

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**TRATAMENTO METROLÓGICO E QUIMIOMÉTRICO DE
DADOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PARA
AMOSTRAS DE BIODIESEL EM DIESEL**

Francisco Fernandes Gambarra Neto*

Tese apresenta como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORADO EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira

Co-orientador: Dr. Marcos Roberto Monteiro

*** Bolsista CNPq**

São Carlos - SP
2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

G188tm

Gambarra Neto, Francisco Fernandes.

Tratamento metrológico e quimiométrico de dados de ressonância magnética nuclear para amostras de biodiesel em diesel / Francisco Fernandes Gambarra Neto. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

119 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Ressonância magnética nuclear. 2. Medição. 3. Quimiometria. 4. Química analítica. I. Título.

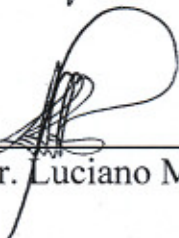
CDD: 543.0877 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado


*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutorado do candidato **Francisco Fernandes Gambarra Neto**, realizada em 29 de março de 2012:*



Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira



Prof. Dr. Luciano Morais Lião



Prof. Dr. Roberto Antonio Martins



Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro



Dra. Cláudia Maria Guimarães de Souza

Dedico este trabalho à Wanessa P. T. Gambarra por estar sempre do meu lado, aos meus pais, Fernando e Ana Gambarra, e à minha avó, Maria de Lourdes, por ser um “porto seguro”.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo grande amor que Ele tem comigo;

À Fernanda Fontes Gambarra e à Fabiana Fontes Gambarra por serem minhas irmãs e torcerem por mim;

À toda minha família que se movimentou por mim seja fisicamente e/ou por oração;

Ao Senhor Givaldo Alves Tito e Maria do Socorro Porto Tito pela colaboração muito grande com a minha vida;

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira acima de tudo pela confiança na minha dedicação e no meu trabalho;

Ao Dr. Marcos R. Monteiro pelo sistema de trabalho em seu laboratório e o grande amigo que ele tem sido;

Ao Clayton Rodrigues pela colaboração em todas as análises de RMN;

Aos técnicos do laboratório de RMN, Paulo Lambertuci e Luciana Vizotto, pela grande amizade que fiz entre eles;

Aos meus amigos dos laboratórios de RMN, Analítica, Produtos Naturais, Síntese Orgânica e da Química da USP que contribuíram muito como amigos em São Carlos;

Aos funcionários da Bruker na Alemanha e no Brasil pela colaboração em várias conversas;

Aos órgãos financiadores: CNPq, FAPESP e CAPES.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Metrologia em RMN	2
1.1.1. Validação do método	10
1.1.2. Incerteza de medição em RMNq	14
1.1.2.1. Rastreabilidade	17
1.2. Quimiometria.....	19
1.2.1. Algoritmo SPA-LDA	23
1.2.2. Algoritmo SPA-MLR.....	29
1.3. A matriz biodiesel.....	31
2. OBJETIVOS.....	41
Objetivo geral.....	41
Objetivos específicos	41
3. MATERIAIS E MÉTODO	43
3.1. Preparação de amostras.....	43
3.2. Materiais e reagentes.....	46
3.3. Instrumentação	47

3.4.	Parâmetros de aquisição.....	47
3.5.	Parâmetros de processamento	48
3.6.	Validação do método RMNq	49
3.6.1.	Robustez	50
3.6.1.1.	Avaliação do espectro de RMNq de ^1H	50
3.6.1.2.	Homogeneidade do campo magnético.....	51
3.6.2.	Seletividade e especificidade	52
3.6.3.	Exatidão.....	52
3.6.4.	Precisão.....	53
3.6.4.1.	Repetitividade.....	54
3.6.4.2.	Reprodutibilidade	54
3.6.5.	Linearidade.....	55
3.6.6.	Incerteza de medição em RMNq de ^1H	56
3.7.	Tratamento dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C para quimiometria.....	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1.	Metrologia em RMN de ^1H	61
4.1.1.	Erro da pipeta volumétrica.....	61
4.1.2.	Parâmetros de aquisição	63
4.1.3.	Precisão.....	67
4.1.3.1.	Repetitividade.....	67
4.1.3.2.	Reprodutibilidade	68
4.1.4.	Linearidade.....	70
4.1.5.	Incerteza de medição na RMN de ^1H	72
4.2.	Quimiometria em RMN de ^1H e ^{13}C	81
4.2.1.	Classificação da RMN de ^1H e ^{13}C	81

4.2.2. Quantificação de RMN de ^1H e ^{13}C	87
5. CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXO 1.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMNq	Ressonância Magnética Nuclear quantitativa
nOe	Efeito nuclear Overhouser (<i>Nuclear Overhouser effect</i>)
PLS	Mínimos quadrados parciais (<i>Partial least squares</i>)
FID	Decaimento livre de indução (<i>Free induction decay</i>)
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
HMT	Hexametenotetramina
^2H	Deutério
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono
CG	Cromatografia Gasosa
ISO/IEC	Norma da <i>International Organization for Standardization / International Electrotechnical Commission</i>
GUM	Guia para a Expressão da Incerteza da Medição (<i>Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement</i>)
BIPM	<i>Bureau International des Poids et Mesures</i>
CIPM	<i>Comite International des Poids et Mesures</i>
TAG4	<i>ISO Technical Advisory Group on Metrology</i>
EURACHEM	<i>European Chemistry</i>
Guia EURACHEM/CITAC	<i>Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement</i>
IMEP-16	<i>International Measurement Evaluation Programme</i>
<i>fingerprinting</i>	Impressão digital

SPA	Algoritmo das projeções sucessivas (<i>Successive projections algorithm</i>)
MLR	Regressão linear múltipla (<i>Multiple linear regression</i>)
LDA	Análise discriminante linear (<i>Linear discriminant analysis</i>)
PCA	Análise das componentes principais (<i>Principal component analysis</i>)
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
NIR	Infravermelho próximo (<i>Near-infrared</i>)
PCs	Componentes principais (<i>Principal components</i>)
RMSEV	<i>Root Mean Square Error of Validation</i>
NOx	Óxido nítrico e nitroso
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CCD	Cromatografia de camada delgada
FID de CG	<i>Flame Ionization Detection</i>
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detection</i>
EM	Espectrometria de massas
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
DAD	<i>Diode Array Detection</i>
TMS	Tetrametilsilano
TMSP-d4	Trimetilsililpropionato de sódio tetradeuterado

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diagrama de Ishikawa mostrando a relação causa/efeito para uma incerteza expandida ($U_{95\%}$).....18
- Figura 2. Representação esquemática da análise discriminante linear. R1 e R2 são duas classes diferentes^[120]22
- Figura 3. Ilustração da sequência de projeções realizadas pelo SPA. (a) Primeira iteração e (b) segunda iteração.....28
- Figura 4. Esquema reacional da transesterificação do triglicerídeo da mamona (*Ricinus communis* L.).....32
- Figura 5. Diagrama de Ishikawa mostrando a relação causa/efeito para uma incerteza expandida ($U_{95\%}$) do método para medidas de RMN de ^1H43
- Figura 6. Desenho esquemático dos tubos de RMN de ^1H de 5 mm de diâmetro externo para as amostras de: (a) BX e b) o padrão certificado contendo 0,1% de etilbenzeno em CDCl_345
- Figura 7. Desenho esquemático dos tubos de RMN de 10 mm utilizados nas medidas de ^{13}C para a amostra de BX.....46
- Figura 8. Espectro de RMN de ^1H para a amostra de B5 (a) com uma ampliação do sinal da H_3CO - deconvoluída (b).....50
- Figura 9. Espectro de RMN de ^1H com a medida da largura de linha do sinal para o controle do *shimming* da amostra B5 padrão.....51
- Figura 10. (a) Espectro de RMN de ^1H para a amostra de B5 com uma (b) ampliação do sinal específico da metoxila (H_3CO -) do biodiesel.....52
- Figura 11. Espectro de RMN de ^1H do etilbenzeno 0,1% em CDCl_3 . a) espectro normal, b) expansão.....53

Figura 12. Resíduos aleatórios da regressão linear da resposta da sonda BBI 5 mm para RMN de ^1H	55
Figura 13. Representação do mecanismo de busca do algoritmo KS com três amostras circuladas.	57
Figura 14. Gráfico do erro da pipeta 100-1000 μL (Gilson®) calculado usando o biodiesel e uma balança analítica (Shimadzu) acreditada pela NBR ISO/IEC 17025, à temperatura de 25°C	62
Figura 15. Espectros de RMN de ^1H na sonda de 5 mm com os pulsos de 90° (A) e 30° (B) graus.	64
Figura 16. Representação esquemática da sequência de pulso inversão-recuperação para calcular T_1	66
Figura 17. Gráfico com a avaliação da temperatura do BVT por 7 meses, realizadas em 2009 versus a área do pico da metoxila ($\text{H}_3\text{CO}-$) para a amostra B100.	66
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H obtido pelo analista A para o estudo da repetitividade.	67
Figura 19. Gráfico de caixa da repetitividade dos analistas A e B e de reprodutibilidade de uma porção do pico em $\delta_{\text{H}}2,70$ ppm para a amostra de 0,1% etilbenzeno em CDCl_3 em um equipamento de RMN de 9,4 Tesla.	69
Figura 20. Gráfico da linearidade e da curva de calibração de RMN de ^1H da metoxila ($\text{H}_3\text{CO}-$) do BX.	72
Figura 21. Incerteza de medida com a conversão da unidade de área para BX%.	78
Figura 22. Gráfico com as concentrações das amostras de BX fornecidos pelo Laboratório de Combustíveis (LABCom - $B5 \pm 0,5\%$) versus concentração obtida pela técnica RMN de ^1H com o $BX \pm U_{95\%}$	79

- Figura 23. Espectros de RMN de (a) ^1H e (b) ^{13}C da amostra de BX 5% exceto o ruído das extremidades e com 65.536 e 32.768 pontos respectivamente.81
- Figura 24. Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C calibrados no zero, sem a referência (TMS e TMSP- d_4) e o ruído das extremidades. A matriz completa tem 75 amostras e 56.083 pontos.....82
- Figura 25. Gráficos de RMN de ^1H e ^{13}C sem a referência (TMS e TMSP- d_4) e com ampliação no encontro dos espectros.....83
- Figura 26. Gráfico com o número de frequências (variáveis) versus custo do modelo de validação.84
- Figura 27. Representação do modelo SPA-LDA para duas amostras (B5%) S1800 (espectro maior) e S500 (espectro menor).....86
- Figura 28. Simulação de um espectro RMN de ^1H de um anel aromático sulfurado presente no diesel.87
- Figura 29. Gráficos do modelo SPA-MLR para o índice de enxofre com as amostras autoescaladas. (a) 4 variáveis incluídas no modelo de RMN para índice de enxofre; (b) 4 variáveis de RMN de ^1H nenhuma de ^{13}C ; (c) validação do modelo SPA-MLR de RMN com um $R^2 = 0,9954$89
- Figura 30. Modelo SPA-MLR para a massa específica à 20 °C com as amostras autoescaladas. (a) 8 variáveis incluídas no modelo de RMN para ME; (b) 6 variáveis de RMN de ^1H e 2 de ^{13}C ; e (c) validação do modelo SPA-MLR de RMN com um $R^2 = 0,9983$91
- Figura 31. Modelo SPA-MLR para a temperatura de destilação a 50% (T50) do produto com as amostras centradas na média. (a) 15 variáveis incluídas no modelo de RMN para T50; (b) 11 variáveis de RMN de ^1H e 4 de ^{13}C ; e (c) validação do modelo SPA-MLR de RMN com um $R^2 = 0,9804$92
- Figura 32. Modelo SPA-MLR para a temperatura de destilação a 80% (T80) do produto com as amostras centradas na média. (a) 15 variáveis incluídas no modelo de RMN para T80; (b) 11 variáveis de RMN de ^1H e 4 de ^{13}C ; e (c) validação do modelo de SPA-MLR de RMN com um $R^2 = 0,9944$94

Figura 33. Modelo SPA-MLR de RMN para o índice de cetano (IC) com as amostras autoescaladas. (a) 7 variáveis incluídas no modelo de RMN para IC; (b) 4 variáveis de RMN de ^1H e 3 de ^{13}C ; e (c) validação do modelo de SPA-MLR de RMN com um $R^2 = 0,9927$95

Figura 34. Modelo SPA-MLR de RMN para o ponto de fulgor (PF) com as amostras centradas na média. (a) 15 variáveis incluídas no modelo de RMN para PF; (b) 15 variáveis de RMN de ^1H e 0 de ^{13}C ; e (c) validação do modelo de SPA-MLR de RMN com um $R^2 = 0,9600$97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das 75 amostras de óleo diesel comercial, suas misturas e padrões preparados em laboratório.	44
Tabela 2. Principais parâmetros de aquisição utilizados para as medidas de RMN de ^1H e ^{13}C	48
Tabela 3. Componentes do método de validação de RMN de ^1H	49
Tabela 4. Separação dos conjuntos de classificação das amostras S500 e S1800 utilizando o KS.	58
Tabela 5. Classificação dos seis(6) conjuntos de quantificação das amostras de BX utilizado o algoritmo KS.	59
Tabela 6. Erro da pipeta 100-1000 μL (Gilson®) calculado usando o biodiesel e uma balança analítica (Shimadzu) com calibração RBC.	61
Tabela 7. Dados da repetitividade obtidos pelo analista A.	67
Tabela 8. Dados em da repetitividade para o analista B.	68
Tabela 9. Reprodutibilidade de RMN de ^1H dos analistas A e B.	69
Tabela 10. Volume das amostras para a determinação da faixa de linearidade.	71
Tabela 11. das integrações das áreas das metoxilas ($\text{H}_3\text{CO}-$) de BX S1800.	71
Tabela 12. Valor do divisor de acordo com cada distribuição de probabilidade.	74
Tabela 13. Planilha contendo as fórmulas para transformar a fonte de incerteza em incerteza padrão (u_i).	75

Tabela 14. Tabela da incerteza expandida ($U_{95\%}$) para o método de RMNq de ^1H com um nível de confiança de 95%.....77

Tabela 15. Dados da previsão das 19 amostras de BX S500 e S1800 usando os modelos SPA-LDA com erro igual a zero.....85

Tabela 16. Resultados para os modelos de validação usando o algoritmo SPA-MLR de RMN ^1H e ^{13}C para o biodiesel em diesel.....97

RESUMO

TRATAMENTO METROLÓGICO E QUIMIOMÉTRICO DE DADOS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR PARA AMOSTRAS DE BODIESEL EM DIESEL.

O desenvolvimento da instrumentação na Ressonância Magnética Nuclear (RMN) aumentou a sensibilidade da técnica, permitindo que amostras em escalas de micro e nanogramas possam ser analisadas. Essas novas tecnologias possibilitaram que a técnica de RMN fosse vista como uma ferramenta analítica para a quantificação de substâncias além do seu uso na identificação como tradicionalmente se fazia. A Ressonância Magnética Nuclear quantitativa (RMNq) é uma área muito importante que ainda é pouco utilizada na química analítica, havendo a necessidade de um estudo de validação para verificar sua capacidade de quantificação por um ponto de vista metrológico. As aplicações de validação de métodos minimizam os problemas potenciais associados com o método analítico e também dão credibilidade ao método estudado, fornecendo informações abrangentes sobre muitos aspectos importantes que refletem o comportamento e a confiabilidade do método. Os estudos de validação de métodos de RMNq foram realizados em conformidade com a norma ISO/IEC 17025 e ISO GUM. A validação do método é seguida pela medida da incerteza de medição em RMNq e a sua importância vem sendo difundida no meio dos químicos analíticos e em meio à sociedade química em geral. As normas de atividade química instituem como fonte de padronização os estudos de seletividade, que investigam os efeitos dos prováveis interferentes nas amostras e, para a técnica RMN, ela é superior a muitos outros instrumentos analíticos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi o de apresentar ferramentas quantitativas alternativas, levando em consideração a metrologia na

quantificação de substâncias por RMN de ^1H , o que é algo absolutamente novo para o comércio brasileiro. A medida da seletividade foi realizada utilizando-se a quimiometria de quantificação nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . A metrologia dos principais interferentes da técnica RMN de ^1H foi estudada para a quantificação dos teores de biodiesel, em amostras padrões e comerciais de óleo diesel em diferentes proporções de biodiesel na mistura BX. Este estudo levou à separação de dois conjuntos de amostras os quais, por quimiometria de classificação utilizando-se o algoritmo *Successive projection algorithm – Linear discriminant analysis* (SPA-LDA), foram amplamente separados em óleo diesel contendo teores de enxofre em 1800 e 500 ppm. A seletividade foi calculada pela quimiometria de quantificação, através do algoritmo SPA - *Multiple linear regression* (SPA-MLR), do teor de enxofre, da massa específica à 20 °C, da temperatura de destilação a 50% e a 80% do óleo diesel, do índice de cetano e do ponto de fulgor comparados aos resultados obtidos por laboratório (Laboratório de Combustíveis do CCDM/DEMa da Universidade Federal de São Carlos) credenciado pela ANP (Agência Nacional do Petróleo).

ABSTRACT

METROLOGICAL AND CHEMOMETRIC TREATMENT OF NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE DATA FOR BIODIESEL IN DIESEL SAMPLES. The development of instrumentation in Nuclear Magnetic Resonance (NMR) increased the sensitivity of the technique, allowing samples in micro and nanogram scale can be examined. These new technologies enabled the NMR technique was seen as an analytical tool for the quantification of substances in addition to their use in identifying as traditionally did. Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (qNMR) is a very important area that is not widely used in analytical chemistry, with the need for a validation study to verify its ability to quantify by a metrological point of view. The application and validation of methods minimize the potential problems associated with the analytical method and also lends credence to the method studied, providing comprehensive information about many important aspects that reflect the behavior and reliability of the method. The validation studies of methods RMNq were performed in accordance with ISO / IEC 17025 and ISO GUM. The validation of the method is followed by measuring the uncertainty of measurement qNMR and its importance has been widespread in the analytical chemists area and also in the chemical society in general. The rules for establishing chemical activity as a source of patterning the selectivity studies, investigating the effects of interferents likely in the samples, and for the NMR technique, it is superior to many other analytical instruments. Therefore, the objective of this study was to provide quantitative and alternatives tools, taking into account the metrological quantification of substances by ^1H NMR, which is something absolutely new for the Brazilian market. The measure of the selectivity was performed using quantification chemometrics in the spectra of ^1H

and ^{13}C NMR. Metrology of the main interfering in the ^1H NMR technique was studied to quantify the levels of biodiesel in commercial samples and standards of diesel in different proportions in the mixture of biodiesel BX. This study led to the separation of two sets of samples which, by classification using the chemometrics algorithm Successive projection algorithm - Linear Discriminant Analysis (SPA-LDA), are widely separated in diesel fuel containing sulfur in 1800 and 500 ppm . The selectivity was calculated by the quantification chemometric by the algorithm SPA - Multiple linear regression (SPA-MLR) of sulfur content, the density at 20°C, the distillation temperature to 50% and 80% of diesel oil, the cetane number and flash point compared to the results obtained by laboratory (Laboratório de Combustíveis do CCDM/DEMa Universidade Federal de São Carlos) accredited by the ANP (Agência Nacional de Petróleo e Biocobumstíveis).

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metrologia em RMN

A técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi proposta inicialmente por Pauli^[1] em 1924, mas foi somente na década de 40 que os primeiros experimentos foram realizados. Em 1946, dois laboratórios independentes realizaram com sucesso experimentos de RMN, um para amostras no estado líquido e outro para sólidos^[2,3]. A segunda geração dos espectrômetros de RMN apareceu somente na década de 70, quando os magnetos supercondutores foram desenvolvidos, utilizando pulsos de radiofrequência em substituição às ondas contínuas e fazendo-se uso da transformada de Fourier para a obtenção dos espectros no domínio de frequência. Essa tecnologia permitiu um maior controle na orientação da magnetização dos núcleos das amostras e iniciando uma variedade muito grande de sequências de pulsos. Desde então, a espectrometria de RMN tem tido avanço em várias áreas de aplicações, utilizando amostras tanto em solução, estado sólido e de materiais heterogêneos, bem como na geração de imagens^[4-6].

Atualmente o desenvolvimento da instrumentação na RMN aumentou a sensibilidade da técnica, permitindo que amostras em escalas de micro e nanogramas possam ser analisadas, utilizando-se sondas refrigeradas por hélio/nitrogênio sob compressão (sondas criogênicas). Essas novas tecnologias possibilitaram que a técnica de RMN fosse vista como uma ferramenta analítica, não só para identificar substâncias como tradicionalmente era utilizada, mas também para sua quantificação.

A Ressonância Magnética Nuclear quantitativa (RMNq) é uma área importante que ainda é pouco utilizada na química analítica. Ela tem sido utilizada como uma técnica qualitativa desde a sua invenção, mas foi também proposta como um método de análise quantitativa desde 1970, com ênfase em sua aplicação nas pesquisas químico-farmacêuticas^[7-9]. Jancke H. (1998) propôs a espectroscopia de RMN como um método analítico primário, haja visto, que a sua quantificação refere-se aos núcleos da amostra em análise, independentemente da necessidade de uma amostra padrão. Por essa razão, a RMN de hidrogênio (^1H) tem sido utilizada como uma técnica quantitativa, que aliada ao fato da sua grande sensibilidade, dos núcleos de hidrogênio também possuir um tempo de relaxação curto, não ter problemas do efeito nuclear Overhouser (n.O.e) ainda tem aproximadamente cem por cento (100%) de abundância natural^[10].

As aplicações da RMNq têm, nos últimos 20 anos, um número de publicações extensivos. Haiber et. al (2002) quantificou os extratos vegetais pela combinação da técnica de RMN unidimensional (1D) e bidimensional (2D)^[11]. A análise quantitativa dos sinais no domínio do tempo de RMN de baixo campo tem sido reportada por Nordon et. al (2001) usando o método da inserção de padrão interno na amostra. O autor descreve ainda dois novos métodos (FID-DECRA: algoritmo da resolução da curva exponencial direta e PLS: mínimos quadrados parciais) para análise quantitativa direta do decaimento livre de indução (*free induction decay* - FID). Enquanto o primeiro método deu uma exatidão com um erro menor que 5% (desvio padrão relativo de 2,3%) usando somente uma amostra de calibração, no segundo método um conjunto de 10 misturas de padrão proporcionou um resultado com exatidão e precisão comparáveis^[12].

Um novo método para determinar a pureza de substâncias foi discutido por Herndeson T. J. (2002) em contraste ao método convencional de padrão interno de RMNq, em que foi inserido um tubo coaxial com o material de referência para evitar possíveis reações/interações com o analito. O método encontrado foi altamente específico e robusto com respeito a indução da variável pelo operador, parâmetros experimentais e toda a influência da relaxação magnética nuclear. A pureza das substâncias foi determinada com a precisão e exatidão em torno de 1%, e a impureza foi detectada em concentrações abaixo de 25 µg/mL, enquanto o limite de quantificação foi estabelecido em 85 µg/mL. O método usando a RMNq e o método cromatográfico tiveram semelhantes precisão, exatidão e tempo de execução^[13]. Um método na espectroscopia de RMN de ¹H foi desenvolvido para permitir a microdeterminação de hexametilenotetramina (HMT) em solução aquosa usando a substância anisol como um padrão interno. HMT foi determinado na faixa de 5-50 µg, sendo que, o sucesso na determinação de HMT em microescala depende das otimizações e ajustes cuidadosos dos parâmetros instrumentais, da relação sinal/ruído, da eliminação de água e outros interferentes^[14].

A literatura pesquisada reporta inúmeros artigos sobre a potencialidade da RMNq, como o emprego da espectroscopia de RMN de deutério (²H) na determinação quantitativa da abundância natural dos isótopos ²H em amostras contendo 6,7-diidro-capsaicina e capsaicina^[15]. A espectroscopia de RMNq de ¹H *in situ* tem sido usada para o monitoramento do consumo de monômeros e estimar as razões de sua reatividade^[16]. A RMN de ¹H tem sido também empregada para medir a dinâmica fluxional em compostos de cadeia longa em soluções de óxido de polibutadieno e polietileno^[17], e para quantificar metabólitos encontrados no cérebro humano, *in vivo*, usando análise de rede neural artificial automatizado^[18].

Técnicas analíticas combinadas de RMN e HPLC podem ser utilizadas para superar os problemas quantitativos. Peters et. al (2002) usaram a RMNq de ^1H para determinar de poli metacrilato de metila obtido por HPLC com detecção por espalhamento de luz. Os resultados foram comparáveis e em boa concordância^[19]. Os metabólitos encontrados em bile de rato e na sua urina tem sido quantificados usando método de contagem por cintilação, seguido por um estudo comparativo com RMNq de ^1H e ^{19}F ^[20]. O acoplamento das espectroscopias de RMN de ^1H e ^{19}F e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (RMN-HPLC) têm sido usadas para quantificar e identificar os metabólitos excretados na urina de ratos^[21]. Os polifenóis em folhas de *Pistacia lentiscus L.* foram somente possíveis de identificar e quantificar pela combinação das técnicas de HPLC-MS junto com a RMN de ^1H e ^{13}C . Esta combinação permitiu estabelecer uma relação entre a composição química e a atividade biológica de *P. lenticius*^[22]. Uma boa concordância entre os resultados obtidos pelas análises de HPLC e RMNq de ^1H tem sido registrado por Lacroix et. al (1994), para a quantificação do enantiômero R, em oito lotes de matéria prima da droga maleato de timolol. Os limites de quantificação foram 0,05 % e 0,2 % (m/m) para o HPLC e RMN, respectivamente^[23].

Van-Beek et. al (1993) descreveram um procedimento quantitativo em folhas de *Ginkgo biloba* por RMNq de ^1H usando ácido maleico como padrão interno. Obtendo-se bons resultados quanto à sensibilidade da técnica e comparáveis com as medidas feitas via HPLC, sendo que a RMN apresenta várias vantagens especialmente em relação ao tempo menor de análise e no preparo da amostra^[24].

Os princípios fundamentais para as medidas quantitativas em fluxo contínuo HPLC-RMN foram registrados por Haw et. al em 1982, que sugeriram o uso de um padrão interno e também foram discutidas algumas fontes de erros

sistemáticos^[25]. Godejohann et. al (1998) descreveram em profundidade as medidas quantitativas em fluxo contínuo HPLC-RMN, bem como o sucesso da combinação de ambas as técnicas. Como exemplo, as bombas de HPLC devem fornecer um fluxo e pulsação constantes e esta taxa de fluxo tem que ser exatamente conhecida, além disso, o padrão interno e o analito devem ser solúveis na fase móvel^[26,27].

A diversidade de aplicações da RMNq tem motivado pesquisadores para investigar a confiabilidade da RMN de ^1H como um método quantitativo. Griffiths et. al (1998) discutiram em profundidade os limites de quantificação em RMN e, concluíram que o método utilizando um padrão interno na RMNq, soma uma série de erros como: massas do analito em relação às do padrão interno, tempo de aquisição, duração dos pulsos, tempo de relaxação, utilização de funções de apodização, preenchimento do FID com zeros (*zerofilling*), os limites das regiões de integração, correções de fase e linha de base no espectro^[28]. Minimizando essas fontes de erros, obtêm-se como limite mínimo de detecção, para um determinado analito, cerca de 1%, o que aumenta a aplicação dessa técnica como ferramenta analítica.

Claramente, a RMN tem-se apresentado como uma alternativa para medida quantitativa confiável, precisa e exata entre as muitas técnicas analíticas. Alternativas não cromatográficas têm tido uma forte demanda para a detecção de pureza de compostos orgânicos. Essa demanda é facilmente entendida com as várias vantagens da RMN frente às outras técnicas. A preparação da amostra é mínima na RMN, ou seja, muitas vezes se resume em dissolver o analito e o material de referência interna em um solvente deuterado. Ao contrário, um maior número de etapas está envolvido nos métodos cromatográficos, todos com erros contínuos, mesmo num caso mais simples, quando a amostra e um padrão interno são

pesados, seguidos por uma série de diluições levando a solução analítica para uma faixa linear do detector ou para acomodar o fator de capacidade da coluna de separação, além de outros passos que envolvem a derivatização e desgaseificação da amostra. A técnica de RMN permite a recuperação total da amostra intacta e oferece uma solução para muitos problemas difíceis de serem resolvidos por HPLC direto ou por Cromatografia Gasosa (CG). Além disso, em contraste com o método cromatográfico, não há nenhuma exigência para o uso de materiais de referência padrão para cada constituinte do analito, que pode não ser facilmente comercializado, e sim, o uso de um padrão interno de pureza conhecida mas sem relação com o analito alvo.

Wells et. al (2001 e 2002) observaram que a pureza dos padrões que são certificados por cromatografia ou calorimetria por varredura diferencial foram encontradas fora da faixa de certificação quando examinadas por RMN. Um estudo comparativo de RMNq com métodos cromatográficos, sejam eles por CG ou HPLC, para a determinação de pureza e impureza em agrotóxicos grau técnico, tem revelado que RMNq é mais precisa e exata que os métodos cromatográficos^[29].

Pauli G. F. (2001) considera a RMNq um método versátil em material de referência certificado e enfatizou a demanda crescente de alternativas não cromatográficas para a avaliação de sua pureza. O estudo mostrou ainda que RMNq de ^1H permite a determinação precisa e simultânea de ambos, os teores de compostos bem como a quantidade e a natureza das impurezas. O método é discutido respeitando-se a sensibilidade, precisão e seletividade^[30].

Como é difundido o uso de RMN como uma ferramenta de medidas quantitativas, há a necessidade de um estudo de validação para verificar sua capacidade de quantificação por um ponto de vista metrológico.

As aplicações de validação de métodos minimizam os problemas potenciais associados com o método analítico. Eles também dão credibilidade ao método estudado e fornecem informações abrangentes sobre muitos aspectos importantes que refletem o comportamento e a confiabilidade do método. Os estudos de validação de métodos de RMNq devem ser realizados em conformidade com normas internacionais, tais como a ISO/IEC 17025 (*International Organization for Standardization / International Electrotechnical Commission*)^[31] e o GUM (*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*)^[32], seguindo as respectivas normas/guias veiculadas pelo INMETRO. Robustez, especificidade e seletividade, exatidão, precisão, linearidade, limites de detecção e quantificação, incerteza de medição e a quantidade de constituintes químicos podem ser determinados com uma certa exatidão e uma precisão.

A metodologia é documentada como o passo final na validação do método, de forma que o mesmo possa ser usado por outras pessoas inequivocamente e reproduzir os mesmos resultados.

O método de validação é seguido pela medida da incerteza de medição em RMNq. A importância da incerteza de medição vem sendo difundida no meio dos químicos analíticos e em meio à sociedade química em geral, especialmente depois da necessidade da garantia da qualidade, segurança e confiabilidade de laboratórios de ensaios e calibração, que atualmente tem sua competência reconhecida por meio da sua acreditação de acordo com a norma ISO/IEC 17025.

A determinação das fontes da incerteza no método RMNq pode ser realizada empregando diversas metodologias, como por exemplo pelo emprego do diagrama de Ishikawa seguido por uma descrição abrangente na preparação da incerteza. A incerteza estimada de todas as medidas dos analitos e materiais de

referência são relatadas nas cadeias de rastreabilidade das medições estabelecidas nas unidades do Sistema Internacional de Medidas (SI). Esta rastreabilidade é a chave elementar para o reconhecimento de qualquer resultado de teste e ele garante que todos os laboratórios que possam ser envolvidos trabalhem com a mesma escala de medição ou os mesmos pontos de referência. Assim, ele permite a comparação entre os resultados de diferentes laboratórios, ou do mesmo laboratório, mas em momentos diferentes, por operadores diferentes, mas para as mesmas amostras.

O experimento de RMN de ^1H é a técnica mais utilizada e o núcleo de hidrogênio o mais sensível dentre os vários núcleos passíveis de serem observados pela técnica. Mesmo apresentando uma faixa espectral relativamente estreita (aproximadamente 20 ppm, de -5 a 15 ppm), as medidas de RMN de ^1H precedem as medições obtidas por RMN de ^{13}C . Desta forma pode-se ter uma medida efetiva do segundo núcleo para a sua quantificação.

O núcleo de ^{13}C é menos sensível que o de ^1H , isso devido à sua abundância natural menor e ao valor da sua constante magnetogírica. Alguns fatores extras afetam a medida quantitativa quando utilizamos a RMN de ^{13}C . Dentre elas temos o efeito nuclear Overhauser (n.O.e) e o tempo de relaxação, fatores que precisam ser considerados cada a caso^[33]. A norma ASTM D5292 indica os agentes de relaxação que diminuem o tempo para a quantificação de óleos pelas técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C .

O objetivo dessa discussão foi o de apresentar os métodos quantitativos alternativos, em várias áreas das análises orgânicas, levando em consideração a metrologia na quantificação de substâncias por RMN, que é algo absolutamente novo para o setor produtivo brasileiro.

1.1.1. Validação do método

O estudo de validação de método depende da determinação dos parâmetros de desempenho da técnica. Esses parâmetros são obtidos durante o desenvolvimento do método a ser estudado ou seguindo protocolos de validação interna^[34]. A importância da validação de método tornou-se recentemente clara entre os analistas, embora muitos conceitos relacionados já existam na literatura^[35-63].

Green J. M. (1996) descreveu um guia prático da validação do método analítico^[64], que estão abordadas nas referências de 35 a 63, e que, reuniu alguns nomes de parâmetros e conceitos de validação básicos, tais como: especificidade, linearidade, estabilidade e robustez do método. O guia também menciona como diminuir todos os problemas potenciais associados ao método analítico e as consequências de não fazê-lo. Princípios de validação geralmente são aplicáveis aos métodos de laboratórios analíticos^[65] que esboçam uma validação prática para assistir ao analista na avaliação de um método. Os conceitos de validação baseados na ISO 8402 foram definidos como a confirmação por evidências objetivas e exames que o método atende aos requisitos específicos que incluem os conceitos de exatidão, precisão, seletividade, sensibilidade, linearidade, faixa de aplicação, limites de detecção, quantificações, robustez e confiabilidade.

O desenvolvimento e a validação de um novo método podem ser considerados como um processo iterativo, que geralmente é conhecido como “ciclo de desenvolvimento de validação”, porque os dados do processo de desenvolvimento podem ser usados nos estudos de validação, enquanto os resultados de validação podem indicar mudanças na metodologia. Independente de

quão eficaz é o método desenvolvido e como ele é usado com habilidade, ele não deve ser posto em prática antes da sua validação. Os analistas de um laboratório de desenvolvimento devem ser conscientes das possíveis fontes de erros e o ajuste pode ser feito para aperfeiçoar o modelo, mas isso pode ser perdido quando o método é transferido para outro laboratório, ou aplicado por analistas não qualificados. O papel da validação, assim como descrito, deve realçar as possíveis funções de erro e incerteza (durante o processo de validação) e desta forma fornecer uma diretriz de precisão esperada do método. Portanto, um método deve ser validado quando for necessário verificar se os seus procedimentos paramétricos são adequados para seu uso em problemas analíticos particulares^[66-68].

Como um método pode ser validado? Será que é um procedimento do laboratório, analista ou do desenvolvedor de método? Ou deve-se deixar esse processo para os peritos e os metrologistas?

Embora haja um consenso geral sobre o que é estudado pela validação de método e que aspectos devem ser testados, há uma grande diversidade de maneira como ele deve ser aplicado.

A norma brasileira ABNT ISO/IEC 17025: 2005^[31] institui os requisitos gerais para a padronização de atividades de laboratórios de ensaios e calibrações, que representam os parâmetros como: especificidade, robustez, exatidão, precisão, linearidade, incerteza de medição usando o GUM e seletividade^[69,70]. O documento do INMETRO necessário para a acreditação, o DOQ-CGCRE-008, revisão 02, julho de 2007, fornece a orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, e a validação aplicada a técnica de RMN quantitativo é apresentada no trabalho de Malz F. et. al em 2005^[71].

A especificidade avalia se os sinais, no caso da RMN, estão em regiões que não são afetados por outros, tanto de contaminantes quanto do analito. No caso da RMN, ela é superior a muitos outros instrumentos analíticos, pois cada núcleo ativo tem uma constante magnetogírica (γ) característica do núcleo e uma frequência bem definida (ν). Seletividade e especificidade são medidas que avaliam a confiabilidade na presença de interferentes na matriz em estudo.

Exatidão pode ser definida como o grau de concordância entre o resultado de medição e o valor verdadeiro do mensurado^[72]. A exatidão, quando aplicada a um conjunto de resultados de teste, envolve a variação de componente sistemática de erros. Portanto, a validação de métodos serve para quantificar a exatidão avaliando os efeitos sistemáticos e aleatórios nos resultados^[74]. O VIM^[73] define exatidão como uma quantidade que se refere às diferenças entre a média do conjunto de resultados ou um resultado individual e um valor pelo qual é aceitável como verdadeiro ou valor correto de uma medida quantitativa.

Precisão é a capacidade em promover a repetitividade e reprodutibilidade de um método. Protocolos de validação também exigem a avaliação da robustez, a qual dá uma indicação da validade da medida obtida em diferentes condições.

Linearidade pode ser definida como a habilidade do método em obter resultados de testes proporcionais à concentração do mensurado^[72].

Os estudos de seletividade investigam os efeitos dos prováveis interferentes nas amostras. Os resultados normalmente são usados para demonstrar que para efeitos práticos esses interferentes não são significativos^[73], ou seja, mesmo tendo um contaminante na amostra ele não interfere na medida realizada.

Finalmente, a validação de um método deve dar uma indicação do nível de detecção para uma dada matriz e, portanto, limites de detecção e de quantificação são determinados no método estabelecido.

No entanto, deve-se questionar se laboratórios podem validar seus próprios métodos. Um programa interlaboratorial, deveria apenas reconhecer a adequação de uma validação^[75]. Entretanto, esse estudo pode ser comprometido em função dos interesses mútuos e da dificuldade de encontrar laboratórios que desenvolvam ensaios com os mesmos propósitos e métodos. Existem duas alternativas para compensar a falta de informação da medida interlaboratorial: a medida do material de referência certificado e a comparação do método avaliado com aqueles que já foram validados anteriormente.

Uma vez completado o processo de validação, é importante que ele seja documentado. Isto fornece um guia com nível de segurança e consistência para a aplicação do método. Além disso, a documentação apropriada é necessária para a auditoria realizada pelos órgãos de acreditação. A qualidade da documentação terá uma influência direta sobre reprodutibilidade e no grau de incerteza do método e, portanto, uma documentação inadequada pode produzir incerteza extra e que pode tornar inútil o método. Portanto, as informações que devem ser incluídas na documentação de um método é uma descrição completa e detalhada de todo o processo e em ordem lógica. Uma armadilha comum é assumir que todos entenderão o método da mesma forma que a pessoa que o documentou. Usualmente, a documentação começa com o título, finaliza com o sumário e as referências bibliográficas são indicadas para dar uma base teórica. O tipo de informação que deve ser incluída na documentação de um método, para um laboratório em particular, é desejável e recomendável que tenha o mesmo formato

de documentação para todos os métodos a serem desenvolvidos por aquele mesmo laboratório. Com isso garante-se o mesmo grau de detalhamento para todos os métodos^[76].

Em função do desenvolvimento técnico e aprimoramento dos métodos ao longo do tempo, as atualizações e revisões da documentação tornam-se necessárias. A proposta de alterações da documentação visando melhor entendimento e/ou modificação dos métodos devem ser discutidas por todas as pessoas que se utilizam do documento, entretanto sua alteração só deve ser realizada pelas pessoas que tenham autorização para tal. Após atualização, estas devem treinar todos os envolvidos na execução do método para essa nova revisão do documento.

1.1.2. Incerteza de medição em RMNq

A incerteza da medição tornou-se uma importante questão em torno da apresentação dos resultados químicos, especialmente, depois da introdução da norma ISO/IEC 17025^[31]. A introdução do conceito de incerteza fez com que as agências de acreditação aumentassem o grau de exigência na comprovação da confiabilidade de seus resultados. As primeiras tentativas formais para o estabelecimento do princípio de incerteza ocorreram em 1980. Em função da complexidade, surgiram dúvidas de como a incerteza de um resultado deveria ser estimada e expressa pelos diferentes laboratórios. Essas dificuldades levaram a criação de um fórum, a *Bureau International des Poids et Mesures* (BIPM). Participaram 11 laboratórios do grupo de trabalho do *Comite International des Poids et Mesures* (CIPM) para elaborar as recomendações na expressão da incerteza. Na

seqüência, a *International Organization for Standardization* (ISO) foi convidada para desenvolver um texto padrão, sendo que esse trabalho foi coordenado pelo ISO *Technical Advisory Group on Metrology* (TAG4). Diversos documentos sobre a expressão da incerteza em medição foram publicados em 1993 pela ISO^[77].

Posteriormente, uma versão corrigida em 1995 (ISO GUM) foi elaborada e finalmente culminou com o lançamento do Guia EURACHEM/CITAC “*Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*” em 2000^[72], que foi o trabalho desenvolvido pelo grupo *European Chemistry* (EURACHEM) juntamente com os membros internacionais da CITAC, IAEA e AOAC. Enquanto a versão de 1995 foi baseada no Guia ISO, a versão final em 2000 foi elaborada à luz da experiência da estimativa de incerteza em laboratórios de química e de uma maior conscientização da necessidade de se introduzir procedimentos formais de qualidade em laboratórios. Esta versão enfatizou que a estimativa da incerteza de medição deve ser integrada com medidas da garantia da qualidade existente. Assim, a estimativa da incerteza de medição estava em total conformidade com os princípios formais do Guia ISO e, portanto, consistente com o requerimento da norma ISO 17025^[31].

A incerteza é assim definida: “*Um parâmetro associado com um resultado de medição que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurado*”^[78]. Qualquer medida tem uma incerteza associada ao seu resultado. Por isso, é necessário uma declaração quantitativa desta incerteza para que ela tenha credibilidade. A incerteza de medição dá a credibilidade, fornecendo os limites de dispersão do valor verdadeiro. Os componentes individuais de incerteza podem ser estimados pelos procedimentos do tipo A, utilizando o desvio padrão de medidas repetidas, ou pelo tipo B, que usa qualquer outro meio como

experiência, conhecimento e etc., e que, poderia ser a principal fonte de erro na incerteza final combinada^[79].

Estimativa da incerteza de medição refletirá a contribuição de todas as fontes de erros maiores, mas a incerteza não é suficiente para avaliar os resultados, a menos que, estes resultados sejam rastreáveis a padrões e todos os resultados forem produzidos por diferentes laboratórios, ou várias vezes pelo mesmo laboratório. Esta cadeia ininterrupta de comparações leva a um ponto de referência comum e garante que os diferentes operadores estejam usando a mesma unidade de medida.

A incerteza de medição está intimamente ligada à rastreabilidade de cada laboratório. Isso explica porque é importante o uso de material de referência certificado no método de análise. Isso estabelece a rastreabilidade nos resultados e, juntamente com a incerteza de medição, irá proporcionar credibilidade ao método.

O último relatório apresentado pelo *International Measurement Evaluation Programme* foi o IMEP-16, que enfatiza a necessidade de se aumentar o conhecimento sobre esta questão. Os congressos conduzidos pela EURACHEM em Graz (1994) e em Berlim (1997) ofereceram os princípios para a avaliação e expressão da incerteza de medição em análise química^[80,81]. Tentativas de promover a implementação de incerteza não têm parado, e um sistema de programa especializado foi desenvolvido, em cooperação com institutos de pesquisa e fabricantes de instrumentos analíticos, permitindo o cálculo da incerteza para análises de procedimentos como a titulação, espectrometria de emissão atômica, espectrometria de absorção atômica e cromatografia líquida e gasosa^[79].

Considerando o que foi exposto, fica evidente que a determinação das incertezas de medição é um processo longo e difícil, pois envolve o conhecimento e

investigações das diversas fontes de incerteza que estão associadas a uma determinada medida^[82-92]. De qualquer forma, este conhecimento é uma importante ferramenta que pode ajudar na redução da incerteza total de um método analítico e aumentar a eficiência do método^[93,94].

1.1.2.1. Rastreabilidade

Rastreabilidade pode ser definida como o resultado de uma medição e que pode estar relacionado às referências estabelecidas, que geralmente são padrões internacionais ou nacionais, através de uma cadeia contínua de comparações, sendo que todas tenham as suas incertezas estabelecidas^[72]. A diferença entre os resultados de um método pode ser causada por variações nos parâmetros de medida. Por isso, é essencial a presença de um indicador externo pois ele permite demonstrar a conversão interlaboratorial^[95,96].

O estabelecimento da rastreabilidade e da avaliação da incerteza do resultado de uma medição são essenciais a fim de se estabelecer sua aptidão para fins de comparabilidade^[97]. A norma ISO/IEC 17025^[31] também a enfatiza como um elemento-chave para o reconhecimento de quaisquer resultados de testes e medições químicas, ou seja, envolve a necessidade de referências iniciais e uma incerteza claramente declarada, fornecendo a comparabilidade entre os resultados e evitando a duplicação de medidas que levam ao aumento de tempo e custos^[98]. Portanto, a necessidade crescente de demonstrar a confiabilidade em medições analíticas levou a enfatizar a criação de cadeia de rastreabilidade nas medições^[99].

A literatura tem divulgado amplamente os conceitos envolvidos na rastreabilidade, no entanto, estabelecer a cadeia completa de rastreabilidade do resultado de uma medida geralmente não é um processo simples.

A rastreabilidade de materiais de referência, torna-se importante e eficaz na construção da estimativa da incerteza, isto é, a análise da causa e efeito do modelo. Comumente para um método analítico é necessário desenvolver e registrar uma lista de fontes de incerteza relevantes. Para isso, tem que compreender quais são os fatores importantes que poderão influenciar nos resultados analíticos obtidos por um método específico. O diagrama da causa e efeito do método é uma das ferramentas empregadas para mostrar as relações entre um dado efeito e uma causa potencial, bem como organizá-las em categorias e subcategorias principais, assemelhando-se com uma espinha dorsal de um peixe (Figura 1).

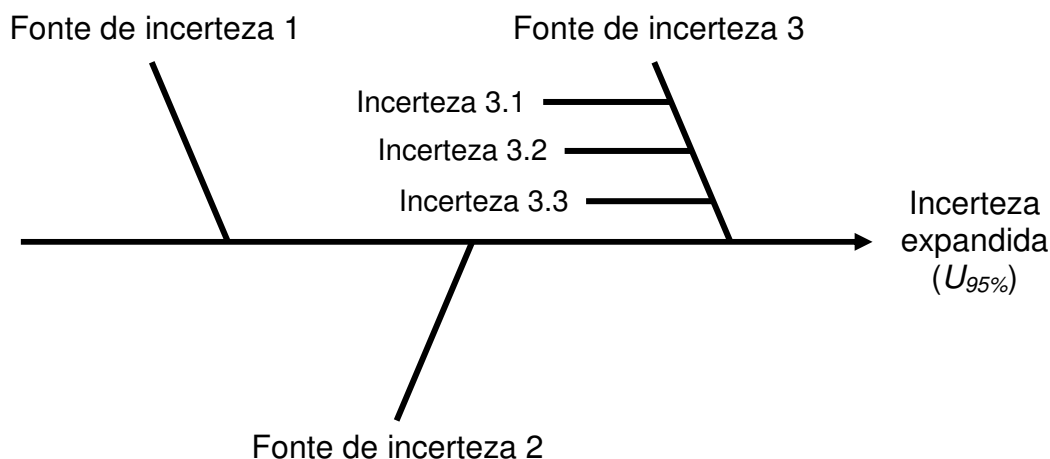


Figura 1. Diagrama de Ishikawa mostrando a relação causa/efeito para uma incerteza expandida ($U_{95\%}$).

Essa metodologia passou a ser conhecida como diagrama de espinha de peixe ou diagrama de Ishikawa^[100]. Os princípios de construção do diagrama causa-

efeito são descritos na literatura^[101,102] e na figura 1 exibe uma representação desse diagrama aplicado a uma determinada situação.

1.2. Quimiometria

A RMN é uma das técnicas mais poderosas e utilizadas para a caracterização e elucidação estrutural de compostos orgânicos e organometálicos. No entanto, ela ainda é pouco empregada como um instrumento analítico tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Vários trabalhos em que se empregam a RMN como obtenção de *fingerprinting* são descritos na literatura e, em particular pelo grupo de RMN do DQ/UFSCar. Vale destacar o emprego da RMN como *fingerprinting* em amostras de alimento como vinagre, aguardente, entre outros^[103,104]. Também vem sendo utilizado para a obtenção de *fingerprinting* para controle de qualidade de medicamentos a base de plantas. Nesses trabalhos, utiliza-se a RMN aliada à quimiometria, em que são obtidos resultados expressivos, que possibilitam discriminar os vários elementos de interesse para cada matriz estudada^[104,105].

Uma ferramenta valiosa e que está sendo utilizada com muita frequência na química, principalmente na química analítica, é a utilização de métodos quimiométricos como um instrumento estatístico na avaliação de perfis, também denominados *fingerprintings*, a partir de medidas espectroscópicas e espectrométricas obtidas de diversos materiais, os quais nos permitem avaliar similaridades ou diferenças na composição de amostras^[106,107]. Esses perfis podem ser obtidos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C a fim de avaliar a potencialidade das técnicas como fator discriminante entre as amostras de várias origens e/ou de

diferentes constituições químicas. Utilizando-se o Algoritmo das Projeções Sucessivas (SPA) aplicado aos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , reduz-se para poucas variáveis, de importância inestimável, que contribuem para a classificação e quantificação das amostras.

Araújo et al.^[108] (2001) construíram o SPA (*Successive Projections Algorithm*), como uma técnica de seleção de variáveis que utiliza operações simples num espaço vetorial para minimizar problemas de colinearidade, e que, mostrou ser um método eficiente para seleção de variáveis espectrais no contexto da calibração multivariada, especificamente quando aplicado à regressão linear múltipla (MLR do inglês, *Multiple Linear Regression*).

O objetivo do SPA consiste em buscar um pequeno subconjunto representativo de variáveis espectrais com ênfase na minimização da colinearidade. Com isso, torna-se possível utilizar modelos MLR que, embora simples e de fácil interpretação, podem ser severamente afetados por problemas de colinearidade. Para diagnosticar a colinearidade, verifica-se a matriz de correlações das variáveis explicativas apresenta altas correlações que varia de 0 a 1. Por exemplo, se a correlação de duas variáveis for próxima de 1, alta colinearidade, se for próxima de 0 o inverso.

O trabalho inicial da aplicação do SPA^[109] foi realizado em uma análise espectrofotométrica, na região do ultravioleta-visível, simultânea de vários complexos de Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} com 4-(2-piridilazo) resorcinol em misturas que continham os analitos nas faixas de concentração de 0,05 a 1,5 mg L^{-1} e de 0,02-0,5 mg L^{-1} .

Adicionalmente, foi realizado um estudo comparativo envolvendo outros métodos, tais como: PLS e regressão por componentes principais (PCR: *Principal*

Component Regression). Através do SPA-MLR foram obtidos os melhores resultados.

Após a apresentação inicial do SPA, novos artigos foram publicados com diferentes modificações e aplicações, incluindo as técnicas de UV-VIS^[108], FTIR^[110] e espectrometria NIR^[111,112].

Vale ressaltar que, no que diz respeito aos métodos de classificação, a habilidade de generalização dos modelos de Análise Discriminante Linear (LDA) pode ser comprometida pela presença de colinearidade entre as variáveis^[113,114]. Por essa razão, a LDA se restringe normalmente aos problemas de pequenas dimensões. Dessa forma, a minimização de colinearidade proporcionada pelo SPA deve ser útil também para modelos LDA.

A LDA é um dos Métodos de Reconhecimento de Padrão supervisionados mais utilizados. Foi originalmente proposta por Fisher^[115] e é utilizada por muitos autores em diversas aplicações em química, incluindo alimentos^[116,117], bebidas alcoólicas^[118] e gasolina, entre outros^[119]. Esse método é baseado na determinação de funções discriminantes lineares as quais maximizam a variância entre as classes e minimizam a variância dentro de cada classe. A LDA pode ser considerada, assim como a Análise das Componentes Principais (PCA), um método de redução de dimensionalidade. Contudo, enquanto a PCA seleciona uma direção que retém a máxima variância dos dados em uma menor dimensão, a LDA seleciona uma direção que alcança a separação máxima entre as classes avaliadas conforme pode-se observar na figura 2.

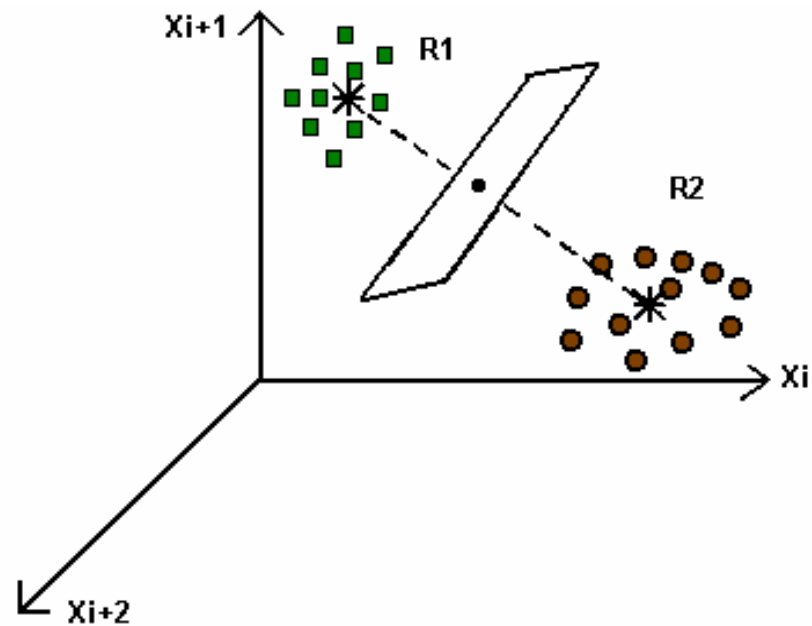


Figura 2. Representação esquemática da análise discriminante linear. R1 e R2 são duas classes diferentes^[120].

Uma desvantagem da LDA em relação aos outros métodos de reconhecimento de padrão supervisionados é que a mesma é apropriada apenas para conjuntos de dados de pequenas dimensões. Além disso, a capacidade de generalização de modelos LDA pode ser comprometida por problemas de colinearidade^[114]. Dessa forma, o uso da LDA para classificação, sobretudo com dados espectrométricos, necessita de procedimentos de redução de dimensionalidade e/ou seleção de variáveis.

Nesse contexto, aplicações envolvendo técnicas de redução de dimensionalidade têm crescido consideravelmente nos últimos anos^[121-125]. Essas técnicas têm como objetivo principal capturar a grande parte da informação útil em um número menor de variáveis. A PCA é uma das técnicas mais conhecidas e empregadas para esse propósito. Contudo, alguns autores vêm utilizando os valores de escores obtidos por um número restrito de PCs para serem aplicados junto aos modelos LDA^[123, 126, 127].

Estas transformações utilizadas pela PCA são eficientes em diversos problemas de classificação devido à sua capacidade em explicar a grande parte da informação dos dados em um número reduzido de variáveis. Apesar disso, a interpretação de tais modelos torna-se difícil porque nem sempre as novas variáveis possuem um significado físico e/ou físico-químico. Além disso, outro problema envolvendo este tipo de método é que, após a transformação, não é possível excluir regiões do sinal com baixa relação sinal/ruído, pois todas as variáveis originais contribuem para cada variável latente.

1.2.1. Algoritmo SPA-LDA

A informação da modelagem apresentada nos métodos de reconhecimento de padrão supervisionados está contida nos dados provenientes da resposta instrumental (matriz X) e no índice de classes para cada amostra. Nesse caso, o RMSEV (*Root Mean Square Error of Validation* - equação 1.1) originalmente empregado no SPA não é uma métrica aplicável. Por esse motivo, uma nova função de custo foi concebida para guiar a seleção de variáveis.

$$\frac{\sum_{k=1}^{K_v} (y_{\bar{v}}^k - \hat{y}_{\bar{v}}^k)^2}{K_v} \quad (1.1)$$

Em que $y_{\bar{v}}^k$ e $\hat{y}_{\bar{v}}^k$ são os valores de referência e o valor previsto para o parâmetro de interesse na k -ésima amostra de validação respectivamente. K_v é número de amostras do conjunto de validação.

A função de custo proposta refere-se ao risco médio G de uma classificação incorreta pela LDA. Assim como o RMSEV, esta função é calculada com base em um conjunto de validação, conforme descrito na equação 1.2:

$$G = \frac{1}{K_V} \sum_{k=1}^{K_V} g_k \quad (1.2)$$

Em que g_k (risco de uma classificação incorreta do objeto x_k da k -ésima amostra de validação) é definido como:

$$g_k = \frac{r^2(x_k, \mu_{lk})}{\min_{l_j \neq lk} r^2(x_k, \mu_{lj})} \quad (1.3)$$

Na equação 1.3, o numerador $r^2(x_k, \mu_{lk})$ é o quadrado da distância de Mahalanobis entre o objeto x_k (com índice de classe lk) e a média de sua classe (μ_{lk}). O denominador da equação 1.3 corresponde ao quadrado da distância de Mahalanobis entre o objeto x_k e o centro da classe errada mais próxima. Idealmente, g_k deverá ser tão pequeno quanto possível, ou seja, o objeto x_k deverá estar perto do centro da sua verdadeira classe e distante dos centros das demais classes.

Para iniciar o procedimento de seleção de variáveis no SPA-LDA, deve-se fornecer como entrada:

I) Matrizes correspondentes às respostas instrumentais:

- Conjunto de treinamento: Train ($K_c \times J$);
- Conjunto de validação: Val ($K_v \times J$);
- Conjunto externo para Teste: Test ($K_t \times J$);

Em que K_c , K_v e K_t representam o número de amostras para os conjuntos de treinamento ou calibração, validação e teste ou previsão, respectivamente. Esses conjuntos deverão ter o mesmo número de variáveis J .

II) Índices das classes:

- Conjunto de calibração: Group_Train ($K_c \times 1$);
- Conjunto de validação: Group_Val($K_v \times 1$);
- Conjunto externo para previsão: Group_Test($K_t \times 1$);

III) Número mínimo e máximo de variáveis a serem selecionadas:

- Número mínimo de variáveis: $N1$;
- Número máximo de variáveis: $N2$;

Vale ressaltar que a construção de subconjuntos de variáveis com base no critério de minimização de colinearidade realizada pelo SPA-LDA resulta de uma sequência de operações de projeções de vetores aplicadas às colunas da matriz de calibração (K_c , J). Contudo, antes mesmo de realizar esse procedimento, os objetos pertencentes a este conjunto são centralizados na média da sua própria classe. Então, torna-se necessário o uso dos índices de classes.

Considera-se que as respostas instrumentais (x) referentes ao conjunto de calibração estejam em uma matriz \mathbf{X} de dimensões ($K_c \times J$), de forma que a j -

ésima variável x_j esteja associada ao j -ésimo vetor coluna. Sejam $M = \min(K_c - C, J)$ o número máximo de variáveis que podem ser incluídas no modelo LDA e C é o número de classes envolvidas no problema.

Partindo de cada variável x_j , $j = 1, \dots, J$, uma cadeia contendo M variáveis é construída de acordo com as seguintes operações^[128]:

a) 1º passo: Início

(vetor que define as operações de projeção inicial)

b) 2º passo: Cálculo da matriz P^i de projeção no subespaço ortogonal a z^i (equação 1.4):

$$\text{-----} \quad (1.4)$$

Em que I é uma matriz identidade de dimensões apropriadas.

c) 3º passo: Cálculo dos vetores projetados x_k^{i+1} a partir da equação 1.5:

$$(1.5)$$

para $k = 1, \dots, J$.

- d) 4º passo: Determinar o índice k^* do vetor de maior projeção e armazená-lo na matriz L (equação 1.6 e 1.7).

$$(1.6)$$

$$(1.7)$$

- e) 5º passo: Fazer $z^{i+1} = x_{k^*}^{k+1}$ (Vetor que define as operações de projeção para a próxima iteração).

- f) 6º passo: Fazer $i = i + 1$. Se $i < M$, retornar ao 2º passo.

O vetor selecionado para cada repetição do procedimento apresentado acima será aquele minimamente colinear em relação aos vetores selecionados nas iterações anteriores.

Facilitando o entendimento das projeções, um exemplo simples (figura 3)^[128] com $K_c = 3$ e $J = 5$ é apresentado para ilustrar os primeiros cinco passos do SPA.

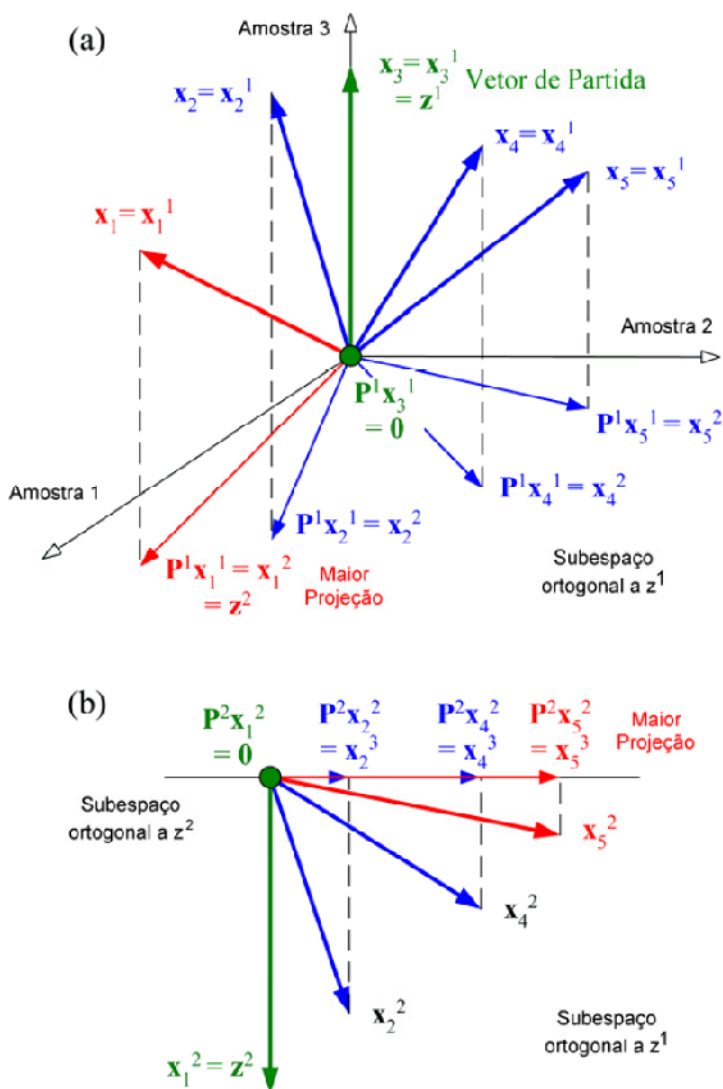


Figura 3. Ilustração da sequência de projeções realizadas pelo SPA. (a) Primeira iteração e (b) segunda iteração.

Nesse exemplo, a cadeia de variáveis que inicia em x_3 deverá ser $[x_3, x_1, x_5]$.^[128]

O algoritmo SPA-LDA foi adaptado utilizando a função qr ^[129] disponível no *software* Matlab®. Com ela, torna-se possível gerar as cadeias de variáveis com maior eficiência computacional. Por definição, a função qr adota a coluna com a maior norma como vetor de partida. Contudo, um procedimento foi realizado para forçar o algoritmo a iniciar pela i -ésima coluna da matriz de calibração centrada na média ou autoescalada.

Uma vez construídas as cadeias de variáveis candidatas, o SPA escolherá aquela que apresentar o menor risco médio de classificação incorreta pela LDA, como definido na equação 1.2.

O algoritmo SPA-LDA tem como saída:

- **I:** Um vetor contendo a melhor cadeia de variáveis;
- **R:** Risco médio G de uma classificação incorreta pela LDA em função do número de variáveis usadas;
- **Lopt:** Matriz contendo as cadeias de variáveis associadas a R .

Além disso, o SPA-LDA fornece como resultado o número de erros (tanto para o conjunto de validação, como para previsão), o valor ótimo de G e os índices das classes previstos pelo modelo LDA. Adicionalmente, o SPA-LDA apresenta um gráfico de *scores* que mostra a função de custo (Risco G , equação 1.2) *versus* o número de variáveis. O número ótimo de variáveis corresponde ao mínimo dessa curva.

O SPA-LDA^[130] foi implementado com a sub-rotina *multilda.m* para o cálculo da LDA.

1.2.2. Algoritmo SPA-MLR

Para a calibração multivariada, o SPA emprega conjuntos de calibração e validação, ambos com respostas instrumentais (\mathbf{X}) e valores medidos por um método de referência (y). A essência do SPA consiste em realizar operações de projeção na matriz de calibração $\mathbf{X}_{\text{cal}}(K_c \times J)$, cujas linhas e colunas correspondem a K_c amostras de calibração e J variáveis espectrais, respectivamente^[108].

A partir de cada uma das variáveis J disponível para o procedimento de seleção, o SPA constrói uma cadeia ordenada de K_c variáveis. Na construção dessa cadeia, cada elemento é selecionado de modo a exibir a mínima colinearidade como anterior. Dessa forma, a colinearidade entre variáveis é avaliada pela correlação entre os vetores coluna da respectiva matriz de calibração \mathbf{X}_{cal} . Vale observar que, de acordo com este critério de seleção, não mais que K_c variáveis podem ser incluídas na cadeia^[109,131].

Para cada uma das J cadeias de variáveis construídas como descrito anteriormente, é possível extrair K_c subconjuntos de variáveis usando de um até K_c elementos na ordem em que eles foram selecionados. Assim, um total de $J \times K_c$ subconjuntos de variáveis podem ser formados. Para escolher o subconjunto mais apropriado, constroem-se modelos *MLR*, ou seja, assume-se que as concentrações (matriz Y) são funções lineares das respostas instrumentais (matriz X), e podem ser escritas matricialmente como descrito na equação 1.8.

$$Y = Xb + e \quad (1.8)$$

Em que b é o vetor dos coeficientes lineares de regressão, e e é o vetor dos resíduos ou erro da modelagem.

O vetor b dos coeficientes lineares é estimado, na etapa de calibração, utilizando o critério dos “Mínimos Quadrados” que minimiza o vetor dos resíduos ($e = Y - Xb$) e é calculado pela equação 1.9.

$$b = (X^t \times X)^{-1} \times X^t \times Y \quad (1.9)$$

Em que a inversa de

O vetor concentração Y_{am} de uma amostra desconhecida é obtido pela equação 1.10.

$$(1.10)$$

Assim, são comparados em termos da raiz quadrada do erro médio quadrático para um conjunto de validação (RMSEV)^[108], calculado conforme a equação 1.1. Por fim, o algoritmo seleciona a cadeia de variáveis cuja MLR levou ao mais baixo RMSEV para um bom modelo.

1.3. A matriz biodiesel

O uso de biodiesel como combustível alternativo ao diesel fóssil tem aumentando nos últimos anos devido às questões de preservação ambiental e conservação de energia, assim como à busca de desenvolvimento sustentável. Por ser originário de fonte renovável e possuir baixo conteúdo de enxofre, o seu uso implica na diminuição dos níveis de emissão dos principais gases relacionados com o “efeito estufa”^[132]. Além disso, ele pode ser usado puro ou em mistura nos motores a diesel e nos sistemas de transporte e armazenamento sem que sejam necessárias alterações significativas^[133,134]. Entretanto, o seu alto custo, sua baixa estabilidade oxidativa, o aumento em 10% da emissão dos NO_x, assim como, a geração de

subprodutos tais como a glicerina, são aspectos que ainda devem ser avaliados^[134-137].

O biodiesel é constituído majoritariamente por ésteres alquílicos de ácidos graxos, que são obtidos através da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais (novos ou reciclados). Na figura 4, é apresentado um esquema reacional para reação de transesterificação.

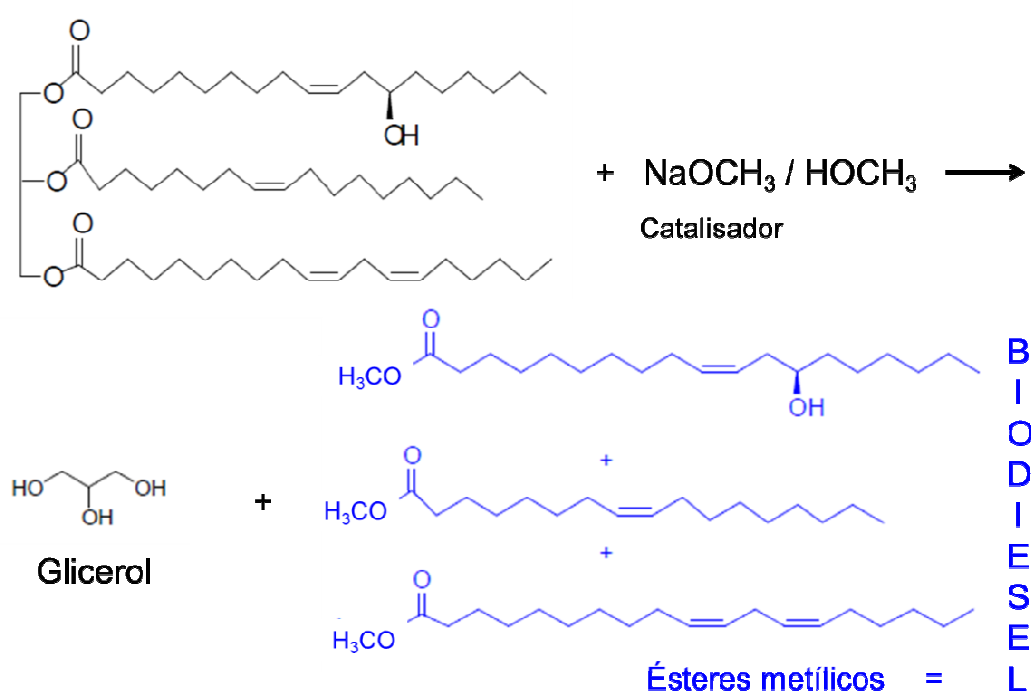


Figura 4. Esquema reacional da transesterificação do triglicerídeo da mamona (*Ricinus communis* L.).

A reação de transesterificação consiste na reação dos triglicerídeos, presentes em óleos e gorduras, com um álcool (metanol, etanol, etc.) na presença de um catalisador ácido ou básico. Frequentemente, a transesterificação é realizada com metanol sob catálise homogênea básica (NaOH , KOH , NaOCH_3 , KOCH_3)^[138-140]. O glicerol (ou glicerina) é o principal subproduto dessa reação, mas também mono-, di-, triglicerídeos, ácidos graxos livres, água, álcool, catalisador residual e outras

impurezas podem estar presentes no produto final^[139]. Assim sendo, a qualidade do biodiesel está diretamente relacionada com o teor dessas impurezas no produto, que hoje são estabelecidas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP, por meio de Resoluções e seus respectivos Regulamentos Técnicos.

Na Europa, as especificações foram estabelecidas na norma EN 14214 e nos EUA pela ASTM D 6751^[141,142]. No Brasil, as especificações do biodiesel (B100) estão definidas no Regulamento Técnico no. 01/08 da Resolução nº 07/2008 da ANP.

Na literatura é usual encontrar a designação BX, aonde B100 é usada para o biodiesel puro, e para misturas utiliza-se a denominação BX, que indica a porcentagem X, em volume, de biodiesel na mistura com óleo diesel. Exemplificando, o emprego de B2 significa 2% (v/v) de biodiesel e 98% (v/v) de óleo diesel no produto; B5, 5% (v/v) de biodiesel e 95% (v/v) de óleo diesel^[132,139]. No Brasil, segundo a legislação em vigor (Resolução ANP nº 07/2008 e CNPE nº 06/2009), a utilização de B5 passou a ser obrigatória desde 2010.

Nas normas de padronização também estão estabelecidos os métodos de ensaio para a determinação dos parâmetros de qualidade. No Brasil, as análises são realizadas de acordo com as normas estabelecidas pela ASTM (*American Society for Testing and Materials*) e pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). A determinação do emprego de normas assegura a padronização dos métodos empregados de modo a garantir uma menor dispersão de resultados em função das possíveis diversidades de sistemáticas e métodos de ensaios.

A qualidade do biodiesel, que é inferida a partir de sua composição química e de alguns parâmetros físico-químicos, pode ser influenciada por fatores

tais como composição da matéria-prima, processo produtivo, transporte e armazenamento. Os ésteres graxos, glicerol, mono-, di-, triglicerídeos, álcool e catalisador residual podem constituir o biodiesel e, portanto, devem ser limitados de forma a assegurar a qualidade do combustível. Como essas impurezas advêm da reação de transesterificação, o monitoramento desta etapa do processo produtivo é também essencial. Além disso, a determinação do conteúdo de biodiesel em suas misturas com diesel é também um aspecto relevante já que a comercialização dessas misturas tem aumentado significativamente nos últimos anos. Nas Resoluções da ANP e seus Regulamentos técnicos estabelecem os métodos para a determinação dos parâmetros de qualidade do biodiesel, entretanto, vários métodos alternativos são relatados na literatura^[142-179].

Vários tipos de métodos cromatográficos foram propostos para o acompanhamento da reação de transesterificação. A cromatografia em camada delgada (CCD) analítica foi um dos primeiros métodos empregados para essa análise^[143,144]. Ela é uma técnica rápida e eficiente que permite a análise dos ésteres graxos, tri-, di- e monoglicerídeos. Entretanto, ela é uma técnica essencialmente qualitativa, não sendo adequada para a quantificação dos componentes.

A técnica mais utilizada para o monitoramento da transesterificação é, sem dúvida, a cromatografia gasosa (CG) com detecção por FID (*Flame Ionization Detection*). Nos métodos desenvolvidos^[145-147], empregam-se colunas capilares de sílica e a amostra deve ser derivatizada para que os acil-derivados do glicerol possam ser identificados. A derivatização costuma envolver uma reação de sililação com um reagente como o *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoracetamida (BSTFA). A técnica de CG é bastante eficiente para a quantificação tanto dos ésteres graxos quanto dos mono-, di- e triglicerídeos.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) também pode ser utilizada na identificação dos mesmos compostos na mistura reacional. Diferentes métodos de separação (fase reversa, exclusão, etc.) assim como distintos modos de detecção (UV, ELSD - *Evaporative Light Scattering Detection*, EM – Espectrometria de Massas) foram usados^[148,149]. A principal vantagem da HPLC em relação CG é que não há necessidade de derivatização da amostra para a sua análise.

Além dos métodos cromatográficos, o uso de métodos espectroscópicos também foi proposto a fim de acompanhar a reação de transesterificação. A RMN é uma técnica mais rápida e simples que as técnicas cromatográficas, assim como requer uma menor quantidade de amostra, que não precisa de pré-purificação e muito menos de derivatização. Tanto a RMN de ^1H quanto a de ^{13}C foram propostas para o acompanhamento da transesterificação com metanol ou etanol^[150-152]. A desvantagem do uso da RMN são os custos relativamente altos da instrumentação e da manutenção.

A espectroscopia na região do infravermelho (IV) também é amplamente usada para o monitoramento da reação. Para isso, emprega-se a região do infravermelho próximo (IVP)^[153,154], do infravermelho médio^[155,156], e a espectroscopia Raman^[157]. Além disso, sua correlação com outras técnicas permite a verificação da qualidade do biodiesel^[154] e, com a quantificação, por exemplo de metanol residual. Entretanto, a determinação dos compostos minoritários nos níveis estabelecidos nas normas de padronização não é possível por este tipo de espectroscopia^[154]. De fato, ela é uma técnica rápida e precisa para determinação da conversão de reação.

Altas concentrações de glicerol, mono-, di- e triglicerídeos podem danificar o motor ou mesmo liberar substâncias tóxicas quando da queima do

combustível. Eles podem contaminar o biodiesel devido à transesterificação incompleta ou falhas no método da sua purificação. Segundo Knothe^[154], e Mittelbach^[142], a quantidade desses contaminantes é o fator principal para a determinação da qualidade do biodiesel.

O conteúdo de água no biodiesel também é um aspecto importante desde que ela pode promover o crescimento microbiano, causar corrosão em tanques e motores, formar emulsão ou causar hidrólise no biodiesel. Os métodos baseados em normas de padronização estabelecem o uso de centrifugação e da titulação de Karl-Fischer para sua determinação.

A quantidade de álcool residual no biodiesel também é limitada e está intimamente relacionada com o ponto de fulgor. Pequena quantidade de álcool no biodiesel diminui seu ponto de fulgor, além de poder ocasionar corrosão metálica dos componentes de motores e tanques de estocagem e transporte. Já a acidez do biodiesel está relacionada principalmente ao seu conteúdo de ácidos graxos livres, proveniente da hidrólise do ester e do glicerol.

O monitoramento da quantidade de metais, tais como Na, K, Ca e Mg no biodiesel é necessário devido a questões ambientais e de prejuízos causados ao motor. As normas determinam o emprego da espectrometria de absorção atômica e de emissão óptica com plasma induzido para a sua determinação em biodiesel.

Assim como para o monitoramento da transesterificação, a determinação dos ésteres graxos e dos acil-derivados do glicerol presentes no biodiesel é realizada principalmente por CG. De fato, as técnicas estabelecidas nas regulamentações brasileiras e internacionais estão baseadas no uso de CG-FID para a quantificação de ésteres graxos e do conteúdo de glicerina “livre” e total. Segundo Mittelbach^[142], somente esta técnica possui todos os requisitos para a

determinação do baixo conteúdo destes compostos em biodiesel. Além disso, vários trabalhos na literatura^[158-164], descrevem o uso de CG, com diversos modos de detecção, para o mesmo fim. Nessas análises, emprega-se geralmente coluna capilar e a amostra deve ser previamente derivatizada, assim como padrões têm que ser usados para a quantificação^[165].

O uso de HPLC para a quantificação de ésteres graxos, glicerol e seus derivados em biodiesel também foi proposta em diversos trabalhos. Vários métodos de detecção (ELSD, EM, etc.) foram empregados com sucesso^[166-172].

Um método baseado em eletroforese capilar (EC) com DAD também foi desenvolvido para quantificação de glicerol em biodiesel^[173]. Esse tipo de técnica cromatográfica é bastante rápida, simples e confiável.

Além dos métodos cromatográficos e espectroscópicos, técnicas baseadas em propriedades físico-químicas também foram desenvolvidas para a determinação do conteúdo de ésteres em biodiesel. O trabalho de Filippis et. al^[174] (1995), descreve o uso de medidas de viscosidade para avaliação do conteúdo de ésteres metílicos em biodiesel. Essas medidas são úteis já que há uma relação inversa entre a concentração dos ésteres e a viscosidade do meio. Segundo os autores, o método é rápido, simples e especialmente útil para o controle do processo produtivo.

Para a determinação de glicerol “livre” e total em biodiesel são descritos ainda o uso de titulação com periodato, e um método enzimático^[175]. O primeiro apresentou alta precisão e exatidão e o segundo foi muito complexo e com baixa reprodutibilidade. Recentemente, a *Sigma-Aldrich Fine Chemicals* desenvolveu um *kit* (BQP-02) para determinação de glicerol total e “livre” em biodiesel, que está baseado em uma reação enzimática e em medidas espectrométricas.

A determinação do conteúdo de biodiesel em misturas com óleo diesel é geralmente realizada pelo uso de métodos espectroscópicos, já que técnicas cromatográficas não são adequadas devido a complexidade da composição química do óleo diesel^[175]. A ANP e as normas internacionais estabelecem o uso da espectrofotometria no infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IV) para essa quantificação^[176-180].

Para o monitoramento da reação de transesterificação, utiliza-se com frequência CG-FID, mas os métodos espectroscópicos, tais como RMN e IV são também muito úteis. Por outro lado, a determinação do conteúdo de biodiesel nas misturas biodiesel/diesel é realizada principalmente por métodos espectroscópicos (RMN e IV) devido a grande variabilidade de compostos químicos presentes no diesel, que tornam os cromatogramas bastante complexos.

No contexto brasileiro, a experiência na produção de biodiesel ainda está em desenvolvimento. Desta forma, a pesquisa de novas técnicas analíticas que sejam mais adequadas à nossa realidade é um campo bastante promissor. Além disso, a busca por técnicas analíticas mais simples e de menor custo continua sendo de essencial importância para a área.

Este trabalho relata o emprego da técnica RMN de ^1H para a quantificação dos teores de biodiesel em amostras padrões e comerciais de óleo diesel, levando-se em consideração aspectos metrológicos, fato esse nunca antes abordado para essa técnica. Este estudo levou à separação de dois conjuntos de amostras os quais, por quimiometria de classificação utilizando-se o algoritmo *Successive projection algorithm – Linear discriminant analysis* (SPA-LDA), obteve-se a separação das amostras de óleo diesel contendo teor de enxofre em 1800 e 500 ppm. A seletividade foi calculada pela quimiometria de quantificação, através do

algoritmo SPA - *Multiple linear regression* (SPA-MLR), do teor de enxofre, da massa específica à 20 °C, da temperatura de destilação a 50% e a 80% do produto de óleo diesel BX, do índice de cetano e do ponto de fulgor comparados aos resultados obtidos pelo Laboratório de Combustíveis (LABCom) do CCDM/DEMa da Universidade Federal de São Carlos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C como métodos analíticos para as medidas quantitativas e o controle de qualidade a partir de amostras padrões e comerciais de óleo diesel.

Objetivos específicos

- Validar o emprego da técnica de RMN de ^1H de acordo com a norma ISO/IEC 17025 para a análise quantitativa do teor de biodiesel em óleo diesel;
- Aplicar o algoritmo SPA-LDA aos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para classificar o BX com relação a sua quantidade de enxofre;
- Avaliar a seletividade das técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C para quantificar o diesel/biodiesel aplicando o algoritmo SPA-MLR.

MATERIAIS E MÉTODO

3. MATERIAIS E MÉTODO

As principais fontes de incerteza da técnica RMN de ^1H são aquela que vão desde o preparo da amostra até a atuação do analista homogeneizando o campo magnético para obter um bom espectro de RMN. Portanto, foram considerados a balança analítica, a pipeta volumétrica, a temperatura da BVT, a repetitividade e reprodutibilidade (figura 5).

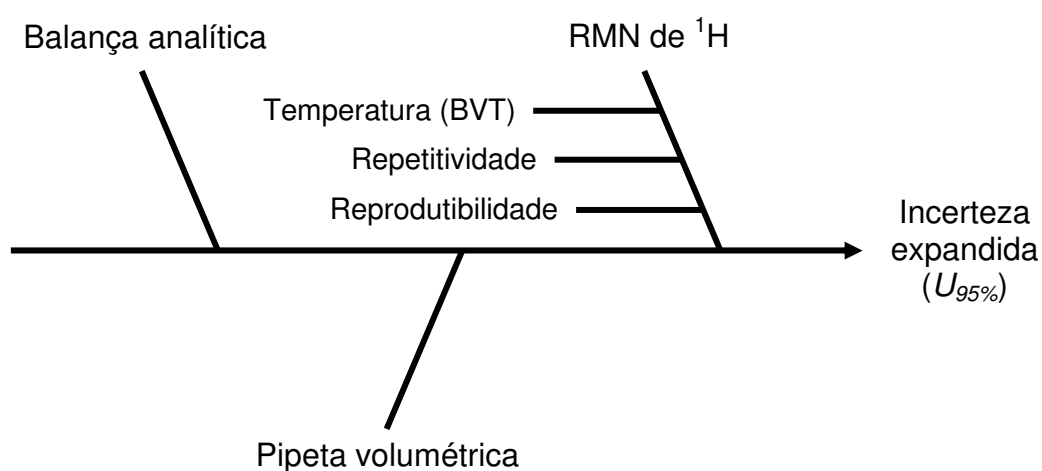


Figura 5. Diagrama de Ishikawa mostrando a relação causa/efeito para uma incerteza expandida ($U_{95\%}$) do método para medidas de RMN de ^1H .

3.1. Preparação de amostras

As 75 amostras de óleo diesel BX empregadas neste estudo, 61 foram coletadas em diversos postos revendedores de diferentes bandeiras, do interior e da capital do Estado de São Paulo. As amostras foram coletadas em frascos PET, âmbar, de 1 litro e conduzidas ao laboratório para análise.

Todas as amostras foram analisadas e neste estudo só utilizou-se as que apresentavam-se em conformidade com os limites estabelecidos pela Resolução

ANP no. 42/2009 para óleo diesel. As análises foram realizadas no Laboratório de Combustíveis e Biocombustíveis do CCDM/DEMa/UFSCar, que tem sua competência técnica reconhecida na realização de ensaios em combustíveis automotivos. Este laboratório tem certificação INBR ISO 9001:2008 e ensaios em gasolina, etanol e óleo diesel acreditados pelo INMETRO.

Das 75 amostras analisadas, 61 são oriundas de coletas em postos revendedores de combustíveis, sendo 31 amostras com teor de enxofre em 1800 ppm e 30 com 500 ppm, 2 amostras foram preparadas a partir de misturas das amostras com teores de enxofre em 1800 e 500 ppm, e 12 amostras de preparadas em laboratório a partir de óleo diesel sem biodiesel e biodiesel (B100). A tabela 1 apresenta a classificação do conjunto de amostras avaliadas.

Tabela 1. Classificação das 75 amostras de óleo diesel comercial, suas misturas e padrões preparados em laboratório.

Teor de enxofre	Comerciais		Laboratório (Padrão)	
	S1800	BX [*]	31	B0
Mistura BX 1 ^{**}		1	B4	1
			B5	1
	B6		1	
S500	BX [*]	30	B10	1
			B20	1
			B0	1
	Mistura BX 2 ^{**}	1	B4	1
			B5	1
			B6	1
			B10	1
			B20	1
			B0	1

* BX = 4,5 a 5,5 % (v/v); ** Obtida a partir da mistura de todas as amostras comerciais.

As misturas de 1 e 2 foram obtidas a partir de 100 μL de cada amostra comercial, sendo 31 amostras de BX S1800 e 30 amostras de BX S500.

As amostras padrão foram utilizadas de modo a determinar a curva de linearidade do conjunto. Para tal, estas foram preparadas no laboratório de maneira a alcançar a concentração desejada, exemplificando: para B5 (v/v) foi adicionado 50 μL de biodiesel em 950 μL de diesel, empregando pipetas de 10-100 e 100-1000 μL (Gilson®). Desta mistura, um volume de 470 μL foi retirado e colocado num tubo de RMN de 5 mm de diâmetro e inserido um capilar coaxial contendo 200 μL de clorofórmio deuterado com tetrametilsilano (TMS), conforme descrito na figura 6a. Espectros de RMN de ^1H da amostra contendo 0,1% de etilbenzeno em CDCl_3 (figura 6b) foram obtidos para calcular a exatidão e a precisão da RMNq, utilizando oito promediações (ns) e sem o uso de funções de apodização no tratamento dos espectros. A coleta da alíquota das amostras foi feita uma única vez e as aquisições dos espectros foram realizadas em triplicata com giro no tubo em torno do eixo central a uma frequência de 20 Hz.

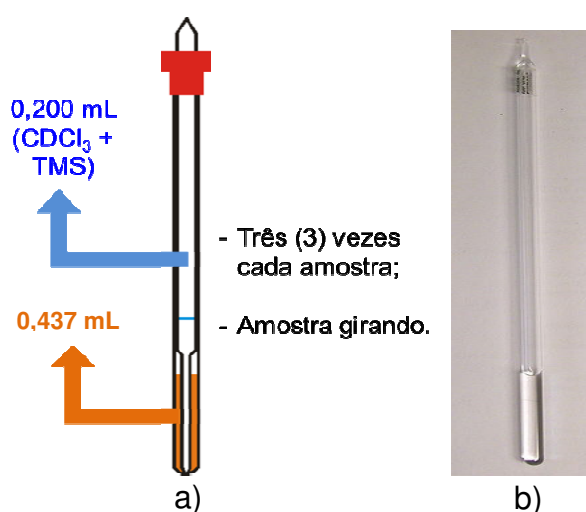


Figura 6. Desenho esquemático dos tubos de RMN de ^1H de 5 mm de diâmetro externo para as amostras de: (a) BX e b) o padrão certificado contendo 0,1% de etilbenzeno em CDCl_3 .

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos em um tubo de 10 mm de diâmetro contendo 2 mL das amostras, exemplificando: B5 (v/v) foi 100 μL de biodiesel e 1900 μL de diesel. Foi utilizado apenas uma pipeta de 100-1000 μL (Gilson®) para as tomadas de volume. Em seguida, foi adicionado um tubo lacrado de 5 mm de diâmetro externo, contendo 600 μL de água deuterada (D_2O) e traços de trimetilsililpropanóico (TMSP-d₄), conforme indicado na figura 7. A coleta da alíquota das amostras foi feita uma única vez e as aquisições dos espectros foram realizadas sem o giro no tubo.

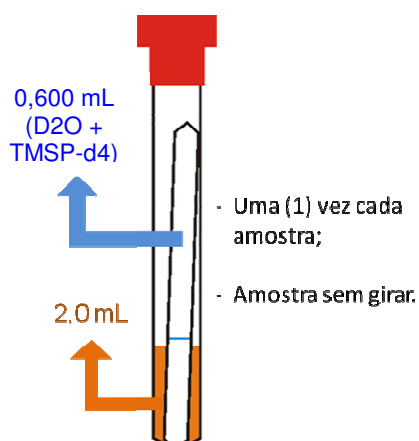


Figura 7. Desenho esquemático dos tubos de RMN de 10 mm utilizados nas medidas de ^{13}C para a amostra de BX.

3.2. Materiais e reagentes

Todos os reagentes, substâncias e padrões utilizados foram de grau analítico e são listados abaixo juntamente com os materiais:

- ✓ Tetrametilsilano (TMS), 99%;
- ✓ Ácido 3-(trimetilsilil)-2,2',3,3'-tetradeuteropropanóico (TMSP-d₄), 99%;
- ✓ Clorofórmio deuterado (CDCl_3), 99%;

- ✓ Água deuterada (D₂O) 99,9%;
- ✓ 0,1% de etilbenzeno em CDCl₃ (Bruker®);
- ✓ Pipetas automáticas de 10-100 e 100-1000 µL (Gilson®);
- ✓ Balança analítica de 4 casas decimais (Shimadzu®);
- ✓ Tubos de 5 e 10 mm de diâmetro externo;
- ✓ Tubos capilar de 3 mm coaxial de 5 mm;
- ✓ Vidrarias.

3.3. Instrumentação

Utilizou-se um equipamento da marca Bruker, modelo DRX 400, de 9,4 Tesla, equipado com uma sonda de 5 mm de diâmetro interno, com detecção inversa (BBI), para a obtenção dos espectros de RMN de ¹H. Para a obtenção dos espectros de RMN de ¹³C utilizou-se um equipamento Bruker, modelo Avance III, de 9,4 Tesla equipado com uma sonda de 10 mm de diâmetro interno com detecção direta (BBO). Todos os dados foram processados usando o programa TOPSPIN[®] 2.1 (Bruker). Para os cálculos quimiométricos empregou-se o programa MatLab[®] e programa ACD[®] para fazer as simulações dos espectros de RMN de ¹H.

3.4. Parâmetros de aquisição

Na tabela 2 estão resumidos os principais parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C. No entanto, é importante salientar que antes de cada medida houve um tempo de espera de 5 minutos com a amostra dentro do magneto, para que se atingisse o equilíbrio térmico na temperatura de

303K. Além disso, antes de cada medida foram feitos os ajustes de *tunning/matching*.

Tabela 2. Principais parâmetros de aquisição utilizados para as medidas de RMN de ^1H e ^{13}C .

Parâmetros	^1H	^{13}C
Dummy scan (DS)	0	1
Tempo de espera de pré-scan (DE)	6,00 μs	6,50 μs
Número de promediação (scan)	128	4096 (4k)
Pulso	30°	Desacoplado 30°
Ganho do receptor(RG) escala	3,2	203
OFFSET	15,0 ppm	211,7 ppm
Largura espectral (SW)	20,0 ppm	219,3 ppm
Número de pontos utilizados no FID* (TD)	65.536 (64k)	32.768 (32k)
Tempo de aquisição (AQ)	4,09 s	0,74 s
Tempo de espera (D1)	2,00 s	0,20 s
Tempo de relaxação (T_1)	2,40 s	não obtido
Sequência de pulso (Bruker)	zg30	zgpg30

3.5. Parâmetros de processamento

Todos os espectros foram processados utilizando uma função exponencial para apodização, com um fator de multiplicação (*line broadening* – lb) de 0,3 e 5 Hz para os hidrogênios e carbonos, respectivamente. Para os espectros de hidrogênio, a correção de fase e a da linha base foi feita automaticamente e para os espectros de carbono manualmente. Esses tratamentos reduzem o ruído dos espectros e igualam a linha de base dos mesmos, deixando apenas a resposta química como a variação a ser estudada.

Finalmente, as amostras foram calibradas com relação ao eixo zero da abscissa por um algoritmo criado com a programação C++ (Anexo 1).

3.6. Validação do método RMNq

A validação do método utilizando a RMNq foi realizada depois que o método foi introduzido, desenvolvido e usado para analisar uma série de compostos orgânicos da matriz do biodiesel. Foram utilizadas para definir os parâmetros do método, uma amostra B5 e uma de 0,1% de etilbenzeno em CDCl_3 (padrão utilizado pela empresa Bruker para controle de qualidade da linha de base nos espectros de RMN de ^1H) para as medidas de exatidão e precisão do método na RMN de ^1H . Considerando os requisitos preconizados na norma ISO/IEC 17025, foi proposto o protocolo de validação mostrados na tabela 3.

Tabela 3. Componentes do método de validação de RMN de ^1H .

Validação de RMNq de ^1H	
➤ Robustez:	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Materiais e reagentes ✓ Parâmetros de aquisição ✓ Parâmetros de processamento ✓ Avaliação de espectro de RMN de ^1H
➤ Especificidade	
➤ Exatidão	
➤ Precisão	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Repetitividade ✓ Reprodutibilidade
➤ Linearidade	
➤ Incerteza de medição	✓ GUM
➤ Seletividade	✓ Quimiometria

3.6.1. Robustez

3.6.1.1. Avaliação do espectro de RMNq de ^1H

Protocolos de desenvolvimento de método ou a validação exigem que a sensibilidade a parâmetros específicos sejam investigados diretamente. Isso foi feito por meio de um “teste de rugosidade”, no qual o efeito das mudanças de um ou mais parâmetros fossem observados, como a mudança de matriz ou mudanças de configuração de equipamentos e que têm efeitos imprevisíveis sobre o resultado^[72]. Por tanto, estiveram envolvidos os materiais e reagentes, parâmetros de aquisição, parâmetros de processamento e a avaliação da qualidade do espectro obtido, principalmente no que se referia a largura de linha, conforme pode ser observado na figura 8 em que se observa a deconvolução Laurentziana-Gaussiana no sinal da metoxila ($\text{H}_3\text{CO}-$) de uma amostra de BX.

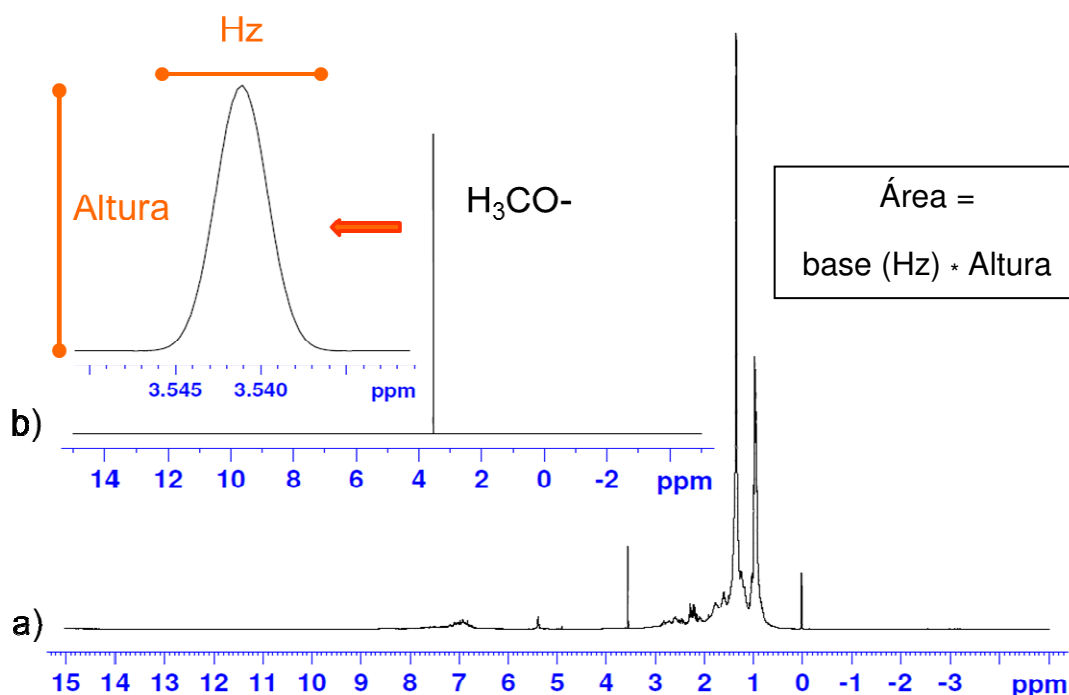


Figura 8. (a) Espectro de RMN de ^1H para a amostra de B5 com uma (b) ampliação do sinal da $\text{H}_3\text{CO}-$ deconvoluída.

3.6.1.2. Homogeneidade do campo magnético

A homogeneidade do campo magnético é imprescindível para o controle de qualidade dos espectros. Portanto, antes de iniciar as medidas, foi realizada uma aferição dessa homogeneidade pela medida da largura de linha na base do pico do TMS para o hidrogênio, sendo considerada como aceitável a faixa de 0,7 a 1,1 Hz, conforme pode ser visto na figura 9. Para os espectros de RMN de ^{13}C , aferiu-se essa homogeneidade com o uso do espectro de hidrogênio obtido anteriormente e observando o sinal do TMS- d_4 , sendo considerado a mesma faixa como aceitável.

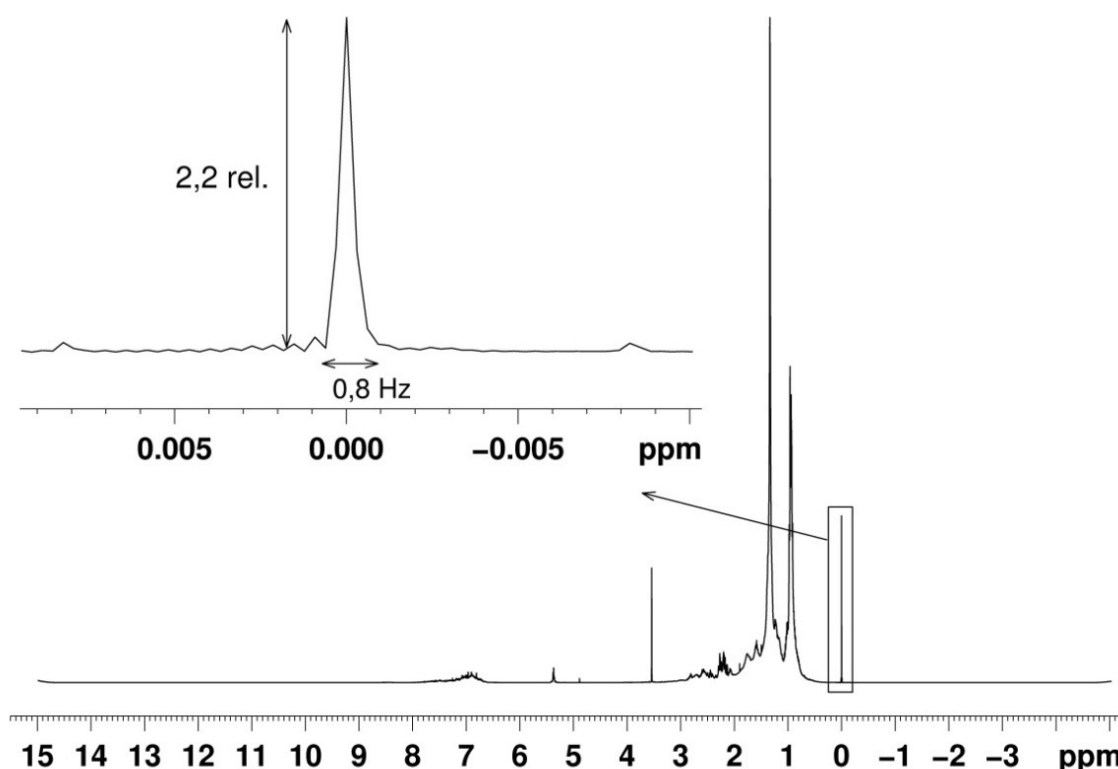


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H com a medida da largura de linha do sinal para o controle do *shimming* da amostra B5 padrão.

3.6.2. Seletividade e especificidade

Os ensaios de seletividade e especificidade foram feitos utilizando a região da metoxila nos espectros de RMN de ^1H , em que pode-se observar na figura 10 que esse pico não sofre interferência nem de contaminantes e nem de outros picos do analito.

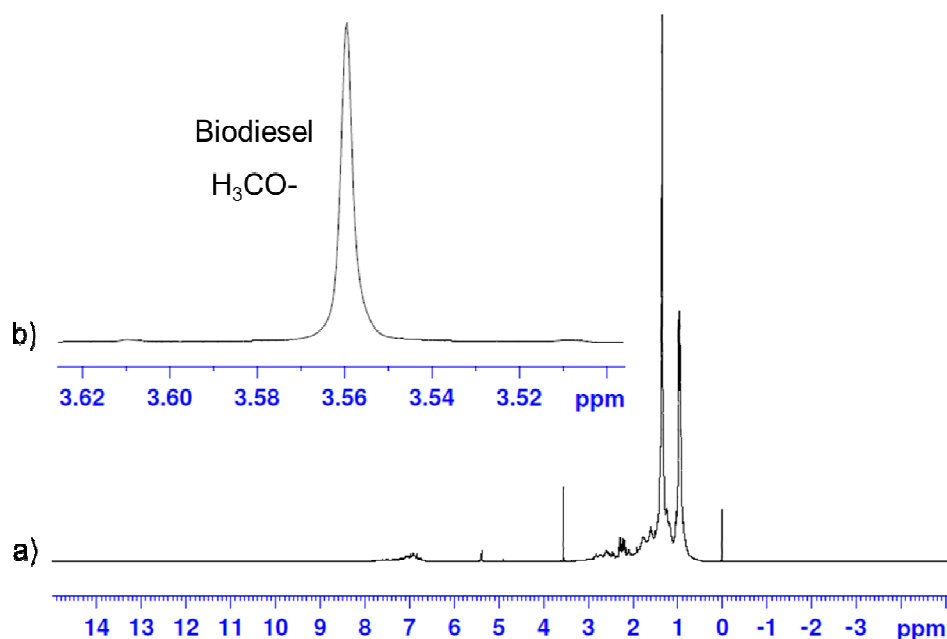


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H para a amostra de B5 (a) com uma ampliação do sinal específico da metoxila ($\text{H}_3\text{CO}-$) do biodiesel (b).

3.6.3. Exatidão

A exatidão foi medida pela RMN de ^1H em que foi utilizado uma amostra contendo 0,1% de etilbenzeno em CDCl_3 , em um tubo selado, de 5 mm de diâmetro externo, com oito promediações (ns) e sem o uso de funções de apodização. Pode-se verificar que o valor da integração para os grupos metila e metileno são respectivamente de 3:2 como o esperado. O espectro da figura 11 mostra esse resultado.

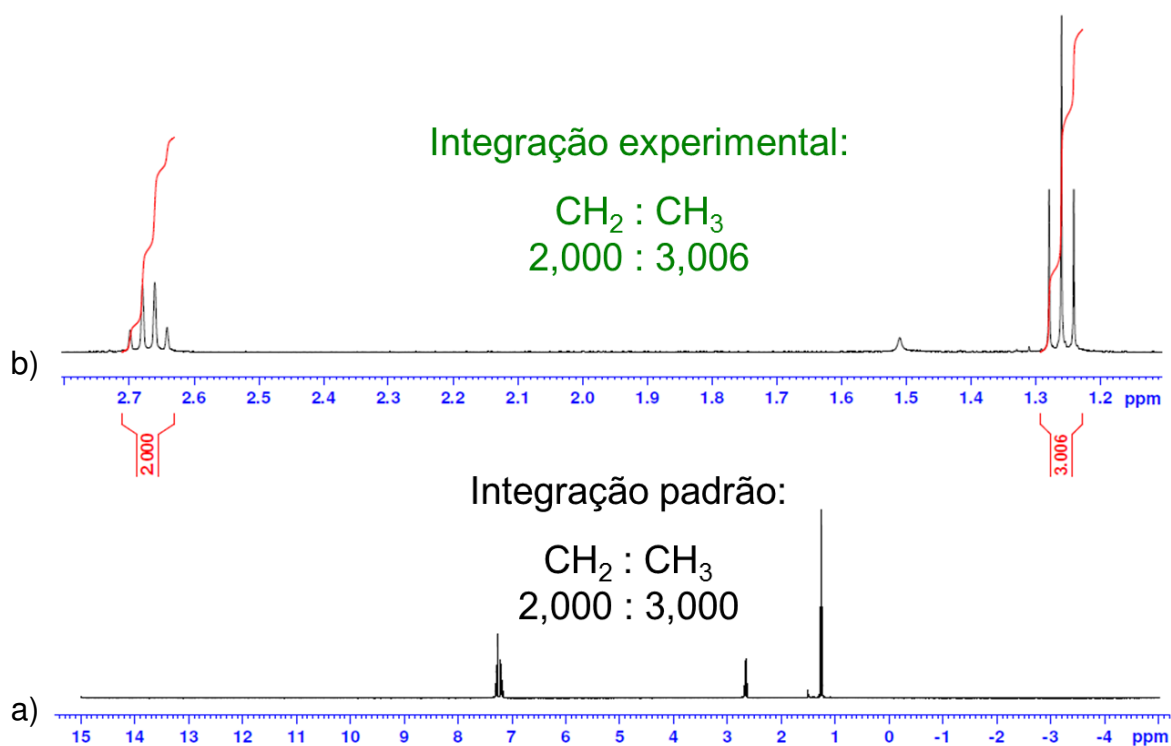


Figura 11. Espectro de RMN de ^1H do etilbenzeno 0,1% em CDCl_3 . a) espectro normal, b) expansão.

3.6.4. Precisão

A precisão de um método analítico é o grau de concordância entre resultados de testes independentes obtidos em condições estipuladas^[72]. Isso foi medido pela variância entre os resultados obtidos de análises múltiplas da amostra 0,1% de etilbenzeno em CDCl_3 . Normalmente, a precisão é determinada por circunstâncias específicas de variáveis, portanto, pode ser obtida por demonstração da repetitividade e da reprodutibilidade de um método^[31,72]. Um método é repetitivo para análises com os mesmos parâmetros e analista (medidas de RMNq em dias diferentes), e é reprodutivo quando se altera algum parâmetro e/ou analista (medidas de RMNq por analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes)^[181].

3.6.4.1. Repetitividade

Repetitividade é o grau de concordância entre os resultados das medições sucessivas de um mesmo mensurado realizada sob as mesmas condições de medição^[73]. De acordo com a EURACHEM^[72], as condições de repetitividade são resultados dos testes independentes que são obtidos: com o mesmo método, no mesmo laboratório, o mesmo analista, o mesmo equipamento e com curtos intervalos de tempo, e para a mesma amostra certificada.

Neste trabalho, a repetitividade dos espectros de RMN de ¹H foi adquirida com os parâmetros de aquisição descritos na tabela 3.1, usando o mesmo espectrômetro RMN, 9,4 T- 400 MHz para frequência do hidrogênio, pelo mesmo operador, no mesmo laboratório e no mesmo dia. A pureza foi calculada usando a equação 3.1.

$$\text{Área} = \text{base (Limites de deconvolução esquerda – direita Hz)} * \text{Altura} \quad (3.1)$$

3.6.4.2. Reprodutibilidade

Grau de concordância entre os resultados do mesmo mensurando foi realizado em condições alteradas de medição^[73] e de acordo com a EURACHEM^[72]. Foram obtidos os dados utilizando: o mesmo método, no mesmo laboratório, o mesmo equipamento, para a mesma amostra certificada, mas por diferentes operadores e diferentes intervalos de tempo (manhã e tarde). Assim, a precisão da RMNq foi estabelecida pela demonstração de repetitividade e reprodutibilidade do método.

3.6.5. Linearidade

Para o teste experimental de linearidade foi necessário determinar a faixa de concentração analítica para o método na RMNq. Estabelecida a linearidade, uma curva de calibração foi usada para determinar a faixa de trabalho do método analítico empregando as amostras padrão.

Os resíduos da linearidade, apresentados na figura 12, foram usados para estimar o erro aleatório na linha de regressão conforme equação 3.2, o qual pode ser usado para calcular o ponto de intercepção no eixo y (*interceptor*) descrito pela equação 3.3 e a inclinação (*slope*) da reta definida pela equação 3.4.

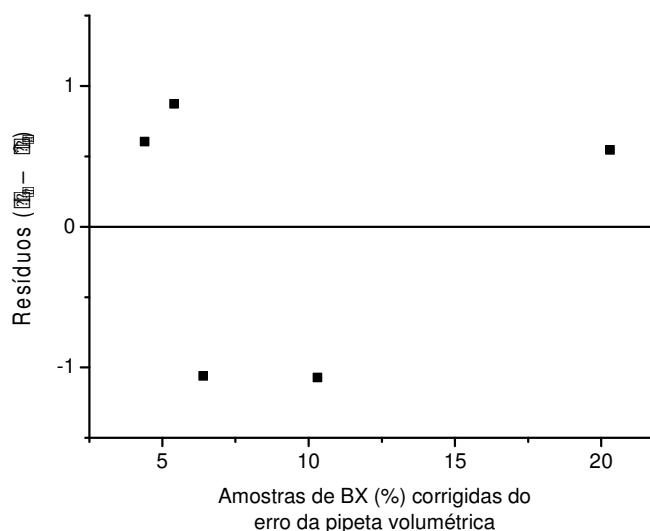


Figura 12. Resíduos aleatórios da regressão linear da resposta da sonda BBI 5 mm para RMN de ¹H.

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad \left| \quad \text{DP da regressão, } s_{y/x} = 0,27 \right. \quad (3.2)$$

$$s_a = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \left| \quad \text{DP da interseção, } s_a = 0,06 \quad (3.3)$$

$$s_b = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 2}} \quad \left| \quad \text{DP da inclinação, } s_b = 0,01 \quad (3.4)$$

3.6.6. Incerteza de medição em RMNq de ^1H

Utilizou-se para o estudo da incerteza de medição os dados rastreáveis da balança analítica de quatro casas decimais (Shimadzu®), a curva de calibração da pipeta volumétrica 100-1000 μL (Gilson®), a temperatura medida no equipamento de RMN utilizando uma unidade de controle de temperatura variável (*Bruker Variable Temperature* - BVT), a repetitividade e a reprodutibilidade. O diagrama de Ishikawa indica as principais causas e efeitos observados no método de RMN de ^1H (Figura 1 na página 18) empregado neste estudo.

3.7. Tratamento dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C para quimiometria

Antes da construção dos modelos, os dados das amostras padrão e comerciais foram divididos em três subconjuntos (calibração, validação e previsão) com o uso do algoritmo Kennard-Stone (KS)^[182]. Nesse algoritmo, as distâncias Euclidianas entre os vetores das respostas instrumentais (\mathbf{x}) das amostras selecionadas foram maximizadas.

Para uma melhor compreensão da forma como o algoritmo KS executa a busca por amostras mais representativas para o conjunto de calibração, uma

representação gráfica simplificada encontra-se na figura 13. Os detalhes de cada passo são apresentados em seguida.

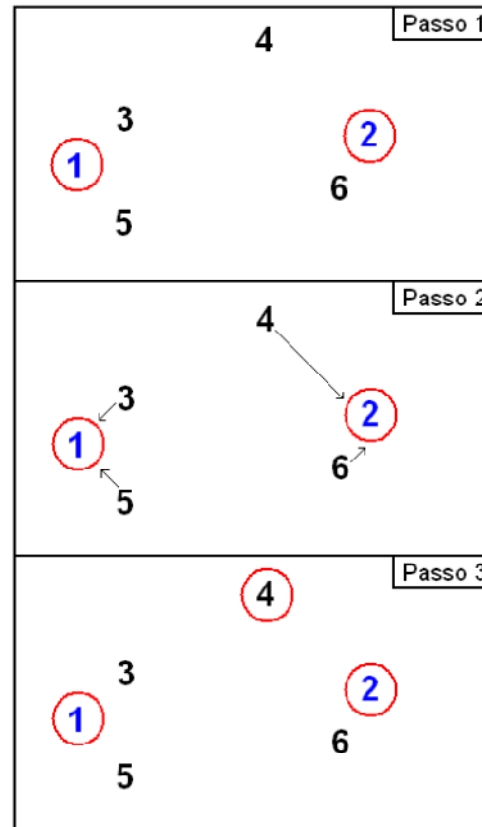


Figura 13. Representação do mecanismo de busca do algoritmo KS com três amostras circuladas.

- 1º Passo: Selecionam-se as duas amostras que apresentem a maior distância euclidiana entre si. Nesse caso, as amostras 1 e 2.
- 2º Passo: As menores distâncias entre as amostras remanescentes e as selecionadas são calculadas: D_{3-1} ; D_{5-1} ; D_{4-2} e D_{6-2} .
- 3º Passo: Seleciona-se aquela amostra cuja distância obtida no passo anterior for maior. Nesse caso a amostra 4 foi selecionada.

O procedimento descrito acima é repetido até que um número de amostras estipulado pelo analista seja alcançado.

O algoritmo foi aplicado separadamente para cada classe. As amostras do conjunto de treinamento foram inicialmente selecionados e os remanescentes foram divididos em validação e teste, de acordo com a ordenação do KS. As amostras de treinamento e validação foram utilizadas para o procedimento de modelagem, incluindo a seleção de variáveis para os modelos LDA. Já o conjunto externo de teste foi utilizado apenas para uma avaliação final dos modelos de classificação SPA-LDA.

As setenta e cinco (75) amostras de BX foram separadas nos conjuntos de calibração, validação e previsão (tabela 4) usando o algoritmo KS para que não houvesse erro no modelo de classificação.

Tabela 4. Separação dos conjuntos de classificação das amostras S500 e S1800 utilizando o KS.

	S1800	S500
Calibração	21	21
Validação	7	7
Previsão	10	9
Total	75	

Das 75 amostras 46 foram utilizadas em função destas terem sido avaliadas pelo Laboratório de Combustíveis do CCDM/DEMa/UFSCar em todos os ensaios utilizados na construção do modelo. Essas amostras foram separadas em conjunto de calibração e validação utilizando-se o algoritmo KS para seis (6) medidas diferentes: teor de enxofre, massa específica a 20 °C (ME), temperatura de destilação a 50% (T50) e 80% (T80), índice de cetano (IC) e o ponto de fulgor (PF),

conforme mostrado tabela 5. Foram utilizadas apenas as amostras do S1800 por termos informações quantitativas das amostras o que não foi possível para as S500.

Tabela 5. Classificação dos seis(6) conjuntos de quantificação das amostras de BX utilizado o algoritmo KS.

	Enxofre	ME	T50	T80	IC	PF
Calibração				36		
Validação				10		
Cal. + Val.				46		

Todos os modelos foram validados por série de teste, ou seja, foram separadas 10 amostras para validação dos modelos SPA-MLR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Metrologia em RMN de ^1H

4.1.1. Erro da pipeta volumétrica

Antes de utilizar uma pipeta é importante verificar se ela foi calibrada, se não há algum defeito aparente, quantas vezes foi revisada ou se é feito um acompanhamento do seu desempenho, pois para que se possa obter sempre os melhores resultados, em termos de exatidão e precisão, é necessário que as peças da pipeta estejam em boas condições de funcionamento.

Uma balança analítica (Shimadzu UX 620H) aferida foi utilizada para realização dos testes de verificação da performance da pipeta. Conforme observado na tabela 6, o erro variou de 3 a 10 %, sendo necessário avaliar e reduzir, onde for possível, os erros sistemáticos e aleatórios que possam influenciar o bom desempenho da análise.

Tabela 6. Erro da pipeta 100-1000 μL (Gilson®) calculado usando o biodiesel e uma balança analítica (Shimadzu) com calibração RBC.

Pipeta (μL)	Replicatas (mg)			Erro da pipeta em μL ($d = 0,8749 \text{ g/mL}$)	
	a	b	c	Médio	D. Padrão
100	89	83	84	97	4
250	204	203	201	232	1
470	384	387	376	437	6
500	401	400	391	454	6
750	623	624	612	708	7
1000	798	780	786	901	11

O erro da pipeta 100-1000 μL (Gilson®) foi calculado usando o biodiesel, cuja densidade (d) foi 0,8749 g/mL medida pelo LABCom, e uma balança analítica (Shimadzu®) calibrada e com certificados rastreáveis pela Rede Brasileira de Calibração (RBC). Na figura 14 são apresentados os dados obtidos.

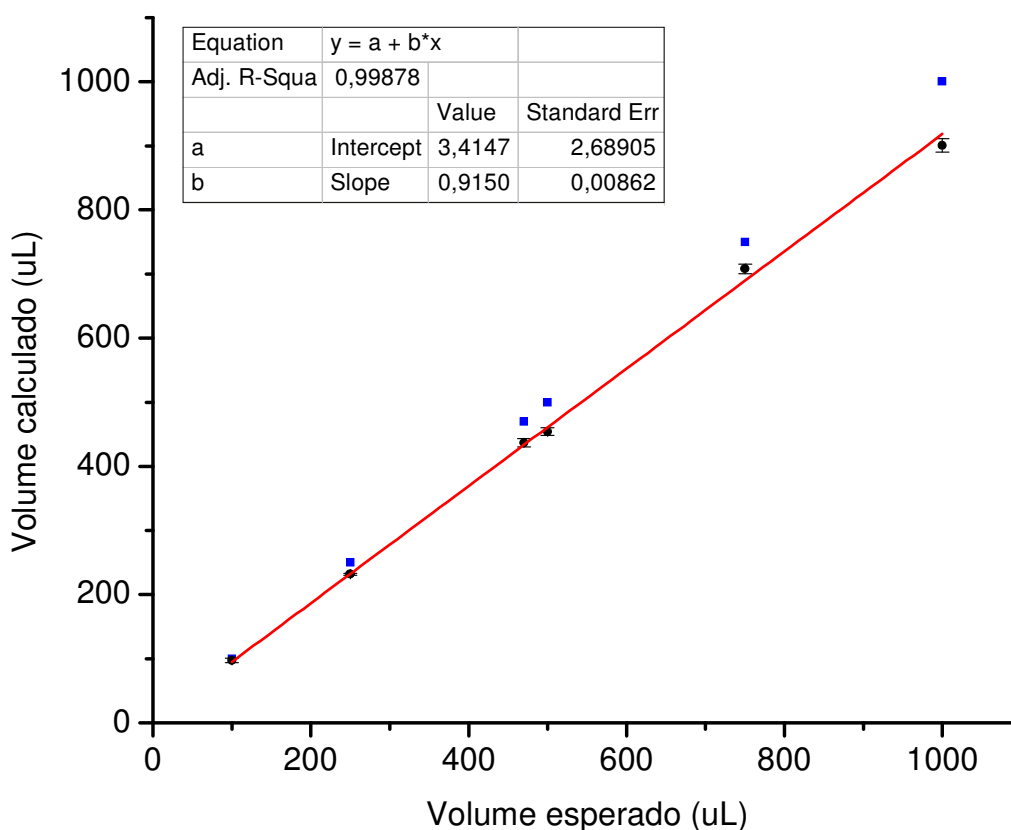


Figura 14. Gráfico do erro da pipeta 100-1000 μL (Gilson®) calculado usando o biodiesel e uma balança analítica (Shimadzu) acreditada pela NBR ISO/IEC 17025, à temperatura de 25°C.

No entanto, a calibração das pipetas, por si só, não garante a qualidade de seu uso. As pipetas têm que ser mantidas em bom funcionamento por meio de um programa de manutenção adequado, incluindo limpeza, lubrificação, substituição de vedantes e ajuste.

4.1.2. Parâmetros de aquisição

A sintonia da sonda (*tunning/matching*) foi realizada de forma manual antes de cada medida e os parâmetros de aquisição foram selecionados de modo que os menores sinais do espectro fossem observados. Para isso, os seguintes cuidados foram levados em consideração:

1-) Em todas as medidas foram usados promediações para atingir o equilíbrio dos sistemas de spins antes da aquisição. Essas promediações são chamadas de *dummy scans* (ds - Bruker) ou *state scans* (ss-Varian) e são utilizados antes e/ou durante as aquisições dos espectros de RMN. No nosso caso essas promediações foram executadas antes das aquisições propriamente ditas;

2-) O Tempo de espera (DE) antes das promediações e logo após o pulso é utilizado para que não tenha resquícios das irradiações do pulso. Nesse caso, esse valor foi fixado em 6 μ s para o hidrogênio e 6,5 μ s para o carbono 13;

3-) Número de promediação (*scan* – ns Bruker ou nt – *number of transientes* – Varian) foi escolhido em função da melhor relação sinal/ruído e do tempo de máquina a ser utilizado em cada medida. Para os espectros de RMN de ^1H o ns foi igual a 128 e o de ^{13}C igual a 4096;

4-) O pulso de RF em microssegundos (μ s) foi calibrado tanto para o hidrogênio como para o carbono 13 sendo utilizados pulsos de 30 $^\circ$ para ambos. A sequência de pulso utilizada para o hidrogênio foi a zg30 (linguagem Bruker) e zgpg30 (linguagem Bruker) para o carbono 13. Nesse caso, também utilizou-se o efeito nuclear Overhauser;

5-) Controle do ganho do receptor:

O ganho do receptor (RG) de um espectrômetro de RMN é muito próximo do controle do volume de um rádio. Quando é configurado para valores mais altos o FID terá um ganho maior e conseqüentemente uma intensidade maior. Como conseqüência, se esse valor não for ajustado, ter-se-á um *clipped FID*, que quando for feita a transformada de Fourier aparece um sinal de RMN distorcido. Na figura 15, pode-se observar esse comportamento para uma amostra de biodiesel. Vale salientar que uma outra maneira de diminuir o ganho do receptor é simplesmente diminuir o ângulo do pulso.

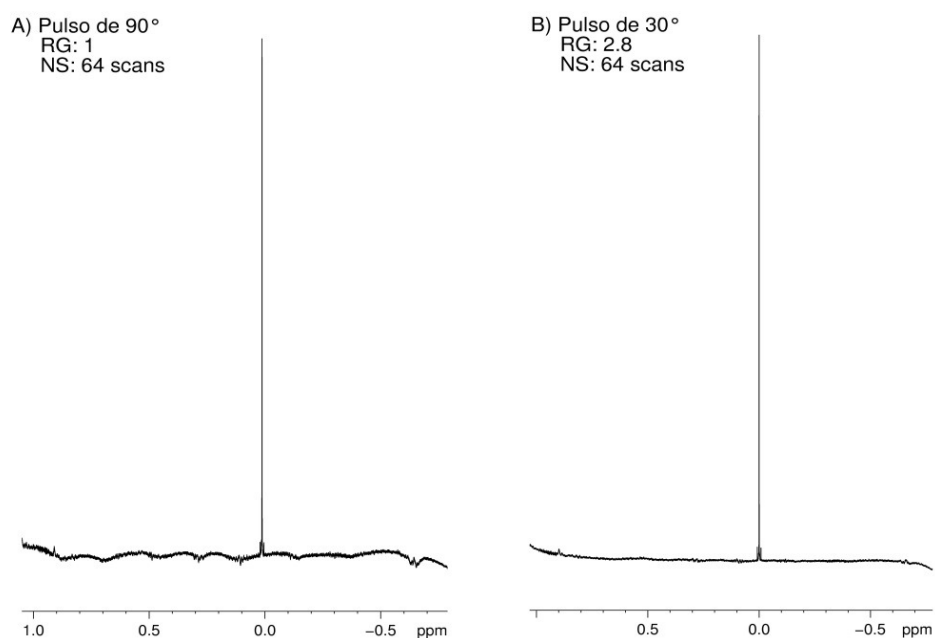


Figura 15. Espectros de RMN de ¹H na sonda de 5 mm com os pulsos de 90° (A) e 30° (B) graus.

6-) As janelas espectrais selecionadas para os núcleos de hidrogênios e carbono 13, foram de 20,0 e 219,3 ppm, assim como os valores dos limites superiores das janelas (*offset*) foram também fixados em 15,01 e 211,75 ppm, respectivamente;

7-) O número de pontos utilizados para a digitalização dos FIDs foi de 65.536 e 32.768 pontos para hidrogênio e carbono 13 respectivamente;

8-) O tempo de aquisição (AQ) foi fixado em função da janela espectral e do número de pontos, conforme pode-se observar pela relação descrita na equação 4.1^[183].

$$AQ = DW \times TD = \frac{TD}{2 SW} \quad (4.1)$$

Utilizando essa relação, obtêm-se uma resolução digital (DR) igual a 0,12 e 0,58 Hz/ponto para os espectros de RMN de ¹H e ¹³C respectivamente;

9-) O tempo de espera (D1) entre o final da aquisição e o início do pulso, também chamado de tempo de relaxação (*relaxation time*), foi otimizado em função do tempo de máquina total e do tempo de relaxação longitudinal T₁. Os valores utilizados foram de 2 e 0,2 s para os espectros de RMN de ¹H e ¹³C, respectivamente. É importante salientar que o tempo de relaxação, de fato, deve compreender também o tempo de aquisição, uma vez que ao término do pulso, o processo de relaxação já se inicia;

10-) O tempo de relaxação T₁ foi medido pela sequência de pulso inversão-recuperação (*inversion recovery*) cuja sequência de pulso está representada na figura 16 e calculado usando a equação 4.2. O valor de T₁ utilizado nas medidas de RMN de ¹H foi de 2,40 s para um ângulo de pulso de 90°. Para o núcleo de carbono 13 esse tempo não foi medido pois envolve um longo período de medida.

$$I(\tau) = I_{\infty} (1 - 2 \exp(-\tau/T_1)) \quad (4.2)$$

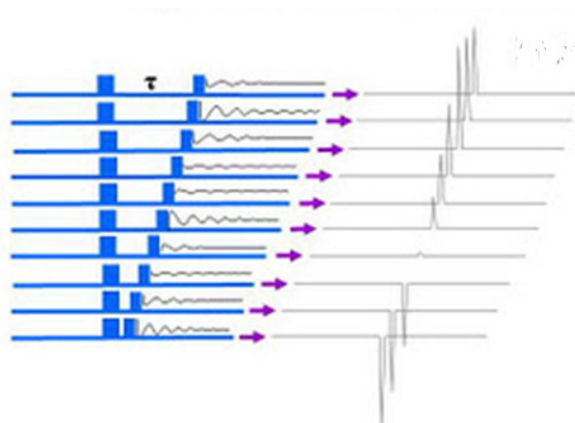


Figura 16. Representação esquemática da sequência de pulso inversão-recuperação para calcular T_1 .

11-) Controle de temperatura da amostra:

As medidas de RMNq respondem a uma ampla faixa de temperatura, e para controlar esse parâmetro procurou-se trabalhar com um valor fixo. Para obtenção de uma temperatura ótima foram feitos espectros com a *Bruker Variable Temperature* (BVT) em 297, 303 e 308 K por cerca de 7 meses, sendo que 303 K apresentou um menor desvio padrão, 1,60 área conforme pode ser observado na figura 17.

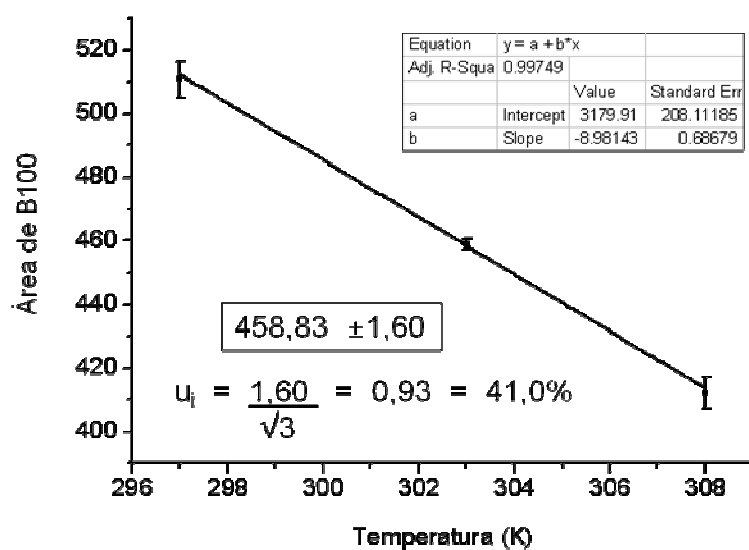


Figura 17. Gráfico com a avaliação da temperatura do BVT por 7 meses, realizadas em 2009 versus a área do pico da metoxila (H_3CO^-) para a amostra B100.

4.1.3. Precisão

4.1.3.1. Repetitividade

Os resultados da repetitividade obtidos para um dos analistas estão representados na figura 18 e na tabela 7. Utilizou-se uma amostra selada contendo 0,1% de etilbenzeno em CDCl_3 .

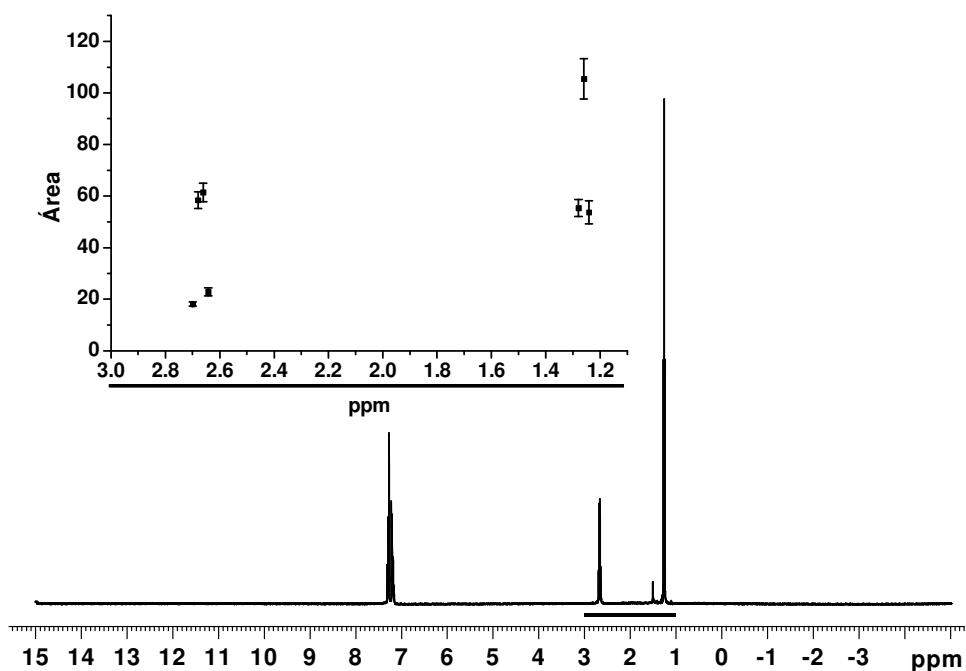


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H obtido pelo analista A para o estudo da repetitividade.

Tabela 7. Dados da repetitividade obtidos pelo analista A.

	ppm	Manhã		Tarde		Área média (Hz * Altura)	Desvio padrão
		Medida a	Medida b	Medida c	Medida d		
Quadruple- to	2,70	18,96	17,25	18,80	17,67	18,17	0,84
	2,68	58,42	54,58	62,54	58,12	58,41	3,26
	2,66	61,04	57,23	65,96	61,39	61,40	3,57
	2,64	22,29	21,28	25,04	22,90	22,88	1,59
Tripleto	1,28	55,14	51,59	59,60	55,10	55,36	3,28
	1,26	105,02	95,93	114,92	105,94	105,45	7,76
	1,24	53,31	48,10	59,15	54,30	53,71	4,53

A repetitividade tomada para as medidas de BX foi correspondente à área do pico em 2,70 ppm (18,17 Hz * altura) da frequência externa e superior do quadrupletto, e que, apresentou o menor desvio padrão (DP) e igual a 0,84 Hz * Altura. Essa escolha levou em consideração o fato do deslocamento químico da metileno do etilbenzeno (2,70 ppm) ser o pico que fica mais próximo da frequência básica do transmissor (o1) e que foi fixado em 5,00 ppm para as medidas do BX.

4.1.3.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é uma medida ainda maior da precisão do que a repetitividade e foi examinada levando em consideração apenas a troca de analista. O analista B fez um estudo de repetitividade igual ao do analista A cujos resultados estão resumidos na tabela 8.

Tabela 8. Dados em da repetitividade para o analista B.

	ppm	Manhã		Tarde		Área média (Hz*Altura)	Desvio padrão
		Medida a	Medida b	Medida c	Medida d		
Quadrupletto	2,70	18,04	17,40	21,19	19,68	19,08	1,71
	2,68	57,03	58,08	67,89	65,06	62,02	5,30
	2,66	59,54	61,57	71,18	69,78	65,52	5,82
	2,64	21,88	23,42	26,24	27,02	24,64	2,40
Tripleto	1,28	53,32	54,72	66,96	63,09	59,52	6,57
	1,26	101,94	105,14	128,25	122,86	114,55	12,96
	1,24	51,79	54,25	65,28	63,76	58,77	6,75

Os resultados obtidos pelo analista A foram melhores do que o do analista B. Os espectros foram adquiridos pelo analista A tomando-se com base a largura da

base e a altura do sinal enquanto que o analista B se preocupou somente com a largura da base do sinal.

Os resultados da repetibilidade dos analistas A e B em 2,70 ppm e reprodutibilidade do método são apresentados na Tabela 9. Um gráfico convencional para expressar esses resultados é o gráfico de caixas (*box plot*), apresentado na figura 19.

Tabela 9. Reprodutibilidade de RMN de ^1H dos analistas A e B.

Analistas	A	B
ppm	2,70	
Área média (Área)	18,17	19,08
Desvio padrão (Área)	0,84	1,71
Reprodutibilidade (Área)	18,62	
Desvio padrão (Área)	1,34	

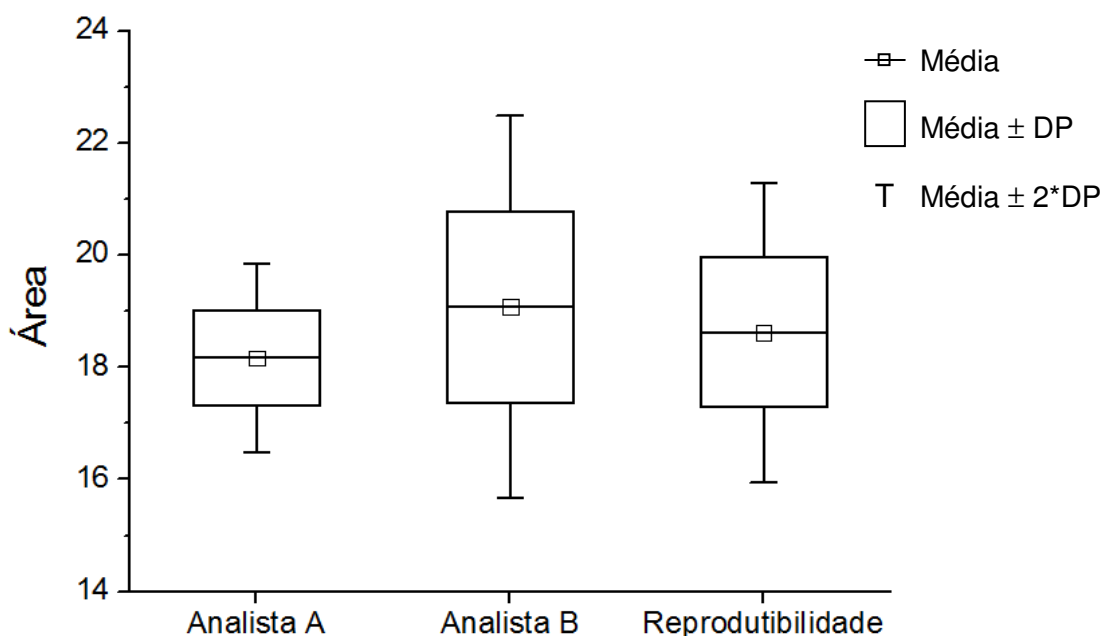


Figura 19. Gráfico de caixa da repetitvidade dos analistas A e B e de reprodutibilidade de uma porção do pico em $\delta_{\text{H}}2,70$ ppm para a amostra de 0,1% etilbenzeno em CDCl_3 em um equipamento de RMN de 9,4 Tesla.

A figura 19 indica que o analista B obteve resultados com a área maior do que o analista A, no entanto, o desvio padrão foi quase duas vezes maior. Isso demonstra que para uma análise quantitativa devem ser considerado um maior número de parâmetros para o *shimming*, tais como: largura da base e a altura do sinal do TMS considerados pelo analista A e que muito provavelmente não foi considerado pelo analista B, uma vez que, ele foi informado que era necessário um bom *shimming* da amostra, mas não quais seriam os parâmetros a serem considerados.

4.1.4. Linearidade

A faixa linear do BX para a RMN de ^1H foi medida para amostras contendo de 0 a 20% (v/v) de biodiesel no óleo diesel, conforme descrito na tabela 10. Considerando o erro da pipeta de 100-1000 μL , foram retirados 437 μL das amostras e introduzido um tubo concêntrico de referência externa contendo CDCl_3 e TMS cuja intensidade do TMS era semelhante à da metoxila existente no biodiesel. Para os espectros de RMN de ^{13}C , os erros corrigidos para a pipeta foram os mesmos aos do ^1H porque utilizou-se a mesma pipeta de 100-1000 μL (Gilson®).

Tabela 10. Volume das amostras para a determinação da faixa de linearidade.

	Óleo diesel ^{*,**}	Biodiesel (B100) ^{**}	BX (%)	BX (Erro corrigido)
RMN de ¹H	1000,0	0,0	B0	0,0
	960,0	40,0	B4	4,3
	950,0	50,0	B5	5,3
	940,0	60,0	B6	6,3
	900,0	100,0	B10	10,3
RMN de ¹³C	800,0	200,0	B20	20,2
	2000,0	0,0	B0	0,0
	1920,0	80,0	B4	4,3
	1900,0	100,0	B5	5,3
	1880,0	120,0	B6	6,3
	1800,0	200,0	B10	10,3
	1600,0	400,0	B20	20,2

* Sem adição de biodiesel; ** Expresso em μL .

Os resultados das integrações das áreas das metoxilas para as cinco amostras de BX S1800 estão mostrados na tabela 11 e, a linearidade e a curva de calibração para o RMN de ¹H, estão representados na figura 20. A curva de calibração apresentou a função linear $y = -1,08 + 3,54 \cdot x$ onde R^2 é igual a 0,9968.

Tabela 11. das integrações das áreas das metoxilas (H₃CO-) de BX S1800.

BX (%) S1800 (sem erro)	Medidas (área deconvoluída)			Média (área)	Desvio Padrão (DP)
	a	b	c		
4,3	14,76	14,80	14,70	14,75	0,05
5,3	18,70	18,65	18,34	18,56	0,19
6,3	20,20	20,09	20,19	20,16	0,06
10,3	34,14	33,93	33,81	33,96	0,16
20,2	71,09	70,98	70,87	70,98	0,11

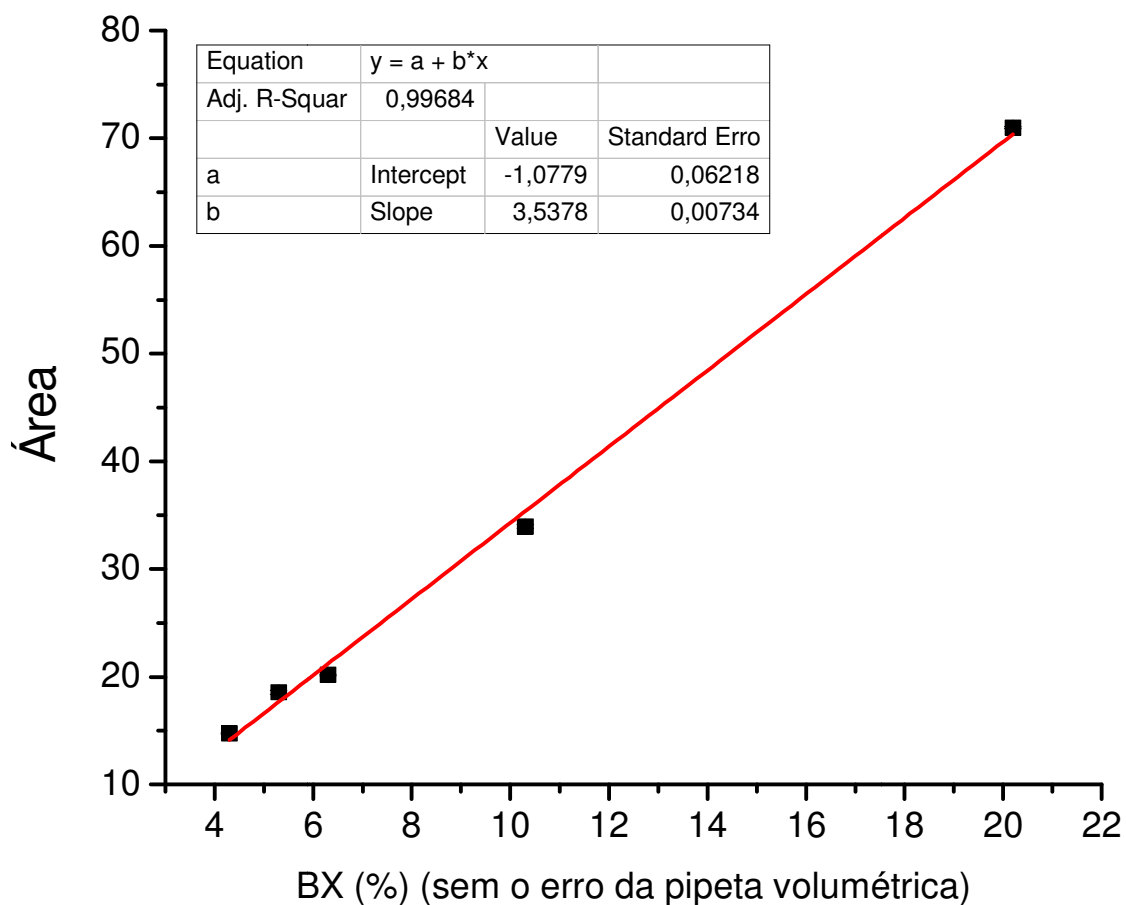


Figura 20. Gráfico da linearidade e da curva de calibração de RMN de ^1H da metoxila ($\text{H}_3\text{CO}-$) do BX.

4.1.5. Incerteza de medição na RMN de ^1H

Fonte de incerteza de um resultado de medida pode ser expressa como um desvio padrão experimental da média conforme equação 4.3 e que se origina da dispersão dos resultados "s" equação 4.4.

$$u(x) = \text{DP experimental da média} [\text{ }] = \text{---} \quad (4.3)$$

$$\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (4.4)$$

Em que x_i representa o resultado da i -ésima medição e \bar{x} representa a média aritmética dos n resultados considerados.

Esse valor da fonte de incerteza é sempre acompanhado de uma unidade de medida que precisa ser transformado pelo coeficiente de sensibilidade (c_i) conforme equação 4.5 para que o efeito causado no mensurado pela variação de outras grandezas lhe afetem.

$$u_i = c_i \cdot u \quad (4.5)$$

O cálculo do c_i é feito pela derivada parcial do modelo matemático (f) em relação a variável que se deseja alterar (x_i).

Quando as unidades de medida (x_i) estiverem na mesma unidade em que se deseja, o c_i é igual a um.

Para expressar todas as componentes da incerteza padrão (u_i), conforme equação 4.6, do tipo A e/ou B é necessário, para cada contribuição, que seja dividido pelo valor atribuído pela distribuição de probabilidade como mostrado na tabela 12.

$$u_i = \frac{u(x) \times c_i}{Divisor} \quad (4.6)$$

Tabela 12. Valor do divisor de acordo com cada distribuição de probabilidade.

Distribuição de probabilidade*	Valor do divisor
Normal	1 (incerteza padrão Tipo A)
Normal (k)	k (do Certificado de Calibração - Tipo B)
Retangular	$\sqrt{3}$
Triangular	$\sqrt{6}$
Forma de U	$\sqrt{2}$

* Assunto detalhado no GUM.

Quando a incerteza padrão é do tipo B, ou seja, vem citada em um certificado de calibração, a incerteza expandida de acordo com a probabilidade (U_P) deverá ser transformada em u_i dividindo-se pelo valor de abrangência (k) que é dado pelo valor do grau de liberdade que também vem citado no certificado.

Os valores das fontes de incerteza que estão mostrados na tabela 13 estão de acordo com as medidas de cada um deles: $U_{95\%}$ está no certificado de calibração da balança analítica, u_{resB} é a resolução da balança calculada juntamente com a anterior como uma incerteza de medição do tipo B, a calibração da pipeta volumétrica é a fonte de incerteza u_{Px} , e a temperatura, a repetitividade e a reprodutibilidade (U_T , U_{Repe} e U_{Repro}) são as fontes de incerteza principais do RMN. Os valores de funções descritos nas equações 4.3 e 4.6 estão presentes na tabela 13.

Tabela 13. Planilha contendo as fórmulas para transformar a fonte de incerteza em incerteza padrão (u_i).

Ensaio						Valor de referência			Unida de	
RMN de ^1H						Deconvolução da metoxila			Área	
Símbolo	Fontes de incerteza			Distribuição de probabilidade	Divisor	Coef. de sens. (c_i)		Inc. Padrão u_i (Área)	Graus de liberdade ($\nu_i = n-1$)	% de contribuição
	Nome	Valor (\pm)	Unidade			Valor	Unidade			
$U_{95\%}$	Balança analítica (Tipo B)	0.0002	g	Normal (k)	2	1	A/g	0.00010	∞	0.00
$u_{res.B}$	Resolução da balança ($2a = LS-LI$)	0.00005	g	Retangular	1.73	1	A/g	0.00003	∞	0.00
u_{p1}	Pipeta de 100 μL (Tipo A)	0.00058	mL	Normal	1	1	A/mL	0.00058	2	0.03
u_{p2}	Pipeta de 250 μL (Tipo A)	0.00289	mL	Normal	1	1	A/mL	0.00289	2	0.13
u_{p3}	Pipeta de 470 μL (Tipo A)	0.00058	mL	Normal	1	1	A/mL	0.00058	2	0.03
u_{p4}	Pipeta de 500 μL (Tipo A)	0.00115	mL	Normal	1	1	A/mL	0.00115	2	0.05
u_{p5}	Pipeta de 750 μL (Tipo A)	0.00346	mL	Normal	1	1	A/mL	0.00346	2	0.15
u_{p6}	Pipeta de 1000 μL (Tipo A)	0.00058	mL	Normal	1	1	A/mL	0.00058	2	0.03
u_T	Temperatura do RMN (Tipo A; 303K)	0.92528	Área	Normal	1	1	A	0.92528	2	40.95
u_{Repe}	Repetitividade (Tipo A)	0.85252	Área	Normal	1	1	A	0.85252	3	37.73
u_{Repro}	Reprodutibilidade (Tipo A)	0.47223	Área	Normal	1	1	A	0.47223	7	20.90

Pode-se observar a percentagem (%) de contribuição de cada componente de incerteza padrão e nota-se que a temperatura do equipamento RMN medida pela unidade BVT tem a maior contribuição, com 40,95%, conforme indicado na figura 17 (página 63), acompanhada da repetitividade com 37,73% e da

reprodutibilidade com 20,90%. Valores estes que eram esperados, porque as três maiores contribuições são devido ao equipamento de RMN de ^1H , sendo que a maior percentagem é dada pela temperatura uma vez que a temperatura indicada pela BVT não necessariamente é a mesma aferida na amostra; a repetitividade e a reprodutibilidade por terem o *shimming* manual, mas que não ultrapassam a incerteza da temperatura que é automática. Há realmente a necessidade de se verificar a temperatura da amostra antes de começar a fazer medida e esta é uma das razões para esperar cinco minutos antes de iniciar o *shimming* a fim de estabilizar a temperatura do sistema.

A incerteza padrão combinada (u_c) é uma função matemática que une todas as incertezas padrões e estão representadas na tabela 13. A RMN é uma técnica que tem muitas fontes de incerteza padrão que são somadas para chegar a um resultado, então, u_c é a raiz da soma quadrática de todas as incertezas padrão conforme mostrado pela equação 4.7.

$$u_c = \sqrt{u(U_{95\%})^2 + \dots + u(P1)^2 + \dots + u(T)^2 + u(Repe)^2 + u(Repro)^2} \quad 4.7$$

Em que $U_{95\%}$, $P1$, T , $Repe$ e $Repro$ são abreviações de cada fonte de incerteza padrão.

A grandeza que define um intervalo em torno de uma incerteza padrão combinada de uma medição, que pode englobar uma grande fração da distribuição de valores ou o fator de abrangência (k) que podem ser atribuídos ao mensurado, é a incerteza expandida (U_P). A fração pode ser entendida como o grau de liberdade efetivo (ν_{ef}) e o nível de confiança (95%) da incerteza expandida ($U_{95\%}$). O ν_{ef} da

incerteza padrão combinada é calculada pela equação de Welch Sattethrwaite mostrada na equação 4.8.

$$v_{ef} = \frac{u_c^4}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i^4}{v_i}} \quad (4.8)$$

Em que u_c é a incerteza padrão combinada, u_i representa cada i -ésima incerteza padrão e v_{ii} são os graus de liberdade de cada respectiva u_i .

A incerteza expandida ($U_{95\%}$) é obtida pela multiplicação do fator de abrangência (k) pela incerteza padrão combinada conforme equação 4.9.

$$U_{95\%} = k \times u_c \quad (4.9)$$

Os resultados da aplicação das fórmulas oriundas das equações 4.7, 4.8e 4.9 estão na tabela 14 com todos os valores pertencentes ao método RMNq de ^1H .

Tabela 14. Tabela da incerteza expandida ($U_{95\%}$) para o método de RMNq de ^1H com um nível de confiança de 95%.

Incerteza padrão combinada (u_c) não-correlacionadas	Distribuição de probabilidade	Graus de liberdade (v_{ef})	Fator de abrangência (k)	Incerteza expandida ($U_{95\%}$)	Unidade
1.34386	Normal	6	2.09	2.8	Área

A amostra utilizada para a construção da curva de linearidade B5,3 apresentou uma área de $18,6 \pm 2,8$, ou seja, a unidade de medida na incerteza expandida é a área que está de acordo com os espectros de RMNq de ^1H , mas convertidos para BX% resulta nos dados mostrados na figura 21:

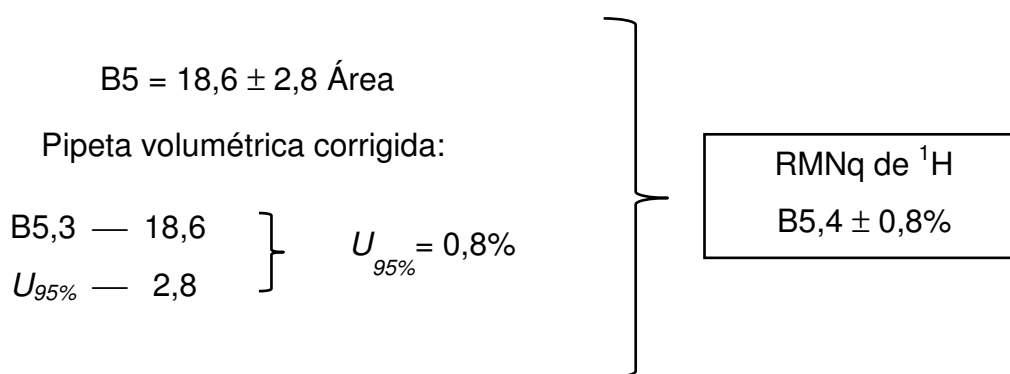


Figura 21. Incerteza de medida com a conversão da unidade de área para BX%.

Com a concentração convertida para a percentagem v/v é possível aplicar um gráfico onde constam as concentrações dos sinais das metoxilas do BX em RMNq de ^1H (y) versus as concentrações fornecidas pelo Laboratório de Combustíveis e Biocombustíveis do CCDM/DEMa/UFSCar, e forneceu as concentrações do $B5 \pm 0,5\%$ de desvio padrão conforme indicado na figura 22.

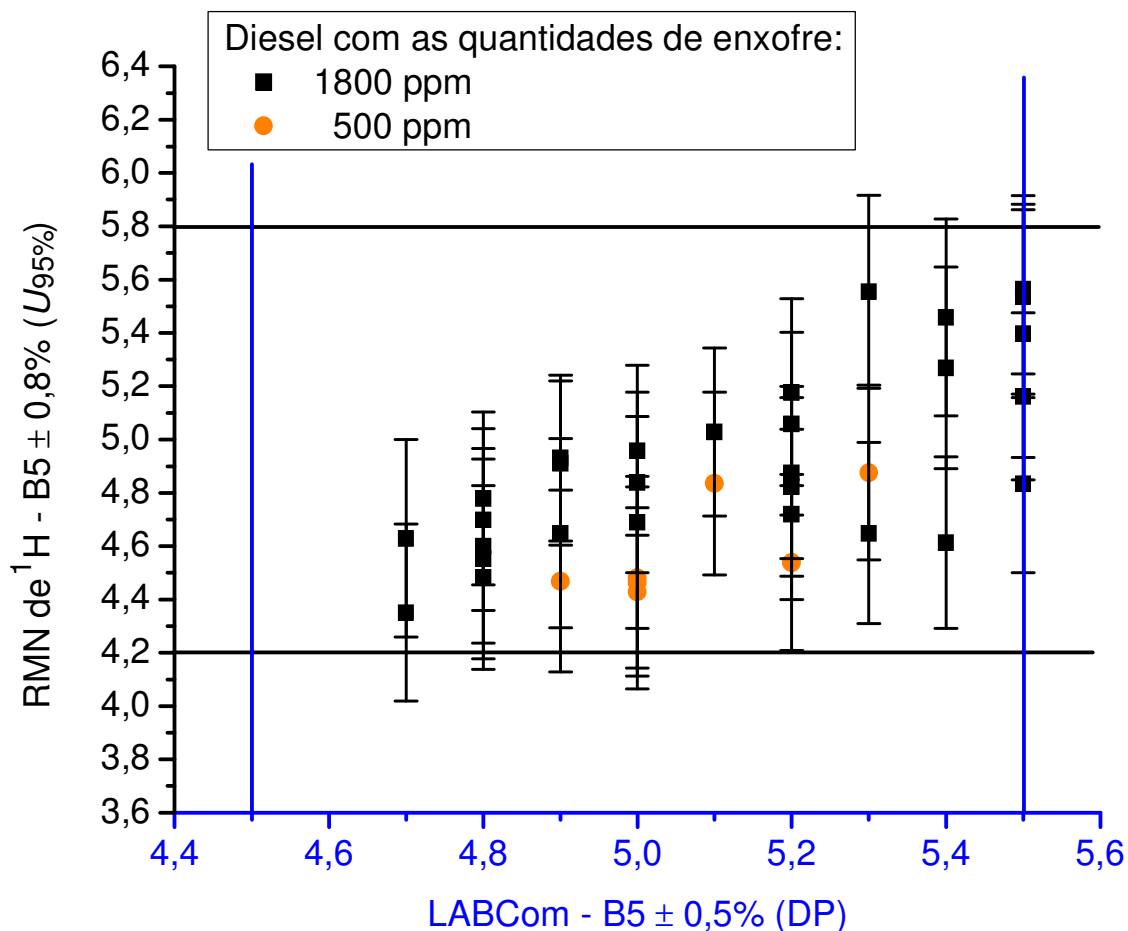


Figura 22. Gráfico com as concentrações das amostras de BX fornecidos pelo Laboratório de Combustíveis (LABCom - B5 ± 0,5%) versus concentração obtida pela técnica RMN de ¹H com o BX ± U_{95%}.

Os resultados do teor de biodiesel em BX através dos resultados da espectroscopia de RMN de ¹H foram piores do que os obtidos em laboratório, mas a RMN tem o cálculo da incerteza expandida (U_{95%}) igual a 0,8%, enquanto que a metodologia empregada no laboratório apresentou desvio padrão DP igual 0,5%, o que torna muito menor do que qualquer incerteza de medição.

Na figura 22 são apresentados os resultados de 36 amostras de óleo diesel BX, sendo 29 contendo 1800 ppm de teor de enxofre e 7 com 500 ppm. Como o gráfico é construído sobre a curva de calibração do óleo diesel BX S1800, a média

das 7 amostras S500 apresentam-se abaixo da concentração de todas as amostras analisadas em laboratório. Fazendo-se um estudo de classificação para avaliar se os espectros das amostras de S1800 e S500 apresentavam separação em função da quantidade de enxofre, isto porque, apesar da diferença entre elas ser grande em função dos seus teores de enxofre obtidos pela técnica de fluorescência de raios-X, para a RMN de ^1H a variação da quantidade de enxofre não é tão expressiva.

4.2. Quimiometria em RMN de ^1H e ^{13}C

4.2.1. Classificação da RMN de ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos com os parâmetros de aquisição e de processamento descritos na tabela 2 e no tópico 3.5 respectivamente e estão representados na figura 23.

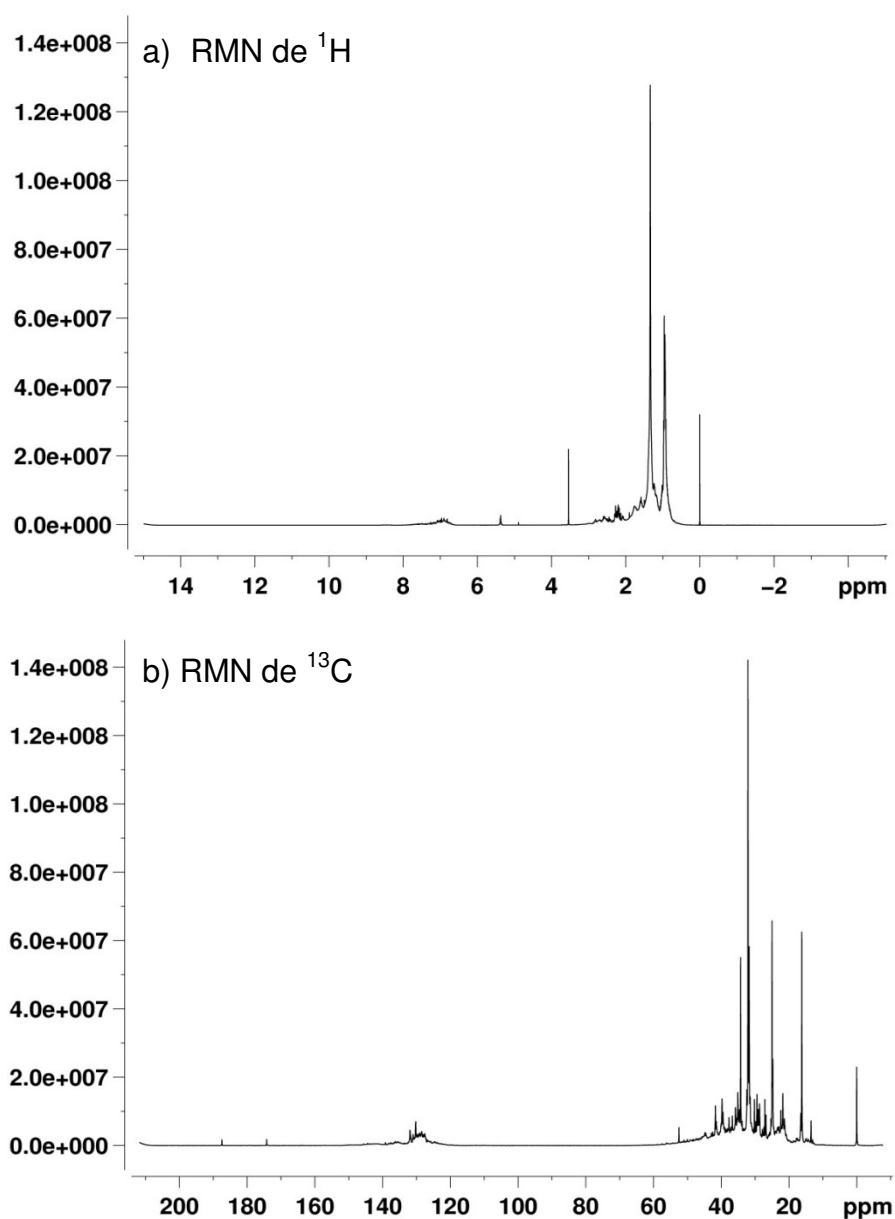


Figura 23. Espectros de RMN de (a) ^1H e (b) ^{13}C da amostra de BX 5% exceto o ruído das extremidades e com 65.536 e 32.768 pontos respectivamente.

Os espectros apresentados na figura 22 foram concatenados, para cada amostra, utilizando o programa MatLab®, ou seja, cada linha contém informações de RMN de ^1H e ^{13}C de cada BX. Os espectros foram retirados os ruídos das extremidades e o sinal (TMS e TMSP-d₄) em zero (0) ppm e reunidos em uma única matriz conforme mostrado na figura 24.

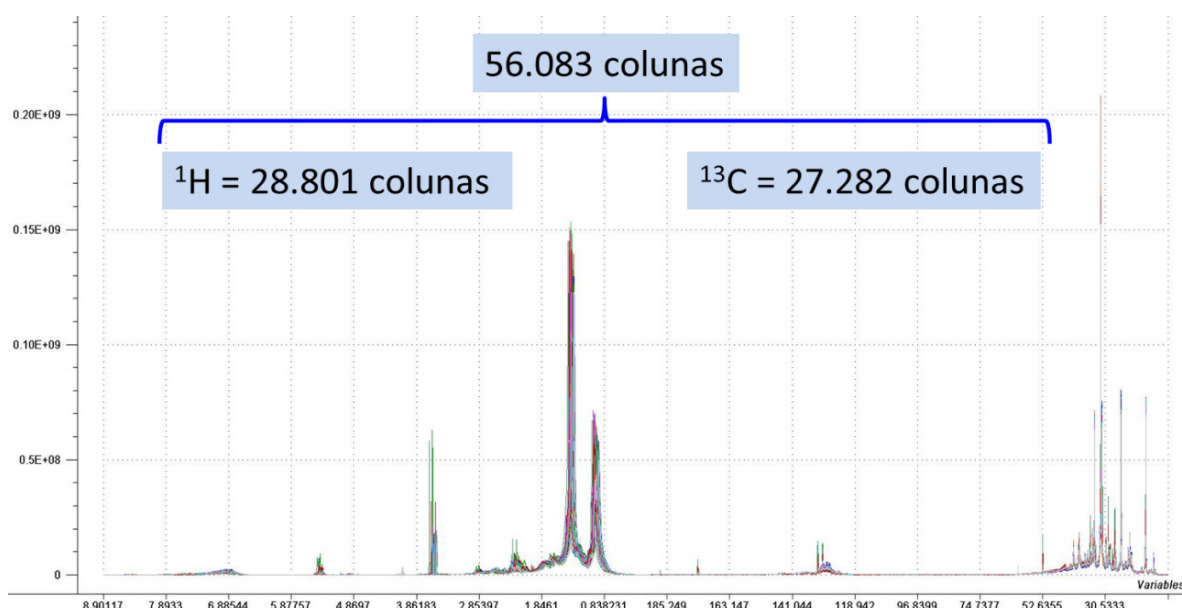


Figura 24. Espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C calibrados no zero, sem a referência (TMS e TMSP-d₄) e o ruído das extremidades. A matriz completa tem 75 amostras e 56.083 pontos.

Apesar do sinal do ruído dos espectros de ^{13}C serem naturalmente mais intensos que os do hidrogênio, conforme pode-se observar na figura 25. Isso não interfere na análise dos dados quando feitos em conjunto.

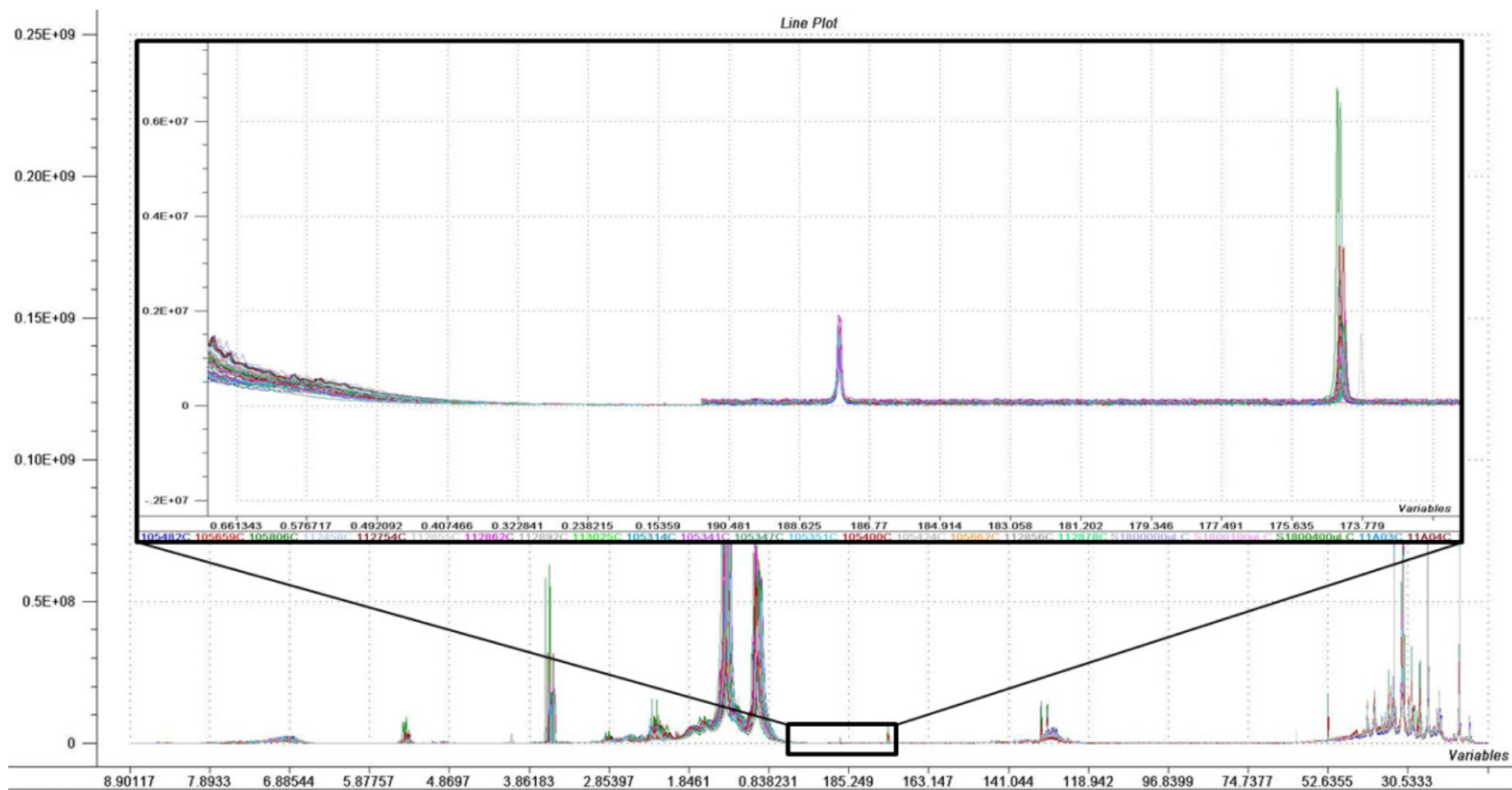


Figura 25. Gráficos de RMN de ¹H e ¹³C sem a referência (TMS e TMSP-d4) e com ampliação no encontro dos espectros.

O SPA-LDA foi executado a partir da matriz oriunda dos espectros relatados acima e separada em calibração, validação e previsão escolhendo-se apenas uma variável das 56.083 (em 8,26 ppm) e que foi utilizada para a classificação entre óleo diesel BX S1800 ou S500, provavelmente porque é a região de deslocamento químico do anel benzênico com um heteroátomo de enxofre. Os espectros foram centrados na média e validados por série de teste. O menor custo obtido no conjunto teste da validação foi 0,018 conforme figura 26.

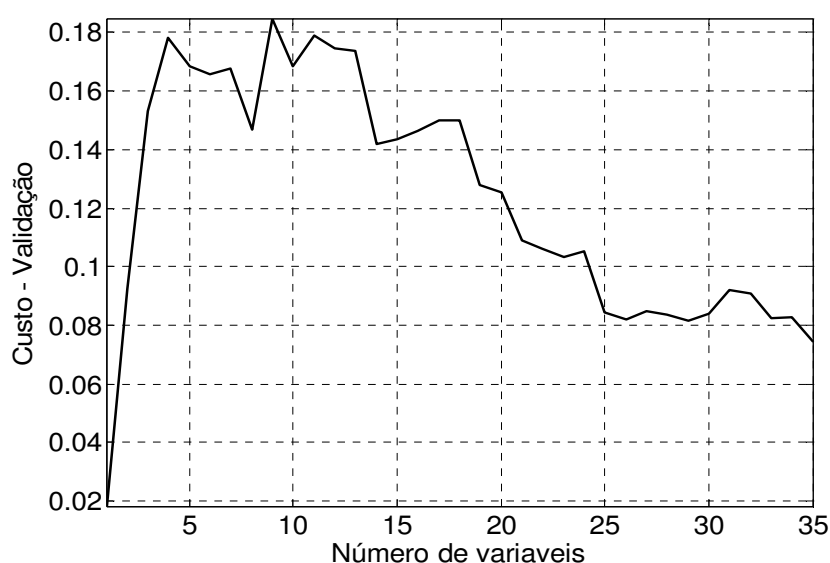


Figura 26. Gráfico com o número de frequências (variáveis) versus custo do modelo de validação.

A variável 1 foi escolhida para montar o modelo de classificação com o custo da validação 0,018 e corresponde a 8,26 ppm. O número que *a priori* seria um cálculo errado do algoritmo por ter uma quantidade de variáveis inicial muito alta (56.083), simplesmente colocou uma (1) variável como o melhor resultado, sendo obtido com as amostras de previsão que continham as duas misturas BX e apresentando uma ótima classificação conforme apresentado na tabela 15.

Tabela 15. Dados da previsão das 19 amostras de BX S500 e S1800 usando os modelos SPA-LDA com erro igual a zero.

	AMOSTRA	CÓDIGO DA AMOSTRA	CLASSIFICAÇÃO DO SPA-LDA
S1800	1	1	1
	2	1	1
	3	1	1
	4	1	1
	5	1	1
	6	1	1
	7	1	1
	B4	1	1
	B10	1	1
	Mistura BX 1	1	1
S500	1	2	2
	2	2	2
	3	2	2
	4	2	2
	5	2	2
	6	2	2
	7	2	2
	B10	2	2
	Mistura BX 2	2	2

A representação desta variável selecionada pelo SPA-LDA está representada na figura 27, em que realmente, a variável selecionada está no começo do gráfico e se apresenta com uma variação da amplitude da linha de base muito grande. Isso pode estar relacionado ao fato do S1800 ser mais viscosos e apresentar um maior teor de enxofre. Há uma ampliação de todas as amostras para mostrar o sinal selecionado em 8,261 ppm.

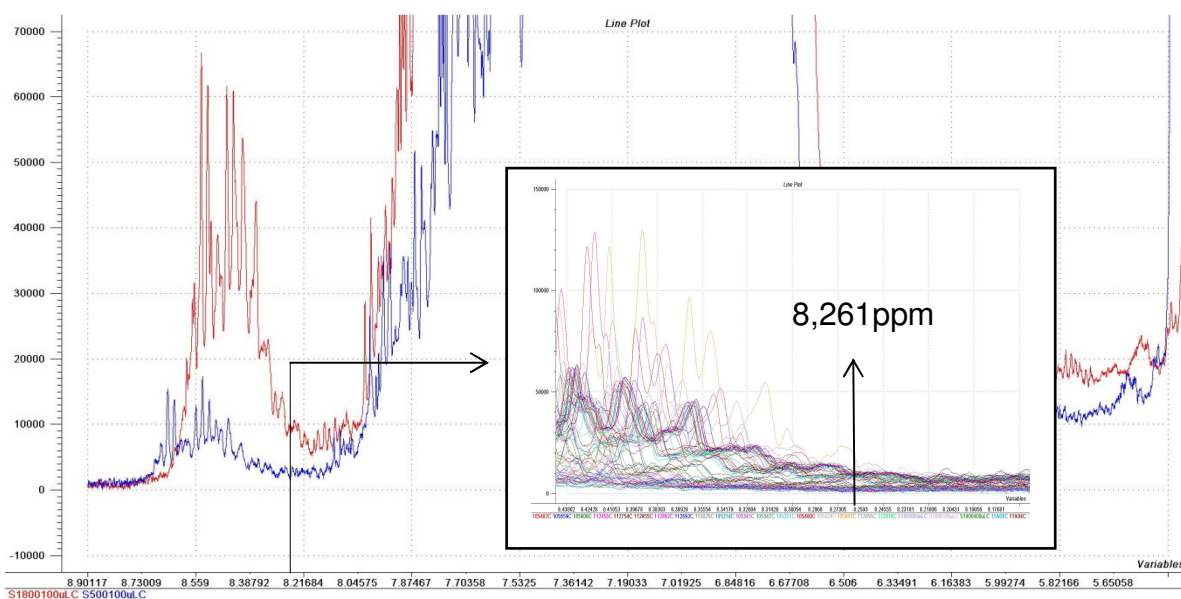


Figura 27. Representação do modelo SPA-LDA para duas amostras (B5%) S1800 (espectro maior) e S500 (espectro menor).

O gráfico simulado de um espectro de RMN de ^1H de um composto contendo anel benzênico e com um heteroátomo de enxofre, é mostrado na figura 28. Nele pode-se observar que o deslocamento químico está muito próximo do deslocamento químico observado nos espectros de RMN de ^1H do óleo diesel BX.

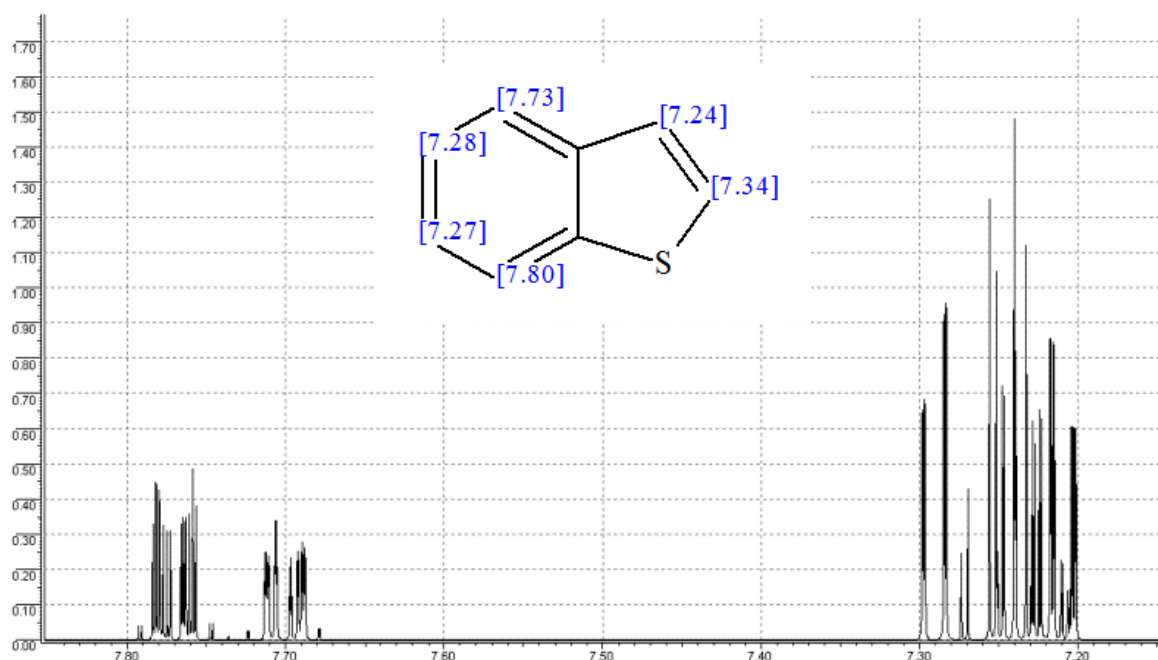


Figura 28. Simulação de um espectro RMN de ^1H de um anel aromático sulfurado presente no diesel.

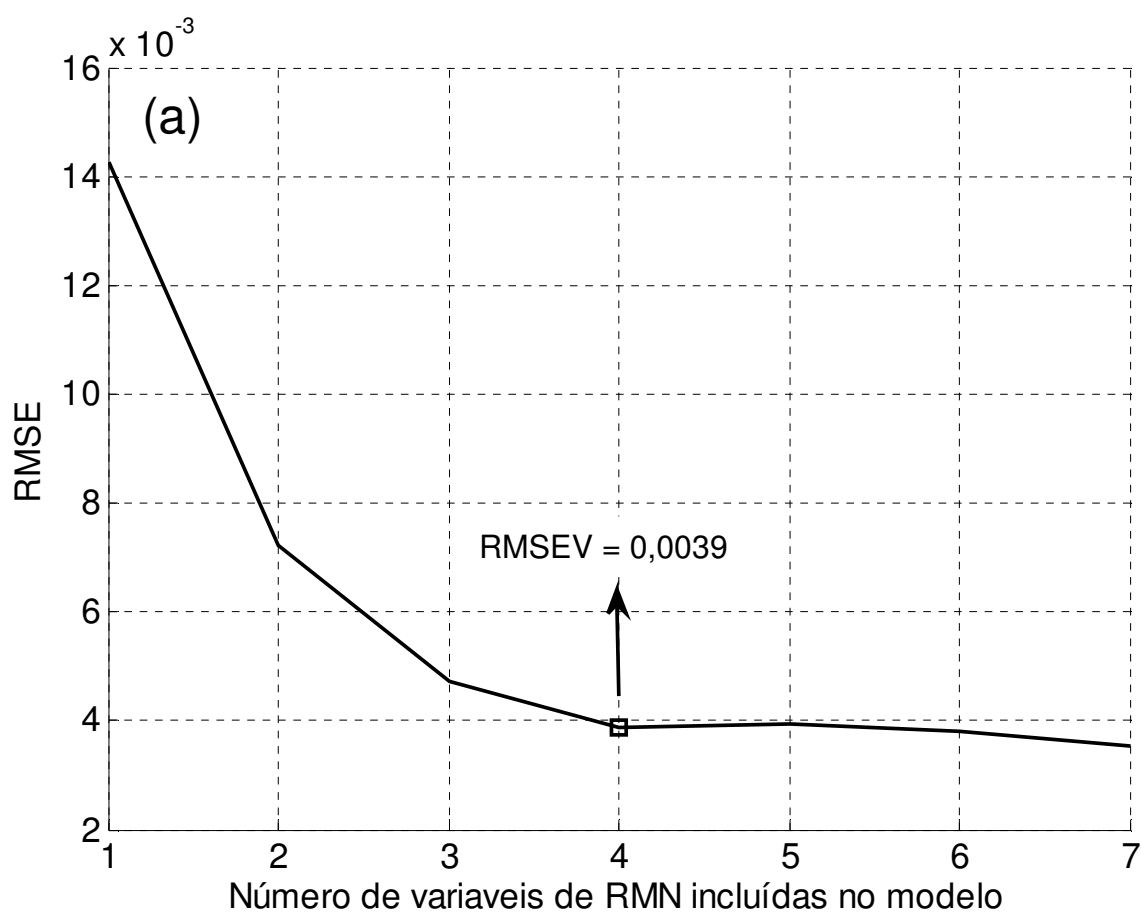
Observa-se que a variação da quantidade de enxofre presente nas amostras desloca os espectros de RMN de ^1H para região mais desprotegido, fazendo com que o algoritmo SPA-LDA classifique as amostras de S500 diferentemente das S1800. Isso se deve devido à mudança nos valores dos deslocamentos químicos assim como da sua intensidade, principalmente, na região centrada em 8,261 ppm.

4.2.2. Quantificação de RMN de ^1H e ^{13}C

O teor de biodiesel não tem a calibração interferida pela variação na quantidade de outros elementos contidos na matriz óleo diesel. Para comprovar esta afirmação foi realizada uma quantificação dos parâmetros: teor de enxofre, massa específica, temperatura de destilação a 50% e 80%, índice de cetano e ponto de

fulgor que são alguns dos parâmetros determinados pelo Laboratório de Combustíveis do CCDM/DEMa/UFSCar para avaliar a qualidade do produto.

As variáveis que foram escolhidas para o teor de enxofre são as que condizem com a simulação anterior, apresentada na figura 28, somadas a algumas outras variáveis no espectro, como as frequências dos grupos $-CH_2$, e que ajudaram a obter um bom modelo de regressão multilinear, conforme figura 29. Nela, podemos observar as regiões em azul (na direção x - horizontal) que representa os teores de enxofre e fornecida pelas análises realizadas no CCDM e as intensidades (na direção y - vertical) representa a quantidade de substâncias detectadas pelo RMN.



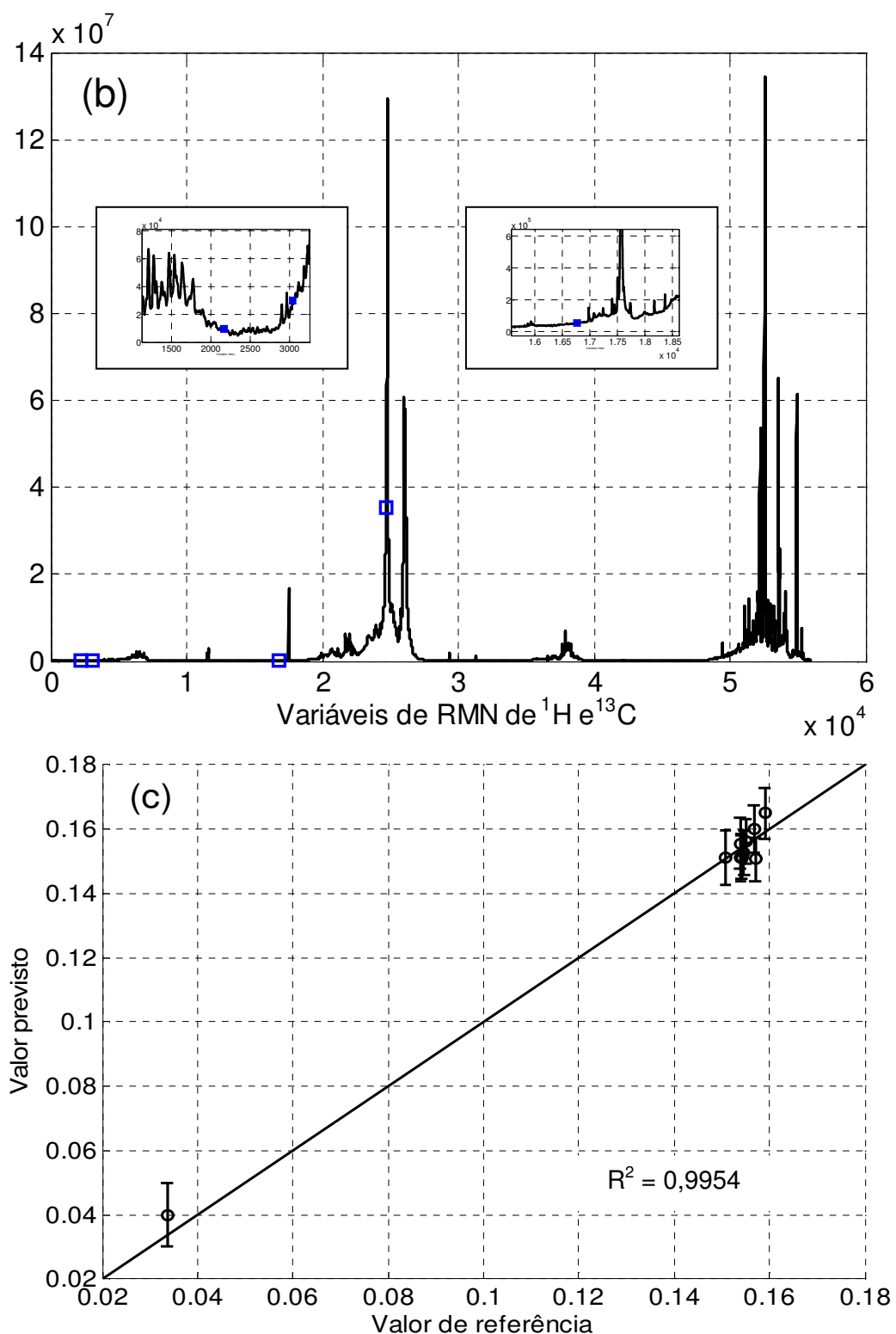
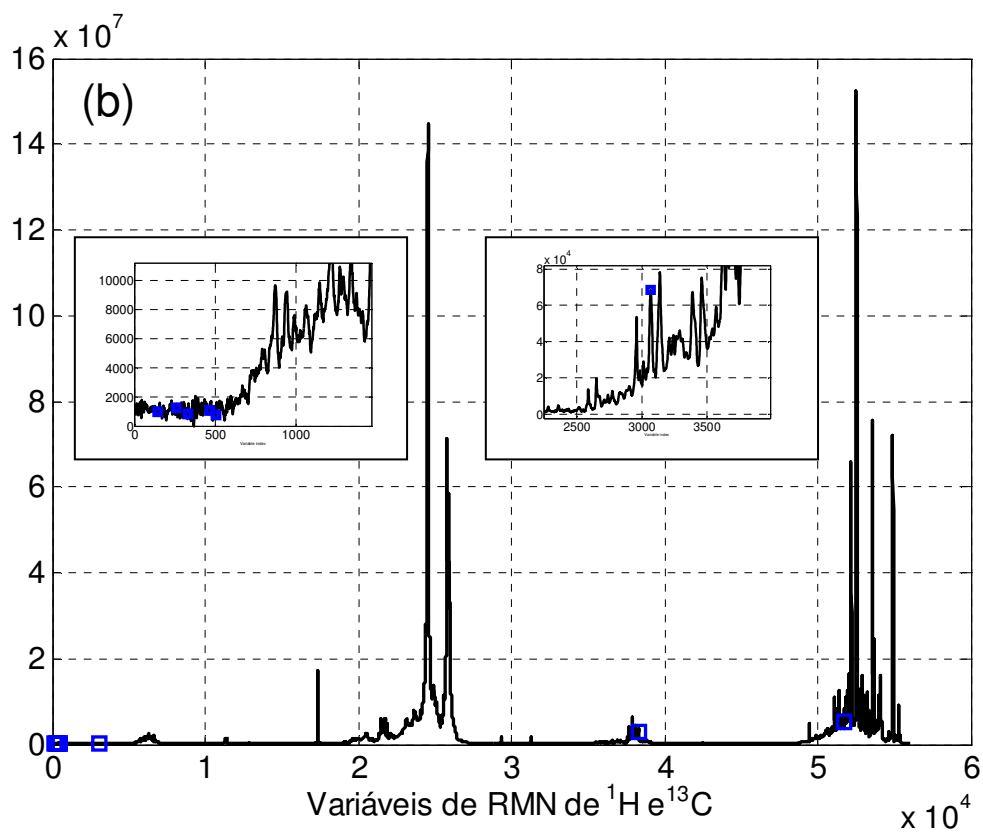
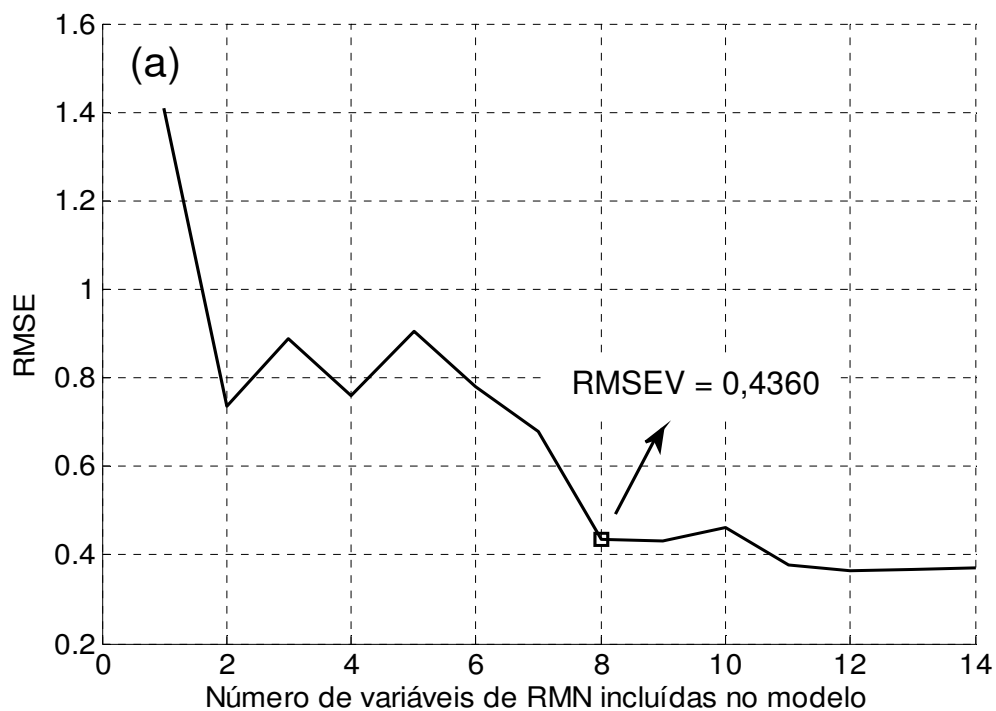


Figura 29. Gráficos do modelo SPA-MLR para o índice de enxofre com as amostras autoescaladas. (a) 4 variáveis incluídas no modelo de RMN para índice de enxofre; (b) 4 variáveis de RMN de ^1H nenhuma de ^{13}C ; (c) validação do modelo SPA-MLR de RMN com um $R^2 = 0,9954$.

O modelo SPA-MLR foi realizado para os demais índices, incluindo os que são físico-químicos como: massa específica (ME) e a temperatura de destilação a 50 e 80% (T50 e T80) conforme vistos nas figuras 30, 31, 32, 33 e 34.



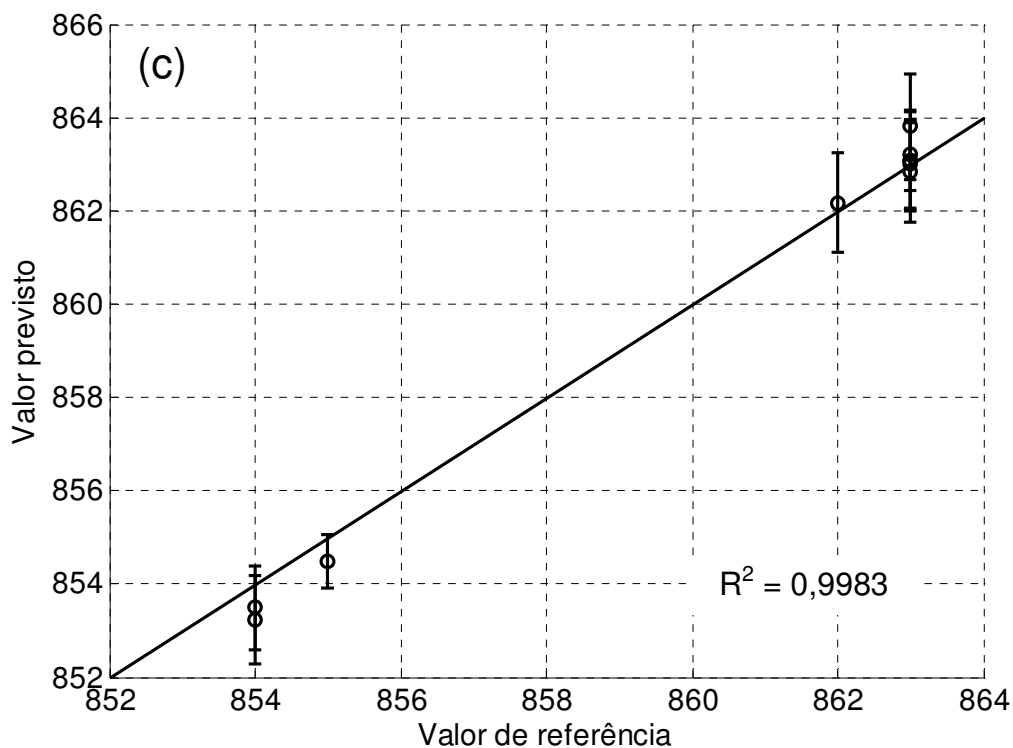
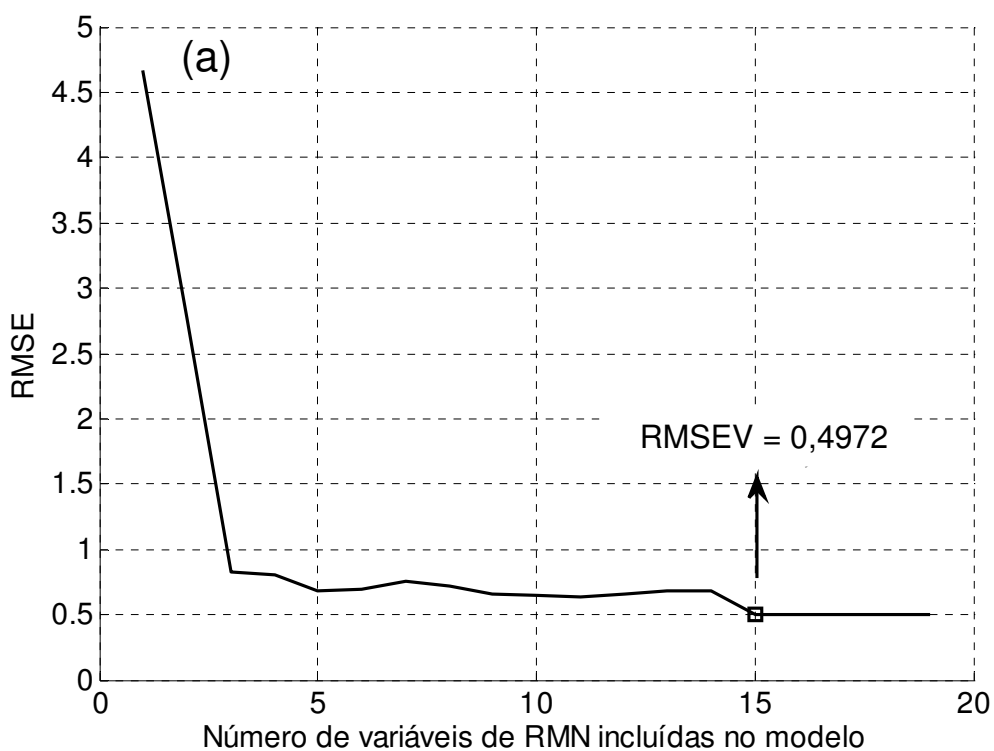


Figura 30. Modelo SPA-MLR para a massa específica à 20 °C com as amostras autoescaladas. (a) 8 variáveis incluídas no modelo de RMN para ME; (b) 6 variáveis de RMN de ^1H e 2 de ^{13}C ; e (c) validação do modelo SPA-MLR de RMN com um $R^2 = 0,9983$.



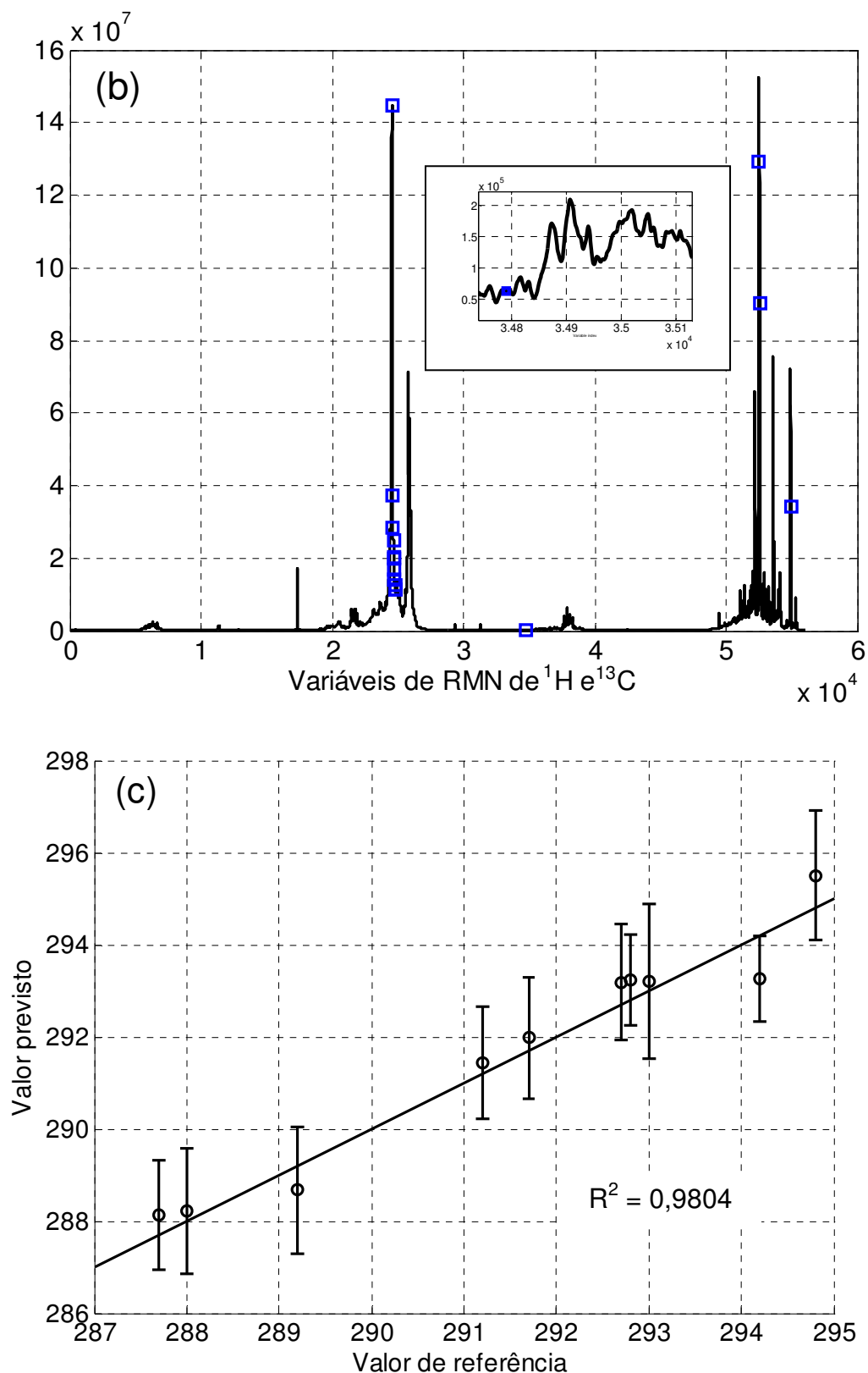
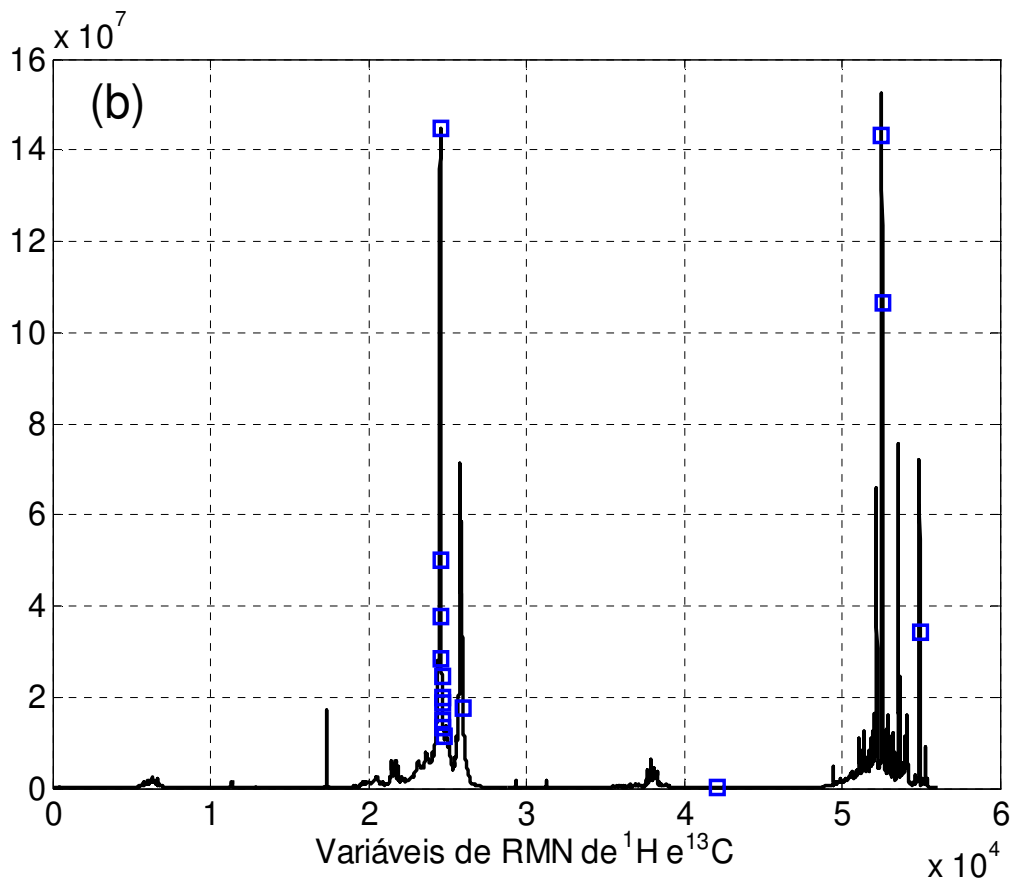
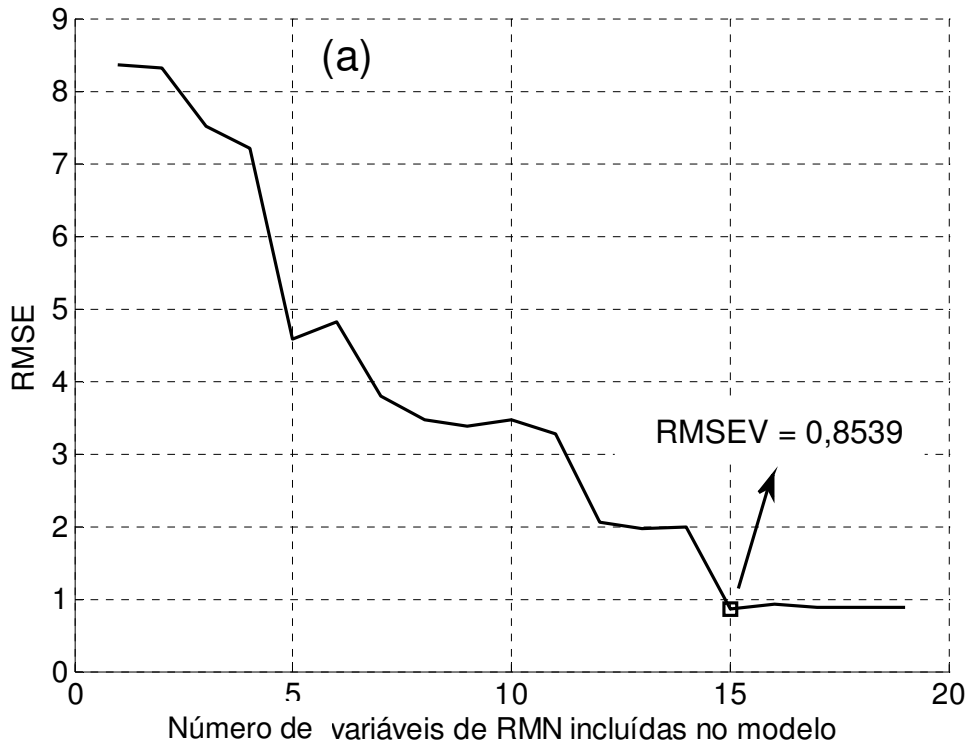


Figura 31. Modelo SPA-MLR para a temperatura de destilação a 50% (T50) do produto com as amostras centradas na média. (a) 15 variáveis incluídas no modelo de RMN para T50; (b) 11 variáveis de RMN de ^1H e 4 de ^{13}C ; e (c) validação do modelo SPA-MLR de RMN com um $R^2 = 0,9804$.



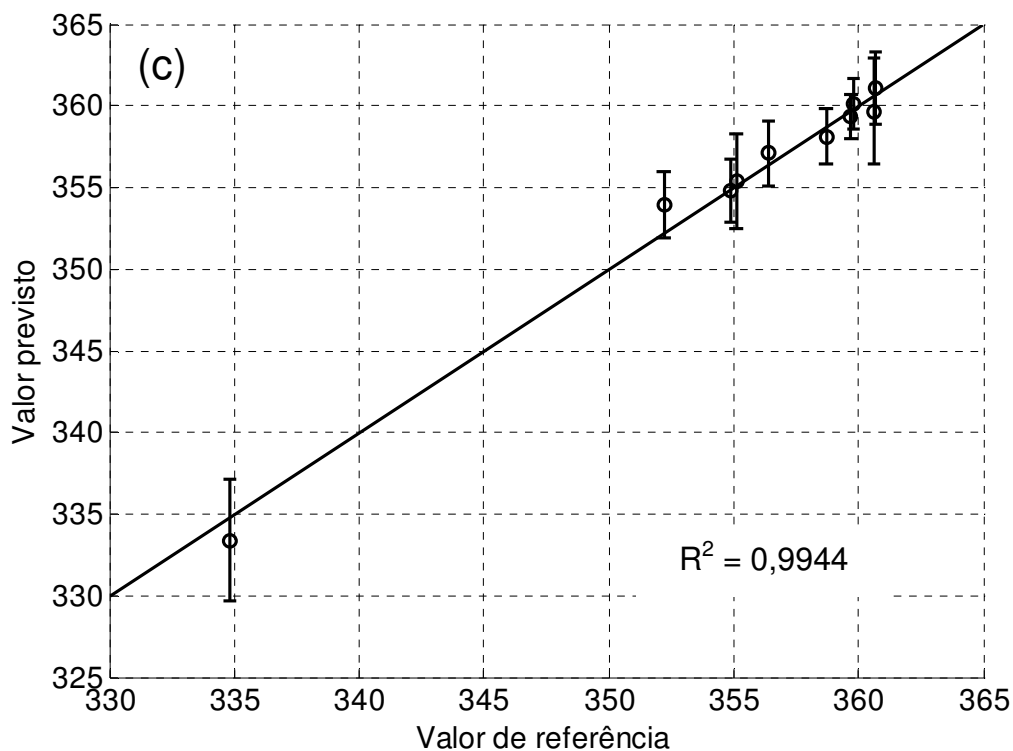
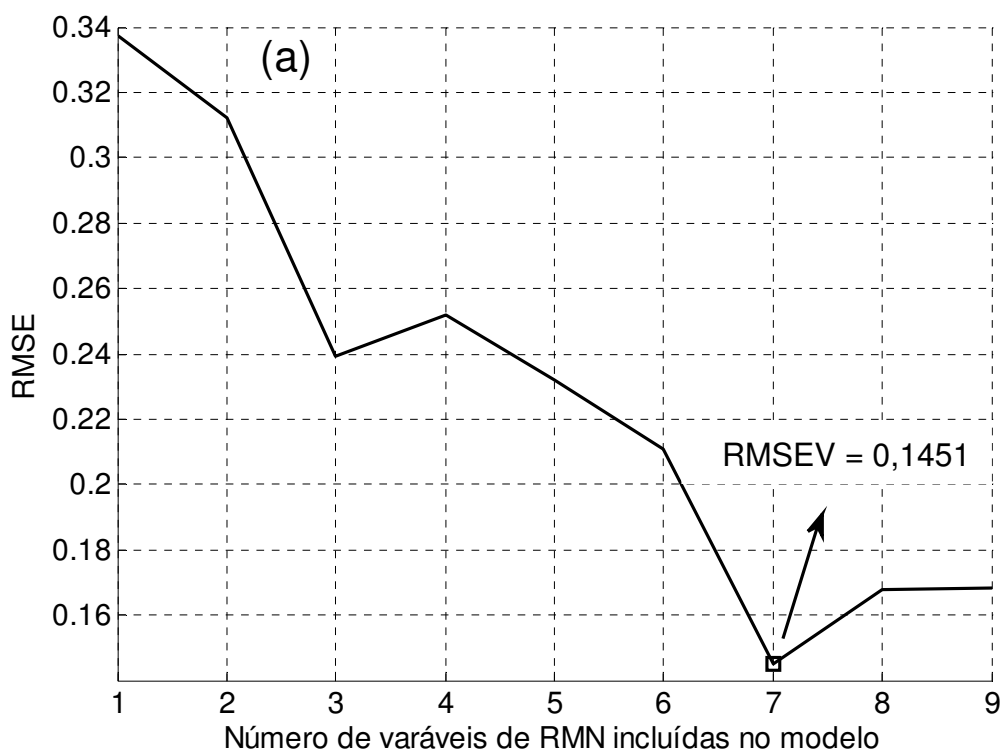


Figura 32. Modelo SPA-MLR para a temperatura de destilação a 80% (T80) do produto com as amostras centradas na média. (a) 15 variáveis incluídas no modelo de RMN para T80; (b) 11 variáveis de RMN de ^1H e 4 de ^{13}C ; e (c) validação do modelo de SPA-MLR de RMN com um $R^2 = 0,9944$.



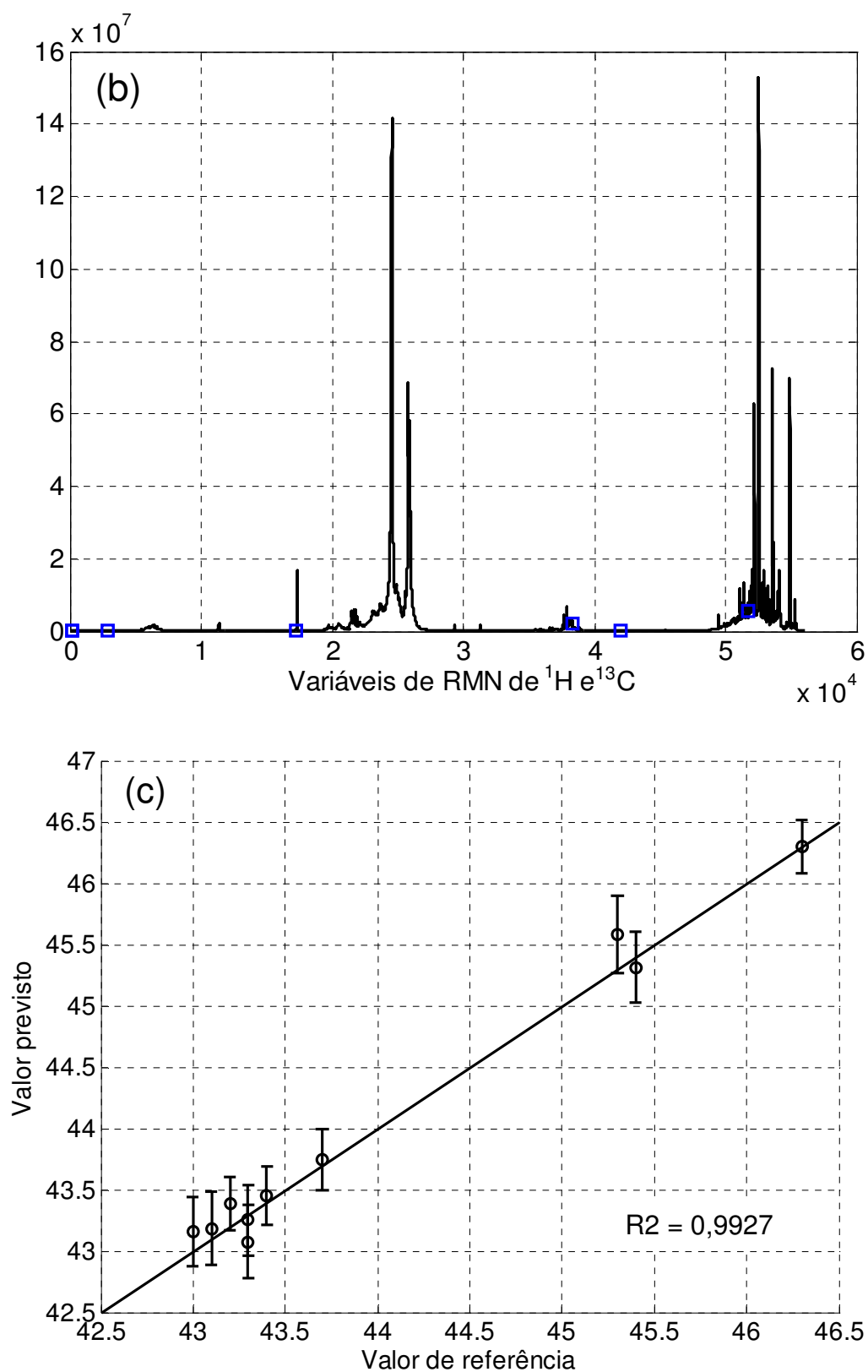
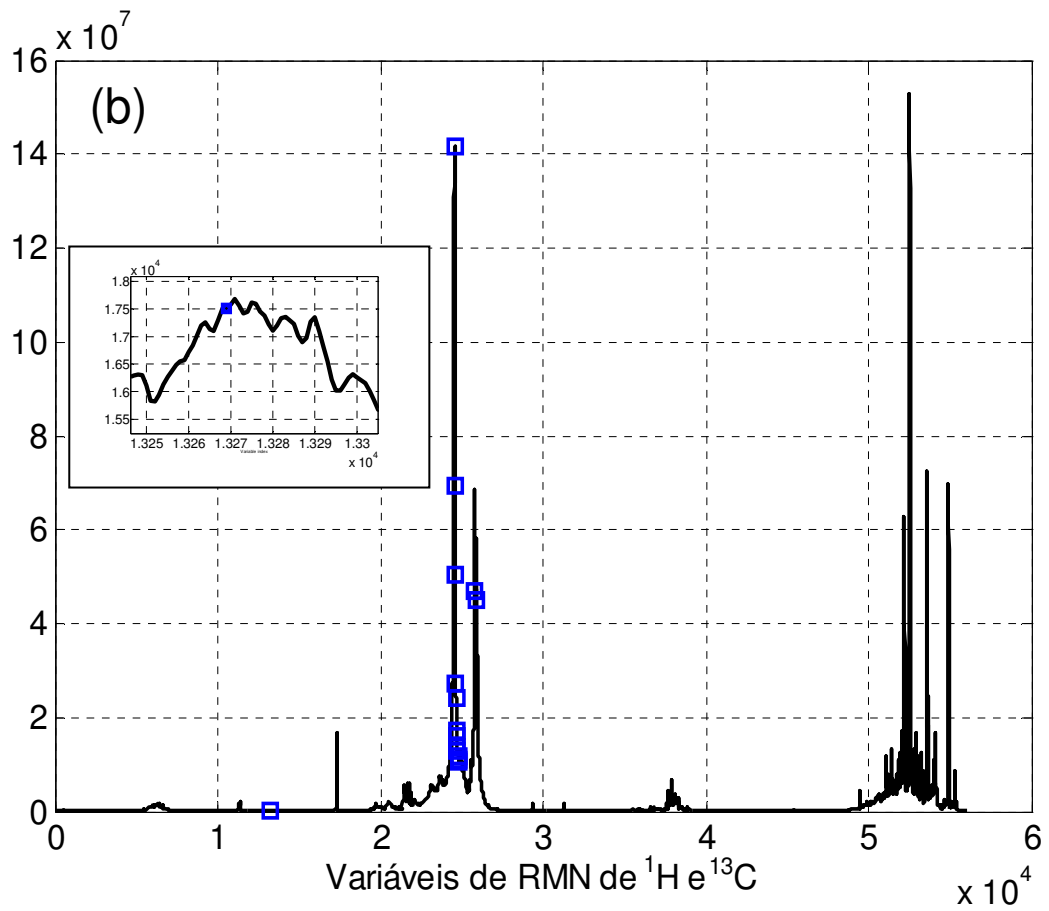
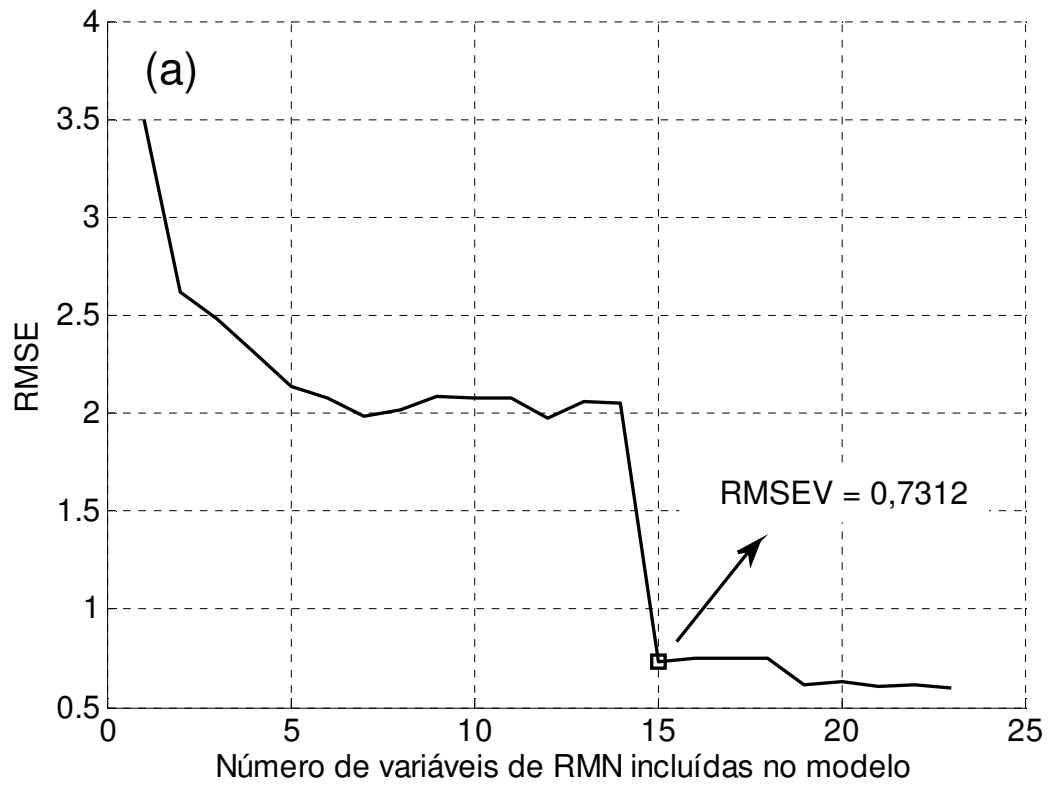


Figura 33. Modelo SPA-MLR de RMN para o índice de cetano (IC) com as amostras autoescaladas. (a) 7 variáveis incluídas no modelo de RMN para IC; (b) 4 variáveis de RMN de ^1H e 3 de ^{13}C ; e (c) validação do modelo de SPA-MLR de RMN com um $R^2 = 0,9927$.



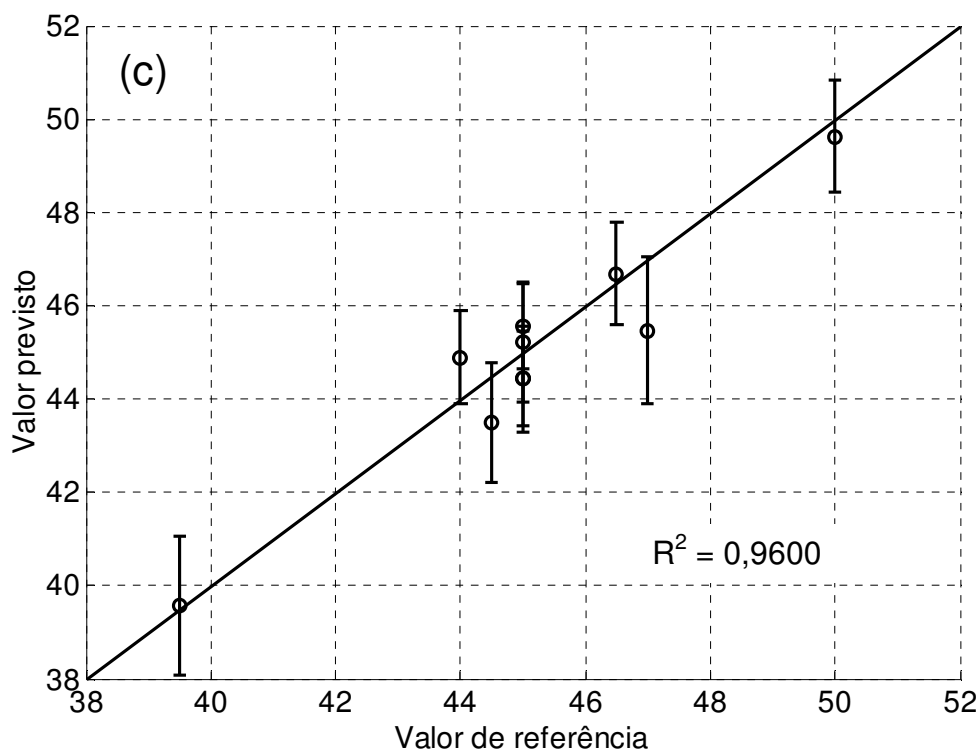


Figura 34. Modelo SPA-MLR de RMN para o ponto de fulgor (PF) com as amostras centradas na média. (a) 15 variáveis incluídas no modelo de RMN para PF; (b) 15 variáveis de RMN de ^1H e 0 de ^{13}C ; e (c) validação do modelo de SPA-MLR de RMN com um $R^2 = 0,9600$.

Os resultados para as 6 calibrações SPA-MLR de RMN de ^1H e ^{13}C são mostrados na tabela 16.

Tabela 16. Resultados para os modelos de validação usando o algoritmo SPA-MLR de RMN ^1H e ^{13}C para o biodiesel em diesel.

	Variáveis (x)	RMSEV	R^2	Pretratamento
Enxofre	4 (^1H)	0,0039	0,9954	Autoescalonado
ME	6 (^1H) e 2 (^{13}C)	0,4360	0,9983	Autoescalonado
T50	11 (^1H) e 4 (^{13}C)	0,4972	0,9804	Centrado na média
T80	11 (^1H) e 4 (^{13}C)	0,8539	0,9944	Centrado na média
IC	4 (^1H) e 3 (^{13}C)	0,1451	0,9927	Autoescalonado
PF	15 (^1H)	0,7312	0,9600	Centrado na média

Conforme apresentado na figura 30, a maioria das variáveis selecionadas para a massa específica foi das regiões dos aromáticos, tanto no RMN de ^1H quanto no de ^{13}C .

Os modelos SPA-MLR de RMN para a temperatura de destilação (figuras 31 e 32) são coerentes porque as 14 variáveis que foram selecionadas tanto do hidrogênio como do carbono têm os deslocamentos das metilenas ($-\text{CH}_2$) que formam as grandes cadeias de ácidos carboxílicos que compõem o BX.

O índice de cetano, figura 33, selecionou a variável correspondente ao deslocamento químico da metoxila na RMN de ^1H porque ele depende da quantidade de biodiesel adicionado no diesel.

Todos os parâmetros foram bem calibrados e apresentaram uma ótima validação do método SPA-MLR, mostrando que mesmo com a possibilidade de variar as concentrações de enxofre e de outros parâmetros como: teor de enxofre, massa específica, temperatura de destilação a 50% e 80%, índice de cetano e ponto de fulgor ainda conseguem calibrar o teor de biodiesel no óleo diesel BX, ou seja, a RMNq mostrou-se uma técnica muito seletiva.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Nesta tese foi apresentada uma nova proposta para validação da técnica RMNq, seguindo a normalização NBR ISO/IEC 17025 e o guia GUM para o cálculo da incerteza de medição, para a quantificação do teor de biodiesel em óleo diesel.

O método de RMNq de ^1H foi uma técnica precisa e exata e com uma linearidade de 4 a 20% para a determinação do biodiesel em óleo diesel. Com isso, o método torna-se uma ferramenta analítica importante para o monitoramento dos teores de biodiesel em diesel até os limites que hoje são estabelecidos para o uso experimental em frotas automotivas ou em equipamentos industriais específicos, que é de 20% (v/v), conforme estabelecido pela Resolução ANP no. 2 de 13 de janeiro de 2011.

Considerando aos aspectos metrológicos envolvidos nos cálculos de incerteza de medição para as medidas de RMNq de ^1H , a principal componente de incerteza determinada está associada ao controle de temperatura pela BVT (unidade controladora da temperatura), que apresentou uma contribuição de 40,95% na incerteza padrão combinada. Este fato confirma algumas evidências experimentais de que a temperatura da amostra deve ser calibrada.

O teor de biodiesel apresentou uma incerteza de medição de $\pm 0,8\%$ para o B5, que foi próximo da medida da concentração do desvio padrão $\pm 0,5\%$, obtido pelo Laboratório de Combustíveis e Biocombustíveis do CCDM/DEMa/UFSCar. Pressupõem-se que se a temperatura interna da amostra fosse calibrada, esse valor tenderia a ser menor, uma vez que pode existir uma diferença entre a temperatura da amostra e a temperatura de entrada dos gases para aquecê-la.

Os teores de enxofre existente no biodiesel em diesel S500 e S1800 se mostraram de suma importância para a quantificação dos teores de biodiesel em

óleo diesel BX. A curva linear de calibração do S1800 apresentou um erro para todas as amostras de S500. Com base nessa constatação o modelo SPA-LDA permitiu que as amostras de óleo diesel BX fossem classificadas entre S500 e S1800 com uma variável de RMNq de ^1H e ^{13}C , em 8,261 ppm, que tem o deslocamento químico muito próximo dos compostos aromáticos sulfonados.

A seletividade do espectro de RMNq de ^1H e ^{13}C é comprovada pelo modelo SPA-MLR para o teor de enxofre, massa específica, temperatura de destilação a 50% e 80%, índice de cetano e ponto de fulgor que apresentaram um R^2 de 0,9954, 0,9983, 0,9804, 0,9944, 0,9927 e 0,9600 respectivamente. Além disso, conseguiu-se calibrar o teor de biodiesel sem interferir na sua medida.

Os resultados alcançados neste trabalho são passos importantes na busca pela excelência da qualidade dos ensaios realizados pelo grupo do Laboratório de RMN do DQ/UFSCar, principalmente em função da introdução e discussão de aspectos metrológicos envolvidos na RMN, incorporação de experiências multidisciplinares, melhorias nos procedimentos laboratoriais e a formação de recursos humanos voltados a uma Gestão da Qualidade com reconhecida competência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) SKOOG D. A.; LEARY J. J.; "Principles of instrumental analysis"; 4th edition; Saunders College Publishing; p. 310-311; 1992.
- 2) BLOCH F.; HANSEN W. W.; PACKARD M. E.; "Nuclear induction"; *Phys. Rev.*; **69**; 127; 1946.
- 3) PURCELL E. M.; TORREY H. C.; POUND R. V.; "Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid"; *Phys. Rev.*; **69**; 37-38; 1946.
- 4) ERNST R. R.; BODENHAUSEN G.; WOKAUN A.; "Principles of Nuclear Magnetic Resonance in one and two dimensions"; Oxford University Press; Oxford; 1991.
- 5) FREEMAN R.; "The Fourier transform revolution NMR spectroscopy"; *Anal. Chem.*; **65** (17); 743-753; 1993.
- 6) KOMOROSKI R. A.; "In vivo NMR spectroscopy can be used to determine drug concentrations directly in tissues of interest and may provide new information on drug efficacy and metabolism"; *Anal. Chem.*; **66** (20); 1024A-1033A; 1994.
- 7) RACKHAM D. M.; "Quantitative analysis in pharmacy and pharmaceutical chemistry by nuclear magnetic resonance spectroscopy"; *Talanta*; **17** (10); 895-906; 1970.
- 8) SHOOLERY J. N.; "Some quantitative applications of ¹³C NMR spectroscopy"; *Progress in NMR Spectroscopy*; **11** (2); 79-93; 1977.
- 9) GREENHALGH R.; SHOOLERY J. N.; "Analysis of organophosphorus insecticide and formulations for contaminants by phosphorus-31 Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance spectrometry"; *Anal. Chem.*; **50** (14); 2039-2042; 1978.
- 10) JANCKE H.; "NMR Spectroscopy as a Primary Analytical Method"; *CCQM Report*; **98** (2); 1-12; 1998.
- 11) HAIBER S.; HERZOG H.; BUDDRUS J.; BURBA P.; LAMBERT J.; "Proceedings of refractory organic substances in the environment"; 115-128; 2002.
- 12) NORDON A.; GEMPERLINE P. J.; MCGILL C. A.; LITTLE-JOHN D.; "Quantitative analysis of low-field NMR signals in the time domain"; *Anal. Chem.*; **73** (17); 4286-4294; 2001.

- 13) HENDERSON T. J.; "Quantitative NMR spectroscopy using coaxial inserts containing a reference standard: purity determinations for military nerve agents"; *Anal. Chem.*; **74** (1); 191-198; 2002.
- 14) MADSEN G. L.; CRUMRINE D. S.; JASELSKIS B.; "Proton nuclear magnetic resonance determination of hexamethylenetetramine in the presence of formaldehyde and urine"; *Analyst*; **121**; 567-570; 1996.
- 15) MARKAI S.; MARCHAND P. A.; MABON F.; BAGUET E.; BILLAULT I.; ROBINS R. J.; "Natural deuterium distribution in branched-chain medium-length fatty acids is nonstatistical: a site-specific study by quantitative ^2H NMR spectroscopy of the fatty acids of capsaicinoids"; *Chem. BioChem.*; **3** (2-3); 212-218; 2002.
- 16) AGUILAR M. R.; GALLARDO A.; DEL-MAR F. M.; SAN R. J.; "In situ quantitative ^1H NMR monitoring of monomer consumption: a simple and fast way of estimating reactivity ratios"; *Macromolecules*; **35** (6); 2036-2041; 2002.
- 17) GUILLERMO A.; COHEN A. J-P.; "Quantitative nuclear magnetic resonance characterization of long-range chain dynamics: polybutadiene, polyethylene-oxide solution"; *J. Chem. Phys.*; **116** (7); 3141-3151; 2002.
- 18) HILTUNEN Y.; KAARTINEN J.; PULKKINEN J.; HAEKKINEN A-M.; LUNDBOM N.; KAUPPINEN R. A.; "Quantification of human brain metabolites from *in vivo* ^1H NMR magnitude spectra using automated artificial neural network analysis"; *J. Magn. Reson*; **154** (1); 1-5; 2002.
- 19) PETERS R.; MENGERINK Y.; LANGEREIS S.; FREDERIX M.; LINSSEN H.; VAN-HEST J.; VANDER W. S.; "Quantitation of functionality of poly(methyl methacrylate) by liquid chromatography under critical conditions followed by evaporative light-scattering detection. Comparison with NMR and titration"; *J. of Chromatography A*; **949** (1-2); 327-335; 2002.
- 20) LENZ E. M.; WILSON I. D.; WRIGHT B.; PARTRIDGE E. A.; RODGERS C. T.; HAYCOCK P. R.; LINDON J. C.; NICHOLSON J. K.; "A comparison of quantitative NMR and radiolabelling studies of the metabolism and excretion of StatilTM (3-(4-bromo-2-fluorobenzyl)-4-oxo-3H-phthalazin-1-ylacetic acid) in the rat"; *J. Pharm. & Biomed Anal.*; **28** (1); 31-43; 2002.
- 21) TUGNAIT M.; LENZ E. M.; PHILLIPS P.; HOFMANN M.; SPRAUL M.; LINDON J. C.; NICHOLSON J. K.; WILSON I. D.; "The metabolism of 4-

- trifluoromethoxyaniline and [^{13}C]-4-trifluoromethoxyacetanilide in the rat: detection and identification of metabolites excreted in the urine by NMR and HPLC-NMR”; *J. Pharm. & Biomed. Anal.*; **28** (5); 875-885; 2002.
- 22) ROMANI A.; PINELLI P.; GALARDI C.; MULINACCI N.; TATTINI M.; "Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus L*”; *Phytochem. Anal.*; **13** (2); 79-86; 2002.
- 23) LACROIX P. M.; DAWSON B. A.; SEARS R. W.; BLACK B.; “HPLC and NMR methods for the quantitation of the (R)-enantiomer in (-)-(S)-timolol maleate drug raw materials”; *Chirality*; **6**; 484-491; 1994.
- 24) VAN-BEEK T. A.; VELDHUIZEN A. V.; LELYVELD G. P.; PIRON I.; LANKHORST P. P.; “Quantitation of bilobalide and ginkgolides A, B, C and J by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy”; *Phytochem. Anal.*; **4**; 261-268; 1993.
- 25) HAW J. F.; GLASS T. E.; DORN H. C.; “Conditions for quantitative flow FT- ^1H NMR measurements under repetitive pulse conditios”; *J. Magn. Reson.*; **49** (1); 22-31; 1982.
- 26) GODEJOHANN M.; PREISS A.; MUGGE C.; “Quantitative measurements in continuous-flow HPLC/NMR”; *Anal. Chem.*; **70** (3); 590-595; 1998.
- 27) GODEJOHANN M.; PREISS A.; MUGGE C.; WUNSCH G.; “Application of on-line HPLC- ^1H NMR to environmental samples: analysis of groundwater near former ammunition plants”; *Anal. Chem.*; **69** (18); 3832-3837; 1997.
- 28) GRIFFITHS L.; IRVING A. M.; “Assay by nuclear magnetic resonance spectroscopy: quantification limits”; *Analyst*; **123**; 1061-1068; 1998.
- 29) WELLS R.; SAED Al-Deen T.; HOOK J. M.; HIBBER D. B.; “Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (QNMR) spectroscopy for assessing the purity of technical grade agrochemicals: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and sodium 2,2-dichloropropionate (Dalapon Sodium)”; *J. Agric. Food Chem.*; **50** (12); 3366-3374; 2002.
- 30) PAULI G. F.; “qNMR: a versatile concept for the validation of natural product reference compounds”; *Phytochemical Anal.*; **12**; 28-42; 2001.
- 31) ABNT NBR ISO/IEC 17025; “Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração”; *Associação Brasileira de Normas Técnicas*; Segunda edição; 2005.

- 32) GUM; "Guia para a Expressão da Incerteza de Medição"; INMETRO, *Associação Brasileira de Normas Técnicas*, Terceira Edição Brasileira, 2003.
- 33) MOONEY J. R.; "Quantitative applications of ^{13}C NMR. In analytical NMR"; *John Wiley: Chichester*; 41-61; 1989.
- 34) EURACHEM Working Group; "A laboratory guide to method validation and related topics, the fitness for purpose of analytical methods"; First English Edition; 1998.
- 35) MOBERG L.; KARLBERG B.; "Validation of a multivariate calibration method for the determination of chlorophyll *a*, *b* and *c* and their corresponding pheopigments"; *Anal. Chim. Acta*; **450** (1-2); 143-153; 2001.
- 36) OCHIAI H.; MORI H.; MURATA H.; SEKI T.; ARAKI K.; KAWABE Y.; MIYAZAKI K.; TSUKAMOTO K.; IWAMURA S.; "Validation of an analytical method for a potent antitumor agent, TZT-1027, in plasma using liquid chromatography–mass spectrometry"; *J. of Chrom. B: Biomed. Scienc. and App.*; **762** (2), 155-163, 2001.
- 37) CHRISTENSEN H. B.; GRANBY K.; "Method validation for strobilurin fungicides in cereals and fruit"; *Food Addit. Contam. Part A*; **18** (10); 866-874; 2001.
- 38) SMEYERS-VERBEKE J.; "Operational definitions of uncertainty"; *Trends Anal. Chem.*; **20** (8); 394-406; 2001.
- 39) HOLCOMBE M.; "Book reviews: Principles and practices of method validation"; *Chromatographia*; **53** (7/8); 457-458; 2001.
- 40) ANYZEWSKA M.; WOJTASIK E.; ARENT I.; "The development and validation of the HPLC method for morphine content determination in poppy straw"; *Acta Pol. Pharm.*; **58** (2); 121-126; 2001.
- 41) WEBSTER G. K.; LI H.; SANDERS W. J.; BASEL C. L.; HUANG G.; "Column robustness case study for a liquid chromatographic method validated in compliance with ICH, VICH, and GMP guidelines"; *J. of Chromatographic Science*; **39** (7); 273-279; 2001.
- 42) WIELINSKI S.; OLSZANOWSKI A.; "Development and validation of HPLC method for simultaneous determination of fat-soluble vitamins in capsules"; *J. Liquid Chrom. & Rel. Tech.*; **24** (2), 201-213, 2001.
- 43) WOITKE P.; KRESSNER R.; LEPOM P.; "Determination of hydrocarbons in water – interlaboratory method validation before routine monitoring"; *Accred. and Quality Assur.*; **6** (4-5); 173-177; 2001.

- 44) LEE K. R.; BONGERS J.; GULATI D.; BURMAN S.; "Statistical validation of reproducibility of HPLC peptide mapping for the identity of an investigational drug compound based on Principal Component Analysis"; *Drug Development and Industrial Pharmacy*; **26** (10); 1045-1057; 2000.
- 45) QUEVAUVILLER P.; "Preface"; *Trends Anal. Chem.*; **19** (2+3); 67-68; 2000.
- 46) VAN ZONEN P.; HOOGERBRUGGE R.; GORT S. M.; VAN DE WIEL H. J.; VAN'T KLOOSTER H. A.; "Some practical examples of method validation in the analytical laboratory"; *Trends Anal. Chem.*; **18** (9+10); 584-593; 1999.
- 47) FEINBERG M.; RAUGUÈNÈS N.; "Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories"; *Anal. Chim. Acta*; **391** (2); 239-252; 1999.
- 48) McDOWALL R. D.; "The role of laboratory information management systems (LIMS) in analytical method validation"; *Anal. Chim. Acta*; **391** (2); 149-158; 1999.
- 49) KRULL I.; SWARTZ M.; "Quantitation in method validation"; *LC-GC*; **16** (12); 1084-1090; 1998.
- 50) FEINBERG M. H.; "Data processing and software requirement for analytical method validation"; *J. AOAC Int.*; **81** (5); 1065-1076; 1998.
- 51) CIURCZAK E. W.; "Validation of spectroscopic methods in pharmaceutical analyses"; *Pharm. Technol.*; **22** (3); 93; 1998.
- 52) ZWANZIGER H. W.; SÂRBU C.; "Validation of Analytical Methods Using a Regression Procedure"; *Anal. Chem.*; **70** (7); 1277-1280; 1998.
- 53) JENKE D. R.; "Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. Part II. Guidelines for primary validation parameters"; *Instrum. Sci. Technol.*; **26** (1); 19-35; 1998.
- 54) BOENKE A.; "Method validation for mycotoxin determinations in food and feedstuffs"; *Trends Anal. Chem.*; **17** (1); 10-17; 1998.
- 55) JENKE D. R.; "Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. III. Ruggedness, re-validation and system suitability"; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*; **19** (12); 1873-1891; 1996.
- 56) RICHARDSON J. M.; MORRISON J. L.; "Perspective. Method validation in the Ontario Geoscience Laboratories"; *Analyst*; **120** (5); 1519-1526; 1995.
- 57) RYMEN T.; "Method validation for the determination of dioxins"; *Tech. Instrum. Anal. Chem.*; **17**; 591-639; 1995.

- 58) PETERSEN H. W.; CHRISTENSEN F.; VAD M.; "Method validation in relation to accuracy and precision for the gas chromatography–mass spectrometric analysis of 19-nortestosterone in urine with heptafluorobutyric anhydride and *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide"; *Analyst*; **119** (12); 2627-2630; 1994.
- 59) EBEL S.; "Validation of analysis methods"; *Fresenius' J. Anal. Chem.*; **342** (10); 769-78; 1992.
- 60) LANG J. R.; BOLTON S.; "A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry — 1. Experimental considerations"; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; **9** (5); 357-361; 1991.
- 61) EDWARDSON P. A. D.; BHASKAR G.; FAIRBROTHER J. E.; "Method validation in pharmaceutical analysis"; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; **8** (8-12); 929-933; 1990.
- 62) MARTIN-SMITH M.; RUDD D. R.; "The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality control of pharmaceuticals"; *Acta Pharm. Jugosl.*; **40** (1-2), 7-19, 1990.
- 63) TAYLOR J. K.; "Validation of analytical methods"; *Anal. Chem.*; **55** (6); 600A-608A; 1983.
- 64) GREEN J. M.; "Peer reviewed: a practical guide to analytical method validation"; *Anal. Chem.*; **68** (9); 305A-309A; 1996.
- 65) BRUCE P.; MINKKINEN P.; RIEKKOLA M. -L.; "Practical method validation: validation sufficient for an analysis method"; *Mikrochimica Acta*; **128** (1-2); 93-106; 1998.
- 66) FAJGELJ A.; AMBRUS A. A.; "Principles and practices of method validation"; *J. Am. Chem. Soc.*; **123** (6); 1266; 2001.
- 67) WELLS R. J.; "Validation requirements for chemical methods in quantitative analysis – horses for courses?"; *Accredit. Qual. Assur.*; **3** (5); 189-193; 1998.
- 68) CARDONE J. M.; LACY S. A.; MARK E.; "Method validation revisited: a chemometric approach"; *Pharm. Res.*; **7** (2); 154-160; 1990.
- 69) SHARMA R.; GUPTA P. K.; MAZUMDER A.; DUBEY D. K.; GANESAN K.; VIJAYARAGHAVAN R.; "A quantitative NMR protocol for the simultaneous analysis of atropine and obidoxime in parenteral injection devices"; *J. Pharm. Biom. Anal.*; **49** (4); 1092-1096; 2009.
- 70) BIPM; IEC; IFCC; ISSO; IUPAC; IUPAP; OIML; "Guia para a expressão da incerteza de medição (GUM)"; *Associação Brasileira de Normas Técnica e*

- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (ABNT e INMETRO)*, Terceira edição brasileira, 2003.
- 71) MALZ, F.; JANCKE, H.; "Validation of quantitative NMR"; *J. Pharm. Biom. Anal.*; **38**; 813-823; 2005.
- 72) GUIA EURACHEM/CITAC; "Determinando a incerteza na medição analítica"; *Sociedade Brasileira de Metrologia*; Primeira Edição Brasileira; 2002.
- 73) Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia – VIM; *Portaria INMETRO 029*; 1995.
- 74) CHRISTENSEN J. M.; "Correcting measurement errors using reference materials in method validation"; *Mikrochim. Acta*; **123** (1-4); 231-240; 1996.
- 75) HILST C. V.; MÜLLER A.; BJÖRKLUND E.; ANKLAM E.; "In-house validation of a simplified method for the determination of PCBs in food and feedingstuffs"; *Eur. food Res. Tech.*; **213** (2), 154-160, 2001.
- 76) ISO 78-2; "Layouts for standards - part 2: Standard for chemical analysis"; 1982.
- 77) KESSEL W.; "ISSO/BIPM Guide: Uncertainty in measurement"; Geneva; 1993.
- 78) International vocabulary of basic and general terms in metrology (VIM); ICS 01.040.17; 17.020; 1993.
- 79) NOACK S.; "New tools: Expert systems for uncertainty budgets"; *Accred. Qual. Assur.*; **3** (11); 436-443; 1998.
- 80) LAMBERTY A.; SAVORY J.; MOODY J. R.; DE BIÈVRE P.; ROSMAN K. J. R.; GRAMLICH J. W.; "The IRMM International Measurement Evaluation Programme (IMEP) IMEP-4: trace elements (Li, Cu, Zn) in serum"; *Accred. Qual. Assur.*; **3** (11); 447-458; 1998.
- 81) WILLIAMS A.; "Measurement uncertainty in analytical chemistry"; *Accred. Qual. Assur.*; **1** (1); 14-17; 1996.
- 82) MAROTO A.; BOQUÉ R.; RIU J.; RIUS F. X.; "Estimation of measurement uncertainty by using regression techniques and spiked samples"; *Anal. Chim. Acta*; **446** (1-2); 131-143; 2001.
- 83) MAROTO A.; BOQUÉ R.; RIU J.; RIUS F. X.; "Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays"; *Anal. Chim. Acta*; **440** (2); 171-184; 2001.

-
- 84) BARWICK V. J.; ELLISON S. L. R.; "Measurement uncertainty: approaches to the evaluation of uncertainties associated with recovery"; *Analyst*, **124** (7); 981-990; 1999.
- 85) BARWICK V.J.; ELLISON S. L. R.; "The evaluation of measurement uncertainty from method validation studies. Part 1: description of a laboratory protocol"; *Accred. Qual. Assur.*; **5** (2); 47-53; 2000.
- 86) BARWICK V. J.; ELLISON S. L. R.; FAIRMAN B.; "Estimation of uncertainties in ICP-MS analysis: a practical methodology"; *Anal. Chim. Acta*; **394** (2-3); 281-291; 1999.
- 87) KESSEL W.; "Measurement uncertainty according to ISO/BIPM-GUM"; *Thermochimica Acta*; **382** (1-2); 1-16; 2002.
- 88) CORDEIRO F.; BORDIN G.; RODRIGUEZ A. R.; HART J. P.; "Uncertainty estimation on the quantification of major milk proteins by liquid chromatography"; *Analyst*, **126** (12); 2178-2185; 2001.
- 89) COWLES J. R.; DAILY S.; ELLISON S. L. R.; HARDCASTLE W. A.; WILLIAMS C.; "Experimental sensitivity analysis applied to sample preparation uncertainties: are ruggedness tests enough for measurement uncertainty estimates?"; *Accred. Qual. Assur.*; **6** (8); 368-371; 2001.
- 90) WOLFF BRICHE C. S. J.; HARRINGTON C.; CATTERICK T.; FAIRMAN B.; "Orthodox uncertainty budgeting for high accuracy measurements by isotope dilution inductively coupled plasma-mass spectrometry"; *Anal. Chim. Acta*; **437** (1); 1-10; 2001.
- 91) NEUGEBAUER M.; "Uncertainty analysis for roundness measurements by the example of measurements on a glass hemisphere"; *Meas. Sci. Technol.*; **12** (1); 68-76; 2001.
- 92) SJÖLAND K. A.; MUNNIK F.; WÄTJEN U.; "Uncertainty budget for ion beam analysis"; *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B*; **161-163**; 275-280; 2000.
- 93) BRIX R.; HANSEN S. H.; BARWICK V.; TJORNELUND J.; "Method optimisation with the use of uncertainty budgets"; *Analyst*; **127** (1); 140-143; 2002.
- 94) HÄSSELBARTH W.; "Uncertainty – The key topic of metrology in chemistry"; *Accred. Qual. Assur.*; **3** (3); 115-116; 1998.
- 95) DE BIÈEVRE P.; "Do interlaboratory comparisons provide traceability?"; *Accred. Qual. Assur.*; **4** (8); 342-346; 1999.

- 96) KING B.; "Meeting the measurement uncertainty and traceability requirements of ISO/IEC standard 17025 in chemical analysis"; *Fresenius' J. Anal. Chem.*; **371** (6); 714-720; 2001.
- 97) WILLIAMS A.; "Traceability and uncertainty – A comparison of their application in chemical and physical measurement"; *Accred. Qual. Assur.*; **6** (2); 73-75; 2001.
- 98) PAPADAKIS I.; WEGSCHEIDER W.; "CITAC Position Paper: Traceability in chemical measurement"; *Accred. Qual. Assur.*; **5** (9); 388-389; 2000.
- 99) DE BIÈVRE P.; TAYLOR P. D. P.; "Traceability to the SI of amount-of-substance measurements: from ignoring to realizing, a chemist's view"; *Metrologia*; **34** (1); 67-75; 1997.
- 100) GARAJ J.; "The status of traceability in chemical measurements – A EURACHEM Workshop"; *Accred. Qual. Assur.*; **5** (8); 349-351; 2000.
- 101) ISO 9004-4; Total Quality Management Part 2; Geneva; 1993.
- 102) ELLISON S. L. R.; "Using validation data for ISO measurement uncertainty estimation part 1. Principles of an approach using cause and effect analysis"; *Analyst*; **123** (6); 1387-1392, 1998.
- 103) BOFFO, E. F.; TAVARES, L. A.; FERREIRA, M. M. C.; **FERREIRA, A. G.**; "Classification of Brazilian vinegars according to their ^1H NMR spectra by pattern recognition analysis"; *LWT-Food Sci. Techn.*; **42** (9); 1455-1460; 2009.
- 104) DAOLIO, C.; BELTRAME, F. L.; FERREIRA, A. G.; CASS, Q. B.; CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, M. M. C.; "Classification of commercial catuaba samples by NMR, HPLC and chemometrics"; *Phytochem. Anal.*; **19** (3); 218-228; 2008.
- 105) BOFFO, E. F.; FERREIRA, M. M. C.; **FERREIRA, A. G.**; "SNIF-NMR and chemometric methods applied to ^1H NMR in the study of Brazilian brandy authenticity. In: Magnetic Resonance in Food Science: Challenges in a changing world"; Cambridge: *The Royal Soc. Chem.*; 143-150; 2009.
- 106) BRERETON R. G.; "Chemometrics Data Analysis from the Laboratory and Chemical Plant"; *John Wiley & Sons.*; Chichester; 2002.
- 107) BEEBE K. R.; PELL R. J.; SEASHOLTZ M. B.; "Chemometrics: a practical guide"; New York, *John Wiley & Sons. Inc.*; 1998.
- 108) ARAÚJO M. C. U.; SALDANHA T. C. B.; GALVÃO R. K. H.; YONEYAMA T.; CHARME H. C.; VISANI V.; "The successive projections algorithm for variable

- selection in spectroscopic multicomponent analysis"; *Chemom. Intel. Lab. Sys.*; **57** (2); 65-73; 2001.
- 109) DANTAS FILHO H. A.; SOUZA E. S. O. N.; VISANI V.; BARROS S. R. R. C.; SALDANHA T. C. B.; ARAÚJO M. C. U.; GALVÃO R. K. H.; "Simultaneous spectrometric determination of Cu^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} in polivitaminic/polimineral drug using SPA and GA algorithms for variable selection"; *J. Braz. Chem. Soc.*; **16** (1); 58-61; 2005.
- 110) DANTAS FILHO H. A.; GALVÃO R. K. H.; ARAÚJO M. C. U.; SILVA E. C.; SALDANHA T. C. B.; JOSÉ G. E.; PASQUINI G. E.; RAIMUNDO J. R.; ROHWEDDER J. J. R.; "A strategy for selecting calibration samples for multivariate modeling"; *Chemom. Intel. Lab. Sys.*; **72** (1); 83-91; 2004.
- 111) HONORATO F. A.; GALVÃO R. K. H.; PIMENTEL M. F.; BARROS NETO B.; ARAÚJO M. C. U.; CARVALHO F. R.; "Robust modeling for multivariate calibration transfer by the successive projections algorithm"; *Chemom. Intel. Lab. Sys.*; **76** (1); 65-72; 2005.
- 112) BREITKREITZ M. C.; RAIMUNDO J. R.; ROHWEDDER J. J. R.; PASQUINI C.; DANTAS FILHO H. A.; JOSÉ G. E.; ARAÚJO M. C. U.; "Determination of total sulfur in diesel fuel employing NIR spectroscopy and multivariate calibration"; *Analyst*; **128** (9); 1204-1207; 2003.
- 113) MASSART D. L.; VANDEGINSTE B. G. M.; BUYDENS S. J.; LEWI P. J.; SMEYERS-VERBEKE; "Journal Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Parte B"; Amsterdam: Elsevier; 1997.
- 114) NAES T.; MEVIK B. H.; "Understanding the collinearity problem in regression and discriminant analysis"; *J. Chemom.*; **15** (4); 413-426; 2001.
- 115) FISHER, R. A.; "The use of multiple measurements in taxonomic problems"; *Annal. Hum. Genet.*; **7** (2); 179-188; 1936.
- 116) GAMBARRA NETO F. F.; MARINO G.; ARAÚJO M. C. U.; GALVÃO R. K. H.; PONTES M. J. C.; MEDEIROS, E. P.; LIMA, R. S.; "Classification of edible vegetable oils using square wave voltammetry with multivariate data analysis"; *Talanta*; **75** (5); 1660-1666; 2009.
- 117) SOLA-LARRAÑAGA, C.; NAVARRO-BLASCO, I.; "Chemometric analysis of minerals and trace elements in rawcow milk from the community of Navarra, Spain"; *Food Chemistry*, **112** (1); 189-196; 2009.

- 118) CÂMARA J. S.; ALVES M. A.; MARQUES J. C.; "Classification of Boal, Malvazia, Sercial and Verdelho wines base don terpenoid patterns"; *Food Chemistry*; **101** (2); 475-484; 2007.
- 119) SANDERCOCK P. M. L.; PASQUIER E. D.; "Chemical fingerprinting of unevaporated automotive gasoline samples"; *Forensic Sci. Intern.*; **134** (1); 1-10; 2003.
- 120) GAMBARRA NETO, F. F.; "Classificação de óleos vegetais utilizando voltametria de onda quadrada de métodos quimiométricos"; Dissertação de Mestrado em Química Analítica; Departamento de Química; Universidade Federal da Paraíba; 2008.
- 121) MALLETT Y.; COOMANS D.; DE VEL O.; "Recent developments in discriminant analysis on high dimensional spectra data"; *Chemom. Intel. Lab. Sys.*; **35** (2); 157-173; 1996.
- 122) PARTRIDGE M.; CALVO R. A.; "Fast dimensionality reduction and simple PCA"; *Intel. Data Anal.*; **2**; 203; 1998.
- 123) INDAHL, U. G.; SAHNI, N. S.; KIRKHUS, B.; NAES, T.; "Multivariate strategies for classification based on NIR-spectra with application to mayonnaise"; *Chemom. Intel. Lab. Sys.*; **49** (1); 19-31; 1999.
- 124) YAN, J.; ZHANG, B.; YAN, S.; LIU, N.; YANG, Q.; CHENG, Q.; LI, H.; CHEN, Z.; MA, W-Y.; "A scalable supervised algorithm for dimensionality reduction on streaming data"; *Information Sciences*; **176** (14); 2042-2065; 2006.
- 125) QUNXIONG, Z. H. U.; CHENGFEI, L. I.; "Dimensionality reduction with input training neural network and its application in chemical process modeling Chinese"; *J. Chem. Engin.*; **14**; 597; 2006.
- 126) DU, C.; LINKER, R.; SHAVIV, A.; "Identification of agricultural Mediterranean soils using mid-infrared photo acoustic spectroscopy"; *Geoderma*; **143** (1-2); 85-90; 2008.
- 127) TAN, C.; LI, M.; QIN, X.; "Study of the feasibility of distinguishing cigarettes of different brands using an Adaboost algorithm and near-infrared spectroscopy"; *Anal. Bioanal. Chem.*; **389** (2); 667-674, 2007.
- 128) GALVÃO, R. K. H.; ARAÚJO, M. C. U.; "Linear regression modelling: variable selection"; *Comprehensive chemometrics*; **3**; 233-283; 2009.
- 129) GALVÃO, R. K. H.; ARAÚJO, M. C. U.; SILVA, E. C.; JOSÉ, G. E.; SOARES, S.F. C.; PAIVA, H. M.; "Cross-validation for the selection of spectral variables

- using the successive projections algorithm"; *J. Braz. Chem. Soc.*; **18** (8); 1580-1584; 2007.
- 130) PONTES, M. J. C.; GALVÃO, R. K. H.; ARAÚJO, M. C. U.; MOREIRA, P. N. T.; PESSOA NETO, O. D.; JOSÉ, G. E.; SALDANHA, T. C. B.; "The successive projections algorithm for spectral variable selection in classification problems"; *Chemom. Intel. Lab. Sys.*; **78** (1-2); 11-18; 2005.
- 131) GALVÃO, R. K. H.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U.; YONEYAMA, T.; VISANI, V.; "Aspects of the successive projections algorithm for variable selection in multivariate calibration applied to plasma emission spectrometry"; *Anal. Chim. Acta*; **443** (1); 107-115; 2001.
- 132) AGARWAL, A.K.; "Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines"; *Prog. Energ. Combust.*; **33** (3); 233-271; 2007.
- 133) TAN, M. E.; VAN GERPEN, J. H.; "The kinematic viscosity of biodiesel and its blends with diesel fuel"; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **76** (12); 1511-1513; 1999.
- 134) ENCINAR, J.M.; GONZÁLEZ, J.F.; REINARES, A.R.; "Ethanolysis of used frying oil. Biodiesel preparation and characterization"; *Fuel Process. Technol.*; **88** (5); 513-522; 2007.
- 135) DANTAS, M.B.; ALMEIDA, A.A.F.; CONCEIÇÃO, M.M.; FERNANDES JR., V.J.; SANTOS, I.M.G.; SILVA, F.C.; SOLEDADE, L.E.B.; SOUZA, A.G.; "Characterization and kinetic compensation effect of corn biodiesel"; *J. Therm. Anal. Cal.*; **87** (3); 847-851; 2007.
- 136) Biodiesel: barreiras, potenciais e impactos,
http://www.esru.strath.ac.uk/EandE/Web_sites/06-07/Biodiesel/biodieselp.htm,
acesso em 08/02/2012.
- 137) KNOTHE, G.; "Analytical methods used in the production and fuel quality assessment of biodiesel"; *Trans. ASAE*; **44**; 193-200; 2001.
- 138) MA, F.; HANNA, M. A.; "Biodiesel production: a review"; *Bioresource Technol.*; **70** (1); 1-15; 1999.
- 139) PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PEREIRA, P. A. P.; DE ANDRADE, J. B.; "Biodiesel:an overview"; *J. Braz. Chem. Soc.*; **16** (6B); 1313-1330; 2005.
- 140) MEHER, L.C.; SAGAR, D.V.; NAIK, S.N.; "Technical aspects of biodiesel production by transesterification — a review"; *Renew. Sustain. Energy Rev.*; **10** (3); 248-268; 2006.

- 141) KNOTHE, G.; "Analyzing biodiesel: standards and other methods"; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **83** (10); 823-833; 2006.
- 142) MITTELBAACH, M.; "Diesel fuel derived from vegetable oils, VI: Specifications and quality control of biodiesel"; *Bioresour. Technol.*; **56** (1); 7-11; 1996.
- 143) FREEDMAN, B.; PRYDE, E.H.; KWOLEK, W.F.; "Thin layer chromatography/flame ionization analysis of transesterified vegetable oils"; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **61** (7); 1215-1220; 1984.
- 144) CVENGROS, J.; CVENGROSOVA, Z.; HOKA, C.; "Conversion of acyl glycerols to methyl esters by Tlc method"; *Petrol. Coal*; **44** (1-2); 67-71; 2002.
- 145) FREEDMAN, B.; KWOLEK, W.F.; PRYDE, E.H.; "Quantitation in the analysis of transesterified soybean oil by capillary gas chromatography 1"; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **63** (10); 1370-1375; 1986.
- 146) CVENGROS, J.; CVENGROSOVA, Z.; "Quality control of rapeseed oil methyl esters by determination of acyl conversion"; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **71** (12); 1349-1352; 1994.
- 147) CVENGROSOVA, Z.; CVENGROS, J.; HRONEC, M.; "Determination of acyl conversion in vegetable oil ethyl esters"; *Petrol. Coal*; **40** (2); 97-99; 1998.
- 148) TRATHNIGG B.; MITTELBAACH, M.; "Analysis of triglyceride methanolysis mixtures using isocratic HPLC with density detection"; *J. Liq. Chromatogr.*; **13** (1); 95-105; 1990.
- 149) HOLCAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER, J.; PROKES, B.; "Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods"; *J. Chromatogr. A*; **858** (1); 13-31; 1999.
- 150) GELBARD, G.; BRES, O.; VARGAS, R.M.; VIELFAURE, F.; SCHUCHARDT, U.F.; "¹H nuclear magnetic resonance determination of the yield of the transesterification of rapeseed oil with methanol"; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **72** (10); 1239-1041; 1995.
- 151) COSTA NETO, P.R.; CARO, M.S.B.; MAZZUCO, L.M.; NASCIMENTO, M.G.; "Quantification of soybean oil ethanolysis with ¹H NMR"; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **81** (12); 1111-1114; 2004.
- 152) MORGENSTERN, M.; CLINE, J.; MEYER, S.; CATALDO, S.; "Determination of the kinetics of biodiesel production using proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (¹H NMR)"; *Energy Fuels*; **20** (4); 1350-1353; 2006.

- 153) KNOTHE, G.; "Rapid monitoring of transesterification and assessing biodiesel fuel quality by near-infrared spectroscopy using a fiber-optic probe; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **76** (7); 795-800; 1999.
- 154) KNOTHE, G.; "Monitoring a progressing transesterification reaction by fiber-optic near infrared spectroscopy with correlation to ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy"; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **77** (5); 489-493; 2000.
- 155) ZAGONEL, G.F.; PERALTA-ZAMORA, P.; RAMOS, L.P.; "Multivariate monitoring of soybean oil ethanolysis by FTIR"; *Talanta*; **63** (4); 1021-1025; 2004.
- 156) SIATIS, N.G.; KIMBARIS, A.C.; PAPPAS, C.S.; TARANTILIS, P.A.; POLISSIOU, M.G.; "Improvement of biodiesel production based on the application of ultrasound: monitoring of the procedure by FTIR spectroscopy"; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **83** (1); 53-57; 2006.
- 157) GHESTI, G.F.; DE MACEDO, J.L.; BRAGA, V.S.; DE SOUZA, A.T.C.P.; PARENTE, V.C.I.; FIGUEREDO, E.S.; RESCK, I.S.; DIAS, J.A.; DIAS, S.C.L.; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **83**, 597, 2006.
- 158) MARIANI, C.; BONDIOLI, P.; VENTURINI, S.; FEDELI, E.; "Sulla formazione di acidi grassi trans nel processo di raffinazione dell'olio di oliva lampante"; *Riv. Ital. Sostanze Grasse*; **68**; 455-559; 1991.
- 159) WAWRZYNIAK, R.; WASIAK, W.; FRACKOWIAK, M.; "Determination of methyl esters in diesel oils by Gas Chromatography - validation of the method"; *Chem. Pap.*; **59** (6B); 449-452; 2005.
- 160) SCHOBBER, S.; SEIDL, I.; MITTELBAACH, M.; "Ester content evaluation in biodiesel from animal fats and lauric oils"; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*; **108** (4); 309-314; 2006.
- 161) BONDIOLI, P.; MARIANI, C.; LANZANI, A.; FEDELI, E.; VERONESE, S.; "Vegetable oil derivatives as diesel fuel substitutes. Analytical aspects. Note 3: determination of methanol"; *Riv. Ital. Sostanze Grasse*; **69**; 467-469; 1992.
- 162) PLANK C.; LORBEER, E.; "Quality control of vegetable oil methyl esters used as diesel fuel substitutes: quantitative determination of mono-, di-, and triglycerides by capillary GC"; *J. High Res. Chromatogr.*; **15** (9); 609-612; 1992.
- 163) MITTELBAACH, M.; "Diesel fuel derived from vegetable oils, V [1]: Gas chromatographic determination of free glycerol in transesterified vegetable oils"; *Chromatographia*; **37** (11-12); 623-626; 1993.

- 164) MITTELBACH, M.; ROTH, G.; BERGMANN, A.; "Simultaneous gas chromatographic determination of methanol and free glycerol in biodiesel"; *Chromatographia*; **42** (7-8); 431-434; 1996.
- 165) BONDIOLI, P.; DELLA BELLA, L.; "An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel"; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*; **107** (3); 153-157; 2005.
- 166) FILLIÈRES, R.; MLAYAH, B.B.; DELMAS, M.; "Ethanolysis of rapeseed oil: quantitation of ethyl esters, mono-, di-, and triglycerides and glycerol by high-performance size-exclusion chromatography"; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **72** (4); 427-432; 1995.
- 167) DARNOKO, D.; CHERYAN, M.; PERKINS, E.G.; "Analysis of vegetable oil transesterification products by gel permeation chromatography"; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*; **23** (15); 2327-2335; 2000.
- 168) FOGLIA, T.A.; JONES, K.C.; "Quantitation of neutral lipid mixtures using high performance liquid chromatography with light scattering detection"; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*; **20** (12); 1829-1838; 1997.
- 169) LOZANO, P.; CHIARAT, N.; GRAILLE, J.; PIOCH, D.; "Measurement of free glycerol in biofuels"; *Fresenius' J. Anal. Chem.*; **354** (3); 319-322; 1996.
- 170) HÁJEK, M.; SKOPAL, F.; MACHEK, J.; "Determination of free glycerol in biodiesel"; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*; **108** (8); 666-669; 2006.
- 171) FOGLIA, T.A.; JONES, K.C.; NUNEZ, A.; PHILLIPS, J.G.; MITTELBACH, M.; "Comparison of chromatographic methods for the determination of bound glycerol in biodiesel"; *Chromatographia*; **60** (5-6); 305-311; 2004.
- 172) LECHNER, M.; PLANK, C.; LORBEER, E.; "Determination of acylglycerols in vegetable oil methyl esters by on-line normal phase LC-GC"; *J. High Res. Chromatog.*; **20** (11); 581-585; 1997.
- 173) GONÇALVES FILHO, L. C.; MICKE, G. A.; "Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis"; *J. Chromatogr. A*; **1154** (1-2); 477-480; 2007.
- 174) FILIPPIS, P.; GIAVARINI, C.; SCARSELLA, M.; SORRENTINO, M.; "Transesterification processes for vegetable oils: a simple control method of methyl ester content"; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **72** (11); 1399-1404; 1995.
- 175) BAILER, J.; DE HUEBER, K.; "Determination of saponifiable glycerol in "Bio-Diesel""; *Fresenius' J. Anal. Chem.*; **340** (3); 186; 1991.

-
- 176) KNOTHE, G.; "Determining the blend level of mixtures of biodiesel with conventional diesel fuel by fiber-optic near-infrared spectroscopy and ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy"; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; **78** (10); 1025-1028; 2001.
- 177) BIROVA, A.; SVAJDLENKA, E.; CVENGROS, J.; DOSTALIKOVA, V.; "Determination of the mass fraction of methyl esters in mixed fuels"; *Eur. J. Lipid Sci Technol.*; **104** (5); 271-277; 2002.
- 178) OLIVEIRA, J. S.; MONTALVÃO, R.; DAHER, L.; SUAREZ, P. A. Z.; RUBIM, J. C.; "Determination of methyl ester contents in biodiesel blends by FTIR-ATR and FTNIR spectroscopies"; *Talanta*; **69** (5); 1278-1284; 2006.
- 179) PIMENTEL, M. F.; RIBEIRO, G. M. G. S.; DA CRUZ, R. S.; STRAGEVITCH, L.; PACHECO FELHO, J. G. A.; TEIXEIRA, L. S. G.; "Determination of biodiesel content when blended with mineral diesel fuel using infrared spectroscopy and multivariate calibration"; *Microchem. J.*; **82** (2); 201-206; 2006.
- 180) ALISKE, M. A.; ZAGONEL, G. F.; COSTA, B. J.; VEIGA, W.; SAUL, C. K.; "Measurement of biodiesel concentration in a diesel oil mixture"; *Fuel*; **86** (10-11); 1461-1464; 2007.
- 181) MALZ, F.; "Chapter 2: Quantitative NMR in the solution state"; *NMR Spec. Pharm. Anal.*; EBook; 43-62; 2008.
- 182) KENNARD, R. W.; STONE, L. A.; "Computer aided design of experiments"; *Technometrics*; **11** (1); 137-148; 1969.
- 183) CLARIDGE, T. D. W.; "High-resolution NMR techniques in organic chemistry"; *Elsevier*, Second Edition; Oxford; 2009.

ANEXO 1

Programa em C++ de calibração dos espectros da RMN de ^1H :

```
function [eixox,Matriz_cal]=calibrarNMRspectrum(O1P,SW,TD,Matriz,N);

%Este programa calibra os espectros de RMN com base no sinal do TMS.
%
%Dados de saída:
%eixox    --> Eixo da abcissa em ppm;
%Matriz_cal --> Matriz com os espectros calibrados;
%
%Dados de entrada:
%O1P      --> Valor de O1 em ppm;
%SW       --> Spectral width (ppm);
%Matriz   --> Matriz de espectros cujas variáveis estão nas linhas %          e
as amostras nas colunas (igual ao Origin).
%N        --> Número de amostras da Matriz de espectros.
%
%Autor: Francisco Fernandes Gambarra Neto
%Data: 02/03/2009

eixox=linspace(O1P+SW/2,O1P-SW/2,TD); %O número 65536 corresponde ao TD
de 64K.

eixox_signal=sign(eixox); %transforma os números negativos, zero e positivos em -
1, 0 e 1, respectivamente.

eixox_positivo=find(eixox_signal==1); %Encontra as posições dos números 1 na
matriz anterior.

eixox_zero=eixox_positivo(1,end); %Esta é a posição do número mais próximo de
zero. Esta posição será tomada como referência para a calibração dos espectros.

%load Matriz
TMS=Matriz;

TMS(eixox>0.25,:)=0; %Esta matriz é do mesmo tamanho da matriz de dados inicial,
só que ela contém apenas os picos do TMS.

TMS(eixox<-0.25,:)=0; %Ela foi usada para definir a posição real do pico de tms para
cada amostra

TMS_max=max(TMS); %Valores máximos dos picos de TMS.
```

```

for j=1:N %35 é o numero de amostras.
TMS_position(1,j)=find(TMS(:,j)==TMS_max(1,j)); %Encontrando a posição real do
pico de TMS para cada amostra.
end

```

```

offset=TMS_position-eixox_zero; %Este caso resolve apenas o meu problema de
calibração. Para situações em que os sinais
%estejam deslocados positiva ou e negativamente, pode ser melhor trabalhar com
%os valores absolutos do offset.
%offset =abs(offset);
m=size(Matriz,1);

```

```

for j=1:N;
if (offset(j)>0)
Matriz_cal(:,j)=[Matriz(offset(j)+1:m,j);Matriz(m-offset(j)+1:m,j)];
else
Matriz_cal(:,j)=[Matriz(1:-offset(j),j);Matriz(1:(m+offset(j)),j)];
end
end%Este loop faz com que a parte inicial dos sinais correspondentes ao offset com
relação ao zero seja transferida para o final do espectro. Isto faz com que os sinais
spectrais recuem para o início da matriz, corrigindo o erro de offset.

```

```

faixa_eixox=find(eixox>-0.25);
faixa_eixox2=find(eixox(1,faixa_eixox)<0.25);
sizedeste2=size(faixa_eixox2,2);
subplot(2,2,1:2),plot(eixox,Matriz_cal);
set(gca,'XDir','reverse');
title('Espectro calibrado')
xlabel('Deslocamento químico (ppm)')
subplot(2,2,3),plot(eixox(1,eixox_zero-
round(sizedeste2/2):eixox_zero+round(sizedeste2/2)),Matriz(eixox_zero-
round(sizedeste2/2):eixox_zero+round(sizedeste2/2),:))
set(gca,'XDir','reverse');
title('TMS descalibrado')
xlabel('Deslocamento químico (ppm)')
subplot(2,2,4),plot(eixox(1,eixox_zero-
round(sizedeste2/2):eixox_zero+round(sizedeste2/2)),Matriz_cal(eixox_zero-
round(sizedeste2/2):eixox_zero+round(sizedeste2/2),:))
set(gca,'XDir','reverse');
title('Tms calibrado')
xlabel('Deslocamento químico (ppm)')

```