

Determinação de Ácidos Graxos Livres em Óleos Vegetais por FT-NIR e Calibração Multivariada

Determination of Free Fatty Acids in Vegetable Oils by FT-NIR and Multivariate Calibration

Djéssica Tatiane Raspe

Universidade Estadual de Maringá – UEM, Umuarama, PR
djessicaraspe@hotmail.com

Vitor Augusto dos Santos Garcia

Universidade Estadual de Maringá – UEM, Umuarama, PR
garcia.vitoraugusto@gmail.com

Flávio Augusto Vicente Seixas

Universidade Estadual de Maringá – UEM, Umuarama, PR
seixas_flavio@yahoo.com.br

Camila da Silva

Universidade Estadual de Maringá – UEM, Umuarama, PR
camiladasilva.eq@gmail.com

Resumo: Métodos instrumentais têm sido reportados como alternativas aos métodos convencionais comumente aplicados em análise químicas, dentre os quais a espectrometria no infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) tem superado a técnica convencional fornecendo procedimentos analíticos rápidos, diretos, precisos e não-invasivos. Este trabalho tem como objetivo a aplicação da espectroscopia FT-NIR acoplada à calibração multivariada na determinação do percentual de ácidos graxos livres (AGL) em óleos vegetais. O método analítico desenvolvido utilizou como matriz de calibração misturas de óleo de soja e ácido oléico em proporções de 0,3 a 38,0% (em massa) de ácido oléico. O método de mínimos quadrados parciais (PLS) com espectro derivado (1ª derivada) foi utilizado com sete fatores primários, fornecendo valores de erro médio quadrático de 0,2841 e 0,4613 para as curvas de ca-

Recebido em 12/08/2011 - Aceito em 30/09/2011.

RECEN Guarapuava, Paraná v. 13 n° 1 p. 113-123 jan/jun 2011

libração e predição respectivamente. Dentre as principais aplicações da metodologia desenvolvida está a avaliação do teor de AGL em óleos vegetais com potencialidade na produção de biodiesel.

Palavras-chave: ácidos graxos livres; calibração multivariada; FT-NIR.

Abstract: Instrumental methods have been reported as alternatives to the conventional methods commonly applied in chemical analysis. In this regards the Fourier transform near infrared spectroscopy (FT-NIR) has overtaken the conventional techniques providing rapid, direct, precise and noninvasive analytical procedures. The aim of this work was to apply the FT-NIR spectroscopy coupled with multivariate calibration to determine the percentage of free fatty acids (FFA) in vegetable oils. The developed analytical methodology used as calibration matrix the mixtures of soybean oil and oleic acid at proportions from 0.3 to 38.0% (by weight) of oleic acid. The method of choice for calibration was the partial least squares (PLS) starting from the first derivative spectra and seven primary factors, which provides values of root mean square error of 0.2841 and 0.4613 for the calibration and prediction data, respectively. Among the application of this methodology lies the evaluation of FFA content in vegetable oils aiming at their potential use in bio-diesel production.

Key words: free fatty acids; FT-NIR; multivariate calibration.

1 Introdução

A busca constante por fontes alternativas e renováveis de energia tem se tornado necessária devido à possível escassez de combustíveis fósseis e preocupações de ordem ambiental. Dentro desse contexto, a produção de biocombustíveis a partir de óleos vegetais (biodiesel) tem sido largamente investigada e bem reportada na literatura [1-3]. Trata-se do processamento de uma fonte de energia renovável, com crescente disponibilidade, produção disponível em vários países, uso sustentado e que não provoca danos ao meio ambiente [4].

No cenário nacional, a soja destaca-se como a principal matéria-prima a ser utili-

zada para a produção de biodiesel [5]. No entanto, devido ao fato de se tratar de um substrato com fins alimentícios, a busca por fontes alternativas é foco de interesse. As tendências atuais destacam a potencialidade dos óleos de pinhão manso, palmeira macaúba, caroço do algodão e óleos residuais de frituras como os principais substitutos ao óleo de soja na obtenção de biocombustíveis [5]. Entre as principais características dos substratos citados, podemos destacar o elevado teor de ácidos graxos livres.

Diferentes metodologias analíticas têm sido propostas para a determinação de ácidos graxos livres em óleos vegetais, dentre elas a cromatografia gasosa [6–8], espectrometria de ressonância magnética nuclear [9, 10], espectrometria no infravermelho [11–14], espectrometria no infravermelho próximo [12, 15–18] entre outros. Segundo a AOCS [19], a acidez em óleos vegetais pode ser determinada pela titulação ácido-base, utilizando hidróxido de sódio como titulante e fenolftaleína como indicador, sendo tal método comumente utilizado devido à simplicidade de operação. Entretanto, este método é lento, trabalhoso e carece de precisão. Na determinação desse parâmetro, grandes quantidades de amostras e reagentes são consumidas durante a operação e há muita dificuldade na visualização do ponto de viragem do indicador [18]. A Agência Nacional de Petróleo (ANP) [20] especifica a determinação por técnicas cromatográficas que envolvem etapas complexas de preparo da amostra como a derivatização e custos com padronização interna. Outros métodos são aplicados, envolvendo técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência [21] em que se elimina as etapas de derivatização, no entanto, observa-se o elevado consumo de solventes utilizados como fase móvel e longo tempo de análise. Um método analítico que tem sido capaz de superar tais inconvenientes é a Espectrometria FT-NIR. Essa técnica fornece procedimentos analíticos rápidos, diretos (sem pré-tratamento), reprodutíveis, não-invasivos e, além disso, o custo por análise é relativamente baixo quando comparada às técnicas clássicas de referência [22, 23].

Dentro desse contexto, este trabalho tem por objetivo a aplicação da espectroscopia FT-NIR associada a ferramentas quimiométricas (calibração multivariada) na quantificação de ácidos graxos livres em óleos vegetais visando à utilização desses substratos na produção de biodiesel.

2 Material e métodos

2.1 Material

Para calibração do método analítico foram utilizados óleo de soja comercial (Marca Soya) e ácido oléico (Synth P.A.), ambos sem nenhum tratamento prévio. Na etapa de titulação das amostras foram utilizados: solução de álcool etílico/éter etílico 2:1 (v:v) (Vetec/Nuclear), hidróxido de sódio 0,1 N (Nuclear) e o indicador fenolftaleína (Nuclear).

2.2 Composição do grupo de calibração e validação

Para criação do banco de dados de calibração e validação, nas amostras de óleo de soja foram acrescentados percentuais de ácido oléico em intervalos de concentração de 0,3 a 38% (mg de ácido oléico/100 mg de amostra), totalizando 170 amostras estudadas. Sendo: 114 amostras utilizadas para calibração da metodologia e 56 amostras para validação interna. As concentrações de ácido oléico foram adotadas tendo como referência os teores de AGL em óleos vegetais com potencial para produção de biodiesel [21]. Outras 10 amostras foram preparadas para formação do grupo de calibração externa, com percentual de ácido oléico de 6,0 a 33% (mg de ácido oléico/100 mg de amostra).

Após o preparo das amostras, realizaram-se as análises de titulação ácido-base em triplicata, utilizando como metodologia de referência o método Ca 5a-40 [19], a fim de verificar o percentual de acidez em ácido oléico nas amostras. Determinado o percentual de ácido oléico nas amostras, realizou-se a medida das amostras em espectrofotômetro FT-NIR N200 (Büchi) em triplicata. As medidas foram realizadas em temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, utilizando uma placa de petri de vidro (altura de 1,7 cm e diâmetro de 9 cm), cobrindo uma região espectral de 1000 a 2500 nm.

2.3 Tratamento quimiométrico dos dados

A análise quimiométrica dos dados obtidos foi realizada no Software NIR Cal 4.21, o qual avalia o melhor método quimiométrico para regressão dos dados, bem como o tratamento dos espectros de absorção (quando necessário). Os métodos pro-

postos serão avaliados com base no erro médio quadrático (RMSE), determinado pela equação 1:

$$RMSE = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_p - y_{REF})^2}{N}} \quad (1)$$

onde os termos y_p e y_{REF} denotam o valor previsto e o valor de referência, respectivamente. O erro padrão relativo é designado como RMSEC (%) para a calibração e RMSEP (%) para a validação.

O modelo aprovado refere-se ao que levou ao menor valor possível de RMSE para um conjunto de amostras não utilizadas anteriormente para construí-la, ou seja, o conjunto de validação.

3 Resultados e discussão

O estabelecimento da faixa de calibração do método adotou como critério os valores de acidez reportados na literatura em relação a óleos vegetais, utilizados para produção de biodiesel [5, 20]. A calibração do método foi avaliada considerando a correlação entre o percentual de ácidos graxos livres (AGL) predito pelo FT-NIR e o percentual determinado pelo método de titulação de referência. No tratamento quimiométrico dos dados, avaliou-se o método quimiométrico dos mínimos quadrados parciais (PLS) para a regressão dos dados, para o espectro sem tratamento prévio e espectro com pré-tratamento (1ª e 2ª derivada pelo método de Savitzky-Golay) conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Resultados do tratamento quimiométrico dos dados

	Espectro sem tratamento	1ª Derivada	2ª Derivada
RMSEC	0,5068	0,2841	0,4369
RMSEP	0,5094	0,4613	0,5886

Com base nos valores apresentados (Tabela 1), o método PLS com espectro derivado (1ª derivada), utilizando 7 fatores primários, foi selecionado, pois apresentou os menores valores de RMSE para as etapas de calibração e validação do método analí-

tico proposto. Os espectros de absorção com pré-tratamento (1ª derivada) na região do Infravermelho próximo para as amostras de calibração e validação são apresentados na figura 1.

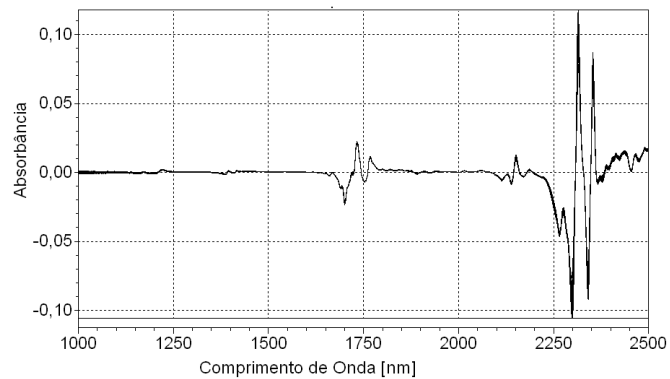


Figura 1. Espectros derivativos das amostras obtidos por FT-NIR após tratamento

A utilização do método PLS no tratamento de dados espectroscópicos na determinação de AGL é reportada na literatura [15, 17, 18]. Rao *et al.* [24] na avaliação do teor de AGL em óleo de amendoim por espectroscopia NIR relatam valores de RMSE para a etapa de calibração e predição da metodologia em 0,308 e 0,333 respectivamente. A correlação entre os resultados obtidos pelo método FT-NIR/PLS e a metodologia de referência para as etapas de calibração e validação interna, é apresentada na figura 2.

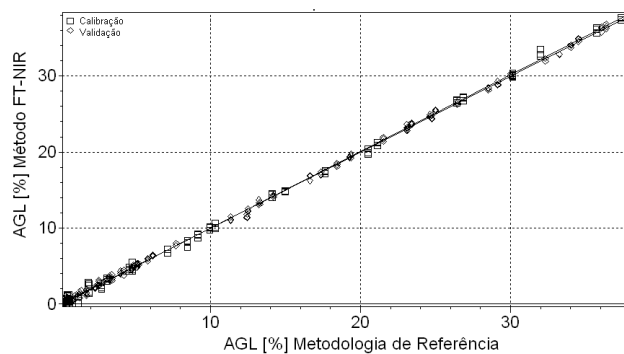


Figura 2. Correlação entre o percentual de AGL predito pelo método FT-NIR e observados pela metodologia de referência

A capacidade de predição da curva de calibração desenvolvida foi testada com um grupo independente de amostras, preparadas em concentrações de ácido oléico diferentes das utilizadas na etapa de calibração e validação interna (Figura 3), denominadas amostras sintéticas.

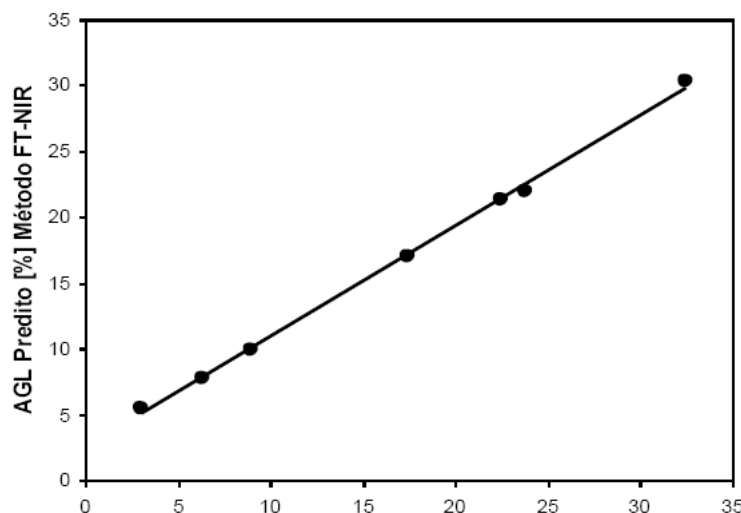


Figura 3. Correlação entre o percentual de AGL predito pelo método FT-NIR e observados pela metodologia de referência

A comparação dos resultados obtidos com a literatura especializada é apresentada na tabela 2. Verifica-se que o método proposto apresenta larga faixa de trabalho, quando comparado a demais trabalhos disponíveis na literatura. Man e Setiowaty [14] utilizaram o método instrumental IR para analisar o conteúdo de AGL em óleo de palma, trinta amostras de padrões de calibração foram preparadas pela adição de ácido oléico à óleo de palma em concentrações de AGL entre 0,08 a 1,04%. A etapa de calibração inclui o método quimiométrico dos mínimos quadrados parciais (PLS) como rotina de calibração. O estudo de Aryee *et al.* [12] apresenta a aplicação na espectroscopia IR para a determinação de AGL em óleo de peixe, os autores relatam a utilização da metodologia aplicada a simples regressão linear, o método proposto apresentou linearidade para a faixa de 0 a 6,5% de acidez. O método instrumental IR é reportado por Yu *et al.* [13] na avaliação do teor de AGL em óleo de canola, com boa correlação ($r > 0,99$) entre a metodologia proposta e de referência para teor de AGL entre 0,4 a 2,0% (em massa).

No que se refere à determinação de AGL por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), Cozzolino *et al.* [15] reportam a aplicação da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) na avaliação de AGL em óleo de peixe.

Tabela 2. Comparação dos resultados obtidos com a literatura

	Faixa do Método % [mg de ácido oléico/100mg de amostra]	Material em Estudo	Método Experimental	Método Quimio- métrico
Este Trabalho	0,2 a 38	Óleo de soja + ácido oléico	FT-NIR	PLS
Aryee <i>et al.</i> [12]	0 a 6,5	Óleo de peixe	FT-IR	–
Yu <i>et al.</i> [13]	0,4 a 2,0	Óleo de canola + ácido hexanóico	IR	–
Man e Setiowaty [14]	0,08 a 1,04	Óleo de palma + ácido oléico	FT-IR	PLS
Cozzolino <i>et al.</i> [15]	0,16 a 1,96	Óleo de Peixe	NIR	PLS
Ng <i>et al.</i> [17]	0,020 a 0,568	Óleos Residuais de Fritura	NIR	PLS

As medidas foram realizadas na faixa de 0,16 a 1,96% de AGL, dessa forma, o método proposto pode ser usado para melhorar a velocidade de relatar os resultados e auxiliar na tomada de decisões de gestão com maior eficiência. A aplicação da espectroscopia NIR e mínimos quadrados parciais (PLS) na determinação de AGL em óleos residuais de fritura é relatada por Ng *et al.* [17]. Os limites de determinação do método para AGL variam entre 0,020% a 0,568%, sendo que os resultados obtidos apresentaram baixos desvios em relação ao método de referência.

4 Conclusões

O estabelecimento de metodologia analítica para determinação de ácidos graxos livres em óleos vegetais foi estudada. Os resultados obtidos demonstram que a utilização da espectroscopia FT-NIR acoplada a calibração multivariada apresentou-se eficiente na determinação de AGL na faixa de 0,2 a 38 (mg de ácido oléico/100 mg de amostra). O método demonstrou ser simples e rápido para o estabelecimento de

acidez em óleos vegetais com potencialidade como matérias-primas para produção de biodiesel. Outra grande vantagem desse método de caracterização é a ampla faixa de utilização do método quando comparado com os trabalhos da literatura. Vislumbra-se como continuidade do presente trabalho, o monitoramento da reação de esterificação de AGL em óleos vegetais, a fim de estabelecer uma ferramenta eficaz para o monitoramento contínuo do rendimento de reações de esterificação, visando a uma avaliação rápida durante o processo de produção de biodiesel.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Projeto Universal 472962/2009-4) pelo suporte financeiro e a Universidade Estadual de Maringá – Campus Regional de Umuarama pela infra-estrutura.

6 Referências

- [1] MA, F.; HANNA, M. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technol*, v. 70, p. 1–15, 1999.
- [2] FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng*, v. 92, p. 405–416, 2001.
- [3] SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. *Renew Sust Energ Rev*, v. 4, p. 111–133, 2000.
- [4] RAMOS, L. P.; KUCEK, K. T.; DOMIGOS, A. K.; WILHEIM, H. M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 31, p. 27–37, 2003.
- [5] PORTAL BIODIESEL BRASIL. Disponível em: www.biodieselbr.com. Acesso em abr/2011.
- [6] LEE, D.; NOH, B.; BAE, S.; KIM, K. Characterization of fatty acids compositions in vegetables oils by gas chromatography and chemometrics. *Anal Chim Acta*, v. 358, p. 163–175, 1998.

- [7] CERT, A.; MOREDA, W.; PEREZ CAMINOS, M. C. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *J Chromatogr A*, v. 881, p. 131–148, 2000.
- [8] GIACOMELLI, L. M.; MATTEA, M.; CEBALLOS, C. D. Analysis and characterization of edible oils by chemometric methods. *J Am Oil Chem Soc*, v. 83, p. 303–308, 2006.
- [9] SACCO, A.; BRESCIA, M. A.; LIUZZI, V.; RENIERO, F.; GUILLOU, G.; GHELLI, S.; VAN DER MEER, P. Characterization of italian olive oils based on analytical and nuclear magnetic resonance determinations. *J Am Oil Chem Soc*, v. 77, p. 619–625, 2000.
- [10] SATYARTHI, J. K.; SRINIVAS, D.; RATNASAMY, P. Estimation of free fatty acid content in oils, fats and biodiesel by ¹HNMR spectroscopy. *Energ Fuel*, v. 23, p. 2273–2277, 2009.
- [11] DAHLBERG, D. B.; LEE, S. M.; WENGER, S. J.; VARGO, J. A. Classification of vegetable oils by FT-IR. *Appl Chemometrics*, v. 51, p. 1118–1124, 1997.
- [12] ARYEE, A.; VAN DE VOORT, F. R.; SIMPSON, B. K. FT-IR determination of free fatty acids in fish oils intended for biodiesel production. *Proc Bioch*, v. 44, p. 401–405, 2009.
- [13] YU, X.; VAN DE VOORT, F. R.; SEDMAN, J. A new direct Fourier transform infrared analysis of free fatty acids in edible oils using spectral reconstitution. *Anal Bioanal Chem*, v. 401, p. 315–324, 2001.
- [14] MAN, Y. B.; SETIOWATY, G. Application of Fourier transform infrared spectroscopy to determine free fatty acid contents in palm olein. *Food Chem*, v. 66, p. 109–114, 1999.
- [15] COZZOLINO, M. D. I.; CHREEB, A.; SCAIFEC, J. R. Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-squares regression and near-infrared spectroscopy. *LWT*, v. 38, p. 821–828, 2005.

- [16] ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Determination of edible oil parameters by near infrared spectrometry. *Anal Chim Acta*, v. 596, p. 330–337, 2007.
- [17] NG, C. L.; WEHLING, R. L.; CUPPETT, S. L. Method for determining frying oil degradation by near-infrared spectroscopy. *J Agric Food Chem*, v. 55, p. 593–597, 2007.
- [18] PEREIRA, A. F. C.; PONTES, M. J. C.; GAMBARRA NETO, F. F.; SANTOS, S. R. B.; GALVÃO, R. K. H.; ARAÚJO, M. C. U. NIR spectrometric determination of quality parameters in vegetable oils using iPLS and variable selection. *Food Res Int*, v. 41, p. 341–348, 2008.
- [19] AOCS (Ca 5a-40) American Oil Chemists' Society. 5^a ed., 1998.
- [20] ANP: Agência Nacional de Petróleo. www.anp.gov.br. Acesso em abr/2011.
- [21] KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J. The Biodiesel Handbook. AOCS Press: Champaign, IL, USA, 2005.
- [22] CEN, H.; HE, Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends Food Sci Tech*, v. 18, p. 72–83, 2007.
- [23] PANCORBO, A. C.; IGLESIAS, N. N.; RODRÍGUEZ, L. C. From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis. *Trend Anal Chem*, v. 28, p. 263–278, 2009.
- [24] RAO, Y.; XIANG, B.; ZHOU, X.; WANG, Z.; XIE, S.; XU, J. Quantitative and qualitative determination of acid value of peanut oil using near-infrared spectrometry. *J Food Eng*, v. 93, p. 249–252, 2009.

