o pedido de uma patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) foi feito a respeito do processo de quantificação da degradação do biodiesel com íons de cobre usando a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). As informações são

mostradas no anexo C.

Por fim, no capítulo 4 é mostrada a avaliação do processo de termo-oxidação de biodiesel comercial aplicando a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e investigando a partir da técnica a proporção de grupos acil presente nas amostras. Os dados do capítulo 4 foram publicados em um artigo na revista *Fuel* e suas informações são mostradas no anexo D.

1.1 BIODIESEL

Atualmente, a comunidade internacional tem voltado sua atenção aos diversos problemas ambientais, tais como a presença da chuva ácida, surgimento do aquecimento global, intensificação do efeito estufa, etc. Dentre os principais fatores responsáveis por tais problemas encontra-se o uso excessivo de produtos derivados do petróleo. Em 1992, houve a implementação do protocolo de Quioto, com o objetivo de mobilizar, em modo conjunto, a diminuição nas emissões de gases considerados como causadores do efeito estufa (BREIDENICH et al., 1998). Desde então surgiu uma preocupação mundial sobre uso e desenvolvimento de fontes energéticas alternativas.

O Brasil não é considerado um país com grandes níveis de emissões de gases poluentes, quando comparado a Rússia, Estados Unidos e China. Entretanto, o país vem ao longo dos anos desenvolvendo medidas a fim de diminuir a emissão de tais poluentes a partir da geração de energia através de modos alternativos, usando biomassa, resíduos urbanos, óleos vegetais, óleos de reciclagem, entre outros (RAMOS et al., 2003).

Particularmente, o Brasil dirigiu suas pesquisas e investimentos na produção de biocombustíveis, dentre eles o biodiesel, biogás e bioetanol. Uma das grandes vantagens acerca do biodiesel é que esse biocombustível é considerado uma alternativa para a substituição, total ou parcial, do diesel proveniente do petróleo (KIMURA et al., 2019; RAMOS et al., 2003). No ano de 2004, foi lançado no Brasil o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), fomentado pelo Governo Federal. O programa tem como principal objetivo incentivar a produção e o uso do biodiesel, considerando um desenvolvimento econômico sustentável em toda sua cadeia produtiva, desde o produtor até a indústria e comercialização (BRASIL, 2022).

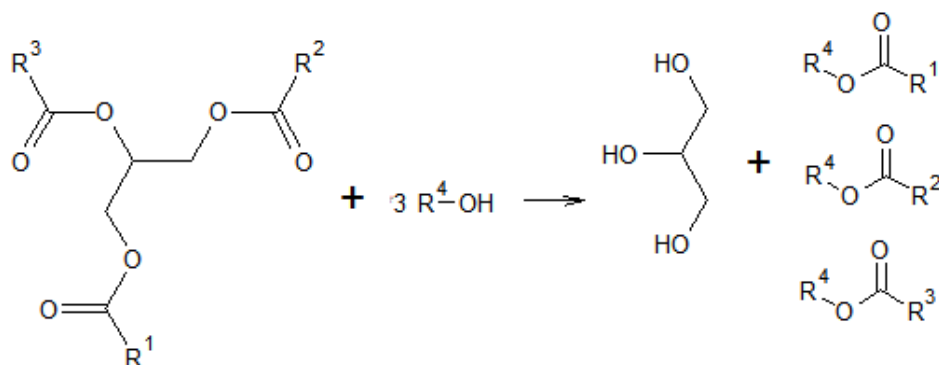
No ano de 2005, a Lei 11.097 (BRASIL, 2005) incluiu o biodiesel na matriz energética brasileira, realizando projeções futuras de adição de biodiesel ao diesel comercializado no país. Entre os anos de 2005 e 2007 a adição era autorizada e a partir de 2008 tornou-se obrigatória, com a adição de 2 % de biodiesel ao diesel (B2). Com o decorrer dos anos, o percentual de mistura obrigatória do biodiesel foi alterado. Em 2014 era de 7 % (B7), atingindo os 8 % (B8) em 2017, 10 % em março de 2018 (B10), 11 % (B11) em de março de 2019 e em março de 2020 atingiu os 12 % (B12). Devido aos problemas gerados pela pandemia do COVID-19 o governo reduziu temporariamente o percentual para 10 % (BRASIL, 2022). Estima-se que cerca de 80 % do biodiesel brasileiro é obtido a partir do óleo de soja, uma vez que o país apresenta uma cadeia produtiva bem estabelecida dessa oleaginosa (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005).

Muitas vezes a produção do biodiesel pode apresentar-se como não favorável, principalmente pelo alto custo de fabricação em determinadas regiões, quando comparado ao diesel. Todavia, a produção do biodiesel proporciona melhorias em questões socioculturais, gerando empregos em regiões carentes, atraindo mão de obra especializada, e se tornando um apoio à agricultura em geral, tanto para os pequenos quanto para os grandes produtores. Além disso, há vantagens quanto aos aspectos ambientais, pois, com seu uso ocorre a diminuição da emissão de compostos de enxofre, principal responsável pelo fenômeno da chuva ácida (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009; HASSAN; KALAM, 2013; RAMOS et al., 2003).

O biodiesel constitui-se, em sua maioria, por ésteres metílicos, podendo ser produzido usando diferentes matérias-primas. É principalmente obtido através da reação de transesterificação de óleos e gorduras (SALUJA; KUMAR; SHAM, 2016; YAAKOB et al., 2014). Na Figura 1 é apresentada a reação global de transesterificação de triacilglicerídeos.

Na literatura encontram-se diversas opções de matérias-primas tais como: óleo de soja, óleo de girassol, óleo de milho, óleo de algodão, sebo bovino, gordura de aves, óleos de reciclagem, entre outros (BUSSLER et al., 2019; CHENDYNSKI et al., 2016; KNOTHE, 2010; SOUZA et al., 2014).

Figura 1– Reação global de transesterificação de triacilglicerídeos



Fonte: a própria autora (2022).

As diferentes matérias primas de produção do biodiesel geram diferenças em suas propriedades. Essas diferenças podem ser tanto nas propriedades físicas quanto químicas, interferindo por exemplo na composição de ácidos graxos saturados e insaturados e, conseqüentemente, na estabilidade oxidativa, assim como diferenças no ponto de fulgor e no ponto de entupimento de filtro a frio (CREMONEZ et al., 2015; SALUJA; KUMAR; SHAM, 2016).

Algumas propriedades das matérias-primas são consideradas indesejadas. É o caso das insaturações presentes nas cadeias carbônicas dos óleos vegetais, que são as principais responsáveis pela maior susceptibilidade de degradação, ocasionando uma menor estabilidade oxidativa do biodiesel produzido. Esse fato ocorre devido à maior disponibilização de sítios reativos com a molécula de oxigênio, favorecendo processos oxidativos (CHENDYNSKI et al., 2020; MANTOVANI et al., 2018; SORATE; BHALE, 2015). Existem vários tipos de ácidos graxos que podem compor o biodiesel, tais como: láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolênico, entre outros (YAAKOB et al., 2014). Na Tabela 1 são mostrados os diferentes tipos de ésteres que compõem as amostras de biodiesel obtidas a partir dos óleos de soja, milho e canola.

Tabela 1 – Composição dos biodiesel de óleo de soja, biodiesel de óleo de milho e biodiesel de óleo de canola (%)

Ácido Graxos		Biodiesel de óleo de soja	Biodiesel de óleo de milho	Biodiesel de óleo de Canola
Palmítico	C16:0	10,7	12,6	4,9
Esteárico	C18:0	3,3	2,3	2,0
Oleico	C18:1	23,5	33,4	60,9
Linoleico	C18:2	53,6	48,6	22,4
Linolênico	C18:3	6,3	1,3	5,7

Fonte: adaptado de (CARVALHO et al., 2012).

Diferentes fatores influenciam na degradação do biodiesel, principalmente durante o armazenamento, dentre eles a oxidação ocasionada pelo oxigênio do ar, incidência de radiação UV, influência da temperatura, contaminação microbiológica, contaminação com compostos metálicos, presença de água, dentre outros. As contaminações metálicas podem ser originadas nos tanques usados na produção, armazenamento e transporte do biocombustível (ANGILELLI et al., 2017; COMIN et al., 2017; KUMAR, 2017).

Existem diversas técnicas mencionadas na literatura com o objetivo de determinar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. Dentre elas destacam-se as técnicas de avaliação de índice de iodo e peróxido, Rancimat, PetroOxy, calorimetria gasosa, cromatografia líquida e gasosa, espectrometria por fluorescência, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), entre outras (KUMAR, 2017; SALUJA; KUMAR; SHAM, 2016; YAAKOB et al., 2014).

Grande parte das análises dos fenômenos de degradação são realizadas por testes acelerados, com o uso de aquecimento e/ou oxigenação das amostras, uma vez que a degradação a temperatura ambiente é lenta e não seria adequada ao controle de qualidade industrial (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

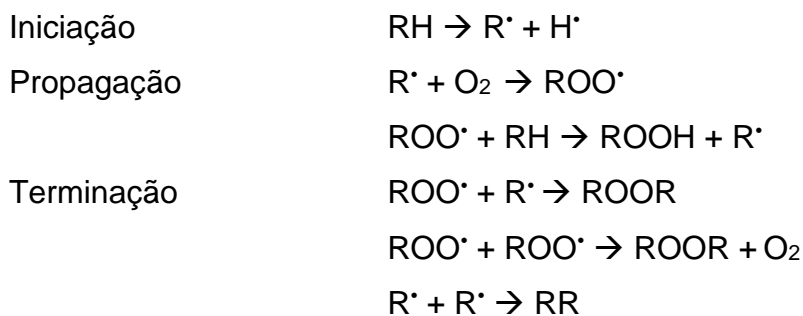
A análise da estabilidade oxidativa usando o equipamento Rancimat é um dos testes acelerados que se destaca no meio, principalmente por ser o método regulamentado pelas normas internacionais de avaliação de qualidade do produto como a EN 14112 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2016). Nesse método, o valor de estabilidade oxidativa é obtido através do aquecimento das amostras a temperaturas fixas e, então, a oxidação é induzida por um fluxo contínuo de ar. Os produtos voláteis produzidos na degradação são medidos através do aumento da condutividade num recipiente com água deionizada. Assim, a estabilidade

oxidativa das amostras, ou período de indução, é determinada pelo ponto de inflexão da curva entre a condutividade e tempo fornecidos pelo software do equipamento (CREMONEZ et al., 2016; DWIVEDI; SHARMA, 2014; PULLEN; SAEED, 2012). Uma das principais desvantagens do uso da técnica de aquecimento acelerado empregando o equipamento Rancimat é o longo tempo de análise necessário, podendo ultrapassar 12 h (BRASIL, 2019). O tempo está diretamente relacionado à qualidade do produto avaliado, sendo obtidos baixos períodos de indução para amostras degradadas ou com alta susceptibilidade à oxidação.

A respeito da reação de oxidação dos componentes presentes no biodiesel que pode ocorrer por processos de foto-oxidação, termo-oxidação ou auto-oxidação. No processo foto-oxidativo há ação da radiação e oxigênio, enquanto a termo-oxidação é ocasionada pela ação de temperatura e oxigênio e o processo de auto-oxidação é catalisada pela presença de oxigênio (JAIN; SHARMA, 2012a; YAAKOB et al., 2014).

A reação de auto-oxidação é utilizada para explicar as etapas do processo degradativo. A reação radicalar é irreversível com três principais etapas: iniciação, propagação e terminação (Reação 1).

Reação 1 – Etapas da reação de oxidação do biodiesel



Onde RH representa a molécula de éster insaturado, R^{\cdot} é o radical livre formado, ROO^{\cdot} é o radical peróxido, ROOH é o hidroperóxido e RR o produto final.

Na primeira fase da reação radicalar, ocasionada pela influência da temperatura, luz ou oxigênio, ocorre a formação de radicais livres do éster. Posteriormente, há o surgimento dos produtos primários de oxidação como os hidroperóxidos e peróxidos, exercendo a função de propagadores da reação. Na fase de terminação, fase final, dois radicais livres se combinam, formando produtos

estáveis. Também existe a presença de reações secundárias como o rearranjo e quebra de peróxidos, formando vários produtos secundários de oxidação (KUMAR, 2017; YAAKOB et al., 2014).

Diversos produtos podem ser formados a partir da propagação dos radicais livres. Os hidroperóxidos formados na reação podem ser decompostos resultando na formação de uma variedade de produtos como álcoois cetona, ácidos orgânicos, aldeídos, etc (JAIN; SHARMA, 2010, 2012a). Os produtos gerados na degradação também podem se polimerizar, formando gomas e causando danos aos motores de veículos automotivos (JAIN; SHARMA, 2010).

Moléculas com propriedades antioxidantes são adicionadas com a finalidade de minimizar essa degradação e aumentar o período de armazenamento desse biocombustível.

1.2 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES NATURAIS E SINTÉTICAS

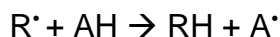
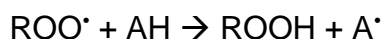
O processo degradativo gera radicais livres que propagam a reação de forma irreversível. Ou seja, uma vez iniciada essa reação não há a possibilidade de interrompê-la, pois os radicais livres são muito reativos. Desse modo, o uso de antioxidantes, sintéticos ou naturais, faz-se necessário com o objetivo de inibir ou retardar o processo de degradação. Atualmente, o emprego de antioxidantes é o método que apresenta maior eficácia quanto ao aumento do período de indução do biodiesel (YAAKOB et al., 2014).

Os antioxidantes podem ser classificados em algumas categorias, como primários, agentes quelantes, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos e antioxidantes mistos (BAILEY, 1996).

Os antioxidantes primários, também conhecidos como antioxidantes fenólicos, removem ou deixam o radical livre inativo nos estágios de iniciação ou propagação da reação radicalar, a partir da doação de um elétron ou átomo de hidrogênio nas moléculas (RAMALHO; JORGE, 2006).

O mecanismo de ação dos antioxidantes proposto por Frankel é mostrado na reação 2 (FRANKEL, 2005).

Reação 2 – Mecanismo de ação dos antioxidantes



Onde ROO^{\bullet} e R^{\bullet} representam os radicais livres, RH a molécula do éster restaurada, AH o antioxidante juntamente com um átomo ativo de hidrogênio e A^{\bullet} representa um radical inerte, ou seja, não reativo (FRANKEL, 2005; RAMALHO; JORGE, 2006).

O átomo de hidrogênio é abstraído do antioxidante para a formação dos radicais livres, formando espécies inativas e um radical inerte A^{\bullet} originado do antioxidante, geralmente estabilizado por ressonância. Por sua vez, é importante a escolha da molécula para que esse radical seja inerte, não possuindo capacidade de iniciar ou até mesmo propagar as reações de oxidação (RAMALHO; JORGE, 2006).

Antioxidantes tais como butil-hidroxitolueno (BHT), butil-hidroxianisol (BHA) são conhecidos como antioxidantes fenólicos. Eles atuam na inibição da reação de oxidação (RAMALHO; JORGE, 2006). Os agentes quelantes, como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), atuam na formação de complexos estáveis com diversos íons metálicos, reduzindo assim a disponibilidade desses íons na reação de oxidação (SINDHI et al., 2013).

Os sinergistas possuem pouca atividade antioxidante. São usados na combinação com antioxidantes primários podendo aumentar a atividade antioxidante (BORSATO et al., 2014; MAIA et al., 2011; RAMALHO; JORGE, 2006).

O BHA é um antioxidante eficiente no combate à oxidação de ácidos graxos de cadeia carbônica. O BHT possui propriedades similares a ele. O terc-butil-hidroquinona (TBHQ) apresenta o melhor desempenho em óleos vegetais quando comparado ao BHA e ao BHT pois possui o dobro de hidroxilas em sua estrutura (RAMALHO; JORGE, 2006).

Além dos antioxidantes sintéticos existem também os antioxidantes naturais. Moléculas com propriedades antioxidantes podem ser obtidas a partir de extratos de plantas ou já estão presentes nas próprias matérias-primas usadas na síntese do biodiesel (CHENDYNSKI et al., 2019; YAAKOB et al., 2014).

Algumas vitaminas como o ácido ascórbico, tocoferóis, vitamina E, atuam como antioxidantes naturais. O tocoferol dos seus hidrogênios fenólicos aos

radicais livres, interrompendo a reação em cadeia. Eles são frequentemente usados para inibir a oxidação de óleos e gorduras (SARIN et al., 2010).

Os antioxidantes naturais atuam como agentes redutores, além aumentarem o tempo de armazenamento, sem odores de compostos oxidados em óleos (SINDHI et al., 2013). Diversos extratos naturais com propriedades antioxidantes com ácidos fenólicos têm sido testados com o objetivo de substituir os antioxidantes sintéticos. Entre os antioxidantes destacam-se o alecrim (BAO et al., 2020; CHENDYNSKI et al., 2020), o orégano (COPPO et al., 2013), o chá verde (LORENZO; MUNEKATA, 2016; POLOVKA, 2006), o chá preto (MAGDALENA SKOTNICKA, JOANNA CHOROSTOWSKA-WYNIMKO, JERZY JANKUN, 2011; POLOVKA, 2006), o hibisco (CID-ORTEGA; GUERRERO-BELTRÁN, 2012; ROMAGNOLI et al., 2020), a amora (CHENDYNSKI et al., 2019; JACQUES; ZAMBIAZI, 2011), entre outros.

A quantidade de compostos fenólicos presente nas plantas pode ser modificada por fatores ambientais como temperatura, umidade, radiação UV e condições agrônômicas como variação genética, nutrientes dentre outros (LLORACH et al., 2008).

1.3 COMPOSTOS METÁLICOS

A presença de contaminantes metálicos também é um dos grandes responsáveis pela degradação do biodiesel. Quando em contato com o biodiesel, alguns metais atuam como catalisadores da reação de oxidação, formando sedimentos insolúveis (YAAKOB et al., 2014).

Os contaminantes metálicos podem ser derivados de diversas fontes, mas no caso do biodiesel, são originados principalmente no processo de transporte e armazenamento. Os tanques de armazenamento e transporte de combustíveis são fabricados a partir de ligas metálicas, que podem ter em sua composição ferro, cobalto, cobre, manganês, entre outros (KUMAR, 2017).

Jain e Sharma (2012b), em estudos com biodiesel, mostraram que o cobre apresenta maior efeito catalítico, enquanto que o alumínio não apresenta nenhuma influência. Além disso, avaliaram o efeito catalítico de outros metais frequentemente usados na produção de tanques de armazenamento, concluindo assim que o cobre possui maior efeito catalítico no biodiesel, seguido de cobalto,

manganês, níquel e ferro.

Alguns metais de transição são os responsáveis pela iniciação da oxidação dos óleos, pois mesmo pequenas concentrações são suficientes para catalisar a reação de oxidação. Além do mais, apenas os metais de transição que transferem um elétron por vez são considerados catalisadores ativos, como por exemplo o cobre, manganês, ferro e cobalto (SHAHIDI, 2005).

Chendynski et al. (2019) estudaram diferentes ligas metálicas, como aço prata, aço carbono, cobre, reportando que a presença de cobre implica em uma influência mais expressiva na degradação do biodiesel, quando comparado com outros íons metálicos.

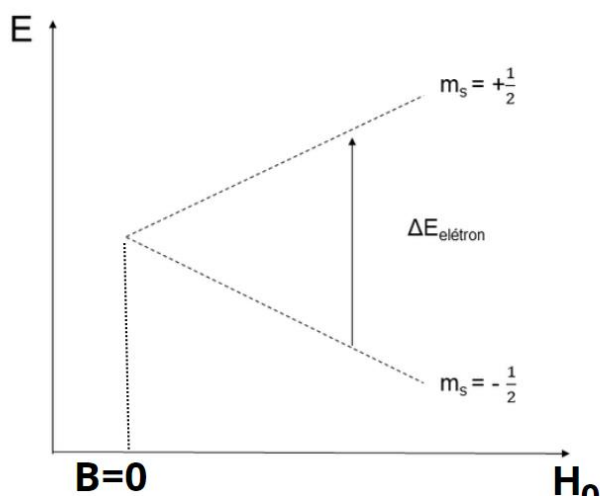
1.4 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é uma técnica espectroscópica importante para o estudo de moléculas e íons que possuem elétrons desemparelhados em sua estrutura, chamados de espécies paramagnéticas (BUNCE, 1987; WEIL; BOLTON, 2007).

Dentre as espécies paramagnéticas frequentemente encontradas estão alguns complexos metálicos, estados excitados tripletos de moléculas diamagnéticas, assim como moléculas do tipo NO, NO₂ que são considerados radicais livres estáveis, assim como os radicais livres •OH e •CH₃ (BUNCE, 1987).

O elétron possui dois estados de spin eletrônicos possíveis $m_s = \pm 1/2$. Ambos estados de spin possuem a mesma energia quando não sofrem a interferência de um campo magnético externo. Porém, a partir da aplicação de um campo magnético no sistema, há a separação dos dois estados como mostrado na Figura 2 a seguir (BUNCE, 1987).

Figura 2 – Representação esquemática da separação dos estados de spin eletrônico submetidos a um campo magnético



Fonte: a própria autora (2022).

A variação de energia ΔE dos dois possíveis níveis de energia dos estados do elétron depende diretamente do campo magnético H_0 , do magneton de Bohr (β) e do fator de proporcionalidade g , mostrados na equação 1:

$$\Delta E = g\beta H_0 \quad (1)$$

Quando há a incidência de radiação em uma determinada amostra, a uma frequência ν , na qual os níveis de energia foram separados pelo do campo magnético, tanto a condição de absorção quanto emissão são estimuladas, nomeada como condição de ressonância que acontece quando $\Delta E = h\nu$. O valor absoluto de ΔE é geralmente pequeno, desse modo, os espectros de RPE são comumente medidos através da primeira derivada da curva de absorção, com o objetivo de reduzir o ruído do sinal medido (BUNCE, 1987; WEIL; BOLTON, 2007).

O fator espectroscópico g é considerado um dos principais fatores para extrair informações sobre as espécies observadas pela RPE. Ele pode até mesmo ser considerado a impressão digital da espécie. Sabe-se que os radicais livres orgânicos com carbono centrado possuem valores de g próximos de 2,0026 (BUNCE, 1987).

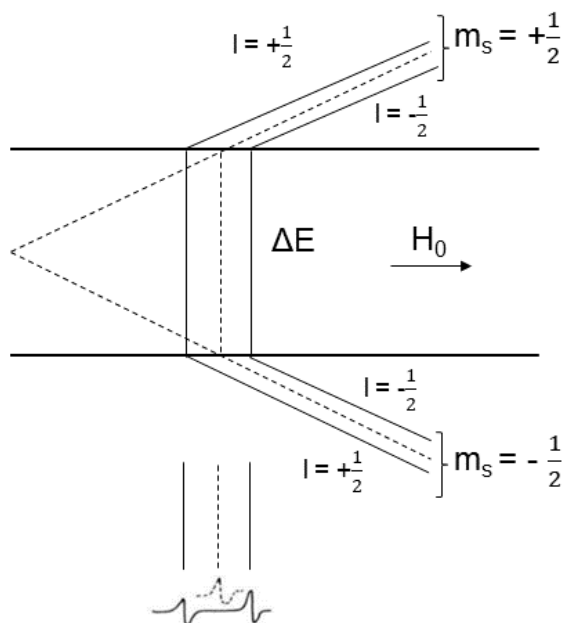
As constantes de desdobramento hiperfinas são parâmetros fundamentais para obter informações do espectro de RPE. As interações hiperfinas

surtem devido a mudanas na fora efetiva do campo magn3tico sentida pelo el3tron livre, resultante das influ4ncias magn3ticas dos n3cleos vizinhos que possuam algum momento nuclear. O n3mero de linhas geradas depende do spin nuclear e do spin eletr3nico, uma vez que essas intera3es resultam no desdobramento dos n3veis de energia associados ao sistema (WEIL; BOLTON, 2007).

Os padr3es do espectro de RPE apresentam uma an3lise do n3mero e tipo de n3cleo magn3tico adjacente ao radical livre. Frequentemente 3 poss3vel obter uma identifica3o n3o amb3gua do radical analisado (BUNCE, 1987). A quantidade de linhas hiperfinas depende dos n3meros de spin eletr3nico (S) e nuclear (I), possuindo valores inteiros ou semi-inteiros. Assim, os n3meros dos n3veis de energia s3o dados por $(2S+1) \times (2I+1)$, respeitando a regra de sele33o $\Delta m_s = \pm 1$ e $\Delta m_l = 0$, onde Δm_s corresponde as poss3veis transi3es, enquanto que Δm_l indica as transi3es poss3veis dos estados de energia dos spins nucleares. A regra de sele33o indica que apenas momentos magn3ticos das amostras na mesma dire33o do campo magn3tico externo - perpendicular ao campo magn3tico criado pelas microondas - s3o detect3veis (WEIL; BOLTON, 2007).

Na Figura 3 3 mostrado o desdobramento oriundo da intera33o hiperfina de um radical livre com um 3tomo de hidrog4nio, sendo que nesse caso a constante possui valor $A(H) = 507$ G. Duas linhas espectrais s3o observadas, pois devido a regra de sele33o, nem todas as transi3es s3o poss3veis (BUNCE, 1987; WEIL; BOLTON, 2007).

Figura 3 – Desdobramento hiperfino da interação entre um radical livre e um átomo de hidrogênio



Fonte: a própria autora (2022).

Os radicais livres orgânicos, em sua maioria, são espécies reativas com baixa concentração em seu estado estacionário, possuindo uma pequena concentração ou tempos de vida muito curtos, tornando difícil sua detecção direta pela RPE, de modo que se faz necessário o uso da técnica de *spin trapping*. (DAVIES, 1987; FUJINO; UKAI, 2013; PINGRET et al., 2012; VELASCO; ANDERSEN; SKIBSTED, 2004)

1.4.1 Técnica de *Spin Trapping*

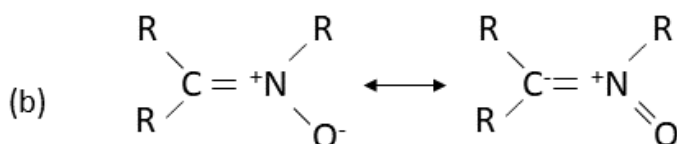
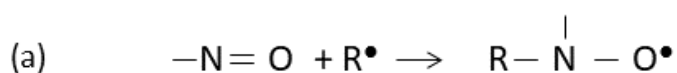
A técnica de *spin trapping* baseia-se na adição de uma espécie diamagnética, chamada de *spin trap* (armadilha de spin), que aprisiona o radical livre presente na amostra, formando um radical aduto ou spin aduto, uma molécula estável e, conseqüentemente, detectável por RPE. Apenas a armadilha de spin não é detectável no equipamento uma vez que não possui elétron desemparelhado. Desse modo, a técnica de *spin trapping* possibilita a detecção indireta do radical livre presente na amostra, uma vez que observamos no espectro o radical/spin aduto

formado (SWARTZ; KHAN; KHRAMTSOV, 2009). A partir do spin aduto detectado é possível obter informações sobre o radical aprisionado e até mesmo, em alguns casos, a caracterização desse radical (DAMIAN; PETRISOR; MICLAUS, 2007; REINKE et al., 1987).

A técnica de *spin trapping* é considerada eficiente na detecção e estudo de radicais livres. Dentre suas vantagens encontram-se: simples uso experimental, fácil preparação das amostras, menor tempo de análise quando comparada a outras técnicas que visam o estudo de radicais livres, além de permitir a detecção indireta dos radicais livres, impossíveis de serem detectados somente por RPE (DAVIES, 1987; REINKE et al., 1987). A técnica tem sido aplicada na detecção de radicais livres em diversos estudos, como em amostras biológicas (BUETTNER; MASON, 1990; YIM; CHOCK; STADTMAN, 1990), óleos e gorduras (OTTAVIANI et al., 2001; PAPADIMITRIOU et al., 2006; VELASCO; ANDERSEN; SKIBSTED, 2005), estudos *in vivo* (BOLLI et al., 1988; REINKE et al., 1987) e, atualmente, aplicada ao estudo do processo degradativo do biodiesel (CHENDYNSKI et al., 2019; MANTOVANI et al., 2018).

Existem diversos tipos de armadilha de spin, dentre eles se destacam os do tipo nitrona e nitrosos (Figura 4).

Figura 4 – Estrutura química dos compostos nitrosos (a) e nitronas (b)



Fonte: a própria autora (2022).

Os compostos nitrosos podem fornecer informações sobre os radicais aprisionados de uma maneira mais simples, quando comparado às nitronas, e podem ser aplicados a análises em órgãos de animais ou humanos (DAMIAN; PETRISOR; MICLAUS, 2007). Uma de suas desvantagens é que alguns reagentes podem competir com a armadilha de spin nitrosa na captura dos radicais livres, diminuindo a

concentração das espécies devido a reações paralelas que não são seletivas e/ou específicas. Caso não seja possível a detecção e quantificação usando esse tipo de armadilha de spin, não se pode concluir a inexistência de radicais livres no meio, necessitando de uma investigação mais aprofundada (DAVIES, 2013). O solvente pode interferir na detecção dos radicais livres a partir dos compostos nitrosos uma vez que os radicais livres detectados podem ser oriundos do próprio solvente, fornecendo informações equivocadas. Assim, recomenda-se não usar solvente em amostras em que isso seja possível, como em substâncias em estado líquido à temperatura ambiente (LAGERCRANTZ, 1971).

As armadilhas de spin do tipo nitronas apresentam uma melhor eficiência no estudo de radicais livres, além de apresentarem maior estabilidade fotolítica e térmica (DAMIAN; PETRISOR; MICLAUS, 2007; LAGERCRANTZ, 1971). Porém, os radicais livres aprisionados apenas podem ser identificados e caracterizados a partir das constantes de acoplamento do nitrogênio e próton beta e gama (DAMIAN; PETRISOR; MICLAUS, 2007).

Os *spins traps* do tipo nitronas mais usados nos trabalhos abordados na literatura são o PBN (N-t-butil- α -fenilnitrona) e o DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido), onde ambos possuem um hidrogênio beta que possibilita a extração de informações sobre o radical (REINKE et al., 1987).

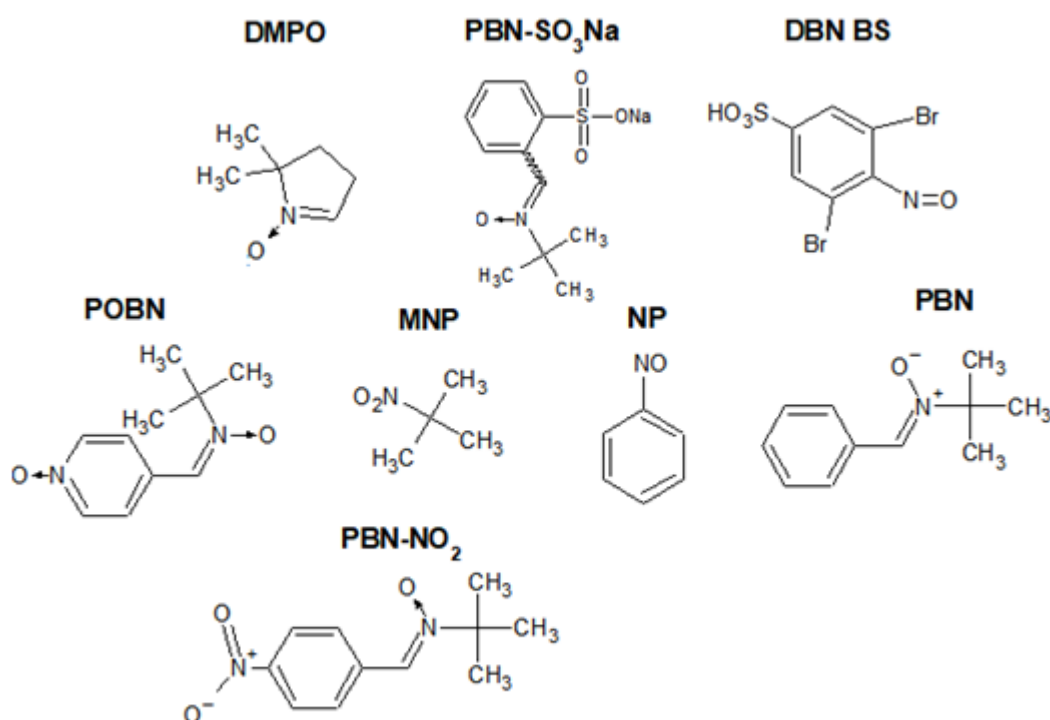
A formação dos spins adutos está diretamente correlacionada ao tipo de armadilha de spin utilizada, uma vez que dependendo da reatividade do radical, variações significativas na estrutura do radical aduto formado podem surgir. Estudos apontam que as armadilhas de spin possuem taxas de aprisionamento diferentes. Em um estudo abordando a taxa de aprisionamento de radicais do tipo $\bullet\text{OH}$, usando a armadilha de spin PBN, mostrou-se que para uma reação gerando uma taxa de radicais de $7,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, cerca de $7,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dos radicais foram aprisionados, ou seja, nem todos os radicais formados na reação a ser estudada são efetivamente aprisionados pelo armadilha de spin (DAVIES, 2013). Porém, em alguns meios, como o biodiesel, esse é o único modo de estudar e analisar o sistema através da RPE.

A armadilha de spin PBN aparece em diversos estudos na literatura (BUETTNER, 1987; DAMIAN; PETRISOR; MICLAUS, 2007; JACOB; BHUGRA; MANN, 1997; JERZYKIEWICZ; ÓWIELAŁG-PIASECKA; JEZERSKI, 2013; PAPADIMITRIOU et al., 2006; VELASCO; ANDERSEN; SKIBSTED, 2005), sendo preferencialmente escolhido no estudo de radicais livres em meios apolares (DAVIES,

2013).

Na Figura 5 são mostrados algumas armadilhas de spin, onde: DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido), PBN-SO₃Na (N-terc-butil-α-(2-sulfofenil)nitrona de sódio), DBN BS (3,5-dibromo-4-nitrosobenzenosulfonato) e 4-POBN (α-piridil-1-óxido-N-terc-butilnitrona) são armadilhas de spin solúveis em água; MNP (2-metil-2-nitrosopropano) e NB (nitrosobenzeno) são solúveis em lipídios; PBN e PBN-NO₂ (N-terc-butil-α-(4-nitrofenil)nitrona) são solúveis tanto em água quanto em lipídios.

Figura 5 – Estrutura química de moléculas que atuam como armadilhas de spin



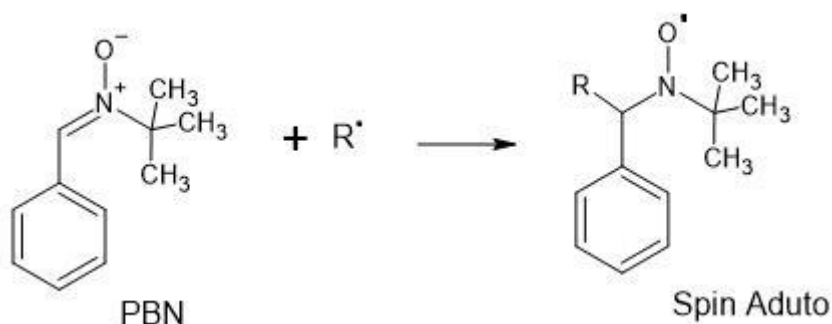
Fonte: a própria autora (2022).

Determinados fatores são de extrema importância para a eficiência do uso da armadilha de spin, como a taxa de aprisionamento dos radicais e a taxa de decaimento do spin aduto formado. Interferências externas podem inativar alguns tipos de spin adutos, devido sua natureza instável. Assim, o sinal do spin aduto detectado pela RPE pode apresentar variações. Frequentemente o sinal observado possui crescimento inicial, estabilização e decaimento (DAMIAN; PETRISOR; MICLAUS, 2007; DAVIES, 2013). Além disso, a taxa de decaimento do sinal dos radicais adutos é diretamente dependente da estrutura da armadilha de spin usada,

natureza do solvente e até mesmo do pH da amostra e do solvente (DAVIES, 2013).

Na maioria dos estudos sobre óleos apresentados na literatura a armadilha de spin PBN é usada. Na Figura 6 é mostrado a reação do aprisionamento do radical livre, formando o radical aduto a partir da armadilha de spin PBN.

Figura 6 – Reação de aprisionamento do radical livre usando a armadilha de spin PBN



Fonte: a própria autora (2022).

O radical livre aprisionado na molécula de PBN apenas possibilita a identificação dos radicais a partir das constantes de acoplamento do nitrogênio e do próton β , proveniente do hidrogênio. Desse modo, qualquer radical que seja aprisionado por essa armadilha de spin deverá ser analisado a partir das constantes de acoplamento $A(N)$ e $A(H)$ (DAMIAN; PETRISOR; MICLAUS, 2007).

Jerzykiewicz e colaboradores (2013) estudaram degradação lipídica a partir da RPE. Eles avaliaram que o efeito do α -tocoferol adicionado em amostras de óleo de canola e óleos de descarte dependia da quantidade de antioxidante usado. Para quantidades de até 0,35 mg/1 g (α -tocoferol/ ácido graxo ou triglicerídeo) ocorria a inibição da formação de spin adutos (PBN/ adutos lipídicos), enquanto que para quantidades superiores a formação de spin adutos aumentava. Bao et al. (2020) investigaram a quantidade de radicais presentes em amostras de coxa de frango assada, peito de frango, carnes de porco e bife, com e sem a adição de substâncias antioxidantes como polifenóis de chá e alecrim. Eles observaram decaimento expressivo na formação de radicais livres nas carnes assadas quando adicionado os polifenóis de chá, enquanto que a adição de alecrim não diminuiu de maneira eficiente a formação de radicais livres nas amostras.

Jiang et al. (2020) também avaliaram a estabilidade oxidativa de óleos

a partir da RPE, concluindo que a RPE é um método sensível para avaliar a estabilidade oxidativa de óleos. Zhao et al. (2020) estudaram os efeitos de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina na estabilidade oxidativa de óleo de amendoim usando RPE. Além disso, diversos estudos têm sido desenvolvidos sobre estabilidade oxidativa usando a técnica de *spin trapping* (JERZYKIEWICZ; ÓWIELĄG-PIASECKA; JEZIERSKI, 2013; JERZYKIEWICZ; CWIELĄG; JERZYKIEWICZ, 2009; OTTAVIANI et al., 2001; PAPADIMITRIOU et al., 2006; THOMSEN; JACOBSEN; SKIBSTED, 2000; THOMSEN; KRISTENSEN; SKIBSTED, 2000; VELASCO; ANDERSEN; SKIBSTED, 2004, 2005), mas há poucos trabalhos na literatura sobre análises de amostras de biodiesel por RPE.

1.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear é considerada uma técnica eficiente na análise e identificação de substâncias orgânicas e biológicas, ajudando a elucidar suas estruturas químicas. Possui a vantagem de ser uma técnica altamente confiável e rápida (HWANG, 2017).

A espectroscopia RMN permite analisar a estrutura molecular de materiais observando e medindo as interações dos spins nucleares das amostras submetidas a um forte campo magnético externo. Quando há aplicação do campo externo, ocorre o alinhamento dos spins nucleares a favor ou contra o campo. Além disso, uma energia de transferência (ΔE) se torna possível entre o estado fundamental do sistema e o estado excitado. Quando o spin retorna ao seu estado fundamental, a energia de radiofrequência absorvida é emitida na mesma frequência, dando origem ao sinal no espectro de RMN sobre determinado núcleo, de modo que a radiofrequência emitida é diretamente proporcional ao campo magnético aplicado, como mostrado na equação 2 (AKITT; MANN, 2000).

$$\Delta E = h\nu = \frac{\gamma H_0}{2\pi} \quad (2)$$

Onde H_0 é o campo magnético externo aplicado e sentido pelo próton; γ é a razão giromagnética (razão entre o momento magnético nuclear e o momento angular, constante característica para cada núcleo) e h é a constante de Planck.

A técnica permite o estudo de uma variedade de núcleos que

possuem estados de spin nuclear $\pm 1/2$ tais como: ^1H , ^{13}C , ^{19}F ^{31}P (AKITT; MANN, 2000; MOOLENAAR; ENGELKE; WEVERS, 2003).

A frequência de ressonância de um núcleo é determinada pelo seu ambiente químico. Assim, não apenas moléculas diferentes, mas também grupos químicos diferentes podem ser identificados pelo espectro de RMN. A diferença entre a frequência de ressonância e a frequência de referência do sistema é dada como o deslocamento químico, expresso em ppm (parte por milhão), que na maioria dos casos usa o tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os deslocamentos químicos podem ser usados para avaliar e analisar diferentes moléculas, mesmo que suas estruturas químicas sejam ligeiramente diferentes (MOOLENAAR; ENGELKE; WEVERS, 2003), indicando pequenas diferenças nas posições de ressonância.

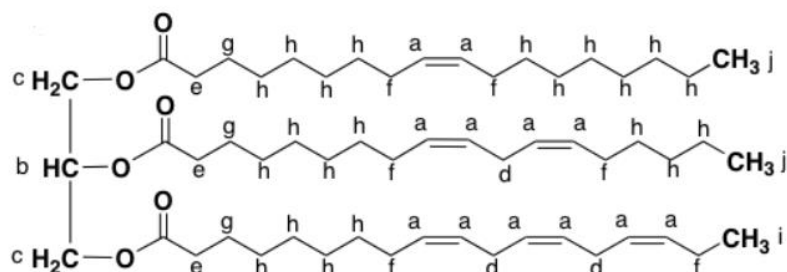
Os sinais de RMN são gerados a partir dos hidrogênios equivalentes na estrutura da molécula analisada, podendo ser divididos em duas ou mais componentes (dubleto, tripleto) fornecendo maiores informações sobre a estrutura do composto analisado. Esse desdobramento, chamado desdobramento spin-spin, é causado pela interação entre os hidrogênios vizinhos. O desdobramento spin-spin não ocorre entre hidrogênios equivalentes (HWANG, 2017; MOOLENAAR; ENGELKE; WEVERS, 2003).

A intensidade do sinal de ressonância (ou a área do pico) é proporcional ao número de hidrogênios contribuindo para o surgimento desse sinal e, conseqüentemente, é proporcional a concentração da molécula a ser estudada (MOOLENAAR; ENGELKE; WEVERS, 2003).

A espectroscopia de RMN de hidrogênios, também chamada ^1H RMN, tem sido aplicada ao estudo de óleos e gorduras de maneira eficiente, juntamente com técnicas padrões, para analisar óleos e suas respectivas composições a respeito de ácidos glicerol, ésteres alquílicos de ácidos graxos e coprodutos (ANDERSON; FRANZ, 2012; GUILLÉN; GOICOECHEA, 2007; TYL; BRECKER; WAGNER, 2008). É possível analisar os óleos e gorduras, assim como a quantidade dos grupos linoleicos, linolênicos, oleicos e saturados a partir das áreas de alguns sinais presentes no espectro de ^1H RMN (ANDERSON; FRANZ, 2012). Na Figura 7 é mostrada a estrutura do triacilglicerol com alguns dos mais comuns ácidos graxos.

Figura 7- Estrutura das cadeias de ácidos graxos do triacilglicerol onde (a) representa os hidrogênios olefínicos, (b) os hidrogênios gliceril metínicos, (c) os hidrogênios gliceril

metílicos, (d) os hidrogênios bisalílicos, (e) os hidrogênios metílicos na posição α em relação à carbonila, (f) os hidrogênios alílicos, (g) os hidrogênios metílicos na posição β em relação à carbonila e (h) os outros hidrogênios metílicos



Fonte: (ANDERSON; FRANZ, 2012).

Martínez-Yusta e Guillén (2019) estudaram o processo de degradação acelerado em óleo de girassol. Howell e Ostrander (2019) investigaram a estabilidade térmica de componentes presentes no óleo de rícino. Recentemente, a técnica foi aplicada ao estudo do processo de transesterificação da produção do biodiesel, monitorando os produtos de reação como ésteres metílicos de ácidos graxos, triglicerídeos, monoglicerídeos e diglicerídeos (GALVAN et al., 2020) mas, existem poucas pesquisas usando a espectroscopia RMN no estudo da degradação do biodiesel.

A presença de compostos olefínicos, bisalílicos e alílicos em uma amostra pode estar relacionada com o seu processo de degradação. Sabe-se que os compostos alílicos são produtos de oxidação primários, instáveis e que formam uma variedade de produtos de oxidação secundários (JAIN; SHARMA, 2010). A taxa do processo de oxidação dos ácidos graxos insaturados pode estar relacionada ao número de carbonos bisalílicos presentes no biocombustível (JAIN; SHARMA, 2010). Além disso, os compostos olefínicos são relacionados à quantidade de ésteres insaturados presente na matéria-prima (DE FREITAS et al., 2019).

CAPÍTULO 2

*Rastreamento da formação de radicais livres no
processo de degradação do biodiesel em misturas com
antioxidantes por Ressonância Paramagnética
Eletrônica (RPE)*

Resumo

O biodiesel é considerado um combustível renovável visando a substituição do diesel. Porém, sua degradação, causada por uma reação radicalar, é uma das grandes desvantagens sobre esse biocombustível. A técnica de *spin trapping* pode ser um recurso útil para avaliar e acompanhar a formação de radicais livres nas amostras. No presente trabalho, o processo de degradação do biodiesel de canola, milho e soja, com antioxidantes sintéticos (BHA, BHT, TBHQ) e extratos naturais (alecrim, orégano, manjeriço) foram analisados por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE). As análises foram realizadas a temperatura ambiente, aplicando a técnica de *spin trapping*, empregando a armadilha de spin PBN (N-t-butil- α -fenilnitrona). A partir dos dados obtidos foi possível avaliar o processo degradativo das amostras e estabilidades oxidativas, assim como identificar a presença do radical hidroxil em todas as amostras. Dentre as amostras de biodiesel analisadas, o biodiesel de soja apresentou maior estabilidade à oxidação.

Palavras-chave: *Spin-trapping*, RPE, N-t-butil- α -fenilnitrona, oxidação, espectroscopia.

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho propõe analisar o processo oxidativo do biodiesel comercial (B100) em temperatura ambiente, com o uso de antioxidantes sintéticos e naturais, por espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).

2.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência de antioxidantes sintéticos e naturais na inibição do processo de degradação do biodiesel produzido a partir de diferentes matérias primas (canola, milho e soja) por RPE.
- Quantificar a formação de radicais livres durante o processo de degradação das diferentes amostras de biodiesel durante estocagem a partir da técnica de *spin trapping*.
- Inferir informações sobre o tipo de radical/ spin aduto formado nas amostras com o uso da armadilha de spin PBN.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Produção das Amostras de Biodiesel

Para a preparação das amostras de biodiesel foram pesados individualmente 100 g de óleo de soja (Suavit[®]), canola (Suavit[®]) e milho (Suavit[®]). As amostras foram produzidas usando 50 mL de metanol P. A. (Anidrol[®], 99,8 %) e 0,8 g de hidróxido de sódio (NaOH, F. maia[®]: 97 %) como catalisador.

As misturas foram submetidas a agitação lenta, sob refluxo a 65 °C durante 2 h. O produto obtido foi colocado em funil de decantação para separar o glicerol do biodiesel. As amostras de biodiesel foram então neutralizadas com 0,1 % (v/v) de solução de ácido clorídrico (HCl, F. maia[®]: 36,5 %) a 80 °C com o objetivo de minimizar a formação de emulsões. Posteriormente as amostras foram lavadas com água destilada a 80 °C até atingir pH 7. Então, a desumidificação foi realizada adicionando 8 g de sulfato de sódio anidro P.A. (Na₂SO₄, Dinâmica[®], 99 %), previamente seco em estufa a 120 °C durante 30 minutos. As misturas foram agitadas e filtradas em papel de filtro quantitativo azul (Quantity[®], ~8 µm) no vácuo. As amostras de biodiesel produzidas foram então estocadas na ausência de luz e a temperatura ambiente.

2.2.2 Preparação dos Extratos Alcoólicos de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*), Orégano (*Origanum vulgare*) e Manjeriço (*Ocimum basilicum*)

Os extratos alcoólicos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*) foram produzidos seguindo a metodologia de Romagnoli et al. (2020). Foram usados 10 g de folhas secas de alecrim, orégano e manjeriço para a produção dos extratos. Após a pesagem das folhas, foram adicionados 250 mL de etanol (99,5 %, Anidrol PA) às mesmas e misturado com bastão de vidro. As misturas foram mantidas na ausência de luz durante 48 horas e então filtradas à vácuo. Os filtrados foram evaporados com uma chapa aquecedora a 60 °C até atingir um volume de 50 mL. As alíquotas foram transferidas em balões volumétricos de 50 mL e aferiu-se com etanol absoluto.

Antes do uso de cada alíquota dos extratos, foi retirado o etanol para

que não interferisse na degradação das amostras de biodiesel por meio de um leve aquecimento na chapa aquecedora.

2.2.3 Preparação das Amostras

Os extratos de alecrim, orégano e manjeriço, isentos de álcool, foram adicionados às amostras de biodiesel em uma concentração de 2 % (v/v), misturados até completa homogeneização, seguindo a metodologia de Romagnoli et al. (2020).

Os antioxidantes sintéticos BHA (butil hidroxianisol; marca Synth, 98,5 % pureza), BHT (butil hidroxitolueno; marca Sigma-Aldrich, 99 % pureza) e TBHQ (terc-butil-hidroquinona; Sigma-Aldrich marca, 97 % pureza) foram adicionados nas concentrações de 7 % (m/m), 7 % (m/m) e 3,5% (m/m), respectivamente. Os antioxidantes sintéticos foram adicionados às amostras de biodiesel e então misturados manualmente durante 20 minutos. Posteriormente as amostras foram deixadas em repouso por 15 minutos e então misturadas novamente por mais 20 minutos. As concentrações foram definidas seguindo o trabalho de Kimura et al. (2019), no qual mostra que o fator de proteção relativa (FPR) do antioxidante TBHQ é superior ao BHA e BHT. Essa diferença pode ser justificada devido às estruturas químicas dos antioxidantes sintéticos, uma vez que o TBHQ possui dois grupos hidroxila ligados ao seu anel aromático enquanto que o BHA e BHT apenas possuem um.

De acordo com a descrição no parágrafo anterior, 21 diferentes amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2– Nomenclatura usada nas 21 amostras preparadas

	Canola	Milho	Soja
Controle	CC	MC	SC
TBHQ	CTBHQ	MTBHQ	STBHQ
BHT	CBHT	MBHT	SBHT
BHA	CBHA	MBHA	SBHA
Orégano	CO	MO	SO
Manjeriço	CM	MM	SM
Alecrim	CA	MA	SA

Fonte: a própria autora (2022).

2.2.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica

2.2.4.1 Incubação com a armadilha de spin

As amostras dos extratos foram previamente testadas com o PBN, porém não foi determinado nenhum sinal, indicando que os sinais obtidos foram da degradação do biodiesel. Ainda, não foi obtido sinal para amostras de biodiesel sem PBN, sendo necessário o uso da técnica de *spin trapping*. As 21 amostras de biodiesel de canola, milho e soja, com os extratos naturais e os antioxidantes sintéticos, foram incubadas usando a armadilha de spin PBN (pureza $\geq 98\%$), adquirido da empresa Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemanha) e usado como recebido. 1 g de cada amostra de biodiesel foi coletada e adicionado 0,1 mg de armadilha de spin PBN. Então, as amostras foram agitadas manualmente, por aproximadamente 2 minutos 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, seguindo a metodologia previamente estabelecida por Mantovani et al. (2018).

A armadilha de spin PBN foi escolhida pois é solúvel tanto em óleos quanto em meios polares, facilitando sua solubilização no processo de incubação.

2.2.4.2 Análises de RPE a temperatura ambiente

As medidas de RPE foram realizadas em um espectrômetro JEOL (JES-PE-3X) operando na banda X (~9,5 GHz), com potência de microondas de 1 mW, com scans de 4 minutos. As amostras foram incubadas com a armadilha de spin PBN uma única vez e, então, foram seladas no primeiro dia de análise e, monitoradas por RPE a aproximadamente cada 7 dias, a temperatura ambiente. Durante o período de análise, as amostras foram armazenadas na ausência de luz e a temperatura ambiente.

2.2.4.3 Quantificação das espécies paramagnéticas do padrão marcador

de campo de óxido de magnésio dopado com manganês (MgO:Mn²⁺)

A quantificação das espécies paramagnéticas do padrão marcador de campo de óxido de magnésio dopado com manganês (MgO:Mn²⁺) foi previamente estabelecida por Mantovani et al. (2018) em trabalhos anteriores.

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

2.2.4.4 Quantificação das espécies paramagnéticas aprisionadas

Em todas as medidas de RPE realizadas o marcador de campo de manganês dopado com óxido de magnésio (MgO:Mn²⁺) foi usado. O padrão possui um momento de spin resultante de $\frac{5}{2}$. De acordo com a física quântica, seis estados ($2I+1=6$) de spin nucleares existem para o número quântico de spin magnético (m). Assim, os possíveis valores de m são: $\pm\frac{5}{2}, \pm\frac{3}{2}, \pm\frac{1}{2}$, gerando um espectro característico com seis linhas de ressonância, ou seja, seis diferentes campos magnéticos internos para o spin eletrônico (EIDELS-DUBOVOI; BELTRÁN-LÓPEZ, 1987; IKEYA, 1993). Além disso, sua terceira e quarta linhas espectrais apresentam valores de $g_3 = 2,0340$ e $g_4 = 1,9810$, respectivamente (IKEYA, 1993).

Sabe-se que a área sob uma curva de absorção é proporcional ao número de spins desemparelhados que uma amostra possui (POOLE, 1987). Desse modo, a partir do *software* Origin 9.0 realizou-se a integração matemática dos

espectros de RPE de cada amostra de biodiesel a fim de realizar a determinação da quantidade de radicais livres aprisionados pela armadilha de spin PBN. Assim, o número de espécies paramagnéticas do biodiesel foi determinado pela comparação entre as áreas do radical detectado e da quarta linha espectral do padrão de manganês, como mostrado na equação a seguir:

$$N_{biodiesel} = \frac{A_{radical} * N_{manganês}}{A_{manganês}} \quad (3)$$

Onde:

$N_{biodiesel}$ indica o número de espécies aprisionadas;

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

$A_{radical}$ é a área do espectro do radical observado;

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

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

2.2.4.5 Simulação computacional dos espectros

Os espectros de RPE foram simulados usando o *software* Matlab (MATHWORKS, 2012), usando a função *garlic* da ferramenta EasySpin (SPIN, 2006), disponível online de modo gratuito.

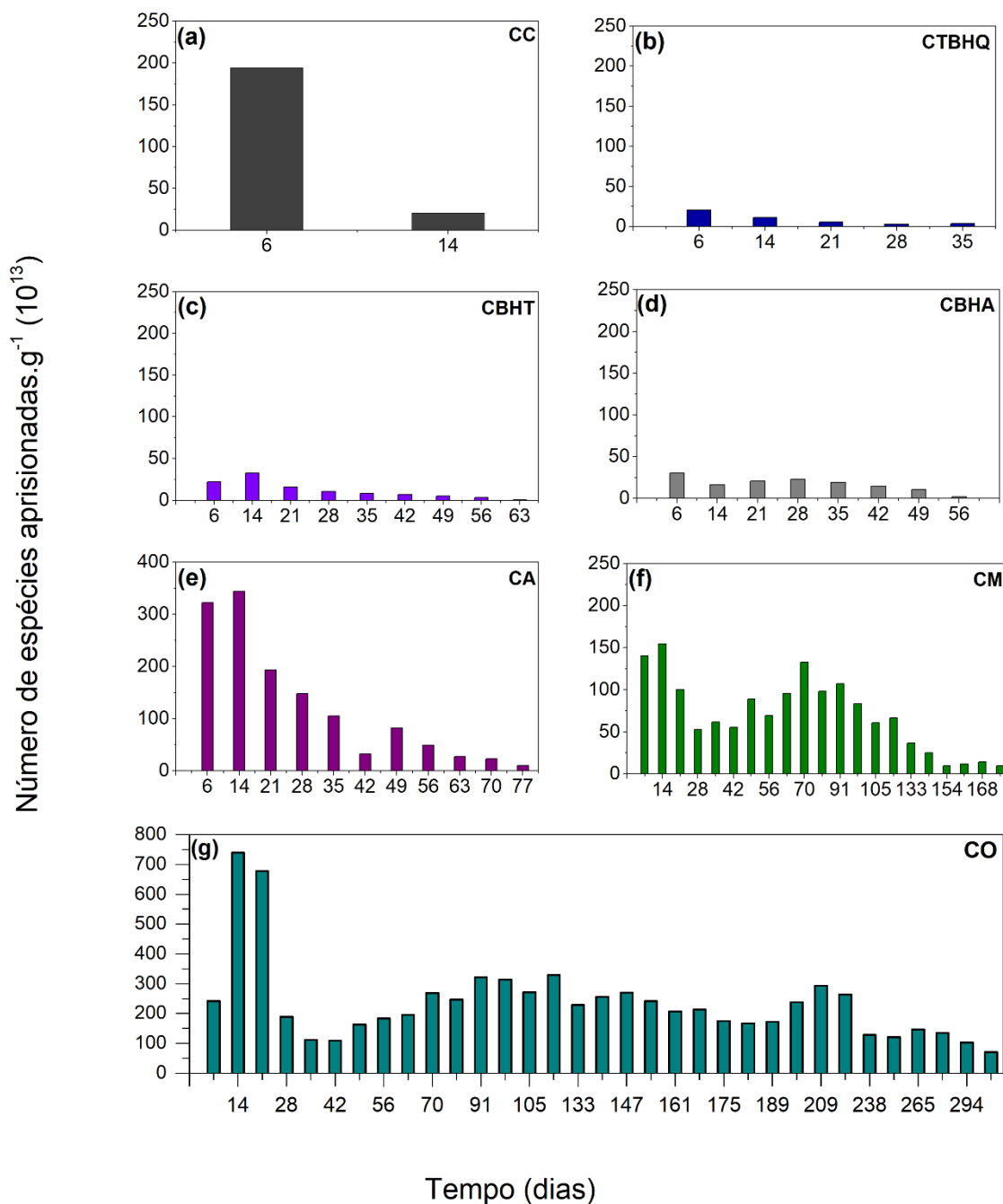
2.2.4.6 Cálculo do tempo de correlação rotacional (τ_c)

Os tempos de correlação rotacional (τ_c) foram calculados seguindo a metodologia descrita por Jerzykiewicz; Ćwieląg-Piasecka; Jezierski, (2013) e Vasilescu, Caragheorghopol, Caldararu (2001).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

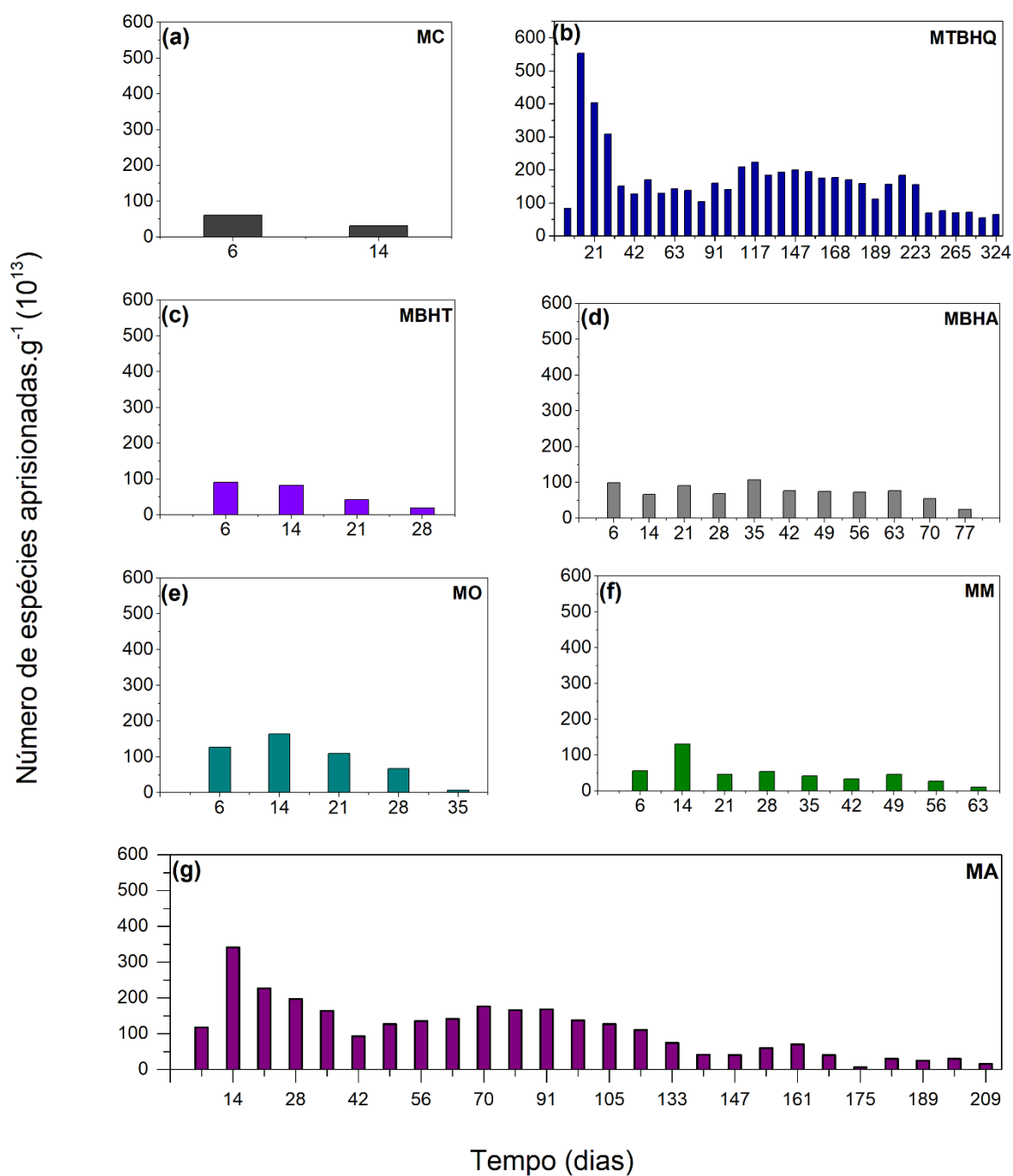
Uma análise cinética de RPE foi realizada em todas as amostras de biodiesel, observando a formação de spins adutos nas amostras durante o período de armazenamento. As Figuras 8, 9 e 10 mostram o número de spins adutos (espécies aprisionadas) detectadas a partir das medidas de RPE das amostras de biodiesel (canola, milho e soja) misturadas com antioxidantes sintéticos (TBHQ, BHT, BHA) e com extratos naturais com propriedades antioxidantes (alecrim, manjeriço, orégano), ao longo das semanas e a temperatura ambiente. As Tabelas 3, 4 e 5 mostram o número máximo de radicais adutos detectados em todas as amostras de biodiesel analisadas.

Figura 8 – Número de espécies aprisionadas detectadas por grama de biodiesel no processo de degradação das amostras de biodiesel de canola: (a) CC, (b) CTBHQ, (c) CBHT, (d) CBHA, (e) CA, (f) CM, (g) CO



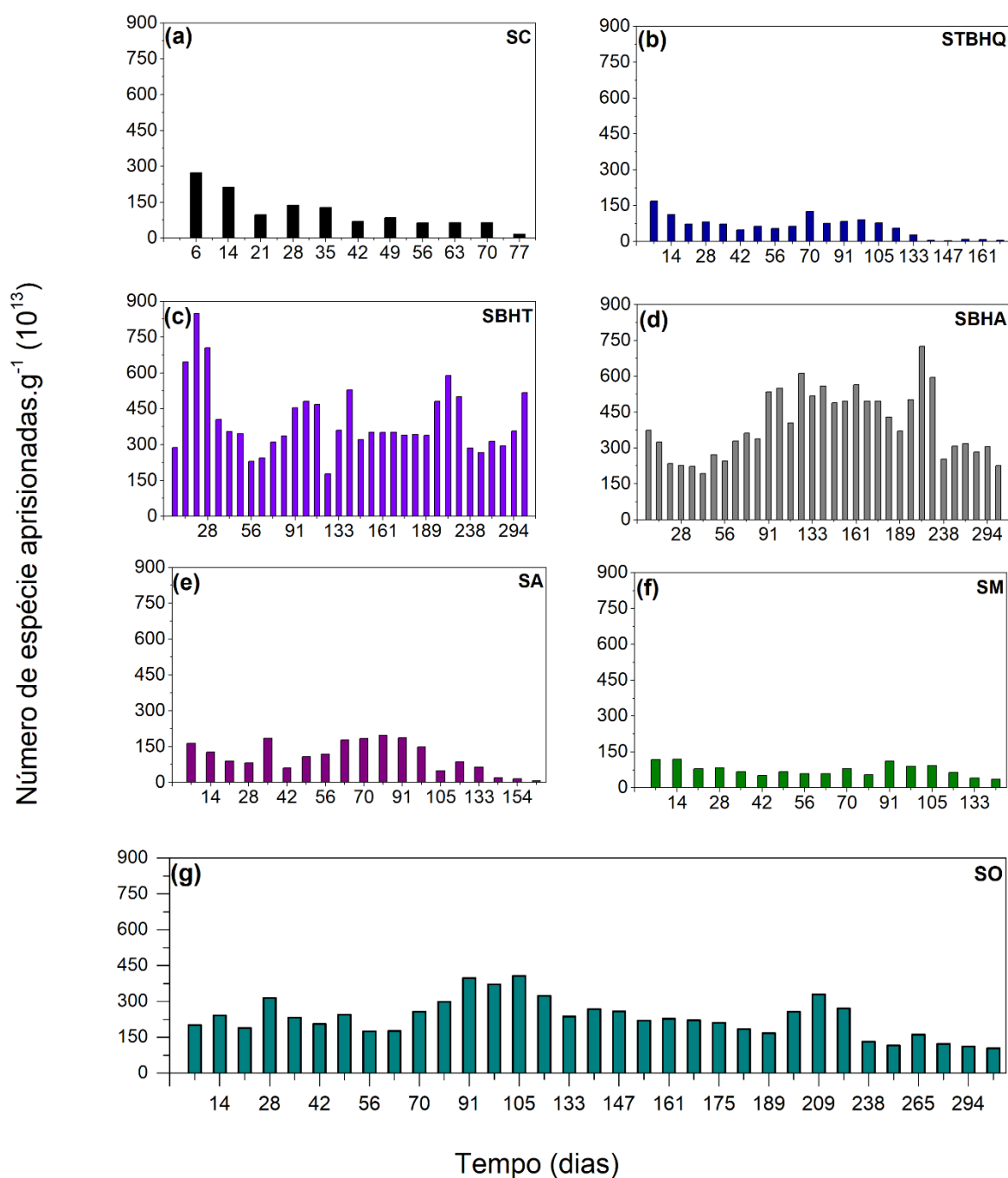
Fonte: a própria autora (2022).

Figura 9 – Número de espécies aprisionadas detectadas por grama de biodiesel no processo de degradação das amostras de biodiesel de milho: (a) MC, (b) MTBHQ, (c) MBHT, (d) MBHA, (e) MO, (f) MM, (g) MA



Fonte: a própria autora (2022).

Figura 10 - Número de espécies aprisionadas detectadas por grama de biodiesel no processo de degradação das amostras de biodiesel de soja: (a) SC, (b) STBHQ, (c) SBHT, (d) SBHA, (e) SA, (f) SM, (g) SO



Fonte: a própria autora (2022).

Tabela 3 – Número máximo de radicais adutos detectados nas amostras de biodiesel de canola

Biodiesel de canola	Número de espécies aprisionadas por unidade de massa (10^{13})
CC	20 ± 5
CTBHQ	21 ± 5
CBHT	33 ± 5
CBHA	30 ± 5
CO	740 ± 5
CM	154 ± 5
CA	344 ± 5

Fonte: a própria autora (2022).

Tabela 4 - Número máximo de radicais adutos detectados nas amostras de biodiesel de milho

Biodiesel de milho	Número de espécies aprisionadas por unidade de massa (10^{13})
MC	61 ± 5
MTBHQ	553 ± 5
MBHT	91 ± 5
MBHA	108 ± 5
MO	164 ± 5
MM	131 ± 5
MA	342 ± 5

Fonte: a própria autora (2022).

Tabela 5 - Número máximo de radicais adutos detectados nas amostras de biodiesel de soja

Biodiesel de soja	Número de espécies aprisionadas por unidade de massa (10^{13})
SC	270 ± 5
STBHQ	169 ± 5
SBHT	848 ± 5
SBHA	725 ± 5
SO	408 ± 5
SM	120 ± 5
SA	197 ± 5

Fonte: a própria autora (2022).

A partir da Figura 8 pode-se observar que a detecção dos spins adutos da amostra CC aconteceu até o 14^o dia de análise (último dia com sinal), enquanto que nas amostras CTBHQ, CBHT, CBHA, CA, CM, CO, a detecção foi observada até o 35^o, 63^o, 56^o, 77^o, 175^o e 324^o dias, respectivamente. O mais alto número de spin adutos detectados ocorreu, em geral, nos primeiros 15 dias de análise. A amostra CO (Figura 8g) apresentou o período mais longo de detecção de radicais adutos, ultrapassando 300 dias. Além disso, a mesma amostra (CO – Figura 8g) apresentou o maior número de radicais adutos detectados (Tabela 3).

A partir da Figura 9, nota-se que a detecção de spins adutos da amostra MC ocorreu também até o 14^o dia de análise, enquanto que nas amostras MTBHQ, MBHT, MBHA, MA, MM, MO, a detecção foi observada até o 324^o, 28^o, 77^o, 209^o, 63^o e 35^o dias, respectivamente. O maior número de spins adutos detectados ocorreu, em geral, nos 15 primeiros dias de análise. A amostra MTBHQ (Figura 9b) apresentou o período mais longo de detecção dos radicais adutos, ultrapassando 300 dias. A mesma amostra (MTBHQ – Figura 9b) apresentou o maior número de radicais adutos detectados (Tabela 4).

A partir da Figura 10, um comportamento diferente é observado. A amostra controle apresentou detecção dos spin adutos até o 77^o dia de análise. De modo geral, todas as amostras de biodiesel de soja apresentaram períodos de detecção mais longos quando comparadas as amostras de biodiesel de canola e milho. As amostras STBHQ, SBHT, SBHA, SO, SM e SA apresentaram detecção de spin adutos até 175^o, 324^o, 324^o, 324^o, 141^o e 161^o dias, respectivamente. As amostras SBHT, SBHA e SO (Figuras 10c, 10d, 10g) apresentaram o mesmo período de detecção, mais de 300 dias, variando em suas respectivas intensidades de sinal. Além disso, a amostra SBHT (Figura 10c) apresentou o maior número de radicais adutos detectados (Tabela 5).

Vale ressaltar que o número de radicais adutos detectados pode não representar a quantidade total de radicais presente nas amostras, uma vez que a armadilha de spin PBN possui uma taxa de aprisionamento menor que a produção de radicais livres. Além disso, a variação do sinal dado por um crescimento inicial, estabilização e decaimento, é frequentemente observada em sinais de RPE de spins adutos (DAVIES, 2013).

A degradação do biodiesel pode ser explicada através da reação radicalar com três principais etapas: iniciação, propagação e terminação. A produção

de radicais livres a partir dos ácidos graxos ocorre na etapa de iniciação, seguida pela etapa de propagação, na qual há a formação de outros tipos de radicais livres, como peróxidos e hidroperóxidos, propagando a reação. No final, na etapa de terminação, os radicais livres estabelecem ligações entre eles, formando produtos estáveis. Assim, quanto mais longa a etapa de propagação nas amostras, mais longo é o processo de degradação e, conseqüentemente, maior é a estabilidade do biodiesel, uma vez que maior é o período para ocorrer a degradação (CHENDYNSKI et al., 2019; MANTOVANI et al., 2018).

A partir das Figuras 8a, 8b, 8c, 8e, 9a, 9c, 9e, 9f e 10a, observa-se um comportamento de decaimento após o dia de análise que apresenta o máximo número de radicais adutos detectados. Por outro lado, nas Figuras 8d, 8f, 8g, 9b, 9d, 9g, 10b-g há variação na quantidade de espécies aprisionadas, mostrando um comportamento oscilatório durante o processo de degradação, até atingir uma tendência de decaimento.

Todas as amostras controle apresentaram comportamento de decaimento após a máxima detecção de radicais adutos. De modo geral, quase todas as amostras que apresentaram um comportamento de decaimento também apresentam os mais curtos tempos de degradação (Figura 8d). Além disso, as amostras com os tempos de degradação mais longos foram as que apresentaram comportamento oscilatório dos radicais adutos detectados durante o processo degradativo.

Para o biodiesel de canola, o extrato de orégano apresentou atividade antioxidante durante maior tempo, com mais longa propagação de radicais livres entre as amostras analisadas, mostrando-se até mesmo mais eficiente que os antioxidantes sintéticos, bem estabelecidos e usados nas indústrias. O extrato natural de orégano apresenta uma concentração de fenóis totais variando de 3,57 a 11,01 mgEAG /g¹_{peso seco} (SPACINO et al., 2015).

Para o biodiesel de milho, o antioxidante sintético BHT apresentou melhor atividade antioxidante, entretanto o extrato de folhas de alecrim também mostrou uma boa resposta, ajudando na propagação da reação até o 209º dia. O extrato de alecrim apresenta a maior quantidade de fenóis, variando de 11,60 a 34,57 mgEAG /g¹_{peso seco} (SPACINO et al., 2015).

Considerando o biodiesel de soja, ele apresenta melhor estabilidade oxidativa, conclusão baseada no fato que sua amostra controle levou maior período

para se degradar. Em geral, todos os antioxidantes usados apresentaram interferência positiva em atrasar a reação de degradação. Entre eles, os antioxidantes que se destacaram são: BHT, BHA e extrato de folhas de orégano (Figuras 10c, 10d, 10g).

Nas Figuras 8d, 8f, 8g, 9b, 9d, 9g, 10b-g, a variação do sinal dos radicais adutos é observada, como mencionado anteriormente. Essa variação pode ser associada à boa atividade antioxidante no biodiesel. Durante a oxidação há a produção de radicais livres. Então, o antioxidante atua inativando o radical livre formado e, conseqüentemente, o número de radicais adutos detectados decresce. Entretanto, a formação de radicais livres continua, elevando o número de radicais adutos. Em seguida, o antioxidante atua na reação inativando os radicais livres. Assim, a reação continua apresentando esse comportamento oscilatório, até o término da atividade antioxidante dessa molécula presente no meio.

Os comportamentos diversos observados pelos seis antioxidantes estudados sugerem a existência de um antioxidante adequado para cada biodiesel obtido a partir de diferentes matérias-primas, uma vez que eles apresentaram eficiências diferentes dependendo da amostra analisada.

Barclay (2000) estudou a atividade da armadilha de spin PBN como um possível antioxidante para interrupção da reação radicalar. Conclui-se que o PBN não atua como um antioxidante de quebra de cadeia radicalar pois, quando um antioxidante ativo está presente na amostra, ele irá aprisionar os radicais, aproximadamente 5 a 10 vezes mais rápido que o PBN. Velasco, Andersen, Skibsted (2005) em estudos realizados com óleos, apresentam que o efeito de interação antioxidante-lipídio-PBN depende diretamente do antioxidante e do tipo de óleo utilizados. Quando o PBN foi combinado com o antioxidante natural α -tocoferol, o antioxidante atuou nos radicais de um modo que o PBN apenas começou a atuar na amostra após a total perda de atividade antioxidante, excluindo a possibilidade do PBN interagir com os grupos fenólicos.

Velasco, Andersen, Skibsted (2005) estudaram a degradação de óleos de canola, girassol e peixe a partir da RPE. No estudo, eles investigaram a quantidade de tocoferol, observando uma maior concentração nas amostras com a armadilha de spin PBN quando comparadas às amostras controle. Além disso, encontrou-se que quanto menor a estabilidade oxidativa do óleo, maior é o efeito do PBN na oxidação lipídica, apresentando um efeito de inibir a degradação de determinados óleos. A armadilha de spin PBN apresenta diferentes capacidades de

interação com os radicais peróxidos em diferentes amostras de óleos, também afetada pela concentração de tocoferol (VELASCO; ANDERSEN; SKIBSTED, 2005). Alguns estudos consideram também uma possível degradação do PBN durante análises. A degradação do PBN tem sido sugerida em reagir com radicais peróxidos, formando radicais adutos que se decompõem, criando radicais livres secundários (DIKALOV; MASON, 1999).

Jerzykiewicz, Ćwieląg-Piasecka, Jezierski (2013) estudaram o efeito do α -tocoferol na reação de oxidação em lipídios, usando a espectroscopia RPE e a armadilha de spin PBN. A partir dos espectros de RPE eles observaram diferentes propriedades dos radicais lipídicos, dependendo das insaturações presentes nas amostras. Os óleos com maiores quantidades de insaturações apresentaram spins adutos mais estáveis, enquanto que em óleos com maiores quantidades de saturações, seus radicais eram mais instáveis e foram detectados por RPE durante períodos mais curtos.

As análises de biodiesel apresentadas nesse trabalho mostram o mesmo comportamento. Em geral, o biodiesel com maiores quantidades de insaturações (soja) apresentou spin adutos mais estáveis que os biodiesel de canola e milho, com menores quantidades de insaturações. Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, o óleo de canola é formado por 62,6 % de ácidos graxos monoinsaturados e 28,4 % de ácidos graxos poliinsaturados, o óleo de milho por 33,4 % e 50,9 %, e o óleo de soja por 23,3 % e 60 %, respectivamente.

Considerando que cada insaturação corresponde a um sítio de reação com o oxigênio, quanto maior o teor de insaturações totais, maior a susceptibilidade à reação de oxidação. De acordo com Ma & Hanna (1999), o óleo de soja possui maior teor de insaturações totais, com a presença de duas (55,53 %) e três (6,31 %) duplas ligações na cadeia carbônica.

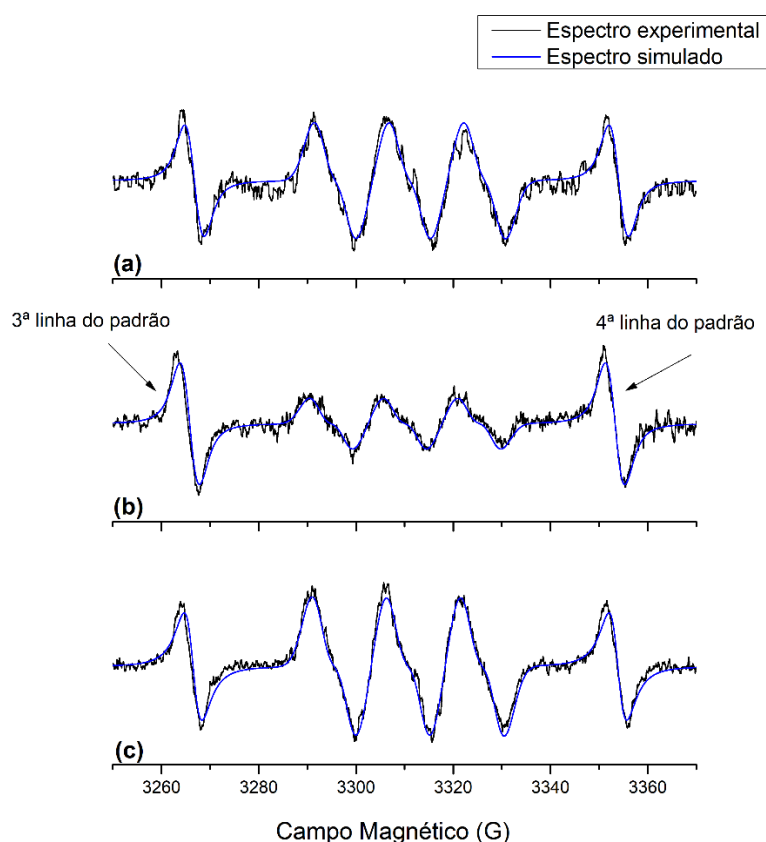
O número de iodo é diretamente proporcional à quantidade de insaturações na molécula, conseqüentemente, pode ser diretamente correlacionado ao período de indução (SOARES; ROCHA, 2018). As pesquisas relatam que o índice de iodo para o óleo de soja é superior ao determinado para o óleo de canola e de milho, concordando com os dados obtidos de que o óleo de soja se degrada mais rapidamente devido ao maior teor de insaturações totais (SHIMAMOTO; FAVARO; TUBINO, 2015; SOARES; ROCHA, 2018; ZULETA et al., 2012).

Foram realizadas simulações computacionais dos espectros de RPE

de todas as amostras e analisadas com o objetivo de caracterizar os radicais adutos detectados. A Figura 11 mostra os espectros experimentais e simulados de todas as amostras de biodiesel de canola, milho e soja.

As interações hiperfinas originam-se a partir da interação entre o núcleo, que apresenta momento nuclear e um elétron desemparelhado presente na amostra. Quando analisamos amostras com a armadilha de spin PBN, os núcleos vizinhos que apresentam contribuições importantes são o Nitrogênio (N) e o Hidrogênio (H). Assim, as constantes de acoplamento hiperfinas $A(N)$ e $A(H)$ podem ser usadas para caracterizar o radical aprisionado pela armadilha de spin PBN. Desse modo, na Tabela 6 são apresentadas todas as constantes de acoplamento hiperfinas $A(N)$, $A(H)$, fator g e largura de linha de cada amostra estudada e simulada (WEIL; BOLTON, 2007).

Figura 11 – Espectros experimentais e simulados das amostras controle dos biodiesel de (a) canola, (b) milho e (c) soja



Fonte: a própria autora (2022).

Tabela 6 – Valores das constantes de acoplamento hiperfinas, fator g e largura de linha das espécies radicalares simuladas para todas as amostras de biodiesel

	Amostras	A(N) (G)	A(H) (G)	Fator g	Largura de linha (G)
Biodiesel de canola	CC	15,4	4,4	2,006	6,0
	CTBHQ	15,2	4,5	2,006	6,0
	CBHT	15,3	4,4	2,007	6,0
	CBHA	15,3	4,5	2,007	6,0
	CA	15,2	4,5	2,007	6,0
	CM	15,0	4,2	2,006	6,0
	CO	15,3	4,4	2,007	6,0
	MC	15,2	4,6	2,006	6,0
Biodiesel de milho	MTBHQ	15,4	4,4	2,007	6,0
	MBHT	15,1	5,1	2,007	6,0
	MBHA	14,2	4,8	2,006	7,0
	MO	15,3	4,9	2,007	7,0
	MM	15,3	4,5	2,007	6,0
	MA	15,3	4,4	2,007	6,0
Biodiesel de soja	SC	15,2	4,7	2,006	6,0
	STBHQ	15,3	4,4	2,006	6,0
	SBHT	15,2	4,2	2,006	6,0
	SBHA	15,1	4,2	2,006	6,0
	SO	14,5	4,3	2,006	6,0
	SM	15,4	4,3	2,007	6,0
	SA	14,7	3,9	2,006	7,0

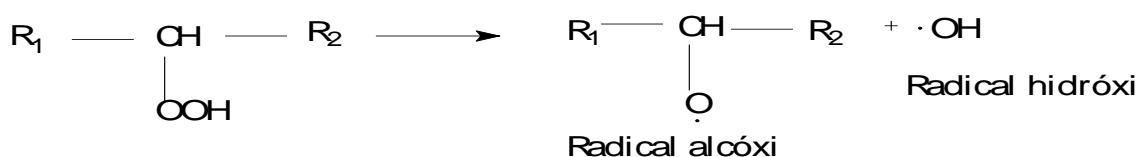
Fonte: a própria autora (2022).

O espectro do radical detectado nas amostras, apresentados na Figura 11. A partir da interação com o PBN espera-se que o espectro do radical apresente um total de seis linhas. Alguns autores sugerem que essa sobreposição de linhas, indicado pelo alargamento delas, deve-se ao acúmulo dos radicais detectados nas amostras (MANTOVANI et al., 2018; PINGRET et al., 2012; VELASCO; ANDERSEN; SKIBSTED, 2005), assim como na realização das análises em uma temperatura que não seja a temperatura ótima para cada óleo (THOMSEN; KRISTENSEN; SKIBSTED, 2000). Além disso, o efeito de alargamento de linhas pode ser ocasionado a partir de restrições na mobilidade rotacional das amostras, proporcionando uma média espectral parcial de RPE, relacionada às diferentes orientações dos radicais livres em relação ao campo magnético (VELASCO; ANDERSEN; SKIBSTED, 2005).

Pode-se observar que os espectros simulados e experimentais apresentaram boa concordância entre si. Os valores do fator g, em todas as amostras, é caracterizado por radicais livres orgânicos (GERSON; HUBER, 2004). A partir das constantes de acoplamento hiperfinas obtidas através das simulações computacionais realizadas em todas as amostras, elas podem ser atribuídas ao radical $\bullet\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ (HAIRE et al., 1988; REINKE et al., 1987, 1991). Os dados obtidos estão de acordo com trabalhos realizados anteriormente em análises de biodiesel a 70 °C (MANTOVANI et al., 2018) e, na presença de extrato natural de amora e contaminantes metálicos a 110 °C (CHENDYNSKI et al., 2019).

A presença do radical $\bullet\text{OH}$, identificado partir das constantes de acoplamento hiperfinas das linhas do espectro, confirma a degradação do biodiesel durante o período de armazenamento, concordando com o mecanismo de degradação estabelecido na literatura, mostrado na Figura 12 (FRANKEL, 2005).

Figura 12 – Reação de decomposição do hidroperóxido



Fonte: a própria autora (2022).

Os tempos de correlação rotacional (τ_c), em segundos, dos adutos formados nas amostras (armadilha de spin PBN + radicais do biodiesel), foram calculados considerando os parâmetros das linhas hiperfinas do ^{14}N dos espectros de RPE obtidos. Os tempos de correlação rotacional iniciais e finais das amostras são mostrados nas Tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7 - Tempos de correlação rotacional iniciais e finais (τ_c) para as amostras de biodiesel de canola

Biodiesel de canola	Tempo de correlação rotacional (τ_c) ($\times 10^{-9}$)
CC _{inicial}	1,35 \pm 0,14
CC _{final}	1,32 \pm 0,13
CTBHQ _{inicial}	1,19 \pm 0,12
CTBHQ _{final}	0,73 \pm 0,07
CBHT _{inicial}	1,31 \pm 0,13
CBHT _{final}	1,17 \pm 0,12
CBHA _{inicial}	1,13 \pm 0,11
CBHA _{final}	1,03 \pm 0,10
CA _{inicial}	1,22 \pm 0,12
CA _{final}	Não determinado
CM _{inicial}	1,31 \pm 0,13
CM _{final}	0,88 \pm 0,08
CO _{inicial}	1,26 \pm 0,13
CO _{final}	1,25 \pm 0,13

Fonte: a própria autora (2022).

Tabela 8 - Tempos de correlação rotacional iniciais e finais (τ_c) para as amostras de biodiesel de milho

Biodiesel de milho	Tempo de correlação rotacional (τ_c) ($\times 10^{-9}$)
MC _{inicial}	1,22 \pm 0,12
MC _{final}	1,31 \pm 0,13
MTBHQ _{inicial}	1,20 \pm 0,12
MTBHQ _{final}	1,09 \pm 0,11
MBHT _{inicial}	1,14 \pm 0,11
MBHT _{final}	1,22 \pm 0,12
MBHA _{inicial}	1,38 \pm 0,14
MBHA _{final}	1,10 \pm 0,11
MA _{inicial}	1,26 \pm 0,13
MA _{final}	1,10 \pm 0,11
MM _{inicial}	1,36 \pm 0,14
MM _{final}	0,77 \pm 0,08
MO _{inicial}	1,21 \pm 0,12
MO _{final}	1,15 \pm 0,12

Fonte: a própria autora (2022).

Tabela 9- Tempos de correlação rotacional iniciais e finais (τ_c) para as amostras de biodiesel de soja

Biodiesel de soja	Tempo de correlação rotacional (τ_c) ($\times 10^{-9}$)
SC _{inicial}	1,36 \pm 0,14
SC _{final}	1,06 \pm 0,11
STBHQ _{inicial}	1,07 \pm 0,11
STBHQ _{final}	1,02 \pm 0,10
SBHT _{inicial}	1,20 \pm 0,12
SBHT _{final}	1,18 \pm 0,12
SBHA _{inicial}	1,23 \pm 0,12
SBHA _{final}	1,19 \pm 0,12
SA _{inicial}	1,31 \pm 0,13
SA _{final}	0,67 \pm 0,07
SM _{inicial}	1,20 \pm 0,12
SM _{final}	0,95 \pm 0,10
SO _{inicial}	1,31 \pm 0,13
SO _{final}	1,12 \pm 0,11

Fonte: a própria autora (2022).

Quando consideramos o tempo de correlação rotacional, valores altos de τ_c indicam um movimento molecular mais vagaroso enquanto que baixos valores de τ_c indicam alta mobilidade molecular dos adutos formados. A partir das Tabelas 7-9, observa-se que o τ_c decresce, principalmente, em algumas amostras de biodiesel de soja (considerando principalmente a amostra controle SC). Apenas algumas amostras apresentaram mudanças significativas durante a reação de oxidação. Desse modo, uma melhor investigação acerca dos τ_c se faz necessária, o que será abordado em trabalhos futuros.

2.4 CONCLUSÕES

A técnica de RPE mostrou-se eficiente na avaliação da reação de degradação de diferentes amostras de biodiesel, produzidos a partir de diferentes matérias-primas, observando a formação de radicais adutos com a armadilha de spin PBN no decorrer do tempo. Os diferentes antioxidantes aplicados nas amostras

apresentaram comportamentos diferentes, ocasionados principalmente devido à diferente resposta entre as matérias-primas usadas na produção do biodiesel e no tipo de extrato com propriedades antioxidantes usado. Em geral, as amostras obtidas a partir do óleo de soja apresentaram degradação mais longa, quando comparadas às demais amostras. O antioxidante sintético BHT apresentou melhor eficiência no biodiesel de canola, enquanto que o TBHQ foi mais eficiente no biodiesel de milho, os antioxidantes BHT/BHA apresentaram melhor eficiência no biodiesel de soja. O extrato natural de folhas de orégano apresentou melhor eficiência nos biodiesel de canola e soja, enquanto o extrato de folhas de alecrim apresentou melhor eficiência no biodiesel de milho. O comportamento diverso entre os seis antioxidantes usados nas amostras sugere a existência de um antioxidante adequado para cada biodiesel obtido a partir de diferentes matérias-primas. Os radicais adutos observados na degradação de todas as amostras foram caracterizados como o radical $\bullet\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, o mesmo radical aduto observado em trabalhos realizados previamente. Além disso, a RPE juntamente com a técnica não convencional de *spin trapping* mostrou-se eficiente para avaliar a atuação de moléculas com propriedades antioxidantes na inibição da degradação do biodiesel.

CAPÍTULO 3

*Avaliação do processo de oxidação do biodiesel a partir
da Ressonância Magnética Nuclear (^1H RMN)*

Resumo

O biodiesel é considerado uma alternativa para a substituição do petro-diesel. Ele é formado por ésteres insaturados, que são facilmente degradados através da interferência de oxigênio, temperatura, contato com metais e contaminantes. O objetivo dessa pesquisa foi investigar o processo de degradação do biodiesel através da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de prótons (^1H RMN), observando os sinais dos hidrogênios olefínicos, alílicos e bisalílicos das ligações químicas e, também, através do período de indução (PI) fornecido pelo equipamento Rancimat. Foram analisadas amostras de biodiesel com íons metálicos de Ferro [Fe^{3+}] e Cobre [Cu^{+2}] e também com extrato de alecrim. Os íons apresentaram um efeito catalítico nas amostras, enquanto que o extrato de alecrim mostrou-se ser eficiente na diminuição da constante de velocidade da reação de oxidação. A atuação antioxidante do extrato mostrou-se ineficiente na presença dos íons metálicos. Através dos espectros de ^1H RMN foi possível observar mudanças nas intensidades dos sinais dos hidrogênios olefínicos, alílicos e bisalílicos, assim como a formação de produtos de oxidação provenientes do processo de degradação do biodiesel.

Palavras-chave: Biodiesel, RMN, degradação, oxidação, espectroscopia.

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho propõe analisar as substâncias formadas pela reação de oxidação de biodiesel comercial (B100) a partir da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de prótons (^1H RMN).

3.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o processo de degradação do biodiesel a partir da intensidade das áreas referentes aos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos;
- Inferir informações acerca das influências de íons metálicos de Ferro [Fe^{3+}] ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e Cobre [Cu^{+2}] ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) na catálise da reação de oxidação do biodiesel comercial (B100);
- Inferir informações sobre a influência do extrato natural de alecrim, com propriedades antioxidantes, no processo de degradação do biodiesel comercial (B100);
- Comparar as informações obtidas do processo degradativo do biodiesel comercial (B100) a partir das análises de RMN com o método de estabilidade oxidativa do equipamento Rancimat.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Amostras

Para as análises foi usada uma amostra de biodiesel comercial (B100) fornecida por uma empresa local no estado do Paraná – (Bs- Bios®) Brasil. O laudo do biodiesel utilizado encontra-se no Anexo E. O Biodiesel estava dentro das especificações estabelecidas pela legislação internacional EN 14112 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2016).

3.2.2 Preparação do Extrato Alcoólico de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

O extrato alcoólico de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) foi produzido usando 10 g de folhas secas de alecrim, seguindo a metodologia estabelecida por Romagnoli et al. (2020). O uso do extrato de alecrim foi determinado baseando-se em resultados prévios e pesquisa na literatura (LEE et al., 2019; RAITIO; ORLIEN; SKIBSTED, 2011; SOUZA et al., 2014). Cerca de 10 g de folhas secas de alecrim foram adicionadas a 250 mL de etanol (99,5 %, Anidrol PA, Diadema, Brasil) e misturados com um bastão de vidro. A mistura foi então mantida durante 48 h na ausência de luz e, então, o extrato foi filtrado. O filtrado foi evaporado a 60 °C, usando uma placa de aquecimento, até obter-se, aproximadamente, uma alíquota de 50 mL. A alíquota foi então transferida a um balão volumétrico de 50 mL e aferiu-se com etanol absoluto.

3.2.3 Preparação das Amostras

Foram preparadas seis diferentes amostras: Controle (B100) [B.C.], B100+extrato [B.E], B100+Cu [B.Cu], B100+Cu+extrato [B.Cu.E], B100+Fe [B.Fe], B100+Fe+extrato [B.Fe.E]. Os íons metálicos Fe^{3+} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; marca Synth, Diadema, Brasil; 99,5 %) e Cu^{2+} ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; marca Vetec; Rio de Janeiro, Brasil; 99,0 %), foram adicionados nas concentrações de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (27,3 mg L^{-1} e 17,0 mg L^{-1} , respectivamente). O extrato de alecrim, isento de álcool, foi adicionado na concentração de 2 % (v/v) e misturado até atingir total homogeneização, seguindo a

metodologia de Romagnoli et al. (2020). A quantidade de íons metálicos foi determinada de acordo com testes preliminares, de modo que as concentrações não gerem uma degradação muito rápida ou muito devagar, uma vez que em pequenas quantidades ($\sim 1 \text{ mg L}^{-1}$) os íons metálicos já podem catalisar a reação (SARIN et al., 2009). Além disso, íons de cobre apresentam um efeito catalítico maior que os íons de ferro (SARIN et al., 2009). As amostras foram preparadas 24 h antes de serem analisadas, mantidas fechadas a temperatura ambiente e na ausência de luz.

3.2.4 Determinação do Período de Indução e Constantes de Velocidade das Reações e Degradação das Amostras

Em cada uma das amostras preparadas foi realizado o teste de degradação acelerada a uma temperatura de $110 \text{ }^\circ\text{C}$, usando o equipamento Rancimat (marca Metrohm; modelo 873), com taxa de fluxo de ar de $10 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$, seguindo a metodologia descrita pelo padrão e norma internacional EN 14112 (EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, 2016). Os períodos de indução foram fornecidos a partir do ponto de inflexão da curva de condutividade elétrica em função do tempo, gerada pelo *software* do equipamento.

Considera-se a reação radicalar do biodiesel de primeira ordem. As constantes de velocidade das reações (k), para cada uma das amostras, foram determinadas através do ajuste linear do logaritmo natural em função do tempo dos dados obtidos a partir do equipamento Rancimat (CHENDYNSKI et al., 2017).

Antes de realizar as análises de ^1H RMN, as amostras foram degradadas usando o método de aquecimento acelerado. Foram divididas em 8 análises de cada uma das 6 principais amostras ([B.C.], [B.E.], [B.Cu], [B.Cu.E], [B.Fe], [B.Fe.E]) no equipamento Rancimat. Posteriormente, as oito análises de cada amostra principal foram submetidas ao aquecimento acelerado, a uma temperatura de $110 \text{ }^\circ\text{C}$, com retiradas em 8 diferentes intervalos de tempo. A última amostra foi mantida até a obtenção do ponto de inflexão da curva de condutividade elétrica em função do tempo. Então, as amostras foram colocadas em tubos de vidro, resfriadas e armazenadas sob refrigeração para posteriores análises de ^1H RMN. Os intervalos de retirada de cada uma das amostras foram determinados a partir de testes preliminares.

3.2.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (^1H RMN)

Para a aquisição dos espectros de RMN foi usado um espectrômetro operando a 9,4 T, 400 MHz (marca Bruker), do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Estadual de Londrina. As amostras foram preparadas dissolvendo 50 μL de biodiesel em 600 μL de clorofórmio deuterado (CDCl_3 99,8 % com 0,05 % (v/v) de Tetrametilsilano – TMS, marca Sigma Aldrich; Saint Louis, EUA). Os parâmetros aplicados nas análises foram: pulso simples, largura espectral de 8012 Hz, número de varreduras de 16 *scans*, tempo de relaxação de 1 s, largura de pulso de 90° e tempo de aquisição de 4,089 s. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm, usando como padrão interno o TMS.

Todos os espectros foram alinhados em uma fase de ordem zero e, as correções de linha base foram feitas para o intervalo de $\delta = -2.00$ ppm à 10.00 ppm, usando o *software* TopSpin (3.6.1). As regiões de integração do sinal espectral correspondendo aos carbonos metílicos na posição α em relação à carbonila (2,2-2,4 ppm), hidrogênios olefínicos (5,0-5,7 ppm), hidrogênios alílicos (1,8-2,2 ppm) e hidrogênios bisalílicos (2,6-3,0 ppm) foram realizadas usando uma rotina elaborada no *software* Matlab (2015). A área dos carbonos metílicos na posição α em relação à carbonila (2,2-2,4 ppm), que apresentam um sinal característico com 6 prótons, originalmente na molécula de triglicerídeos, foi usada como pico padrão para a realização das normalizações dos resultados obtidos. Os intervalos de integração foram previamente descritos na literatura (ANDERSON; FRANZ, 2012) e são usados no presente trabalho com adaptações.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 10 são mostrados os períodos de indução (PI) e as constantes de velocidade (k) das amostras analisadas. Pode-se observar que o extrato de alecrim apresentou uma atuação antioxidante eficiente, apresentando PI de 9,61 h e k de $0,30 \text{ h}^{-1}$, desacelerando a reação radicalar do biodiesel, quando comparada à amostra controle ($k = 0,44 \text{ h}^{-1}$). Por outro lado, a presença de Cu^{2+} no biodiesel colaborou com a aceleração da reação, atuando como catalisador, apresentando valor de PI de 1,15 h e valor de k de $2,01 \text{ h}^{-1}$. Quando foi analisada a presença dos íons de ferro no biodiesel, a reação de oxidação apresentou uma sutil

mudança no período de indução, indicando que o extrato de alecrim não é eficiente quando há a presença de Fe^{3+} na amostra.

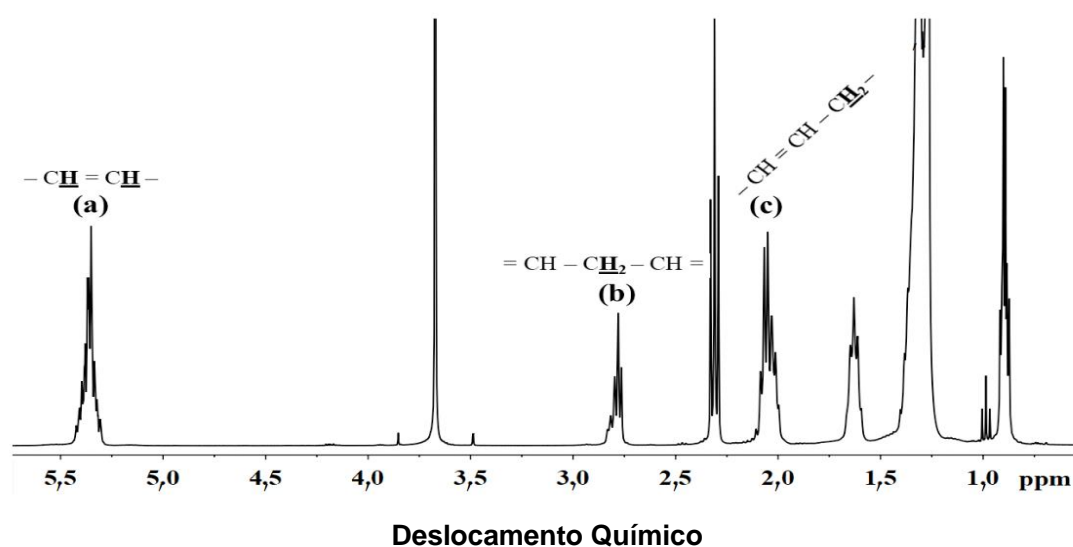
Tabela 10 – Valores dos períodos de indução (PI) e das constantes de velocidade (k) das amostras analisadas

Amostras	PI (h)	k (h^{-1})
B.C	7,01	0,44
B.E	9,61	0,30
B.Cu	1,15	2,01
B.Cu.E	1,38	1,85
B.Fe	1,60	1,71
B.Fe.E	1,68	1,58

Fonte: a própria autora (2022).

Sabe-se que diversos sinais de RMN podem fornecer diferentes informações sobre grupos funcionais em moléculas orgânicas, representando bons pontos para analisar o processo de oxidação em óleos, uma vez que esses compostos podem causar mudanças espectrais. Desse modo, no presente trabalho, analisamos as intensidades dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos durante o processo de oxidação das amostras de biodiesel. Os deslocamentos químicos característicos usados foram: 5,30-5,43 ppm para os hidrogênios olefínicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$), 2,74-2,79 ppm para os hidrogênios bisalílicos ($=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) e 1,98-2,04 ppm para os hidrogênios alílicos ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) (ANDERSON; FRANZ, 2012; PARKER et al., 2014). O espectro de ^1H RMN do biodiesel analisado, antes da degradação, com os deslocamentos químicos dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos é mostrado na Figura 13.

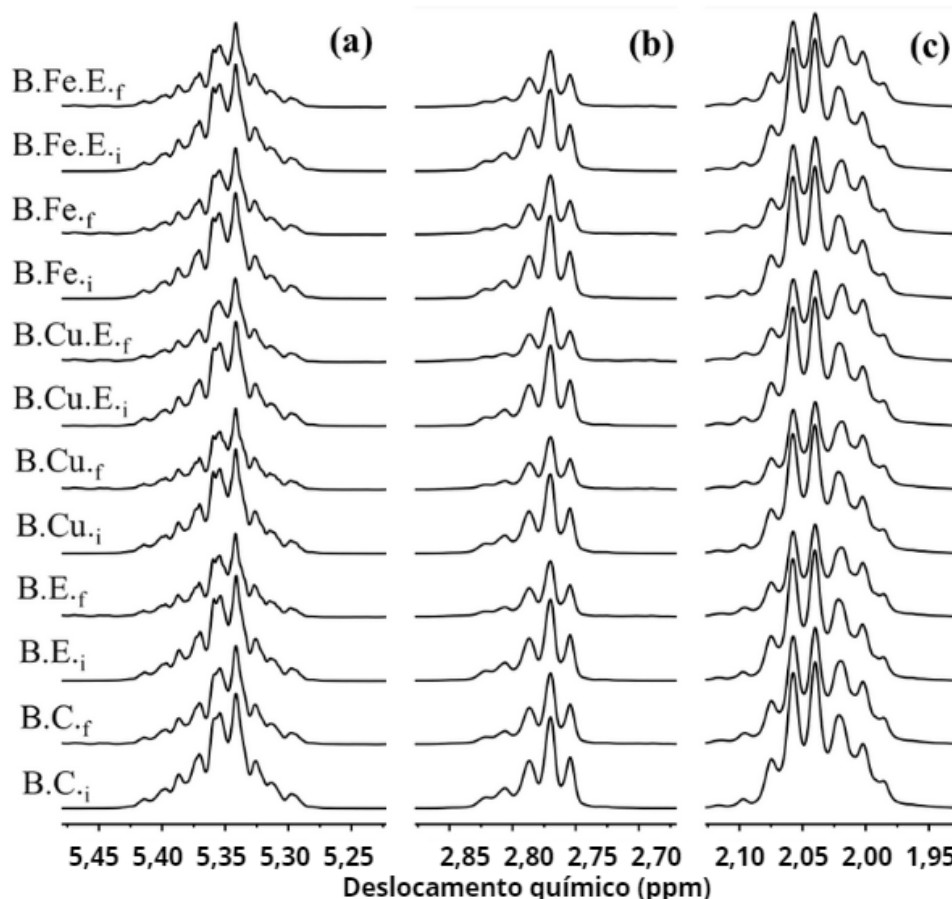
Figura 13 – Espectro de ^1H RMN do biodiesel (400 MHz, CDCl_3 , temperatura ambiente) dos deslocamentos químicos dos hidrogênios olefínicos **(a)**, hidrogênios bisalílicos **(b)** e hidrogênios alílicos **(c)**. As regiões apresentadas são as que foram integradas



Fonte: a própria autora (2022).

As regiões dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos dos espectros de ^1H RMN obtidos para as amostras de biodiesel com íons metálicos e extrato de alecrim são apresentados na Figura 14.

Figura 14 – Sinais iniciais (i) e finais (f) dos hidrogênios olefínicos (a), hidrogênios bisalílicos (b) e hidrogênios alílicos (c) detectados por ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , temperatura ambiente) para as amostras B.C, B.E, B.Cu, B.Cu.E, B.Fe e B.Fe.E.



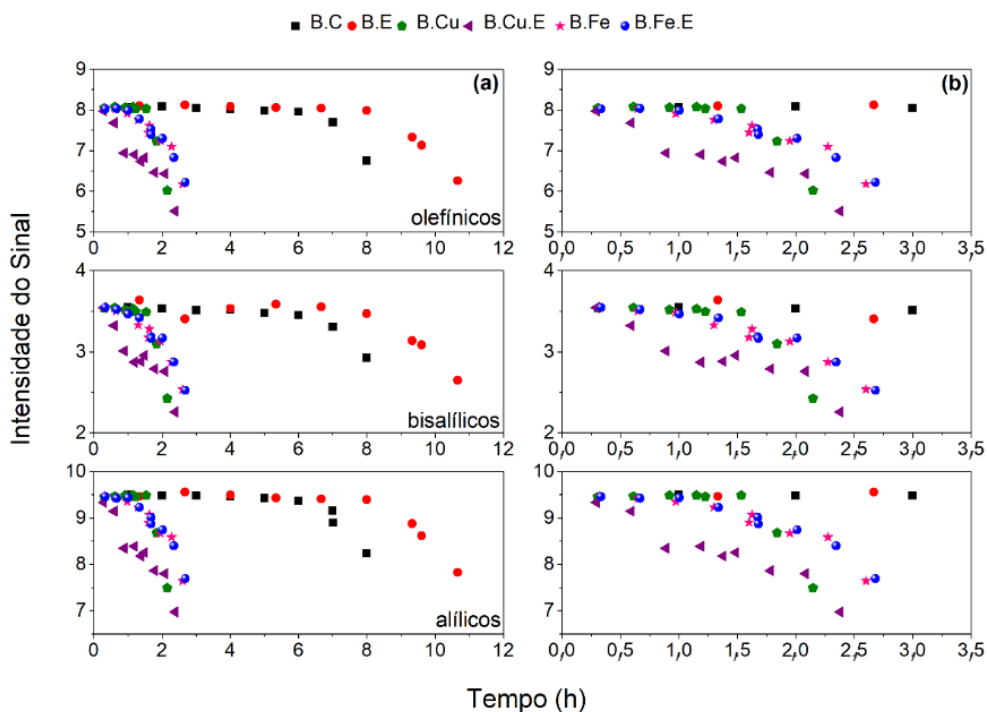
Abreviação: B.C (biodiesel controle); B.E. (biodiesel+extrato); B.Cu.(biodiesel+Cu); B.Cu.E. (biodiesel+Cu+extrato); B.Fe (biodiesel+Fe); B.Fe.E. (biodiesel+Fe+extrato);

Fonte: a própria autora (2022).

Visualmente as regiões de integração mostradas na Figura 14 não apresentaram uma larga variação em seus sinais espectrais para os ensaios analisados. Desse modo, as regiões de integração foram apresentadas em gráficos, onde são mostradas as intensidades dos sinais em função do tempo de análise.

A Figura 15 apresenta a variação das intensidades de sinais dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos para as amostras analisadas, através do processo de degradação em função do tempo de análise. A Figura 15a mostra todos os dados para as seis amostras estudadas e, do lado direito, a Figura 15b apresenta os dados com um corte na escala em 3,5 h, para possibilitar melhor visualização e análise gráfica.

Figura 15 – Mudança nas intensidades dos sinais dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos para as amostras B.C, B.E, B.Cu, B.Cu.E, B.Fe e B.Fe.E: **(a)** gráfico em escala normal e **(b)** Escala ampliada em 3,5 h .



3,5

Fonte: a própria autora (2022).

A partir da Figura 15 pode-se observar que as intensidades dos hidrogênios olefínicos para a amostra B.C. permaneceu aproximadamente constante até 6 h de análise, decaindo a partir da proximidade do tempo correspondente ao seu período de indução de 7,01 h. Para a amostra B.E., contendo o extrato antioxidante de alecrim, a intensidade do sinal permaneceu aproximadamente constante até as 8 h de análise, decaindo perto do seu período de indução de 9,61 h.

A intensidade dos hidrogênios olefínicos para a amostra com cobre permaneceu constante, até aproximadamente 1,5 h, decaindo após esse tempo. Entretanto, a amostra B.Cu.E, com um período de indução maior, mostrou um decaimento em sua respectiva intensidade de sinal desde o início da análise, apresentando uma maior variação na intensidade do sinal. As amostras B.Fe e B.Fe.E mostraram comportamentos bastante similares, além de períodos de indução próximos. Ambas amostras permaneceram com suas intensidades aproximadamente constantes até 1 h de análise, com uma queda subsequente, apresentando, praticamente, a mesma variação na intensidade do sinal.

A respeito das intensidades dos hidrogênios bisalílicos e alílicos (Figura 15), o comportamento de todas as seis amostras foram similares àqueles apresentados no parágrafo anterior em relação aos hidrogênios olefínicos, mostrando apenas algumas variações nas intensidades dos sinais. Em geral, observou-se que as amostras contendo o extrato apresentaram maiores variações em suas intensidades. Tais variações de intensidades, nos três grupos analisados, indicam que eles sofrem preferencialmente o ataque durante o processo de oxidação (TYL; BRECKER; WAGNER, 2008).

Tyl, Brecker e Wagner (2008) estudaram as mudanças no perfil espectral de ácidos graxos de óleos de peixe usando ^1H RMN. As intensidades dos sinais dos hidrogênios olefínicos e bisalílicos tiveram queda durante o processo de degradação de suas amostras, enquanto que as intensidades dos hidrogênios alílicos permaneceram constantes, sem mudanças. De modo geral, sabe-se que a probabilidade da oxidação lipídica aumenta de acordo com o número de hidrogênios alílicos presente no óleo (COSGROVE; CHURCH; PRYOR, 1987). Entretanto, nas amostras de biodiesel analisadas no presente trabalho, observou-se uma queda nas intensidades dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos (Figuras 14 e 15). Tyl, Brecker e Wagner (2008) estudaram a degradação do óleo a uma temperatura de 40 °C e, no presente trabalho, a degradação foi realizada a 110 °C. Assim, há a possibilidade da ruptura das três ligações químicas analisadas no biodiesel, formando uma maior quantidade de produtos secundários, implicando na queda das intensidades dos sinais.

Os hidrogênios olefínicos estão relacionados com a quantidade de ésteres insaturados presente nas amostras (DE FREITAS et al., 2019). Em todas as amostras a intensidade do sinal desses hidrogênios diminui durante a degradação do biodiesel. Sabe-se também que as cadeias de ácidos graxos são reativas com a molécula de oxigênio (KNOTHE, 2007), confirmando a degradação das amostras. Os grupos bisalílicos são susceptíveis a abstração do hidrogênio, e também possuem uma alta probabilidade a iniciação da reação de peroxidação (DEVI; DAS; DEKA, 2019). A variação na intensidade também corrobora a degradação do biodiesel. A dissociação das ligações C-H nas posições alílicas é maior que nas regiões bisalílicas, sendo 332 kJ mol^{-1} e 272 kJ mol^{-1} , respectivamente. Assim, os ésteres de ácidos graxos com ligações duplas interrompidas com metileno são mais susceptíveis a oxidação que os metis ésteres monoinsaturados (AKHLAGHI et al., 2015).

A presença de moléculas com propriedades antioxidantes deveria prevenir a oxidação e manter a composição de ácidos graxos das amostras constante (TYL; BRECKER; WAGNER, 2008). Esse comportamento foi observado na amostra B.E (Figura 15), na qual as intensidades dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos permaneceram aproximadamente constantes até as 8 h de degradação, indicando a eficiência do extrato de alecrim como um antioxidante natural para o biodiesel, concordando com os dados obtidos a partir do equipamento Rancimat. Assim como informado na literatura, a ação do extrato como antioxidante, retardando o processo de oxidação, pode ser ocasionado devido aos seus compostos fenólicos, tais como: carnosol, rosmanol, ácido ursólico, etc (SOLIMAN et al., 2016). Os compostos do extrato podem doar elétrons a radicais reativos, tornando-os menos reativos e mais estáveis, prevenindo-os de atingir as moléculas e assim retardando o processo de oxidação (SOLIMAN et al., 2016).

As amostras B.Fe e B.Fe.E (Figura 15) não apresentaram mudanças substanciais, indicando a ineficiência do extrato na presença dos Fe^{3+} . Chendynski et al. (2019) observaram um comportamento similar quando investigando a degradação do biodiesel com adição de extrato de amora na presença de íons de ferro originados pela corrosão de aço-prata.

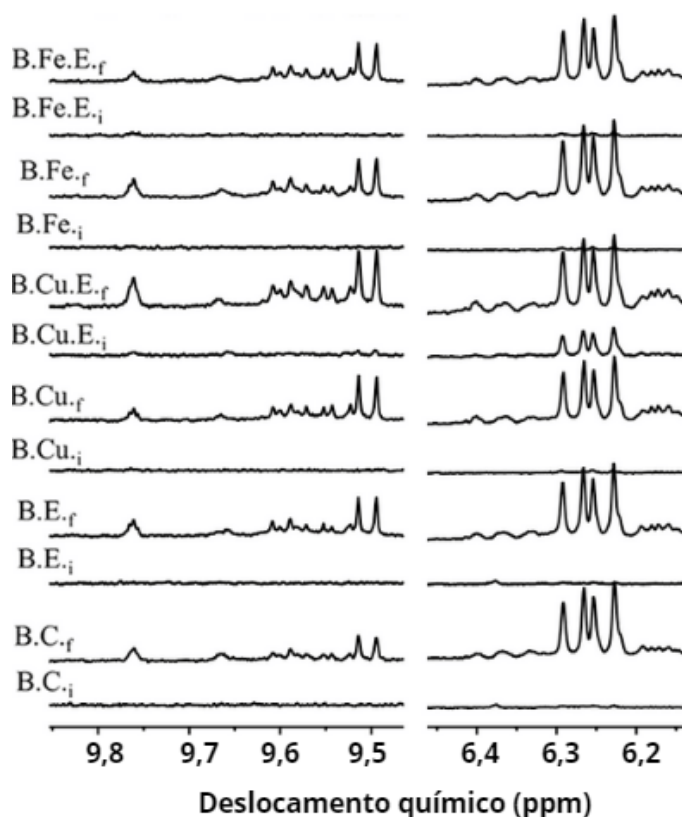
O extrato não manteve a composição de ésteres metílicos constante, embora os dados obtidos pelo equipamento Rancimat indiquem uma melhor estabilidade oxidativa nessa amostra. Pode-se observar que o extrato estava interferindo na amostra até 1 h de degradação, tentando estabilizar a queda das intensidades.

A formação da maioria dos componentes secundários no processo de oxidação também foi investigada usando a técnica de 1H RMN. Tyl, Brecker e Wagner (2008) observaram a formação de produtos de oxidação como propanal e 2-propenal, em óleos de capelin, após 30 dias de degradação. O propanal possui deslocamentos químicos em aproximadamente 9,8 ppm e, o 2-propenal possui deslocamentos químicos em 9,5 – 9,6 ppm e entre 6,2 e 6,5 ppm. Martínez-Yusta, Guillén (2014) estudaram alimentos fritos em azeite de oliva com o objetivo de observar mudanças nas concentrações de grupos acil e de alguns componentes formados como aldeídos, grupos epóxi estearil, álcoois primários e secundários. Pode-se observar que no início dos experimentos as amostras não apresentaram sinais de produtos de oxidação mas, durante o processo de degradação, os sinais de $-CHO((E)-2\text{-alcenos})$ a 9,49 ppm, –

CHO((E,E)-2,4-alcadienos) a 9,52 ppm e -CHO (n-alcacos) a 9,75 ppm apareceram, indicando a formação de aldeídos, produtos da oxidação.

A Figura 16 mostra os sinais dos produtos de oxidação formados nas amostras de biodiesel durante o processo de degradação. O índice *i* representa o tempo inicial e o índice *f* indica o tempo final para cada amostra analisada.

Figura 16 – Sinais de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , temperatura ambiente) dos produtos de oxidação formados nas amostras de biodiesel com íons metálicos e extrato natural de alecrim durante o processo de degradação



Fonte: a própria autora (2022).

Na Figura 16 são mostradas as mesmas regiões relacionadas aos produtos de oxidação observados por Tyl, Brecker e Wagner (2008) e Martínez-Yusta, Guillén (2014). Pode-se observar que para todas as amostras no tempo inicial (índice *i*) nenhum sinal é apresentado, exceto na amostra B.Cu.E. Quando analisando os tempos finais (índice *f*), quando as amostras estão degradadas, para todas as 6 amostras, os deslocamentos químicos dos produtos de oxidação estão presentes. Tal

fato confirma a degradação do biodiesel.

Assim, há uma correlação entre os PI, k e as intensidades dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos, mostrando que os PI de cada amostra foram obtido perto do decaimento das intensidades dos componentes das amostras, e além disso, a variação das intensidades pode indicar o estágio da reação de oxidação, assim como a formação de produtos de degradação. Logo, a análise por espectroscopia RMN pode adicionar informações relevantes na compreensão das reações de oxidação do biodiesel.

3.4 CONCLUSÕES

As amostras de biodiesel mostraram queda nas intensidades dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos durante o processo de degradação do biodiesel. Os íons metálicos, ferro e cobre, atuaram como catalisadores na degradação das amostras e o extrato de alecrim mostrou-se um bom antioxidante natural, retardando a degradação do biodiesel e inibindo a propagação radicalar. O extrato natural de alecrim mostrou-se ineficiente em melhorar a estabilidade oxidativa do biodiesel com as concentrações de metais usadas. Em concentrações de íons metálicos próximas de 1 mg L^{-1} , o extrato poderia ter apresentado maior eficiência. Além disso, foi possível encontrar uma relação entre os PI e as intensidades de decaimento dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos. A espectroscopia de RMN mostrou-se eficiente, fornecendo informações relevantes a respeito da reação de oxidação do biodiesel e da formação de produtos secundários da reação de oxidação.

CAPÍTULO 4

*Estudo da termo-oxidação do biodiesel a partir da
Ressonância Magnética Nuclear (^1H RMN)*

Resumo

O biodiesel é considerado um biocombustível adequado para a substituição do diesel. Ele possui em sua composição ácidos graxos insaturados, o que o torna facilmente suscetível à degradação. O objetivo do presente trabalho foi investigar a termo-oxidação do biodiesel a partir da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (^1H RMN). A partir da RMN foi possível analisar a intensidade dos sinais das ligações químicas dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos, obter as proporções dos grupos acil oleico, linoleico, linolênico e saturado além de observar e caracterizar alguns produtos de oxidação. Dois conjuntos de biodiesel foram analisados, o primeiro foi oxidado no equipamento Rancimat a 110 °C durante 8 h e, o segundo, foi oxidado em estufa durante 17 dias a uma temperatura de 50 °C. O biodiesel oxidado à 110 °C apresentou um maior grau de degradação quando comparado às amostras oxidadas a 50 °C. As amostras apresentaram um aumento nas proporções de saturações. Foi possível observar a formação de produtos de oxidação como hidroperóxidos e aldeídos.

Palavras-chave: Biodiesel, RMN, degradação, termo-oxidação, espectroscopia.

4.1 OBJETIVOS

4.1.2 Objetivo Geral

O presente trabalho propõe analisar o processo oxidativo de biodiesel comercial (B100), em temperaturas e períodos de oxidação diferentes, usando a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de prótons (^1H RMN).

4.1.3 Objetivos Específicos

- Extrair informações sobre o processo de degradação do biodiesel a partir da presença de hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos, a temperaturas de 110 °C e 50 °C;
- Inferir informações sobre a proporção de grupos acil presentes nas amostras (oleico, linoleico, linolênico e saturado).
- Inferir informações sobre a formação de produtos de oxidação gerados na degradação do biodiesel via RMN, sendo esta uma técnica não convencional, rápida e com alta sensibilidade de detecção.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Amostras

Para as análises, foi usada uma amostra de biodiesel comercial (B100) fornecida pelo Laboratório de Análise de Combustíveis (LPAC), da Universidade Estadual de Londrina (UEL), dentro dos parâmetros de conformidade.

4.2.2 Termo-Oxidação das Amostras

As amostras de biodiesel B100 (110°C-1h), B100 (110°C-3h), B100 (110°C-5h) e B100 (110°C-8h) foram degradadas a partir do método de aquecimento acelerado. Elas permaneceram no equipamento Rancimat em intervalos de tempo diferentes, sendo que B100 (110°C-1h) permaneceu por 1 hora, B100 (110°C-3h) por 3 horas, B100 (110°C-5h) por 5 horas e B100 (110°C-8h) por 8 horas. Após a retirada das amostras do Rancimat, elas foram colocadas em tubos de vidro para análises posteriores de ^1H NMR. A amostra controle B100 (110°C) foi mantida no equipamento Rancimat até obter-se o ponto de inflexão da curva.

As amostras de biodiesel B100 (50°C-3d), B100 (50°C-7d), B100 (50°C-11d) e B100 (50°C-17d) foram degradadas em estufa a 50 °C durante 17 dias. A amostra B100 (50°C-3d) foi mantida na estufa durante 3 dias, a amostra B100 (50°C-7d) por 7 dias, a amostra B100 (50°C-11d) por 11 dias e a amostra B100 (50°C-17d) por 17 dias. Em cada dia especificado, as amostras foram coletadas e colocadas em tubos de vidro para análises posteriores de ^1H RMN. A amostra B100 (50°C) foi mantida como amostra controle.

Para cada grupo de análises uma amostra controle foi mantida – B100 (110°C) e B100 (50°C) – sem qualquer termo-oxidação.

4.2.3 Determinação dos Períodos de Indução (PI) e Constantes de Velocidade (k)

As amostras B100 (50°C), B100 (50°C-3d), B100 (50°C-7d), B100 (50°C-11d), B100 (50°C-17d) e B100 (110°C) foram submetidas ao aquecimento

acelerado à 110 °C, usando o equipamento Rancimat (Marca Metrohm; Modelo 873), com taxa de insuflação de ar de 10 dm³ h⁻¹, segundo a norma internacional EN 14112. Os períodos de indução (PI) foram fornecidos pelo ponto de inflexão da curva da condutividade elétrica em função do tempo, gerada pelo software e, as constantes de velocidade foram determinadas através do ajuste linear do logaritmo natural como função do tempo, dos dados obtidos - em triplicatas - no Rancimat.

As amostras B100 (110°C-1h), B100 (110°C-3h), B100 (110°C-5h), B100 (110°C-8h) não tiveram seus respectivos períodos de indução obtidos uma vez que elas foram degradadas no próprio equipamento e, desse modo, não obteve-se curva de condutividade completa para as mesmas. Assim, apenas a amostra controle possui valor de período de indução.

4.2.4 Análise de Ressonância Magnética Nuclear

Para a aquisição dos espectros de RMN foi usado um espectrômetro operando a 9,4 T, 400 MHz (marca Bruker), da Universidade Estadual de Londrina. As amostras foram preparadas dissolvendo 50 µL de biodiesel em 600 µL de clorofórmio deuterado (CDCl₃ 99,8 % com 0,05 % (v/v) de Tetrametilsilano – TMS, marca Sigma Aldrich; Saint Louis, EUA). Os parâmetros aplicados nas análises foram: pulso simples, largura espectral de 8012 Hz, número de varreduras de 16 *scans*, tempo de relaxação de 1 s, largura de pulso de 90 ° e tempo de aquisição de 4,089 s. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm, usando como padrão interno o TMS.

Todos os espectros foram alinhados em uma fase de ordem zero e, as correções de linha base foram feitas para o intervalo de $\delta = -2,00$ ppm à 10,00 ppm, usando o *software* TopSpin (3.6.1). As regiões de integração do sinal espectral correspondendo aos carbonos metílicos na posição α em relação à carbonila (2,2-2,4 ppm), hidrogênios olefínicos (5,0-5,7 ppm), hidrogênios alílicos (1,8-2,2 ppm), hidrogênios bisalílicos (2,6-3,0 ppm), grupo metílico do grupo acil saturado ω -6 e ω -9 (i.e. linoleico e oleico) (0,83-0,93 ppm) e hidrogênios dos grupos metil acil ω -3 (0,93-1,03 ppm), foram realizadas usando uma rotina elaborada no *software* Matlab (2015). A área dos carbonos metílicos na posição α em relação à carbonila (2,2-2,4 ppm), que apresentam 6 prótons, presente originalmente na molécula de triglicerídeos, foi usada

para a realização das normalizações dos resultados obtidos. Os intervalos de integração foram previamente descritos na literatura (ANDERSON; FRANZ, 2012) e são usados no presente trabalho com adaptações.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sinais de RMN são uma ferramenta adequada para analisar a degradação do biodiesel pois podem fornecer informações específicas sobre componentes de grupos funcionais dos ácidos graxos. Analisando a variação das intensidades e deslocamentos químicos dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos, pode-se obter informações sobre a degradação do biodiesel. Os hidrogênios olefínicos ($-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}-$) possuem deslocamento químico característico em 5,30-5,43 ppm, os hidrogênios bisalílicos ($=\text{CH}-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2-\text{CH}=\text{CH}$) em 2,74-2,79 ppm e, os hidrogênios alílicos ($-\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) em 1,98-2,04 ppm (ANDERSON; FRANZ, 2012; PARKER et al., 2014).

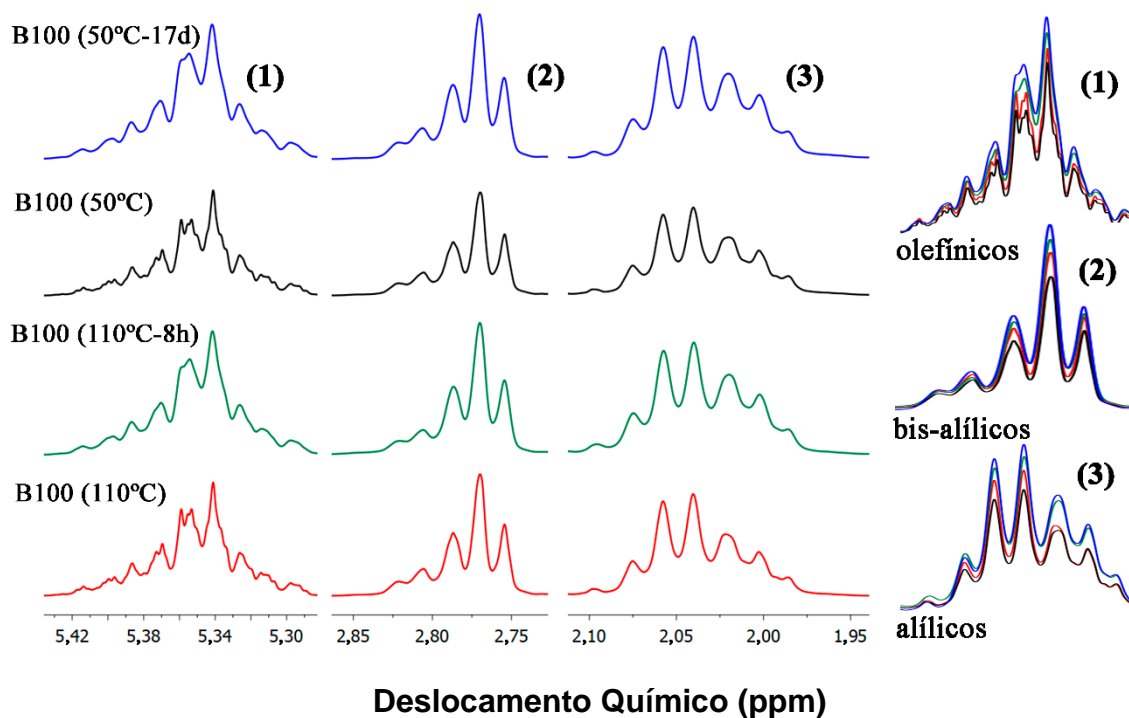
A Tabela 11 e a Figura 17 apresentam a intensidade dos sinais dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos das amostras controle e das duas amostras com maior grau de degradação dos dois conjuntos de experimentos.

Tabela 11 – Intensidade dos sinais dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos das amostras controle e das duas amostras com maior grau de degradação dos dois conjuntos de experimentos

Amostras	Olefínicos (5,0-5,7 ppm)	Bisalílicos (2,6-3,0 ppm)	Alílicos (1,8-2,2 ppm)
B100 (50°C)	7,55	3,08	8,96
B100 (50°C-17d)	7,54	3,06	8,86
B100 (110°C)	8,00	3,60	9,46
B100 (110°C-8h)	6,75	2,92	8,23

Fonte: a própria autora (2022).

Figura 17 – Sinal dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos das amostras controle e das duas amostras com maior grau de degradação dos dois conjuntos de experimentos



Fonte: a própria autora (2022).

Pode-se observar que as amostras B100 (50°C) e B100 (110°C) apresentaram uma queda na intensidade dos três sinais analisados, conforme é mostrado com os espectros sobrepostos à direita da figura 17. Em geral, a amostra B100 (50°C-17d) apresentou uma pequena variação nas intensidades dos sinais quando comparada à amostra controle e, a amostra B100 (110°C-8h) apresentou uma maior diferença no decréscimo das intensidades.

Os hidrogênios olefínicos são associados com os ésteres insaturados presentes nos óleos (DE FREITAS et al., 2019). Os hidrogênios bisalílicos possuem maiores chances de peroxidação (AKHLAGHI et al., 2015). Além disso, a quebra das ligações C-H nas posições alílicas é maior que nas bisalílicas (AKHLAGHI et al., 2015). Assim, essas diferenças nas intensidades dos sinais são originadas pela degradação do biodiesel, mostrando que a amostra B100 (110°C-8h) sofreu maior degradação do que a amostra B100 (50°C-17d). Além disso, o equipamento Rancimat

possui um fluxo de ar atmosférico, colaborando para um nível de degradação oxidativo mais elevado.

O biodiesel é produzido principalmente a partir de óleos vegetais e gorduras animais, sendo então composto por ácidos graxos insaturados e saturados. A instabilidade do biodiesel está diretamente correlacionada com a quantidade de cadeias insaturadas presente em sua estrutura, tais como grupos acil, oleicos, linoleicos e linolênicos. Durante o processo oxidativo as insaturações reagem formando compostos saturados (PULLEN; SAEED, 2012; YAAKOB et al., 2014).

De acordo com Guillén & Ruiz (2003) a determinação das proporções dos graus de insaturação dos diferentes grupos acil podem ser determinados por ^1H RMN, uma vez que a área de cada sinal do espectro de ^1H RMN é proporcional ao número de hidrogênios presente em cada amostra. Assim, a porcentagem das proporções dos grupos acil Linolênico (Ln), Linoleico (L), Oleico (O) e Saturado (S), de todas as amostras, foram calculados a partir das equações apresentadas por Guillén & Ruiz (2003) e são mostrados nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 – Porcentagens das proporções dos grupos acil Linolênico (Ln), Linoleico (L), Oleico (O) e Saturado (S), períodos de indução (PI) e constantes de velocidade (k) das amostras degradadas a 50 °C

Amostras	Ln (%)	L (%)	O (%)	S (%)	PI (h)*	k (h⁻¹)*
B100 (50°C)	7,30	37,00	32,10	23,60	9,09 ± 0,09	0,34 ± 0,01
B100 (50°C-3d)	7,40	36,60	32,30	23,70	7,66 ± 0,12	0,40 ± 0,02
B100 (50°C-7d)	7,40	36,50	32,40	23,70	7,31 ± 0,20	0,34 ± 0,02
B100 (50°C-11d)	7,40	36,20	32,40	24,00	6,00 ± 0,20	0,45 ± 0,02
B100 (50°C-17d)	7,20	36,20	32,40	24,20	4,64 ± 0,07	0,61 ± 0,01

* desvio padrão.

Fonte: a própria autora (2022).

Tabela 13 – Porcentagens das proporções dos grupos acil Linolênico (Ln), Linoleico (L), Oleico (O) e Saturado (S), das amostras degradadas a 100 °C no equipamento Rancimat

Amostras	Ln (%)	L (%)	O (%)	S (%)
B100 (110°C)*	4,50	50,10	27,30	18,10
B100 (110°C-1h)	4,50	48,70	26,90	19,90
B100 (110°C-3h)	4,50	48,20	26,80	20,50
B100 (110°C-5h)	4,40	47,60	26,80	21,20
B100 (110°C-8h)	2,60	37,40	27,60	32,40

A amostra controle B100 (110°C) apresentou um PI de 9,61 h e constante de velocidade k de 0,44 h⁻¹.

Fonte: a própria autora (2022)

Pode-se observar que para as amostras oxidadas em estufa a 50 °C, as mesmas não apresentaram mudanças substanciais quando analisado as porcentagens de ácidos graxos insaturados, mas, um aumento de aproximadamente 0,6 % é notado quanto aos componentes saturados. Para essas amostras, os períodos de indução (PI) no equipamento Rancimat foram obtidos assim como suas respectivas constantes de velocidade da reação (k), para cada dia de análise. Embora não seja extremamente preciso avaliar o processo de degradação para essas amostras a partir do cálculo das porcentagens dos grupos acil, mencionados acima, via ¹H RMN, os resultados do equipamento Rancimat mostraram que a degradação realmente ocorreu na amostra, uma vez que os períodos de indução (PI) diminuíram ao longo dos dias enquanto as constantes de velocidade (k) aumentaram, indicando a oxidação das amostras.

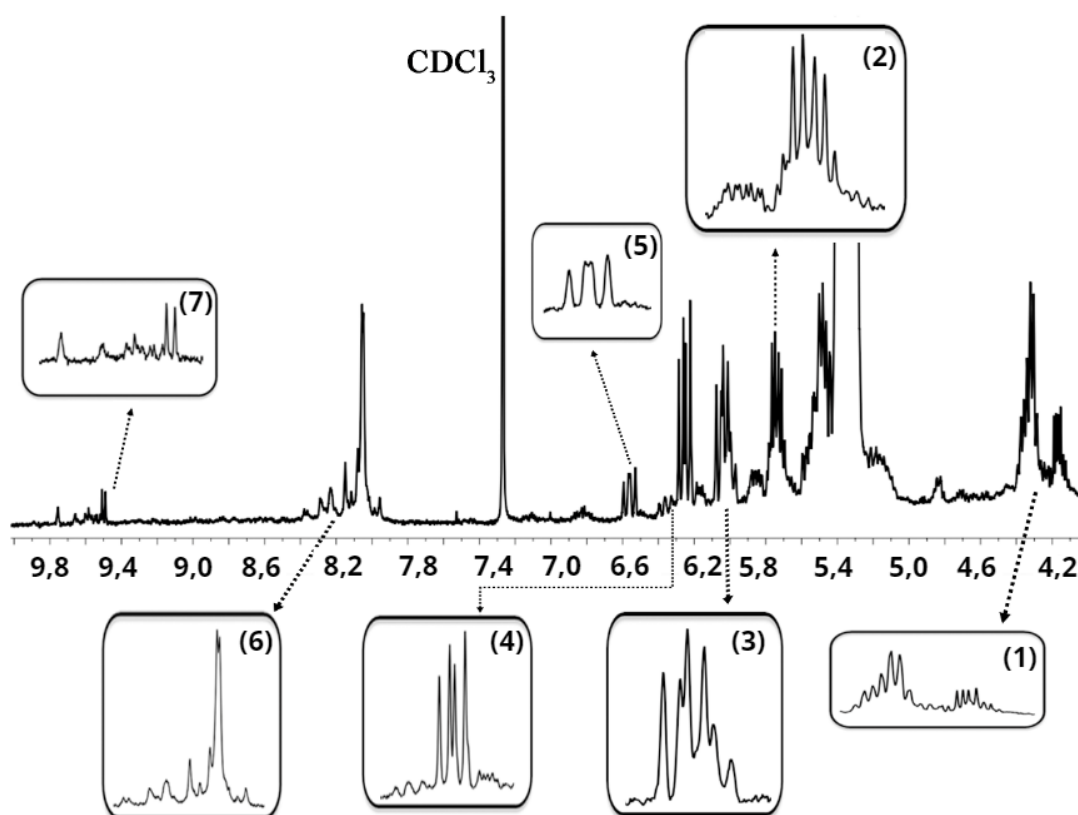
Entretanto, quando considerando as amostras degradadas no equipamento Rancimat, expressivas mudanças são observadas. A composição dos grupos acil linolênico e linoleico decresceram 1,9 % e 12,7 %, respectivamente, enquanto o grupo acil saturado apresentou acréscimo de 14,3 %. A partir desses dados é possível inferir que o biodiesel a temperatura de 110 °C apresentou níveis de degradação elevados quando comparado às outras amostras (degradadas a 50 °C), principalmente ocasionado devido ao alto aumento dos compostos saturados, pois estes são produtos do processo de degradação.

Sabe-se que a formação dos produtos da reação de oxidação pode ser investigada a partir da espectroscopia ¹H RMN, analisando os diferentes

deslocamentos químicos. Existem algumas pesquisas sobre possíveis produtos de oxidação gerados em degradação de óleos. Tyl et al. (2008) investigaram a formação dos produtos de oxidação propanal e 2-propenal em óleo de Capelin, após 30 dias de degradação. Martinez-Yusta & Guillén (2019) estudaram alimentos fritos em azeite de oliva, para observar a evolução da concentração de alguns compostos durante a oxidação, como por exemplo aldeídos. Após a degradação, eles observaram produtos como $-CHO((E)-2\text{-alcenos})$, $-CHO((E,E)-2,4\text{-alcadienos})$, $-CHO (n\text{-alcanos})$. Alonso et al. (2011) estudaram a estabilidade do azeite de oliva por RMN, especificando alguns produtos de degradação, como a formação de hidroperóxidos. Guillén & Ruiz (2005) também observaram a formação de hidroperóxidos na degradação de três diferentes óleos.

Analisando os espectros das amostras B100 (110°C-8h) e B100 (50°C-17d), foi possível observar apenas dois sinais de deslocamentos químicos similares entre elas, 4,25-4,10 ppm e 7,95-8,25 ppm. O primeiro deslocamento químico mencionado é característico de 1,3 diacilglicerol ($-CH-$) (ANDERSON; FRANZ, 2012) e, o segundo, é possivelmente derivado de hidroperóxidos (GUILLÉN; RUIZ, 2005), diretamente relacionado à degradação do biodiesel. Porém, a amostra degradada a 110 °C, durante 8 horas, apresentou diferentes deslocamentos químicos em seu espectro de 1H RMN. Tais deslocamentos químicos são mostrados na Tabela 14 e Figura 18.

Figura 18 – Espectro de ^1H RMN da amostra B100 (110°C-8h) e os produtos formados durante sua termo-oxidação



Fonte: a própria autora (2022).

Tabela 14 – Deslocamentos químicos dos produtos de oxidação presentes na amostra B100 (110°C-8h)

Molécula	δ (ppm)	Referência
(1) >CH-OOH (próton metino do grupo hidroperóxido)	4,25-4,40	(ALONSO-SALCES; HOLLAND; GUILLOU, 2011)
(2) -CH=CH-CH=CH- (hidroperóxidos)	5,90-5,65	(ALONSO-SALCES; HOLLAND; GUILLOU, 2011)
(3) -CH=CH-CH=CH- (hidroperóxidos)	6,16-5,90	(ALONSO-SALCES; HOLLAND; GUILLOU, 2011; GUILLÉN; RUIZ, 2005)
(4) Propanal e 2-propenal (C ₃ H ₆ O/ C ₃ H ₄ O)	6,48-6,20*	(TYL; BRECKER; WAGNER, 2008)
(5) -OOH (derivados de hidroperóxidos)	6,55-6,50	(GUILLÉN; RUIZ, 2005)
(6) -OOH (derivados de hidroperóxidos)	8,40-8,35	(GUILLÉN; RUIZ, 2005)
(7) Propanal e 2-propenal (C ₃ H ₆ O/ C ₃ H ₄ O)	9,80-9,50*	(TYL; BRECKER; WAGNER, 2008)

*Existem outros dois deslocamentos químicos para esses componentes no espectro de RMN (2,45 ppm e 1,1 ppm) mas, nas amostras de biodiesel esses deslocamentos químicos estão sobrepostos com outros sinais do biodiesel.

Fonte: a própria autora (2022).

A partir dos deslocamentos químicos analisados na amostra B100 (110°C-8h) pode-se observar a formação de compostos de hidroperóxidos. Esses produtos são formados no processo degradativo do biodiesel e, são bem estabelecidos na literatura (KUMAR, 2017; SORATE; BHALE, 2015). O processo de oxidação inicia-se com a peroxidação, removendo um hidrogênio ligado ao carbono, gerando radicais livres. Os radicais livres peróxidos são altamente reativos à extração

do hidrogênio, formando outro radical e o hidroperóxido (JAIN; SHARMA, 2010; KUMAR, 2017). Os compostos propanal e 2-propenal são produtos voláteis formados durante a oxidação de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) (TYL; BRECKER; WAGNER, 2008).

Mantovani *et al.* (2018) e Chendynski *et al.* (2019) estudaram a formação de radicais livres em amostras de biodiesel durante termo-oxidação via Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), a temperaturas de 70 °C e 110 °C, respectivamente. Segundo seus trabalhos, nota-se que as amostras degradadas a 110 °C possuem maiores quantidades de radicais livres no processo degradativo, indicando que, nesta temperatura, o biodiesel sofre maior degradação. O mesmo comportamento foi observado nas amostras estudadas neste trabalho.

As análises de biodiesel via espectroscopia ^1H RMN é mais rápida que os métodos tradicionais usando o equipamento Rancimat, no qual demora horas para a realização de uma análise, e, também, usa uma pequena quantidade de amostra. Assim, a espectroscopia ^1H RMN se apresenta como uma possível alternativa para o estudo da oxidação do biodiesel.

4.4 CONCLUSÕES

As amostras de biodiesel apresentaram queda nas intensidades dos hidrogênios olefínicos, bisalílicos e alílicos durante o processo de termo-oxidação. A amostra degradada a 110 °C mostrou decaimento mais expressivo nas intensidades, indicando maior grau de degradação. Observou-se um aumento nas proporções do grupo acil saturado em ambas as amostras, mas a amostra degradada a 110 °C apresentou níveis superiores. Essa mesma amostra apresentou diferentes deslocamentos químicos em seu espectro de RMN, indicando a formação de produtos como hidroperóxidos, propanal e 2-propenal. Além disso, a determinação dos grupos acil mostrou-se útil no monitoramento do processo degradativo do biodiesel a altas temperaturas em presença de oxigênio.

REFERÊNCIAS

AKHLAGHI, S.; HEDENQVIST, M. S.; BRAÑA, M. T. C.; BELLANDER, M.; GEDDE, U. W. Deterioration of acrylonitrile butadiene rubber in rapeseed biodiesel. **Polymer degradation and stability**, v. 111, p. 211–222, 2015.

AKITT, J. W.; MANN, B. E. **NMR and Chemistry: An introduction to modern NMR spectroscopy**. [S. l.]: Crc Press, 2000.

ALONSO-SALCES, R. M.; HOLLAND, M. V.; GUILLOU, C. ¹H-NMR fingerprinting to evaluate the stability of olive oil. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 2041–2046, 2011.

ANDERSON, L. A.; FRANZ, A. K. Real-time monitoring of transesterification by ¹H NMR spectroscopy: catalyst comparison and improved calculation for biodiesel conversion. **Energy & Fuels**, v. 26, n. 10, p. 6404–6410, 2012.

ANGILELLI, K. G.; SILVA, L. R. C.; CHENDYNSKI, L. T.; DA SILVA, P. R. C.; BORSATO, D. The Effect of Catalysis on the Parameters of the Oxidation Reaction of Biodiesel. **ChemistrySelect**, v. 2, n. 20, p. 5453–5457, 2017.

BAILEY, A. E. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 5th ed. New York: John Wiley, 1996.

BAO, Y.; ZHU, Y.; REN, X.; ZHANG, Y.; PENG, Z.; ZHOU, G. Formation and Inhibition of Lipid Alkyl Radicals in Roasted Meat. **Foods**, v. 9, n. 5, p. 572, 4 May 2020.

BARCLAY, L. Do spin traps also act as classical chain-breaking antioxidants? a quantitative kinetic study of phenyl tert-butyl nitron (PBN) in solution and in liposomes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 7, p. 1079–1090, 2000.

BOLLI, R.; PATEL, B. S.; JEROUDI, M. O.; LAI, E. K.; MCCAY, P. B. Demonstration of free radical generation in “stunned” myocardium of intact dogs with the use of the spin trap α -phenyl N-tert-butyl nitron. **Journal of Clinical Investigation**, v. 82, n. 2, p. 476–485, 1988.

BORSATO, D.; GALVAN, D.; PEREIRA, J. L.; ORIVES, J. R.; ANGILELLI, K. G.; COPPO, R. L. Kinetic and thermodynamic parameters of biodiesel oxidation with synthetic antioxidants: simplex centroid mixture design. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 11, p. 1984–1992, 2014.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de Janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. Diário Oficial da União, 2005. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11097.htm>.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB)**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/agricultura->

familiar/biodiesel/programa-nacional-de-producao-e-uso-do-biodiesel-pnpb>. Acesso em: 04 fev. 2022.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **CNPE mantém percentual de 10% de biodiesel no diesel em 2022**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/noticias/cnpe-mantem-percentual-de-10-de-biodiesel-no-diesel-em-2022-3>>. Acesso em: 21 jan. 2022.

BRASIL. Resolução nº 798, de 1º de agosto de 2019. Altera a Resolução ANP nº 45, de 25 de agosto de 2014, que estabelece as especificações de qualidade de biodiesel, para determinar a obrigatoriedade da aditivação do biodiesel com antioxidante e estabelecer novo limite de especificação da característica estabilidade à oxidação. Diário Oficial da União, 2019. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-798-de-1-de-agosto-de-2019-208544998>>.

BREIDENICH, C.; MAGRAW, D.; ROWLEY, A.; RUBIN, J. W. The Kyoto protocol to the United Nations framework convention on climate change. **American Journal of International Law**, v. 92, n. 2, p. 315–331, 1998.

BUETTNER, G R. Spin Trapping - Electron-Spin-Resonance Parameters of Spin Adducts. **Free Radical Bio. Med.**, v. 3, n. 4, p. 259–303, 1987.

BUETTNER, Garry R.; MASON, R. P. Spin-trapping methods for detecting superoxide and hydroxyl free radicals in vitro and in vivo. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. C, p. 127–133, 1990.

BUNCE, N. J. Introduction to the interpretation of electron spin resonance spectra of organic radicals. **Journal of Chemical Education**, v. 64, n. 11, p. 907, 1987.

BUSSLER, L.; IZIDA, T.; LIMA, S. M.; ANDRADE, L. H. C. Comparison of optical spectroscopy techniques for monitoring the stages of thermoxidation of soybean biodiesel. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 217, p. 190–196, 2019.

CARVALHO, M. S.; MENDONÇA, M. A.; PINHO, D. M. M.; RESCK, I. S.; SUAREZ, P. A. Z. Chromatographic analyses of fatty acid methyl esters by HPLC-UV and GC-FID. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 763–769, 2012.

CHENDYNSKI, L T; CORDEIRO, T.; MESSIAS, G. B.; MANTOVANI, A. C. G.; SPACINO, K. R.; ZERAIK, M. L.; BORSATO, D. Evaluation and application of extracts of rosemary leaves, araçá pulp and peel of bacuri in the inhibition of the oxidation reaction of biodiesel. **Fuel**, v. 261, p. 116379, 2020.

CHENDYNSKI, L T; MANTOVANI, A. C. G.; SAVADA, F. Y.; MESSIAS, G. B.; SANTANA, V. T.; SALVIATO, A.; DI MAURO, E.; BORSATO, D. Analysis of the formation of radicals in biodiesel in contact with copper and metallic alloys via electronic paramagnetic resonance (EPR). **Fuel**, v. 242, p. 316–322, 2019.

CHENDYNSKI, L.T.; ANGILELLI, K. G.; FERREIRA, B. A. D.; BORSATO, D. Mathematical Modeling Applied Transesterification Reaction Product of Synthesis from Animal Fats and Vegetable Oil. **Revista Virtual de Química**, v. 8, 2016.

CHENDYNSKI, Letícia T; SIGNORI ROMAGNOLI, E.; DA SILVA, P. R. C.; BORSATO, D. Activation Energy's Deviations of the Oxidation Reaction of Biodiesel in Mixtures with Ferric Ions and Natural Antioxidant. **Energy & Fuels**, v. 31, n. 9, p. 9613–9618, 2017.

CID-ORTEGA, S.; GUERRERO-BELTRÁN, J. A. Propiedades funcionales de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos**, v. 6–2, p. 47–63, 2012.

COMIN, M.; DE SOUZA, A. C. D.; ROVEDA, A. C.; YAHAGI, S. S.; DE OLIVEIRA, L. H.; AMARAL, M. S.; SILVA, C. A. A.; FIORUCCI, A. R.; GOMES, R. S.; CAIRES, A. R. L. Alternatives binary and ternary blends and its effects on stability of soybean biodiesel contaminated with metals. **Fuel**, v. 191, p. 275–282, 2017.

COPPO, R. L.; BORSATO, D.; PEREIRA, J. L.; DA SILVA, H. C. FAME Storage Time in an Optimized Natural Antioxidant Mixture. **Journal of Renewable Energy**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

COSGROVE, J. P.; CHURCH, D. F.; PRYOR, W. A. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. **Lipids**, v. 22, n. 5, p. 299–304, 1987.

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

CREMONEZ, P. A.; FEROLDI, M.; DE JESUS DE OLIVEIRA, C.; TELEKEN, J. G.; MEIER, T. W.; DIETER, J.; SAMPAIO, S. C.; BORSATTO, D. Oxidative stability of biodiesel blends derived from different fatty materials. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 135–140, 2016.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: a critical overview on the current status and perspectives at the academy and industry. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 776–792, 2009.

DAMIAN, G.; PETRISOR, D.; MICLAUS, V. Free radicals detection by ESR PBN spin-trap technique. **Journal of Optoelectronics and Advanced Materials**, v. 9, n. 4, p. 1010–1013, 2007.

DAVIES, K. J. A. **Oxidative damage & repair: Chemical, biological and medical aspects**. [S. l.]: Elsevier, 2013.

DAVIES, M. J. (i) Rapid freezing. v. 44, p. 149–173, 1987.

DE FREITAS, O. N.; RIAL, R. C.; CAVALHEIRO, L. F.; DOS SANTOS BARBOSA, J. M.; NAZÁRIO, C. E. D.; VIANA, L. H. Evaluation of the oxidative stability and cold filter plugging point of soybean methyl biodiesel/bovine tallow methyl biodiesel blends. **Industrial Crops and Products**, v. 140, p. 111667, 2019.

DEVI, A.; DAS, V. K.; DEKA, D. A green approach for enhancing oxidation stability including long storage periods of biodiesel via *Thuja orientalis* L. as an antioxidant additive. **Fuel**, v. 253, p. 1264–1273, 2019.

DIKALOV, S. I.; MASON, R. P. Reassignment of organic peroxy radical adducts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 7–8, p. 864–872, Oct. 1999.

DWIVEDI, G.; SHARMA, M. P. Impact of cold flow properties of biodiesel on engine performance. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 650–656, 2014.

EIDELS-DUBOVOI, S.; BELTRÁN-LÓPEZ, V. Powder pattern effects in the ESR spectrum of polycrystalline MgO:Mn²⁺. **Journal of Magnetic Resonance (1969)**, v. 74, n. 1, p. 94–104, 1987.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. EN 14112: Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test). Berlin, 2016.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. da S.; SCABIO, 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.

FRANKEL, E. N. **Lipid Oxidation**. 2nd ed. [S. l.]: Woodhead Publishing, 2005.

FUJINO, H.; UKAI, M. Fat and Oil Oxidation by Electron Spin Resonance (ESR) Spin-Trapping Method. v. 3, p. 584–591, 2013.

GALVAN, D.; CHENDYNSKI, L. T.; MANTOVANI, A. C.; QUADRI, M.; KILLNER, M.; CREMASCO, H.; BORSATO, D. Mathematical Modeling of the Transesterification Reaction by Finite Elements: Optimization of Kinetic Parameters Using the Simplex Sequential Method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 2, p. 313–319, 2020.

GERSON, F.; HUBER, W. **Electron Spin Resonance Spectroscopy of Organic Radicals**. [S. l.: s. n.], 2004.

GUILLÉN, M. D.; GOICOECHEA, E. Detection of primary and secondary oxidation products by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) in sunflower oil during storage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10729–10736, 2007.

GUILLÉN, M. D.; RUIZ, A. Oxidation process of oils with high content of linoleic acyl groups and formation of toxic hydroperoxy- and hydroxyalkenals. A study by ¹H nuclear magnetic resonance. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 14, p. 2413–2420, 2005.

GUILLÉN, M. D.; RUIZ, A. Rapid simultaneous determination by proton NMR of unsaturation and composition of acyl groups in vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 11, p. 688–696, 2003.

HAIRE, L. D.; KRYGSMAN, P. H.; JANZEN, E. G.; OEHLER, U. M. Correlation of radical structure with EPR spin adduct parameters: utility of the proton, carbon-13, and nitrogen-14 hyperfine splitting constants of aminoxyl adducts of PBN-nitronyl-¹³C for three-parameter scatter plots. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 53, n. 19, p. 4535–4542, 1988.

HASSAN, M. H.; KALAM, M. A. An overview of biofuel as a renewable energy source: Development and challenges. **Procedia Engineering**, v. 56, p. 39–53, 2013.

HOWELL, B. A.; OSTRANDER, E. A. Thermal degradation of flame-retardant compounds derived from castor oil. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 138, n. 6, p. 3961–3975, 2019.

HWANG, H.-S. **Advances in NMR Spectroscopy for Lipid Oxidation Assessment**. Cham: Springer International Publishing, 2017 (SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition).

IKEYA, M. **New applications of electron spin resonance: dating, dosimetry and microscopy**. [S. l.]: World Scientific, 1993.

JACOB, K. S.; BHUGRA, D.; MANN, A. H. Brief Communication. **Psychological Medicine**, v. 27, n. 5, p. S0033291796004436, 1997.

JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R. C. Fitoquímicos em amora-preta (*Rubus* spp). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, 2011.

JAIN, S.; SHARMA, M. P. Correlation development between the oxidation and thermal stability of biodiesel. **Fuel**, v. 102, p. 354–358, 2012a.

JAIN, S.; SHARMA, M. P. Oxidation, Thermal, and Storage Stability Studies of *Jatropha Curcas* Biodiesel. **ISRN Renewable Energy**, v. 2012, p. 1–15, 2012b.

JAIN, S.; SHARMA, M. P. Stability of biodiesel and its blends: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 2, p. 667–678, 2010.

JERZYKIEWICZ, M.; CWIELAG, I.; JERZYKIEWICZ, W. The antioxidant and anticorrosive properties of crude glycerol fraction from biodiesel production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 8, p. 1196–1201, 2009.

JERZYKIEWICZ, M.; CWIELAĞ-PIASECKA, I.; JEZIERSKI, A. Pro- and antioxidative effect of α -tocopherol on edible oils, triglycerides and fatty acids. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, n. 6, p. 803–811, 2013.

JIANG, S.; XIE, Y.; LI, M.; GUO, Y.; CHENG, Y.; QIAN, H.; YAO, W. Evaluation on the oxidative stability of edible oil by electron spin resonance spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125714, 2020.

KIMURA, M.; SAVADA, F. Y.; ROMAGNOLI, E. S.; CHENDYNSKI, L. T.; BORSATO, D. Mathematical modeling of the relative protection factor of synthetic antioxidants in commercial biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 4, p. 1097–1105, 2019.

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 36, n. 3, p. 364–373, 2010.

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

KUMAR, N. Oxidative stability of biodiesel: Causes, effects and prevention. **Fuel**, v.

190, p. 328–350, 2017.

LAGERCRANTZ, C. Spin trapping of some short-lived radicals by the nitroxide method. **Journal of Physical Chemistry**, v. 75, n. 22, p. 3466–3475, 1971.

LEE, K. H.; LEE, J.-S.; KIM, E. S.; LEE, H. G. Preparation, characterization, and food application of rosemary extract-loaded antimicrobial nanoparticle dispersions. **LWT**, v. 101, p. 138–144, 2019.

LLORACH, R.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, A.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GIL, M. I.; FERRERES, F. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. **Food Chemistry**, v. 108, n. 3, p. 1028–1038, 2008.

LORENZO, J. M.; MUNEKATA, P. E. S. Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 8, p. 709–719, 2016.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: A review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1–15, 1999.

MAGDALENA SKOTNICKA, JOANNA CHOROSTOWSKA-WYNIMKO, JERZY JANKUN, E. S.-J. The black tea bioactivity: an overview. **Central European Journal of Immunology**, v. 36, n. 4, p. 284–292, 2011.

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 Processing Technology**, v. 92, n. 9, p. 1750–1755, 2011.

MANTOVANI, A. C. G.; CHENDYNSKI, L. T.; SALVIATO, A.; BORSATO, D.; SANTANA, V. T.; DI MAURO, E. Monitoring free radicals formation in the biodiesel oxidation reaction via electronic paramagnetic resonance. **Fuel**, v. 224, p. 255–260, 2018.

MARTÍNEZ-YUSTA, A.; GUILLÉN, M. D. Deep-frying food in extra virgin olive oil: A study by ¹H nuclear magnetic resonance of the influence of food nature on the evolving composition of the frying medium. **Food chemistry**, v. 150, p. 429–437, 2014.

MARTÍNEZ-YUSTA, A.; GUILLÉN, M. D. Enrichment of Sunflower Oil with γ -Tocopherol. Study by ¹H NMR of Its Effect Under Accelerated Storage Conditions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, n. 6, p. 1800457, 2019.

MATHWORKS, I. MATLAB and statistics toolbox release 2012b. Natick (Massachusetts, United States), 2012.

MOOLENAAR, S. H.; ENGELKE, U. F. H.; WEVERS, R. A. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of body fluids in the field of inborn errors of metabolism. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 16–24, 2003.

OTTAVIANI, M. F.; SPALLACI, M.; CANGIOTTI, M.; BACCHIOCCA, M. Electron Paramagnetic Resonance Investigations of Free Radicals in Extra Virgin Olive Oils. , p. 3691–3696, 2001.

PAPADIMITRIOU, V.; SOTIROUDIS, T. G.; XENAKIS, A.; SOFIKITI, N.; STAVYIANNOUNDAKI, V.; CHANIOTAKIS, N. A. Oxidative stability and radical scavenging activity of extra virgin olive oils: An electron paramagnetic resonance spectroscopy study. **Analytica Chimica Acta**, v. 573–574, p. 453–458, 2006.

PARKER, T.; LIMER, E.; WATSON, A. D.; DEFERNEZ, M.; WILLIAMSON, D.; KEMSLEY, E. K. 60 MHz ¹H NMR spectroscopy for the analysis of edible oils. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 57, p. 147–158, 2014.

PINGRET, D.; DURAND, G.; FABIANO-TIXIER, A. S.; ROCKENBAUER, A.; GINIES, C.; CHEMAT, F. Degradation of edible oil during food processing by ultrasound: Electron paramagnetic resonance, physicochemical, and sensory appreciation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 31, p. 7761–7768, 2012.

POLOVKA, M. EPR spectroscopy: A tool to characterize stability and antioxidant properties of foods. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 45, n. 1, p. 1–11, 2006.

POOLE, C. P. **Electron spin resonance: a comprehensive treatise on experimental techniques**. 1st ed. [S. l.: s. n.], 1987.

PULLEN, J.; SAEED, K. An overview of biodiesel oxidation stability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 8, p. 5924–5950, 2012.

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**, v. 113, n. 2, p. 208–213, 2011.

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. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento-Edição n**, v. 31, p. 29, 2003.

REINKE, L A; LAI, E. K.; DUBOSE, C. M.; MCCAY, P. B. Reactive free radical generation in vivo in heart and liver of ethanol-fed rats: correlation with radical formation in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9223–7, 1987.

REINKE, Lester A.; KOTAKE, Y.; MCCAY, P. B.; JANZEN, E. G. Spin-trapping studies of hepatic free radicals formed following the acute administration of ethanol to rats: In vivo detection of 1-hydroxyethyl radicals with PBN. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, n. 1, p. 31–39, 1991.

ROMAGNOLI, É. S.; BORSATO, D.; SILVA, L. R. C.; TASHIMA, D. L. M.; CANESIN, E. A. Influence of the extracts of senna leaves, blackberries and hibiscus flowers in the oxidation reaction of commercial biodiesel. **Biofuels**, v. 11, n 7, p. 839–845, 2020.

SALUJA, R. K.; KUMAR, V.; SHAM, R. Stability of biodiesel – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2016.

- SARIN, A.; ARORA, R.; SINGH, N. P.; SARIN, R.; SHARMA, M.; MALHOTRA, R. K. Effect of metal contaminants and antioxidants on the oxidation stability of the methyl ester of Pongamia. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 5, p. 567–572, 2010.
- SARIN, A.; ARORA, R.; SINGH, N. P.; SHARMA, M.; MALHOTRA, R. K. Influence of metal contaminants on oxidation stability of Jatropha biodiesel. **Energy**, v. 34, n. 9, p. 1271–1275, 2009.
- SHAHIDI, F. Quality assurance of fats and oils. **Bailey's Industrial oil and fat products**, 2005.
- SHIMAMOTO, G. G.; FAVARO, M. M. A.; TUBINO, M. Simple Methods via Mid-IR or ¹H NMR Spectroscopy for the Determination of the Iodine Value of Vegetable Oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2015.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Methods for the evaluation of the degree of lipid oxidation and the antioxidant activity. **Quimica Nova**, v. 22, n. 1, p. 94–103, 1999.
- SINDHI, V.; GUPTA, V.; SHARMA, K.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, R.; DHAKA, N. Potential applications of antioxidants – A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 828–835, 2013.
- SOARES, S.; ROCHA, F. Fast Spectrophotometric Determination of Iodine Value in Biodiesel and Vegetable Oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2018.
- SOLIMAN, S. M. E.; ABDEL-WAHHAB, M. M.; ABDELTAWAB, ; Mahmoud A.; EL-REHEEM, ; Khaled G. Abdel-Wahhab and Abdel-Baset M. A. Abd; . Possible Protective Effect of Natural Extracts of Rosemary and Parsley Against Isoniazid-induced Nephrotoxicity in Adult Male Albino Rats. **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences physiology and molecularbiology**, v. 8, n. 1, p. 87–104, 2016.
- SORATE, K. A.; BHALE, P. V. Biodiesel properties and automotive system compatibility issues. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 777–798, 2015.
- SOUZA, A. G.; MEDEIROS, M. L.; CORDEIRO, A. M. M. T.; QUEIROZ, N.; SOLEDADE, L. E. B.; SOUZA, A. L. Efficient antioxidant formulations for use in biodiesel. **Energy and Fuels**, v. 28, n. 2, p. 1074–1080, 2014.
- SPACINO, K. R.; BORSATO, D.; BUOSI, G. M.; CHENDYNSKI, L. T. Determination of kinetic and thermodynamic parameters of the B100 biodiesel oxidation process in mixtures with natural antioxidants. **Fuel Processing Technology**, v. 137, p. 366–370, 2015.
- SPIN, E. A comprehensive software package for spectral simulation and analysis. **EPR. J. Magn. Reson.**, v. 178, n. 1, p. 42–55, 2006.
- SWARTZ, H. M.; KHAN, N.; KHRAMTSOV, V. V. Use of electron paramagnetic resonance spectroscopy to evaluate the redox state in vivo. **Antioxidants and**

Redox Signaling, v. 9, n. 10, p. 1757–1771, 2009.

THOMSEN, M. K.; JACOBSEN, C.; SKIBSTED, L. H. Mechanism of initiation of oxidation in mayonnaise enriched with fish oil as studied by electron spin resonance spectroscopy. **European Food Research and Technology**, v. 211, n. 6, p. 381–386, 2000.

THOMSEN, M. K.; KRISTENSEN, D.; SKIBSTED, L. H. Electron spin resonance spectroscopy for determination of the oxidative stability of food lipids. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 77, n. 7, p. 725–730, 2000.

TYL, C. E.; BRECKER, L.; WAGNER, K. ¹H NMR spectroscopy as tool to follow changes in the fatty acids of fish oils. **European journal of lipid science and technology**, v. 110, n. 2, p. 141–148, 2008.

VASILESCU, M.; CARAGHEORGHEOPOL, A.; CALDARARU, H. Aggregation numbers and microstructure characterization of self-assembled aggregates of poly(ethylene oxide) surfactants and related block-copolymers, studied by spectroscopic methods. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 89–90, p. 169–194, 2001.

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 alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron on lipid oxidation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1328–1336, 2005.

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**, v. 85, n. 4, p. 623–632, 2004.

WEIL, J.; BOLTON, J. **Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications**. 2nd ed. [S. l.: s. n.], 2007.

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

YIM, M. B.; CHOCK, P. B.; STADTMAN, E. R. Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 13, p. 5006–5010, 1990.

ZHAO, Q.; WANG, M.; ZHANG, W.; ZHAO, W.; YANG, R. Impact of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine on the oxidative stability of stripped peanut oil and bulk peanut oil. **Food Chemistry**, v. 311, p. 125962, 2020.

ZULETA, E. C.; BAENA, L.; RIOS, L. A.; CALDERÓN, J. A. The oxidative stability of biodiesel and its impact on the deterioration of metallic and polymeric materials: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 12, p. 2159–2175, 2012.

ANEXOS

ANEXO A

Artigo publicado na revista *Fuel* referente ao Capítulo 2Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119531>

Fuel 287 (2021) 119531



Contents lists available at ScienceDirect

Fuel

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fuel

Full Length Article

Influence of antioxidants in biodiesel degradation: Electronic paramagnetic resonance tracking of free radicals



Ana Carolina Gomes Mantovani^{a,*}, Letícia Thaís Chendynski^b, Vinicius Tadeu Santana^c,
Dionísio Borsato^d, Eduardo Di Mauro^a

^a State University of Londrina, Physics Department, Rod. Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, ZIP Code 86057-970, Londrina, PR, Brazil

^b Federal Institute of Paraná, Campus Palmas, Palmas, PR, Brazil

^c Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic

^d State University of Londrina, Chemistry Department, Rod. Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, ZIP Code 86057-970, Londrina, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Spin trapping
 α -Phenyl-N-tert-butyl nitron
PBN
Oxidation
EPR

ABSTRACT

Biodiesel is considered a renewable fuel that has been replacing diesel. However, its degradation, caused by a radical reaction, is one of the biggest concerns about this fuel. Spin trapping is a useful resource to evaluate the radical formation in a sample. In the present work, the biodiesel degradation from canola, corn and soybean oils, with synthetic antioxidants (BHA -butylated hydroxyanisole; BHT- butylated hydroxytoluene; TBHQ- tert-butylhydroquinone) and extracts (rosemary; oregano; basil), were measured by Electron Paramagnetic Resonance (EPR). The measurements were performed at room temperature, applying the spin trapping technique, using the α -phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) as the spin trap. The analyzed data allowed evaluating the degradation of the samples and their stability. Besides, the presence of the hydroxyl radical in all samples in the degradation process was identified. The biodiesel from soybean oil presented the greatest stability compared to the others, with all antioxidants tested. The oregano extract proved to be the most efficient natural antioxidant in the canola and soybean biodiesel, with more than 300 days of free radical detection, while the rosemary extract was more efficient in the corn biodiesel, achieving free radical signals until the 209th day of analysis.

ANEXO B

Artigo publicado na revista *Journal of the Brazilian Chemical Society* referente ao
Capítulo 3

Doi: <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20200052>

<http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20200052>

Article

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-7, 2020
Printed in Brazil • ©2020 Sociedade Brasileira de Química

Evaluation of the Oxidation Degradation Process of Biodiesel via ¹H NMR Spectroscopy

**Ana Carolina G. Mantovani,^a Leticia Thaís Chendynski,^b Diego Galvan,^{b,c}
Dionísio Borsato^{b,*c} and Eduardo Di Mauro^a**

^a*Laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica (LARPE), Departamento de Física,
Universidade Estadual de Londrina, 86057-970 Londrina-PR, Brazil*

^b*Instituto Federal do Paraná, Campus Palmas, 85555-000 Palmas-PR, Brazil*

^c*Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis (LPAC), Departamento de Química,
Universidade Estadual de Londrina, 86057-970 Londrina-PR, Brazil*

Biodiesel is a suitable alternative to replace the petro-diesel. The biodiesel is formed by unsaturated esters easily degraded by interferences of oxygen, temperature, contact with metals or contaminants. The aim of this research was to investigate the biodiesel degradation process via ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, observing the olefinic, bis-allylic and allylic protons signals of the chemical bonds and the by the induction period of the Rancimat. Biodiesel samples with metallic ions (Fe and Cu) and with rosemary natural extract were analyzed. The metal compounds showed a catalytic effect in the samples and the rosemary natural extract showed to be efficient by retarding the degradation process. The extract was ineffective in the presence of iron. Through the ¹H NMR spectra was possible to observe changes in the signal intensities of the olefinic, bis-allylic and allylic protons as well as the formation of oxidation products in the biodiesel in the degradation process.

Keywords: NMR, biodiesel, degradation, oxidation, spectroscopy

ANEXO C

Depósito de patente

A partir das pesquisas realizadas no capítulo 3 uma patente foi requisitada sobre o processo de quantificação da degradação do biodiesel com íons de cobre usando a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). O pedido de depósito da patente consta no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 000616 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 78640489000153

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS UNIVERSITARIO

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86055-900

País: Brasil

Telefone: (043) 3371 5812

Fax: (043) 3371 5812

Email: aintecpi@uel.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 10/01/2020 às 15:09, Petição 870200004618

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO PARA QUANTIFICAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO BIODIESEL POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EM PRESENÇA DE ÍONS DE COBRE

Resumo: A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) possibilita analisar a degradação do biodiesel a partir das intensidades de prótons olefínicos, bis-alílicos e alílicos a medida que a reação de oxidação progride, sendo possível correlacioná-las com os períodos de indução fornecidos pelo Rancimat. Desse modo, a presente invenção mostra um processo para a quantificação da degradação oxidativa do biodiesel através das intensidades dos prótons olefínicos, bis-alílicos e alílicos. O processo apresenta um tempo curto de análise quando comparada às convencionais, é uma técnica não destrutiva, além de permitir a observação dos produtos de degradação gerados.

Figura a publicar: FIG 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 10/01/2020 às 15:09, Petição 870200004618

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4**Nome:** DIONÍSIO BORSATO**CPF:** 20191286915**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Cândido Betoni, nº 199, Apto. 301**Cidade:** Londrina**Estado:** PR**CEP:** 86060-590**Pais:** BRASIL**Telefone:** (43) 337 15812**Fax:****Email:****Inventor 2 de 4****Nome:** ANA CAROLINA GOMES MANTOVANI**CPF:** 08380381904**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Estudante de Pós Graduação**Endereço:** Avenida Waldemiro Moreira, Q-06 DT-12, nº 395**Cidade:** Rolândia**Estado:** PR**CEP:** 86605-256**Pais:** BRASIL**Telefone:** (43) 337 15812**Fax:****Email:****Inventor 3 de 4****PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 10/01/2020 às 15:09, Petição 870200004618

Nome: DIEGO GALVAN

CPF: 06601249980

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Dom Pedro I, 110, QD15 LT29

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86066-090

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email:

Inventor 4 de 4

Nome: LETÍCIA THAÍS CHENDYNSKI

CPF: 08828402903

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Desembargador Aurélio Feijó, nº 395

Cidade: Rolândia

Estado: PR

CEP: 86605-262

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email:

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 10/01/2020 às 15:09, Petição 870200004618

ANEXO D

Artigo publicado na revista *Fuel* referente ao Capítulo 4

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117833>

Fuel 274 (2020) 117833



Contents lists available at ScienceDirect

Fuel

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fuel



Full Length Article

Thermal-oxidation study of biodiesel by proton nuclear magnetic Resonance (^1H NMR)



Ana Carolina Gomes Mantovani^{a,*}, Letícia Thaís Chendynski^b, Diego Galvan^c,
Fernando César de Macedo Júnior^c, Dionísio Borsato^c, Eduardo Di Mauro^a

^a State University of Londrina, Physics Department- LARPE, Rd. Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, Londrina, PR, Brazil

^b Federal Institute of Paraná, Campus Palmas, Av. Bento Munhoz da Rocha Neto, Palmas, PR, Brazil

^c State University of Londrina, Chemistry Department -LPAC, Rd. Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, Londrina, PR, Brazil

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:
Biodiesel
NMR
Spectroscopy
Degradation
Thermo-oxidation

ABSTRACT

Biodiesel is a renewable biofuel suitable for diesel replacement. Biodiesel has in its composition unsaturated fatty esters making it easily degraded. The objective of the present work was to investigate biodiesel thermal-oxidation by ^1H NMR spectroscopy. Using the NMR was possible to analyze the signal intensities of the olefinic, bis-allylic and allylic protons of the chemical bonds, obtain the oleic, linoleic, linolenic and saturated acyl groups proportions, observe and classify some oxidation products. Two sets of biodiesel were analyzed, the first was oxidized in the Rancimat equipment at 110 °C during 8 h, and the second was oxidized in an oven at 50 °C during 17 days. The biodiesel oxidized at 110 °C had a more expressive degradation when compared to the samples oxidized at 50 °C. The samples presented an increase in the saturated proportion. It was possible to observe the formation of oxidation products as hydroperoxides and aldehydes as propanal and 2-propenal.

ANEXO E

Relatório de Ensaio do Biodiesel Comercial Usado


RELATORIO DE ENSAIO
 "CERTIFICADO DA QUALIDADE"
 LABORATÓRIO DE CONTROLE DA QUALIDADE BSBIOS MARIALVA

Documento de origem: FO-CQ-MVA-063 rev. 1C

Data de emissão: 09/03/2018	Relatório de Ensaio Nº 031-2018	Página 1 de 1
--------------------------------	---------------------------------	---------------

1. Dados do Solicitante

Nome:	BSBIOS Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A		
Endereço:	Estrada Fruteira, s/nº Lote 212 A/B		
Cidade:	Marialva	UF:	PR
		CEP:	86990-000
Número Lote / Ordem de Serviço:	031-2018		

2. Dados da Amostra

Identificação da Amostra:	031-2018	Nº Lacre da amostra testemunho:	2119/65	
Data de produção do Biodiesel:	06/03/2018 a 07/03/2018			
Matérias-primas:	Metanol + Óleo de Soja (89%) + Gordura Bovina (2%) + Gordura de Porco (4%) + Óleo de aves (4%) + Óleo de Algodão (1%)		Aditivo:	não aplicável

3. Dados da Coleta

Responsável pela Coleta:	Jorge	Data da Coleta:	08/03/2018
Local da Coleta:	Tanque estacionário 3	Volume do Lote:	1.500.000 Litros
Procedimento utilizado na coleta:	PG-CQ-MVA-013		

Item Analítico	Método	Especificação ²	Unidade	Resultado
Aspecto ¹	PE-CQ-MVA-001	LII (1) - Limpido e isento de impurezas	-	LII (1) a 32,6°C
Massa Específica a 20°C ¹	ASTM D 4052	850 a 900	kg/m ³	879,9
Viscosidade Cinemática a 40°C ¹	ASTM D 445	3,0 a 6,0	mm ² /s	4,437
Teor de água ¹ (procedimento A)	ASTM D 6304	máx. 200,0	mg/kg	191,1
Contaminação Total ¹	EN 12662	máx. 24	mg/kg	21,9
Ponto de Fulgor ¹ (procedimento C)	ASTM D 93	mín. 100,0	°C	151,5
Teor de Éster ⁵	EN 14103	mín. 96,5	% massa	99,8
Cinzas Sulfatadas ⁴	ASTM D 874	máx. 0,020	% massa	NN
Enxofre Total ⁵	NBR 15867	máx. 10	mg/kg	4,4
Sódio + Potássio ¹	NBR 15553	máx. 5	mg/kg	<1,0
Cálcio + Magnésio ¹	NBR 15553	máx. 5	mg/kg	<1,0
Fósforo ¹	NBR 15553	máx. 10	mg/kg	<1,0
Corrosividade ao Cobre a 3 h e 50 °C ⁴	ASTM D 130	máx. 1	-	NN
Ponto de Entupimento de Filtro a Frio ¹	ASTM D 6371	*	°C	1
Índice de Acidez ¹	ASTM D 664	máx. 0,50	mg/g	0,44
Glicerina Livre ¹	ASTM D 6584	máx. 0,02	% massa	0,015
Glicerina Total ¹	ASTM D 6584	máx. 0,25	% massa	0,217
Monoglicérides ¹	ASTM D 6584	máx. 0,7	% massa	0,700
Diglicérides ¹	ASTM D 6584	máx. 0,20	% massa	0,106
Triglicérides ¹	ASTM D 6584	máx. 0,20	% massa	0,067
Metanol ^{3,1}	EN 14110	máx. 0,20	% massa	NN
Índice de Iodo ¹	EN 14111	Anotar	% massa	107
Estabilidade à Oxidação a 110°C ¹	EN 14112	mín. 8	horas	9,5

* Para os meses citados, o limite máximo é de: JAN / FEV / MAR / NOV / DEZ: máx. 14 °C; ABR / OUT: máx. 10 °C; MAI / JUN / JUL / AGO / SET: máx. 5 °C.

1 Realizado pelo Laboratório BSBIOS Ind. e Com. de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizado em Marialva, cadastrado na ANP pelo nº 044 e no CRQ-IX pelo nº 04702. Boletim de análise nº 031-2018.

2 Conforme Regulamento Técnico ANP Nº 3/2014 – DOU 26.08.2014.

3 Quando a análise de Ponto de Fulgor resultar em um valor superior a 130°C fica dispensada a análise de Metanol.

4 Estes parâmetros são analisados a cada trimestre civil, tomando uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre.

5 Realizado pelo Laboratório BSBIOS, localizado em Passo Fundo/RS, cadastrado na ANP pelo nº 007 e no CRQV pelo nº 051906526 Relatório de Ensaio nº 067/2018

Signatário Autorizado
Luciana Languila Aniceto
CRQ 09101116 - 9ª Região

A unidade % massa expressa neste relatório equivale à unidade g/100g do SI.
Os Resultados apresentados valem única e exclusivamente para a amostra ensaiada

ANEXO F

Patrimônio Genético

Para utilização das plantas orégano, manjeriço e alecrim em pesquisas científicas, faz-se necessário o cadastro das mesmas no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético do Ministério do Meio Ambiente. Desse modo, tais cadastros são mostrados a seguir.



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº AC32015

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AC32015**
 Usuário: **DIONISIO BORSATO**
 CPF/CNPJ: **201.912.869-15**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Origanum vulgare

Título da Atividade: **Determinação do Fator de Proteção Relativo dos Extratos naturais em mistura com Biodiesel (orégano)**

Equipe

DIONISIO BORSATO **UEL**
Leticia Thais Chendynski **UEL**

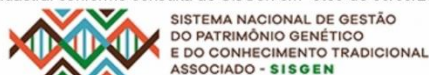
Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Congressos nacionais e publicações em periódicos**

Data do Cadastro: **17/09/2018 19:26:43**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **8:39** de **30/09/2020**.





Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº AF7ECF3

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AF7ECF3**
 Usuário: **DIONISIO BORSATO**
 CPF/CNPJ: **201.912.869-15**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Ocimum basilicum

Título da Atividade: **Determinação do Fator de Proteção Relativo dos Extratos naturais em mistura com Biodiesel B100 (manjerição)**

Equipe

DIONISIO BORSATO **UEL**
Leticia Thais Chendynski **UEL**

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Congressos e periódicos**

Data do Cadastro: **17/09/2018 19:22:03**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **8:38 de 30/09/2020.**



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A31C9F7

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A31C9F7**
 Usuário: **DIONISIO BORSATO**
 CPF/CNPJ: **201.912.869-15**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Rosmarinus officinalis

Título da Atividade: **Estudo da estabilidade oxidativa de biodiesel com óxidos e metais de ferro e cobre em mistura de extrato de alecrim**

Equipe

DIONISIO BORSATO	UEL
Leticia Thais Chendynski	UEL
Érica Signori Romagnoli	UEL
Kelly Roberta Spacino'	UEL
Gabriel Benassi Messias	UEL

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Publicação em Periódico internacional: Energy**

Data do Cadastro: **17/09/2018 10:07:57**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **8:38 de 30/09/2020.**



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**