

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Uso de Voltametria de Pulso Diferencial Combinada
com Quimiometria para Determinação Simultânea de
Antioxidantes em Amostras de Biodiesel**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lívia de Souza Schaumlöffel

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Uso de Voltametria de Pulso Diferencial Combinada
com Quimiometria para Determinação Simultânea de
Antioxidantes em Amostras de Biodiesel**

Lívia de Souza Schaumlöffel

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre em
Engenharia

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de
Processos

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Mariliz Gutterres Soares

Co-orientador:

Prof. Dr. Pedro Rafael Bolognese Fernandes

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação **Uso de Voltametria de Pulso Diferencial Combinada com Quimiometria para Determinação Simultânea de Antioxidantes em Amostras de Biodiesel**, elaborada por Livia de Souza Schaumlöffel, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Luiz Antonio Mazzini Fontoura – CIENTEC

Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão – IQ/UFRGS

Prof. Dr. Marcelo Farenzena – DEQUI/UFRGS

*À memória de meu pai.
“Se vi mais longe
foi por estar de pé sobre
ombros de gigantes.”*

Agradecimentos

Aos meus pais Naura e Romeu (in memoriam) pelo amor, carinho, exemplo, base moral, incentivo e suporte sem os quais não teria chegado até aqui. Um agradecimento especial às minhas tias Alvina e Maria da Graça por todo o suporte nos momentos de aperto.

Aos amigos de antes e aos que fiz ao longo desse trabalho pela constante parceria e pelos momentos de alegria e descontração.

À minha orientadora Prof^a Mariliz Gutterres e co-orientador Prof. Pedro Fernandes pela acolhida da minha proposta de trabalho, orientação ao longo do caminho, ensinamentos e confiança, fundamentais para realização deste trabalho.

À Prof^a Clarisse Piatnicki por sua imprescindível colaboração neste trabalho. Agradeço também pelo carinho e valiosos ensinamentos. Também às suas alunas Yara, Marcella e Andrea pelos divertidos papos no laboratório, conhecimentos compartilhados quanto à eletroquímica e boa vontade em ajudar. Sou muito grata a tudo que aprendi com vocês nesses anos de convívio!

Aos colegas do LACOURO pela calorosa acolhida e disposição para ajudar, sempre com dicas valiosas. Obrigada também pela torcida para que tudo desse certo!

Agradecimento especial ao também aluno do programa Jônathan Dambros pela sugestão e valorosa ajuda na implementação das árvores de decisão.

Ao CECOM e todos os seus funcionários, que apesar das dificuldades forneceram a estrutura necessária para realização deste trabalho.

À UFRGS e ao Departamento de Engenharia Química e seus professores pelos conhecimentos transmitidos e estrutura oferecida.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

O biodiesel vem se consolidando como combustível alternativo devido às suas vantagens e importância econômica. Conforme seu percentual no diesel comercial cresce, o monitoramento da qualidade se torna cada vez mais importante para uma comercialização segura. No entanto, a estabilidade oxidativa do biodiesel é inferior à do diesel fóssil, assim antioxidantes sintéticos, tais como BHA, BHT, PG e TBHQ, são adicionados para prevenir a degradação do mesmo, evitando danos ao sistema de combustão automotivo. Os métodos para avaliar a estabilidade oxidativa e a quantidade de antioxidantes são em geral demorados, requerem preparação amostral ou equipamentos de alto custo. Com o objetivo de contornar tais problemas, neste trabalho foi aplicada uma metodologia para análise direta de antioxidantes em amostras de biodiesel por meio de voltametria de pulso diferencial. Conjuntamente, foi estudada a viabilidade da associação dessa metodologia com técnicas quimiométricas para a determinação simultânea desses antioxidantes em misturas de antioxidantes em biodiesel. Para permitir uma análise direta, sem extração e pré-concentração dos analitos, o biodiesel foi diluído em meio etanólico. Medidas de voltametria de pulso diferencial para cada antioxidante individualmente mostraram relação linear entre as concentrações dos antioxidantes e a corrente de oxidação. Os limites de detecção individuais obtidos foram de 20,5 mg L⁻¹ para BHA, 32,4 mg L⁻¹ para BHT, 35,5 mg L⁻¹ para PG e 26,5 mg L⁻¹ para TBHQ. A modelagem quimiométrica foi aplicada por meio das ferramentas Mínimos Quadrados Clássico (CLS), Mínimos Quadrados Parciais (PLS), Redes Neurais Artificiais (ANN), Componentes Principais-Redes Neurais Artificiais (PC-ANN) e Árvore de Decisão-Redes Neurais Artificiais (DT-ANN). O modelo construído por PLS se mostrou melhor quando comparado à modelagem por CLS. O modelo construído por ANN's sem seleção de dados de entrada apresentou erros semelhantes ao PLS. Quando a redução da quantidade de dados de entrada foi aplicada em conjunto com ANN's através de Análise por Componentes Principais (PCA) e DT, a aplicação de PCA levou a aumento de 10,2% no erro de predição, enquanto que na seleção por DT os erros de predição foram reduzidos em 8,5%. A determinação simultânea dos quatro compostos pelo modelo DT-ANN apresentou precisão satisfatória, com recuperação de 98% para BHA, 97% para BHT, 103% para PG e 100% para TBHQ, o que indica que a técnica analítica e a modelagem quimiométrica são viáveis e promissoras para aplicação no controle de qualidade do biodiesel, bem como em análises de monitoramento nas plantas industriais.

Palavras-chave: biodiesel, antioxidantes, voltametria de pulso diferencial, PLS, ANN

Abstract

Biodiesel is becoming established as an alternative fuel because its advantages and economic importance. As the levels of biodiesel in commercial diesel grows, quality monitoring becomes increasingly important for safe marketing. However, the oxidative stability of biodiesel is smaller than that of fossil diesel and synthetic antioxidants such as BHA, BHT, PG and TBHQ are added to it in order to prevent its degradation, avoiding damage to the automotive combustion system. Methods for evaluating oxidative stability and the amount of antioxidants are usually time-consuming, require sample preparation or expensive equipment. In order to overcome such problems, in this work a methodology was applied for direct analysis of antioxidants in biodiesel samples by means of differential pulse voltammetry. The viability of associating this methodology with chemometric techniques was studied for the simultaneous determination of these antioxidants in biodiesel. To allow a direct analysis, without extraction and preconcentration of analytes, biodiesel was diluted in ethanolic medium. Differential pulse voltammetric measurements for each antioxidant individually showed a linear relationship between antioxidant concentrations and oxidation current. The individual detection limits were 20,5 mg L⁻¹ for BHA, 32,4 mg L⁻¹ for BHT, 35,5 mg L⁻¹ for PG and 26,5 mg L⁻¹ for TBHQ. The chemometric modeling was applied using the Classical Least Squares (CLS), Partial Least Squares (PLS), Artificial Neural Networks (ANN), Principal Component-Artificial Neural Networks (PC-ANN) and Decision Tree-Artificial Neural Networks (DT-ANN) techniques. The model constructed by PLS was better than that obtained with CLS. The model constructed by ANN's without input selection presented similar deviations in comparison to PLS. When amount of input data reduction was applied together with ANNs through Principal Component Analysis (PCA) and DT, the PCA application led to a 10.2% increase in prediction error, whereas in the selection by DT prediction errors were reduced by 8,5%. The simultaneous determination of the four compounds by the DT-ANN model presented satisfactory accuracy with 98% recovery for BHA, 97% for BHT, 103% for PG and 100% for TBHQ, indicating that the analytical technique and the chemometric modeling are feasible and promising for application in biodiesel quality control, as well as in monitoring analyzes in the industrial plants.

Keywords: biodiesel, antioxidants, differential pulse voltammetry, PLS, ANN

Sumário

Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
Abreviações	xvii
Introdução	1
1.1 Objetivos	2
Revisão Bibliográfica	5
2.1 Biodiesel	5
2.1.1 Antioxidantes e a Estabilidade Oxidativa do Biodiesel	7
2.1.2 Controle de Qualidade do Biodiesel	10
2.2 Métodos voltamétricos	11
2.2.1 Voltametria em ultramicroeletrodos (ume)	13
2.3 Quimiometria	13
2.3.1 Métodos Lineares de Calibração Multivariada	14
2.3.2 Redes Neurais Artificiais (ANN)	17
2.3.3 Análise por Componentes Principais (PCA)	18
2.3.4 Árvores de Decisão (DT)	18
2.3.5 Quimiometria Aplicada à Eletroquímica	20
2.4 Quantificação de Antioxidantes em Amostras de Biodiesel	22
2.4.1 Determinação de Antioxidantes por Voltametria	23
2.4.2 Uso da Quimiometria Aplicada à Eletroquímica na Determinação de Antioxidantes	24
Materiais e Métodos	27
3.1 Equipamentos e Reagentes	27
3.2 Planejamento Experimental	28
3.3 Procedimento Experimental	30
3.4 Tratamento dos Dados	30
3.5 Construção dos Modelos	31
3.5.1 Normalização	32
3.5.2 Redes Neurais Artificiais	32
3.6 Métricas de Qualidade dos Modelos	34
Resultados e Discussões	37
4.1. Curvas de Calibração e Limites de Detecção para os Componentes Individuais	37
4.2 Determinação Simultânea	41
4.2.1 Modelagem por CLS	42
4.2.2 Modelagem por PLS	43
4.2.3 Modelagem por Redes Neurais	46
4.3 Recuperação dos Analitos	55
Conclusões	57

5.1 Conclusões e Considerações Finais	57
5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros.....	58
Referências Bibliográficas.....	61

Lista de Figuras

Figura 1. Representação genérica da reação de transesterificação.....	6
Figura 2. Perfil nacional de matérias-primas consumidas para produção de biodiesel em maio/2017	6
Figura 3. Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos	8
Figura 4: Exemplo de potenciostato manual para medidas voltamétricas	11
Figura 5. Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial	12
Figura 6. Representação de uma Árvore de Decisão.....	19
Figura 7. Célula eletroquímica com a configuração dos eletrodos utilizada (1) eletrodo de trabalho (ume Pt) (2) eletrodo de referência (fio Pt) e (3) contra-eletrodo (fio Pt).....	28
Figura 8. Arquitetura de uma rede neuronal com uma camada de entrada, uma camada oculta e uma camada de saída.	33
Figura 9. Voltamogramas de pulso diferencial para BHA em ultramicroeletrodo de Pt, meio B100:etanol 1:1 (v/v), contendo 0,002 mol L ⁻¹ de N(Hex) ₄ ClO ₄ . Concentrações de BHA: (a) 19,6 mg L ⁻¹ , (b) 49,0 mg L ⁻¹ , (c) 72,4 mg L ⁻¹ , (d) 97,7 mg L ⁻¹ , (e) 146,2 mg L ⁻¹ , (f) 194,4 mg L ⁻¹ , (g) 280,7 mg L ⁻¹ e (h) 385,1 mg L ⁻¹ . Curva analítica correspondente.....	38
Figura 10. Voltamogramas de pulso diferencial para BHT em ultramicroeletrodo de Pt, meio B100:etanol 1:1 (v/v), contendo 0,002 mol L ⁻¹ de N(Hex) ₄ ClO ₄ . Concentrações de BHT: (a) 19,8 mg L ⁻¹ , (b) 73,1 mg L ⁻¹ , (c) 147,6 mg L ⁻¹ , (d) 196,3 mg L ⁻¹ , (e) 283,4 mg L ⁻¹ e (f) 388,8 mg L ⁻¹ . Curva analítica correspondente.	38
Figura 11. Voltamogramas de pulso diferencial para PG em ultramicroeletrodo de Pt, meio B100:etanol 1:1 (v/v), contendo 0,002 mol L ⁻¹ de N(Hex) ₄ ClO ₄ . Concentrações de PG: (a) 19,6 mg L ⁻¹ , (b) 49,0 mg L ⁻¹ , (c) 72,4 mg L ⁻¹ , (d) 97,7 mg L ⁻¹ , (e) 146,2 mg L ⁻¹ , (f) 194,4 mg L ⁻¹ , (g) 280,7 mg L ⁻¹ e (h) 385,1 mg L ⁻¹ . Curva analítica correspondente.....	39
Figura 12. Voltamogramas de pulso diferencial para TBHQ em ultramicroeletrodo de Pt, meio B100:etanol 1:1 (v/v), contendo 0,002 mol L ⁻¹ de N(Hex) ₄ ClO ₄ . Concentrações de TBHQ: (a) 29,0 mg L ⁻¹ , (b) 52,2 mg L ⁻¹ , (c) 77,2 mg L ⁻¹ , (d) 125,2 mg L ⁻¹ , (e) 173,0 mg L ⁻¹ , (f) 258,3 mg L ⁻¹ e (g) 361,6 mg L ⁻¹ . Curva analítica correspondente....	39
Figura 13. Reações de oxidação para TBHQ e BHA	40
Figura 14. Voltamograma de pulso diferencial para B100:etanol 1:1 (v/v), contendo 0,002 mol L ⁻¹ de N(Hex) ₄ ClO ₄	41

Figura 15. Voltamogramas de pulso diferencial para BHA (194,4 mg L ⁻¹), BHT (196,3 mg L ⁻¹), PG (194,4 mg L ⁻¹), TBHQ (192,8 mg L ⁻¹) e a soma algébrica destas. Varredura a 5 mV s ⁻¹ , 50 mV de amplitude e 50 ms de largura de pulso.	41
Figura 16. Concentrações nominais <i>versus</i> preditas (a) e concentrações nominais <i>versus</i> resíduos (b) para BHA, BHT, PG e TBHQ do modelo construído por CLS aplicado ao conjunto de validação.....	42
Figura 17. Concentrações nominais <i>versus</i> preditas (a) e concentrações nominais <i>versus</i> resíduos (b) para BHA, BHT, PG e TBHQ do modelo construído por PLS aplicado ao conjunto de validação.....	44
Figura 18. Soma do sinal individual dos quatro antioxidantes ponderados pela concentração (a) e mistura experimental (b), ambos com 194 mg L ⁻¹ de cada antioxidante. Varredura a 5 mV s ⁻¹ , 50 mV de amplitude e 50 ms de largura de pulso.	45
Figura 19. Voltamogramas de pulso diferencial para as amostras 4, 8, 13, 23 e 29 do planejamento experimental. Varredura a 5 mV s ⁻¹ , 50 mV de amplitude e 50 ms de largura de pulso.	46
Figura 20. RMSEP para os modelos construídos por CLS, PLS e ANN's.....	47
Figura 21. Concentrações nominais <i>versus</i> preditas (a) e concentrações nominais <i>versus</i> resíduos (b) para BHA, BHT, PG e TBHQ do modelo construído por ANN's aplicado ao conjunto de validação.....	48
Figura 22. RMSEP para os modelos com diferentes entradas	49
Figura 23. RMSEP e %REP para os modelos construídos com CLS, PLS, ANN e PC-ANN	51
Figura 24. Concentrações nominais <i>versus</i> preditas (a) e concentrações nominais <i>versus</i> resíduos (b) para BHA, BHT, PG e TBHQ do modelo construído por PC-ANN com 10 PC's aplicado ao conjunto de validação.	51
Figura 25. RMSEP total para os modelos construídos por ANN's com e sem seleção de variáveis por DT's.....	53
Figura 26. RMSEP para BHA, BHT, PG e TBHQ para os modelos construídos por ANN's com e sem seleção de variáveis por DT's	54
Figura 27. Concentrações nominais <i>versus</i> preditas (a) e concentrações nominais <i>versus</i> resíduos (b) para BHA, BHT, PG e TBHQ do modelo construído por ANN's com as médias (M) e seleção de variáveis de entrada por DT aplicado ao conjunto de validação.	54
Figura 28. Valores de recuperação obtidos para BHA, BHT, PG e TBHQ por cada modelo	55

Lista de Tabelas

Tabela 1. Erros relativos de predição para a determinação de misturas de antioxidantes por diferentes métodos quimiométricos.....	25
Tabela 2. Variáveis e níveis do planejamento experimental	28
Tabela 3. Planejamento experimental e concentrações de antioxidantes nas misturas em meio biodiesel:etanol 1:1 (v/v).....	29
Tabela 4. Concentrações de antioxidantes nas misturas para validação.....	30
Tabela 5. Parâmetros do modelo de calibração linear para cada antioxidante	40
Tabela 6. RMSE e %RE de calibração e de predição para a regressão por CLS	42
Tabela 7. Porcentagem da variância original em (C) explicada pelas variáveis latentes	43
Tabela 8. RMSE e %RE de calibração e predição para a regressão por PLS.....	44
Tabela 9. Número de neurônios utilizados na camada oculta para diferentes entradas (para cada voltamograma)	48
Tabela 10. Porcentagem da variância dos dados originais explicada pelos PCs.....	50
Tabela 11. Número de neurônios utilizados na camada oculta	50
Tabela 12. Número de variáveis de entrada da rede para cada antioxidante após seleção por DT's.....	52

Abreviações

%REC - Erro Relativo Percentual de Calibração (*Percentage Relative Error of Calibration*)

%REP - Erro Relativo Percentual de Predição (*Percentage Relative Error of Prediction*)

ANN - Rede Neuronal Artificial (*Artificial Neural Network*)

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

B100 - Biodiesel

BHA - Hidroxianisol butilado (*Butylated hydroxyanisole*)

BHT - Hidroxitolueno butilado (*Butylated hydroxytoluene*)

BX - Blendas de Óleo Diesel com X% de Biodiesel

CE - Contra-Eletrodo (*Counter Electrode*)

CECOM - Centro de Combustíveis, Biocombustíveis, Lubrificantes e Óleos

CLS - Mínimos Quadrados Clássico (*Classical Least Squares*)

DT - Árvore de Decisão (*Decision Tree*)

EN - Normas Europeias mantidas pelo *Comité Européen de Normalization*

GA - Algoritmo Genético (*Genetic Algorithm*)

GC - Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

GPES - *General Purpose Electrochemical System*

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance (*High-Performance Liquid Chromatography*)

N(Hex)₄ClO₄ - Perclorato de tetrahexilamônio

PC - Componente Principal (*Principal Component*)

PCA - Análise por Componentes Principais (*Principal Component Analysis*)

PCR - Regressão por Componentes Principais (*Principal Component Regression*)

PG - Galato de Propila (*Propyl Gallate*)

PLS - Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares*)

RE - Eletrodo de Referência (*Reference Electrode*)

RMSEC - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Calibração (*Root-Mean Square Error of Calibration*)

RMSEP - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Predição (*Root-Mean Square Error of Prediction*)

TBHQ - *Tert*-butilhidroquinona (*Tert-butylhydroquinone*)

ume - ultramicroeletrodo

VC - Voltametria Cíclica

VL - Voltametria Linear

VOQ - Voltametria de Onda Quadrada

VPD - Voltametria de Pulso Diferencial

WE - Eletrodo de Trabalho (*Working Electrode*)

Capítulo 1

Introdução

É crescente a demanda por alternativas energéticas renováveis tendo em vista diminuir a dependência dos combustíveis de origem fóssil, bem como reduzir impactos ambientais. Assim, o biodiesel foi introduzido na matriz energética nacional em 2005 pela Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005. Aproximadamente 70% do biodiesel nacional é obtido através da transesterificação do óleo de soja, principal matéria-prima utilizada. No entanto, matérias-primas como gordura animal, palma, girassol, mamona, algodão, entre outras, também são usadas na sua produção (ANP, 2017).

A principal vantagem do biodiesel consiste na diminuição das emissões veiculares em comparação ao diesel derivado do petróleo. Além disso, a mistura de biodiesel com diesel confere a este combustível propriedades lubrificantes, compatibilizando seu uso para melhorar a lubricidade do diesel mineral dessulfurizado (S10).

Desta maneira, este combustível ganhou espaço no mercado nacional através da melhora geral da qualidade do diesel comercial, gerando desenvolvimento social e econômico sustentáveis, reduzindo emissões atmosféricas e diminuindo a necessidade de importação de óleo diesel. Atualmente, está consolidado no Brasil. Em 2016, foram produzidos 3,8 bilhões de litros e desde março de 2017 todo diesel comercializado no território nacional conta com 8% de biodiesel, com perspectiva de aumento para 10% até 2019 (ANP, 2016).

Composto por ésteres de ácidos graxos, o biodiesel comparado aos combustíveis fósseis apresenta uma menor resistência à oxidação (KNOTHE, 2007), tornando necessária a adição de antioxidantes sintéticos, tais como, hidroxianisol butilado, (*butylated hydroxyanisole*, BHA), hidroxitolueno butilado (*butylated hydroxytoluene*, BHT), galato de

propila (*propyl gallate*, PG), *tert*-butilhidroquinona (*tert-butylhydroquinone*, TBHQ), para aumentar sua estabilidade oxidativa e, conseqüentemente, a vida útil.

O monitoramento da qualidade do biodiesel é fundamental para a comercialização segura, evitando que produtos da degradação do mesmo afetem o sistema de combustão automotivo. Os métodos padronizados usados para medir a estabilidade oxidativa do biodiesel demandam tempo de análise acima de 6 h (ANP, 2014). Por outro lado, aqueles que analisam a quantidade de antioxidantes, em geral, requerem pelo menos uma etapa de tratamento da amostra ou extração, procedimentos estes que podem causar perda de amostra ou contaminação. Desta forma, surge a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos que forneçam uma resposta mais rápida e segura, permitindo alterações sem precisar esperar o resultado do teste padronizado.

Nesse sentido, os métodos eletroquímicos são promissores, pois apresentam rápida e fácil execução, alta sensibilidade e custos menores comparados às técnicas cromatográficas. Também podem ser considerados métodos mais limpos, uma vez que geram menor quantidade de resíduos. Técnicas voltamétricas de pulso, como a voltametria de pulso diferencial (VPD) e a voltametria de onda quadrada (VOQ), são mais sensíveis do que a voltametria linear, sendo mais indicadas para medidas em meios resistivos, caso do biodiesel. A VPD já foi aplicada com sucesso para determinação simultânea de dois antioxidantes em biodiesel (HOFFMANN DA ROCHA et al., 2017).

Ainda assim, quando existe uma mistura multicomponente destes antioxidantes, as respostas eletroquímicas apresentam sobreposição de sinais impedindo a construção das curvas de calibração. Para contornar esse problema, técnicas de calibração multivariadas são uma alternativa. Atualmente, o emprego dessas ferramentas em eletroanálise vem crescendo, sendo aplicadas a uma ampla gama de importantes áreas, como alimentos, pesticidas, produtos farmacêuticos e análises ambientais (NI; KOKOT, 2008).

1.1 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver uma metodologia para determinação direta e simultânea de antioxidantes em amostras de biodiesel por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial associada a ferramentas quimiométricas.

Os objetivos específicos são:

- Estudar o comportamento eletroquímico de cada antioxidante individualmente no meio biodiesel:etanol, bem como investigar a sensibilidade da voltametria de pulso diferencial na detecção dos mesmos;

- Desenvolver modelos de calibração multivariada através de regressão por Mínimos Quadrado Clássico (CLS), Mínimos Quadrado Parciais (PLS) e Redes Neurais Artificiais (ANN's) para a determinação simultânea desses antioxidantes;

- Avaliar o efeito na precisão dos modelos de diferentes características construtivas, bem como dos diferentes arranjos dos dados de entrada na construção dos modelos.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo será inicialmente abordado o biodiesel, sua produção, controle de qualidade e a relação da estabilidade química do mesmo com os antioxidantes adicionados, dando ênfase aos mais utilizados e objetos de estudo neste trabalho: BHA, BHT, PG e TBHQ. São apresentadas ainda as particularidades do método analítico escolhido bem como aspectos relevantes na sua aplicação. Destaca-se o embasamento teórico a respeito da quimiometria com foco nas ferramentas de calibração multivariada e redes neurais artificiais, bem como os casos em que foram aplicadas com sucesso a dados voltamétricos. Ao final, é apresentado estado da arte da determinação de antioxidantes em biodiesel.

2.1 Biodiesel

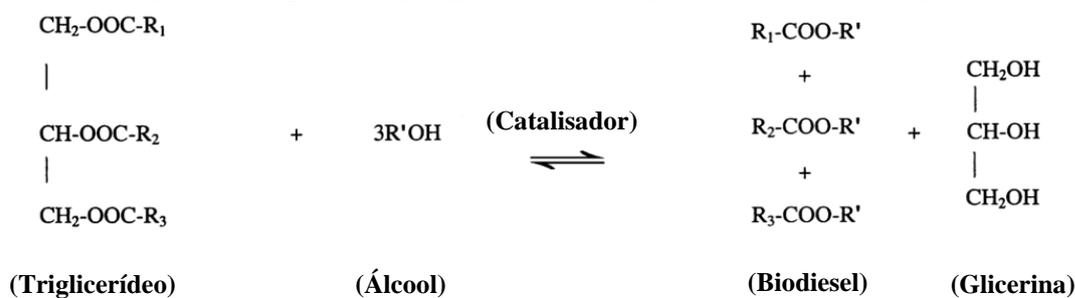
Segundo a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, biodiesel é *“um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil”* (BRASIL, 2005).

A partir dessa lei, o biodiesel foi introduzido na matriz energética nacional, havendo a obrigatoriedade da mistura no diesel comercial em percentuais crescentes. A adição obrigatória iniciou com um percentual de 2% de biodiesel no diesel, sendo denominada de mistura B2. Em 2014, o percentual foi ampliado para 6% (B6) para os comercializados a partir de 1 de agosto e para 7% (B7) para os comercializados a partir de 1 de novembro, segundo a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014 (BRASIL, 2014). Recentemente, a Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016 altera a anterior e amplia

gradativamente o aumento do percentual para 8% (B8) (até março de 2017), 9% (B9) (até março de 2018) e 10% (B10) (até março de 2019) (BRASIL, 2016).

Quimicamente, o biodiesel é uma mistura de ésteres graxos. O método amplamente utilizado para a síntese desse biocombustível é a transesterificação, que consiste na reação química de um éster com um álcool. Especificamente para produção de biodiesel, essa reação ocorre entre triglicerídeos (oriundos de fontes vegetais ou animais) e um álcool de cadeia curta (geralmente metanol ou etanol), acelerada por um catalisador. Os produtos da reação são monoésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerina. Na Figura 1, é representada uma reação genérica desse tipo.

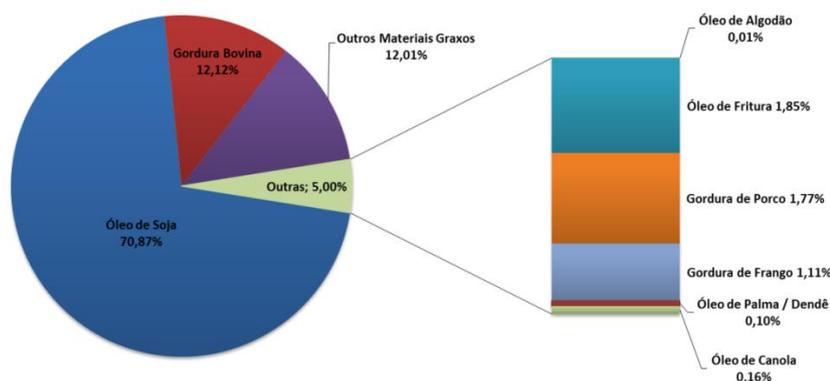
Figura 1. Representação genérica da reação de transesterificação



Fonte: (LEUNG et al., 2006)

Aproximadamente 70% do biodiesel nacional é obtido através da transesterificação do óleo de soja, principal matéria-prima utilizada. No entanto, matérias-primas como gordura animal, palma, girassol, algodão, entre outras, também são usadas na sua produção (ANP, 2017). A Figura 2 apresenta o perfil das matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel em todo território nacional, em maio de 2017.

Figura 2. Perfil nacional de matérias-primas consumidas para produção de biodiesel em maio/2017



Fonte: (ANP, 2017)

Além da redução das emissões veiculares, as propriedades mais significativas do biodiesel são a compatibilidade química com combustíveis existentes, o fato de se tratar de uma fonte renovável, ser biodegradável, apresentar lubricidade inerente na forma pura e competitividade com o diesel de petróleo em termos de muitas propriedades combustíveis (KNOTHE, 2007).

Estudos indicam que o biodiesel tem uma viscosidade de 10 a 17% maior (RAMÍREZ-VERDUZCO et al., 2011) e teores bastante inferiores de enxofre, monóxido de carbono e compostos aromáticos do que o óleo diesel mineral (LOZADA et al., 2010). A mistura de biodiesel com diesel confere a este combustível propriedades lubrificantes, compatibilizando seu uso para melhorar a lubricidade do diesel mineral dessulfurizado (S10).

2.1.1 Antioxidantes e a Estabilidade Oxidativa do Biodiesel

Apesar das suas vantagens, comparado aos combustíveis fósseis, o biodiesel apresenta uma menor resistência à oxidação, estando mais propenso a sofrer degradação e perda de suas características. Vários estudos abordam as diferentes condições de armazenamento e sua influência na estabilidade do biodiesel (LEUNG et al., 2006; BOUAID et al., 2007; PULLEN; SAEED, 2014).

A degradação do biodiesel está associada principalmente a processos de autooxidação, entretanto, fatores como umidade, contato com metais, luz e calor intensificam a formação de radicais livres e, conseqüentemente, a oxidação. Durante o processo de oxidação, peróxidos e hidroperóxidos são formados dando origem a compostos de cadeia mais curta como cetonas, aldeídos, álcoois e ácidos de menor massa molecular.

Estes processos foram estudados de forma detalhada por Du Plessis et al. (1985), quando publicaram um estudo sobre a estabilidade oxidativa de ésteres etílicos e metílicos produzidos a partir do óleo de girassol. Os problemas encontrados em relação à estocagem devem-se à degradação hidrolítica e oxidativa. A degradação hidrolítica (levando a produtos de oxidação primários, ou seja, os hidroperóxidos) consiste na hidrólise dos ésteres metílicos, a qual pode ser influenciada pelo teor de ácidos no biodiesel. Neste caso, dependendo da temperatura, a água pode emulsificar ou separar as fases com precipitação. A degradação oxidativa, a qual transforma os hidroperóxidos em produtos de oxidação secundária, é influenciada pela natureza da substância gordurosa original (em termos do número de ligações duplas). Esta influência está relacionada com a presença de hidroperóxidos e antioxidantes

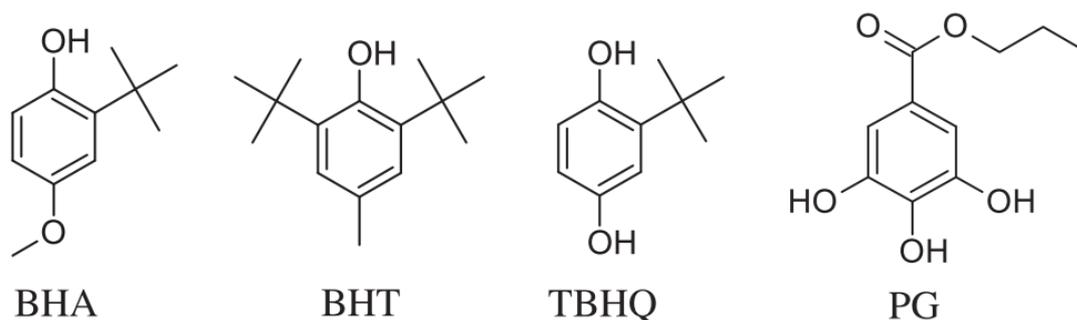
naturais; pela ação de agentes pró-oxidantes, tais como a luz ultravioleta, o ar, a umidade, alguns metais e pela temperatura.

A presença destes produtos da degradação oxidativa causa um aumento indesejável na viscosidade e densidade do biocombustível e, em estágios mais avançados, quando há formação de produtos insolúveis, pode gerar obstrução dos filtros e sistemas de injeção. Além disso, o aumento da acidez e da presença de hidroperóxidos promove a corrosão dos componentes do motor (DOMINGOS et al., 2007).

Para contornar essas desvantagens, são adicionados aditivos que aumentam o tempo de estocagem minimizando os produtos de oxidação. Esses aditivos são os antioxidantes, que atuam atrasando o processo de autooxidação, através de mecanismos diversos (DUNN, 2008; RIZWANUL FATTAH; MASJUKI; et al., 2014).

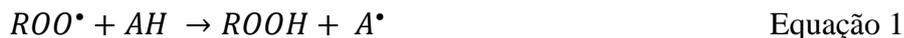
Certos antioxidantes como, por exemplo, a vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis – existem quatro espécies de cada, α , β , γ , δ) ocorrem naturalmente nos óleos vegetais. No entanto, o nível desses antioxidantes naturais diminui no produto final, em maior ou menor grau, em decorrência dos diferentes processos de síntese e refinamento. Logo, materiais sintéticos são adicionados, tais como, hidroxianisol butilado, (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propila (PG), tert-butilhidroquinona (TBHQ), entre outros (KNOTHE, 2007). As estruturas químicas desses antioxidantes sintéticos são apresentadas na Figura 3.

Figura 3. Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos



Fonte:(SANTOS et al., 2012)

A estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos viabiliza a doação de um átomo de hidrogênio a um radical livre, interrompendo o mecanismo de oxidação através destas espécies (RAMALHO; JORGE, 2006; RIZWANUL FATTAH; MASJUKI; et al., 2014). As Equações 1 e 2 ilustram esse mecanismo:



onde

ROO[•] e R[•]: radicais livres;

AH: antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo;

A[•]: radical inerte.

Muito utilizados na indústria de alimentos, os antioxidantes sintéticos como TBHQ, BHA, BHT e PG são geralmente mais eficientes do que antioxidantes naturais, como os tocoferóis. Assim, se tornaram os mais empregados na indústria de biodiesel (DUNN, 2008).

Muitos estudos avaliam a influência desses antioxidantes na estabilidade do biodiesel. Segundo Rizwanul Fattah et al. (2014), a eficácia dos antioxidantes na estabilização da maior parte dos tipos de biodiesel oriundos de óleos vegetais pode ser ordenada como BHT~BHA<TBHQ<PG. No entanto para biodiesel oriundo de gordura animal, esta ordem é BHA~BHT<PG<TBHQ.

Em geral, a quantidade de antioxidante adicionada na indústria é baixa, entre 500 a 1000 ppm, para redução de custos (DUNN, 2008). No entanto, segundo estudo recente de Zhou et al. (2017) com biodiesel oriundo de óleo de cozinha usado, 100 ppm foram suficientes para atingir o limite da norma EN 14214 (8 h) para PG e TBHQ. Já para BHA e BHT, quase 500 ppm foram necessários. Além disto, TBHQ a 100 ppm foi muito mais efetivo que BHA e BHT em todas as concentrações testadas no estudo.

São também conhecidos efeitos sinérgicos que ocorrem entre os antioxidantes e que exercem influência sobre a efetividade dos mesmos (DE GUZMAN et al., 2009; RAWAT et al., 2015). Dessa forma, é comum seu uso em conjunto e não individualmente, estando disponíveis no mercado antioxidantes comerciais com mais de um componente, de forma a melhorar a estabilidade à oxidação com concentrações menores. O sinergismo dos pares de antioxidantes é diferente com diferentes tipos de biodiesel, sugerindo a dependência com a composição do éster metílico de ácido graxo (*fatty acid methyl ester*, FAME) (DE GUZMAN et al., 2009). Logo, para diferentes tipos de óleo são utilizadas diferentes combinações de antioxidantes.

Recentemente, novos estudos apontam que o uso de antioxidantes agrega outras vantagens além da estabilidade à oxidação. Rashed et al. (2015) revisaram alguns estudos que evidenciam que adição de antioxidantes tem potencial benéfico na redução das emissões de NO_x e no consumo de combustível. No estudo de Rizwanul Fattah et al. (2014b), a adição de BHA e BHT em B20 reduziu, em média, as emissões de NO_x em 7,78% e 3,84% e o consumo médio de combustível em 1,77% e 1,46%, respectivamente. Houve aumento de emissões de CO e hidrocarbonetos e da opacidade dos fumos, porém em nível menor do que o de diesel puro.

2.1.2 Controle de Qualidade do Biodiesel

O controle de qualidade do biodiesel é fundamental para sua comercialização segura, evitando que produtos da degradação do mesmo afetem o sistema de combustão automotivo. A Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005 atribui à Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) a responsabilidade pela regulação da comercialização e controle de qualidade do biodiesel (BRASIL, 2005).

A ANP estabelece, através da Resolução nº 45, de 25 de agosto de 2014, as especificações do biodiesel a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional. Esta resolução estabelece que a determinação das características do biodiesel deverá ser feita mediante o emprego das normas e procedimentos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), das normas internacionais da *American Society for Testing and Materials* (ASTM), da *International Organization for Standardization* (ISO) e do *Comité Européen de Normalisation* (CEN) (ANP, 2014).

A estabilidade oxidativa está diretamente relacionada à degradação do biocombustível e, portanto, sua qualidade. Segundo a Resolução nº 45, essa propriedade deve ser avaliada pela norma EN 14112. A norma determina que, para ser utilizado como biodiesel, um éster metílico deve apresentar uma estabilidade oxidativa (tempo decorrido para que ocorra um aumento acentuado na taxa de oxidação) de pelo menos 6 h, à temperatura de 110 °C. Este ensaio é conhecido como Rancimat (ANP, 2014). No entanto, há estudos que indicam que esse método pode apresentar falsos resultados, visto que BHA, BHT e TBHQ tem perda inicial de massa a temperaturas menores ou iguais a 110 °C. Desta maneira, nas condições do ensaio, são degradados ao invés de atuar prevenindo a oxidação do material graxo. Apenas o PG tem resistência térmica maior, com decomposição inicial a 184°C (SANTOS et al., 2012).

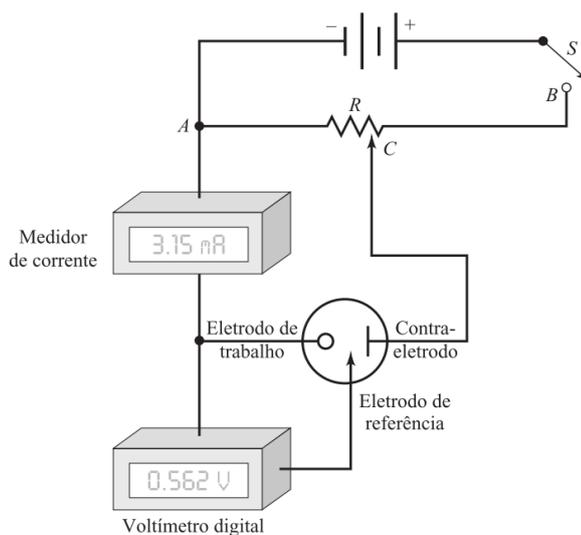
2.2 Métodos voltamétricos

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Nos métodos voltamétricos de análise emprega-se em geral uma célula eletroquímica constituída pela associação de 3 eletrodos, sendo eles:

- (1) eletrodo de trabalho (WE), cujo potencial em relação a um eletrodo de referência varia com o tempo;
- (2) eletrodo de referência (RE), tem um potencial que permanece constante durante o experimento;
- (3) contra-eletrodo (CE) ou eletrodo auxiliar, que frequentemente é um fio de platina ou um poço de mercúrio (SKOOG et al., 2006).

Na célula, a corrente flui entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo. O potenciostato é o equipamento responsável por determinar a varredura da célula eletroquímica e ao mesmo tempo realizar a leitura da corrente proveniente da reação eletroquímica. A Figura 4 ilustra a configuração de uma célula eletroquímica juntamente um potenciostato manual.

Figura 4: Exemplo de potenciostato manual para medidas voltamétricas



Fonte: (SKOOG et al., 2006)

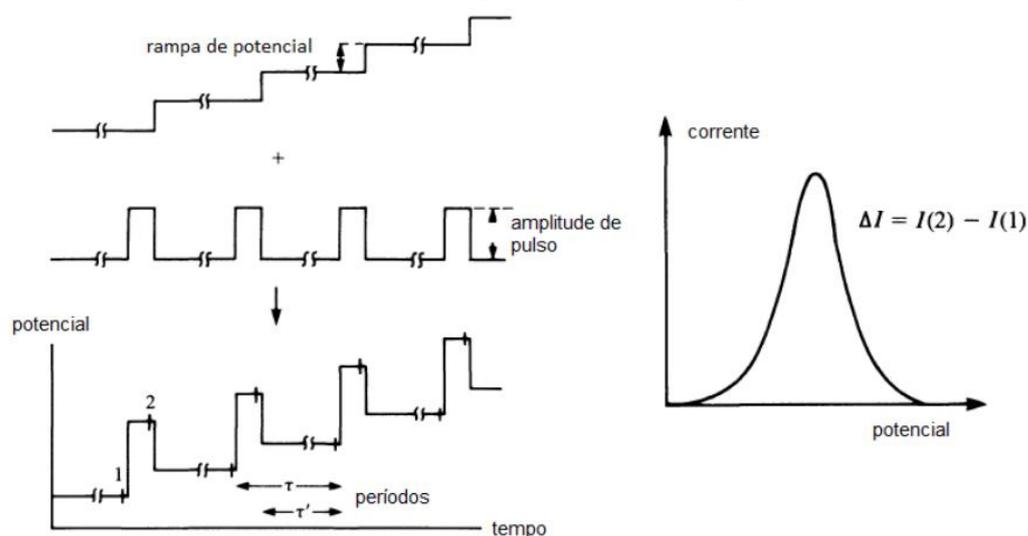
A técnica tem por base a polarização do eletrodo de trabalho, através de uma diferença de potencial aplicada entre este e o eletrodo de referência, em um determinado intervalo de

tempo, registrando-se a corrente que circula entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar (Figura 4) (BARD; FAULKNER, 2000). Sendo a célula eletroquímica operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$), essa técnica é classificada como dinâmica. As informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica ao se aplicar a diferença de potencial – que atua como força motriz para a reação eletroquímica. A corrente é registrada fornecendo um voltamograma, que é um gráfico da corrente em função do potencial aplicado. (PACHECO et al., 2013).

Dentre as técnicas voltamétricas mais utilizadas estão: voltametria cíclica (VC), de varredura linear (VL), de onda quadrada (VOQ) e de pulso diferencial (VPD).

As técnicas de pulso, como as voltametrias de onda quadrada e de pulso diferencial, são mais sensíveis do que a voltametria linear porque minimizam a contribuição da corrente capacitiva – corrente necessária para carregar a dupla camada elétrica existente na interface eletrodo/solução, a qual independe da concentração da espécie em estudo – no sinal obtido (SKOOG et al., 2006). Na VPD, pulsos de igual amplitude sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho. A Figura 5 mostra essa combinação. A corrente é medida antes e depois do pulso aplicado, sendo que a diferença entre elas corresponde à corrente faradaica (proveniente da oxirredução do analito na superfície do eletrodo).

Figura 5. Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial



Fonte: (PACHECO et al., 2013)

A subtração das correntes, possibilitada pelo modo de pulso diferencial, permite alcançar limites de detecção da ordem de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹.

2.2.1 Voltametria em ultramicroeletrodos (ume)

O termo ultramicroeletrodo é aplicado para eletrodos com pelo menos uma das dimensões menor do que 25 μm (XIE et al., 2004). Em razão de suas dimensões, da ordem de 0,8 a 25,0 μm , ou seja, da mesma ordem de grandeza da espessura da camada de difusão, a velocidade de transporte de massa ao eletrodo é elevada e, como a intensidade da corrente é muito baixa, o produto corrente *versus* resistência é desprezível, o que facilita o estudo de reações rápidas e permite observar respostas no estado estacionário.

Desta forma, o ultramicroeletrodo apresenta vantagens sobre os eletrodos convencionais e permite estudar as reações eletrolíticas em meios altamente resistivos (BOND, 1994), caso dos óleos vegetais, onde os eletrodos convencionais, devido a suas maiores dimensões, são afetados por uma expressiva queda ôhmica entre o eletrodo de trabalho e o de referência. Essa queda limita a exatidão com que o potencial aplicado pode ser controlado (FORSTER, 1994). As baixas correntes observadas nos ultramicroeletrodos (na faixa de nA e pA) eliminam a queda ôhmica.

2.3 Quimiometria

A quimiometria pode ser definido como “*o uso de técnicas estatísticas e matemáticas para análise de dados químicos*” (BEEBE et al., 1998). Segundo Massart et al. (1998), quimiometria é uma disciplina da química que usa matemática, estatística e lógica formal para:

- (a) projetar ou selecionar procedimentos experimentais otimizados;
- (b) prover a maior quantidade relevante de informação através da análise de dados químicos;
- (c) obter conhecimento sobre sistemas químicos.

O surgimento da quimiometria deve-se ao fato das análises estatísticas monovariáveis não serem capazes de descrever e modelar satisfatoriamente processos e experimentos químicos com respostas com múltiplas influências que surgiram com o desenvolvimento de

novos instrumentos. A disciplina foi introduzida no final dos anos 60 por grupos de pesquisadores das áreas de química analítica e físico-química orgânica, devido à disponibilidade que tinham de uma gama de equipamentos de análise que geravam respostas multivariadas. Desde então, ela vem evoluindo como uma subdisciplina da química, conforme aumenta a necessidade por métodos estatísticos e matemáticos avançados com a sofisticação da instrumentação e dos processos químicos (GELADI, 2003; HOPKE, 2003).

A quimiometria tem avançado em paralelo com o avanço da capacidade computacional. Começando com o simples ajuste de curvas, hoje é aplicada em diversas áreas de estudo para a realização de calibração multivariada, reconhecimento de padrões e resolução de misturas. As ferramentas variam desde as clássicas Análise por Componentes Principais (*Principal Component Analysis*, PCA), Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares*, PLS), Regressão por Componentes Principais (*Principal Component Regression*, PCR) até outras mais complexas que demandam maior capacidade de processamento, como Algoritmo Genético (*Genetic Algorithm*, GA), Redes Neurais Artificiais (*Artificial Neural Networks*, ANN), entre outras (ESTEBAN et al., 2006).

2.3.1 Métodos Lineares de Calibração Multivariada

A calibração multivariada tem o objetivo de estabelecer modelos capazes de relacionar a elevada gama de medidas químicas, físico-químicas ou eletroquímicas possíveis de serem obtidas a partir de uma dada amostra com os valores de uma determinada propriedade ou das concentrações de analitos de interesse. Métodos de calibração multivariada têm sido amplamente aplicados na identificação e quantificação de substâncias, uma vez que muitos instrumentos analíticos são capazes de fazer análises de múltiplas espécies químicas. Nestes métodos existem várias misturas para as quais as concentrações de cada componente são conhecidas e uma série de propriedades são medidas (HOPKE, 2003).

A calibração multivariada é realizada através de diferentes métodos de regressão. Dentre os mais utilizados estão a regressão por Mínimos Quadrados Clássico (*Classical Least Squares*, CLS), Regressão por Componentes Principais (*Principal Component Regression*, PCR) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares*, PLS).

2.3.1.1 Mínimos Quadrados Clássico (CLS)

Nesta técnica, é assumida uma relação linear entre concentração e a propriedade medida e a aditividade dos sinais, ou seja, a resposta do instrumento a uma mistura de analitos

é igual à soma das respostas do instrumento para os componentes puros. Esta característica corresponde a situações nas quais não existem interações químicas ou físicas entre as espécies (BEEBE et al., 1998).

Para uma propriedade (resposta) r , a aditividade linear pode ser expressa por:

$$r_{ABCD} = r_A + r_B + r_C + r_D = C_A k_A + C_B k_B + C_C k_C + C_D k_D \quad \text{Equação 3}$$

onde r_{ABCD} é a resposta de um instrumento à mistura de A, B, C e D, k é o coeficiente de proporcionalidade do componente e C é a concentração do mesmo na mistura.

Para a calibração do modelo a partir do método CLS, considerando todos os pontos experimentais, a equação pode ser escrita em forma matricial.

$$R = CK \quad \text{Equação 4}$$

onde R é o conjunto de respostas instrumentais para as concentrações C medidas. Com as matrizes R e C conhecidas pode-se estimar, pela Equação 5, o vetor de coeficientes K .

$$\hat{K} = (C^T C)^{-1} C^T R \quad \text{Equação 5}$$

A partir do valor determinado para \hat{K} , as concentrações estimadas podem ser obtidas pela Equação 6 (BEEBE et al., 1998).

$$\hat{C} = R \cdot K^T \cdot (K \cdot K^T)^{-1} \quad \text{Equação 6}$$

É importante ressaltar que este método tem aplicação limitada, pois só é válido quando há aditividade e relação linear entre concentração e propriedade medida. Quando o sistema em estudo não apresenta essas características, a ferramenta não consegue descrever as relações não-lineares. Do ponto de vista estatístico, o valor de \hat{K} obtido deste modo só será livre de erros sistemáticos se os erros presentes nas medidas forem independentes e não houver erro aleatório nos valores de concentração.

2.3.1.2 Regressão por Componentes Principais (PCR) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Mínimos quadrados parciais e regressão por componentes principais são os métodos de calibração multivariada mais utilizados em quimiometria. Diferentemente da abordagem por CLS, esses dois métodos usam a calibração inversa, na qual se representa a propriedade

que se deseja estimar, no caso a concentração, como função da medida experimental, ou seja, da resposta (BEEBE et al., 1998). Desta forma, a matriz de concentrações C é função da matriz de respostas R

$$C = RB \quad \text{Equação 7}$$

E o coeficiente de regressão pode ser estimado por:

$$\hat{B} = (R^T R)^{-1} R^T C \quad \text{Equação 8}$$

Portanto, através destas técnicas é possível calibrar-se o modelo para determinado(s) componente(s) enquanto se modela implicitamente as outras fontes de variação, sejam elas oriundas das respostas instrumentais ou do procedimento de preparo de amostras.

A estimação do modelo de calibração inversa envolve a inversão de uma matriz $(R^T R)$ instável, uma vez que, geralmente, o número de variáveis da resposta do instrumento é maior que o número de experimentos. Ambas as técnicas resolvem esse problema de inversão substituindo as variáveis originais por uma combinação linear das variáveis, chamada de fatores ou variáveis latentes (BEEBE et al., 1998).

Uma diferença importante entre a modelagem por PCR e PLS é que, na última, a decomposição do sinal de resposta é ponderada pela concentração. No PCR, a decomposição é baseada inteiramente em variações na resposta sem considerar as concentrações dos compostos. Assim, uma importante característica do PLS é que este considera tanto os erros nas concentrações quanto nas respostas instrumentais (BRERETON, 2003).

Havendo mais de um analito de interesse, existem duas abordagens para o desenvolvimento de modelos de regressão por PLS. Na primeira delas, chamada PLS-1, modelos separados são desenvolvidos para cada analito. Na outra, PLS-2, um único modelo é gerado para todos os analitos simultaneamente. A abordagem mais difundida é a PLS-1.

Na aplicação do PLS, é feita a decomposição das matrizes R e C e dois conjuntos são obtidos:

$$R = TP^T + E_R \quad \text{Equação 9}$$

$$C = UQ^T + E_C \quad \text{Equação 10}$$

onde T e U são os escores para as duas matrizes de dados, P e Q são os respectivos pesos, e E_R e E_C são os resíduos, compostos pelas variáveis latentes descartadas.

Relacionando as matrizes de escores T e U tem-se a seguinte equação:

$$U = TB \quad \text{Equação 11}$$

Onde B é a matriz diagonal dos coeficientes de regressão que é empregada para a predição, ou seja, a estimação das concentrações de misturas desconhecidas a partir das medidas instrumentais (NI; KOKOT, 2008). É importante ressaltar que existem muitos algoritmos para a regressão por PLS na literatura, e que, apesar das predições de C serem basicamente as mesmas, os escores e pesos não (BRERETON, 2003).

Além da fácil aplicação, a metodologia PLS apresenta outra vantagem que motiva sua vasta aplicação: o fato de ser resistente ao chamado *overfitting*, situação onde modelos estatísticos se adaptam demasiadamente ao conjunto de calibração, ajustando-se a erros de medição e a fatores aleatórios presentes no conjunto, mas que não são representativos do processo como um todo (WOLD et al., 2001). Este fato aumenta a variabilidade das predições para dados não empregados no desenvolvimento do modelo.

2.3.2 Redes Neurais Artificiais (ANN)

Para os casos em que não é possível encontrar uma relação linear entre as medidas instrumentais e as propriedades de interesse, pode-se aplicar as redes neurais para realizar a calibração multivariada. As redes neurais artificiais surgiram com o objetivo de construir modelos computacionais simulando o funcionamento dos neurônios, que são a unidade básica de processamento de informações no sistema nervoso humano. O objetivo da rede é coletar informações de entrada e processá-la gerando uma informação de saída (KADLEC et al., 2009). Esse processamento é feito por um arranjo de funções matemáticas dispostas em rede de modo interconectado.

A estrutura das redes consiste de três ou mais camadas compostas por “neurônios”, sendo a configuração mais simples constituída por camada de entrada, camada oculta e camada de saída. Os neurônios na camada de entrada combinam, geralmente de forma linear, os dados de entrada e os transferem para os neurônios da camada oculta. Estes neurônios aplicam uma transformação não-linear às suas entradas, que pode ser de diferentes tipos (sigmoidal, tangente hiperbólica, etc.). A saída da rede é uma soma ponderada das saídas da

camada oculta, sendo, em modelos quimiométricos, geralmente a concentração do analito. Durante o processo de ajuste da rede, chamado de treinamento ou aprendizagem, os pesos são calculados iterativamente para minimizar a soma dos quadrados dos resíduos das predições do modelo em relação aos dados experimentais (NI; KOKOT, 2008), sendo neste caso chamado de aprendizagem supervisionada. Esse processo de treinamento é equivalente à etapa de calibração em uma análise multivariada por técnicas lineares. A desvantagem das redes neurais é que o processo de aprendizagem é um problema de otimização não-convexo, sujeito a mínimos locais, o que pode gerar resultados sub-ótimos. Além disso, a modelagem por redes neurais está sujeita ao *overfitting*.

2.3.3 Análise por Componentes Principais (PCA)

A análise por componentes principais não é exatamente uma técnica de calibração multivariada, mas é muitas vezes utilizada em conjunto com estas, a fim de fazer uma seleção da informação útil presente nos dados antes da etapa de regressão do modelo. A ideia por trás do uso de PCA vem do fato de que sistemas de grandes dimensões são compostos por muitas variáveis de entrada que podem ser correlacionadas, agregando, portanto, pouca ou nenhuma informação para a construção de um modelo.

Assim, o objetivo da Análise por Componentes Principais é reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados, enquanto retém a maior variabilidade possível do conjunto de dados original. Para isso, é feita a transformação para um novo conjunto de variáveis – os componentes principais (*Principal Components*, PC) – que são descorrelacionadas e ordenadas de maneira que retêm a maior parte da variação presente nas variáveis originais (WARNE et al., 2004).

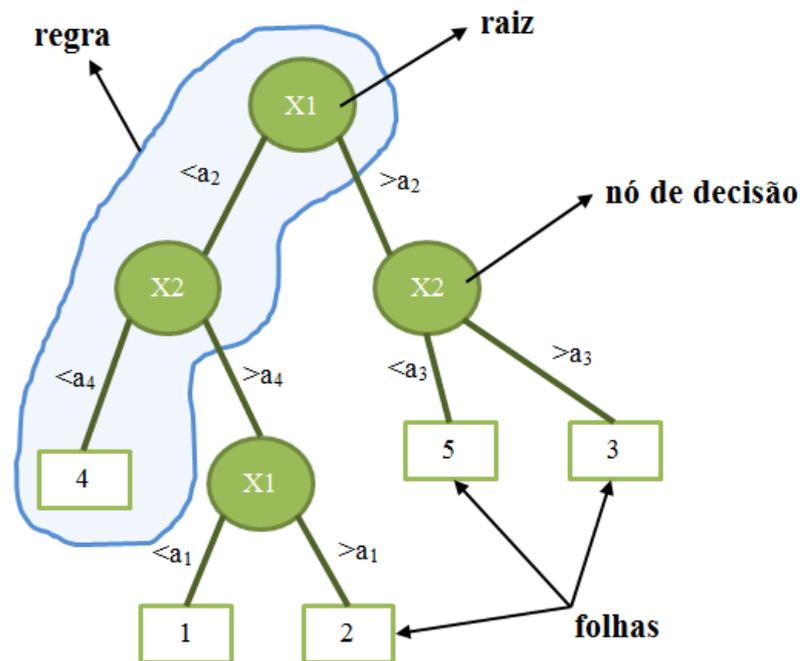
A análise PCA, por fim, permite identificar o grau de correlação entre as variáveis de entrada e permite determinar quantas das mesmas são necessárias para descrever a informação contida no conjunto de dados de maneira satisfatória (RANZAN, 2014).

2.3.4 Árvores de Decisão (DT)

Árvores de Decisão (*Decision Trees*, DT) são versáteis algoritmos de *Machine Learning* capazes de executar tanto tarefas de classificação quanto regressão e até tarefas com múltiplas saídas. São capazes de ajustar conjuntos de dados complexos (GÉRON, 2017).

Uma árvore de decisão é similar à estrutura de uma árvore verdadeira possuindo nós de raiz, nós intermediários e nós de folhas (Figura 6). Cada nó na árvore consiste em uma decisão que leva ao resultado (KUMARI; RAJESWARI, 2014). Sua construção se dá pela partição recursiva do espaço de entrada do conjunto de treinamento. O objetivo é um conjunto de regras de decisão que faça a partição naturalmente para fornecer um modelo de classificação hierárquica informativo e robusto (MYLES et al., 2004).

Figura 6. Representação de uma Árvore de Decisão



Fonte: próprio autor

Cada nó de decisão contém um teste para algum atributo, cada ramo descendente corresponde a um possível valor deste atributo, o conjunto de ramos é distinto, cada folha está associada a uma classe e, cada percurso da árvore, da raiz à folha corresponde uma regra de classificação.

O critério utilizado para realizar as partições é o da utilidade do atributo para a classificação. Aplica-se, por este critério, um determinado ganho de informação a cada atributo. O atributo escolhido como atributo teste para o corrente nó é aquele que possui o maior ganho de informação. A partir desta aplicação, inicia-se um novo processo de partição. Nos casos em que a árvore é usada para classificação, os critérios de partição mais conhecidos são baseados na entropia e índice Gini (MYLES et al., 2004).

Uma das muitas qualidades das Árvores de Decisão é que requerem pouca preparação dos dados. Particularmente, elas não requerem nem escalonamento ou centralização. (GÉRON, 2017).

2.3.5 Quimiometria Aplicada à Eletroquímica

A aplicação da quimiometria a dados eletroquímicos pode ocorrer em várias etapas do processo analítico, tais como o planejamento de experimentos e otimização de parâmetros experimentais, preparação e transformação dos dados (redução de ruído, subtração de *baseline*), determinação de concentrações, calibração e identificação de modelos (ESTEBAN et al., 2006).

O uso da quimiometria em voltametria é pequeno comparado ao uso na espectroscopia (ESTEBAN et al., 2006). No entanto, recentemente, vários autores utilizaram essas ferramentas para resolver o problema de sobreposição de sinais em misturas complexas (NI et al., 2011), calibração e identificação de modelos (GHOLIVAND et al., 2015), otimização de parâmetros experimentais (KHOABI et al., 2013) e classificação de amostras (KUNDU et al., 2011).

Existem duas abordagens para resolver o problema da sobreposição de sinais (ESTEBAN et al., 2006). A mais simples é a deconvolução do sinal eletroanalítico para obter as contribuições individuais dos diferentes analitos presentes, e então executar uma calibração simples com o sinal individual usando corrente ou área de pico. Hoffmann da Rocha et al. (2017) fazem isso com sucesso na determinação simultânea de PG e TBHQ por voltametria de pulso diferencial. A segunda abordagem é por meio da calibração multivariada que considera os dados experimentais como um todo, sem dividi-los explicitamente em suas partes constituintes.

Ni e Kokot (2008) fizeram uma revisão focada em avaliar se, comparada a outras técnicas, a quimiometria (principalmente a análise multivariada) melhora a análise eletroquímica. Quanto ao PLS os autores concluem que a técnica tem aplicação satisfatória com erros relativos de predição (*Percentage Relative Error of Prediction, %REP*) de $\pm 10\%$. Visto que é técnica bem conhecida e de fácil aplicação, recomendam sua aplicação quando este erro é aceitável. Conforme os autores, caso erros menores sejam requeridos, as ANN's vem apresentando melhores desempenhos e podem ser consideradas alternativas ao PLS.

Segundo Esteban et al. (2006), o PLS é a técnica mais aplicada nos dados voltamétricos. O método foi usado por Reguera et al. (2002) para determinação simultânea de quatro compostos anti-inflamatórios que apresentam sobreposição de sinais, utilizando voltametria de pulso diferencial. Os erros relativos obtidos foram na faixa de 1,68% a 4,31%. A regressão por PLS também foi aplicada por Henao-Escobar et al. (2015) na determinação de misturas quaternárias de aminas, usando voltametria de onda quadrada. Os erros de predição obtidos foram inferiores a 9%.

Entre os trabalhos que utilizaram com sucesso as ANN's em dados eletroquímicos está o de Bessant e Saini (1999), que utilizam as redes para determinação simultânea de glicose, frutose e etanol por voltametria em eletrodo de platina. Erros obtidos foram de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ para frutose, glicose e etanol, respectivamente. Robledo et al. (2013) utilizaram voltametria de onda quadrada em um ultramicroeletrodo de fibra de carbono para determinação de tocoferóis em amostras de óleos comestíveis, comparando a calibração multivariada com as ANN's. Esta última apresentou melhor desempenho, com recuperações entre 94% e 99% e erros de predição de 0,89 a 2,5%.

Outra comparação entre PLS e ANN's foi realizada na determinação de eugenol, carvacrol e timol em amostras de mel por voltametria de onda quadrada em eletrodo de carbono vítreo. As redes neuronais também se mostraram mais eficientes com recuperações entre 87% e 104% e erros de predição de 5,0 a 6,7% (TONELLO et al., 2016).

2.3.5.1 Aplicações com Seleção de Variáveis

No trabalho já citado de Reguera et al. (2002), antes da construção do modelo de regressão por PLS foi testada uma seleção das variáveis de entrada por meio do algoritmo genético. Essa seleção não resultou em diferenças significativas em relação ao modelo com o voltamograma inteiro.

Majidi et al. (2005) realizaram a determinação simultânea de isoniazida e hidrazina por voltametria cíclica, em eletrodo de carbono vítreo modificado com polipirrol. No trabalho construíram três modelos: PLS; PLS com seleção de variáveis por GA e ANN com redução de dimensionalidade dos dados de entrada por PCA antes do treinamento. O modelo GA-PLS obteve erros menores que o PLS sem seleção de variáveis, ainda assim, o modelo mais preciso foi o PC-ANN com recuperações de 102,7% e 83,3% para isoniazida e hidrazina, respectivamente.

Cetó et al. (2013) estudaram a determinação simultânea de três nitro-compostos encontrados na maioria das misturas explosivas por voltametria cíclica e ANN's. Neste trabalho, *Discrete Wavelet Transform* (DWT) foi aplicado no pré-processamento das respostas (variáveis de entrada), obtendo coeficientes que foram usados como entrada no treinamento da rede. O RMSE normalizado obtido foi de 0,162.

2.4 Quantificação de Antioxidantes em Amostras de Biodiesel

Diversas metodologias analíticas podem ser empregadas para a determinação de antioxidantes sintéticos em diferentes amostras. Entre as principais estão a cromatografia gasosa (*gas chromatography*, GC), cromatografia líquida de alta performance (*high-performance liquid chromatography*, HPLC), eletroforese capilar e eletroanálise. Recentemente, a espectroscopia de fluorescência também foi aplicada na determinação de antioxidantes (WANG et al., 2013). Grande parte desses métodos é aplicada na determinação de antioxidantes em amostras de cosméticos e alimentos.

Quanto à determinação de antioxidantes em amostras de biodiesel, Tagliabue et al. (1997) usaram HPLC para a determinação quali-quantitativa simultânea de 6 antioxidantes em biodiesel, entre eles PG, TBHQ e BHT. A metodologia proposta faz a diluição do B100 em metanol antes da injeção e o tempo de análise é de 40 min. As recuperações obtidas ficaram entre 96% e 105%.

Tormin et al. (2012) desenvolveram uma metodologia de análise por injeção em batelada combinada com detecção amperiométrica pulsada para determinação simultânea de BHA e TBHQ em biodiesel. As amostras foram diluídas em solução hidroetanólica 50% v/v com $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HClO_4 antes da injeção. As recuperações obtidas ficaram entre 100% e 110%.

Outra metodologia analítica foi desenvolvida por Monteiro et al. (2016) e consiste num sensor fotoeletroquímico para detecção de TBHQ baseado em nanopartículas de dióxido de titânio anatase sensibilizadas com tetracianoetileneto de lítio (LiTCNE/TiO₂). O sensor foi aplicado com sucesso em amostras de biodiesel obtendo recuperações entre 96,8% e 98,2%.

2.4.1 Determinação de Antioxidantes por Voltametria

Diferentes aplicações de técnicas voltamétricas para a determinação, tanto de oxidantes naturais como sintéticos, em diversas amostras oleosas, como óleos vegetais, margarinas, cosméticos e biodiesel são encontradas na literatura em número significativo.

Quanto a amostras de biodiesel, várias metodologias eletroanalíticas foram aplicadas nos últimos anos na determinação dos antioxidantes, tanto individual como simultaneamente. Diversos tipos de eletrodos de trabalho, meio e técnica eletroquímica foram desenvolvidos com sucesso.

Um dos primeiros trabalhos que apresentam a determinação de antioxidantes em biodiesel por voltametria é o de De Araujo et al. (2011). Neste trabalho foi proposto um método eletroanalítico para determinação de TBHQ em biodiesel na presença do surfactante Triton X-100. O surfactante melhorou o sinal eletroanalítico e seu uso foi decisivo para análise de amostras de biodiesel fortificadas com 8000 mg L⁻¹ de TBHQ por voltametria de onda quadrada. Os valores de recuperação obtidos estão na faixa de 95,8% a 100,5%.

Por sua vez, Goulart et al. (2014) propõem um método para determinação de TBHQ por voltametria de pulso diferencial empregando um eletrodo de carbono vítreo. As amostras foram submetidas à extração líquido-líquido do analito por dois solventes diferentes: acetonitrila e etanol, obtendo recuperações de 110,1% para extração com acetonitrila e de 99,4% para etanol.

A determinação de mais de um antioxidante na mesma amostra é um problema mais complexo. São reportados poucos trabalhos que conseguiram quantificar vários antioxidantes simultaneamente em amostras de biodiesel sem utilizar as ferramentas da quimiometria.

Caramit et al. (2013) desenvolveram uma metodologia para a determinação simultânea de TBHQ e BHA, através de voltametria linear, utilizando eletrodos impressos de nanotubos de carbono de paredes múltiplas. O uso de eletrodo modificado permitiu a análise após apenas uma etapa de diluição, obtendo valores de recuperação de 97,90% a 110,0% e de 91,90% a 101,0% para TBHQ e BHA respectivamente.

Em outro trabalho, usando eletrodo semelhante, Caramit et al. (2015) realizaram a determinação simultânea de TBHQ, PG e BHA por voltametria de varredura linear, com a

diluição em etanol e adição de uma solução eletrolítica. Obtiveram recuperações de 98–106% para TBHQ, 98–103% para PG e 92–101% para BHA.

O uso de ultramicroeletrodos em determinações voltamétricas de antioxidantes é bastante estudado em amostras de alimentos e óleos (CEBALLOS; FERNÁNDEZ, 2000). Nesta linha, Hoffmann da Rocha (2017) propõe a medida direta no meio biodiesel:etanol, na relação de 1:1 como forma de determinar simultaneamente TBHQ e PG em biodiesel. A metodologia é aplicada utilizando voltametria de pulso diferencial em ultramicroeletrodo de Pt. Devido à proximidade dos potenciais de pico de oxidação dos dois compostos, é usado um procedimento de deconvolução do sinal. Os valores de recuperação obtidos foram de 116% para TBHQ e 104% para PG.

Outro meio proposto para a medida direta de antioxidantes em biodiesel são as microemulsões de água em óleo utilizando voltametria de pulso diferencial e uma de Pt. (DA SILVA et al., 2014). A caracterização do meio é realizada com ferroceno como sonda e os resultados indicam que a determinação de espécies redutoras em biodiesel é possível nessas microemulsões.

2.4.2 Uso da Quimiometria Aplicada à Eletroquímica na Determinação de Antioxidantes

Galeano Diaz et al. (1998) estudaram o comportamento de PG, BHA e BHT em um meio de acetonitrila e água por voltametria, cíclica e diferencial de pulso, em eletrodo de carbono vítreo. Fizeram a determinação simultânea dos três compostos em amostras de alimentos com o uso de PLS-1 obtendo recuperações entre 77 e 101%. A recuperação de 77% foi obtida para o BHT e o baixo valor foi explicado pela perda do mesmo nas etapas de extração e filtração.

Ni et al. (2000) realizaram a determinação simultânea dos quatro antioxidantes por voltametria linear em um eletrodo de carbono vítreo em solução de 0,1 mol L⁻¹ de ácido perclórico contendo 1% de metanol. Devido à sobreposição dos picos, as técnicas CLS, PCR e PLS foram aplicadas e comparadas. Os três métodos forneceram bons resultados, sendo que a regressão por CLS teve desempenho um pouco inferior, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Erros relativos de predição para a determinação de misturas de antioxidantes por diferentes métodos quimiométricos

<i>Componente</i>	<i>PLS</i>		<i>PCR</i>		<i>CLS</i>	
	REP(%)	Recuperação	REP(%)	Recuperação	REP(%)	Recuperação
BHA	8,16	96	8,11	98	11,72	89
BHT	9,84	106	9,98	105	19,93	118
PG	9,89	96	9,74	96	24,02	113
TBHQ	6,75	105	7,37	107	22,82	123

Fonte: Adaptado de (NI et al., 2000)

Ziyatdinova et al. (2014) compararam as regressões por PLS e ANN's na determinação simultânea de TBHQ, BHA e PG por voltametria cíclica em eletrodo de carbono vítreo. Antes da etapa de calibração, o voltamograma completo foi decomposto por uma função de base radial (*Radial Basis Function*, RBF). Com o resultado dessa decomposição foi feito o ajuste dos modelos por PLS e ANN's, sendo que o último fornece maior precisão na estimativa das concentrações. No entanto, segundo os autores, os esforços totais necessários para treinamento das ANN's não compensam a melhora modesta dos resultados em comparação ao modelo linear, muito mais simples. Os RMSEP foram de 0,256 mmol L⁻¹ e 0,186 mmol L⁻¹ para PLS e ANN, respectivamente.

Robledo et al. (2013) utilizaram a voltametria de onda quadrada com ultramicroeletrodo de fibra de carbono para a determinação de tocoferóis em amostras de óleos comestíveis e compararam a calibração multivariada com as ANN's. Esta última apresentou melhor desempenho, com recuperações entre 94% e 99% e erros de predição de 0,89 a 2,5%.

Não foram encontrados trabalhos que determinem os quatro antioxidantes de forma simultânea por voltametria em amostras de biodiesel.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Este capítulo destina-se à descrição da metodologia empregada no desenvolvimento do trabalho, bem como à descrição dos materiais, procedimentos analíticos envolvidos, tratamento dos dados e critérios de avaliação.

Os experimentos foram realizados no Centro de Combustíveis, Biocombustíveis, Lubrificantes e Óleos (CECOM) do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.1 Equipamentos e Reagentes

O biodiesel de soja utilizado foi cedido pela empresa BSBIOS de Passo Fundo/RS e coletado antes da etapa de adição dos antioxidantes.

Etanol absoluto (99%) foi adquirido da PanReac AppliChem, perclorato de tetrahexilamônio (>99%) da Fluka Chemika. BHA (98%), BHT (97%), PG (98%) e TBHQ (97%) foram adquiridos na Acros Organics (EUA).

Para a realização das medidas por VPD foi utilizado um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 30 (Holland) equipado com uma célula eletroquímica de três eletrodos. Como eletrodo de trabalho foi utilizado um ultramicroeletrodo de Pt com diâmetro de 10 μm , EG&G PAR (Princeton Applied Research, Wellesley, MA, USA) e como eletrodos auxiliar e de quase-referência (IVES; JANZ, 1961) foram utilizados dois fios de Pt. Os dados foram adquiridos no *software* GPES[®] e tratados nos *softwares* Origin[®] versão 8.0724 (B724) e Matlab[®] versão 9.0.0.341360 (R2016a).

A Figura 7 apresenta a célula utilizada e a configuração dos eletrodos.

Figura 7. Célula eletroquímica com a configuração dos eletrodos utilizada (1) eletrodo de trabalho (ume Pt) (2) eletrodo de referência (fio Pt) e (3) contra-eleto-rodo (fio Pt)



3.2 Planejamento Experimental

Para a obtenção dos modelos quimiométricos, elaborou-se um planejamento composto central com 4 fatores e 5 níveis cada (Tabela 2). Cada fator corresponde à concentração de um dos antioxidantes (BHA, BHT, PG e TBHQ). Devido à dificuldade de se obter informações sobre as concentrações utilizadas na indústria, os níveis foram definidos considerando as concentrações mínimas de antioxidantes reportadas na literatura para se atingir valores de estabilidade oxidativa conforme a norma EN 14112 (ZHOU et al., 2017).

Tabela 2. Variáveis e níveis do planejamento experimental

Variáveis	Níveis				
	-2	-1	0	+1	+2
[BHA] mg L ⁻¹	0,0	73,5	147,0	220,5	294,0
[BHT] mg L ⁻¹	0,0	74,3	148,5	222,8	297,0
[PG] mg L ⁻¹	0,0	73,5	147,0	220,5	294,0
[TBHQ] mg L ⁻¹	0,0	72,8	145,5	218,3	291,0

O planejamento experimental (Tabela 3) foi desenhado para um conjunto de 29 amostras, sendo 16 pontos equivalentes a um fatorial 2^4 (1-16), 8 pontos axiais (17-24) e 5 repetições no ponto central (25-29). Para melhorar a predição foram adicionados ao conjunto pontos com presença de um único antioxidante (30-33).

Tabela 3. Planejamento experimental e concentrações de antioxidantes nas misturas em meio biodiesel:etanol 1:1 (v/v)

<i>Nº da Amostra</i>	<i>Ordem de execução</i>	<i>[BHA] mg L⁻¹</i>	<i>[BHT] mg L⁻¹</i>	<i>[PG] mg L⁻¹</i>	<i>[TBHQ] mg L⁻¹</i>
1	12	73,5	74,3	73,5	72,8
2	1	220,5	74,3	73,5	72,8
3	17	73,5	222,8	73,5	72,8
4	21	220,5	222,8	73,5	72,8
5	7	73,5	74,3	220,5	72,8
6	16	220,5	74,3	220,5	72,8
7	25	73,5	222,8	220,5	72,8
8	11	220,5	222,8	220,5	72,8
9	10	73,5	74,3	73,5	218,3
10	2	220,5	74,3	73,5	218,3
11	27	73,5	222,8	73,5	218,3
12	18	220,5	222,8	73,5	218,3
13	5	73,5	74,3	220,5	218,3
14	14	220,5	74,3	220,5	218,3
15	28	73,5	222,8	220,5	218,3
16	22	220,5	222,8	220,5	218,3
17	3	0,0	148,5	147,0	145,5
18	24	294,0	148,5	147,0	145,5
19	6	147,0	0,0	147,0	145,5
20	20	147,0	297,0	147,0	145,5
21	19	147,0	148,5	0,0	145,5
22	15	147,0	148,5	294,0	145,5
23	26	147,0	148,5	147,0	0,0
24	9	147,0	148,5	147,0	291,0
25	4	147,0	148,5	147,0	145,5
26	8	147,0	148,5	147,0	145,5
27	13	147,0	148,5	147,0	145,5
28	23	147,0	148,5	147,0	145,5
29	29	147,0	148,5	147,0	145,5
30	30	195	0,0	0,0	0,0
31	31	0,0	196	0,0	0,0
32	32	0,0	0,0	195	0,0
33	33	0,0	0,0	0,0	193

Outro conjunto de pontos é apresentado na Tabela 4 e foi utilizado para validação dos modelos. Para cada ponto desse conjunto foram realizadas 5 repetições, totalizando 20 amostras de validação.

Tabela 4. Concentrações de antioxidantes nas misturas para validação

<i>Amostra</i>	<i>[BHA] mg L⁻¹</i>	<i>[BHT] mg L⁻¹</i>	<i>[PG] mg L⁻¹</i>	<i>[TBHQ] mg L⁻¹</i>
1v	98,0	118,8	98,0	116,4
2v	215,6	188,1	63,7	63,1
3v	279	282	279	276
4v	194	196	194	192

3.3 Procedimento Experimental

As amostras foram preparadas a partir de soluções estoque de BHA (19600 mg L⁻¹), BHT (19800 mg L⁻¹), PG (19600 mg L⁻¹) e TBHQ (19400 mg L⁻¹) diluídas em meio biodiesel:etanol 1:1 (v/v). Antes das medidas de cada amostra por VPD foi feita a varredura do branco, o qual foi preparado por diluição de biodiesel de soja (livre de antioxidantes) em etanol na razão de 1:1 (v/v) e adicionados 0,002 mol L⁻¹ do eletrólito suporte N(Hex)₄ClO₄.

Após a varredura do branco, quantidades adequadas das soluções estoque foram adicionadas à célula eletroquímica de forma a obter as concentrações desejadas.

Para construção das curvas de calibração individuais, sucessivas adições das soluções estoque foram feitas na célula, contendo 10 mL do branco. Assim, obtiveram-se amostras de concentrações crescentes variando de 20 a 385 mg L⁻¹ para BHA, 20 a 389 mg L⁻¹ para BHT, 20 a 385 mg L⁻¹ para PG e 29 a 362 mg L⁻¹ para TBHQ.

Todas as medidas de voltametria de pulso diferencial foram realizadas à temperatura ambiente, na velocidade de varredura de 5 mV s⁻¹, numa janela de potencial entre 0 V e 1,35 V, amplitude de 50 mV e largura de pulso de 50 ms.

3.4 Tratamento dos Dados

Os dados registrados pelo software GPES passaram por duas etapas de tratamento antes de serem empregados para construção dos modelos. A primeira etapa foi a subtração do sinal da varredura do branco. A segunda etapa consistiu na suavização do sinal por meio da remoção de ruído, com a finalidade de aumentar a precisão na leitura de valores no

voltamograma (por exemplo, a corrente de pico). Ambos procedimentos foram realizados em rotinas implementadas em Matlab.

A remoção do ruído foi feita por meio de *splines*. *Splines* são funções polinomiais que podem ser usadas para ajuste de uma curva ou função aos dados. Neste trabalho, foi empregada a função *spaps* do Matlab, que utiliza *splines* cúbicas na forma de *B-splines* para a obtenção de um sinal aproximado e regularizado. O algoritmo emprega um parâmetro, chamado de tolerância (*tol*), que representa o limite aceitável entre a curva suavizada e os pontos experimentais (CAUMO, 2006). O valor de tolerância utilizado foi -10^8 Amperes.

3.5 Construção dos Modelos

O conjunto de 33 voltamogramas utilizados para calibração e o conjunto de validação foram organizados separadamente em matrizes de intensidade de corrente (I), onde cada linha representa uma amostra e cada coluna corresponde aos valores de corrente de oxidação dos compostos em estudo medidos a um dado potencial, no intervalo de 0,300 a 1,200 V, tomados de 6 em 6 mV, totalizando 150 colunas. Foi escolhida esta faixa de trabalho pois toda informação eletroquímica dos antioxidantes situa-se nessa região. As concentrações foram agrupadas na matriz (C), onde cada linha corresponde a uma amostra e cada coluna à concentração de um antioxidante.

Para a geração dos modelos quimiométricos relacionando o sinal do voltamograma das amostras com a concentração de antioxidantes no biodiesel, a matriz de intensidade de corrente (I) foi utilizada como entrada e a matriz de concentrações (C) como saída.

Além dos modelos construídos com todos os pontos do voltamograma, outra opção foi utilizar como variáveis de entrada alguns parâmetros voltamétricos extraídos dos voltamogramas: média (M), valores máximo e mínimo de intensidade de corrente (MM), derivada (D), integral (A) e energia (E). Este método foi proposto por Palacios-Santander et al. (2007) tendo observado certa diminuição nos erros de modelagem. Semelhante abordagem foi aplicada no trabalho de Robledo et al. (2013). Em ambos os trabalhos citados essas propriedades foram calculadas para o voltamograma inteiro, que apresentava um único pico. Os voltamogramas obtidos para as misturas dos antioxidantes no presente trabalho apresentam mais de um pico. Assim, optou-se por dividir o voltamograma em nove segmentos e extrair esses parâmetros de cada um destes trechos, obtendo-se para cada propriedade matrizes de

9 colunas e 33 linhas. As Equações 12 a 15 foram empregadas para o cálculo de cada propriedade.

$$\text{Média (M)} = \frac{\sum_{j_i}^{j_f} I_j}{n} \quad \text{Equação 12}$$

$$\text{Derivada (D)} = I_{j+1} - I_j \quad \text{Equação 13}$$

$$\text{Integral (A)} = \sum_{j_i}^{j_f} I_j \quad \text{Equação 14}$$

$$\text{Energia (E)} = \sum_{j_i}^{j_f} |I_j|^2 \quad \text{Equação 15}$$

onde I é o valor da corrente medida no potencial j e n é o número de pontos no segmento considerado.

3.5.1 Normalização

Antes de aplicadas para construção do modelo, as variáveis foram normalizadas através da função *zscore* do Matlab que centraliza e normaliza um conjunto de dados de forma que as colunas tenham média zero e desvio padrão unitário, conforme Equação 16.

A centralização é realizada subtraindo de cada variável a média correspondente. O autoescalamamento é realizado para que todas as variáveis adquiram a mesma importância, ou o mesmo grau de magnitude:

$$Z_i = \frac{(x_i - \bar{x})}{s} \quad \text{Equação 16}$$

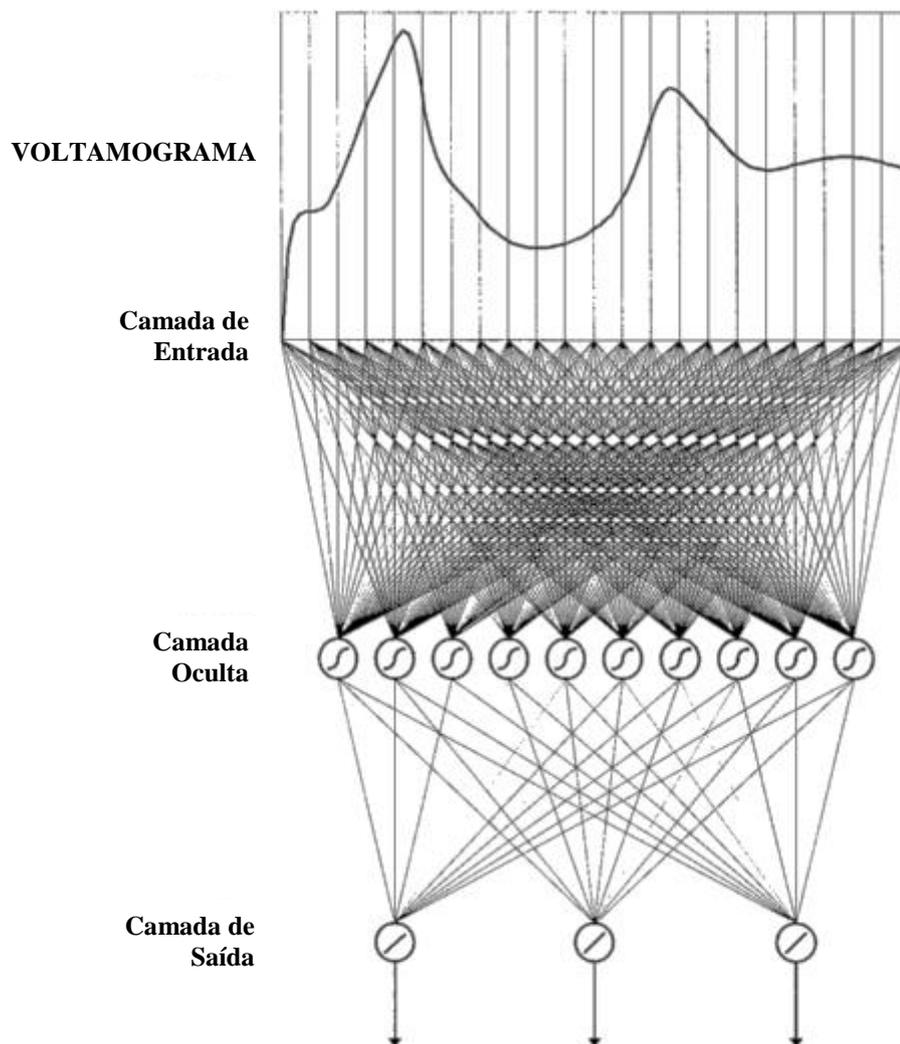
onde \bar{x} é a média e s o desvio padrão da variável.

A partir dos conjuntos normalizados foram aplicadas os métodos CLS, PLS, ANN e DT-ANN para construção dos modelos de calibração multivariada.

3.5.2 Redes Neurais Artificiais

O primeiro passo na construção de um modelo por redes neurais é a seleção da arquitetura da rede utilizada. Este é um processo de teste e erro em que vários parâmetros (algoritmo de treinamento, número de camadas ocultas, número de neurônios, tipos de função de transferência, etc.) são ajustados para encontrar a melhor configuração para o desempenho do modelo. A Figura 8 exemplifica como é a arquitetura de uma rede e como os dados de um voltamograma são transferidos para a entrada dessa rede.

Figura 8. Arquitetura de uma rede neuronal com uma camada de entrada, uma camada oculta e uma camada de saída.



Fonte: (BESSANT; SAINI, 1999)

Após testadas várias configurações, o melhor resultado foi para redes com uma camada de entrada, uma camada oculta e uma camada de saída. Na camada de entrada, o número de neurônios equivale ao número de colunas da matriz de entrada e o número de neurônios na camada de saída corresponde ao número de variáveis de saída do modelo. Neste trabalho as variáveis de saída da rede foram, para todos os casos, as concentrações de BHA, BHT, PG e TBHQ organizadas na matriz (C) assim, quatro neurônios foram usados na camada de saída. O número de neurônios na camada oculta varia conforme o tamanho do conjunto de dados.

Diferentes modelos foram então construídos com as redes neuronais a partir dos diferentes dados: intensidade de correntes do voltamograma inteiro (I), média (M), valores máximo e mínimo de intensidade de corrente (MM), derivada (D), integral (A) e energia (E).

Como a função objetivo apresenta mínimos locais e a rede neural inicia com pesos randômicos, as redes podem convergir para diferentes resultados após o treinamento. Para contornar esse problema, 10 redes neurais foram treinadas e aplicadas aos dados de validação, tomando como resposta final a média dessas 10 respostas.

3.5.2.1 Redução de Dados de Entrada

Além dos modelos construídos com as entradas já mencionadas, duas metodologias foram aplicadas para redução do tamanho do conjunto de entrada antes da etapa de treinamento da rede neuronal. Essa duas metodologias foram a Análise por Componentes Principais (PCA) e a seleção por Árvore de Decisão (DT).

Esta redução da dimensionalidade dos dados é útil devido à extrema complexidade dos sinais e pode trazer como vantagens diminuição do tempo de treinamento, evitar redundância nos dados de entrada e obter um modelo com melhor capacidade de generalização.

A redução da dimensionalidade por meio de PCA foi aplicada através da função *pca* do Matlab. Os escores dessa análise foram aplicados como entrada no treinamento da rede. Os escores do PCA são a representação de (I) no espaço de componentes principais. As linhas da matriz *score* correspondem às amostras e as colunas aos PC's.

A seleção de variáveis por meio das DT's foi realizada através de uma rotina implementada em Python 3.6.1. Essa seleção foi realizada separadamente para cada antioxidante, de maneira que fossem escolhidas as propriedades mais adequadas para a quantificação de cada composto. Assim, foram treinadas rede neuronais para cada antioxidante individualmente. As propriedades foram escolhidas de acordo com o cálculo de sua importância. São consideradas importantes aquelas propriedades com valor de importância acima de um limite, estabelecido neste trabalho como 0,01.

3.6 Métricas de Qualidade dos Modelos

Na metodologia empregada, foram usadas as seguintes métricas para avaliar a qualidade dos modelos: raiz quadrada do erro médio quadrático (*Root-Mean-Square Error*, RMSE) e erro relativo percentual (*Percentage Relative Error*, %RE). Para comparação, ambos foram aplicados tanto ao conjunto de dados de validação/predição (RMSEP e REP%) como ao conjunto de dados de calibração (RMSEC e REC%).

O RMSE é calculado de acordo com a Equação 17, onde \hat{c} representa a concentração predita pelo modelo, c a concentração nominal e n o número de amostras no conjunto considerado (calibração ou validação). Este critério analisa o ajuste do modelo ao conjunto de dados avaliando a precisão dos resultados.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_i^n (\hat{c}_i - c_i)^2}{n}} \quad \text{Equação 17}$$

O segundo critério para avaliação dos modelos é o erro relativo percentual, calculado conforme Equação 18, onde \bar{c} é a média de todas as concentrações nominais do conjunto considerado.

$$\%RE = \frac{100}{\bar{c}} * \sqrt{\frac{\sum_i^n (\hat{c}_i - c_i)^2}{n}} \quad \text{Equação 18}$$

Além dessas duas métricas detalhadas acima, ensaios de recuperação foram utilizados ao final para averiguação da precisão e exatidão do método. A recuperação, calculada pela Equação 19, está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito recuperada no processo, em relação à quantidade real adicionada. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo. O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido a erros de pesagem, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra.

$$rec = \frac{100}{n} * \sum_i^n \left(\frac{\hat{c}_i}{c_i} \right) \quad \text{Equação 19}$$

Capítulo 4

Resultados e Discussões

Este capítulo apresenta os resultados obtidos no estudo do comportamento dos antioxidantes no meio proposto e no desenvolvimento dos modelos quimiométricos para determinação da concentração destes numa amostra de composição desconhecida, bem como a discussão dos mesmos avaliando a precisão da técnica e das ferramentas computacionais utilizadas.

O resultados serão apresentados em duas partes. A primeira apresenta as respostas obtidas através do estudo do comportamento dos componentes puros, enquanto a segunda aborda os resultados obtidos na determinação simultânea dos compostos por meio dos diferentes modelos construídos.

4.1. Curvas de Calibração e Limites de Detecção para os Componentes Individuais

Previamente à análise das misturas multicomponentes, foi feito o estudo do comportamento eletroquímico individual dos antioxidantes por meio de voltametria de pulso diferencial no meio proposto. Também foi investigada a sensibilidade da técnica voltamétrica na detecção dos mesmos.

As Figuras 9, 10, 11 e 12 apresentam os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para cada antioxidante individualmente, após subtração do branco, em concentrações variando de 20 a 389 mg L⁻¹. Os antioxidantes apresentam picos de oxidação bem definidos em 618 mV, 680 mV, 800 mV e 1100 mV para TBHQ, BHA, PG e BHT, respectivamente.

A partir dos voltamogramas, foram construídas curvas de calibração relacionando a corrente de pico com a concentração do antioxidante. Para a construção das curvas, utilizou-se regressão linear simples por mínimos quadrados.

Figura 9. Voltamogramas de pulso diferencial para BHA em ultramicroeletrodo de Pt, meio B100:etanol 1:1 (v/v), contendo $0,002 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$. Concentrações de BHA: (a) $19,6 \text{ mg L}^{-1}$, (b) $49,0 \text{ mg L}^{-1}$, (c) $72,4 \text{ mg L}^{-1}$, (d) $97,7 \text{ mg L}^{-1}$, (e) $146,2 \text{ mg L}^{-1}$, (f) $194,4 \text{ mg L}^{-1}$, (g) $280,7 \text{ mg L}^{-1}$ e (h) $385,1 \text{ mg L}^{-1}$. Curva analítica correspondente.

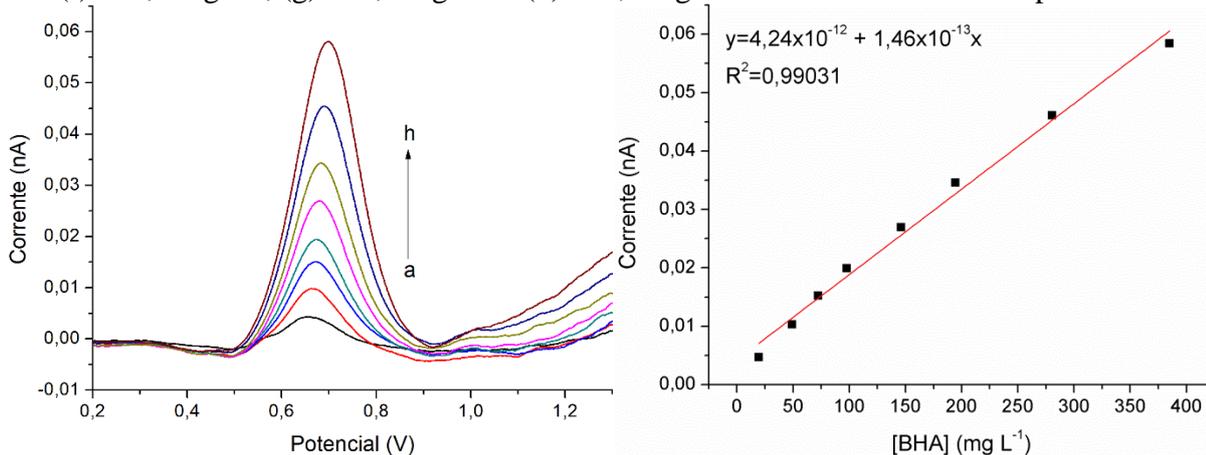


Figura 10. Voltamogramas de pulso diferencial para BHT em ultramicroeletrodo de Pt, meio B100:etanol 1:1 (v/v), contendo $0,002 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$. Concentrações de BHT: (a) $19,8 \text{ mg L}^{-1}$, (b) $73,1 \text{ mg L}^{-1}$, (c) $147,6 \text{ mg L}^{-1}$, (d) $196,3 \text{ mg L}^{-1}$, (e) $283,4 \text{ mg L}^{-1}$ e (f) $388,8 \text{ mg L}^{-1}$. Curva analítica correspondente.

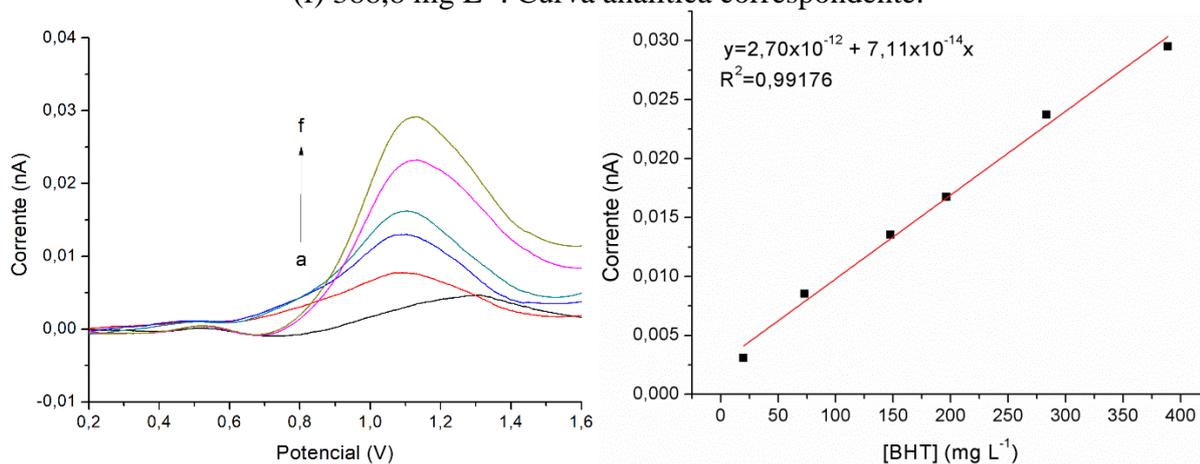


Figura 11. Voltamogramas de pulso diferencial para PG em ultramicroeletrodo de Pt, meio B100:etanol 1:1 (v/v), contendo $0,002 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$. Concentrações de PG: (a) $19,6 \text{ mg L}^{-1}$, (b) $49,0 \text{ mg L}^{-1}$, (c) $72,4 \text{ mg L}^{-1}$, (d) $97,7 \text{ mg L}^{-1}$, (e) $146,2 \text{ mg L}^{-1}$, (f) $194,4 \text{ mg L}^{-1}$, (g) $280,7 \text{ mg L}^{-1}$ e (h) $385,1 \text{ mg L}^{-1}$. Curva analítica correspondente.

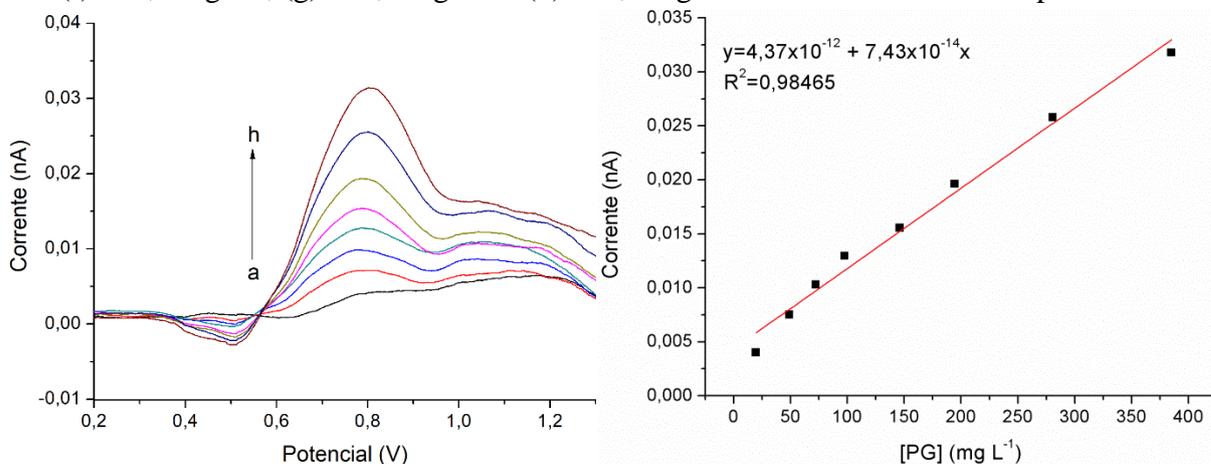
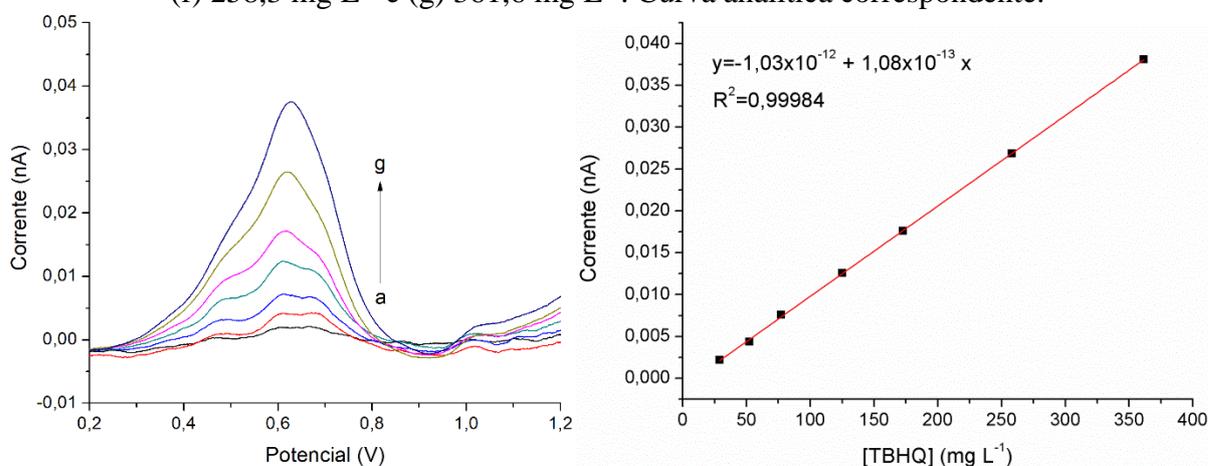
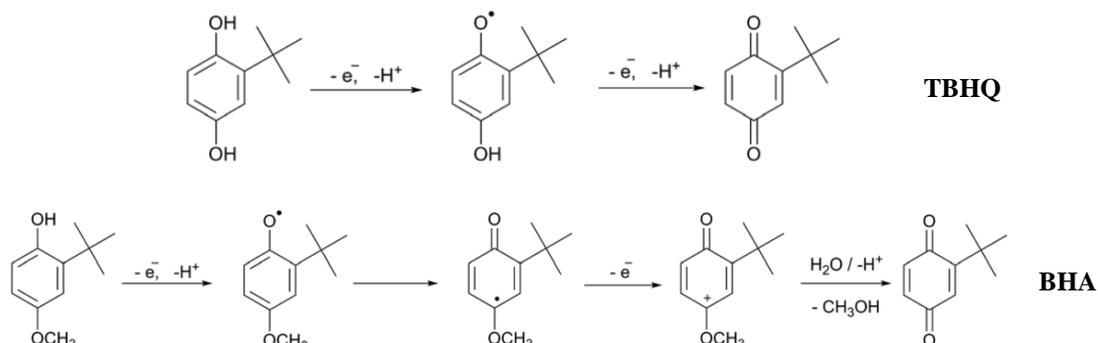


Figura 12. Voltamogramas de pulso diferencial para TBHQ em ultramicroeletrodo de Pt, meio B100:etanol 1:1 (v/v), contendo $0,002 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$. Concentrações de TBHQ: (a) $29,0 \text{ mg L}^{-1}$, (b) $52,2 \text{ mg L}^{-1}$, (c) $77,2 \text{ mg L}^{-1}$, (d) $125,2 \text{ mg L}^{-1}$, (e) $173,0 \text{ mg L}^{-1}$, (f) $258,3 \text{ mg L}^{-1}$ e (g) $361,6 \text{ mg L}^{-1}$. Curva analítica correspondente.



Observou-se um deslocamento de potencial para valores mais positivos conforme há aumento da concentração. Esse deslocamento pode ser atribuído ao caráter irreversível de processos de oxidação de compostos fenólicos (a Figura 13 apresenta exemplos dessas reações). Ao mesmo tempo, provavelmente, há adsorção de biodiesel na superfície do eletrodo, em razão de seu caráter surfactante, outro fator que leva a oxidação a ocorrer em potenciais gradativamente mais positivos, fenômeno mais evidente para o BHA. Esse comportamento já havia sido observado em trabalhos anteriores (HOFFMANN DA ROCHA et al., 2017).

Figura 13. Reações de oxidação para TBHQ e BHA

Fonte: (ZIYATDINOVA et al., 2015)

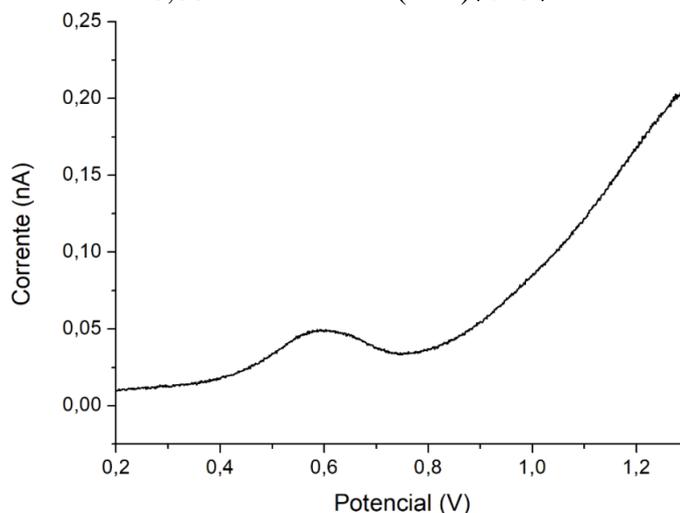
Todos os analitos mostraram dependência linear entre a corrente de pico e a concentração em diferentes intervalos. A Tabela 5 apresenta os parâmetros obtidos na construção das curvas. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados utilizando a relação $3Sb/b$ e $10Sb/b$, respectivamente, onde Sb é o desvio padrão de dez repetições do branco e b é o coeficiente angular da curva analítica.

Tabela 5. Parâmetros do modelo de calibração linear para cada antioxidante

<i>Antioxidante</i>	<i>BHA</i>	<i>BHT</i>	<i>PG</i>	<i>TBHQ</i>
Potencial do pico (mV)	659-700	1088-1111	791-808	611-624
Range (mg L ⁻¹)	20-385	20-389	20-385	29-362
R ²	0,99031	0,99176	0,98465	0,99984
Slope (A L mg ⁻¹)	$1,46 \cdot 10^{-13}$	$7,11 \cdot 10^{-14}$	$7,43 \cdot 10^{-14}$	$1,08 \cdot 10^{-13}$
Intercept (A)	$4,24 \cdot 10^{-12}$	$2,70 \cdot 10^{-12}$	$4,37 \cdot 10^{-12}$	$-1,03 \cdot 10^{-12}$
LD (mg L ⁻¹)	20,5	32,4	35,5	26,5
LQ (mg L ⁻¹)	68,2	108,0	118,3	88,2

Os dados da Tabela 5 mostram que os limites de detecção e de quantificação são mais elevados para BHT e PG. Uma explicação para isso pode ser a menor sensibilidade na medição da corrente nos potenciais onde ocorrem os picos de oxidação desses compostos. Como as reações de oxidação dos fenóis envolvem perda de íon H⁺, quanto maior o caráter doador de prótons do fenol, menos energia será necessária para oxidar o grupo OH da molécula e, portanto, mais baixo o potencial necessário para a reação. Devido às estruturas do BHT e do PG – que dificultam a liberação do íon H⁺ – o pico de oxidação ocorre em potenciais mais elevados (1100 mV e 800 mV, respectivamente), onde já ocorre outro processo de oxidação no meio, provavelmente a oxidação do etanol, como pode ser visto na resposta do branco (Figura 14).

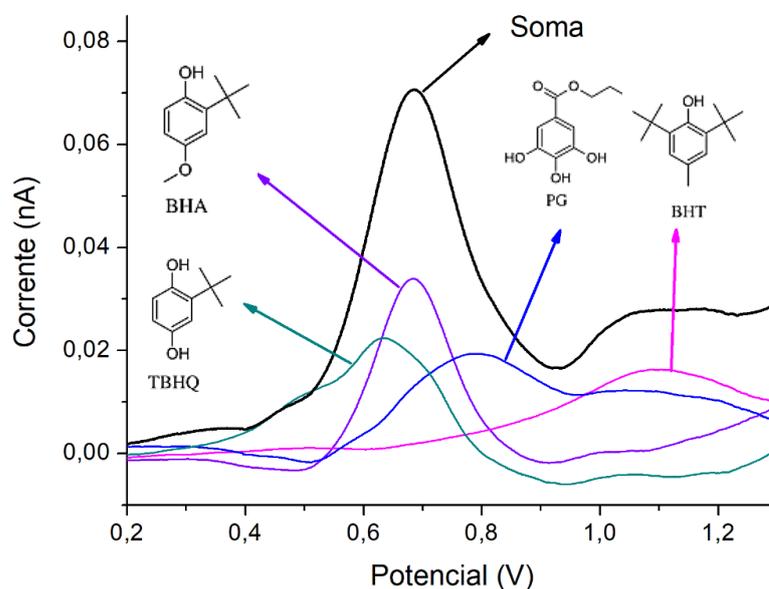
Figura 14. Voltamograma de pulso diferencial para B100:etanol 1:1 (v/v), contendo $0,002 \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{N}(\text{Hex})_4\text{ClO}_4$



4.2 Determinação Simultânea

A dificuldade na determinação simultânea de uma mistura destes antioxidantes está na sobreposição dos sinais, que pode ser visualizada na Figura 15, onde são comparadas as respostas para os quatro antioxidantes puros e aquela correspondente à soma algébrica das mesmas. Fica evidente que os picos individuais se sobrepõem de maneira que o voltamograma da soma das respostas individuais não apresenta picos distintos para cada antioxidante, logo não pode ser utilizado para construção de curvas de calibração individuais.

Figura 15. Voltamogramas de pulso diferencial para BHA ($194,4 \text{ mg L}^{-1}$), BHT ($196,3 \text{ mg L}^{-1}$), PG ($194,4 \text{ mg L}^{-1}$), TBHQ ($192,8 \text{ mg L}^{-1}$) e a soma algébrica destas. Varredura a 5 mV s^{-1} , 50 mV de amplitude e 50 ms de largura de pulso.



Desta forma, para realizar a determinação simultânea dos antioxidantes foram utilizadas técnicas que usam o voltamograma inteiro para realizar a calibração.

4.2.1 Modelagem por CLS

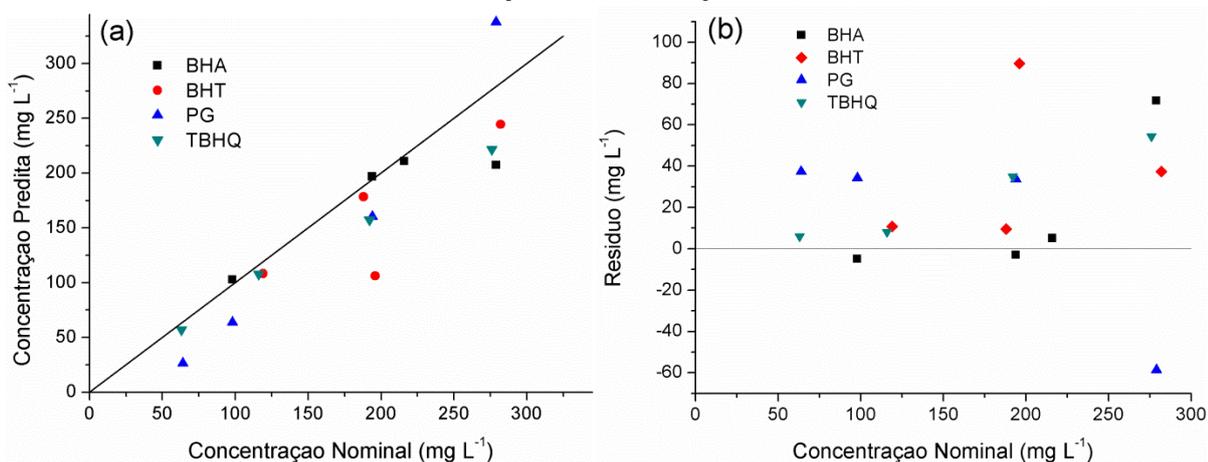
Por sua simplicidade e fácil aplicação, foi construído um modelo quimiométrico através de regressão por CLS (Equação 5), para a qual, como matriz de respostas (R), foi utilizada a matriz de intensidade de correntes (I) obtida dos voltamogramas. As concentrações estimadas foram calculadas pela Equação 6. As métricas RMSE e %RE foram calculadas a partir das concentrações nominais e estimadas. A Tabela 6 apresenta esses resultados. Observa-se que o modelo apresenta erros de predição elevados, até mesmo para os próprios dados de calibração.

Tabela 6. RMSE e %RE de calibração e de predição para a regressão por CLS

	<i>BHA</i>	<i>BHT</i>	<i>PG</i>	<i>TBHQ</i>	<i>TOTAL</i>
RMSEC [mg L ⁻¹]	32,2	67,2	54,3	21,2	47,3
%REC	23,6	48,7	39,8	15,7	34,7
RMSEP [mg L ⁻¹]	39,6	56,7	50,8	36,9	46,7
%REP	20,1	28,9	32,0	22,8	26,2

A Figura 16(a) apresenta a relação entre concentrações reais e preditas para o modelo aplicado aos dados de validação. A distribuição dos resíduos de predição do modelo pode ser observada na Figura 16(b). Através da análise dessa figura, é possível visualizar que existe uma tendência na qual os valores preditos ficaram abaixo dos nominais.

Figura 16. Concentrações nominais *versus* preditas (a) e concentrações nominais *versus* resíduos (b) para BHA, BHT, PG e TBHQ do modelo construído por CLS aplicado ao conjunto de validação.



Fica evidente também que as predições para BHT e PG apresentam os erros maiores, o que está de acordo com os resultados obtidos no estudo dos antioxidantes puros.

4.2.2 Modelagem por PLS

Para a construção do modelo de regressão por mínimos quadrados parciais foi utilizada a função *plsregress* do Matlab que realiza uma regressão de Y em X, onde X é a matriz das variáveis preditoras, neste caso as intensidades de corrente do voltamograma (I), e Y a concentração dos antioxidantes (C). Enquanto a matriz original (I) possui 150 variáveis independentes, na regressão por PLS foram utilizadas 10 variáveis latentes (ou fatores), que se mostraram suficientes para explicar 95% da variância em (C), conforme apresentado na Tabela 7. O método de validação cruzada *leave-one-out* foi utilizado para encontrar o número ótimo de fatores.

Tabela 7. Porcentagem da variância original em (C) explicada pelas variáveis latentes

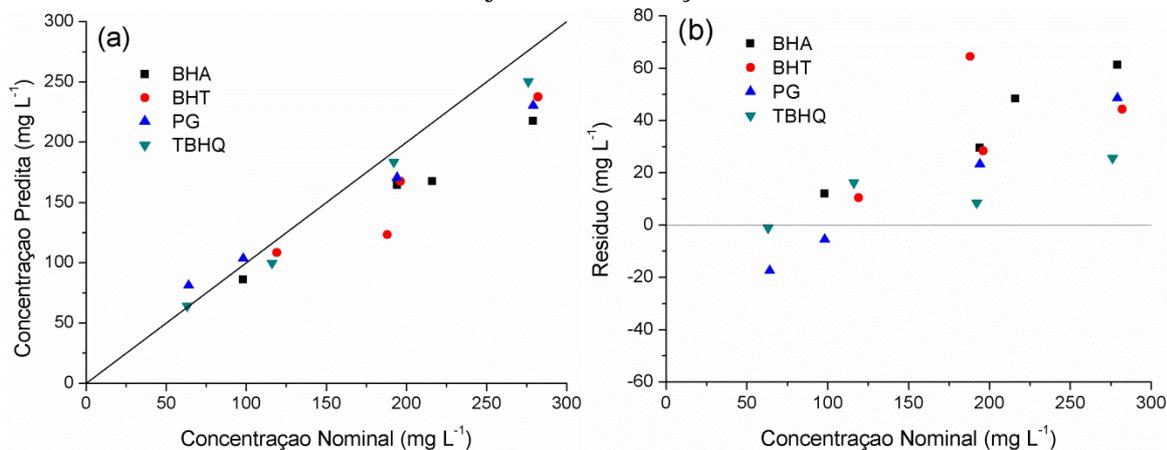
<i>Nº de variáveis latentes</i>	<i>% de variância explicada</i>
1	39,71
2	14,12
3	12,46
4	12,86
5	3,18
6	4,24
7	3,18
8	2,20
9	2,09
10	1,21
11	0,66
12	0,41

A Tabela 8 apresenta os valores das métricas RMSE e %RE, calculadas a partir das concentrações estimadas e nominais. Apesar de um melhor ajuste aos dados de calibração e, portanto, menores erros de predição para esse conjunto, a predição para o conjunto de validação apresentou erros relativos percentuais de 19,0%.

Tabela 8. RMSE e %RE de calibração e predição para a regressão por PLS

	<i>BHA</i>	<i>BHT</i>	<i>PG</i>	<i>TBHQ</i>	<i>TOTAL</i>
RMSEC [mg L ⁻¹]	17,5	21,5	18,2	12,4	17,7
%REC	12,8	15,6	13,3	9,2	12,9
RMSEP [mg L ⁻¹]	27,4	37,7	39,7	29,2	33,9
%REP	13,9	19,2	25,0	18,1	19,0

A Figura 17(a) apresenta a relação entre concentrações reais e preditas para o modelo aplicada aos dados de validação. A distribuição dos resíduos pode ser observada na Figura 17(b). Neste caso, também se observa uma tendência de valores preditos abaixo dos nominais, no entanto, em menor proporção do que para a regressão por CLS. Os valores dos resíduos da regressão por PLS são inferiores, com valor máximo em torno de 60 mg L⁻¹, enquanto para o modelo por CLS esse valor chega até 100 mg L⁻¹.

Figura 17. Concentrações nominais *versus* preditas (a) e concentrações nominais *versus* resíduos (b) para BHA, BHT, PG e TBHQ do modelo construído por PLS aplicado ao conjunto de validação.

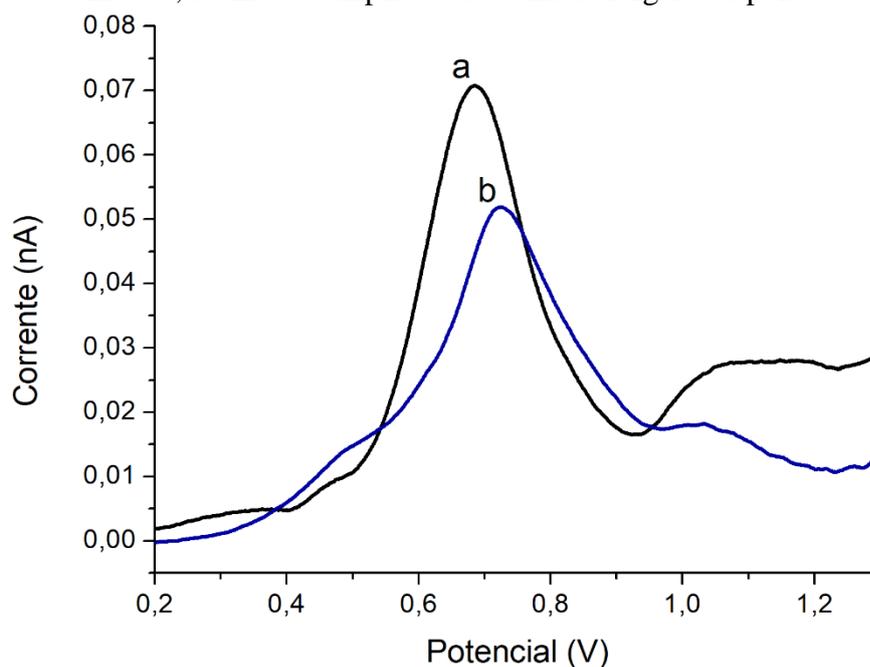
A comparação entre essas duas técnicas confirma o resultado obtido por Ni et al. (2011) na determinação de herbicidas por voltametria de pulso diferencial e em (2000) na determinação de antioxidantes em amostras de alimentos. Os autores observaram que a regressão por CLS apresenta desempenho bastante inferior aos demais métodos testados com %REP de 10 e 20%, respectivamente, enquanto que na regressão por PLS encontraram %REP de 4,1% e 8,16%.

A diferença de desempenho entre as duas metodologias pode ser explicada pela redução no número de variáveis explicativas que a transformação feita pelo PLS produz.

Assim, o modelo é ajustado apenas para a informação relevante contida nos conjuntos de dados I e C o que contribuiu para um ajuste superior ao CLS.

Ainda assim, ambas as técnicas, CLS e PLS, apresentaram erros elevados, pois só conseguem prever comportamentos lineares. Apesar das curvas de calibração para os antioxidantes puros mostrarem comportamento linear entre concentrações e correntes, não se pode afirmar que esse comportamento é válido também para misturas, uma vez que podem existir interações químicas ou físicas entre eles. Para avaliar se o sinal do voltamograma dos antioxidantes em mistura seria realmente diferente da combinação linear dos sinais individuais, foi realizada varredura de pulso diferencial numa amostra de biodiesel aditivada com os quatro antioxidantes na mesma concentração (194 mg L^{-1}).

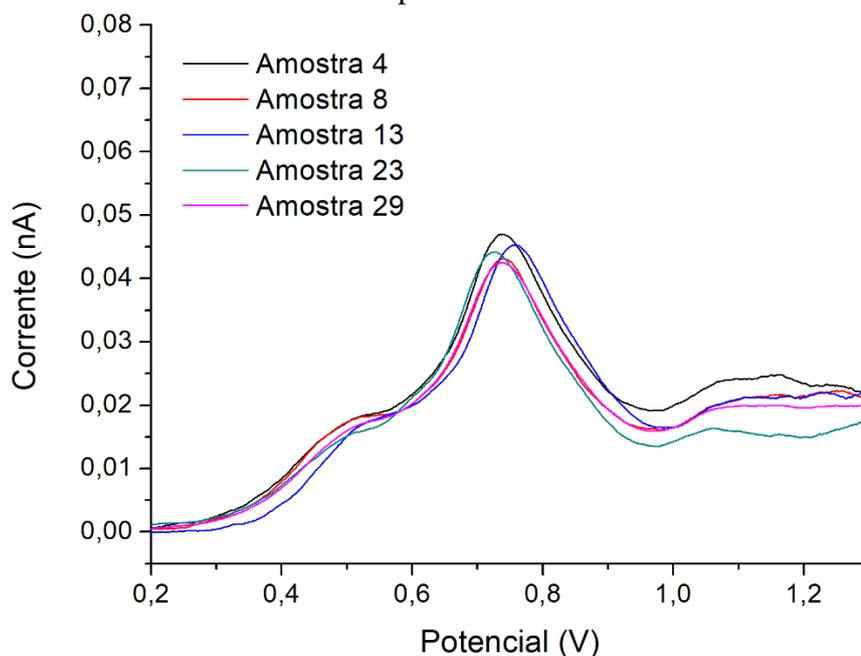
Figura 18. Soma do sinal individual dos quatro antioxidantes ponderados pela concentração (a) e mistura experimental (b), ambos com 194 mg L^{-1} de cada antioxidante. Varredura a 5 mV s^{-1} , 50 mV de amplitude e 50 ms de largura de pulso.



A Figura 18 apresenta a soma dos sinais individuais e a resposta da varredura por voltametria de pulso diferencial dessa mistura. A diferença entre as duas curvas foi comparada com o erro experimental da técnica voltamétrica, que pode ser visualizado na Figura 19, onde são apresentadas as respostas para as cinco repetições no ponto central do planejamento experimental. Os desvios foram comparados através do teste F, sendo a diferença entre a soma e a resposta experimental estatisticamente maior que o erro experimental com 95% de confiança. Assim, confirma-se que o comportamento em mistura é

diferente e que as respostas não são aditivas. Desta forma, supõe-se que interações ou fenômenos difusivos distintos ocorrem entre os antioxidantes e, por essa razão, os modelos construídos pelas regressões lineares CLS e PLS não apresentaram boa predição.

Figura 19. Voltamogramas de pulso diferencial para as amostras 4, 8, 13, 23 e 29 do planejamento experimental. Varredura a 5 mV s^{-1} , 50 mV de amplitude e 50 ms de largura de pulso.



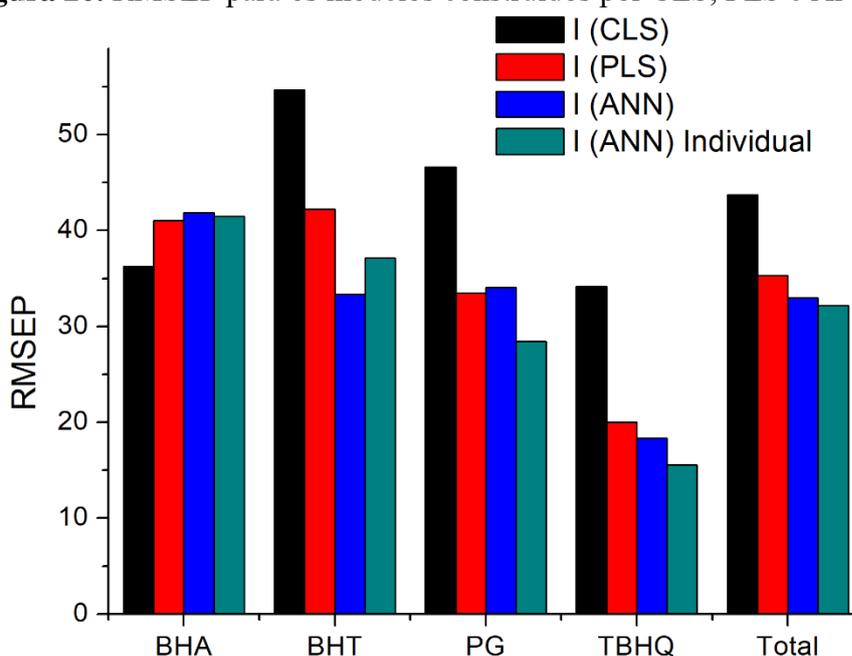
4.2.3 Modelagem por Redes Neurais

Visando construir um modelo para a predição das concentrações de antioxidantes capaz de considerar a não-linearidade do voltamograma das misturas, utilizaram-se as redes neurais. A arquitetura das redes foi implementada pela função *fitnet* do Matlab que constrói uma rede do tipo *feed-forward* e tem como parâmetros o número de neurônios da camada oculta e o algoritmo de treinamento. O algoritmo de treinamento que apresentou melhores resultados foi o algoritmo de Levenberg-Marquardt com regularização Bayesiana. O número de neurônios na camada oculta foi otimizado por tentativa e erro até se obter aquele que minimizasse o valor de RMSEP, para este caso 4 neurônios.

Para se treinar a rede foi utilizada a função *train* do Matlab, com a matriz (I) como entrada e matriz (C) como saída. A rede foi treinada com as 33 amostras do conjunto de calibração, considerando 70% das amostras para aprendizagem, 15% para monitoramento e outros 15% para teste.

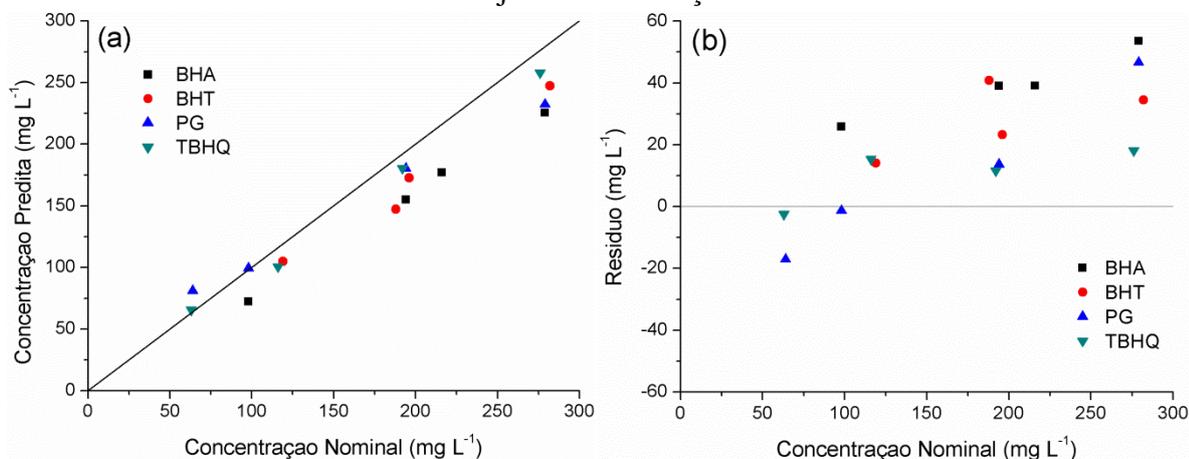
No entanto, diferentemente do esperado, as redes neuronais apresentaram desempenho similar ao PLS, conforme mostra a Figura 20. Apesar do erro relativo percentual encontrado de 16,8% ser menor, para alguns antioxidantes os erros foram superiores à predição da regressão por PLS. Esse resultado pode ser explicado devido a um possível excesso de informação nos dados de entrada, de maneira que a rede acaba se ajustando a informações que não tem correlação com a concentração. Esse excesso de informação pode estar relacionado com o uso de todos os pontos do voltamograma no treinamento da rede, sendo que nem todas as medições de corrente são necessariamente relacionadas às reações de oxidação dos antioxidantes. Outra explicação possível seria que, durante o treinamento, as redes tenham convergido a mínimos locais. Também foi testado construir uma rede neuronal para cada antioxidante, mas a diferença observada foi pequena (redução do %REP de 16,8% para 16,0%) não compensando o esforço para o treinamento de quatro redes.

Figura 20. RMSEP para os modelos construídos por CLS, PLS e ANN's



Pela análise da Figura 21, que apresenta a relação entre concentrações reais e preditas (a) e a distribuição dos resíduos (b) para o modelo construído com as redes neuronais, se confirma que não houve melhora significativa da predição e da distribuição dos resíduos com a aplicação das ANN's.

Figura 21. Concentrações nominais *versus* preditas (a) e concentrações nominais *versus* resíduos (b) para BHA, BHT, PG e TBHQ do modelo construído por ANN's aplicado ao conjunto de validação.



4.2.3.1 Estratégia Baseada em Propriedades do Voltamograma

Com o objetivo de reduzir o excesso de informações dos dados na construção do modelo, a fim de melhorar a predição, foram extraídas diferentes propriedades do voltamograma para serem utilizadas como entradas no treinamento da rede.

Para cada entrada testada, o número de neurônios na camada oculta foi otimizado por tentativa e erro até se obter aquele que minimizasse o valor de RMSEP. A Tabela 9 apresenta a melhor configuração da rede para cada entrada. Neste caso, o algoritmo de Levenberg-Marquardt com regularização Bayesiana também apresentou melhor desempenho.

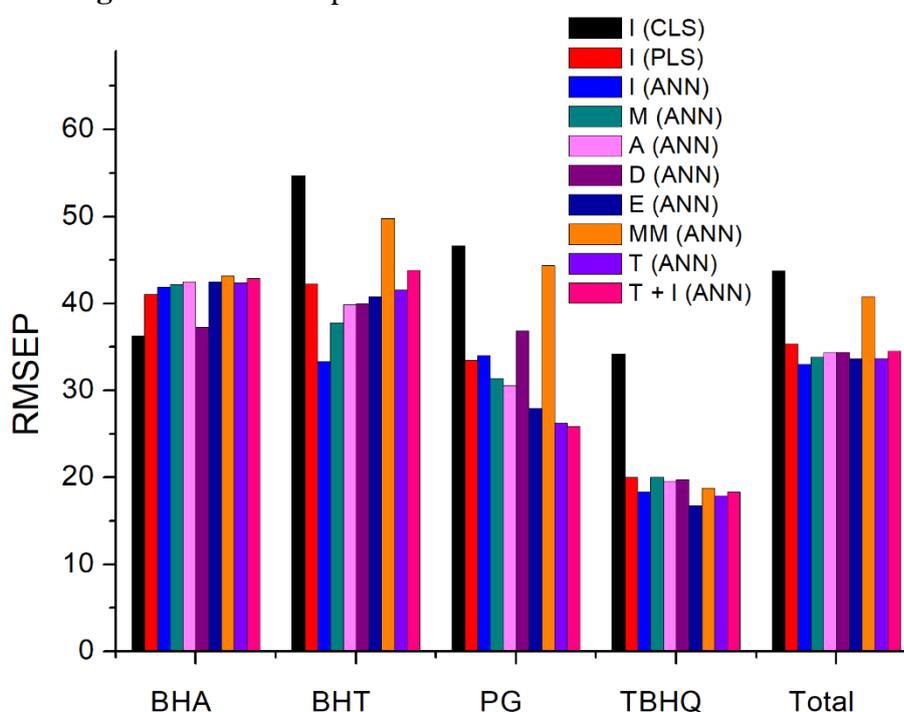
Tabela 9. Número de neurônios utilizados na camada oculta para diferentes entradas (para cada voltamograma)

<i>Entrada</i>	<i>Nº variáveis de entrada</i>	<i>Neurônios na camada oculta</i>
Intensidades de corrente do voltamograma (I)	150	4
Média (M)	9	4
Integral (A)	9	4
Derivada (D)	9	5
Energia (E)	9	4
Máx e Mín (MM)	18	6
Todas (T)	54	4
(T) + (I)	204	4

Após a etapa de treinamento, o modelo foi aplicado ao conjunto de validação e as métricas RMSEP e %REP foram calculadas. De maneira geral, a diferença total dos modelos construídos com as propriedades para os modelos construídos anteriormente por PLS e ANN à partir do voltamograma inteiro (I) foi de menos de 1%. A exceção foi o modelo com valores máximos e mínimos do sinal (MM), que apresentou erros 5% maiores.

Por outro lado, para cada antioxidante, propriedades diferentes apresentaram melhor desempenho: a derivada (D) para o BHA, o voltamograma inteiro (I) para o BHT, todos juntos (T+I) para o PG e a energia (E) para o TBHQ. Esse resultado pode ser visualizado na Figura 22 que apresenta os valores de RMSEP para as diferentes entradas.

Figura 22. RMSEP para os modelos com diferentes entradas



Pode-se observar também que a predição para alguns antioxidantes apresenta erros maiores do que para outros. A predição para o TBHQ apresenta o menor erro relativo percentual 13,1%, enquanto para BHT chega a 22,0% e BHA a 22,5%. Uma possível explicação para esse resultado é que TBHQ se oxida no potencial menos positivo, antes de começar a oxidação dos demais, logo parte do sinal desse antioxidante não sofre sobreposição com os demais e há mais dados diretamente relacionados à concentração de TBHQ disponíveis para construção do modelo.

4.2.3.2 Estratégia Baseada na Redução de Dimensionalidade da Entrada

Com o objetivo de melhorar a predição, uma redução do tamanho do conjunto de entrada foi implementada de forma a diminuir a quantidade de informação não relevante e treinar a rede apenas com as variáveis realmente relacionadas à concentração dos antioxidantes.

4.2.3.3 Redução por PCA

Neste caso, todos os pontos do voltamograma de cada mistura passaram pela análise por componentes principais e os escores dessa análise foram aplicados como entrada no treinamento da rede neuronal. A Tabela 10, apresenta os PC's e a variância (fornecida pela PCA através dos autovalores da matriz de covariância) explicada por cada um. Assim, com quatro componentes principais 95% da variância total dos dados originais é explicada.

Tabela 10. Porcentagem da variância dos dados originais explicada pelos PCs

<i>Nº de PC's</i>	<i>% de variância explicada</i>
1	66,95
2	18,74
3	8,57
4	2,68
5	1,54
6	0,89
7	0,28
8	0,17

Três modelos foram construídos, com 5, 10 e 15 PC's. A Tabela 11 apresenta o número de neurônios na camada oculta utilizado em cada modelo para minimizar o RMSEP.

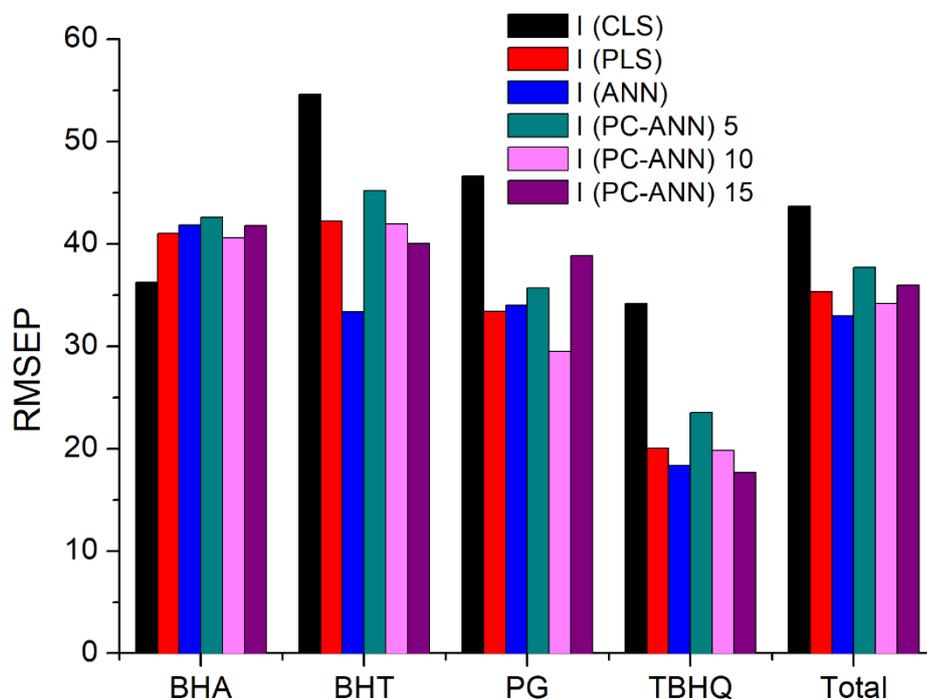
Tabela 11. Número de neurônios utilizados na camada oculta

<i>Nº de PC's</i>	<i>Nº variáveis de entrada</i>	<i>Neurônios na camada oculta</i>
5	5	3
10	10	5
15	15	8

Conforme pode ser visto na Figura 23, houve melhora na predição de BHA e PG quando se utilizou 10 PC's, no entanto, independentemente do número de componentes

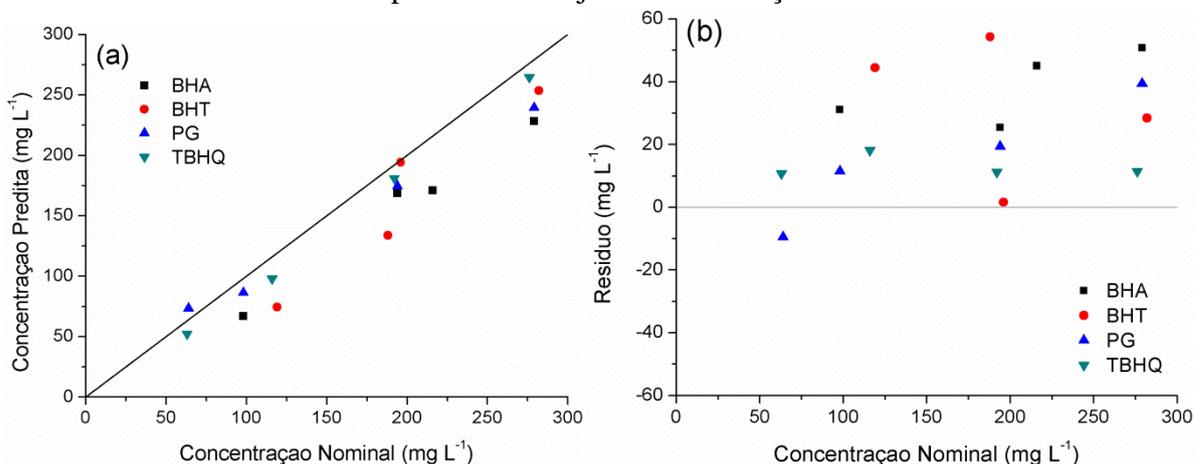
principais, não houve melhora na capacidade de predição geral do modelo, apresentando erros 3,02%, 0,75%, 1,90% maiores para 5, 10 e 15 PC's, respectivamente.

Figura 23. RMSEP e %REP para os modelos construídos com CLS, PLS, ANN e PC-ANN



Através da análise da Figura 24 (a), que apresenta a relação entre concentrações reais e preditas para o modelo construído com 10 PC's aplicado ao conjunto de validação, é visível que não houve melhora na predição. A distribuição dos resíduos, que pode ser observada na Figura 24 (b), também é semelhante à distribuição do modelo sem seleção de variáveis.

Figura 24. Concentrações nominais *versus* preditas (a) e concentrações nominais *versus* resíduos (b) para BHA, BHT, PG e TBHQ do modelo construído por PC-ANN com 10 PC's aplicado ao conjunto de validação.



Uma razão para esse resultado é o fato de que a decomposição dos dados realizada por PCA considera apenas as informações presentes nos voltamogramas, sem relacioná-las com as concentrações dos antioxidantes.

4.2.3.4 Seleção por DT's

A fim de verificar qual o melhor conjunto de variáveis para serem empregadas como entradas do modelo, foi empregada a técnica das Árvores de Decisão. A metodologia foi aplicada tanto para o modelo com os todos os pontos do voltamograma, quanto para aqueles com as propriedades extraídas dos voltamogramas.

Para otimizar a seleção das propriedades, primeiramente foi extraído o número máximo de propriedades possíveis por meio de diferentes segmentações do voltamograma, ou seja, dividindo-se o mesmo em 1, 2, 5, 10, etc. partes. Para cada particionamento diferente, foi extraída uma propriedade em cada segmento. Ao final obteve-se um total de aproximadamente 570 valores para cada propriedade. Então, foi feita a seleção das propriedades mais importantes por meio das Árvores de Decisão.

Essa seleção foi realizada separadamente para cada antioxidante e cada rede neuronal, de maneira que fossem escolhidas as propriedades mais adequadas para a quantificação de cada um, contornando assim a diferença na capacidade predição entre os antioxidantes que ocorria nos modelos anteriores. Como o número de propriedades selecionadas foi diferente para cada antioxidante, foi construída uma rede neuronal para cada um. A Tabela 12 apresenta o número de variáveis selecionadas pelas DT's em cada voltamograma para cada propriedade usada como entrada.

Tabela 12. Número de variáveis de entrada da rede para cada antioxidante após seleção por DT's

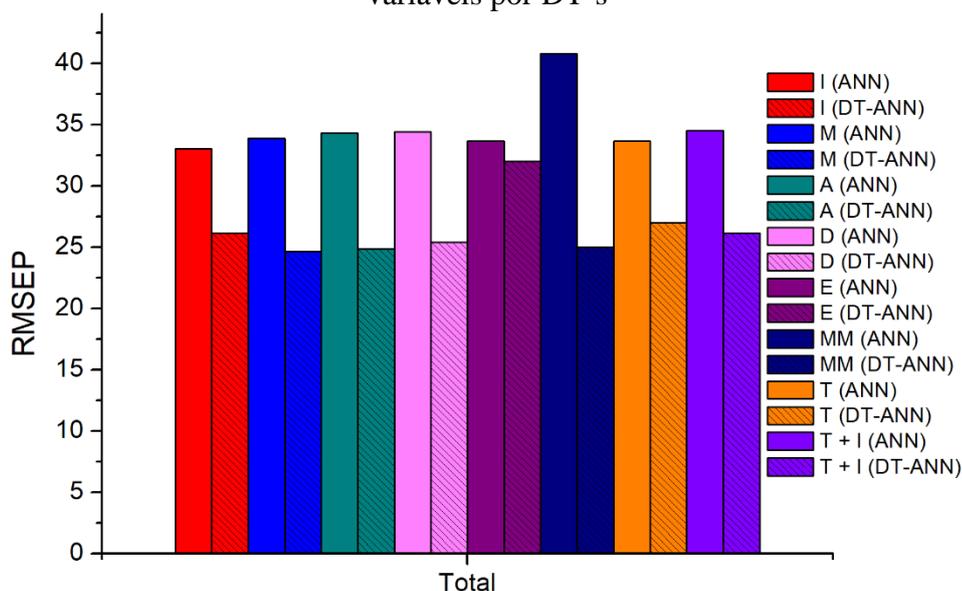
	<i>I</i>	<i>M</i>	<i>A</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>MM</i>	<i>T</i>	<i>T+I</i>
BHA	35	34	34	33	32	36	41	41
BHT	38	22	22	26	24	18	21	23
PG	36	29	26	23	26	26	28	27
TBHQ	33	39	36	35	40	40	43	42

Para cada conjunto de dados de entrada, o número de neurônios na camada oculta e o algoritmo de treinamento foram otimizados por tentativa e erro até se obter aquele que minimizasse o valor de RMSEP. Para todos os casos, os melhores resultados foram obtidos

com o algoritmo *lbfgs*, que utiliza o método de Quasi-Newton e com 20 neurônios na camada oculta.

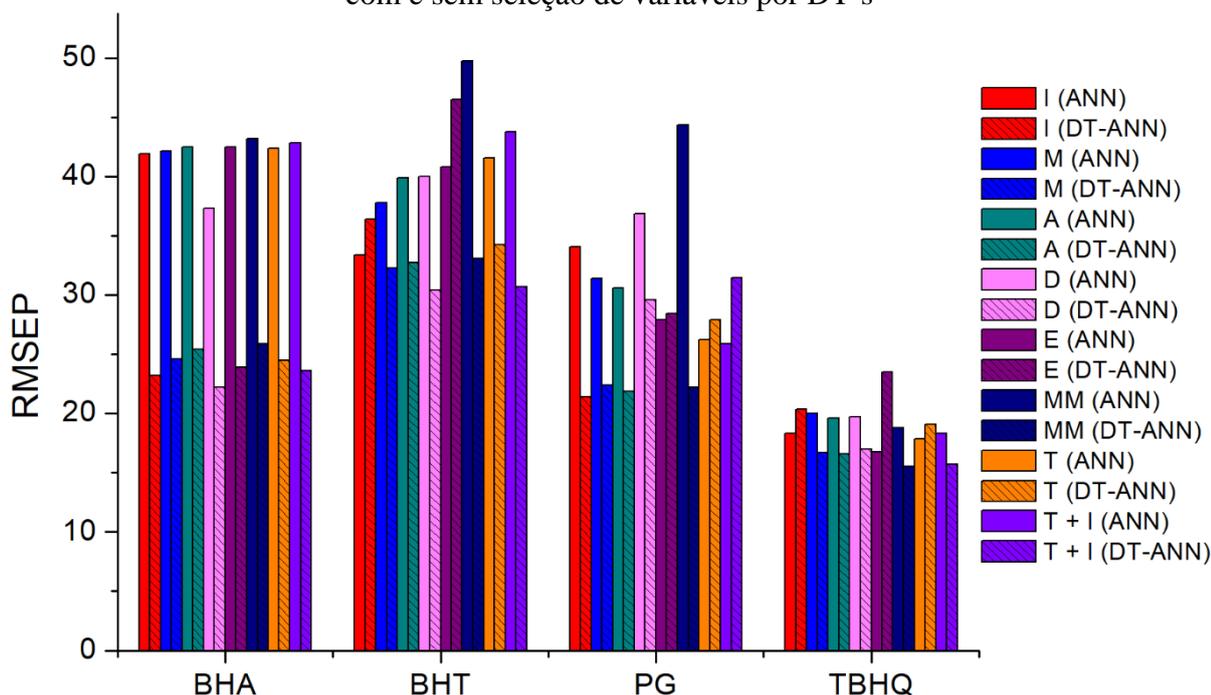
A seleção de variáveis pela Árvore de Decisão permitiu obter modelos melhores, como por ser visto na Figura 25. Em média, os erros relativos de predição obtidos foram de 16,5%, uma redução de 8,5%.

Figura 25. RMSEP total para os modelos construídos por ANN's com e sem seleção de variáveis por DT's



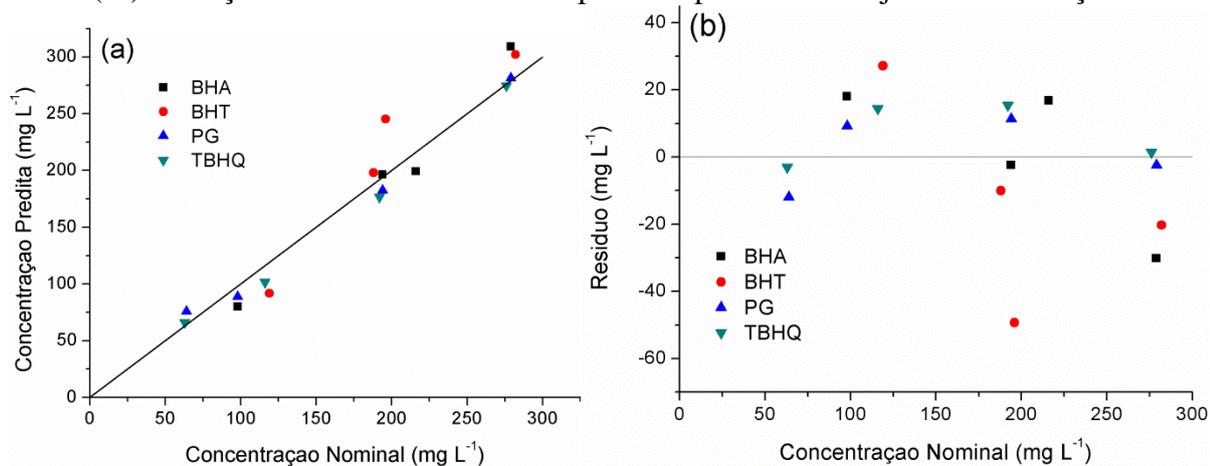
O RMSEP para cada antioxidante em separado é apresentado na Figura 26. Conclui-se que o uso da seleção de variáveis permitiu significativa melhora na predição visto que, foram usadas variáveis diferentes para cada antioxidante. A melhora ocorreu principalmente para o BHA, onde os erros de predição tiveram diminuição de 28,3%. Para o BHT a redução foi de 6,5%, para o PG de 10,3% e para o TBHQ 3,3%.

Figura 26. RMSEP para BHA, BHT, PG e TBHQ para os modelos construídos por ANN's com e sem seleção de variáveis por DT's



Por fim, a Figura 27 mostra que o ajuste dos modelos aos dados de validação após a seleção de variáveis pelo método DT é melhor e confirma a efetividade do mesmo, uma vez que os outros modelos, e até mesmo a seleção de variáveis por PCA, apresentaram desempenho inferior.

Figura 27. Concentrações nominais *versus* preditas (a) e concentrações nominais *versus* resíduos (b) para BHA, BHT, PG e TBHQ do modelo construído por ANN's com as médias (M) e seleção de variáveis de entrada por DT aplicado ao conjunto de validação.

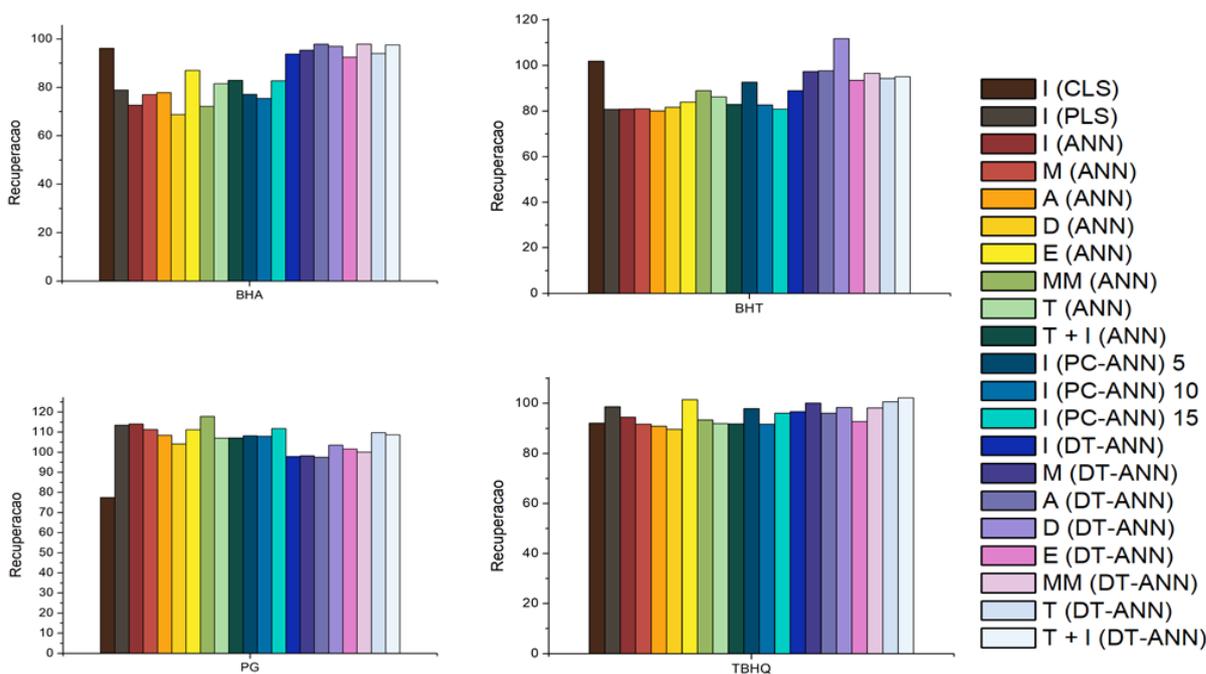


4.3 Recuperação dos Analitos

A porcentagem de recuperação foi calculada a partir das quantidades de antioxidantes adicionadas nas 20 amostras do conjunto de validação. A Figura 28 apresenta a comparação entre as recuperações obtidas para cada antioxidante em cada modelo construído. Através desses dados, se confirma que tanto os modelos lineares como os construídos com as redes neurais sem seleção de variáveis não conseguiram prever corretamente as quantidades adicionadas. Também não houve diferença significativa para os valores de recuperação entre as diferentes propriedades utilizadas como entrada.

Os valores de recuperação obtidos após a seleção de entradas pela Árvore de Decisão foram os melhores, recuperando quase 100% do valor adicionado. Além disso, a seleção de variáveis individualizada permitiu corrigir as diferenças entre o percentual recuperado entre os analitos.

Figura 28. Valores de recuperação obtidos para BHA, BHT, PG e TBHQ por cada modelo



Capítulo 5

Conclusões

Neste capítulo, são apresentadas as conclusões e considerações finais desse trabalho e sugestões para trabalhos futuros.

5.1 Conclusões e Considerações Finais

Os estudos desenvolvidos neste trabalho mostraram a possibilidade de determinação simultânea de BHA, BHT, PG e TBHQ em amostras de biodiesel por meio de técnicas voltamétricas em conjunto com a modelagem quimiométrica.

No estudo do comportamento individual dos antioxidantes, as medidas realizadas por voltametria de pulso diferencial em meio biodiesel:etanol 1:1 (v/v) com um *ume* de Pt mostraram uma relação linear entre a concentração do antioxidante e a corrente de oxidação. As curvas analíticas construídas para cada um dos quatro antioxidantes apresentaram fatores de correlação de 0,99031, 0,99176, 0,98465 e 0,99984 para BHA, BHT, PG e TBHQ, respectivamente. Os limites de detecção obtidos são da ordem de 20,5 a 35,5 mg L⁻¹.

Os resultados evidenciaram que a resposta eletroquímica para os antioxidantes puros é diferente daquela dos mesmos em mistura no biodiesel. Esta observação indica a existência de interações entre os compostos ou diferentes fenômenos difusivos, de maneira que não há uma relação linear entre as correntes medidas e as concentrações dos antioxidantes quando há mais de um presente na amostra. Contudo, a regressão por PLS ainda se mostrou satisfatória para contornar o problema da sobreposição de sinais nos voltamogramas das misturas multicomponentes. Como é uma ferramenta simples, seu uso é indicado em aplicações onde não é requerida grande precisão. Os erros relativos de predição obtidos através dos modelos

lineares construídos por calibração multivariada foram de 26,2% e 19,0% para CLS e PLS, respectivamente.

O modelo não linear, construído através das redes neuronais, sem pré-tratamento da entrada, apresentou erro relativo de predição de 17,9%, próximo ao obtido no modelo linear de regressão por PLS. A redução da dimensionalidade dos dados por PCA, aplicada previamente ao treinamento das ANN's, acarretou em um aumento de 10,2% no erro de relativo predição em relação ao modelo sem seleção. Por outro lado, a seleção de variáveis por DT reduziu, em média, os erros relativos de predição em 8,5%. Os modelos construídos por meio de redes neuronais e seleção de variáveis por DT apresentaram valores médios de recuperação de 96% para BHA, 97% para BHT, 102% para PG e 98% para TBHQ. A seleção de variáveis diferentes para cada antioxidante permitiu também corrigir as diferenças nos erros relativos de predição entre os analitos.

Os modelos construídos por redes neuronais a partir das propriedades extraídas do voltamograma não apresentaram redução significativa no erro médio de predição quando comparados àqueles construídos através da utilização das intensidades de corrente dos voltamogramas inteiros.

Por fim, os resultados obtidos e a precisão satisfatória encontrada indicam que a voltametria de pulso diferencial associada a uma modelagem quimiométrica com redes neuronais e seleção de variáveis por árvores de decisão é uma alternativa viável. A resposta rápida, o baixo custo e baixa geração de resíduos são vantagens da metodologia que favorecem sua aplicação na determinação desses antioxidantes no controle de qualidade de biodiesel e análises de monitoramento na planta industrial.

5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros

Alguns aspectos relacionados a este trabalho podem ser estudados com maior profundidade de maneira a estender a aplicação da metodologia.

Uma sugestão é avaliar em detalhes as situações onde a validade do modelo se mantém, pois sabe-se que as amostras de biodiesel apresentam propriedades diferentes conforme a origem, conseqüentemente há diferenças na ação dos antioxidantes. Com este objetivo, pode-se testar a validade dos modelos construídos em biodiesel oriundo de outras fontes oleosas, bem como para amostras com diferentes tempos de armazenamento. A

expansão da capacidade de predição para concentrações de misturas de um, dois ou três componentes também é interessante. Um novo planejamento experimental pode ser realizado incluindo como variáveis todos esses fatores, assim a aplicação dos novos modelos construídos será maior.

Outra proposta seria realizar um estudo termodinâmico do comportamento eletroquímico desses compostos no meio biodiesel:etanol com o objetivo de desenvolver um modelo teórico para prever as interações entre eles.

Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Resolução ANP nº 45, de 25 de agosto de 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Boletim Mensal do Biodiesel, Dezembro 2016. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 2/6/2017.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Sistema de Movimentação de Produtos da ANP 2017. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 20/8/2017.

ARAUJO, T. A. DE; BARBOSA, A. M. J.; VIANA, L. H.; FERREIRA, V. S. Electroanalytical determination of TBHQ, a synthetic antioxidant, in soybean biodiesel samples. **Fuel**, v. 90, n. 2, p. 707–712, 2011.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: A Practical Guide**. John Wiley & Sons, 1998.

BESSANT, C.; SAINI, S. Simultaneous determination of ethanol, fructose, and glucose at an unmodified platinum electrode using artificial neural networks. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2806–2813, 1999.

BOND, A. M. Past, present and future contributions of microelectrodes to analytical studies employing voltammetric detection. A review. **The Analyst**, v. 119, n. 11, p. 1R–21R, 1994.

BOUAID, A.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. **Fuel**, v. 86, n. 16, p. 2596–2602, 2007.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 14 jan. 2005. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111097.htm>. Acesso em: 2/6/2017.

BRASIL. Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 25 set 2014. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2014/Lei/L13033.htm>. Acesso em: 18/6/2017.

BRASIL. Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 24 mar. 2006. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2016/lei/L13263.htm>. Acesso em: 18/5/2017.

BRERETON, R. G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Inc., 2003.

CARAMIT, R. P.; ANTUNES ARAÚJO, A. S.; FOGLIATTO, D. K.; et al. Carbon-nanotube-modified screen-printed electrodes, a cationic surfactant, and a peak deconvolution procedure: alternatives to provide satisfactory simultaneous determination of three synthetic antioxidants in complex samples. **Analytical Methods**, v. 7, p. 3764–3771, 2015.

CARAMIT, R. P.; FREITAS ANDRADE, A. G. DE; GOMES DE SOUZA, J. B.; et al. A new voltammetric method for the simultaneous determination of the antioxidants TBHQ and BHA in biodiesel using multi-walled carbon nanotube screen-printed electrodes. **Fuel**, v. 105, p. 306–313, 2013.

CAUMO, L. **Aplicação e Cálculo da Derivada de Sinais de Processos Industriais**. 2006. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CEBALLOS, C.; FERNÁNDEZ, H. Synthetic antioxidants in edible oils by square-wave voltammetry on ultramicroelectrodes. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 7, p. 731–735, 2000.

CETÓ, X.; O'MAHONY, A. M.; WANG, J.; VALLE, M. DEL. Simultaneous identification and quantification of nitro-containing explosives by advanced chemometric data treatment of cyclic voltammetry at screen-printed electrodes. **Talanta**, v. 107, p. 270–276, 2013.

DOMINGOS, A. K.; SAAD, E. B.; VECHIATTO, W. W. D.; WILHELM, H. M.; RAMOS, L. P. The influence of BHA, BHT and TBHQ on the oxidation stability of soybean oil ethyl esters (biodiesel). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 416–423, 2007.

DUNN, R. O. Antioxidants for improving storage stability of biodiesel. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, p. 304–318, 2008.

ESTEBAN, M.; ARIÑO, C.; DÍAZ-CRUZ, J. M. Chemometrics for the analysis of voltammetric data. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 86–92, 2006.

FORSTER, R. J. Microelectrodes: new dimensions in electrochemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 23, n. 4, p. 289, 1994.

GALEANO DIAZ, T.; GUIBERTEAU CABANILLAS, A.; ALEXANDRE FRANCO, M. F.; SALINAS, F.; VIRÉ, J.-C. Voltammetric Behavior and Simultaneous Determination of the

Antioxidants Propyl Gallate, Butylated Hydroxyanisole, and Butylated Hydroxytoluene in Acidic Acetonitrile-Water Medium Using PLS Calibration. **Electroanalysis**, v. 10, n. 7, p. 497–505, 1998.

GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. **Spectrochimica Acta - Part B**, v. 58, n. 5, p. 767–782, 2003.

GÉRON, A. **Hands-On Machine Learning with Scikit-Learn and TensorFlow**. 1st ed. O'Reilly Media, 2017.

GHOLIVAND, M. B.; JALALVAND, A. R.; GOICOECHEA, H. C.; et al. Combination of electrochemistry with chemometrics to introduce an efficient analytical method for simultaneous quantification of five opium alkaloids in complex matrices. **Talanta**, v. 131, p. 26–37, 2015.

GOULART, L. A.; TEIXEIRA, A. R. L.; RAMALHO, D. A.; TEREZO, A. J.; CASTILHO, M. Development of an analytical method for the determination of tert-butylhydroquinone in soybean biodiesel. **Fuel**, v. 115, p. 126–131, 2014.

GUZMAN, R. DE; TANG, H.; SALLEY, S.; NG, K. Y. S. Synergistic effects of antioxidants on the oxidative stability of soybean oil- and poultry fat-based biodiesel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 5, p. 459–467, 2009.

HENAO-ESCOBAR, W.; DOMÍNGUEZ-RENEDO, O.; ALONSO-LOMILLO, M. A.; ARCOS-MARTÍNEZ, M. J. Resolution of quaternary mixtures of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by the square wave voltammetry and partial least squares method. **Talanta**, v. 143, p. 97–100, 2015.

HOFFMANN DA ROCHA, A. A.; CASAGRANDE, M.; SOUZA SCHAUMLÖFFEL, L. DE; SILVA, Y. P. DA; SARTORI PIATNICKI, C. M. Simultaneous Voltammetric Determination of tert -Butylhydroquinone and Propyl Gallate in Biodiesel–Ethanol at a Pt Ultramicroelectrode. **Energy & Fuels**, v. 31, n. 7, p. 7076–7081, 2017.

HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1–2, p. 365–377, 2003.

IVES, D. J. G.; JANZ, G. J. **Reference Electrodes: Theory and Practice**. New York: Academic Press, 1961.

KADLEC, P.; GABRYS, B.; STRANDT, S. Data-driven Soft Sensors in the process industry. **Computers and Chemical Engineering**, v. 33, n. 4, p. 795–814, 2009.

KHOABI, A.; GHOREISHI, S. M.; MASOUM, S.; BEHPOUR, M. Multivariate curve resolution-alternating least squares assisted by voltammetry for simultaneous determination of betaxolol and atenolol using carbon nanotube paste electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 94, p. 100–107, 2013.

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

KUMARI, P.; RAJESWARI, K. Selection of Significant Features Using Decision Tree Classifiers. **Int. Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 6, p. 48–51,

2014.

KUNDU, P. K.; PANCHARIYA, P. C.; KUNDU, M. Classification and authentication of unknown water samples using machine learning algorithms. **ISA Transactions**, v. 50, n. 3, p. 487–495, 2011.

LEUNG, D. Y. C.; KOO, B. C. P.; GUO, Y. Degradation of biodiesel under different storage conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 250–256, 2006.

LOZADA, I.; ISLAS, J.; GRANDE, G. Environmental and economic feasibility of palm oil biodiesel in the Mexican transportation sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 486–492, 2010.

MAJIDI, M. R.; JOUYBAN, A.; ASADPOUR-ZEYNALI, K. Genetic algorithm based potential selection in simultaneous voltammetric determination of isoniazid and hydrazine by using Partial Least Squares (PLS) and Artificial Neural Networks (ANNs). **Electroanalysis**, v. 17, n. 10, p. 915–918, 2005.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; DEMING, S. N.; MICHOTTE, Y.; KAUFMAN, L. **Chemometrics: a textbook**. 1st ed. Elsevier, 1998.

MONTEIRO, T. O.; YOTSUMOTO NETO, S.; DAMOS, F. S.; LUZ, R. D. C. S. Development of a photoelectrochemical sensor for detection of TBHQ antioxidant based on LiTCNE-TiO₂ composite under visible LED light. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 774, p. 36–41, 2016.

MYLES, A. J.; FEUDALE, R. N.; LIU, Y.; WOODY, N. A.; BROWN, S. D. An introduction to decision tree modeling. **Journal of Chemometrics**, v. 18, n. 6, p. 275–285, 2004.

NI, Y.; KOKOT, S. Does chemometrics enhance the performance of electroanalysis? **Analytica Chimica Acta**, v. 626, n. 2, p. 130–146, 2008.

NI, Y.; WANG, L.; KOKOT, S. Voltammetric determination of butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, propyl gallate and tert-butylhydroquinone by use of chemometric approaches. **Analytica Chimica Acta**, v. 412, p. 185–193, 2000.

NI, Y.; WANG, L.; KOKOT, S. Simultaneous determination of three herbicides by differential pulse voltammetry and chemometrics. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 46, n. 5, p. 328–335, 2011.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. V. G. K. DE; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltamétrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PALACIOS-SANTANDER, J. M.; CUBILLANA-AGUILERA, L. M.; NARANJO-RODRÍGUEZ, I.; HIDALGO-HIDALGO-DE-CISNEROS, J. L. A chemometric strategy based on peak parameters to resolve overlapped electrochemical signals. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 85, n. 1, p. 131–139, 2007.

DU PLESSIS, L. M.; VILLIERS, J. B. M. DE; WALT, W. H. VAN DER. Stability studies on methyl and ethyl fatty acid esters of sunflowerseed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 62, n. 4, p. 748–752, 1985.

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

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

RAMÍREZ-VERDUZCO, L. F.; GARCÍA-FLORES, B. E.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. E.; RAYO JARAMILLO-JACOB, A. DEL. Prediction of the density and viscosity in biodiesel blends at various temperatures. **Fuel**, v. 90, n. 5, p. 1751–1761, 2011.

RANZAN, L. **Estudo da viabilidade do uso de espectroscopia por fluorescência 2d para quantificar teor de enxofre em óleo diesel**. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RASHED, M. M.; KALAM, M. A.; MASJUKI, H. H.; et al. Stability of biodiesel, its improvement and the effect of antioxidant treated blends on engine performance and emission. **RSC Advances**, v. 5, n. 46, p. 36240–36261, 2015.

RAWAT, D. S.; JOSHI, G.; LAMBA, B. Y.; TIWARI, A. K.; KUMAR, P. The effect of binary antioxidant proportions on antioxidant synergy and oxidation stability of Jatropha and Karanja biodiesels. **Energy**, v. 84, p. 643–655, 2015.

REGUERA, C.; ORTIZ, M. C. C.; ARCOS, M. J. J. Differential Pulse Voltammetric Simultaneous Determination of Four Anti-Inflammatory Drugs by Using Soft Modelling. **Electroanalysis**, v. 14, n. 24, p. 1699–1706, 2002.

RIZWANUL FATTAH, I. M.; HASSAN, M. H.; KALAM, M. A.; ATABANI, A. E.; ABEDIN, M. J. Synthetic phenolic antioxidants to biodiesel: path toward NO_x reduction of an unmodified indirect injection diesel engine. **Journal of Cleaner Production**, v. 79, p. 82–90, 2014.

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

ROBLEDO, S. N.; ZACHETTI, V. G. L.; ZON, M. A.; FERNÁNDEZ, H. Quantitative determination of tocopherols in edible vegetable oils using electrochemical ultra-microsensors combined with chemometric tools. **Talanta**, v. 116, p. 964–971, 2013.

SANTOS, N. A.; CORDEIRO, A. M. T. M.; DAMASCENO, S. S.; et al. Commercial antioxidants and thermal stability evaluations. **Fuel**, v. 97, p. 638–643, 2012.

DA SILVA, Y. P.; DALMORO, V.; MORENO RUIZ, Y. P.; et al. Biodiesel water in oil microemulsions: ferrocene as a hydrophobic probe for direct analysis by differential pulse voltammetry at a Pt ultramicroelectrode. **Analytical Methods**, v. 6, n. 23, p. 9212–9219, 2014.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8th ed. São Paulo: Thomson, 2006.

TAGLIABUE, S.; GASPAROLI, A.; BELLA, L. DELLA; BONDIOLI, P. Quali-quantitative

determination of synthetic antioxidants in biodiesel. **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v. 81, n. 1, p. 37–40, 1997.

TONELLO, N.; MORESSI, M. B.; ROBLEDO, S. N.; D'ERAMO, F.; MARIOLI, J. M. Square wave voltammetry with multivariate calibration tools for determination of eugenol, carvacrol and thymol in honey. **Talanta**, v. 158, p. 306–314, 2016.

TORMIN, T. F.; CUNHA, R. R.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Fast simultaneous determination of BHA and TBHQ antioxidants in biodiesel by batch injection analysis using pulsed-amperometric detection. **Talanta**, v. 99, p. 527–531, 2012.

WANG, J. Y.; WU, H. L.; CHEN, Y.; et al. Quantitative determination of butylated hydroxyanisole and n-propyl gallate in cosmetics using three-dimensional fluorescence coupled with second-order calibration. **Talanta**, v. 116, p. 347–353, 2013.

WANG, P.; HAN, C.; ZHOU, F.; et al. Electrochemical determination of tert-butylhydroquinone and butylated hydroxyanisole at choline functionalized film supported graphene interface. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 224, p. 885–891, 2016.

WARNE, K.; PRASAD, G.; REZVANI, S.; MAGUIRE, L. Statistical and computational intelligence techniques for inferential model development: A comparative evaluation and a novel proposition for fusion. **Engineering Applications of Artificial Intelligence**, v. 17, n. 8, p. 871–885, 2004.

WOLD, S.; SJOSTROM, M.; LENNART, E. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, p. 109–130, 2001.

XIE, X.; STÜBEN, D.; BERNER, Z.; et al. Development of an ultramicroelectrode arrays (UMEAs) sensor for trace heavy metal measurement in water. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 97, n. 2–3, p. 168–173, 2004.

ZHOU, J.; XIONG, Y.; LIU, X. Evaluation of the oxidation stability of biodiesel stabilized with antioxidants using the Rancimat and PDSC methods. **Fuel**, v. 188, p. 61–68, 2017.

ZIYATDINOVA, G. K.; SAVELIEV, A. A.; EVTUGYN, G. A.; BUDNIKOV, H. C. Simultaneous voltammetric determination of phenolic antioxidants with chemometric approaches. **Electrochimica Acta**, v. 137, p. 114–120, 2014.

ZIYATDINOVA, G.; OS'KINA, K.; ZIGANSHINA, E.; BUDNIKOV, H. Simultaneous determination of TBHQ and BHA on a MWNT-Brij® 35 modified electrode in micellar media. **Analytical Methods**, v. 7, n. 19, p. 8344–8351, 2015.