Análise da qualidade de óleos vegetais em sementes intactas por RMN de baixa resolução

Daniela Toma

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, como um dos re-
quisitos para a obtenção do título de Mestre
em Ciências (Química Analítica).

Orientador:
Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago

São Carlos – SP

2009

"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há homens que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda vida ...
Esses são os imprescindíveis". Bertolt Brecht

*Dedico este trabalho ao grande amor da
minha vida, Wesley. Meu herói, obrigada
pelo apoio, pela presença incansável, por toda
paciência e dedicação!*

Agradecimentos

Primeiramente à Deus;

Ao meu grande amor, Wesley;

À minha família: minha mãe Ana, meu pai Tsugushiro, minha irmã Polyana e meu querido e amado sobrinho Akio;

Aos meus queridos amigos: Rachel, Ju, Gaúcha, Fazinha, Ingrid, Adriana, Romário, Cátia, Torto e muitos, muitos outros;

Ao meu querido professor Colnago: Professor, obrigada por tudo, por ter me ajudado tanto, pela paciência gigantesca e principalmente pela compreensão;

Aos meus colegas da Embrapa do grupo de RMN, em especial à Fabiana;

Aos meus colegas de trabalho, sei que muitos torceram por mim e ao meu querido chefe Gaba;

Aos meus futuros sogros: Dirlei e Vitor, muito obrigada pelo carinho!

Virgínia, muito obrigada;

Ao Instituto de Química de São Carlos - USP pela oportunidade da realização do curso de mestrado;

À Embrapa Instrumentação Agropecuária pela recepção, infra-estrutura e todas as facilidades oferecidas;

À Capes pela bolsa concedida;

Em fim, à todos que torceram muito por mim, MUITÍSSIMO Obrigada!!!!!!

Resumo

O biodiesel vem sendo usado como uma alternativa ao diesel com vantagens ambientais. No entanto, existem duas questões que deverão dificultar a implantação deste combustível no Brasil: a não-sustentabilidade da produtividade desses vegetais, e a baixa qualidade dos óleos vegetais disponíveis, inviabilizando a utilização como combustível. Para atenuação destes problemas se faz necessário o melhoramento genético dos vegetais cultivados e seleção de plantas silvestres que podem possuir alta produtividade de óleo/ha/ano. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar o uso da relaxometria por RMN em baixa resolução, através das técnicas CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), que gera sinal dependente do tempo de relaxação T_2 e CWFP (*Continuous Wave Free Precession*), que gera sinal dependente tanto de T_2 quanto de T_1 . Os valores de T_2 obtidos a partir dos dados de CPMG apresentaram alta correlação com a razão M_z/M_0 ($r=0,93$), T^* ($r=0,94$) e T_2 calculado ($r=0,91$), obtidos a partir dos dados CWFP, para as 31 amostras analisadas. T_2 apresentou correlação inversa com a viscosidade do óleo e número de cetano, ambos com $r \sim -0,63$ e correlação direta com o índice de iodo ($r=0,64$), quando foram retiradas as amostra de mamona e palmáceas, que possuem óleo diferente das outras sementes. Os dados obtidos a partir do sinal CWFP, T^* e M_z/M_0 também obtiveram correlação similar às observadas para T_2 . T_2 , T^* e T_2 calculado apresentaram alta correlação com o PC_1 , obtido pela análise de PCA e baixa correlação com PC_2 . T_1 obteve boa correlação com PC_2 dos dados CWFP. Com o acoplamento dessas metodologias não-destrutivas a um sistema de medidas *on-line*, essas medidas poderão ser obtidas rapidamente (cerca de 1 s por amostra) permitindo a análise de um grande número de amostras, necessárias para o desenvolvimento de sementes com óleo de alta qualidade. Este desenvolvimento é um dos gargalos para o uso de biodiesel em altas concentrações no diesel.

Abstract

Biodiesel is a highly promising renewable energy source that has gained widespread acceptance in recent years as an environmentally friendly substitute for petroleum diesel oil fuel. However, there are two questions that should difficult the use of this fuel in Brazil in high quantity: the low plant productivity and the low quality of available vegetable oils. To attenuate these problems is necessary the genetic improvement of cultivated plants and the selection of wild plants that may have high productivity of oil/ha/year and high quality oils. To help to accelerate the genetic selection of high quality oil we are developing fast and non-destructive low resolution NMR methods based on relaxometry. These methods uses CPMG pulse sequence (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), which generates a decay signal dependent of relaxation time T_2 , and CWFP (Continuous Wave Free Precession), which generates a decay signal dependent of both (T_1 and T_2) relaxation times. The T_2 values obtained through CPMG data shows high correlation to M_z/M_0 ratio ($r= 0,93$), T^* ($r= 0,94$) and T_2 calculated through CWFP data ($r= 0,91$), for the 31 analyzed samples. T_2 shows inverse correlation to the kinematic oil viscosity and cetane number, both with $r \sim 0,63$, and direct correlation to iodine value ($r= 0,64$), when excluded the castor bean and palm samples, which have different oil composition of others seeds. Data obtained through CWFP signal, T^* and M_z/M_0 , also have correlation similar to observed for T_2 . T_2 , T^* and M_z/M_0 shows high correlation to PC_1 and low correlation to PC_2 , both obtained through PCA analysis. T_1 shows some correlation to CWFP PC_2 . With the coupling of these non-destructive methodologies to a high-throughput on-line measurement system (about 1 s per sample) it will be possible to analyze thousands of samples per hour, allowing the identification of seeds with high quality vegetable oil, necessary for the genetic selection of plants, which is necessary to speed up the Brazilian biodiesel program.

Lista de Figuras

Figura 1.1 –	Variação da emissão de gases de acordo com a porcentagem de biodiesel no combustível. NO_x óxidos de nitrogênio; PM = partícula em suspensão; CO = monóxido de carbono; HC = hidrocarboneto.	19
Figura 1.2 –	Processo de transesterificação para obtenção do biodiesel.	21
Figura 1.3 –	Estruturas dos ácidos graxos (1) ácido oléico, (2) ácido linoléico e (3) ácido linolênico.	24
Figura 1.4 –	Estrutura química do ácido ricinoléico.	27
Figura 1.5 –	Representação vetorial da quantização do momento angular de <i>spin</i> , para o isótopo ^1H ($I=1/2$).	30
Figura 1.6 –	Representação dos níveis de energia quando expostos a B_0	31
Figura 1.7 –	Representação da precessão dos <i>spins</i> nucleares na presença de um campo magnético externo.	31
Figura 1.8 –	Polarização da magnetização após a aplicação de um pulso.	33
Figura 1.9 –	Relaxação longitudinal e variação temporal de M_z após um pulso de π (a) vetor magnetização ao longo da direção z ; (b) evolução temporal da magnetização.	34
Figura 1.10 –	Representando a diferença entre o decaimento natural T_2 e o decaimento efetivo T_2^*	36
Figura 1.11 –	Seqüência de pulsos da técnica de Eco de Hahn, onde τ representa o tempo de espera entre os pulsos e T_r o tempo espera para a repetição da seqüência.	37
Figura 1.12 –	(A) Magnetização no equilíbrio térmico em $t = 0$. (B) Após o primeiro pulso a magnetização se desloca em 90 graus para o plano $x'y'$. (C) Durante um intervalo de tempo τ , a magnetização se defasa $\Delta\omega\tau$ no plano $x'y'$. (D) Ao final do intervalo de tempo τ um segundo pulso de 90 graus é aplicado deslocando os momentos magnéticos do plano xy para o plano $x'z$. (E) Durante o novo intervalo τ , os momentos magnéticos precessionam $\Delta\omega\tau$ ao redor de z , refocalizando-se em 2τ . Como se pode ver, a magnetização descreve a forma de um oito "8", denominado em inglês como " <i>8 Ball</i> ".	37
Figura 1.13 –	seqüência de pulsos sugerida por Carr e Purcell.	38

Figura 1.14 – (A) Magnetização no equilíbrio térmico em $t = 0$. (B) Após o primeiro pulso a magnetização se desloca em 90 graus para o plano $x'y'$. (C) Durante um intervalo de tempo τ , a magnetização se defasa $\Delta\omega\tau$ no plano $x'y'$. (D) Ao final do intervalo de tempo τ um segundo pulso de 180 graus em x' é aplicado, provocando a rotação em 180 graus em todos os vetores. Durante o novo intervalo τ , os momentos magnéticos precessionam $\Delta\omega\tau$, refocalizando-se em 2τ , recuperando a coerência das magnetizações. (E) Representação do sinal do eco. (F) Os vetores continuam a precessionar dando seguimento ao ciclo de pulsos.	38
Figura 1.15 – Amplitude do sinal adquirida pela sequência de pulsos <i>spin</i> eco (90 graus τ 180 graus) proposta por Carr-Purcell.	39
Figura 1.16 – sequência de pulsos da técnica de CPMG.	39
Figura 1.17 – (A) Magnetização no equilíbrio térmico em $t = 0$. (B) Após o primeiro pulso a magnetização se desloca em 90 graus para o plano $x'y'$. (C) Durante um intervalo de tempo τ , a magnetização se defasa $\Delta\omega\tau$ no plano $x'y'$. (D) Ao final do intervalo de tempo τ um segundo pulso de 180 graus é aplicado em y' . Durante o novo intervalo τ , há a refocalização em 2τ , recuperando a coerência das magnetizações. (E) Representação do sinal do eco. (F) Os vetores continuam a precessionar dando seguimento ao ciclo de pulsos.	40
Figura 1.18 – sequência de pulsos da técnica de CWFP.	42
Figura 1.19 – Sinais de RMN de uma amostra de óleo vegetal obtidos com a técnica de análise do FID (a) e CWFP (b) (Azeredo <i>et al.</i> , 2000).	43
Figura 1.20 – Representação do sinal do CWFP para amostra de ácido fosfórico (^1H) (Venâncio, 2005).	43
Figura 1.21 – Sinal de RMN <i>on-line</i> obtido pela técnica CWPF de 99 amostras de sementes oleaginosas (Colnago <i>et al.</i> , 2007).	45
Figura 3.1 – Esquema de um sistema de RMN <i>on-line</i> , onde d = espaço necessário para a magnetização da amostra (200 mm), V = velocidade linear da esteira e D = distância entre as amostras (20 mm).	61
Figura 3.2 – Esteira em policarbonato preto (A), usada diretamente para colocação de amostras (B) ou com porta-amostras em policarbonato branco (C). D indica a posição do motor de passos e a polia acionadora da esteira.	62
Figura 3.3 – Foto da bobina tipo sela montada sobre tubo de acrílico.	62
Figura 3.4 – Tela de configuração do modo de operação da esteira.	63
Figura 4.1 – Sinais normalizados de CPMG das sementes linhaça, niger e moringa.	65

Figura 4.2 – Decaimentos do sinal de CWFP para as amostras de linhaça, niger e moringa.	66
Figura 4.3 – Sinais da figura 4.1 ajustados: mono (a) e bi exponencial (b). Resíduos (diferença entre o ajuste e o respectivo sinal) dos ajustes: mono (c) e bi exponencial (d).	69
Figura 4.4 – Todos os sinais de decaimentos obtidos pela técnica CPMG.	71
Figura 4.5 – Perfil de variação dos tempos de relaxação obtidos pelos ajustes mono e bi exponenciais para CPMG.	71
Figura 4.6 – Gráfico entre os valores de T_2 mono <i>versus</i> T_{21} (a) e T_{22} (b) biexponencial.	72
Figura 4.7 – Gráfico entre os valores de T_2 mono <i>versus</i> viscosidade, (a) com mamona e (b) sem mamona.	74
Figura 4.8 – Gráfico entre os valores de T_2 mono <i>versus</i> viscosidade, sem palmáceas e mamona.	74
Figura 4.9 – Gráficos entre os valores de T_2 mono <i>versus</i> índice de iodo com (a) e sem palmáceas (b).	75
Figura 4.10 – Gráficos entre os valores de T_2 mono <i>versus</i> número de cetano com (a) e sem palmáceas (b).	76
Figura 4.11 – Correlações entre viscosidade e índice de iodo com (a) e sem palmáceas (b).	76
Figura 4.12 – Correlações entre viscosidade e número de cetano com (a) e sem palmáceas (b).	77
Figura 4.13 – Curva de correlação de T_2 mono CPMG e razão M_z/M_0 medida no sinal CWFP.	78
Figura 4.14 – Decaimento exponencial dos sinais CWFP da figura 4.2 ajustados: mono (a) e bi exponencial (b). Análise dos resíduos dos ajustes: mono (c) e bi exponencial (d).	79
Figura 4.15 – Todos os sinais de decaimentos obtidos pela técnica CWFP.	81
Figura 4.16 – Perfil de variação dos tempos de relaxação obtidos pelos ajustes mono e bi exponencial para CWFP.	81
Figura 4.17 – Correlação entre os valores de T^* mono e T_{21}^* bi (a) e T^* mono e T_{22}^* bi (b).	82
Figura 4.18 – Correlação de T^* mono CWFP <i>versus</i> T_2 mono CPMG.	83
Figura 4.19 – Correlação de (a) T_{21}^* bi CWFP <i>versus</i> T_{21} bi CPMG e (b) T_{22}^* bi CWFP <i>versus</i> T_{22} bi CPMG.	83

Figura 4.20 – Curva de correlação entre os valores de T_2 calculado a partir do dados CWFP e T_2 CPMG, ajustado mono exponencialmente.	86
Figura 4.21 – Gráfico entre os valores T_1 e T_2 calculados pelas equações 4.1 e 4.2. .	86
Figura 4.22 – Gráfico entre os valores de T_1/T_2 <i>versus</i> T_2 mono CPMG.	87
Figura 4.23 – Exemplo de um dendrograma de HCA.	88
Figura 4.24 – Representação gráfica da decomposição de um conjunto de dados formados por 24 amostras, 3 variáveis (dimensões) Var.1, Var.2 e Var.3. Após a execução da PCA o sistema é reduzido a duas componentes principais (dimensões) PC_1 e PC_2	89
Figura 4.25 – Gráfico de <i>scores</i> PC_1 <i>versus</i> PC_2	90
Figura 4.26 – Exemplo de pré-processamento de dados para 10 variáveis fictícias: (a) dados originais, (b) dados centrados na média (c) dados auto-escalados. As linhas horizontais representam as médias de cada variável (Matos <i>et al.</i> , 2003).	92
Figura 4.27 – Dendrograma dos dados de CPMG AE (a) e CM (b).	93
Figura 4.28 – Gráfico de <i>scores</i> do PCA de CPMG, CM, com 3 componentes principais com 99,91%, PC_1 98,05% e PC_2 1,74% (a) e gráfico de <i>scores</i> do PCA de CPMG, AE, com 3 componentes principais com 95,21%, PC_1 91,18% e PC_2 2,91% (b).	94
Figura 4.29 – Gráficos dos dados CPMG entre PC_1 AE <i>versus</i> PC_1 CM com $r=0,99$ (a) e entre os PC_2 AE <i>versus</i> PC_2 CM, com $r=-0,96$ (b).	94
Figura 4.30 – PC_1 CPMG AE <i>versus</i> T_2 mono CPMG (a), PC_2 CPMG AE <i>versus</i> T_2 mono CPMG (b).	95
Figura 4.31 – Dendrograma dos dados CWFP AE índice de similaridade 0,81.	96
Figura 4.32 – Gráfico de <i>scores</i> do PCA de CWFP, pré-processamento auto-escalado, com 3 componentes principais com 99,42%, PC_1 95,01% e PC_2 3,70%.	97
Figura 4.33 – Gráfico de PC_1 CPMG AE <i>versus</i> PC_1 CWFP AE com $r=0,80$	97
Figura 4.34 – Gráficos entre PC_1 CWFP AE <i>versus</i> T^* mono CWFP (a), PC_2 CWFP AE <i>versus</i> T^* mono CWFP (b).	98
Figura 4.35 – Gráfico entre o PC_1 CWFP e T_1 CWFP (a) e entre PC_2 e T_1 (b). ...	99
Figura 4.36 – Gráficos de PC_1 CWFP <i>versus</i> : viscosidade (mm^2s^{-1}) (a), número de cetano (b) e índice de iodo (c).	100
Figura 4.37 – Gráficos de PC_2 CWFP <i>versus</i> : viscosidade (mm^2s^{-1}) (a), índice de iodo (b) e número de cetano (c).	101
Figura 4.38 – Sinal CPMG de 42 amostras de girassol, obtido no sistema <i>on-line</i> . ..	102

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 – Nomes Vulgares e Científicos de sementes oleaginosas utilizadas.	53
Tabela 3.2 – Composição em ácidos graxos (média de valores da literatura) para as amostras da tabela 3.1 e informações para os cálculos na tabela 3.3. ..	55
Tabela 3.3 – Siglas utilizadas na tabela 3.2 dos ácidos graxos com respectivas fórmulas químicas, massas moleculares e valores de viscosidade.	56
Tabela 4.1 – Valores de T_2 mono e T_2 bi exponencial (T_{21} e T_{22}) e as respectivas intensidades dos decaimentos, I_1 e I_2 , para todos os sinais da figura 4.4.	70
Tabela 4.2 – Valores para viscosidade (μ), índice de iodo (IV) e número de cetano (CN) para o biodiesel de óleo com a composição em ácidos graxos das sementes analisadas.	73
Tabela 4.3 – Correlações entre T_2 e μ , IV e CN.	77
Tabela 4.4 – Valores de T^* mono e biexponencial do sinal CWFP das 31 amostras analisadas.	80
Tabela 4.5 – Correlações entre T^* e μ , IV e CN e razão M_z/M_0 e μ , IV e CN.	83
Tabela 4.6 – Valores de T_1 , T_2 calculado e da razão entre T_1 e T_2 das sementes analisadas.	85

Lista de Siglas

FAMES – (*Fatty acid methyl esters*), ésteres metílicos de ácidos graxos

PNPB – Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel

BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social

ASTM – *American Society for Testing and Materials*

EN – *European Normalization*

NO_x – compostos nitrogenados

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

CPMG – Carr-Purcell-Meibom-Gill

CWFP – *Continuous Wave Free Precession*

r.f. – radiofrequência

FID – *Free Induction Decay*

CP – Carr Purcell

SSFP – *Steady State Free Precession*

PCA - Análises de Componentes Principais

HCA – Análises de Agrupamentos Hierárquicos

PC – Componente Principal

μ – viscosidade

IV – índice de iodo

CN – número de cetano

CM – Centrado na média

AE – Auto-escalado

Lista de Símbolos

I – número quântico de spin

m_I – número quântico direcional

h – constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J.s)

μ – momento magnético nuclear

γ – constante magnetogírica

ρ – momento angular de spin

B_0 – campo magnético estático

α – estado de menor energia

β – estado de maior energia

ΔE – diferença de energia

n – números inteiros e positivos

ν – frequência da radiação aplicada (Hz).

ω_0 – frequência angular (frequência de Larmor)

θ – ângulo entre μ e B_0

N_α – população no nível de menor energia

N_β – população no nível de maior energia

k – constante de Boltzmann ($1,3806 \times 10^{-23}$ JK⁻¹)

T – temperatura (K)

M_0 – magnetização resultante

B_1 – campo magnético oscilante

Θ – ângulo rotação da magnetização

t_p – tempo de duração do pulso de r.f.

M_{xy} – magnetização projetada no plano xy do sistema de referencial rotativo

M_z – magnetização no estado estacionário

T_1 – constante de tempo de relaxação longitudinal

T_2 – constante de tempo de relaxação transversal

τ – intervalo entre os pulsos

T_r – tempo de repetição

I_0 – intensidade do sinal para $T_r > 5T_1$

ΔB_0 – não homogeneidade do campo magnético

T^* – constante de tempo de relaxação sob efeito da não-homogeneidade

I_{eco} – intensidade do eco dependente de τ e T_2

S/R – razão sinal/ruído

$T_{(\alpha=\pi/2)}$ – constante de tempo para pulsos de 90 graus

μ_0 – viscosidade cinemática para a mistura

μ_i – viscosidade para cada ácido graxo

A_i – porcentagem para cada ácido graxo

D – quantidade de duplas ligações

MW_i – a massa molecular de cada ácido graxo

r – coeficiente de correlação

Sumário

1	Introdução	p. 17
1.1	Definição de Biodiesel	p. 20
1.2	Processo de Produção do Biodiesel	p. 20
1.3	Óleo vegetal <i>in natura</i> como fonte de energia renovável	p. 22
1.4	Propriedades do biodiesel	p. 23
1.4.1	Número de Cetano	p. 23
1.4.2	Estabilidade Oxidativa	p. 24
1.4.3	Viscosidade	p. 25
1.4.4	Lubricidade	p. 25
1.5	Matéria-prima ideal	p. 26
1.6	Proposta para aumento da qualidade e quantidade dos óleos vegetais	p. 27
1.7	Contribuição da Ressonância magnética Nuclear	p. 28
1.8	Fundamentos da Ressonância Magnética Nuclear	p. 29
1.8.1	Relaxação Longitudinal	p. 34
1.8.2	Relaxação Transversal	p. 35
1.9	<i>Continuous Wave Free Precession</i> (CWFP)	p. 41
1.10	Otimização das medidas de RMN em baixo campo	p. 44
1.11	Análise do teor e qualidade de óleo em sementes por RMN	p. 45
2	Objetivos	p. 52
3	Materiais e Métodos	p. 53
3.1	Amostras	p. 53
3.2	Determinação da viscosidade do biodiesel a partir dos dados de Cromatografia gasosa	p. 56
3.3	Determinação do índice de iodo e número de cetano do biodiesel a partir dos dados de Cromatografia gasosa	p. 57
3.4	Análises por RMN	p. 57

3.4.1	Análise da qualidade do óleo por CPMG	p. 58
3.4.2	Análise da qualidade do óleo com CWFP	p. 59
3.4.3	Análise quimiométrica	p. 60
3.4.3.1	Comparação entre PCA e HCA	p. 60
3.5	Análises das amostras por RMN utilizando Esteira	p. 61
4	Resultados e Discussão	p. 64
4.1	Análise multiexponencial dos dados de CPMG	p. 67
4.1.1	Correlação de T_2 e propriedades quantitativas do biodiesel	p. 72
4.2	Análise dos sinais CWFP	p. 78
4.3	Análise Quimiométrica	p. 87
4.3.1	Análise dos dados de CPMG por Quimiometria	p. 92
4.3.2	Análise dos dados de CWFP por Quimiometria	p. 96
4.3.3	Análises de PC_1 e PC_2 CWFP e as propriedades quantitativas do biodiesel	p. 99
4.4	Análises <i>on-line</i>	p. 102
5	Conclusões	p. 104
	Referências	p. 107

1 Introdução

A necessidade crescente de redução da emissão dos gases, responsáveis pelo aquecimento global e conseqüentemente pelo efeito estufa, juntamente com os altos preços do petróleo, estimularam o desenvolvimento de combustíveis renováveis, que reciclam o gás carbônico atmosférico via fotossíntese.

O Protocolo de Kyoto, (Ramos *et al.*, 2003) foi desenvolvido durante o fórum ambiental Rio-92 e ratificado em Kyoto, por mais de 140 países. Segundo esse protocolo, os países desenvolvidos que fazem parte do acordo se comprometem a reduzir até 2012 a emissão de gases de efeito estufa em pelo menos 5%, de acordo com os níveis de 1990.

Estados Unidos, o maior emissor de gases de efeito estufa do mundo (cerca de 36% do total mundial), não ratificou o acordo. Por isso, os países que ratificaram o protocolo estão buscando mobilizar a comunidade internacional para que promova uma ação conjunta com o objetivo de estabilizar a concentração dos gases causadores do efeito estufa e, assim, limitar a interferência antropogênica sobre o sistema climático global (Ramos *et al.*, 2003).

Como exemplo, o etanol já demonstrou sua eficiência e conseqüentemente a liderança mundial do Brasil na produção desse tipo de combustível renovável. Hoje o valor numérico do balanço energético (quantidade de energia produzida no total da energia gasta para a produção) do álcool é maior que oito (Azeredo, Engelsberg e Colnago, 2000). Porém, para o diesel, o combustível mais usado no país, principalmente em veículos de transporte de carga e passageiros e máquinas agrícolas, ainda há muita pesquisa e desenvolvimento a serem realizados até que se atinja um patamar tecnológico semelhante ao do álcool.

O biodiesel, ésteres metílicos de ácido graxo (FAME's - *Fatty acid methyl esters*),

obtido de sementes oleaginosas e gorduras, é atualmente considerado adequado para uso como combustível em motores à diesel, pois é ambientalmente seguro, não-tóxico e biodegradável.

O Brasil é o país que reúne o maior número de vantagens comparativas para liderar a agricultura de energia. A primeira vantagem é a perspectiva de incorporação de áreas à agricultura de energia, sem competição com a agricultura de alimentos, e com a minimização de impactos ambientais. O segundo aspecto a considerar é a possibilidade de múltiplos cultivos no decorrer do ano. Por situar-se, predominantemente, na faixa tropical e subtropical do planeta, o Brasil recebe intensa radiação solar ao longo do ano. Em decorrência de sua extensão e localização geográfica, o Brasil apresenta diversidade de clima, biodiversidade e detém um quarto das reservas superficiais de água doce (Rodrigues, 2005).

Em curto prazo, a principal força propulsora do crescimento da demanda por agro-energia será a pressão social pela substituição de combustíveis fósseis. É considerado que a concentração de CO₂ atmosférico vem aumentando significativamente nos últimos anos, havendo então, a necessidade do controle das fontes emissoras de gases causadores do efeito estufa, como a queima de combustíveis fósseis, o principal responsável pela produção destes gases.

Vários estudos têm demonstrado que a substituição do diesel de petróleo por biodiesel reduziria a quantidade de CO₂ introduzida na atmosfera. A redução não se daria exatamente na proporção de 1:1, pois cada litro de biodiesel libera na atmosfera cerca de 15% de CO₂ a mais que o diesel convencional. Todavia, diferentemente do combustível fóssil, o CO₂ proveniente do biodiesel é reciclado nas áreas agricultáveis, gerando novamente óleo vegetal para um novo ciclo de produção, proporcionando um balanço equilibrado entre a massa de carbono fixada e a massa presente na atmosfera. Portanto, a redução real no acúmulo de CO₂ na atmosfera será possível somente com a redução do uso de derivados do petróleo (Ramos *et al.*, 2003).

Para o biodiesel as emissões de monóxido e dióxido de carbono e material particulado

são inferiores às do diesel convencional, se considerado o balanço energético, enquanto que os níveis de emissões de gases nitrogenados (NO_x) são ligeiramente maiores para o biodiesel (figura 1.1). Por outro lado, a ausência total de enxofre confere ao biodiesel uma grande vantagem, pois não há qualquer emissão dos gases sulfurados normalmente detectados no escape dos motores movidos a diesel (Ramos *et al.*, 2003).

A redução do teor de enxofre no diesel reduz a viscosidade do produto a níveis não compatíveis com a sua especificação, tornando-se necessária a incorporação de aditivos com poder lubrificante, como o biodiesel. A adição de biodiesel em níveis de até 5% (B5) corrigirá esta deficiência viscosimétrica, que confere à mistura propriedades lubrificantes vantajosas para o motor (Ramos *et al.*, 2003).

Figura 1.1 - Variação da emissão de gases de acordo com a porcentagem de biodiesel no combustível. NO_x óxidos de nitrogênio; PM = partícula em suspensão; CO = monóxido de carbono; HC = hidrocarboneto.

O caráter renovável do biodiesel é devido ao fato de que as matérias-primas utilizadas para a sua produção serem oriundas de fontes renováveis, ao contrário dos derivados de petróleo. Uma exceção a essa regra diz respeito à utilização do metanol, derivado de petróleo, como agente transesterificante. Isso significa que a prática adotada no Brasil, isto é, a utilização do etanol, derivado de biomassa, torna o biodiesel um produto verdadeiramente renovável.

O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) foi lançado em dezembro de 2004. Depois de elaborado um marco regulatório, o BNDES criou o Programa

de Apoio a Investimentos em Biodiesel, quando a mistura de 2% de biodiesel no diesel ainda era voluntária. Admitia-se que a adição de 2% de biodiesel não exigiria alterações nos motores movidos a diesel. Além disso, os motores que passarem a utilizar o biodiesel misturado ao diesel nessa proporção terão a garantia de fábrica. Em 13 de janeiro de 2005, foi sancionada a Lei 11.097, que introduziu o biodiesel na matriz energética, permitiu a mistura de 2% de biodiesel no diesel e estipulou prazo de três anos para a mistura se tornar obrigatória. Em julho de 2008, tornou-se obrigatório o uso de 2% de biodiesel. Em 2013, oito anos após a promulgação da lei, o percentual obrigatório de mistura será de 5% (Prates, Pierobon e da Costa, 2007).

1.1 Definição de Biodiesel

O biodiesel, monoalquil-éster de ácidos graxos, é um combustível biodegradável, derivado de fontes renováveis, provenientes de óleo vegetal ou de gordura animal. Pode ser utilizado integralmente ou em variáveis proporções com o diesel, em motores do ciclo a diesel, sem a necessidade de onerosas adaptações.

No Brasil, a Lei 11.097/05 define biodiesel como "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" (Prates, Pierobon e da Costa, 2007).

As especificações para biodiesel no Brasil são menos restritivas que na Europa, permitindo produção com base em diversas matérias-primas. Essa flexibilidade das especificações contribuiu não só para maior competitividade entre matérias-primas, mas também para a diversificação da produção em termos regionais.

1.2 Processo de Produção do Biodiesel

Há três rotas tecnológicas que estão sendo estudadas para a substituição do óleo diesel por derivados de óleos vegetais:

- a) O uso do óleo vegetal *in natura*;
- b) O craqueamento catalítico ou térmico refere-se ao processo químico provocado pela quebra de moléculas por aquecimento em altas temperaturas, formando uma mistura de compostos químicos com propriedades muito semelhantes às do diesel de petróleo.
- c) A transesterificação (figura 1.2), o processo mais utilizado mundialmente, consiste na reação química de triglicerídeos (óleos e gorduras vegetais ou animais) com álcoois (metanol ou etanol), na presença de um catalisador (ácido, básico ou enzimático, sendo os mais utilizados NaOH ou KOH), obtendo a glicerina e o éster (biodiesel) (Rodrigues, 2005).

Figura 1.2 - Processo de transesterificação para obtenção do biodiesel.

A glicerina, subproduto da obtenção de biodiesel, é um produto de alto valor agregado quando utilizado na indústria farmacêutica, de cosméticos e alimentos e bebidas, entre outros. Pode ser utilizada como um combustível de baixa qualidade em caldeiras, em substituição ao óleo combustível. Porém, a sua queima exige controle de emissões de substâncias tóxicas como a acroleína, um poluente altamente tóxico.

A experiência internacional indica uma tendência à adoção da transesterificação com a utilização do metanol (rota metílica). Uma rota alternativa desenvolvida no Brasil utiliza o etanol (rota etílica) na mistura, mas essa tecnologia ainda necessita de aperfeiçoamentos no processo produtivo em escala comercial. As principais diferenças entre essas duas rotas decorrem do fato de que o processo de transesterificação com etanol é mais lento e a separação das fases (glicerina-biodiesel-álcool) é mais complexa. Apesar de o etanol ser abundante no Brasil, renovável e de baixa toxicidade, o seu preço é superior ao do metanol. Esse último, por sua vez, é importado, não-renovável, tem grande toxicidade e menor poder de combustão (Prates, Pierobon e da Costa, 2007).

1.3 Óleo vegetal *in natura* como fonte de energia renovável

O biodiesel é um substituto natural do diesel, sendo uma alternativa capaz de atender à maior parte da frota de veículos a diesel já existente no mercado, sem a necessidade de investimentos tecnológicos no desenvolvimento de motores. Por outro lado, o uso de outros combustíveis limpos, como o óleo *in natura*, requer uma adaptação considerável para sustentar o desempenho exigido pelos motores (Ramos *et al.*, 2003).

O Brasil está realizando pesquisas na utilização de óleos vegetais *in natura* como combustível alternativo; como os óleos virgens de macaúba, pinhão-manso, dendê, indaiá, buriti, pequi, mamona, babaçu, cotieira, tingui e pupunha. No entanto, a alta viscosidade e a baixa volatilidade dos óleos vegetais *in natura* podem provocar problemas ao funcionamento do motor. Dentre os problemas que geralmente aparecem após longos períodos de utilização, destacam-se a formação de depósitos de carbono por combustão incompleta, a diminuição da eficiência de lubrificação do óleo pela ocorrência de polimerização (no caso de óleos poliinsaturados) e a atomização ineficiente e/ou entupimento dos sistemas de injeção.

No Brasil, as alternativas para a produção de óleos vegetais são diversas, o que constitui um dos diferenciais para a estruturação do programa de produção e uso do biodiesel no país. Por se tratar de um país tropical, com dimensões continentais, o desafio é o aproveitamento das potencialidades regionais. Isso é válido tanto para culturas tradicionais, como a soja, o amendoim, o girassol, a mamona e o dendê, quanto para novas alternativas como o pinhão-manso, o nabo forrageiro, o pequi, o buriti, a macaúba e uma grande variedade de oleaginosas a serem exploradas.

Dentre as várias alternativas, merecem destaque: a soja, cujo óleo representa 90% da produção brasileira de óleos vegetais, o dendê, o côco e o girassol, pelo rendimento em óleo, e a mamona, pela resistência à seca (Rodrigues, 2005).

1.4 Propriedades do biodiesel

Recentemente, as indústrias de alimentos e biocombustíveis têm requerido o desenvolvimento de óleos vegetais de alta qualidade (Knothe, 2005). Os óleos vegetais com concentração elevada de ácido oléico são os mais pesquisados devido à sua menor suscetibilidade à oxidação. Biodiesel de óleos poliinsaturados é menos estável do que os de monoinsaturados e saturados. Por outro lado, os ácidos graxos saturados possuem alta viscosidade e uma tendência maior a se solidificar em baixa temperatura. Consequentemente, a tentativa de encontrar um rendimento elevado e sementes oleaginosas de qualidade adequada para produção de biodiesel é uma exigência urgente para o sucesso dos programas do biodiesel.

As principais características que determinam os padrões de identidade e qualidade do biodiesel são: número de cetano, estabilidade oxidativa (índice de iodo) e viscosidade (Knothe, 2005).

1.4.1 Número de Cetano

O número de cetano (CN) é um indicador da qualidade de ignição dos combustíveis utilizados em motores diesel. É conceitualmente semelhante ao número de octano utilizados para gasolina. O CN de um combustível para motores diesel está relacionado com o tempo de demora da ignição (ID), ou seja, o tempo entre a injeção do combustível no cilindro e início da ignição. Portanto, quanto menor o ID maior deverá ser o CN. O valor de CN diminui com a diminuição do comprimento da cadeia, e com a ramificação crescente (Knothe, 2005).

As normas da ASTM (*American Society for Testing and Materials*) dos Estados Unidos e EN (*European Normalization*) são as principais normas utilizadas como parâmetros de padrões. A norma ASTM D975 para o CN do diesel requer um mínimo de 40 enquanto os padrões para o biodiesel prescrevem um mínimo de 47 para ASTM D6751 ou 51 para EN14214 (Knothe, 2005).

As emissões de NO_x aumentam com o número de insaturações e diminuem com o comprimento da cadeia, levando a uma relação com os CN's destes compostos, pois os valores de CN diminuem com o aumento do número de insaturações e aumenta com o comprimento da cadeia (Knothe, 2005).

1.4.2 Estabilidade Oxidativa

A instabilidade oxidativa do biodiesel é um problema, principalmente se for armazenado por um longo período. Geralmente, fatores como a presença de ar, temperaturas elevadas ou a presença de metais facilitam a oxidação, sobretudo, a influência da estrutura dos compostos de ácidos graxos, principalmente a insaturação.

A auto-oxidação ocorre devido à presença de duplas ligações nas cadeias dos ácidos graxos, que depende do número e da posição das duplas ligações. Por exemplo, o ácido linoléico possui duplas ligações no C9 e C12 e o ácido linolênico possui duplas ligações em C9, C12, C15 sendo ainda mais propensas para a auto-oxidação que o ácido oléico com uma única insaturação no C9 (figura 1.3). Taxas relativas de oxidação são 1 para oléicos, 41 para linoléicos, e 98 para linolênicos (Frankel, 1998). Estes dados são fundamentais, pois as quantidades significativas de ácido oléico, linoléico ou linolênico influenciarão na estabilidade oxidativa dos combustíveis.

Figura 1.3 - Estruturas dos ácidos graxos (1) ácido oléico, (2) ácido linoléico e (3) ácido linolênico.

Para o conhecimento prévio da estabilidade da oxidação de um dado óleo é necessário que se conheça a sua composição percentual em ácidos graxos. Um dos meios mais

utilizados para se inferir sobre a susceptibilidade de um determinado óleo à oxidação é a avaliação de seu índice de iodo. O índice de iodo indica o número de insaturações de uma determinada amostra e esse valor constitui um dos parâmetros de identidade dos óleos vegetais.

1.4.3 Viscosidade

Reduzir a viscosidade é a principal razão pela qual os óleos vegetais ou gorduras são transesterificados, formando o biodiesel. A alta viscosidade dos óleos vegetais ou gorduras afeta o processo de atomização de um combustível formando depósitos no motor. A viscosidade do biodiesel é ligeiramente superior ao do diesel, mas cerca de uma ordem de grandeza inferior à do óleo vegetal ou gordura (Dunn e Knothe, 2001) e (Knothe e Dunn, 2001). A viscosidade aumenta com o comprimento da cadeia e com o grau de saturação (Knothe e Steidley, 2005). A viscosidade cinemática do biodiesel foi incluída nos padrões, ASTM D6751, 1.9-6.0 mm²s⁻¹ e EN 14214 3.5-5.0 mm²s⁻¹.

1.4.4 Lubricidade

Com o advento do combustível com baixa quantidade de enxofre para a utilização em motores a diesel, a questão da lubricidade do diesel está se tornando cada vez mais importante. A dessulfurização do diesel é necessária para a eliminação de compostos sulfurosos, que são altamente poluentes. Porém no processo de dessulfurização do diesel há a eliminação de compostos polares não-sulfurosos, que reduzem a lubricidade deste combustível, que é essencial para o bom funcionamento do motor, como bombas de combustível e injetores. A adição de biodiesel em níveis baixos (1-2%) é a resposta para o diesel com baixo teor de enxofre devido à diferença de viscosidade entre ambos (Knothe e Steidley, 2005).

Ácidos insaturados exibem melhor lubricidade do que os saturados. A lubricidade não foi incluída como especificação em normas para o biodiesel, apesar da vantagem definitiva de biodiesel *versus* diesel com respeito a propriedades deste combustível.

1.5 Matéria-prima ideal

De uma maneira geral, o biodiesel pode ser produzido a partir de qualquer tipo de óleo vegetal, mas nem todo óleo vegetal pode ou deve ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel. Portanto, a viabilidade de cada matéria-prima dependerá de suas respectivas competitividades técnica, econômica e sócio-ambiental, e inclusive importantes aspectos agronômicos, tais como: (a) o teor de óleos vegetais; (b) a produtividade por unidade de área; (c) o equilíbrio agronômico e demais aspectos relacionados com o ciclo de vida da planta; (d) a atenção a diferentes sistemas produtivos; (e) o ciclo da planta (sazonalidade); e (f) sua adaptação territorial, atendendo a diferentes condições edafoclimáticas (Ramos *et al.*, 2003).

O óleo de soja é hoje a principal matéria-prima usada na produção de biodiesel. No entanto, há várias outras oleaginosas que poderão ser empregadas para a produção do biodiesel que se encontram em fase de avaliação e desenvolvimento de suas cadeias produtivas. Na região norte, por exemplo, dendê, babaçu e outras palmáceas; na região nordeste, babaçu, mamona, dendê, algodão, pinhão-manso e côco; na região centro-oeste, pinhão-manso, mamona, algodão, girassol, macaúba e gordura animal; na região sul, colza, pinhão-manso, girassol e algodão; e na região sudeste, pinhão-manso, macaúba, mamona, algodão e girassol (Ramos *et al.*, 2003).

Apesar de muitas vantagens na utilização do biodiesel, há dois graves problemas do ponto de vista de produção de óleos vegetais que poderão retardar ou dificultar o uso de derivados de óleos vegetais como combustível.

O primeiro problema é em relação à produtividade de óleo das espécies cultivadas. Atualmente, as principais fontes de óleos vegetais para biodiesel são: a soja, mamona, girassol, algodão, amendoim, que produzem cerca de 1 tonelada de óleo por hectare por ano (1 Ton/ha/ano). Portanto, a produtividade desses vegetais não é economicamente e nem energeticamente sustentável e nem suficiente para atender a demanda futura do mercado. O dendê é a única cultura comercial disponível no país, que possui alta

produtividade, com potencial de produção de mais de 5 Ton/ha/ano de óleo vegetal e balanço energético acima de 5. Entretanto, o dendê só é cultivado na região amazônica, devido a sua alta demanda hídrica.

O segundo problema é relativo à qualidade dos óleos vegetais disponíveis. Os óleos vegetais, citados anteriormente, possuem alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, indesejáveis para a utilização como combustível, devido à baixa estabilidade oxidativa e ao baixo número de cetano. Além disso, esses óleos vegetais induzem um maior depósito de carbono que os óleos com alto teor de ácidos graxos monoinsaturados ou saturados (Knothe, Matheaus e Ryan III, 2002).

Por estes motivos, esses óleos não atendem às especificações das normas da ASTM e EN para o uso na produção de biodiesel. Por exemplo, o óleo de mamona possui alta concentração de ácido ricinoléico (figura 1.4), cerca de 80%, o que torna o seu biodiesel muito viscoso, podendo levar a um rápido entupimento dos filtros de combustível e dos bicos injetores (Prestes *et al.*, 2007). As especificações para biodiesel no Brasil são menos restritivas que na Europa, permitindo então a produção do biodiesel com base em diversas matérias-primas. Essa flexibilização das especificações contribui não só para maior competitividade entre matérias-primas, mas também para a diversificação da produção em termos regionais (Prates, Pierobon e da Costa, 2007).

Figura 1.4 - Estrutura química do ácido ricinoléico.

1.6 Proposta para aumento da qualidade e quantidade dos óleos vegetais

Para a resolução dos problemas citados anteriormente, será necessário o melhoramento genético dos vegetais cultivados para obter alto teor de óleo e alta qualidade, bem como a

identificação e seleção de vegetais silvestre (como pinhão-manso, macaúba, pequi, tucumã, entre outros) que possuem alta produtividade de óleo/ha/ano. Para que os programas de melhoramento e seleção de novas plantas sejam rápidos, serão necessárias dezenas de milhares de análises do teor de óleo de sementes por ano. Para a medida do teor de óleo desenvolveu-se recentemente uma técnica baseada em ressonância magnética nuclear (RMN) de precessão livre em onda contínua (CWFP - *Continuous Wave Free Precession*) com potencial para analisar mais de 20 mil amostras por hora (Colnago *et al.*, 2007). Para a medida da qualidade do óleo também foi desenvolvida uma metodologia de RMN baseada na técnica de eco denominada CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) que permite analisar cerca de 1000 amostras por hora (Prestes *et al.*, 2007).

1.7 Contribuição da Ressonância magnética Nuclear

A primeira observação do fenômeno de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi publicada em 1946, quando os pesquisadores Felix Bloch e Edward Purcell, independentemente, procurando aprimorar a medida de momentos magnéticos observaram sinais de absorção de radiofrequência (rf) da água e da parafina, respectivamente. Por essa descoberta receberam o Prêmio Nobel de Física, em 1952. (Gil e Gerald, 1987 e Claridge, 1999) Desde então, a RMN vem sendo amplamente utilizada em diversas áreas principalmente na elucidação de estruturas químicas.

A grande contribuição da RMN para a química foi reconhecida com os Prêmios Nobel de Química: em 1991, recebido pelo químico suíço Richard Ernst, pelo desenvolvimento da técnica de pulso e RMN multidimensional, e pelo químico suíço Kurt Wüthrich, em 2002, pelo desenvolvimento da metodologia de determinação de estrutura de proteínas em solução por RMN, e Prêmio Nobel de Medicina em 2003 pelo químico Paul Lauterbur e o físico Peter Mansfield, pela descoberta da técnica de tomografia por RMN (Nobel Foundation, 2008).

1.8 Fundamentos da Ressonância Magnética Nuclear

Todas as técnicas de espectroscopia constituem um exemplo de interação da radiação eletromagnética com a matéria. Particularmente, a espectroscopia por RMN fundamenta-se na interação da radiação eletromagnética com núcleos atômicos, na presença de um campo magnético. Conseqüentemente, o fenômeno da RMN é somente observado em alguns núcleos atômicos que se comportam como pequenos dipolos magnéticos, ou seja, pequenos ímãs (Gil e Geraldês, 1987 e Claridge, 1999). Esta propriedade do núcleo é decorrente de sua rotação em torno do seu respectivo eixo, denominado momento angular de *spin*, expresso pelo número quântico de *spin* (I). Esse número quântico pode assumir valores inteiros, semi-inteiro ou zero. Todavia, a RMN é somente observada em núcleos com I diferente de zero (Gil e Geraldês, 1987). O momento angular de *spin* é uma grandeza vetorial quantizada, possuindo módulo, direção e sentido. Então, segundo um sistema de coordenadas cartesianas previamente estabelecido, uma vez definida a direção $\hat{z}$, o momento angular de *spin* pode assumir diversas direções conforme a equação 1.1:

$$a_z = \frac{m_l h}{2\pi} \quad (1.1)$$

m_l = número quântico direcional ($-I, -I+1, \dots, I$);

h = constante de Planck $6,626 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$.

A figura 1.5 ilustra vetorialmente a quantização do momento angular de *spin* para o caso do isótopo ^1H ($I=1/2$), possuindo apenas duas direções ($m_I = -1/2$ e $m_I = +1/2$) de acordo com a equação 1.1.

Figura 1.5 - Representação vetorial da quantização do momento angular de *spin*, para o isótopo ^1H ($I=1/2$).

Como o núcleo é eletricamente carregado, esse movimento de rotação leva a um momento magnético nuclear (μ). Esse momento é proporcional ao momento angular de *spin* (ρ) e a constante magnetogírica (γ) que é uma constante intrínseca de cada núcleo em evidência, como demonstrado na equação 1.2. Assim, por serem proporcionais, quanto maior for o valor de γ maior será μ , promovendo uma maior interação do vetor com o campo aplicado (Gil e Geraldese, 1987 e Claridge, 1999).

$$\mu = \gamma\rho \quad (1.2)$$

O fenômeno da RMN é observado quando uma amostra, contendo um núcleo com momento magnético não-nulo ($I \neq 0$), é submetida a um campo magnético externo (B_0), ocorrendo uma interação entre μ do respectivo núcleo com o B_0 . Esta interação é capaz de separar os *spins* em $2I+1$ níveis de energia, os quais eram degenerados, ou seja, possuíam a mesma energia na ausência de B_0 , permitindo que os núcleos atômicos se posicionem contra ou a favor do campo. Esta separação dos níveis quando aplicado um campo magnético externo denomina-se efeito Zeeman.

A figura 1.6 ilustra o exemplo ^1H com $I=1/2$, com dois estados de energia α (menor energia) e β (maior energia).

Figura 1.6 - Representação dos níveis de energia quando expostos a B_0 .

A diferença de energia (ΔE) no caso do exemplo entre os níveis α e β é dada pela condição de Bohr (Gil e Geraldles, 1987) segundo a equação 1.3:

$$\Delta E = E_\alpha - E_\beta = h\nu \quad (1.3)$$

h = constante de Planck;

ν = frequência da radiação aplicada Hz.

Através da mecânica clássica é possível explicar a interação entre o campo magnético externo com momento magnético nuclear. Esta interação incita a sua orientação em relação ao campo externo, precessionando com frequência angular denominada frequência de Larmor (ω_0) tornando possível as transições dos *spins* nucleares entre os níveis α e β (figura 1.7).

Figura 1.7 - Representação da precessão dos *spins* nucleares na presença de um campo magnético externo.

A frequência de precessão é proporcional ao campo magnético B_0 e à razão magnética γ como demonstrado na equação 1.4 (Gil e Geraldles, 1987):

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (1.4)$$

A distribuição da população de *spins* em cada nível de energia é dada pela distribuição de Boltzmann, segundo a equação 1.5:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp\left(\frac{\Delta E}{kT}\right) \quad (1.5)$$

N_α = população do nível de menor energia

N_β = população do nível de maior energia

k = constante de Boltzmann ($1,3806 \times 10^{-23}$ J · K⁻¹)

T = temperatura (K)

Esta equação demonstra que nas condições experimentais haverá sempre um pequeno excesso de população no estado de menor energia α , caracterizando a baixa sensibilidade da técnica de RMN. Essa diferença de população dá origem a uma magnetização resultante (M_0), que é a soma vetorial de todos os momentos magnéticos (μ) que precessionam em torno de B_0 , formando o cone de precessão em um referencial de coordenadas girantes (equação 1.6)(Claridge, 1999):

$$M_0 = \Sigma \mu \quad (1.6)$$

Uma forma vetorial para visualização deste resultado é o uso do sistema de coordenadas girantes, representadas pelas coordenadas z , x' e y' . Nesse modelo, considera-se que o plano $x'y'$ gira em torno do eixo z , direção de B_0 , com frequência de rotação ω_0 , idêntica a do pulso de rf aplicado (Claridge, 1999).

Aplicando uma radiação eletromagnética na forma de pulso com frequência igual à de Larmor em uma bobina, haverá a formação de um campo magnético B_1 perpendicularmente ao B_0 , alterando a distribuição da população de Boltzmann, incitando as

transições simultâneas entre os níveis α e β e conseqüentemente modificando o módulo da magnetização resultante, denominada M_z (figura 1.8).

Figura 1.8 - Polarização da magnetização após a aplicação de um pulso.

O ângulo entre M_z e o eixo z varia proporcionalmente à duração do pulso incidido sobre a amostra, segundo a equação 1.7:

$$\theta = \gamma B_1 t_p \quad (1.7)$$

θ = ângulo formado pela magnetização com o eixo z

t_p = tempo de duração do pulso de rf

M_0 e sua precessão em torno da direção z determinam o aparecimento de uma magnetização no plano xy , com componentes M_x e M_y .

Após a aplicação dos pulsos, os *spins* nucleares tornam a precessionar em torno de B_0 , induzindo o sinal de RMN na bobina, gerando o sinal denominado decaimento livre induzido (FID, *Free Induction Decay*).

Após um pulso, a magnetização encontra-se em estado excitado, cuja componente longitudinal z é nula e a componente transversal igual à magnetização de equilíbrio. Para que o sistema de *spins* retorne ao equilíbrio ($M_z=M_0$ e $M_{xy}=0$) é necessário que ocorram dois processos de relaxação distintos e simultâneos: a relaxação longitudinal (T_1) o qual recupera a magnetização de equilíbrio ao longo da direção z e a relaxação transversal (T_2) que elimina a magnetização transversal (Gil e Geraldês, 1987).

1.8.1 Relaxação Longitudinal

O retorno da magnetização ao eixo z , ($M_0=M_z$), ou seja, ao estado de equilíbrio térmico, é caracterizada por um decaimento exponencial cuja constante de tempo de relaxação longitudinal é denominada T_1 . Este processo está diretamente relacionado ao restabelecimento da distribuição de população dos níveis Zeeman de energia, transferindo o excesso de energia potencial magnética do estado excitado para vizinhança ou rede, sob a forma de energia cinética molecular (Gil e Gerald, 1987).

Essa transferência é resultante da existência de momentos magnéticos oscilatórios produzidos pelos movimentos rotacionais e translacionais de moléculas da vizinhança, oscilando com frequências semelhantes à de Larmor, tornando a rede capaz de absorver essa energia. Esse processo de transferência é conhecido como relaxação *spin*-rede ou relaxação longitudinal, o qual é responsável pela recuperação exponencial do módulo da magnetização ao longo do eixo z , que transcorre no tempo com uma constante de velocidade $1/T_1$, e é dada pela equação 1.8:

$$M_z(t) = M_0 \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) \right] \quad (1.8)$$

É observado que o tempo necessário para magnetização retornar 99,3% ao seu valor de equilíbrio é da ordem de $5T_1$, para evitar a saturação do sinal. Quando o tempo de repetição atingir o valor de $T_r=T_1$ a magnetização atingiu apenas 63% do seu valor de equilíbrio (figura 1.9): (Claridge, 1999)

Figura 1.9 - Relaxação longitudinal e variação temporal de M_z após um pulso de π (a) vetor magnetização ao longo da direção z ; (b) evolução temporal da magnetização.

A técnica mais utilizada para medir T_1 é a sequência de inversão-recuperação, essa técnica consiste de uma inversão da magnetização com um pulso de 180 graus, então se espera um tempo τ (tempo de intervalo entre os pulsos) para ocorrer a relaxação e se aplica um pulso de 90 graus no mesmo eixo para a leitura da intensidade da magnetização. Um espaçamento superior a $5T_1$ é utilizado entre a aquisição de cada espectro para assegurar o restabelecimento do equilíbrio térmico, antes do início de uma nova sequência.

A recuperação da magnetização depende de T_1 e τ , em função da intensidade do sinal, segundo a equação 1.9:

$$I(\tau) = I_0 \left[1 - 2 \exp \left(-\frac{\tau}{T_1} \right) \right] \quad (1.9)$$

I_0 = intensidade do sinal para $T_r > 5T_1$

Os valores de T_1 são obtidos através de um gráfico semilogarítmico de $\ln[I_0 - I(\tau)]$ *versus* as variações de τ , definindo uma reta cuja inclinação é $-1/T_1$ (Gil e Gerald, 1987).

1.8.2 Relaxação Transversal

Ao contrário do que ocorre no processo de relaxação longitudinal, o desaparecimento do sinal no plano xy ($M_{xy}=0$), independe da transferência de energia para rede. Essa perda de coerência é devido a interações diretas entre os momentos magnéticos individuais, sem modificação na energia do sistema. Esse processo é denominado relaxação *spin-spin* ou relaxação transversal (Claridge, 1999).

A relaxação transversal é caracterizada por um decaimento exponencial da magnetização transversal, com constante de tempo T_2 , demonstrado na equação 1.10:

$$M_y(t) = M_{xy} \cos(\omega_0 t) \exp \left(-\frac{t}{T_2} \right) \quad (1.10)$$

T_2 = tempo de relaxação *spin-spin*

M_{xy} = componente da magnetização do plano $x'y'$

Experimentalmente, o decaimento da magnetização transversal observado no FID não retrata somente o tempo de relaxação *spin-spin* T_2 , pois a não-homogeneidade do campo magnético (ΔB_0) interfere nas componentes transversais da magnetização dispersando-as no plano xy . Dessa forma, a constante de tempo com a qual o FID decai é na verdade representada por um tempo de relaxação efetivo T_2^* (equação 1.11):

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \Delta B_0 \quad (1.11)$$

A diminuição de T_2^* contribui para que o sinal de RMN decaia rapidamente, causando o alargamento das linhas do espectro no domínio da frequência. Por isso, têm-se buscado campos magnéticos cada vez mais homogêneos, onde T_2^* se aproxime do valor de T_2 .

Após a excitação da amostra com um pulso de 90 graus, o sinal de decaimento (vermelho) tem uma constante de tempo T_2^* a qual é menor que a constante de tempo T_2 natural da amostra (preto), como ilustrado na figura 1.10:

Figura 1.10 - Representando a diferença entre o decaimento natural T_2 e o decaimento efetivo T_2^* .

Para a obtenção de medidas de tempo de relaxação transversal independente da homogeneidade de campo B_0 , Hahn propôs a utilização da técnica de sequência de pulsos, denominada Eco de Hahn (Hahn, 1950).

A sequência é composta por dois pulsos de 90 graus separados por um tempo τ (figura 1.11).

Figura 1.11 - Seqüência de pulsos da técnica de Eco de Hahn, onde τ representa o tempo de espera entre os pulsos e T_r o tempo espera para a repetição da seqüência.

A figura 1.12 ilustra uma representação vetorial do efeito dos dois pulsos de 90 graus:

Figura 1.12 - (A) Magnetização no equilíbrio térmico em $t = 0$. (B) Após o primeiro pulso a magnetização se desloca em 90 graus para o plano $x'y'$. (C) Durante um intervalo de tempo τ , a magnetização se defasa $\Delta\omega\tau$ no plano $x'y'$. (D) Ao final do intervalo de tempo τ um segundo pulso de 90 graus é aplicado deslocando os momentos magnéticos do plano xy para o plano $x'z$. (E) Durante o novo intervalo τ , os momentos magnéticos precessionam $\Delta\omega\tau$ ao redor de z , refocalizando-se em 2τ . Como se pode ver, a magnetização descreve a forma de um oito "8", denominado em inglês como "*8 Ball*".

A técnica de Hahn é limitada pelo efeito de difusão molecular (Gil e Gerald, 1987) devido ao movimento Browniano que corresponde à energia cinética das moléculas.

Carr e Purcell substituíram o segundo pulso de 90 graus por um pulso de 180 graus. E para redução do tempo de espera em cada aquisição T_1 ($T_r \geq 5T_1$), foi aplicado um trem de pulsos de 180 graus, após o primeiro pulso de 90 graus reduzindo assim, drasticamente, o efeito de difusão molecular e gerando o dobro da intensidade do sinal de eco (figura 1.13) (Gil e Gerald, 1987).

Figura 1.13 - sequência de pulsos sugerida por Carr e Purcell.

O modelo vetorial da sequência CP pode ser visualizado na figura 1.14.

Figura 1.14 - (A) Magnetização no equilíbrio térmico em $t = 0$. (B) Após o primeiro pulso a magnetização se desloca em 90 graus para o plano $x'y'$. (C) Durante um intervalo de tempo τ , a magnetização se defasa $\Delta\omega\tau$ no plano $x'y'$. (D) Ao final do intervalo de tempo τ um segundo pulso de 180 graus em x' é aplicado, provocando a rotação em 180 graus em todos os vetores. Durante o novo intervalo τ , os momentos magnéticos precessionam $\Delta\omega\tau$, refocalizando-se em 2τ , recuperando a coerência das magnetizações. (E) Representação do sinal do eco. (F) Os vetores continuam a precessionar dando seguimento ao ciclo de pulsos.

Essa sequência permite que todo o decaimento do sinal de RMN seja coletado em um único experimento reduzindo o tempo de análise, principalmente em amostras cujo T_1 é demasiado longo, pois somente uma sequência permite obter uma série completa de n ecos.

A figura 1.15 ilustra o sinal do decaimento quando substituído o pulso de 90 graus pelo pulso de 180 graus. Após o pulso de 90 graus, o sinal decai com constante de tempo T_2^* (vermelho) e o segundo pulso gera um eco (linha preta cheia) cuja intensidade é proporcional à relaxação transversal T_2 da amostra (linha preta pontilhada).

Figura 1.15 - Amplitude do sinal adquirida pela sequência de pulsos *spin echo* (90 graus τ 180 graus) proposta por Carr-Purcell.

Posteriormente, Meiboom e Gill modificaram a sequência CP aplicando os pulsos de 180 graus na direção $+y'$, isto é, com uma diferença de fase de 90 graus em relação ao pulso de 90 graus inicial. Essa sequência aperfeiçoou o método de Carr-Purcell e originando o método chamado CPMG - Carr-Purcell-Meiboom-Gill (Meiboom, 1958) (figura 1.16).

Figura 1.16 - sequência de pulsos da técnica de CPMG.

A figura 1.17 demonstra vetorialmente a técnica CPMG:

Figura 1.17 - (A) Magnetização no equilíbrio térmico em $t = 0$. (B) Após o primeiro pulso a magnetização se desloca em 90 graus para o plano $x'y'$. (C) Durante um intervalo de tempo τ , a magnetização se defasa $\Delta\omega\tau$ no plano $x'y'$. (D) Ao final do intervalo de tempo τ um segundo pulso de 180 graus é aplicado em y' . Durante o novo intervalo τ , há a refocalização em 2τ , recuperando a coerência das magnetizações. (E) Representação do sinal do eco. (F) Os vetores continuam a precessionar dando seguimento ao ciclo de pulsos.

A mudança de direção permite focalizar todos os ecos em uma mesma fase o que não ocorre com o método CP. As principais vantagens dessa técnica são: não acumular erros de calibração e a não homogeneidade dos pulsos de 180 graus.

O valor de T_2 é obtido a partir do estudo do eco no tempo $t = k\tau$, com $k = 2, 4, 6, \dots, 2n$, em função de t , por meio de um ajuste da curva exponencial ou por um gráfico semilogarítmico da intensidade do eco em função de t (Gil e Geraldles, 1987) (equação 1.12):

$$I_{eco}(k\tau) \propto \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \quad (1.12)$$

I_{eco} = intensidade do eco depende de τ e T_2 .

Recentemente propôs-se uma nova metodologia para análises por RMN em baixa resolução, utilizando a sequência de precessão livre no estado estacionário (SSFP, *Steady state free precession*) denominada CWFP (*Continuous Wave Free Precession*) cujo decaimento depende dos dois tempos de relaxação T_1 e T_2 , enquanto a CPMG utiliza somente T_2 (Azeredo *et al.*, 2000).

1.9 *Continuous Wave Free Precession* (CWFP)

A primeira utilização de RMN pulsada em precessão livre no estado estacionário (*Steady State Free Precession* - SSFP) foi desenvolvida por Carr (Carr, 1958). Empregando um trem de pulsos igualmente espaçados por $T_r < (T_1 \text{ e } T_2)$ da ordem de 1 ms, constatou-se que a amplitude do sinal detectado é mantida constante. Nesse trabalho foi proposto o emprego da técnica na melhoria da relação sinal-ruído (S/R) nos experimentos de RMN.

Ernst e Anderson (Ernst e Anderson, 1966) introduziram a técnica de pulso e transformada de Fourier para obter espectros de RMN em alta resolução, com a análise das condições para melhorar a razão S/R dos espectros por unidade de tempo e descreveram o efeito de SSFP na anomalia de fase e intensidade de sinais de RMN de alta resolução. Neste trabalho também descreveram o efeito do estado estacionário (SSFP) na anomalia de fase e intensidade de sinais de RMN de alta resolução.

Freemann e Hill (Freemann e Hill, 1971) estudaram mais detalhadamente o uso da técnica de SSFP para melhorar a razão S/R em espectros de alta resolução. Estendendo o tratamento desenvolvido por Ernst e Anderson (1966) para a condição de campo não-homogêneo, demonstraram que a refocalização da magnetização antes de cada pulso está diretamente relacionada ao eco de Hahn, com dois pulsos de 90 graus separados por um tempo T_r . Também apresentaram um método para eliminar as anomalias de amplitude e fase, sem deixar de se beneficiar das propriedades do estado estacionário.

Schwenk (Schwenk, 1971) abordou o tema e mostrou as vantagens de empregar a

técnica de SSFP para a detecção de sinais de baixa intensidade ou com tempos de relaxação longos, T_1 e T_2 , especialmente T_1 , quando comparados ao T_2^* . E também propôs uma solução para contornar as anomalias de intensidade, baseado na aquisição de espectros com quatro diferentes frequências de irradiação. Demonstrou, assim como Ernst e Anderson, o compromisso entre a melhora da razão S/R e consequentemente da resolução dos espectros.

Uma vez que a técnica de SSFP permite a utilização de T_r menor que T_2 , explorou-se o emprego dessa técnica em análises quantitativas, objetivando melhorar a razão S/R, utilizando a técnica de RMN em baixo campo e baixa resolução (Azeredo *et al.*, 2000 e 2003, e Colnago *et al.*, 2007). A técnica de SSFP utilizada foi denominada *Continuous Wave Free Precession* (CWFP).

As principais diferenças entre a técnica SSFP convencional e a CWFP são: o sinal entre os pulsos de 90 graus com amplitude constante, por isso a denominação CWFP (figura 1.18); e a condição para obtenção do sinal SSFP que é de $T_r < T_2$ enquanto que para CWFP $T_r < 2T_2^*$.

Figura 1.18 - sequência de pulsos da técnica de CWFP.

Na figura 1.19 é possível visualizar um exemplo do ganho de sensibilidade da técnica CWFP em relação à medida do sinal de RMN baseada na técnica de FID. O ganho de sensibilidade calculado para esse caso é aproximadamente oito vezes em relação ao sinal do FID (Azeredo *et al.*, 2000).

Figura 1.19 - Sinais de RMN de uma amostra de óleo vegetal obtidos com a técnica de análise do FID (a) e CWFP (b) (Azeredo *et al.*, 2000).

A técnica CWFP também pode ser usada na medida rápida e simultânea do tempo de relaxação T_1 e T_2 (Venancio *et al.*, 2005). Nesta técnica, a partir do primeiro pulso de 90 graus (equilíbrio térmico) até a obtenção do estado estacionário CWFP, o sinal de RMN passa por dois regimes transientes (figura 1.20). O primeiro regime (vermelho) é caracterizado por uma alternância de amplitude do sinal entre valores negativos e positivos. Este regime ocorre nos primeiros milissegundos do sinal e é seguido por um estado *quasi*-estacionário (verde), onde essas alternâncias desaparecem e o sinal decai até atingir o estado estacionário CWFP (azul).

Figura 1.20 - Representação do sinal do CWFP para amostra de ácido fosfórico (^1H) (Venancio, 2005).

A amplitude do sinal de CWFP (M_z) não depende do valor absoluto de T_1 , e sim da

razão entre T_2 e T_1 de acordo com a equação 1.13.

$$M_z = \frac{M_0 T_2}{(T_1 + T_2)} \quad (1.13)$$

Com essas condições é possível adquirir milhares de espectros por segundo, aumentando sensivelmente a razão S/R e, conseqüentemente, a qualidade dos espectros.

O sinal CWFP do estado *quasi*-estacionário até o estacionário decai exponencialmente com uma constante de tempo dada pela equação 1.14.

$$T_{\alpha=\frac{\pi}{2}} = \frac{2T_1 T_2}{(T_1 + T_2)} \quad (1.14)$$

1.10 Otimização das medidas de RMN em baixo campo

Além da aplicação em análise em amostras estáticas, foram utilizadas esteiras para automação das medidas de RMN em baixo campo, devido ao grande potencial das técnicas CWFP e CPMG, em medidas ultra-rápidas em fluxo, permitindo análises com maior velocidade na determinação da qualidade do óleo presente nas sementes, contribuindo significativamente para o avanço dos programas de melhoramento genético de oleaginosas para produção de biodiesel.

A figura 1.21 apresenta um sinal de RMN obtido num tempo total de 14 s pela técnica CWFP, referente à quantidade de óleo de 99 amostras de sementes. Essa técnica viabiliza a determinação do teor de óleo em mais de 20 mil sementes intactas por hora e está sendo utilizada na avaliação do teor de óleo em sementes para a seleção de material genético para produção de biodiesel (Colnago *et al.*, 2007).

Figura 1.21 - Sinal de RMN *on-line* obtido pela técnica CWPF de 99 amostras de sementes oleaginosas (Colnago *et al.*, 2007).

Por ser uma técnica não-destrutiva, após a análise, permite a utilização das sementes no replantio das mesmas, admitindo uma nova qualificação do óleo presente nas sementes. Acoplado a um sistema de medidas *on-line*, a esteira possui o custo e tempo de análise compatíveis com o número de medidas necessárias.

1.11 Análise do teor e qualidade de óleo em sementes por RMN

A análise de sementes oleaginosas é indispensável na seleção de grãos para determinar o valor energético dos alimentos, produção de biodiesel entre outros usos. A técnica espectroscópica por RMN, uma das principais técnicas analíticas, vem sendo utilizada para análise de quantidade e qualidade de óleo em sementes. Segundo Leal *et al.* (1981), o método de RMN, além de ser não-destrutivo, provou ser rápido e útil para determinação de tipos de óleos de diferentes sementes. Os autores também registraram os espectros obtidos por ^{13}C RMN de uma série de sementes oleaginosas brasileiras. Os constituintes principais dos óleos foram identificados e os deslocamentos químicos foram estimados para os ácidos graxos livres e os deslocamentos experimentais observados nas sementes e foram correlacionados com os dados da literatura. Então, concluíram os autores, à medida que

se aumenta o número de espectros de referência e automatize certas etapas, o método poderá ser empregado para análise em larga escala de diferentes espécies contendo óleos vegetais.

Rubel (1994) comparou técnicas de RMN pulsada na análise da quantidade de óleo presente nas sementes de girassol, linhaça e soja. As análises de rotina de teor de óleo e de água contidos em diferentes sementes oleaginosas foram realizadas por RMN por ser uma técnica rápida, exata, precisa e não-destrutiva. Análises por RMN pulsada de teor de óleo e em misturas mostraram equivalência e/ou maior reprodutibilidade que as medidas feitas pelos métodos tradicionais. Portanto, não houve diferenças estatísticas entre a determinação pelo método tradicional e por RMN pulsada. O autor observou também que a determinação simultânea de percentual de mistura e de óleo, presente em sementes, foi possível com a técnica pulsada de RMN através do método *spin-eco*. A adição de componentes múltiplos em óleo podem ser detectados e quantificados por análise de T_2 através da seqüência de pulsos CPMG.

Hutton *et al.* (1999) utilizaram a rotação do ângulo mágico *Magic-angle Spinning* (MAS) em espectroscopia de ^{13}C RMN, um método prático e não-destrutivo, para caracterização quantitativa da composição de óleo em sementes. Descreveram resultados para sementes híbridas e intactas de canola e do biodiesel resultante. Segundo os autores, os resultados da técnica MAS ^{13}C RMN complementam e condizem com os resultados obtidos pela cromatografia gasosa. Os autores observaram que os dados de MAS ^{13}C RMN permitem a análise quantitativa dos principais componentes do óleo, incluindo ácidos graxos saturados e insaturados, como oléico, linoléico e linolênico. Concluíram que este método de RMN por ser não-destrutivo é atrativo para programa de melhoramento de plantas ou outros estudos onde a perda da viabilidade das sementes é inconveniente.

Azeredo *et al.* (2000) mostraram a utilização do estado de equilíbrio de precessão livre de ressonância magnética nuclear (RMN/SSFP) para análise quantitativa em baixo campo magnético, expondo vantagens substanciais em relação aos métodos convencionais de RMN. Segundo os autores, com apenas pequenos requisitos adicionais, a técnica permite

um aumento considerável na razão sinal/ruído para aquisição de um determinado tempo. As condições experimentais necessárias à implementação e otimização da aquisição de parâmetros foram exploradas e foi verificado que são facilmente acessíveis com equipamentos pouco sofisticados. Os autores concluíram que a SSFP é uma técnica muito útil para determinações quantitativas executadas em um espectrômetro de RMN em baixo campo e de baixa resolução; e que por serem altamente reprodutíveis, os resultados podem ser obtidos rapidamente e sem qualquer dependência de amostra padrão.

Pedersen *et al.* (2000) analisaram, nas sementes de colza e mostarda, o teor de água, óleo e proteína por uma combinação de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear em baixa campo ^1H (LF-RMN) e quimiometria, permitindo utilização de todas curvas de relaxamento na avaliação dos dados. Os resultados quimiométricos foram comparados aos tradicionais pela Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) e pela Análise de Componentes Principais (PCA). O autor declarou que a classificação dos dois tipos de sementes foi facilmente realizada por LF-RMN.

Knothe (2001) utilizou os métodos espectroscópicos Infravermelho Próximo (NIR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para determinar o nível de mistura de biodiesel em combustível para motores diesel. O autor relata que o método é rápido e fácil de usar, e não exige qualquer mudança de *hardware* quando se utiliza o mesmo instrumento de acompanhamento da produção de biodiesel (reação de transesterificação) e da determinação da qualidade do biodiesel. Na espectroscopia ^1H RMN, a integração dos valores dos picos do éster metílico e dos hidrocarbonetos alifáticos do biodiesel e do diesel foram usadas para determinar os níveis de mistura. Os resultados da NIR e RMN do nível de mistura foram correlacionados com os dados da literatura.

Rutledge (2001) caracterizou água e estados hidratados em vegetais através da técnica espectroscópica por RMN em baixa resolução TD-RMN (RMN no domínio do tempo), e utilizou técnicas de quimiometria nos dados obtidos por TD-RMN. Contudo, o autor relata que a completa compreensão do fenômeno de relaxação ocorre em amostras que ainda requerem o cálculo dos tempos de relaxação T_1 e T_2 .

Azeredo *et al.* (2003) desenvolveram a técnica espectroscópica de precessão livre de ondas contínuas (CWFP) como uma prática ferramenta analítica para determinações quantitativas em Ressonância Magnética Nuclear de baixa resolução (RMN). Segundo os autores a técnica exige menos requisitos que a técnica tradicional FID ou *spin-eco* e a implementação desta é relativamente simples. Neste trabalho é observado o ganho substancial na razão sinal/ruído para aquisição de um determinado tempo permitido pela CWFP, sendo explorado como vantagem. Há também a citação de um exemplo, o uso de CWFP rápido para determinação quantitativa de óleo e umidade em diversas sementes.

Knothe *et al.* (2002) estudaram o número de cetano o qual é amplamente utilizado como parâmetro de qualidade relacionado com o tempo de demora da ignição (qualidade de combustão) de um combustível. Os autores confirmam que o número de cetano destes ésteres não é significativamente afetado pela ramificação do agrupamento álcool. Todos os ésteres de cadeia reta (metil, etil, n-propil, n-butil) possuíam pureza >99% conforme confirmado por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC-MS). Os números de cetano foram determinados em um testador de qualidade de ignição (IQT), um novo método em desenvolvimento, automatizado e rápido utilizando apenas pequenas quantidades de material. Os autores relatam que o IQT é tão aplicável ao biodiesel e seus componentes, quanto os métodos anteriores de determinação do número de cetano.

Weir *et al.* (2005) analisaram a concentração de proteínas em sementes de soja baseado na quantidade presente de óleo nas mesmas pela técnica de RMN de alta resolução. Os autores demonstraram que a seleção de sementes com alto teor de proteína analisada pela de quantidade de óleo presente nas sementes foi razoavelmente eficaz no teste de população e poderá oferecer um novo método rápido de seleção de sementes de soja com alto teor de proteína. Segundo o autor, a técnica de RMN tem um potencial para ser utilizada como uma técnica analítica alternativa para medida indireta de concentração de proteína baseada em quantidade de óleo presente em sementes.

Bryan *et al.* (2005) estudaram a utilização de RMN em baixo campo como ferramenta

para estimar valores da viscosidade do óleo. Através da técnica espectroscópica por RMN uma correlação foi desenvolvida que valida a ordem de magnitude estimada ao longo de valores diversos de viscosidade e temperatura. Esta correlação foi construída utilizando experimentos relacionados com o espectro de RMN para análise da viscosidade do óleo. Este trabalho apresenta uma justificativa teórica apresentando um método de padronização de parâmetros para a viscosidade do óleo assim como a respectiva temperatura.

Terskikh *et al.* (2005) utilizaram a técnica espectroscópica de ^{13}C RMN na análise da quantidade de óleo nas sementes in vivo e a composição de ácidos graxos de uma forma não-destrutiva.

Morgenstern *et al.* (2006) produziram ésteres metílicos em diversas temperaturas através do processo de transesterificação de óleo de soja com metanol utilizando catalisadores KOH e NaOH. As reações foram monitoradas pela análise de espectroscopia (^1H RMN), permitindo o cálculo da média do grau de insaturação dos ácidos graxos no óleo e no éster metílico e fornecendo também a energia de ativação de 27,2 kJ/mol. Os autores observaram que os espectros de ^1H RMN de matérias-primas e produtos permitem a quantificação do progresso da reação que é coerente com os resultados obtidos com outros métodos analíticos.

Knothe (2006) estudou a estabilidade do biodiesel após a exposição ao ar, devido ao seu teor de ácidos graxos insaturados. Inúmeros fatores influenciam a estabilidade oxidativa do biodiesel, portanto vários métodos para a sua avaliação foram desenvolvidos. Neste trabalho, uma quantidade definida de biodiesel (originado de óleo de soja) foi aquecida, com diferentes proporções da superfície exposta ao ar. A viscosidade cinemática e a acidez foram analisados por ^1H RMN nos diversos tipos de biodiesel oxidados. O autor observou que os valores ácidos e a viscosidade cinemática aumentaram seus valores com o tempo de exposição e o tamanho da superfície de contato. A técnica de ^1H RMN foi usada também para avaliar o grau de insaturação e a composição do ácido graxo residual. O autor concluiu que aumentar a superfície de contato acelera a oxidação e afeta a composição de ácidos graxos e portanto, a oxidação do biodiesel é muito sensível

à superfície do biodiesel exposta ao ar.

Phippen *et al.* (2006) desenvolveram um método eficiente e confiável para avaliar o teor de óleo das sementes de *Cuphea* e seus respectivos ácidos graxos. O Teor de óleo foi determinado pela técnica não-destrutiva RMN, em todas as sementes de *Cuphea*. Segundo os autores as espécies de *Cuphea* identificadas neste estudo podem servir como novas fontes potenciais de óleo e ácidos graxos a serem introduzidas no melhoramento de novas linhagens.

Colnago *et al.* (2007) desenvolveram um novo método baseado em Ressonância Magnética Nuclear pulsada em precessão livre no estado estacionário *Continuous Wave Free Precession* (CWFP) acoplado a um sistema *on-line* (esteira). Os autores relatam que CWFP é uma técnica poderosa para medir o teor de óleo em sementes intactas e possui o potencial de analisar mais de 20.000 sementes por hora e é aplicável em diferentes espécies de sementes.

Dais *et al.* (2007) avaliaram as metodologias analíticas baseadas em espectroscopia convencional por RMN de ^1H e de ^{31}P e métodos analíticos (titulação, cromatografia gasosa, e cromatografia líquida de alta eficiência) para medida de componentes (ácidos graxos e compostos fenólicos), acidez e índice de iodo, em azeite de oliva.

Knothe e Steidley (2007) estudaram o comportamento da viscosidade do biodiesel em baixa temperatura, investigando os seus componentes, materiais relacionados ao ácido graxo e suas mistura, bem como misturas com o diesel. Segundo os autores, a mistura mostrou um comportamento mais próximo ao do diesel que o biodiesel puro. Os autores relatam que ésteres de ácidos graxos com cadeias curtas e álcool longo exibem a viscosidade menor do que ésteres de ácidos graxos com cadeias longas e álcool menor, e ésteres saturados com alto ponto de fusão têm pouca influência sobre a viscosidade cinemática a temperaturas mais baixas e em concentrações observadas em muitos óleos vegetais. Os dados apresentados neste trabalho podem ser usados para prever ou controlar a viscosidade de compostos ainda não investigados, bem como de misturas.

Knothe (2007) estudou a susceptibilidade do biodiesel à oxidação após exposição ao

oxigênio presente no ambiente. Ele afirmou que essa sensibilidade é devido ao seu teor de ácidos graxos insaturados. Além da presença de ar, vários outros fatores influenciam no processo de oxidação do biodiesel incluindo a presença de luz, temperatura elevada, peróxidos e antioxidantes, bem como a superfície de contato entre biodiesel e o ar. Segundo o autor, as abordagens para melhorar a estabilidade oxidativa do biodiesel incluem a adição deliberada de antioxidantes ou modificação dos ácidos graxos, e, mesmo quando tomadas precauções adequadas, a oxidação pode ser retardada, mas não totalmente evitada. O autor conclui que os resultados obtidos por espectroscopia de RMN mostram um método fácil de avaliação da oxidação do biodiesel, como viscosidade cinemática e o valor ácido.

Prestes *et al.*(2007) demonstraram um rápido e automatizado método de ^1H RMN com baixa resolução, utilizado para selecionar sementes oleaginosas intactas com diferentes teores de ácido graxo, baseado na constante de tempo relaxação transversal (T_2). O T_2 é medido através do decaimento do sinal de RMN, obtido por CPMG e processados por métodos quimiométricos, determinando a qualidade do óleo nas sementes. Através de suas características tais como: composição em ácidos graxos, número de cetano, índice de iodo e viscosidade cinemática.

Portanto, este trabalho de mestrado tem como objetivo avaliar o uso da técnica de RMN, com as seqüências CPMG e CWFP para a medida da qualidade do óleo em sementes, a última utiliza o mesmo tempo de análise que a CPMG e depende dos dois tempos de relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2) enquanto CPMG utiliza somente um tempo (T_2).

2 Objetivos

O principal objetivo desse trabalho foi utilizar a relaxometria por RMN em baixa resolução, através do sinal obtido com a sequência CPMG, cujo decaimento depende apenas do tempo de relaxação transversal, T_2 , e CWFP, que depende tanto de T_2 quanto do tempo de relaxação longitudinal, T_1 , juntamente com o auxílio das análises multiexponenciais e quimiométricas, para determinação de qualidade de óleos vegetais em sementes intactas (técnica não-destrutiva), para uso em projeto de produção de biodiesel.

Os objetivos específicos foram:

1. Avaliar as vantagens e desvantagens do uso dos métodos multiexponenciais na análise dos sinais de CPMG e CWFP, para determinação da qualidade do óleo em sementes intactas;
2. Usar métodos quimiométricos (PCA e HCA) para análise exploratória dos dados de CPMG e CWFP para a determinação da qualidade do óleo em sementes intactas;
3. Comparar os pré-processamentos utilizados na técnica PCA;
4. Avaliar os resultados obtidos com as técnicas CWFP e CPMG;
5. Testar um sistema *on-line* (esteira) para automação das análises da qualidade do óleo das sementes por RMN-CWFP;
6. Analisar a relação dos dados obtidos com as técnicas CPMG e CWFP com as propriedades quantitativas do biodiesel como: viscosidade, número de cetano e índice de iodo.

3 Materiais e Métodos

3.1 Amostras

Tabela 3.1 - Nomes Vulgares e Científicos de sementes oleaginosas utilizadas.

Nomes Vulgares	Nomes científicos
Abóbora	<i>Cucurbita moschata</i>
Algodão	<i>Gossypium hirsutum</i>
Amêndoa	<i>Prunus dulcis</i>
Amendoim	<i>Arachis hipogaea</i>
Andiroba	<i>Fevillea trilobata</i>
Baru	<i>Dipteryx alata</i>
Bucha	<i>Luffa cylindrica</i>
Café	<i>Coffea arabica</i>
Castanha de Caju	<i>Anacardium occidentale</i>
Castanha do Brasil	<i>Bertholletia excelsa</i>
Chapéu-de-napoleão	<i>Thevetia peruviana</i>
Côco	<i>Cocos nucifera</i>
Gergelim	<i>Sesamun indicum</i>
Girassol	<i>Helianthus annuus</i>
Linhaça	<i>Linum usitatissimum</i>
Macadâmia	<i>Macadamia integrifolia</i>
Macaúba	<i>Acrocomia aculeata</i>
Mamona	<i>Ricinus communis</i>
Melancia	<i>Citrullus vulgaris</i>
Moringa	<i>Moringa oleifera</i>
Niger	<i>Guizotia abyssinica</i>
Noz	<i>Juglans regia</i>
Pati	<i>Syagrus botryophora</i>
Pequi	<i>Caryocar brasiliense</i>
Piaçava	<i>Attalea funifera</i>
Pinhão-manso	<i>Jatropha curcas</i>
Pistache	<i>Pistacia vera</i>
Rabanete	<i>Raphanus sativus</i>
Soja	<i>Glucine max</i>
Tucumã	<i>Astrocaryum aculeatum</i>

Foram utilizadas sementes, frutos e amêndoas de 31 espécies vegetais, em triplicata, cujos nomes vulgares e científicos se encontram na tabela 3.1. As amostras foram analisadas intactas tornando possível o plantio após as análises.

A tabela 3.2 foi construída com dados da literatura contendo os valores de ácidos graxos contidos nos tipos das sementes estudadas para comparação com os valores obtidos pela técnica de RMN.

Referências da tabela 3.2:

1. Brodnjak-Voncina, Kodba, Novic, 2004; **2.** Liu, Singh, Green, 2002; **3.** Ramos *et al.*, 2003; **4.** Dagne, Josson, 1997; **5.** Kamal-Eldin, Andersson, 1997; **6.** Aslan, Orhan, Sener, 2002; **7.** Chahed *et al.*, 2008; **8.** Küçüköner, Yurt, 2003; **9.** Kurata, Kazutaka, Masatoshi, 2005; **10.** Allen *et al.*, 1999; **11.** Kalayasiri, Jeyashoke, Krisnangkura, 1996; **12.** Abreu *et al.*, 2004; **13.** Matthaus *et al.*, 2003; **14.** Mattson, Volpenhein, 1961; **15.** Gambhir, 1994; **16.** Hiane *et al.*, 2005; **17.** Kaijser, Dutta Savage, 2000; **18.** El-Adawy, Taha, 2001; **19.** Anwar, Bhanger, 2003; **20.** Oluwaniyi, Ibiyemi, 2003; **21.** Azam, Waris, Nahar, 2005; **22.** Collin, 1933; **23.** Takemoto *et al.*, 2001; **24.** Tsamouris, Hatziantoniou, Demetzos, 2002; **25.** Bora, Moreira, 2003; **26.** De Lima *et al.*, 2007.; **27.** (United Nations conference on trade and development, 2005).

Tabela 3.2 - Composição em ácidos graxos (média de valores da literatura) para as amostras da tabela 3.1 e informações para os cálculos na tabela 3.3.

Ref.	Ácido	Cl	C	La	M	P	Po	Es	O	L	Ln	A	Ei	B	Eu	Lg	R
		8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	22:1	24:0	
1	Abóbora	0,0	0,0	0,0	0,0	11,0	0,0	5,4	33,3	48,8	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5, 9, 10	Algodão	0,0	0,0	0,0	0,8	23,0	0,0	2,7	17,1	54,9	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
11	Amêndoa	0,0	0,0	1,1	0,0	8,9	1,1	2,1	70,4	12,3	0,2	0,3	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0
1, 2, 3	Amendoim	0,0	0,0	0,0	0,0	9,2	0,0	4,0	56,7	22,7	0,2	1,5	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0
12	Andiroba	0,0	0,0	0,0	0,0	27,0	1,0	7,0	49,0	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
23	Baru	0,0	0,0	0,0	0,0	7,6	0,0	5,4	50,4	28,0	0,0	1,1	2,7	2,6	0,0	2,1	0,0
13	Bucha	0,0	0,0	0,0	0,1	14,0	0,1	7,2	33,7	43,0	0,2	0,4	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0
14	Café	0,0	0,0	0,0	0,0	35,0	0,0	7,0	7,0	48,0	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
27	Cast. Brasil	0,0	0,0	0,0	0,1	13,9	0,5	10,3	30,5	44,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	Cast. Caju	0,0	0,0	0,0	0,0	11,6	0,3	8,9	61,5	17,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	Cóco	6,0	45,9	19,2	7,1	0,0	3,0	6,5	1,7	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5, 15	Gergelim	0,0	0,0	0,0	0,0	9,6	0,2	6,7	46,0	36,1	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	Girassol	0,0	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0	4,1	26,2	61,6	0,6	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
5, 15	Linhaça	0,0	0,0	0,0	0,0	5,6	0,0	3,2	21,0	10,9	61,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17	Macadâmia	0,0	0,0	0,0	1,3	9,6	26,7	2,1	48,4	3,4	0,2	1,7	2,0	0,5	0,2	0,2	0,0
16	Macaúba	0,5	0,3	2,0	0,5	16,0	1,0	5,9	65,9	5,1	2,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	87,7
9	Mamona	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	1,5	4,1	4,3	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18	Melancia	0,0	0,0	0,0	0,1	11,3	0,3	10,2	18,1	59,6	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
11, 19	Moringa	0,0	0,0	0,0	0,0	6,2	1,1	5,0	75,8	1,0	0,2	2,8	1,7	5,4	0,0	0,0	0,0
20	Napoleão	0,0	0,0	0,0	0,0	17,1	0,0	11,8	64,3	6,3	0,0	0,4	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
4, 5	Niger	0,0	0,0	0,0	0,0	9,2	0,2	7,1	9,8	68,1	0,2	0,5	0,1	0,7	0,4	0,4	0,0
24	Noz	0,0	0,0	0,0	0,1	10,4	0,4	3,9	0,0	74,0	10,0	0,3	0,6	0,1	0,0	0,0	0,0
25	Pati	5,3	4,5	41,6	9,7	7,2	0,0	3,5	23,8	3,6	0,0	0,2	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0
26	Pequi polpa	0,0	0,0	0,0	0,1	35,2	1,0	2,3	55,9	1,5	0,5	0,2	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
26	Pequi semente	0,0	0,0	0,0	0,5	43,8	1,2	2,5	43,6	5,5	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22	Piçava	6,5	2,7	45,9	19,9	6,9	0,0	0,0	18,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
11, 21	Pinhão-manso	0,0	0,0	0,0	1,4	15,4	0,0	7,9	41,3	34,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6, 7, 8	Pistache	0,0	0,0	0,0	0,0	10,2	1,0	2,4	69,4	15,6	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
13, 14	Rabanete	0,0	0,0	0,0	0,0	5,8	0,2	1,9	20,0	14,5	10,4	1,2	9,7	1,0	32,4	1,0	0,0
1	Soja	0,0	0,0	0,0	0,0	10,6	0,0	4,0	25,2	52,6	6,7	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
22	Tucumã	1,3	4,4	48,9	21,6	6,4	0,0	1,7	13,2	0,4	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

3.2 Determinação da viscosidade do biodiesel a partir dos dados de Cromatografia gasosa

Como já mencionado na introdução, a principal razão pela qual os óleos vegetais ou gorduras são transesterificados para formar o biodiesel é reduzir a viscosidade. A viscosidade do óleo das sementes foi calculada por meio dos dados obtidos na literatura da tabela 3.2 pela equação 3.1 (Prestes *et al.*, 2007):

$$\ln \mu_0 = \sum_{i=1}^n y_i \ln \mu_i \quad (3.1)$$

onde μ_0 e μ_i representam a viscosidade cinemática a $40^\circ C$ para a mistura e para cada ácido graxo respectivamente e $y_i = A_i/100$, e A_i representa a porcentagem de cada ácido graxo. Os valores de μ_i (mm^2s^{-1}) se encontram na tabela 4.2.

Tabela 3.3 - Siglas utilizadas na tabela 3.2 dos ácidos graxos com respectivas fórmulas químicas, massas moleculares e valores de viscosidade.

Siglas	Ácidos graxos	Fórmula química	Massa molecular (g)	Viscosidade (mm^2s^{-1})
Cl	Caprílico	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$	144,2	1,2
C	Cáprico	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$	172,3	1,7
La	Láurico	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$	200,3	2,4
M	Mirístico	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$	228,4	3,3
P	Palmítico	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	256,4	4,4
Po	Palmitoléico	$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_2$	254,4	3,7
Es	Estearico	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	284,5	5,9
O	Oléico	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	282,5	4,5
L	Linoléico	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	280,4	3,7
Ln	Linolênico	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$	278,4	3,1
A	Araquídico	$\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$	312,5	5,9
Ei	Eicosenóico	$\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$	310,5	5,8
B	Behênico	$\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_2$	340,6	5,9
Eu	Erúico	$\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{O}_2$	338,6	7,3
Lg	Lignocérico	$\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$	368,6	5,9
R	Ricínoléico	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_3$	298,5	15,4

Os valores dos Ácidos Araquídico, Behênico e Lignocérico não foram encontrados na

literatura e então podem ser considerados similares ao valor do ácido Esteárico embora estes sejam sólidos à 40°C (Allen *et al.*, 1999).

3.3 Determinação do índice de iodo e número de cetano do biodiesel a partir dos dados de Cromatografia gasosa

A auto-oxidação ocorre devido à presença de duplas ligações nas cadeias dos ácidos graxos, que depende do número e da posição das duplas ligações. Um dos procedimentos mais utilizados para inferir a susceptibilidade de um determinado óleo à oxidação é através da determinação do índice de iodo (IV), que pode ser calculado pela equação 3.2 utilizando os dados de cromatografia gasosa da tabela 3.3. O índice de iodo indica o número de insaturações de uma determinada amostra.

$$IV = \sum \frac{254 \times D \times A_i}{MW_i} \quad (3.2)$$

Onde D representa a quantidade de duplas ligações, MW_i a massa molecular de cada ácido graxo.

O número de cetano (CN), que indica a qualidade de ignição do diesel pode ser calculado pela equação 3.3, usando os valores do índice de iodo e índice de saponificação, $SN = \sum(560 \times A_i) / MW_i$.

$$CN = 46,3 + \frac{5458}{SN} - 0,225 \times IV \quad (3.3)$$

3.4 Análises por RMN

As medidas do sinal de RMN em baixa resolução foram realizadas em um espectrômetro de RMN constituído por Transmissor/Receptor Tecmag CAT-100, juntamente com amplificador de potência 2035 AMT, pré-amplificador AU 1448 Miteq e ímã super-

condutor Oxford de 2,1 Teslas (85 MHz para ^1H) e 30 cm de *bore*.

As amostras de sementes foram dispostas no centro da sonda de bobina única, desenvolvida na Embrapa Instrumentação Agropecuária, que consiste em uma bobina detectora de 1 cm de altura e 1 cm de diâmetro. Em seguida foram realizados os procedimentos de calibração da largura de pulsos (e potência do transmissor) até que se obteve um valor de 10 μs para pulsos de 90 graus. O sistema foi controlado pelo software NTNMR da Tecmag.

Em seguida, os decaimentos foram analisados no espectrômetro de RMN, utilizando as técnicas CPMG e CWFP.

Essas análises foram realizadas em triplicatas, com o auxílio de esteira arquitetada na Embrapa Instrumentação Agropecuária.

Antes das análises por RMN as amostras permaneceram em uma estufa a 70°C, por cerca de 48 horas para a secagem. Em seguida foram armazenadas em dessecador para a estabilização da temperatura ambiente, cerca de 23°C por 24 horas.

3.4.1 Análise da qualidade do óleo por CPMG

Para a análise com CPMG, foi utilizada a sequência da figura 1.16, que consiste de um pulso de 90 graus no eixo x, seguido de um tempo de espera τ e um trem de pulsos de 180 graus no eixo y, separados por um tempo 2τ . Foram utilizados pulsos de 90 graus de cerca de 10 μs , tempo τ de 300 μs e tempo de repetição de 2 s. As aquisições foram realizadas apenas após os eco pares, utilizando-se um tempo de digitalização de 4 μs , 64 pontos, levando a um tempo de aquisição de 256 μs . Foram adquiridos 2500 ecos e fez-se uma aquisição de 4 sinais para melhoria da razão sinal ruído.

Os decaimentos dos sinais obtidos com a sequência CPMG tiveram suas fases ajustadas, para o valor máximo no canal real e mínimo no imaginário. Em seguida foram exportados como arquivo *txt*. No programa Origin, os dados foram importados. A coluna de dados do sinal imaginário, que continha somente ruído, foi excluída. Os dados reais

foram expandidos em 64 colunas. Fez-se a média dos valores dessas colunas e os valores obtidos foram utilizados para a construção da curva do decaimento do sinal CPMG. A coluna com os valores de tempo (em segundos) foi calculada considerando os tempos envolvidos entre os ecos.

Os dados de CPMG foram analisados por métodos de ajustes discretos baseado no método de mínimos quadrados e por métodos quimiométricos empregando a análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamentos hierárquicos (HCA). As análises por ajustes discretos foram realizadas no *software* Origin 7.0, usando ajuste mono e multiexponenciais. As análises quimiométricas foram realizadas no *software* Pirouete, versão 3.11 (Infometrix).

3.4.2 Análise da qualidade do óleo com CWFP

Para as análises com a sequência CWFP (figura 1.18) usou-se um trem de 3000 pulsos de 90 graus de $10\ \mu\text{s}$ separados por um tempo τ de $300\ \mu\text{s}$ e com um tempo de espera entre as seqüências de 2 s. Utilizou-se uma frequência de *offset* de 5 KHz equivalente à um ângulo de precessão $\Psi = (\omega - \omega_0)t$ de 3π .

Utilizou-se um tempo total de aquisição entre os pulsos de $256\ \mu\text{s}$, usando um tempo de digitalização de $4\ \mu\text{s}$ e 64 pontos. Os decaimentos dos sinais obtidos com a seqüência CWFP foram exportados como arquivo *txt*, no modo de magnitude. No programa Origin, os dados foram importados. A coluna de dados de fase foi excluída. Os dados da magnitude do sinal foram expandidos em 64 colunas. Fez-se a média dos valores dessas colunas e os valores obtidos foram utilizados para a construção da curva do decaimento do sinal CWFP. A coluna com os valores de tempo (em segundos) foi calculada considerando os tempos envolvidos entre os pulsos.

Os dados de CWFP foram analisados por métodos de ajustes discretos baseado no método de mínimos quadrados e por métodos quimiométricos usando análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamentos hierárquicos (HCA). As análises por ajustes discretos foram realizadas no *software* Origin 7.0, usando ajuste mono e

multiexponenciais. As análises quimiométricas foram realizadas no *software* Pirouete, versão 3.11 (Infometrix).

3.4.3 Análise quimiométrica

A quimiometria pode ser definida como a aplicação de métodos matemáticos e estatísticos aos dados de origens distintas para a obtenção de informação química. Consiste de um conjunto de técnicas de cálculo com o objetivo de obter informações de um conjunto complexo de dados, incluindo conceitos de planejamento experimental, pré-processamento de dados, estatística e análise multivariada (Robinson, 2001).

As técnicas quimiométricas podem ser divididas em três grupos: análise exploratória de dados; construção de modelos quantitativos de calibração e a construção de modelos qualitativos de classificação. A análise exploratória utiliza principalmente os métodos de análise de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA).

As análises PCA e HCA foram realizadas no programa Pirouette, versão 3.11 (Infometrix).

Para a análise quimiométrica dos dados de RMN foram utilizados dois pré-processamentos: centrados na média e auto-escalado. No primeiro, este pré-processamento é utilizado, principalmente, para dados espectrais (Matos *et al.*, 2003), e consiste em calcular a média dos dados de determinada coluna (variável) e, em seguida, subtraí-la de cada dado da referida coluna. O segundo consiste em calcular as médias e os desvios padrões, subtrair cada valor da média, e dividir o resultado pelo desvio padrão.

3.4.3.1 Comparação entre PCA e HCA

A análise de componentes principais e a análise de agrupamento hierárquico são técnicas de análise multivariada com fundamentos teóricos diferentes, podendo ser aplicadas independentemente. Estas técnicas podem até ser complementares na informação sobre o conjunto de dados, dependendo do sistema analisado. Ambas fornecem a visão mais global

possível das amostras dentro do conjunto de dados, conforme as variáveis utilizadas.

3.5 Análises das amostras por RMN utilizando Esteira

Além das análises das amostras estáticas, foram realizadas também as análises das amostras em movimento ou em *stop and flow*. Para isso as amostras foram colocadas em uma esteira desenvolvida na Embrapa Instrumentação Agropecuária (figura 3.2). Para a movimentação da esteira utilizou-se um motor de passos HV343 e fonte de alimentação chaveada F75 e indexador OEM750X. Todos esses itens foram adquiridos da Parker.

A figura 3.1 apresenta um esquema do sistema da esteira (Colnago *et al.*, 2007). A esteira construída possui 16 mm de largura, com velocidade linear de 13 cm s^{-1} , contendo orifícios de 13 cm de diâmetro, local onde são inseridas as sementes, as quais são submetidas a um trem de pulsos de 90 graus. Neste experimento, foi utilizada uma bobina tipo sela de $18 \times 18 \text{ mm}$.

Figura 3.1 - Esquema de um sistema de RMN *on-line*, onde d = espaço necessário para a magnetização da amostra (200 mm), V = velocidade linear da esteira e D = distância entre as amostras (20 mm).

Figura 3.2 - Esteira em polycarbonato preto (A), usada diretamente para colocação de amostras (B) ou com porta-amostras em polycarbonato branco (C). D indica a posição do motor de passos e a polia acionadora da esteira.

Na figura 3.3 tem-se uma visão geral da bobina tipo sela usada para análise das amostras em movimento.

Figura 3.3 - Foto da bobina tipo sela montada sobre tubo de acrílico.

Para o controle da esteira utilizou-se o *NMR Automation* (figura 3.4) *software* em ambiente de programação Visual Basic 6.0 ^{TM}, também desenvolvido na Embrapa Instrumentação Agropecuária. Com esse *software* é possível controlar a velocidade de movi-

mentação da esteira, das distâncias a serem percorridas no modo *stop and flow* entre outras opções. Para a operação do aparelho, faz-se o controle de início de operação desse *software* pelo programador de pulsos do sistema CAT100 da Tecmag.

Figura 3.4 - Tela de configuração do modo de operação da esteira.

4 Resultados e Discussão

O sinal de H^1 RMN de sementes oleaginosas desidratadas, em baixa resolução e no domínio de tempo, é composto por dois decaimentos exponenciais com constantes de tempo distintos. O decaimento mais rápido, com constante de tempo da ordem de 10^{-5} s é devido aos componentes sólidos das sementes, constituídos principalmente pelas proteínas e carboidratos. O decaimento mais lento, com constante de tempo de 10^{-3} a 10^{-1} s é atribuído aos óleos vegetais que estão em estado líquido, depositados em oleosomas. Por causa dessa grande diferença de tempo de relaxação entre os componentes sólidos e o óleo, pôde-se usar o sinal de RMN de sementes oleaginosas, após $100 \mu s$, para determinação tanto do teor quanto da qualidade do óleo vegetal, independente dos outros constituintes da semente (Prestes *et al.*, 2007).

Para a medida do teor de óleo por RMN faz-se uma curva de calibração entre a intensidade do sinal de RMN, cerca de $100 \mu s$ após o pulso, e o teor de óleo das sementes. Esse método já está certificado para medidas quantitativas do teor de óleo em várias sementes como girassol, colza, soja entre outras.

As metodologias de medida da qualidade do óleo em sementes intactas, para uso em biodiesel, ainda estão em desenvolvimento e os primeiros resultados utilizando a sequência CPMG (Prestes *et al.*, 2007) indicaram que possuem boa correlação com a qualidade do óleo vegetal para uso em biodiesel. No entanto, as análises foram feitas apenas com 15 sementes com composição química similar. Para verificar aplicabilidade de RMN em baixa resolução na determinação da qualidade de óleo vegetais, analisou-se 31 amostras de sementes, frutos e nozes intactas, com composição em ácidos graxos

diferentes. Para isso usou-se tanto a seqüência CPMG, técnica de medida do tempo de relaxação transversal (T_2) quanto a seqüência CWFP, técnica recentemente desenvolvida, a qual contém informações tanto da relaxação transversal T_2 quanto da longitudinal, T_1 .

A figura 4.1 apresenta os sinais obtidos com a seqüência CPMG para as sementes de linhaça, niger e moringa. Esses espectros, assim como todos os outros apresentados neste trabalho, são a média de 3 medidas para cada amostra. É possível observar na figura 4.1 que os sinais das sementes possuem distintas velocidades de decaimentos (T_2) devido à respectiva composição do óleo das sementes. Como T_2 apresenta correlação inversa com a viscosidade do óleo (Prestes *et al.*, 2007), a semente da linhaça possui o óleo menos viscoso, e a moringa o mais viscoso.

Figura 4.1 - Sinais normalizados de CPMG das sementes linhaça, niger e moringa.

A viscosidade do óleo vegetal aumenta com o comprimento da cadeia (número de carbonos) e diminui com o aumento do número de insaturações dos ácidos graxos com o mesmo número de carbonos. Como os principais componentes dos ácidos graxos dessas sementes possuem 18 carbonos, C18 (tabela 3.2), conclui-se que as diferenças de viscosidade são devidas ao grau de insaturação. Isto explica porque o sinal da moringa decai mais rapidamente, pois é rica em ácido oléico (C18:1), consistindo em um óleo mais viscoso dentre os três analisados. O niger é rico em ácido linoléico (C18:2) e possui decaimento intermediário. O sinal da linhaça decai mais lentamente, pois é rico em ácido linolênico

(C18:3), o menos viscoso dos óleos, evidenciando a correlação da velocidade de decaimento com a viscosidade. Portanto, o decaimento exponencial T_2 é inversamente proporcional à viscosidade do óleo das sementes que por sua vez, está diretamente relacionado aos teores e tipos de ácidos graxos e outras propriedades (Prestes *et al.*, 2007).

Na figura 4.2 estão os sinais CWFP das mesmas amostras da figura 4.1 (CPMG), sementes de linhaça, niger e moringa. Ao se comparar as figura 4.1 e 4.2 pode-se ver que os sinais obtidos para as mesmas amostras, com as técnicas CPMG e CWFP, são distintos. Como apresentado anteriormente, os sinais CPMG decaem continuamente até um valor nulo, enquanto que os sinais CWFP apresentam dois regimes até alcançar o estado estacionário, onde a amplitude não tende a zero.

Figura 4.2 - Decaimentos do sinal de CWFP para as amostras de linhaça, niger e moringa.

O regime destacado em vermelho (0 a 0,015 s) ocorre com variação rápida da intensidade do sinal entre 1 e 0,4, cuja taxa de decaimento depende de T_2^* . Após esse tempo, o sinal decai mais lentamente (0,015 a 0,4 s), com constante de tempo para pulsos de 90 graus ($T_{(\alpha=\pi/2)}$) que depende da razão entre os tempos de relaxação, conforme a equação 1.14. Esse sinal é denominado de sinal *quasi*-estacionário (verde).

O regime propriamente estacionário (azul) de onda contínua em precessão livre (CWFP) é alcançado somente após 0,4 s, cuja intensidade (M_z) é dada pela razão entre os tempos de relaxação T_1 e T_2 e o valor da magnetização após o primeiro pulso (M_0) de acordo

com a equação 1.13, onde M_z é obtido do regime estacionário do decaimento (após 0,4 s) e M_0 é obtido através do decaimento após o primeiro pulso.

A equação 1.13 demonstra que a intensidade do sinal de CWFP não é dependente dos valores absolutos de T_2 ou T_1 , mas da razão entre eles e por isso o sinal CWFP não decai a zero (figura 4.2), como no caso do CPMG (figura 4.1).

Assim, uma interpretação qualitativa da figura 4.2, indica que a variação rápida do sinal, entre 0 e 0,015 s, não tem correlação direta com a qualidade do óleo em um aparelho de baixa resolução, pois o valor de T_2^* está diretamente ligado a não-homogeneidade do campo magnético estático B_0 . Já o decaimento do sinal entre 0,015 e 0,4 s, sinal *quasi*-estacionário, possui uma constante de tempo T^* , que varia com os tempos de relaxação T_1 e T_2 (equação 1.14) e é dependente da qualidade do óleo, pois ambos os tempos de relaxação dependem da viscosidade. Como a razão $T_1/T_2 \sim 2$ para essas amostras (a ser apresentado neste trabalho), um decréscimo do valor de T_2 implica um decaimento mais rápido da moringa > niger > linhaça. Além do decaimento T^* , a intensidade do sinal CWFP (M_z) (após 0,4 s) tem correlação com a qualidade do óleo, pois também possui dependência da razão T_1/T_2 , conforme equação 1.13. Assim, a linhaça apresenta o sinal CWFP mais intenso que o do niger e que o da moringa, uma vez que o T_2 decai na mesma ordem (figura 4.2) e a razão T_1/T_2 permanece constante. Assim, como M_z depende da razão $T_2/(T_1+T_2)$, quanto menor T_2 , menor será o valor do sinal no estado estacionário.

Antes de correlacionar quantitativamente os dados de CPMG e CWFP com a qualidade dos óleos vegetais, fez-se uma avaliação dos métodos de ajustes multiexponenciais e dos métodos quimiométricos usados nessas análises.

4.1 Análise multiexponencial dos dados de CPMG

Para se fazer uma correlação quantitativa entre os decaimentos do sinal CPMG e as propriedades do biodiesel, fez-se uma avaliação dos métodos de ajustes multiexponenciais para determinação de T_2 .

Para se determinar o valor da constante de tempo T_2 utilizando o ajuste multiexponencial, avaliou-se qual seria o número de exponenciais adequado a ser empregado, pois tal número deve ser informado pelo operador para que o *software* realize o ajuste do sinal.

As figuras 4.3(a) e (b) ilustram os sinais da figura 4.1 ajustados: mono (a) e bi exponencialmente (b). Os coeficientes de correlação (r) para as três sementes são próximos de 1, acima de 0,996 para mono e de 0,999 para o ajuste biexponencial. No entanto, é possível observar que o ajuste mono, mesmo com um coeficiente de correlação excelente, não representa corretamente o sinal de RMN para essas sementes, sendo nitidamente observado nas figuras 4.3(c) e (d), através da análise dos resíduos, os quais apresentam a diferença entre o sinal experimental e seu respectivo ajuste.

Na figura 4.3(c), pode-se ver que o resíduo do sinal monoexponencial apresenta, no início do sinal, cerca de 10% da sua intensidade e em seguida varia para aproximadamente 2%. O ajuste biexponencial apresenta erro de aproximadamente 2% no início do sinal, com pequenas variações de 0.5% para tempos maiores, diferentemente do ajuste monoexponencial, evidenciando que este ajuste é o mais apropriado.

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 4.3 - Sinais da figura 4.1 ajustados: mono (a) e bi exponencial (b). Resíduos (diferença entre o ajuste e o respectivo sinal) dos ajustes: mono (c) e bi exponencial (d).

O ajuste triexponencial, apresentou menor resíduo que os observados com ajuste mono e bi exponenciais, mas não será utilizado neste trabalho, pois os erros nos valores T_2 dependem veementemente da razão sinal/ruído (Corrêa, 2007).

Na tabela 4.1 estão os valores de T_2 mono e T_2 bi exponencial (T_{21} e T_{22}) e as respectivas intensidades dos decaimentos, I_1 e I_2 , para todos os sinais da figura 4.4.

Tabela 4.1 - Valores de T_2 mono e T_2 bi exponencial (T_{21} e T_{22}) e as respectivas intensidades dos decaimentos, I_1 e I_2 , para todos os sinais da figura 4.4.

Sementes CPMG	Monoexponencial		Biexponencial		
	$T_2(s)$	$T_{21}(s)$	$I_1(\%)$	$T_{22}(s)$	$I_2(\%)$
abóbora	0,105	0,160	60	0,048	40
algodão	0,101	0,164	53	0,054	47
amêndoas	0,093	0,138	61	0,038	39
amendoim	0,094	0,144	57	0,044	43
andiroba	0,060	0,109	42	0,032	58
baru	0,088	0,132	58	0,040	42
bucha	0,110	0,175	55	0,060	45
café	0,069	0,107	55	0,029	45
castanha de caju	0,092	0,137	58	0,043	42
castanha do brasil	0,097	0,169	48	0,055	52
chapéu-de-napoleão	0,090	0,148	51	0,048	49
côco	0,108	0,165	58	0,055	42
gergelim	0,103	0,157	59	0,047	41
girassol	0,109	0,162	62	0,050	38
linhaça	0,123	0,185	64	0,053	36
macadâmia	0,084	0,164	36	0,055	64
macaúba	0,100	0,164	51	0,056	49
mamona	0,019	0,040	31	0,011	69
melancia	0,119	0,178	61	0,059	39
moringa	0,084	0,132	53	0,044	47
niger	0,106	0,156	64	0,039	36
noz	0,116	0,174	62	0,052	38
pati	0,106	0,150	63	0,050	37
pequi polpa	0,098	0,143	59	0,050	41
pequi semente	0,093	0,138	58	0,045	42
piaçava	0,104	0,170	52	0,058	48
pinhão-manso	0,100	0,147	62	0,043	38
pistache	0,095	0,146	58	0,044	42
rabanete	0,076	0,123	51	0,037	49
soja	0,097	0,144	60	0,043	40
tucumã	0,099	0,139	64	0,044	36

Na figura 4.4 estão os sinais obtidos com a sequência CPMG das 31 amostras analisadas. Nesta figura observa-se que o sinal discrepante (vermelho) é o da mamona, o qual possui o menor tempo de relaxação T_2 por ser um óleo extremamente viscoso, apresentando maior valor de viscosidade que os outros óleos vegetais estudados. Esta característica deve-se à sua composição, pois contém cerca de 80% de ácido ricinoléico

(C18:1) e um grupo hidroxila no C12, o que permite ligações intramoleculares de hidrogênio, aumentando assim a sua viscosidade (Prestes *et al.*, 2007).

Figura 4.4 - Todos os sinais de decaimentos obtidos pela técnica CPMG.

Na figura 4.5 estão os gráficos dos valores de T_2 mono e bi exponenciais, para as respectivas sementes, onde nota-se que o perfil de variação dos tempos de relaxação obtidos pelos ajustes mono e bi exponenciais são semelhantes. Nesta figura é possível observar também que as amostras com menor valor de T_2 mono, T_{21} e T_{22} é a mamona, amostra 18, e com maior valor de T_2 é a semente de linhaça.

Figura 4.5 - Perfil de variação dos tempos de relaxação obtidos pelos ajustes mono e bi exponenciais para CPMG.

Figura 4.6 - Gráfico entre os valores de T_2 mono *versus* T_{21} (a) e T_{22} (b) biexponencial.

Esta semelhança entre os três valores de T_2 é evidenciada na figura 4.6, onde fez-se um gráfico entre os valores de T_2 mono *versus* os de T_{21} (a) e T_{22} (b). Nesta figura pode-se notar que há uma boa correlação entre os valores de T_2 mono e T_{21} ($r=0,94$) e T_2 mono e T_{22} ($r=0,88$). Considerando a boa correlação entre os valores de T_2 mono e bi, usou-se somente o ajuste mono exponencial para as correlações com as propriedades do biodiesel, pois tal ajuste possui menor susceptibilidade a ruídos e outras distorções espectrais (Corrêa, 2007).

4.1.1 Correlação de T_2 e propriedades quantitativas do biodiesel

Dentre as propriedades físicas e químicas do biodiesel, a viscosidade, o índice de iodo e número de cetano estão diretamente ligados à composição em ácidos graxos do óleo vegetal e assim, podem ser avaliadas diretamente nas sementes.

A tabela 4.2 apresenta os valores calculados para viscosidade (μ), índice de iodo (IV) e número de cetano (CN) para o óleo das sementes analisadas, utilizando as equações 3.1, 3.2 e 3.3 e a composição em ácidos graxos das sementes.

Tabela 4.2 - Valores para viscosidade (μ), índice de iodo (IV) e número de cetano (CN) para o biodiesel de óleo com a composição em ácidos graxos das sementes analisadas.

n ^o	Sementes	μ (mm ² s ⁻¹)	IV	CN
1	abóbora	4,1	120,8	46,4
2	algodão	3,9	115,9	47,3
3	amêndoa	4,2	88,1	54,3
4	amendoim	4,1	93,8	53,7
5	andiroba	4,4	74,0	56,4
6	baru	4,4	100,5	51,5
7	bucha	4,1	108,9	49,1
8	café	4,2	98,7	50,4
9	castanha de caju	4,4	86,6	54,2
10	castanha do brasil	4,2	109,2	48,8
11	chapéu-de-napoleão	4,6	69,2	57,8
12	côco	2,1	15,4	62,4
13	gergelim	4,2	108,9	49,2
14	girassol	4,0	137,0	42,9
15	linhaça	3,7	205,8	26,6
16	macadâmia	4,0	78,7	56,1
17	macaúba	4,4	76,3	55,7
18	mamona	13,0	86,9	55,8
19	melancia	4,1	125,6	45,1
20	moringa	4,6	73,0	57,8
21	niger	3,8	133,3	44,5
22	noz	3,7	162,3	36,9
23	pati	3,0	28,0	61,5
24	pequi polpa	4,3	55,5	61,2
25	pequi semente	4,2	50,7	61,9
26	piaçava	2,8	16,3	63,5
27	pinhão-manso	4,3	98,7	51,0
28	pistache	4,3	92,8	52,9
29	rabanete	5,0	105,2	52,5
30	soja	4,0	136,7	42,7
31	tucumã	2,9	19,4	63,1

Na figura 4.7(a) está o gráfico entre os valores de T₂ mono e a viscosidade para todas as sementes, com coeficiente de correlação r= - 0,79. Nesta figura pode-se notar que a semente de mamona (18) se destaca das outras, devido à alta viscosidade do seu óleo. Assim, a maioria dos estudos quantitativos será feita sem os dados da mamona. Na figura 4.7(b), está o gráfico dos valores de T₂ mono e da viscosidade, sem a mamona. Nesta figura

pode-se observar que as amostras de côco (12), pati (23), piaçava (26) e tucumã (31), da família das palmáceas, não se agrupam com as outras amostras. Elas se localizam abaixo da curva de correlação linear entre os valores de T_2 e a viscosidade. Isso porque essas amostras possuem principalmente ácidos graxos saturados entre C8 e C16, diferentemente das outras amostras que apresentam predominantemente ácidos graxos com 18 carbonos, C18. A figura 4.8 ilustra o gráfico sem as palmáceas e mamona. Então, juntamente com a figura 4.7 pode-se observar que a correlação entre T_2 e a viscosidade aumenta de $r = -0,46$ (4.7(b)) para $r = -0,63$ (4.8).

Figura 4.7 - Gráfico entre os valores de T_2 mono *versus* viscosidade, (a) com mamona e (b) sem mamona.

Figura 4.8 - Gráfico entre os valores de T_2 mono *versus* viscosidade, sem palmáceas e mamona.

Nas figuras 4.9(a) e (b) estão os gráficos entre os valores de T_2 mono e o índice de iodo com e sem as palmáceas respectivamente e na figura 4.10 estão os gráficos entre os valores de T_2 mono e número de cetano com (a) e sem as palmáceas (b). Nestes gráficos observa-se que sem as palmáceas (4.9(b) e 4.10(b)) as correlações, tanto com índice de iodo ($r = 0,64$) quanto número de cetano ($r = -0,64$), são maiores do que com as palmáceas (4.9(a) e 4.10(a)), $r = 0,31$ e $r = -0,44$, respectivamente. Assim, é evidenciado novamente que as palmáceas não se comportam como as outras amostras, devido à grande diferença de composição em ácidos graxos.

(a)

(b)

Figura 4.9 - Gráficos entre os valores de T_2 mono *versus* índice de iodo com (a) e sem palmáceas (b).

(a)

(b)

Figura 4.10 - Gráficos entre os valores de T_2 mono *versus* número de cetano com (a) e sem palmáceas (b).

Essas diferenças entre as palmáceas e as sementes com maior teor de C18 não são observadas somente na comparação de valores de T_2 . As palmáceas também formam um grupo distinto quando se correlaciona viscosidade e índice de iodo (figuras 4.11(a) e (b)) e viscosidade e número de cetano (figuras 4.12(a) e (b)).

(a)

(b)

Figura 4.11 - Correlações entre viscosidade e índice de iodo com (a) e sem palmáceas (b).

Figura 4.12 - Correlações entre viscosidade e número de cetano com (a) e sem palmáceas (b).

Essas correlações podem ser mais facilmente observadas na tabela 4.3 onde as correlações entre T_2 das palmáceas e os três parâmetros de qualidade de biodiesel, μ , IV e CN são da mesma grandeza, $r = 0,64$.

Tabela 4.3 - Correlações entre T_2 e μ , IV e CN.

Gráficos	r (com palmáceas)	r (sem palmáceas)
$T_2 \times \mu$	-0,46	-0,63
$T_2 \times IV$	0,31	0,64
$T_2 \times CN$	-0,44	-0,64

Assim, conclui-se que as análises da qualidade de óleo vegetal em sementes intactas devem ser realizadas em amostras com composição química similar. As análises apresentaram melhor resultado com amostras que continham os principais ácidos graxos com o mesmo número de carbono (C18), e a variação ocorreu apenas no grau de insaturação.

4.2 Análise dos sinais CWFP

Como demonstrado anteriormente, o sinal CWFP possui dois componentes com dependência dos tempos de relaxação T_1 e T_2 , a razão M_z/M_0 e T^* . A razão M_z/M_0 depende da razão T_1/T_2 de acordo com a equação 1.13. Assim, fez-se uma correlação dessa razão e o valor de T_2 para as mesmas amostras (figura 4.13). Como pode-se verificar nesta figura, há uma boa correlação ($r = 0,93$) entre a razão M_z/M_0 e T_2 , indicando que apenas a medida da intensidade do sinal CWFP, após o primeiro pulso (M_0) e após atingir o estado estacionário (M_z) pode ser utilizada em substituição às medidas de CPMG, que necessitam de um ajuste exponencial para se determinar o valor de T_2 .

Figura 4.13 - Curva de correlação de T_2 mono CPMG e razão M_z/M_0 medida no sinal CWFP.

Para se determinar a constante de decaimento do sinal *quasi*-estacionário (T^*) do sinal CWFP é necessário utilizar os mesmos ajustes multiexponenciais já demonstrados para as medidas de T_2 dos sinais CPMG (figura 4.3). Como a diferença de intensidade dos sinais no regime *quasi*-estacionário (T^*) é menor que a diferença do sinal CPMG, o mesmo apresenta um maior ruído (figura 4.14). Na figura 4.14 estão os ajustes mono (a) e biexponencial (b) para T^* e os coeficientes de correlação (r) para as três sementes são próximos de 1, acima de 0,997 para mono e 0,998 para o ajuste biexponencial. Nestas figuras não é possível observar claramente qual o melhor ajuste a ser utilizado devido ao ruído. Isso pode ser nitidamente observado através da análise dos resíduos, figuras 4.14(c)

e (d).

Como também demonstrado para os dados de CPMG (figura 4.3), o ajuste mono apresenta uma maior oscilação do sinal principalmente no seu início, indicando que não ajusta perfeitamente o decaimento T^* .

Figura 4.14 - Decaimento exponencial dos sinais CWFP da figura 4.2 ajustados: mono (a) e bi exponencial (b). Análise dos resíduos dos ajustes: mono (c) e bi exponencial (d).

Na tabela 4.4 estão os valores de T^* mono e biexponencial do sinal CWFP para as 31 amostras analisadas.

Tabela 4.4 - Valores de T^* mono e biexponencial do sinal CWFP das 31 amostras analisadas.

Sementes CWFP	Monoexponencial		Biexponencial			
	$T^*(s)$	$T_{21}^*(s)$	$I_1(\%)$	$T_{22}^*(s)$	$I_2(\%)$	
abóbora	0,127	0,158	77	0,053	23	
algodão	0,116	0,159	67	0,054	33	
amêndoas	0,118	0,158	68	0,056	32	
amendoim	0,119	0,152	73	0,053	27	
andiroba	0,088	0,126	57	0,049	43	
baru	0,116	0,138	81	0,032	19	
bucha	0,131	0,182	67	0,064	33	
café	0,095	0,131	65	0,039	35	
castanha de caju	0,120	0,153	73	0,054	27	
castanha do brasil	0,127	0,162	73	0,059	27	
chapéu-de-napoleão	0,119	0,153	71	0,056	29	
côco	0,128	0,170	70	0,061	30	
gergelim	0,128	0,160	76	0,056	24	
girassol	0,126	0,165	72	0,054	28	
linhaça	0,135	0,169	77	0,054	23	
macadâmia	0,115	0,146	72	0,052	28	
macaúba	0,134	0,175	68	0,074	32	
mamona	0,043	0,076	38	0,026	62	
melancia	0,128	0,155	79	0,047	21	
moringa	0,098	0,125	72	0,040	28	
niger	0,119	0,153	75	0,042	25	
noz	0,133	0,169	74	0,060	26	
pati	0,126	0,157	77	0,049	23	
pequi polpa	0,113	0,142	74	0,051	26	
pequi semente	0,119	0,148	74	0,056	26	
piaçava	0,132	0,165	75	0,060	25	
pinhão-manso	0,115	0,149	72	0,047	28	
pistache	0,125	0,159	74	0,054	26	
rabanete	0,109	0,155	59	0,061	41	
soja	0,119	0,161	68	0,053	32	
tucumã	0,129	0,159	77	0,056	23	

Na figura 4.15 estão os sinais CWFP das 31 amostras analisadas. Assim como observado nos dados de CPMG (figura 4.4), o sinal discrepante (vermelho) é o da mamona por ser muito mais viscoso e, conseqüentemente, apresenta tempo de relaxação distinto das outras amostras.

Figura 4.15 - Todos os sinais de decaimentos obtidos pela técnica CWFP.

O gráfico da figura 4.16 ilustra os valores de T^* mono e biexponencial (T_{21}^* e T_{22}^*) *versus* as respectivas sementes. Através deste é possível observar que os perfis ilustrados apresentam comportamento semelhante, assim como observado para os dados de CPMG (figura 4.5).

Figura 4.16 - Perfil de variação dos tempos de relaxação obtidos pelos ajustes mono e bi exponencial para CWFP.

Os ajustes mono e bi exponencial para T^* (figura 4.17) apresentaram correlação maior ($r = 0,95$) para T^* mono *versus* T_{21}^* (a) que entre T^* e T_{22}^* (b), com $r = 0,71$, como também observado na análise dos dados de CPMG (figura 4.6).

Figura 4.17 - Correlação entre os valores de T^* mono e T_{21}^* bi (a) e T^* mono e T_{22}^* bi (b).

Também obteve-se a correlação entre os valores de T_2 , medidos por CPMG, *versus* T^* , medidos por CWFP. Na figura 4.18 observa-se que os valores de T_2 mono, CPMG, e T^* mono, CWFP, apresentam alta correlação, $r=0,94$, assim como observado entre a razão M_z/M_0 e T_2 (figura 4.13). Já as correlações entre o ajuste biexponencial foram menores, com $r=0,89$ para o T_{21} (4.19(a)) e $r=0,68$ para T_{22} (4.19(b)). Tais resultados mostram uma grande correlação entre os dados CPMG e CWFP, e que há equivalência entre os dados coletados com as duas técnicas de RMN. Para demonstrar essa similaridade, também foram correlacionados os valores de T^* e razão M_z/M_0 para as amostras com e sem as palmáceas, com os parâmetros de qualidade do biodiesel (μ , IV e CN) (tabela 4.2). Nesta tabela pode-se ver que tanto T^* quanto a razão M_z/M_0 obtiveram menor correlação com μ , IV e CN do que as observadas com CPMG (tabela 4.5).

Figura 4.18 - Correlação de T^* mono CWFP *versus* T_2 mono CPMG.

(a)

(b)

Figura 4.19 - Correlação de (a) T_{21}^* bi CWFP *versus* T_{21} bi CPMG e (b) T_{22}^* bi CWFP *versus* T_{22} bi CPMG.

Tabela 4.5 - Correlações entre T^* e μ , IV e CN e razão M_z/M_0 e μ , IV e CN.

Gráficos	r (com palmáceas)	r (sem palmáceas)
$T^* \times \mu$	-0,45	-0,53
$T^* \times IV$	0,13	0,49
$T^* \times CN$	-0,24	-0,49
$M_z/M_0 \times \mu$	-0,36	-0,43
$M_z/M_0 \times IV$	0,10	0,35
$M_z/M_0 \times CN$	-0,19	-0,37

Como nas análises de CPMG, as análises dos dados de CWFP (tabela 4.5) apresentaram maior correlação sem as palmáceas do que com estas, ou seja, os melhores resultados são obtidos quando o método é aplicado às sementes com composições similares, variando somente o grau de insaturação.

Além de poder usar os valores de T^* e a razão M_z/M_0 , a sequência CWFP permite também obter os valores de T_1 e T_2 . Com o sinal CWFP pode-se calcular tanto T_2 quanto T_1 , rearranjando as equações 1.14 e 1.13 para obter as equações 4.1 e 4.2 (Azeredo *et al.*, 2000). Por meio destas equações é possível notar que, para obter os valores de T_1 e T_2 , são necessários somente os valores das intensidades após o pulso (M_0) e no estado estacionário (M_z) e a constante de tempo ($T_{\alpha=\pi/2}$).

$$T_1 = \frac{T_{(\alpha=\pi/2)}/2}{M_z/M_0} \quad (4.1)$$

$$T_{2calc} = \frac{T_{(\alpha=\pi/2)}/2}{[1 - M_z/M_0]} \quad (4.2)$$

Na tabela 4.6 encontram-se os valores de T_1 e T_2 obtidos para as 31 sementes analisadas, utilizando a sequência CWFP.

Tabela 4.6 - Valores de T_1 , T_2 calculado e da razão entre T_1 e T_2 das sementes analisadas.

nº	Sementes	T_1 (s)	T_{2calc} (s)	T_1/T_2
1	abóbora	0,196	0,094	2,1
2	algodão	0,207	0,081	2,6
3	amêndoas	0,190	0,086	2,2
4	amendoim	0,200	0,085	2,4
5	andiroba	0,188	0,058	3,3
6	baru	0,198	0,082	2,4
7	bucha	0,202	0,093	2,2
8	café	0,194	0,070	2,8
9	castanha de caju	0,200	0,080	2,5
10	castanha do brasil	0,213	0,091	2,3
11	chapéu-de-napoleão	0,205	0,085	2,4
12	côco	0,212	0,093	2,3
13	gergelim	0,206	0,094	2,2
14	girassol	0,198	0,094	2,1
15	linhaça	0,205	0,091	2,2
16	macadâmia	0,219	0,083	2,6
17	macaúba	0,215	0,076	2,8
18	mamona	0,181	0,031	5,8
19	melancia	0,204	0,086	2,4
20	moringa	0,190	0,069	2,7
21	niger	0,210	0,083	2,5
22	noz	0,207	0,098	2,1
23	pati	0,195	0,094	2,1
24	pequi polpa	0,178	0,083	2,1
25	pequi semente	0,192	0,087	2,2
26	piaçava	0,217	0,095	2,3
27	pinhão-manso	0,185	0,084	2,2
28	pistache	0,209	0,089	2,4
29	rabanete	0,213	0,073	2,9
30	soja	0,202	0,084	2,4
31	tucumã	0,202	0,095	2,1

Na figura 4.20 está o gráfico entre T_2 calculado a partir dos dados CWFPT e T_2 obtido dos dados de CPMG. Nesta figura pode-se ver que eles apresentam um alto coeficiente de correlação, $r = 0,91$ para as 31 amostras analisadas, indicando que podem ser usados de maneira equivalente.

Figura 4.20 - Curva de correlação entre os valores de T_2 calculado a partir do dados CWFP e T_2 CPMG, ajustado mono exponencialmente.

Também obteve-se a correlação entre os valores de T_1 e T_2 obtidos dos dados CWFP (figura 4.21). Nota-se nesta figura que o sinal da mamona (18) se destaca das outras amostras, pois possui o valor de T_1 praticamente seis vezes maior que T_2 (tabela 4.6), devido à alta viscosidade de seu óleo.

Figura 4.21 - Gráfico entre os valores T_1 e T_2 calculados pelas equações 4.1 e 4.2.

Na figura 4.21 fez-se uma divisão (barra vermelha) em duas partes, baseando se na razão T_1/T_2 (tabela 4.6). Na parte da esquerda do gráfico estão as amostras de andiroba (5), café (8) moringa (20), rabanete (29) e a macadâmia (17), que possuem uma razão $T_1/T_2 \sim 3$. Além da mamona, essas amostras são as que apresentam os óleos mais

viscosos. Neste grupo, a andiroba possui o óleo com maior viscosidade e a macadâmia o menor. As outras amostras localizadas no lado direito do gráfico possuem óleos com viscosidade menor do que as do lado esquerdo e com razão $T_1/T_2 \sim 2$.

Essas mesmas conclusões podem ser obtidas com o gráfico de T_1/T_2 *versus* T_2 (figura 4.22). Nesta figura pode-se ver que quanto menores são os valores de T_2 , maior é a diferença entre T_1 e T_2 e, portanto, mais viscoso o óleo da amostra. Assim, quanto mais viscoso o óleo maior será a diferença entre os sinais CPMG e CWFP.

Figura 4.22 - Gráfico entre os valores de T_1/T_2 *versus* T_2 mono CPMG.

4.3 Análise Quimiométrica

Os métodos multiexponenciais descritos anteriormente, além de depender de parâmetros fornecidos pelo operador, por exemplo o número de exponenciais, necessitam da correlação entre os tempos de relaxação com os vários tipos de óleos presentes nas sementes. Deste modo, tanto os dados de CPMG quanto os de CWFP também foram analisados pelos métodos quimiométricos Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) que, diferentemente dos métodos multiexponenciais, têm pouca ou nenhuma interferência do operador e podem analisar todas as informações espectrais simultaneamente.

A HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*, consiste no tratamento matemático

de cada amostra como um ponto no espaço multidimensional descrito pelas variáveis escolhidas (Moita Neto e Moita, 1998). O objetivo da HCA é exibir os dados em um espaço bidimensional, de maneira a enfatizar os seus agrupamentos e padrões naturais. Quando uma determinada amostra é tomada como um ponto no espaço das variáveis, é possível calcular a distância deste ponto a todos os outros pontos, constituindo-se assim uma matriz que descreve a proximidade (similaridade) entre todas as amostras estudadas.

Existem várias maneiras de calcular a distância entre dois pontos. A mais conhecida e utilizada é a distância euclidiana. Relembrando que, para duas variáveis, corresponde à aplicação do teorema de Pitágoras ($a^2 = b^2 + c^2$): o comprimento da hipotenusa (a) é igual à raiz quadrada da soma dos quadrados dos catetos (b e c). Baseada nesta matriz de proximidade entre as amostras se constrói um diagrama de similaridade denominado dendrograma (dendr(o) = árvore). No dendrograma exemplificado na figura 4.23, as amostras são listadas do lado esquerdo do gráfico e os ramos indicam quais amostras estão em dado agrupamento. O eixo horizontal é uma medida da distância entre agrupamentos e a posição das linhas verticais indica as distâncias entre dois destes pontos (ou similaridade) (Beebe, Pell e Seasholtz, 1998).

Figura 4.23 - Exemplo de um dendrograma de HCA.

Estes pontos no espaço multidimensional podem se aglomerar matematicamente para formar os agrupamentos hierárquicos. Duas amostras próximas devem ter também valores semelhantes para as variáveis medidas, variando de 1, para similaridade total, até 0, para

total dissimilaridade. Quanto maior a proximidade entre as medidas relativas às amostras, maior a similaridade entre elas. O dendrograma hierarquiza esta similaridade para uma visão bidimensional da similaridade ou dissimilaridade de todo o conjunto de amostras utilizado no estudo.

A Análise dos Componentes Principais (PCA) é uma ferramenta estatística que é empregada para visualização de similaridades ou diferenças de um conjunto de dados e também na redução de dados das amostras. Este método condensa as informações mais relevantes nos primeiros componentes principais (PC's) e as menos proeminentes nos últimos PC's. Desta maneira, reduz a quantidade de informações dos dados utilizando apenas os primeiros PC's e não todo o conjunto de dados, através de combinações lineares estabelecidas entre os dados.

A figura 4.24 ilustra a redução de dimensionalidade efetuada pela PCA num caso simples com três dimensões (variáveis). A componente principal PC_1 é o vetor que atravessa a nuvem de dados apontando na direção da maior variância. A direção da segunda componente principal PC_2 por sua vez aponta na direção da segunda maior variância. A posição de cada amostra neste novo sistema de coordenadas é dada pelo vetor *score*.

Figura 4.24 - Representação gráfica da decomposição de um conjunto de dados formados por 24 amostras, 3 variáveis (dimensões) Var.1, Var.2 e Var.3. Após a execução da PCA o sistema é reduzido a duas componentes principais (dimensões) PC_1 e PC_2 .

Um dos méritos da PCA é que, conforme mostrado na figura 4.24, as PC's geradas são ortogonais entre si. Assim não há qualquer informação redundante, ou seja, o problema de multicolinearidade é eliminado. Embora haja uma infinidade de técnicas para se construir

uma base ortogonal de dados, a vantagem da PCA é que a variância é maximizada dentro de cada componente principal extraída do conjunto original de dados. Ou seja, as novas variáveis geradas, além de não correlatas, são aquelas com a máxima variância.

Devido à ortogonalidade das novas variáveis é possível isolar diferentes efeitos (forças motrizes), pois cada componente principal terá relação com um comportamento de governo diferente e independente.

O gráfico dos *scores* é um excelente instrumento para identificar semelhanças e dissimilaridades entre as amostras analisadas e classificá-las em grupos, conforme ilustra a figura 4.25.

Figura 4.25 - Gráfico de *scores* PC_1 versus PC_2 .

Os PC's são apresentados em ordem decrescente de variância e cada novo PC é ortogonal ao anterior ou seja, sem correlação. Assim, a primeira componente principal (PC_1) descreve a maior variância dos dados do que as componentes subseqüentes ($PC_1 > PC_2 > PC_3 \dots > PC_n$). A variância está relacionada com a quantidade de informações dos dados originais que é descrita pelas componentes principais (Moita Neto e Moita, 1998).

A PCA decompõe a matriz de dados originais X , com m amostras e n dados por amostras ($X = m \times n$) em duas outras matrizes, S e L . A matriz de *scores* S é uma matriz ortogonal de autovetores das linhas da matriz X e a matriz de pesos L é uma matriz ortogonal de coeficientes. (Moita Neto e Moita, 1998 e Ferreira *et al.*, 2007).

Devido à impossibilidade da visualização de todos os dados da matriz S , são utilizados apenas os dados que contêm maior variância, ou seja, os primeiros PC's, gerando gráficos

bidimensionais entre os dados de PC_1 e PC_2 , PC_1 e PC_3 etc. Em um gráfico de *scores* S, de PC_1 *versus* PC_2 , por exemplo, todos os espectros são apresentados no gráfico como pontos em suas coordenadas ao longo de PC_1 e PC_2 (Ferreira *et al.*, 2007).

Antes de aplicar a PCA a dados numéricos, é necessário efetuar um pré-processamento nos dados originais. Os principais tipos de pré-processamento são: Centrado na Média (CM) e Auto-escalado (AE). O pré-processamento CM é convenientemente empregado quando todas as variáveis são medidas na mesma unidade, possuindo a mesma magnitude, como na espectroscopia. Esse tipo de pré-processamento permite que a presença de ruídos não afete negativamente na análise. AE é utilizado quando todas as variáveis apresentam a mesma importância.

No AE, inicialmente se calcula a média de cada conjunto de dados e transferem-se todos os valores para uma nova escala, onde a média se iguala a zero, e depois os dados são novamente normalizados, dividindo-os pela variância do mesmo conjunto de dados. Dessa forma, não se prioriza variáveis que possuam maior magnitude, as quais não distinguem necessariamente os dados, dispondo as variáveis com um mesmo peso.

Para melhor compreensão, a figura 4.26 apresenta uma ilustração dos tipos de pré-processamentos. A figura 4.26(a) contém 10 variáveis (representadas por retângulos) e, como são observados, os retângulos possuem tamanhos muito diferentes. Ao se aplicar o pré-processamento centrado na média, todas as médias são centradas em zero (figura 4.26(b)). Já a figura 4.26(c), representa os dados auto-escalados que possuem média igual a zero e desvio padrão igual a um (Matos *et al.*, 2003).

Figura 4.26 - Exemplo de pré-processamento de dados para 10 variáveis fictícias: (a) dados originais, (b) dados centrados na média (c) dados auto-escalados. As linhas horizontais representam as médias de cada variável (Matos *et al.*, 2003).

Portanto, reiterando a versatilidade, rapidez e potencial da RMN na determinação de sistemas multicomponentes, a eficiência da quimiometria como ferramenta para o estudo desses sistemas complexos e de variáveis altamente correlatas e tendo em vista a relevância do assunto tratado por esse projeto e o seu caráter factível, acredita-se que a utilização desta ferramenta é perfeitamente justificável.

Para facilitar os estudos, empregaram-se somente as médias dos dados de três medidas, assim como nas medidas dos valores de relaxação por métodos multiexponenciais.

4.3.1 Análise dos dados de CPMG por Quimiometria

Inicialmente, analisou-se a influência dos pré-processamentos, auto-escalado (AE) e centrado na média (CM), na análise por HCA e PCA.

A figura 4.27 ilustra os dendrogramas dos dados de CPMG com os pré-processamentos AE (a), e CM (b). Nestes dendrogramas pode-se ver que ambos pré-processamentos possuem o grau de similaridade de cerca de 0,76 e separam as amostras em 5 grupos semelhantes. Isso indica uma similaridade na classificação das sementes, com apenas algumas mudanças de posicionamento nos grupos, que pode ser observada nos gráficos de *scores* dos PCA, onde utilizou-se a classificação do HCA para a classificação.

(a)

(b)

Figura 4.27 - Dendrograma dos dados de CPMG AE (a) e CM (b).

Na figura 4.28(a) está o gráfico de *scores* do PCA, com AE, no qual foram utilizados três componentes principais (PC's), 95,21% da variância acumulativa, sendo 91,18% de PC₁ e 2,91% de PC₂ e na figura 4.28(b), o gráfico de *scores* do PCA, com CM, no qual tamb em foram utilizado três componentes principais, 99,91% da variância acumulativa, sendo 98,05% correspondente de PC₁ e 1,74% de PC₂.

Figura 4.28 - Gráfico de *scores* do PCA de CPMG, CM, com 3 componentes principais com 99,91%, PC₁ 98,05% e PC₂ 1,74% (a) e gráfico de *scores* do PCA de CPMG, AE, com 3 componentes principais com 95,21%, PC₁ 91,18% e PC₂ 2,91% (b).

Assim como em HCA, as diferenças entre os PCA com pré-processamentos AE e CM é pequena em PC₁. Em PC₂ pode-se observar que a diferença de pré-processamentos apresentou uma rotação de 180 graus das amostras. Ou seja, o pré-processamento não interferiu significativamente nos resultados do PCA. Isso pode ser confirmado quantitativamente através do gráfico entre PC₁ AE e PC₁ CM (figura 4.29(a)), com alta correlação, $r = 0,99$, e dos respectivos PC₂ (4.29(b)), com $r = 0,96$.

Figura 4.29 - Gráficos dos dados CPMG entre PC₁ AE *versus* PC₁ CM com $r = 0,99$ (a) e entre os PC₂ AE *versus* PC₂ CM, com $r = -0,96$ (b).

Com os dados de PCA também pode-se fazer uma análise quantitativa dos valores dos PC *versus* os tempos de relaxação e os parâmetros de qualidade do biodiesel, como viscosidade, índice de iodo e número de cetano.

Na figura 4.30(a) está o gráfico dos valores de PC₁ e dos valores de T₂ mono CPMG, que demonstra que essas medidas possuem alto coeficiente de correlação linear ($r = 0,99$), evidenciando que valores de PC₁ têm comportamento similar aos valores de T₂. Já o gráfico de PC₂ e T₂ (figura 4.30(b)) não apresenta nenhuma correlação ($r = 0,04$), e como PC₁ é correlato a T₂ o gráfico de PC₁ *versus* PC₂ (figura 4.28(a)) apresentou um comportamento similar.

Figura 4.30 - PC₁ CPMG AE *versus* T₂ mono CPMG (a), PC₂ CPMG AE *versus* T₂ mono CPMG (b).

Dessa maneira pode-se correlacionar os dendrogramas (figura 4.27(a) e (b)), os gráficos de *scores* (figuras 4.28(a) e (b)) e os valores de T₂, viscosidade, índice de iodo e número de cetano. Assim, as amostras marcadas com mesma cor possuem valores de T₂ (tabela 4.1), composição química e viscosidade (tabela 3.3) semelhantes.

A única vantagem da análise de quimiometria PCA em relação ao uso do valor de T₂ foi a permissão da separação das palmáceas das outras amostras, como pode-ser observado nos círculos pretos da figura 4.28, onde as amostras de côco (12), macaúba (17), pati (23), piaçava (26) e tucumã (31)) apresentam uma tendência de agrupamento, visto que

possuem na composição, principalmente, ácidos graxos saturados com número de carbono entre 8 e 16 (C8 e C16).

4.3.2 Análise dos dados de CWFP por Quimiometria

Assim como nos dados de CPMG, os pré-processamentos CM e AE apresentam resultados similares e, portanto, será apresentado apenas um dos pré-processamentos (AE).

A figura 4.31 ilustra o dendrograma dos dados de CWFP com o pré-processamento auto-escalado (AE), onde são destacados 5 grupos de sementes com grau de similaridade 0,81, e na figura 4.32, gráfico de *scores* do PCA AE, no qual foram utilizados três componentes principais, 99,42% da variância acumulativa, sendo 95,01% de PC₁ e 3,70% de PC₂.

Figura 4.31 - Dendrograma dos dados CWFP AE índice de similaridade 0,81.

Figura 4.32 - Gráfico de *scores* do PCA de CWFP, pré-processamento auto-escalado, com 3 componentes principais com 99,42%, PC₁ 95,01% e PC₂ 3,70%.

Tanto a análise HCA quanto PCA dos dados CWFP (figura 4.31 e 4.32) obtiveram uma boa correlação com os dados CPMG. No caso do PCA essa alta correlação pode ser quantificada no gráfico entre os PC₁ de ambas as técnicas (figura 4.33) com $r = 0,80$.

Figura 4.33 - Gráfico de PC₁ CPMG AE *versus* PC₁ CWFP AE com $r = 0,80$.

De maneira similar a análise dos dados de CPMG, fez-se também a correlação entre os PC₁ e PC₂ dos dados CWFP com os valores de T*. Na figura 4.34(a) está o gráfico de PC₁ *versus* T* e na 4.34(b) o gráfico de PC₂ *versus* T*. Assim, como no caso do CPMG (figura 4.30), o PC₁ possui alta correlação com T* ($r = 0,83$) e o PC₂, uma baixíssima

correlação ($r = 0,26$).

Figura 4.34 - Gráficos entre PC_1 CWFP AE *versus* T^* mono CWFP (a), PC_2 CWFP AE *versus* T^* mono CWFP (b).

É observado que o gráfico de T_2 mono CPMG e T_2 calculado CWFP são correlatos ($r = 0,91$, figura 4.20) e, portanto, é possível concluir que T_2 calculado CWFP é correlato à PC_1 .

No entanto, como o CWFP também permite calcular o valor de T_1 do óleo das amostras, avaliaram-se as correlações tanto com PC_1 quanto PC_2 .

Na figuras 4.35 estão os gráficos de PC_1 *versus* T_1 por CWFP (a) e PC_2 *versus* T_1 por CWFP (b). Nestas figuras pode-se notar que não há correlação entre PC_1 e T_1 ($r = -0,08$) e que T_1 possui alguma correlação ($r = -0,49$) com PC_2 .

Figura 4.35 - Gráfico entre o PC₁ CWFP e T₁ CWFP (a) e entre PC₂ e T₁ (b).

Com esses resultados pode-se concluir que os valores de PC₁ de CWFP estão fortemente correlacionados com T₂ e que PC₂ tem uma fraca correlação negativa com os valores de T₁. Com isso, pode-se dizer que T₁ é o responsável pelas diferenças entre os gráficos de *scores* de PCA dos dados de CPMG e CWFP.

4.3.3 Análises de PC₁ e PC₂ CWFP e as propriedades quantitativas do biodiesel

Como os pré-processamentos CM e AE são semelhantes, foi utilizado somente os dados tratados com o pré-processamento CM. Como visto anteriormente, as palmáceas pertencem a um grupo com características peculiares e portanto foram retiradas dos gráficos para uma análise mais precisa dos dados.

Na figura 4.36 estão os gráficos de PC₁ *versus* μ ($r = -0,41$) (a), CN ($r = -0,34$) (b) e IV ($r = 0,32$) (c). Pode-se observar que as correlações apresentadas por PC₁ CWFP foram menores se comparadas às apresentadas por T₂ (tabela 4.3). Como PC₁ é bastante correlato à T₂ CPMG, conseqüentemente sua correlação com as propriedades do biodiesel também será maior.

(a)

(b)

(c)

Figura 4.36 - Gráficos de PC₁ CWFP *versus*: viscosidade (mm^2s^{-1}) (a), número de cetano (b) e índice de iodo (c).

Na figura 4.37 estão os gráficos de PC₂ *versus* μ (a), IV (b) e CN (c). Nestes gráficos pode-se notar que PC₂ apresentou baixa correlação se comparada com PC₁ (figura 4.36) para μ ($r = 0,26$), mas maiores correlações para CN ($r = 0,54$) e IV ($r = -0,54$).

(a)

(b)

(c)

Figura 4.37 - Gráficos de PC_2 CWFP *versus*: viscosidade (mm^2s^{-1}) (a), índice de iodo (b) e número de cetano (c).

Como nas análises de CPMG, as análises dos dados de CWFP apresentaram maior correlação sem as palmáceas, ou seja, os melhores resultados são obtidos quando o método é aplicado às sementes com composições similares, variando somente o grau de insaturação.

Pode-se também observar que os dados CWFP apresentaram boa correlação com dados CPMG, e as diferenças ocorridas entre as técnicas estão relacionadas ao PC_2 , que apresenta dependência com T_1 , o qual é somente observado no CWFP.

4.4 Análises *on-line*

Como as técnicas CPMG e CWFP são rápidas, cerca de 0,5 s por medida, o tempo gasto em inserir e retirar as amostras do interior do espectrômetro, quando realizado manualmente, é de cerca de alguns minutos, tornando-se o fator limitante da velocidade da análise. Assim, fez-se testes iniciais com o sistema de medidas *on-line*, esteira, desenvolvido na Embrapa Instrumentação Agropecuária. Neste sistema, as amostras são inseridas no porta-amostras separadas por 2 cm ao longo da esteira. Esta esteira é controlada pelo *software* do espectrômetro no modo *stop and flow*. Nesse modo, coloca-se a primeira amostra no interior da bobina, iniciando a aquisição do sinal, CPMG ou CWFP. Após cada medida, o computador envia um sinal para que a esteira desloque 2 cm, ou seja, até a próxima amostra e assim por diante. Com esse sistema, o passo é de cerca de 0,2 s, tornando possível uma análise por segundo aproximadamente. Com esse sistema, fez-se teste confiabilidade do sistema com a análise por CPMG de centenas de amostras de sementes de girassol, o qual demonstrou estabilidade por várias horas de medidas. A figura 4.38 ilustra o resultado da análise de 42 sementes de girassol pela técnica CPMG, o qual foi obtido em 20 segundos aproximadamente. Nesta figura, a intensidade do sinal é proporcional à quantidade de óleo nas sementes e o decaimento ao T_2 e conseqüentemente à qualidade do óleo.

Figura 4.38 - Sinal CPMG de 42 amostras de girassol, obtido no sistema *on-line*.

No entanto, para obter maior eficiência, será necessário usar um sistema automático de inserir e retirar as amostras. Com um sistema automatizado, as análises por RMN em baixa resolução têm potencial de análise de mais de 3000 amostras por hora, o qual torna o tempo de análise compatível com o número de medidas necessárias para um programa de melhoramento genético em larga escala, como necessário para o programa de biodiesel nacional.

5 Conclusões

Devido à grande diferença no tempo relaxação entre os componentes no estado sólido e o óleo, pôde-se usar o sinal de RMN de sementes oleaginosas para determinação da qualidade do óleo vegetal pelas técnicas CPMG e CWFP, independente dos outros constituintes da semente.

Apesar do ajuste biexponencial do sinal CPMG apresentar menor erro do que o ajuste monoexponencial, usou-se somente o ajuste monoexponencial para as correlações com as propriedades do biodiesel, pois tal ajuste possui menor susceptibilidade a ruídos e outras distorções espectrais, e também porque os perfis dos valores de T_2 mono e biexponencial CPMG são semelhantes, assim como os ajustes mono e bi exponencial dos dados de CWFP.

Os valores de T_2 obtidos por ajuste mono exponencial a partir dos dados de CPMG apresentaram alta correlação com a razão M_z/M_0 ($r= 0,93$), T^* ($r= 0,94$) e T_2 calculado ($r= 0,91$), obtidos a partir dos dados CWFP para as 31 amostras analisadas, indicando que podem ser usados de maneira equivalente.

Dentre as amostras analisadas, a semente de mamona apresentou o decaimento mais rápido tanto no sinal CPMG quanto CWFP, pois possui os menores tempos de relaxação T_1 e T_2 , por ser o óleo mais viscoso dentre os óleos vegetais estudados.

As amostras de côco, pati, piaçava e tucumã, originárias de plantas da família das palmáceas, não se agrupam com as outras amostras, pois possuem principalmente ácidos graxos saturados entre C8 e C16. As correlações entre T_2 e T^* , T_2 calculado e viscosidade, índice de iodo e número de cetano sem as palmáceas foram maiores do que com as mesmas,

evidenciando que tal família não se comporta como as outras amostras, devido à grande diferença de composição em ácidos graxos.

Assim, as análises da qualidade de óleo vegetal em sementes intactas devem ser realizadas em amostras com composição química similar, ou seja, mesmo número de carbono (C18) com variação apenas do grau de insaturação.

T_2 apresentou uma correlação inversa com a viscosidade do óleo e número de cetano, ambos com $r \sim -0,63$ e correlação direta com o índice de iodo ($r = 0,64$). Os dados obtidos a partir do sinal CWFP, T^* e M_z/M_0 , também apresentaram correlação similar às observadas para T_2 .

Observou-se também que há um aumento da razão T_1/T_2 , com o aumento da viscosidade, assim, a maior razão pertence à mamona e a menor à abóbora.

As análises dos dados de CPMG e CWFP por PCA e HCA demonstraram que não há diferença significativa entre os pré-processamentos AE e CM. Tanto as análises por HCA quanto PCA dos dados CWFP obtiveram uma boa correlação com os dados CPMG.

Os gráficos entre os valores de T_2 , T^* e T_2 calculado *versus* PC_1 , obtido da análise por PCA, demonstraram uma alta correlação e conseqüentemente uma equivalência entre os dados coletados das duas técnicas de RMN.

PC_2 não apresentou correlação com T_2 CPMG. Nos dados de CWFP, T^* e T_2 calculado obtiveram uma boa correlação entre PC_1 , T_1 e PC_2 . Então, as diferenças ocorridas entre os gráficos de escores de PCA dos dados de CPMG e CWFP estão relacionadas ao PC_2 , que apresenta dependência com T_1 , o qual é somente observado no CWFP.

Mesmo com a composição dos ácidos graxos, utilizada nos cálculos dos parâmetros de qualidade de biodiesel como viscosidade, índice de iodo e número de cetano, não sendo exatamente das amostras analisadas (média de dados da literatura), foi possível notar que houve uma boa correlação tanto com os dados CPMG quanto CWFP.

Com o acoplamento dessas metodologias a um sistema de medidas *on-line*, essas medidas poderão ser obtidas rapidamente (cerca de 1 s por amostra), permitindo a análise

de um grande número de amostras, quantidade necessária para o desenvolvimento de sementes com óleo de alta qualidade. Este desenvolvimento é um dos gargalos para o uso de biodiesel em altas concentrações no diesel, uma das metas do plano nacional de agroenergia.

Referências

- ABREU, F. R. et al. Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of brazilian vegetable oils with different alcohols. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 209, p. 29–33, 2004.
- ALLEN, C. A. W. et al. Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition. **Fuel**, v. 78, p. 1319–1326, 1999.
- ANWAR, F.; BHANGER, M. I. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions of pakistan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6558–6563, 2003.
- ASLAN, M.; ORHAN, I.; ŞENER, B. Comparison of the seed oils of **Pistacia vera** l. of different origins with respect to fatty acids. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 333–335, 2002.
- AZAM, M. M.; WARIS, A.; NAHAR, N. M. Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in india. **Biomass & Bioenergy**, v. 29, p. 293–302, 2005.
- AZEREDO, R. B. V. et al. Continuous wave free precession practical analytical tool for low-resolution nuclear magnetic resonance measurements. **Analytica Chimica Acta**, v. 478, p. 313–320, 2003.
- AZEREDO, R. B. V.; ENGELSBERG, M.; COLNAGO, L. A. Quantitative analysis using steady-state free precession nuclear magnetic resonance. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 11, p. 2401–2415, 2000.
- BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. New York: John Wiley, 1998. p. 1–53.
- BORA, P. S.; MOREIRA, R. V. R. Catolé palm (*Syagrus oleracea* mart) fruits: fatty and amino acids composition. **Grasas y Aceites**, v. 54, n. 2, p. 145–150, 2003.
- BRODNJAK-VONČINA, D.; KODBA, Z. C.; NOVIČ, M. Multivariate data analysis in classification of vegetable oils characterized by the content of fatty acids. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 75, p. 31–43, 2005.
- BRYAN, J.; MOON, D.; KANTZAS, A. In situ viscosity of oil sands using low field NMR. **Journal of Canadian Petroleum Technology**, v. 44, n. 9, p. 23–30, 2005.
- CARR, H. Y. Steady-state free precession in nuclear magnetic resonance. **Physical Review**, v. 112, n. 5, p. 1693–1701, 1958.

CHAHED, T. et al. Pistachio (*Pistacia vera*) seed oil composition: geographic situation and variety effects. **Grasas y Aceites**, v. 59, p. 51–56, 2008.

CLARIDGE, T. D. W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1999. p. 80–120.

COLLIN, G. The kernel-fats of some members of the palmae: *Acrocomia sclerocarpa* mart. (gru-gru palm), *Manicaria saccifera* gaertn., *Astrocaryum Tucuma* mart., *Maximiliana caribaea* griseb., *Attalea excelsa* mart. (pallia palm), and *Cocos nucifera* linn. (coconut). **Biochemical Journal**, v. 27, n. 5, p. 1366–1372, 1933.

COLNAGO, L. A. et al. High-throughput, non-destructive determination of oil content in intact seeds by continuous wave-free precession NMR. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 1271–1274, 2007.

CORRÊA, C. C. **Análise da qualidade de carne bovina por ressonância magnética nuclear em baixa resolução**. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado) — Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

COSTA NETO, P. R. et al. Quantification of soybean oil ethanolysis with ^1H NMR. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 12, p. 1111–1114, 2004.

DAGNE, K.; JONSSON, A. Oil content and fatty acid composition of seeds of *Guizotia* cass. (compositae). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 73, p. 274–278, 1997.

DAIS, P.; SPYROS, A. ^{31}P NMR spectroscopy in the quality control and authentication of extra-virgin olive oil: a review of recent progress. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 367–377, 2007.

DANTAS, M. B. et al. Thermal and kinetic study of corn biodiesel obtained by the methanol and ethanol routes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 835–839, 2007.

DE LIMA, A. et al. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 695–698, 2007.

DIAZ, T. G. et al. Characterization of virgin olive oils according to its triglycerides and sterols composition by chemometric methods. **Food Control**, v. 16, n. 4, p. 339–347, 2004.

DUNN, R.; KNOTHE, G. Alternative diesel fuels from vegetable oils and animal fats. **Journal of Oleo Science**, v. 50, p. 415–426, 2001.

EL-ADAWY, T. A.; TAHA, K. M. Characteristics and composition of watermelon, pumpkin, and paprika seed oils and flours. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1253–1259, 2001.

ERNST, R. R.; ANDERSON, W. A. Application of fourier transform spectroscopy to magnetic resonance. **Review of Scientific Instrumentation**, v. 37, n. 1, p. 93–102, 1966.

- FEDERAL NETWORK FOR SUSTAINABILITY. **Biodiesel technical reference guide**. Disponível em:
<<http://www.federalsustainability.org/initiatives/biodiesel/biodieseltrg.htm>>. Acesso em: Jan 2008.
- FERREIRA, M. C. M. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 1–19, 2007.
- FRANKEL, E. N. **Lipid oxidation**. Dundee: The Oily Press, 1998. p. 1–33.
- FREEMAN, R.; HILL, H. D. W. Phase and intensity anomalies in fourier transform NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 5, p. 376–389, 1971.
- GAMBHIR, P. N. C-13 nmr-spectroscopy of intact oilseeds - a rapid method for measurement fatty-acid composition. **Proceedings of the Indian academy of sciences - Chemical science**, v. 106, n. 7, p. 1583–1594, 1994.
- GHESTI, G. F. et al. FT-Raman spectroscopy quantification of biodiesel in a progressive soybean oil transesterification reaction and its correlation with ^1H NMR spectroscopy methods. **Energy & Fuels**, v. 21, p. 2475–2480, 2007.
- GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987. p. 1–599.
- HAHN, E. L. Spin echoes. **Physical Review**, v. 80, n. 4, p. 580–594, 1950.
- HIANE, P. A. et al. Bocaiúva, acrocomia aculeata (jacq.) lodd., pulp and kernel ools: characterization and fatty acid composition. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 3, p. 256–259, 2005.
- HUTTON, W. C.; GARBOW, J. R.; HAYES, T. R. Nondestructive NMR determination of oil composition in transformed canola seeds. **Lipids**, v. 34, n. 12, p. 1339–1346, 1999.
- JIN, F. et al. NMR spectroscopic study on methanolysis reaction of vegetable oil. **Fuel**, v. 86, n. 7-8, p. 1201–1207, 2006.
- KAIJSER, A.; DUTTA, P.; SAVAGE, G. Oxidative stability and lipid composition of macadamia nuts grown in new zeland. **Food Chemistry**, v. 71, p. 67–70, 2000.
- KALAYASIRI, P.; JEYASHOKE, N.; KRISNANGKURA, K. Survey of seed oils for use as diesel fuels. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, p. 471–474, 1996.
- KAMAL-ELDIN, A.; ANDERSSON, R. A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 4, p. 375–380, 1997.
- KAPILAN, N.; REDDY, R. P. Evaluation of methyl esters of mahua oil (madhuca indica) as diesel fuel. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 2, p. 185–188, 2008.

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

KNOTHE, G. Analysis of oxidized biodiesel by ^1H -NMR and effect of contact area with air. **European Journal of Science and Lipid Technology**, v. 108, p. 493–500, 2006.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059–1070, 2005.

KNOTHE, G. Determining the blend level of mixtures of biodiesel with conventional diesel fuel by fiber optic nir spectroscopy and ^1H NMR spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, p. 1025–1028, 2001.

KNOTHE, G.; DUNN, R. O. **Oleochemical manufacture and applications**. Sheffield: Sheffield Academic Press, 2001. p. 1–106.

KNOTHE, G.; MATHEAUS, A. C.; RYAN III, T. W. Cetane numbers of branched and straight-chain fatty esters determined in an ignition quality tester. **Fuel**, v. 82, p. 971–975, 2002.

KNOTHE, G.; STEIDLEY, K. R. Kinematic viscosity of biodiesel components (fatty acid alkyl esters) and related compounds at low temperatures. **Fuel**, v. 86, p. 2560–2567, 2007.

KNOTHE, G.; STEIDLEY, K. R. Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. **Fuel**, v. 84, p. 1059–1065, 2005.

KURATA, S.; YAMAGUCHI, K.; NAGAI, M. Rapid discrimination of fatty acid composition in fats and oils by electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 21, p. 1457–1465, 2005.

KÜÇÜKÖNER, E.; B, Y. Some chemical characteristics of *Pistacia vera* varieties produced in turkey. **European Food Research and Technology**, v. 217, p. 308–310, 2003.

LEAL, K. Z. et al. Análise imediata do conteúdo oleaginoso de sementes por ressonância magnética nuclear de carbono-13. **Ciência e Cultura**, v. 33, n. 11, p. 1475–1484, 1981.

LIU, Q.; SINGH, S.; GREEN, A. High-oleic and high-stearic cottonseed oils: Nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 205S–211S, 2002.

MATOS, G. D. et al. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. **Revista Analytica**, v. 6, p. 38–50, 2003.

MATTHAUS, B. et al. Fa and tocopherol composition of vietnamese oilseeds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, p. 1013–1020, 2003.

MATTSON, F. H.; VOLPENHEIN, R. A. The specific distribution of fatty acids in the glycerides of vegetable fats. **Journal of the Biological Chemistry**, v. 16, p. 1891–1894, 1961.

MEHER, L.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248–268, 2004.

MEIBOOM, S.; GILL, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. **The Review of Scientific Instruments**, v. 29, n. 8, p. 688–691, 1958.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467–469, 1998.

MONGENSTERN, M. et al. Determination of the kinetics of biodiesel production using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR). **Energy & Fuels**, v. 20, n. 4, p. 1350–1353, 2006.

MOREIRA, A. B. R. et al. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3689–3694, 2007.

NOBEL FOUNDATION. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/>. Acesso em: Jan 2008.

OLUWANIYI, O. O.; IBIYENI, S. A. Efficacy of catalysts in the batch esterification of the fatty acids of *Thevetia peruviana* seed oil. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 7, n. 1, p. 15–17, 2003.

PEDERSEN, H. T.; MUNCK, L.; ENGELSEN, S. B. Low-field ^1H nuclear magnetic resonance and chemometrics combined for simultaneous determination of water, oil, and protein contents in oilseeds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 10, p. 1069–1076, 2000.

PHIPPEN, W. B.; ISBELL, T.; PHIPPEN, M. E. Total seed oil and fatty acid methyl ester contents of cuphea accessions. **Industrial Crops and Products**, v. 24, n. 1, p. 52–59, 2006.

PRATES, C. P. T.; PIEROBON, E. C.; DA COSTA, R. C. a. Formação do mercado de biodiesel no brasil. **Setorial BNDES**, v. 25, p. 39–64, 2007.

PRESTES, R. A. et al. A rapid and automated low resolution NMR method to analyze oil quality in intact oil seeds. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, p. 325–329, 2007.

RAMOS, L. P. et al. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o brasil. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 31, p. 28–37, 2003.

ROBINSON, C. **Genetic modification technology and food: consumer health and safety**. Brussels: ILSI Europe, 2001. p. 1–45.

RODRIGUES, R. **Plano nacional de agroenergia**. Brasília, 2005. p. 1–120.

- RUBEL, G. Simultaneous determination of oil and water contents in different oilseeds by pulsed nuclear magnetic resonance. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 10, p. 1057–1062, 1994.
- RUTLEDGE, D. N. Characterization of water in agro-food products by time domain-NMR. **Food Control**, v. 12, p. 437–445, 2001.
- SCHWENK, A. NMR pulse technique with high sensitivity for slowly relaxing systems. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 5, p. 376–389, 1971.
- SOUZA, A. G. et al. Thermal and kinetic evaluation of cotton oil biodiesel. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 90, n. 3, p. 945–949, 2007.
- SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 4, p. 111–113, 1999.
- TAKEMOTO, E. et al. Composição química da semente e do óleo de baru (*Dipteryx alata* vog.) nativo do município de pirenópolis, estado de goiás. **Revista - Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 113–117, 2001.
- TERSKIKH, V. et al. In vivo ^{13}C NMR metabolite profiling: potential for understanding and assessing conifer seed quality. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 418, p. 2253–2265, 2005.
- UNITED NATIONS CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT. Market Brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species. **Bertholletia excelsa (Brazil nut, Castaña) - Vegetable oil**. 2005
- VENANCIO, T. **Novas aplicações de precessão livre em onda contínua em Ressonância Magnética Nuclear de baixa e alta resolução**. 2006. 151 f. Tese (Doutorado) — Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- VENÂNCIO, T. et al. Fast and simultaneous measurement of longitudinal and transverse NMR relaxation time in a single continuous wave free precession experiment. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 173, p. 34–36, 2005.
- WEIR, A. D. et al. Use of NMR for predicting protein concentration in soybean seeds based on oil measurements. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 2, p. 87–91, 2005.