

## Artigo

**Aplicação de Cartas de Controle Multivariadas no Controle e Garantia da Qualidade do Biodiesel (B100)****Correa, C.;**\* **Ruschel, C. F. C.;** **Bento, F. M.;** **Ferrão, M. F.***Rev. Virtual Quim.*, 2015, 7 (6), 2273-2289. Data de publicação na Web: 23 de julho de 2015<http://www.uff.br/rvq>**Multivariate Control Charts Application to the Control and Quality Assurance of Biodiesel (B100)**

**Abstract:** Currently, 7 % of biodiesel are added to diesel (B7) sold throughout Brazil. The soybean oil and beef tallow are the most used, with a share of 95.6 % in production. In this context, this paper presents an analytical methodology based on multivariate control charts associated with the Fourier transform infrared by attenuated total reflectance (ATR-FTIR), for the control and quality assurance of the mixtures of tallow biodiesel with soybean biodiesel. The charts have been built using Net Analyte Signal (NAS) generating three control charts: the NAS chart that corresponds to the analyte in the sample (in this case biodiesel tallow), the interference chart corresponds to the other constituent in the sample (in this case only soybean biodiesel) and the chart residues corresponds to nonsystematic variation. Thus, it was possible to identify tallow biodiesel content in the blend, by chart NAS, and remaining problems in the production process as the low degree of conversion of the methyl esters. Based on the results achieved this analytical methodology is promising, because in a single analysis it is possible check the quality of soybean biodiesel and its blends with biodiesel from tallow.

**Keywords:** Biodiesel; infrared spectroscopy; multivariate control charts; net analyte signal.

**Resumo**

Atualmente são adicionados 7 % de biodiesel ao diesel (B7) comercializado em todo o território brasileiro, sendo o óleo de soja e o sebo bovino os mais empregados, com uma participação de 95,6 % na produção do biodiesel. Neste contexto o presente trabalho apresenta uma metodologia analítica baseada em cartas de controle multivariada associadas ao infravermelho (ATR-FTIR), para o controle e garantia da qualidade de blends de biodiesel de sebo com biodiesel de soja. Foram construídas cartas de controle utilizando o Sinal Analítico Líquido (NAS), uma correspondente ao analito (NAS) na amostra (neste caso o biodiesel de sebo), uma dos interferentes que corresponde ao outro constituinte na amostra (neste caso o biodiesel de soja) e uma dos resíduos que corresponde às variações não sistemáticas. Assim, foi possível identificar a presença, bem como os adequados teores de biodiesel de sebo na blenda, através da carta NAS, e problemas remanescentes do processo de produção, como o baixo grau de conversão dos ésteres metílicos. A metodologia analítica descrita neste estudo se revela promissora com base nos resultados obtidos.

**Palavras-chave:** Biodiesel; espectroscopia no infravermelho; cartas de controle multivariadas; sinal analítico líquido.

\* Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química Departamento de Química Inorgânica, Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre-RS, Brasil.

✉ [camilacorrea@outlook.com.br](mailto:camilacorrea@outlook.com.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20150135](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150135)

## Aplicação de Cartas de Controle Multivariadas no Controle e Garantia da Qualidade do Biodiesel (B100)

Camila Correa,<sup>a,\*</sup> Carla Felippi C. Ruschel,<sup>a</sup> Fátima M. Bento,<sup>b</sup> Marco F. Ferrão<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química Departamento de Química Inorgânica, Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre-RS, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratório de Biodeterioração de Combustíveis e Biocombustíveis, Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre-RS, Brasil.

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica (INCT -Bioanalítica), CP 6154, CEP 13084-971, Campinas-SP, Brasil.

\* [camilacorrea@outlook.com.br](mailto:camilacorrea@outlook.com.br)

*Recebido em 2 de março de 2015. Aceito para publicação em 20 de julho de 2015*

### 1. Introdução

#### 1.1. Carta de controle multivariadas baseadas no NAS

### 2. Materiais e Métodos

#### 2.1. Síntese de biodiesel

#### 2.2. Caracterização das amostras de biodiesel

#### 2.3. Descrição das amostras para construção das cartas de controle multivariadas

#### 2.4. Análise multivariada

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Determinação do grau de conversão

#### 3.2. Aplicação das cartas de controle multivariadas

### 4. Conclusões

## 1. Introdução

O biodiesel surgiu como uma das principais alternativas ao diesel petroquímico, uma vez que possui propriedades físico-químicas semelhantes, podendo ser misturado ao diesel praticamente em qualquer proporção e ser utilizado sem mudanças na infraestrutura de

distribuição existente.<sup>1</sup> O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de biodiesel, com uma produção anual em 2013 de 2,91 bilhões de litros, atualmente são adicionados 7 % de biodiesel ao diesel (B7) comercializado em todo território nacional.<sup>2</sup>

Os principais componentes do biodiesel são os ésteres de ácidos graxos, normalmente ésteres metílicos. As principais matérias-primas são óleos vegetais (soja,

algodão, canola) e sebo bovino (gorduras animais). No Brasil, o óleo de soja e o sebo bovino são os mais empregados, com uma participação de 95,6 % na produção, sendo que o biodiesel de sebo bovino vem aumentando sua participação significativamente, passando de 16,6 % em 2008 para 21,5 % em 2014.<sup>3</sup>

O sucesso na comercialização do biodiesel depende de uma série de parâmetros de qualidade, dentre esses, a conversão completa dos triglicerídeos em ésteres metílicos na reação de transesterificação (teor de éster) e o ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF), que avalia as propriedades do biodiesel a baixas temperaturas, são de suma importância na garantia da qualidade.<sup>4</sup> Nesse sentido, o controle de qualidade do biodiesel é um desafio, pois suas características físico-químicas variam de acordo com a origem da matéria-prima.<sup>5</sup> Por exemplo, o biodiesel de sebo bovino tem um baixo desempenho de fluxo a frio, devido ao alto teor de ácidos graxos saturados,<sup>6,7</sup> o que limita a sua utilização em regiões com grandes variações de temperatura, como o caso da região sul. Uma alternativa que vem sendo aplicada é a mistura do biodiesel de sebo com outros tipos de biodieseis, principalmente o biodiesel de soja, como é caso do Brasil.

Estudos de Teixeira e colaboradores avaliaram o PEFF de diferentes proporções, 5, 10, 20, 30, 50, 70 e 90 % (v/v) de blendas de biodiesel de sebo com biodiesel de soja e constataram que o aumento da fração do biodiesel de sebo na mistura aumentava o PEFF de 5,9 °C para 15,7 °C, ou seja, o aumento da fração de biodiesel de sebo na blenda, afeta o ponto de fluidez, a temperatura na qual o combustível perde a fluidez,<sup>8</sup> levando à interrupção do fluxo do combustível e entupimento do sistema de filtração, ocasionando problemas na partida do motor.<sup>9</sup>

Diferentes metodologias analíticas como RMN <sup>1</sup>H e cromatografia vem sendo utilizadas para monitorar a qualidade durante a produção e as suas misturas com o diesel.<sup>10-14</sup> Porém, o uso de técnicas que permitam

análise mais rápida, direta e sem pré-tratamento da amostra, como a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e médio (FTIR) em conjunto com a análise multivariada, vem sendo proposta como a alternativa mais promissora para o monitoramento da reação de transesterificação,<sup>15-17</sup> do teor de biodiesel na mistura com o diesel petroquímico,<sup>18,19</sup> bem como a quantidade de biodiesel de sebo bovino misturado ao biodiesel de soja.<sup>20</sup>

Dessa forma, o presente trabalho aborda o uso de cartas de controle multivariadas baseadas no NAS (do inglês “Net Analyte Signal”) associadas à espectroscopia no infravermelho médio para o controle e garantia da qualidade da blenda de biodiesel de sebo e soja.

As cartas baseadas no NAS, desenvolvidas por Skibsted *et al.*<sup>21</sup> levam em conta a divisão do sinal instrumental (espectro de infravermelho) em três constituintes: NAS, interferentes e resíduos. Com o uso dessa metodologia é possível separar a variação sistemática da propriedade de interesse presente nas amostras (analito) da variação sistemática devido ao restante dos componentes (matriz). Neste contexto, Oliveira e colaboradores utilizaram as cartas de controle multivariadas para monitorar o teor de biodiesel na blenda biodiesel/diesel (B2), adulteração com óleo de soja e contaminação com gasolina. Através da carta NAS foi possível avaliar o teor de biodiesel na blenda e avaliar a composição do diesel através da carta dos interferentes.<sup>22</sup>

Assim como foram proposta amplamente para monitorar formulações farmacêuticas. Como nos trabalhos de Rocha e colaboradores que utilizaram as cartas de controle multivariadas baseadas na divisão do espectro de infravermelho próximo em analito (NAS), interferente e resíduo para monitorar a concentração de nimesulida e identificação de adulteração da composição do excipiente em formulações farmacêuticas. Onde a concentração de nimesulida foi monitorada através da carta NAS, que indicou corretamente as amostras de acordo com a concentração do princípio ativo no

fármaco, a composição do excipiente foi monitorada pela carta dos interferentes, indicando corretamente quando houve variação da composição.<sup>23</sup> Em outro trabalho, Rocha e Poppi utilizaram as cartas de controle multivariadas para avaliar a transformação de formas polimórficas por umidade e detecção de diferentes formas polimórficas no fármaco piroxicam. Através da cartas NAS foi possível verificar a presença das diferentes formas polimórficas do piroxicam presente em formulações farmacêuticas.<sup>24</sup> Também, Rocha e Poppi utilizaram as cartas de controle multivariadas para avaliar composição polimórfica do fármaco carbamazepina. Através da utilização das cartas de controle multivariadas foi possível uma rápida avaliação da pureza e a composição polimórfica de formulações farmacêuticas estudadas.<sup>25</sup> E recentemente por Costa e Colaboradores para monitorar simultaneamente a presença de dois princípios ativos (isoniazida e rifampicina) em uma formulação farmacêutica utilizando um espectrômetro portátil na região do infravermelho próximo.<sup>26</sup>

### 1.1. Carta de controle multivariadas baseadas no NAS

O NAS foi definido como sendo a parte do sinal analítico ortogonal às contribuições de outros possíveis constituintes presentes na amostra.<sup>27</sup> O vetor NAS é diretamente proporcional à concentração do analito. Com base nesta metodologia, qualquer espectro  $\mathbf{r}$  pode ser dividido em três partes independentes, o vetor NAS ( $\mathbf{r}_k$ ); um vetor de interferência ( $\mathbf{r}_{INT}$ ); e um vetor residual ( $\mathbf{r}_{RES}$ ), conforme equação 1. Após essa divisão três cartas de controle podem ser construídas: carta NAS, carta dos interferentes e carta dos resíduos.<sup>21</sup> Para isso, dois conjuntos de amostras são necessários, um com todos os constituintes, exceto o analito, para construção do espaço dos interferentes e outro conjunto incluindo o analito.

$$\mathbf{r} = \mathbf{r}_k + \mathbf{r}_{INT} + \mathbf{r}_{RES} \quad \text{Eq. 1}$$

A construção das cartas de controle consiste em duas etapas: a primeira é a definição do espaço dos interferentes ( $\mathbf{PP}^+$ ), descrevendo todas as variações devido a outros componentes da amostra. Este espaço é definido através de uma análise por componentes principais (PCA),<sup>28</sup> equação 2:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 2}$$

onde  $\mathbf{X}$  é uma matriz composta pelas amostras utilizadas para definir o espaço do interferente;  $\mathbf{T}$  é a matriz de escores;  $\mathbf{P}$  é a matriz de pesos;  $\mathbf{E}$  é a matriz resíduo.

Os pesos definem um modelo para o espaço dos interferentes e o número de componentes principais ilustra o número de fenômenos independentes nos espectros das amostras da matriz  $\mathbf{X}$ , por exemplo, variação na composição dos componentes majoritários.

A segunda etapa é o cálculo do vetor de regressão NAS ( $\mathbf{b}_k$ ) (exclusivo para o analito), do vetor interferente e do vetor resíduo.

O vetor interferente ( $\mathbf{r}_{INT}$ ) é determinado pela projeção de qualquer espectro  $\mathbf{r}$  no espaço dos interferentes, equação 3:

$$\mathbf{r}_{INT} = \mathbf{PP}^+ \mathbf{r} \quad \text{Eq. 3}$$

onde  $\mathbf{r}$  é o vetor com todas as informações espectrais, incluindo o analito e  $\mathbf{P}^+$  é a pseudoinversa da matriz  $\mathbf{P}$ .

O vetor de regressão NAS que é definido como sendo a parte ortogonal ao espaço dos interferentes, é determinado pela equação 4:

$$\mathbf{B}_k = (\mathbf{I}_J - \mathbf{PP}^+) \mathbf{R} \quad \text{Eq. 4}$$

onde  $\mathbf{B}_k$  é a matriz que contém os vetores,

os quais são todos ortogonais ao espaço dos interferentes,  $I_j$  é a matriz identidade,  $\mathbf{R}$  é a matriz com somente amostras dentro do controle.

No entanto,  $\mathbf{B}_k$  contém várias direções ortogonais ao espaço dos interferentes, assim a média para todos os vetores ortogonais é calculada de acordo com a equação 5, obtendo-se assim uma única direção:

$$\mathbf{b}_k = \frac{\sum_{i=1}^I \mathbf{B}_{k,i}}{I} \quad \text{Eq. 5}$$

onde  $\mathbf{b}_k$  é chamado o vetor de regressão NAS e  $I$  é número de amostras dentro do controle usadas para construir o modelo.

Agora segundo a equação 6, o vetor NAS de qualquer espectro  $\mathbf{r}$  pode ser calculado por uma projeção do espectro para o vetor de regressão NAS ( $\mathbf{b}_k$ ).

$$\mathbf{r}_K = \mathbf{b}_k (\mathbf{b}_k^T \mathbf{b}_k)^{-1} \mathbf{b}_k^T \mathbf{r} \quad \text{Eq. 6}$$

O vetor residual ( $\mathbf{r}_{RES}$ ), é calculado como a parte do espectro que não foi descrito pelo vetor NAS ou pelo vetor dos interferentes, sendo uma simples subtração vetorial, equação 7:

$$\mathbf{r}_{RES} = \mathbf{r} - \mathbf{r}_{INT} - \mathbf{r}_K \quad \text{Eq. 7}$$

Após definidos os três vetores, as cartas de controle podem ser construídas. Para isso é necessário 2 conjuntos de amostras: Um conjunto com amostras consideradas dentro do controle ( $\mathbf{R}_{NOC}$ ); onde o subscrito NOC indica amostras dentro do controle e um conjunto de amostras para validação das cartas de controle, podendo este último conter tanto amostras dentro quanto fora de controle.

### Carta NAS

Para construir a carta NAS, os espectros das amostras dentro do controle ( $\mathbf{R}_{NOC}$ ) são projetados no vetor de regressão NAS, sendo que estes são proporcionais à concentração do analito na amostra. O valor da projeção é um escalar chamado de valor de NAS. Para determinar os limites estatísticos para a carta NAS, o valor de NAS para cada um dos sinais instrumentais das amostras dentro do controle é calculado de acordo com a equação 8:

$$\mathbf{nas}_{NOC} = \mathbf{R}_{NOC}^T \mathbf{b}_k \quad \text{Eq. 8}$$

onde  $\mathbf{nas}_{NOC}$  é um vetor com o valor de NAS para cada espectro das amostras dentro do controle.

Os limites são calculados pela média dos valores de NAS ( $\overline{\mathbf{nas}}_{NOC}$ ) e o desvio padrão ( $S_{NOC}$ ) das amostras dentro do controle, de acordo com a equação 9 para um limite de 95% de confiança, no caso deste trabalho. Com estes valores, os limites estatísticos são plotados na carta NAS.

$$\overline{\mathbf{nas}}_{NOC} \pm 2 \times S_{NOC} \quad \text{Eq. 9}$$

para um limite de 95 % de confiança.

### Carta de Controle do Interferente

A carta de controle do interferente é baseada na distância da projeção dos espectros das amostras dentro do controle no espaço do interferente ( $\mathbf{PP}^+$ ), que foi determinado através de uma PCA. Assim, as amostras projetadas no espaço definido pelo número de componentes principais são consideradas dentro do controle; e amostras projetadas além desse espaço, são consideradas fora de controle.

Em primeiro lugar, os espectros das amostras dentro do controle são projetados sobre o espaço dos interferentes, de acordo com a equação 10:

$$\mathbf{R}_{INT} = \mathbf{P}\mathbf{P}^T\mathbf{R}_{NOC} \quad \text{Eq. 10}$$

onde  $\mathbf{R}_{INT}$  é a matriz dos interferentes composta pelas amostras dentro do controle.

Após  $\mathbf{R}_{INT}$  é projetado no modelo PCA para

$$\mathbf{d}_{NOC,i} = (\mathbf{t}_{NOC,i} - \bar{\mathbf{t}}_{NOC})^T \mathbf{S}^{-1}(\mathbf{t}_{NOC,i} - \bar{\mathbf{t}}_{NOC}) \quad \text{Eq. 12}$$

onde  $\mathbf{d}_{NOC,i}$  é a distância dos interferentes ao centro do espaço definido pelo número de componentes principais,  $\mathbf{t}_{NOC,i}$  é o vetor,  $\bar{\mathbf{t}}_{NOC}$  é o valor médio dos escores contidos na

$$\mathbf{D}_{lim,0,95} = \mathbf{F}_{0,95(A, I_{NOC}-A)} \left( \frac{A(I_{NOC}^2 - I_{NOC})}{I_{NOC}(I_{NOC}-A)} \right) \quad \text{Eq. 13}$$

onde  $\mathbf{F}_{0,95}$  é valor da distribuição F com 95% de confiança em que o índice  $(I_{NOC}-A)$  refere-se ao número de graus de liberdade,  $I_{NOC}$  é o número de amostras dentro do controle e  $A$  é número de componentes principais.

*Carta de Controle dos Resíduos*

Os espectros das amostras dentro do controle também são usados para calcular o limite da carta dos resíduos, que se baseia no Q-statistic.<sup>29</sup> Para determinar os vetores residuais dos sinais instrumentais das amostras dentro do controle, primeiro é necessário o cálculo da matriz NAS ( $\mathbf{R}_{NOC}^*$ ), pois a carta dos resíduos representa a parte do sinal que não foi modelada pela carta NAS e nem pela dos interferentes, equação 14:

obterem-se os valores de escores, equação 11:

$$\mathbf{T}_{NOC} = \mathbf{R}_{INT}^T \mathbf{P}(\mathbf{P}^T \mathbf{P})^{-1} \quad \text{Eq. 11}$$

onde  $\mathbf{T}_{NOC}$  é a matriz de escores.

Assim a distância das amostras ao espaço definido pelo número de componentes principais pode ser calculada através da equação 12:

matriz  $\mathbf{T}_{NOC}$ ,  $\mathbf{S}$  denota a matriz de covariância centrada na média dos escores.

Já o limite para carta do interferente é determinado através da equação 13:

$$\mathbf{R}_{NOC}^* = \mathbf{b}_k (\mathbf{b}_k^T \mathbf{b}_k)^{-1} \mathbf{b}_k^T \mathbf{R}_{NOC} \quad \text{Eq. 14}$$

Em seguida a matriz de resíduos ( $\mathbf{R}_{RES}$ ), equação 15:

$$\mathbf{R}_{RES} = \mathbf{R}_{NOC} - \mathbf{R}_{INT} - \mathbf{R}_{NOC}^* \quad \text{Eq. 15}$$

Assim de acordo com Jackson e Mudholkar,<sup>29</sup> o limite é calculado da seguinte forma:

$$\mathbf{Q}_{NOC} = \mathbf{R}_{RES}^T \mathbf{R}_{RES} \quad \text{Eq. 16}$$

onde  $\mathbf{Q}_{NOC}$  é a matriz com dimensão  $l \times l$ .

## 2. Materiais e Métodos

Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras de biodiesel sintetizadas a partir de óleo vegetal de soja comercial e amostras de biodiesel de soja cedidas pela empresa Bianchini S.A, Município de Canoas, Rio Grande do Sul. O biodiesel de sebo bovino foi produzido pela empresa Biocapital, Município de Charqueada, São Paulo.

### 2.1. Síntese de Biodiesel

O biodiesel foi preparado em laboratório a partir da reação de transesterificação baseada na metodologia *Transesterification Double Step Process* (TDSP),<sup>30</sup> utilizando o metanol (CH<sub>3</sub>OH P.A. - Neon 99 % (m/m)) como agente transesterificante, hidróxido de potássio (KOH - Synth 85% (m/m)) e ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> P.A. - ROQuimios) como catalisadores. Na primeira etapa da síntese, denominada de catálise básica, uma solução de hidróxido de potássio (1,07g) em metanol (83 mL) foi preparada sob aquecimento (40°C). Essa solução foi adicionada a um reator que continha 200 mL de óleo vegetal previamente aquecido a 65°C. A reação permaneceu em refluxo e sob agitação por 30 minutos. Na segunda etapa, denominada de catálise ácida, foi adicionado 0,5 mL de ácido sulfúrico e 41 mL de metanol, permanecendo a reação sob refluxo e agitação por mais 90 minutos.

Ao final da reação o sistema foi resfriado até temperatura ambiente (25 °C), formando duas fases distintas. A fase superior é formada pelo biodiesel e parte do óleo que possivelmente não reagiu e metanol. A fase inferior é composta de glicerol e de grande parte do metanol, que foi adicionado em excesso para garantir o deslocamento do equilíbrio da reação para os produtos. Após separação das fases em um funil de separação, o metanol é removido de ambas as fases por evaporação sob vácuo e por aquecimento num rotaevaporador. Por fim, o biodiesel foi lavado com água deionizada

para ajustar o pH, que deve ficar entorno de 7, e seco com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> P.A. - Dinâmica).

### 2.2. Caracterização das amostras de biodiesel

*Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H)*

Aproximadamente 15 mg da amostra de biodiesel foi solubilizada em 550 µL de Clorofórmio-D 99,8 % (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) e os espectros foram adquiridos em um equipamento da Varian - INOVA 300, 300 MHz. As condições de análise foram: pulso 90° e tempo de relaxação de 10s.

*Espectroscopia no Infravermelho*

Os espectros ATR-FTIR foram obtidos empregando um espectrofotômetro (FTIR Spectrum 400, Perkin Elmer - acoplado num acessório de reflectância total atenuada horizontal (HATR) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe)). Todas as amostras foram medidas em duplicatas e na faixa de 4.000 a 700 cm<sup>-1</sup>, a temperatura ambiente, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e 32 varreduras.

### 2.3. Descrição das amostras para construção das cartas de controle multivariadas

Foi avaliada a blenda de biodiesel de soja e biodiesel de sebo composta por 80% de biodiesel de soja e 20 % de biodiesel de sebo (80:20). Esta proporção foi escolhida por atender às especificações do PEF na região sul que é 14 °C de novembro a março, 5 °C de maio a setembro e 10°C em abril e outubro.<sup>4</sup> Assim, foi definido que o biodiesel de sebo é o analito e sua variação será representada na carta NAS e o biodiesel de soja o constituinte

majoritário, sendo representado na carta dos interferentes. Foram preparadas 37 amostras utilizando balança analítica 0,0001 g, que foram homogeneizadas através de vórtex por 1 minuto.

Pare definir o espaço dos interferentes foram utilizadas 4 amostras de biodiesel de soja puro. As demais amostras foram divididas em 3 conjuntos:

Conjunto A: Foram preparadas 11

amostras com mistura de biodiesel produzido a partir de soja e sebo (80% de biodiesel de soja e 20 % biodiesel de sebo com uma variação de 5 % acima ou abaixo dos 20%) consideradas dentro do controle para calibração das cartas (Tabela 1).

Conjunto B: Foram preparadas 17 amostras com teor de biodiesel de sebo na faixa de 15 a 29 % na blenda, para validação dos limites das cartas (Tabela 2).

**Tabela 1.** Composição das amostras de biodieseis dentro do controle para

	Amostras										
B100	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
(%) Sebo	19	19,4	19,5	19,7	20	20	20,1	20,1	20,3	20,8	21
(%) Soja	81	80,6	80,5	80,3	80	80	79,9	79,9	79,7	79,2	79

**Tabela 2.** Composição das amostras de biodieseis para validação dos limites das cartas de controle

	Amostras																
B100	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
(%)Sebo	15	16	16	17	19	20	21	21	21,5	21,5	22	22	23	25	26	28	29
(%)Soja	85	84	84	83	81	80	79	79	78,5	78,5	78	78	77	75	74	72	71

Conjunto C: Foram preparadas 9 amostras, duas em que o biodiesel de soja utilizado para preparar a blenda tinha rendimento acima de 96,5 % e sete amostras com baixo rendimento abaixo de 96,5 %, simulando problemas no processo de

produção do biodiesel (Tabela 3), consideradas fora de controle. Não foi alterada a proporção de biodiesel de soja ou de sebo na blenda permanecendo 80 % de biodiesel de soja e 20% biodiesel de sebo.

**Tabela 3.** Amostras de biodiesel de soja com rendimento entre 72,9 e 99 % utilizado na blenda

	Amostras								
Biodiesel de Soja	1	2	3	4	5	6	7	8	9
(%) Rendimento	99,0	99,0	72,9	74,5	81,4	87,1	88,2	91,1	94,7

#### 2.4. Análise multivariada

O software utilizado para estes estudos foi o Matlab 7.11 (MathWorks Inc., Natick, MA), rotinas do PLS\_Toolbox 6.2.1 (Eigenvector Research Inc.) e o pacote iToolbox e a

construção das cartas de controle foi feita em uma rotina pré-estabelecida em ambiente Matlab. A todos os espectros de ATR-FTIR foi aplicada a primeira derivada (algoritmo Savitsky-Golay, 15 pontos, polinômio de segunda ordem).

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Determinação do grau de conversão

Para avaliar o grau de conversão total dos ésteres metílicos, todas as amostras dos biodieseis produzidas foram analisadas por RMN  $^1\text{H}$ . Na Figura 1 é apresentado o espectro de RMN  $^1\text{H}$  de um biodiesel obtido a partir do óleo de soja.

A formação dos ésteres metílicos é indicada pelo aparecimento do sinal intenso em 3,6 ppm, uma vez que este pico está na região dos hidrogênios do grupo éster metílico ( $-\text{COOCH}_3$ ), assim o grau de conversão ( $C_{ME}$ ) dos ésteres metílicos é obtido pelo valor da integral do sinal correspondente aos hidrogênios do grupo éster metílicos ( $I_{ME}$ ) conforme equação 17:

$$C_{ME} = 100 \left( \frac{\frac{I_{ME}}{3}}{\frac{I_{\alpha-\text{CH}_2}}{2}} \right) \quad \text{Eq. 17}$$

A base do cálculo é o sinal correspondente aos hidrogênios do grupo metileno adjacente a carbonila do éster ( $\alpha\text{-CH}_2$ ), o qual corresponde a dois hidrogênios e surge isoladamente em 2,3 ppm, sem somar-se a sinais de outros hidrogênios do biodiesel produzido e de outros produtos intermediários da reação, com isso  $I_{\alpha\text{-CH}_2}$  é o valor da integral do sinal correspondente aos hidrogênios do grupo metileno. A escolha deste sinal deve-se também ao fato deste grupo estar presente em todas as moléculas derivadas de triglicerídeos, as quais incluem o óleo não reagido, diglicerídeos e monoglicerídeos, sabões e quaisquer outras espécies de longa cadeia carbônica que possam ser formadas durante o processo. Os fatores 3 e 2 são adicionados para correção das integrais conforme o número de hidrogênio correspondentes a cada sinal, sendo que o grupo éster metílico apresenta três hidrogênios ( $-\text{COOCH}_3 - 3,6$  ppm) e o grupo metileno adjacente à carbonila apresenta dois hidrogênios ( $\alpha\text{-CH}_2 - 2,3$  ppm).<sup>30,31</sup>

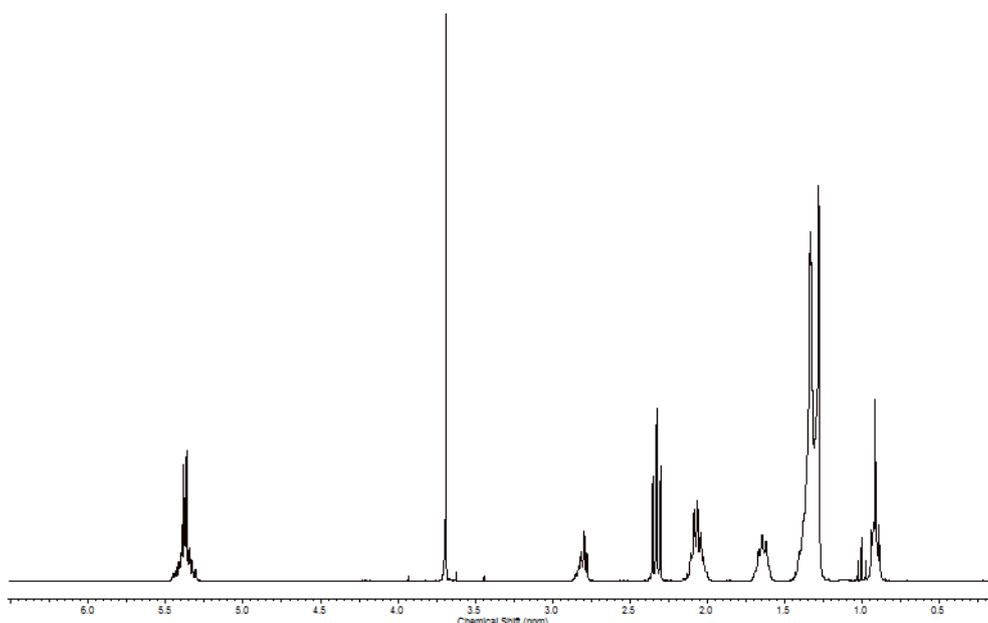


Figura 1. Espectro de RMN $^1\text{H}$  de um biodiesel metílico de óleo de soja

O grau de conversão para as sínteses realizadas sob condições adequadas ficou na faixa de 98 a 99 % para todos os biodieseis empregados na calibração das cartas de controle, demonstrando que todas as amostras submetidas à transesterificação apresentaram adequada conversão em ésteres metílicos de ácidos graxos e pela inspeção dos espectros verificou-se a ausência de impurezas remanescentes do processo. Um conjunto especial de amostras de biodieseis de soja não conforme segundo a ANP, os quais foram obtidos por condições não adequadas, foi utilizado tendo os valores de conversão compreendidos entre 72,9 e 94,7, calculados da mesma forma descrita.

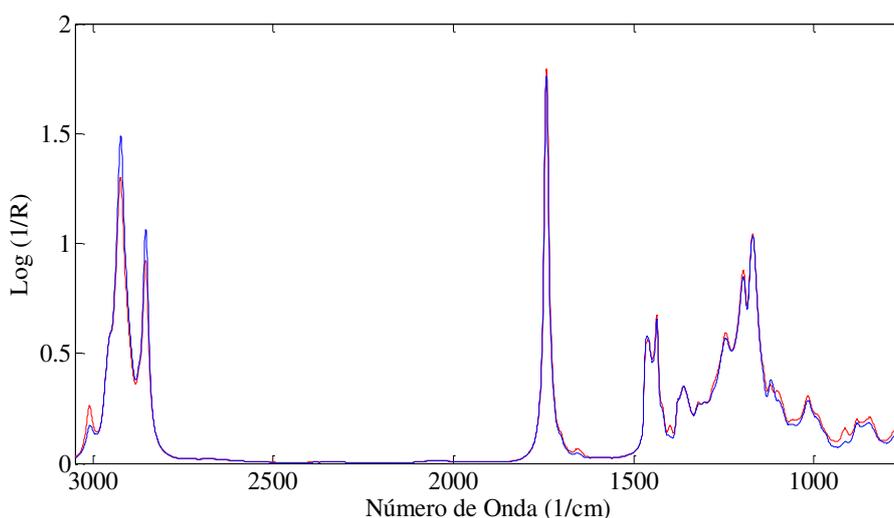
### 3.2. Cartas de Controle Multivariadas

Devido à similaridade observada nos espectros dos biodieseis de soja e sebo (Figura 2), foi necessário avaliar as regiões espectrais que apresentavam a maior discriminação entre os biodieseis de soja e sebo, para tanto foi empregada a análise por

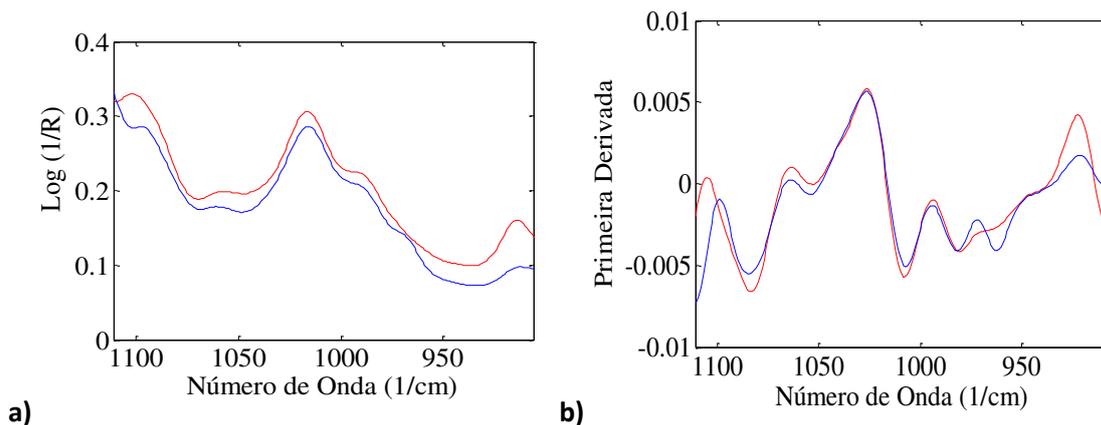
componentes principais por intervalo (*i*PCA). Foi utilizado o espectro médio das amostras e a todos os dados espectrais foi aplicada a primeira derivada.

A *i*PCA é similar à PCA, porém antes de realizar as operações matriciais, a *i*PCA divide o espectro em *i* intervalos equidistantes. Ou seja, para  $i = 16$ , o espectro é dividido em dezesseis intervalos, e a PCA é então conduzida para cada intervalo separadamente. No presente trabalho, os valores de *i* foram 8 e 16 e cada PCA foi avaliada separadamente, sendo o critério de escolha do intervalo uma pré-avaliação do comportamento das cartas de controle com as amostras de calibração, assim o intervalo 15 (variância acumulada nas duas primeiras componentes de 99,42 %) foi escolhido, pois foi o intervalo que gerou a melhor classificação das amostras nas cartas de controle.

Nas Figuras 3a e 3b é apresentada a faixa espectral definida para construção das cartas de controle, antes e após aplicação da primeira derivada, que corresponde à região de 1.111 a 906  $\text{cm}^{-1}$  (intervalo 15).



**Figura 2.** Espectros de HATR-FTIR das amostras: Biodiesel de soja (vermelho) e Biodiesel de sebo (azul)



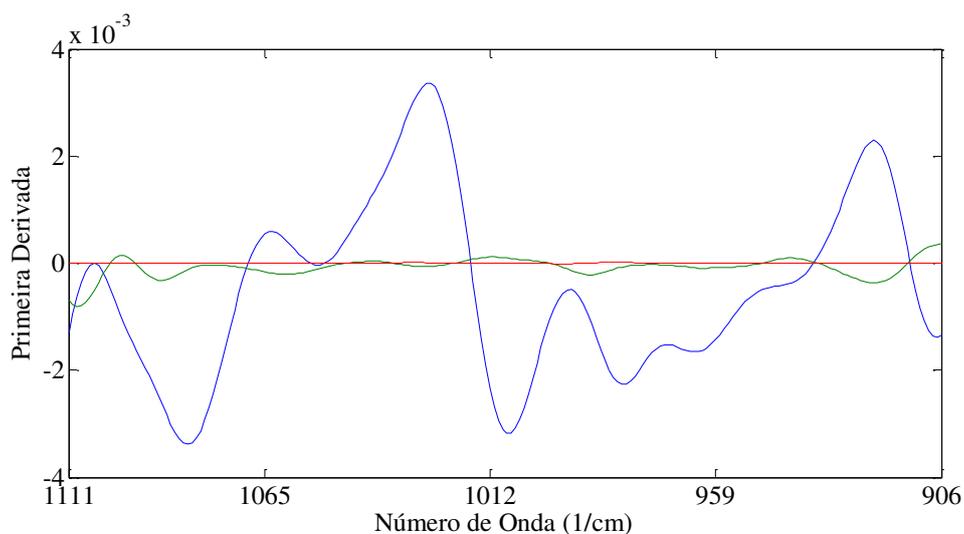
**Figura 3.** Faixa espectral 1.111 a 906  $\text{cm}^{-1}$  dos espectros por HATR-FTIR das amostras de biodieséis de soja (vermelho) e sebo (azul), **a)** sem tratamento e **b)** com aplicação da primeira derivada

A região de 1.111 a 906  $\text{cm}^{-1}$  corresponde às bandas de absorção dos modos de deformações de ligações duplas (*trans* – CH=CH–) e ligações entre carbono e oxigênio dos ésteres (–CO–O–),<sup>32</sup> a diferença na intensidade do sinal pode ser associada ao baixo grau de insaturação do biodiesel de sebo, pois sua composição majoritária contém os ácidos graxos saturados e monoinsaturados: ácido palmítico (C16:0) 24,40 %, ácido esteárico (C18:0) 19 % e ácido oleico (18:1) 41,65 %, já o biodiesel de soja contém principalmente os ácidos graxos insaturados: ácido oleico (18:1) 23,47 %, ácido linoleico (C18:2) 53,46 % e ácido linolênico (18:3) 6,64 %.<sup>33</sup>

A primeira etapa para construção das cartas de controle é a definição do espaço dos interferentes, que foi determinado

através da aplicação da análise por componentes principais (PCA) com os espectros das amostras de biodiesel de soja puro. O número de componentes principais foi determinado através do maior número de amostras classificadas corretamente na carta NAS, sendo definidas 3 componentes principais para construção dos conjuntos de cartas, através das quais, foi possível explicar 99,99% da variância total dos dados.

Determinado o espaço dos interferentes, os espectros das amostras dentro do controle (conjunto A) foram decompostos em três vetores: vetor NAS, que representa o analito (biodiesel de sebo), vetor interferente (biodiesel de soja) e um vetor resíduo. Na Figura 4 é apresentado o resultado da divisão do espectro nos respectivos vetores.



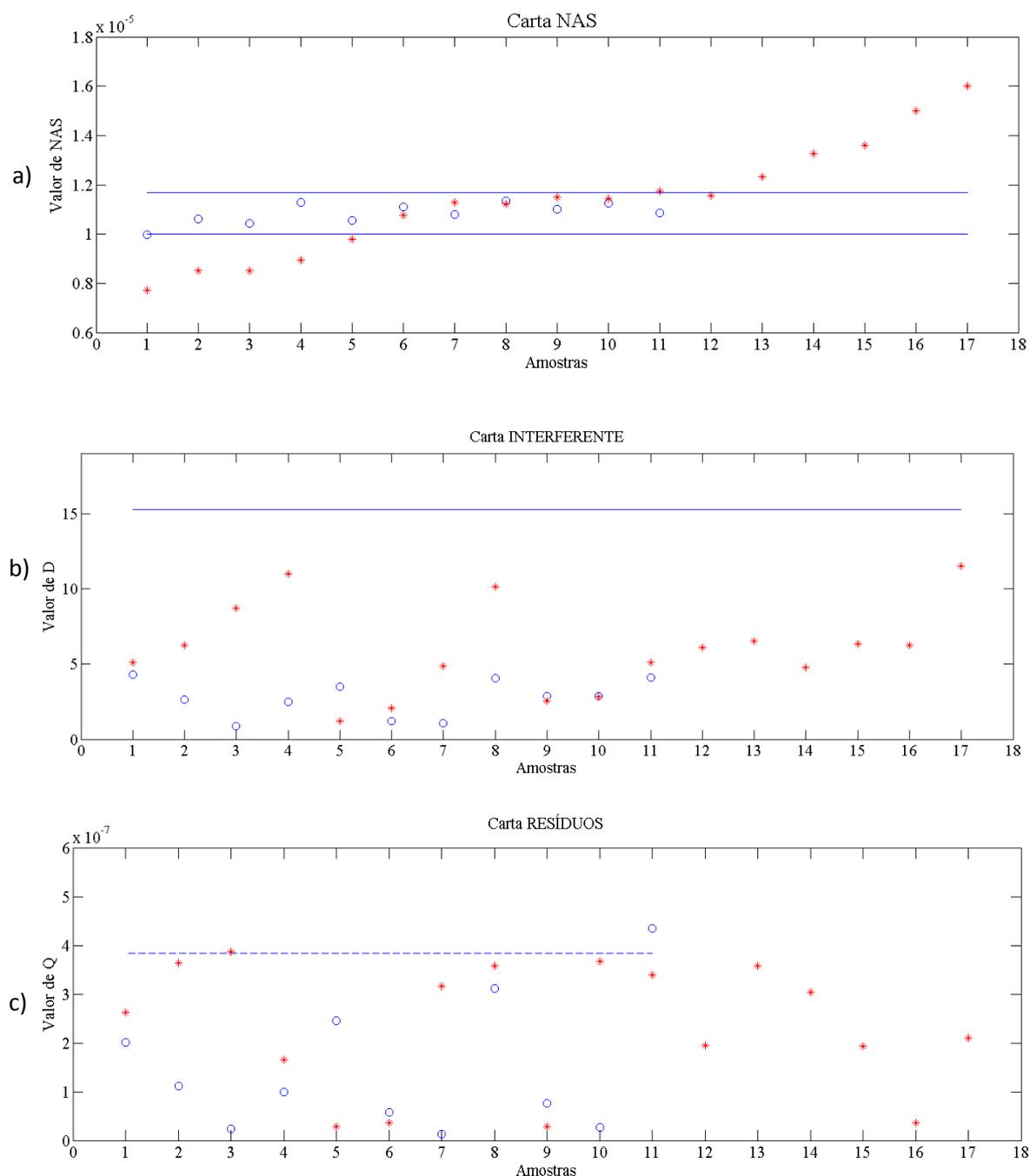
**Figura 4.** Vetor NAS (verde), Vetor interferente (azul) e vetor resíduo (vermelho)

Após a divisão dos espectros são determinados os limites de cada carta, a Figura 5 apresenta as três cartas de controle desenvolvidas com os sinais das 11 amostras (azul) do conjunto A, utilizadas para determinar os limites de cada carta de controle. Os limites inferior e superior em valores de NAS foram de  $9,995 \times 10^{-6}$  e  $1,167 \times 10^{-5}$ , o limite para a carta interferente foi de 15,26 ( $F_{0,95}: 4,07$ ) e para a carta resíduo foi de  $3,383 \times 10^{-7}$  e as 17 amostras do conjunto B (vermelho), preparadas para validar os limites das cartas de controle utilizando misturas com teores de biodiesel de sebo de 15-29 %.

Na carta da Figura 4a o eixo da abcissa corresponde ao número de amostras e o eixo da ordenada representa os valores escalares de NAS para cada amostra. Em sua composição estas amostras do conjunto A contêm um percentual biodiesel de sebo de 19 a 21 %, sendo assim os valores de NAS, interferente e resíduo apresentam-se dentro

dos limites de controle nas três cartas conforme pode ser observado, ou seja, dentro das condições pré-determinadas experimentalmente. Com exceção da amostra 11 que ficou acima do limite estipulado pela carta dos resíduos, porém essa mesma amostra está dentro dos limites na carta NAS e dos interferentes, possivelmente foi uma análise de infravermelho inadequada que causou um nível de ruído maior do que o valor de referência da carta.

Já amostras do conjunto B, de 1 a 4 ficaram abaixo do limite inferior, estando de acordo com o esperado, pois o teor de biodiesel de sebo na blenda era inferior ao das amostras dentro do controle (conjunto A: 19-21 %), o inverso ocorre com as amostras de 13 a 17, pois estão acima do limite superior da carta NAS. As amostras de 6 a 10 estão dentro dos limites estipulados, o que também está de acordo com o teor de biodiesel de sebo presente na blenda.



**Figura 5.** Cartas de Controle: a. carta NAS, b. carta dos interferentes e c. carta dos resíduos. Amostras conjunto A (o) e Amostras conjunto B (\*)

A amostra 5 do conjunto B contém um teor de biodiesel de sebo de 19% na blenda sendo esperado que estivesse dentro do desvio calculado na carta NAS, porém ficou abaixo do limite inferior. E o mesmo ocorre para as amostras 11 e 12, porém deveriam estar acima do limite superior, visto que tem um teor de biodiesel de sebo de 22 % na blenda. Considerando que essas amostras

têm um teor de biodiesel de sebo muito próximo aos das amostras de calibração (conjunto A), provavelmente não houve uma diferença evidente nos espectros de infravermelho resultando em valores de NAS dentro dos limites desta carta.

A carta dos interferentes indica se o outro constituinte da mistura, neste caso o

biodiesel de soja, está com composição semelhante às amostras de biodiesel de soja puro utilizadas na blenda do conjunto de calibração (conjunto A). Na Figura 5b pode-se observar que todas as amostras estão abaixo do limite estabelecido na carta, evidenciando que não houve uma mudança na composição do biodiesel de soja.

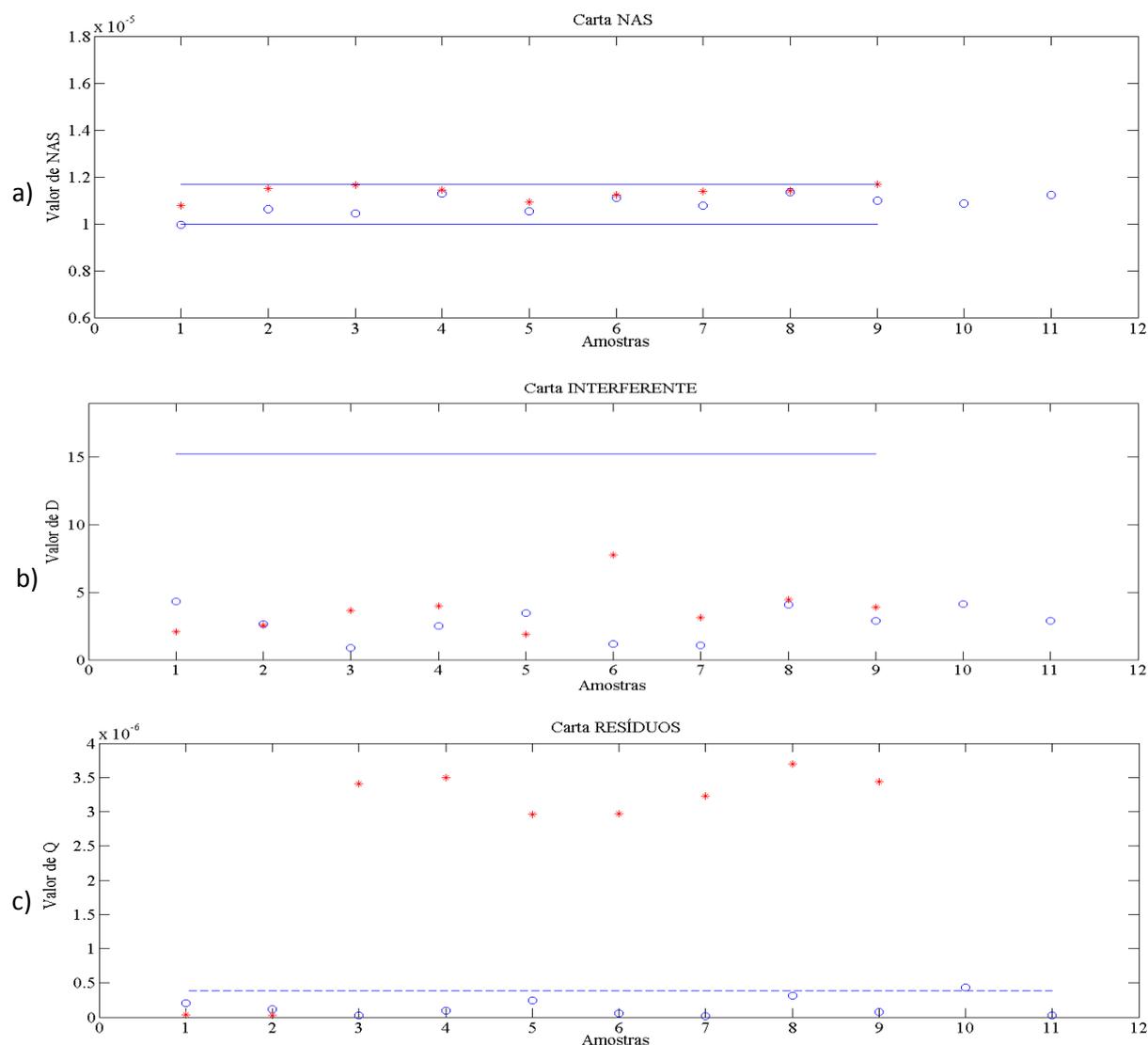
Na carta dos resíduos, Figura 5c, as amostras aparecem dentro do limite estabelecido, ou seja, indicando que nenhum outro composto distinto daqueles das amostras do conjunto A e B encontra-se nas amostras analisadas.

Com o intuito de avaliar a potencialidade das cartas de controle para determinar a presença de um biodiesel de soja com baixo rendimento na blenda, foram construídas as cartas de controle conforme apresentado na Figura 6 com as amostras do conjunto C. O biodiesel com baixo rendimento é composto por mono, di, e triglicerídeos devido a uma reação de transesterificação incompleta do óleo vegetal no processo de produção, ou seja obtendo-se um biodiesel de menor rendimento, segundo a legislação o teor mínimo de éster deve ser de 96,5 %. A presença destes acarreta em problemas de depósitos e entupimentos em partes do motor, afetando a eficiência da combustão.

Através da análise das três cartas na Figura 6 é possível identificar as amostras em que o biodiesel de soja tem baixo rendimento. Na Figura 6a todas as amostras estão dentro do controle, o que está de acordo com o esperado, visto que contém em sua composição o mesmo teor de biodiesel de sebo das amostras de calibração.

Na carta dos interferentes, na Figura 6b, era esperado que as amostras com rendimento inferior a 96,5 % ficassem fora do limite estipulado, pois devem conter maior presença de diglicerídeos, monoglicerídeos e triglicerídeos no biodiesel de soja remanescente do processo de produção. Porém as amostras ficaram abaixo do limite, considerando informações da literatura sobre as principais bandas de absorção de diglicerídeos, monoglicerídeos e triglicerídeos, constatou-se que a região de 1.111 a 906  $\text{cm}^{-1}$ , não é uma região sensível para avaliar tais compostos. Pois segundo os trabalhos consultados de Siaty e colaboradores que monitoraram a reação de transesterificação de óleos vegetais por FTIR observaram que as regiões 1.100, 1.200 e 1.445  $\text{cm}^{-1}$  são as principais bandas de absorção que diferenciam os triglicerídeos do biodiesel.<sup>34</sup> E recentemente, Reyman e colaboradores que avaliaram a reação de transesterificação de óleo de girassol na faixa de 1.500 a 900  $\text{cm}^{-1}$  observaram que o pico em 1.437  $\text{cm}^{-1}$  é o mais sensível para determinar a conversão de triglicerídeos em biodiesel.<sup>35</sup>

Por outro lado, ao se analisar a carta de controle dos resíduos, na Figura 6c, as amostras com rendimento de 72,9 - 94,7 % ficaram acima do limite, evidenciando a possível presença de impurezas (diglicerídeos, monoglicerídeos e/ou triglicerídeos) oriundas do processo de produção do biodiesel, estando de acordo com as análises de RMN  $^1\text{H}$  que indicaram o baixo rendimento do biodiesel de soja destas amostras. Já as amostras 1 e 2 com rendimento  $\geq 96,5$  % não apresentaram desvio.



**Figura 6.** Cartas de Controle (80:20): a. carta NAS, b. carta dos interferentes e c. carta dos resíduos. Amostras conjunto A (o) e Amostras do conjunto C (\*)

#### 4. Conclusões

As cartas de controle multivariadas baseadas no sinal analítico líquido associadas à espectroscopia no infravermelho (ATR-FTIR) possibilitaram o desenvolvimento de uma metodologia analítica para avaliar a presença de biodiesel de sebo misturado ao biodiesel de soja em diferentes proporções. A carta NAS possibilitou identificar as amostras com teor de biodiesel de sebo acima ou abaixo do estipulado na blenda (19-21 %). E a carta dos resíduos indicou problemas remanescentes do processo de produção como o baixo grau

de conversão dos ésteres metílicos. Estes resultados apresentam a potencialidade das cartas multivariadas para o controle de qualidade do biodiesel, podendo ser utilizadas em sistemas on-line, tanto para avaliar o grau de conversão, bem como no controle da composição do biodiesel comercializado para adição ao diesel.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES, CNPq e ao INCT de Bioanalítica pelo fomento.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Knothe, G. Biodiesel: Current Trends and Properties. *Topics in Catalysis* **2010**, *53*, 714. [CrossRef]
- <sup>2</sup> Sítio do Planalto: Medida Provisória nº 647 de 28 de maio de 2014. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/ Ato2011-2014/2014/Mpv/mpv647.html](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ Ato2011-2014/2014/Mpv/mpv647.html)>. Acesso em: 14 julho 2014.
- <sup>3</sup> Sítio do Ministério de Minas e Energia: Boletim Mensal Dos Combustíveis Renováveis. Ed. 77, junho de 2014. Disponível em: <[www.mme.gov.br/spg/menu/publicações.html](http://www.mme.gov.br/spg/menu/publicações.html)>. Acesso em: 15 julho 2014.
- <sup>4</sup> Sítio da Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e biocombustíveis: Resolução ANP nº 45, de 28/08/14. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes\\_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml?fn=document-frameset.htm&f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml?fn=document-frameset.htm&f=templates$3.0)>. Acesso em: 3 janeiro 2015.
- <sup>5</sup> Giakoumis, E. G. A statistical investigation of biodiesel physical and chemical properties, and their correlation with the degree of unsaturation. *Renewable Energy* **2013**, *50*, 858. [CrossRef]
- <sup>6</sup> Dwivedi, G.; Sharma, M. P. Cold flow behaviour of biodiesel-a review. *International Journal of Renewable Energy Research* **2013**, *3*, 827. [CrossRef]
- <sup>7</sup> Ramos, L. P.; da Silva, F. R.; Mangrich, A. S.; Cordeiro, C. S. Tecnologias de produção de biodiesel. *Revista Virtual de Química* **2011**, *3*, 385. [CrossRef]
- <sup>8</sup> Teixeira, L. S. G.; Couto, M. B.; Souza, G. S.; Filho, M. A.; Assis, J. C. R.; Guimarães, P. R. B.; Pontes, L. A. M.; Almeida, S. Q.; Teixeira, J. S. R. Characterization of beef tallow biodiesel and their mixtures with soybean biodiesel and mineral diesel fuel. *Biomass and Bioenergy* **2010**, *34*, 438. [CrossRef]
- <sup>9</sup> Smith, P. C.; Ngothai, Y.; Dzuy Nguyen, Q.; O'Neill, B. K. Improving the low-temperature properties of biodiesel: Methods and Consequences. *Renewable Energy* **2010**, *35*, 1145. [CrossRef]
- <sup>10</sup> Monteiro, M. R.; Ambrozini, A. R. P.; da Silva Santos, M.; Boffo, E. F.; Pereira-Filho, E. R.; Lião, L. M.; Ferreira, A. G. Evaluation of biodiesel-diesel blends quality using <sup>1</sup>H NMR and chemometrics. *Talanta* **2009**, *78*, 660. [CrossRef]
- <sup>11</sup> Andrade, D. F.; Mazzei, J. L.; Kaiser, C. R.; D'Avila, L. A. Assessment of different measurement methods using <sup>1</sup>H NMR data for the analysis of the transesterification of vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2012**, *89*, 619. [CrossRef]
- <sup>12</sup> Flores, I. S.; Godinho, M. S.; de Oliveira, A. E.; Alcantara, G. B.; Monteiro, M. R.; Menezes, S. M. C.; Lião, L. M. Discrimination of biodiesel blends with <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and principal component analyses. *Fuel* **2012**, *99*, 40. [CrossRef]
- <sup>13</sup> Schale, S. P.; Le, T. M.; Pierce, K. M. Predicting feedstock and percent composition for blends of biodiesel with conventional diesel using chemometrics and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* **2012**, *94*, 320. [CrossRef]
- <sup>14</sup> Milina, R.; Mustafa, Z. Gas chromatographic investigations of compositional profiles of biodiesel from different origin. *Petroleum and Coal* **2013**, *55*, 12. [Link]
- <sup>15</sup> Pinzi, S.; Alonso, F.; García Olmo, J.; Dorado, M. P. Near infrared reflectance spectroscopy and multivariate analysis to monitor reaction products during biodiesel production. *Fuel* **2012**, *92*, 354. [CrossRef]
- <sup>16</sup> de Souza, A. V. A.; Cajaiba Da Silva, J. F. Biodiesel synthesis evaluated by using real-time ATR-FTIR. *Organic Process Research and Development* **2013**, *17*, 127. [CrossRef]
- <sup>17</sup> de Lima, S. M.; Silva, B. F. A.; Pontes, D. V.; Pereira, C. F.; Stragevitch, L.; Pimentel, M. F. In-line monitoring of the transesterification reactions for biodiesel production using NIR spectroscopy. *Fuel* **2014**, *115*, 46. [CrossRef]
- <sup>18</sup> Ferrão, M. F.; Viera, M. D. S.; Pazos, R. E. P.; Fachini, D.; Gerbase, A. E.; Marder, L. Simultaneous determination of quality parameters of biodiesel/diesel blends using HATR-FTIR spectra and PLS, iPLS or siPLS regressions. *Fuel* **2011**, *90*, 701. [CrossRef]

- <sup>19</sup> Alves, J. C. L.; Poppi, R. J. Biodiesel content determination in diesel fuel blends using near infrared (NIR) spectroscopy and support vector machines (SVM) *Talanta* **2013**, *104*, 155. [CrossRef]
- <sup>20</sup> Filgueiras, P. R.; Alves, J. C. L.; Poppi, R. J. Quantification of animal fat biodiesel in soybean biodiesel and B20 diesel blends using near infrared spectroscopy and synergy interval support vector regression. *Talanta* **2014**, *119*, 582. [CrossRef]
- <sup>21</sup> Skibsted, E. T. S.; Boelens, H. F. M.; Westerhuis, J. A.; Smilde, A. K.; Broad, N. W.; Rees, D. R.; Witte, D. T. Net analyte signal based statistical quality control. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 7103. [CrossRef]
- <sup>22</sup> de Oliveira, I. K.; de Carvalho Rocha, W. F.; Poppi, R. J. Application of near infrared spectroscopy and multivariate control charts for monitoring biodiesel blends. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *642*, 217-221. [CrossRef]
- <sup>23</sup> Rocha, W. F. C.; Rosa, A. L.; Martins, J. A.; Poppi, R. J. Multivariate control charts based on net analyte signal and near infrared spectroscopy for quality monitoring of Nimesulide in pharmaceutical formulations. *Journal of Molecular Structure* **2010**, *982*, 73. [CrossRef]
- <sup>24</sup> Rocha, W. F. C.; Poppi, R. J. Multivariate control charts based on net analyte signal (NAS) for characterization of the polymorphic composition of Piroxicam using near infrared spectroscopy. *Microchemical Journal* **2010**, *96*, 21. [CrossRef]
- <sup>25</sup> Rocha, W. F. C.; Poppi, R. J. Multivariate control charts based on net analyte signal (NAS) and Raman spectroscopy for quality control of carbamazepine. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *705*, 35. [CrossRef]
- <sup>26</sup> Costa, F. S. L.; Pedroza, R. H. P.; Porto, D. L.; Amorimb, M. V. P.; Lima, K. M. G. Multivariate Control Charts for Simultaneous Quality Monitoring of Isoniazid and Rifampicin in a Pharmaceutical Formulation Using a Portable Near Infrared Spectrometer. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2015**, *26*, 64. [CrossRef]
- <sup>27</sup> Lorber, A. Error Propagation and Figures of Merit for Quantification by Solving Matrix Equations. *Analytical Chemistry* **1986**, *58*, 1167. [CrossRef]
- <sup>28</sup> Bro, R.; Smilde, A. K. Principal component analysis. *Analytical Methods* **2014**, *6*, 2812. [CrossRef]
- <sup>29</sup> Jackson, J. E.; Mudholkar, G. S. Control procedures for residuals associated with principal component analysis. *Technometrics* **1979**, *21*, 341. [CrossRef]
- <sup>30</sup> Samios, D.; Pedrotti, F.; Nicolau, A.; Reiznautt, Q. B.; Martini, D. D.; Dalcin, F. M. A transesterification double step process - TDSP for biodiesel preparation from fatty acids triglycerides. *Fuel Processing Technology* **2009**, *90*, 599. [CrossRef]
- <sup>31</sup> Anderson, L. A.; Franz, A. K. Real-time monitoring of transesterification by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy: catalyst comparison and improved calculation for biodiesel conversion. *Energy & Fuels* **2012**, *26*, 6404. [CrossRef]
- <sup>32</sup> García-González, D. L.; Baeten, V.; Pierna, J. A. F.; Tena, N. Infrared, raman, and fluorescence spectroscopies: methodologies and applications In *Handbook of Olive Oil*, Aparicio, R; Harwood, J.; eds.;, 2013, cap 10. [CrossRef]
- <sup>33</sup> Giakoumis, E. G. A statistical investigation of biodiesel physical and chemical properties, and their correlation with the degree of unsaturation. *Renewable Energy* **2013**, *50*, 858. [CrossRef]
- <sup>34</sup> Siatis, N. G.; Kimbaris, A. C.; Pappas, C. S.; Tarantilis, P. A.; Polissiou, M. G. Improvement of biodiesel production based on the application of ultrasound: Monitoring of the procedure by FTIR spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2006**, *83*, 53. [CrossRef]
- <sup>35</sup> Reyman, D.; Saiz Bermejo, A.; Ramirez Uceda, I.; Rodriguez Gamero, M. A new FTIR method to monitor transesterification in biodiesel production by ultrasonication. *Environmental Chemistry Letters* **2014**, *12*, 235. [CrossRef]