

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

MAGNO RONAN DE OLIVEIRA

**Obtenção de Biodiesel via Catálise Enzimática e
Caracterização Através de Técnicas
Cromatográficas e Espectrometria de
Infravermelho Associada à Calibração Multivariada**

BELO HORIZONTE

2009

UFMG/ICEX/DQ-793^a
D. 461^a

MAGNO RONAN DE OLIVEIRA

**Obtenção de Biodiesel via Catálise Enzimática e Caracterização
Através de Técnicas Cromatográficas e Espectrometria de
Infravermelho Associada à Calibração Multivariada**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Química do Instituto
de Ciências Exatas da Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Química – Química Analítica

BELO HORIZONTE

2009

0482o Oliveira, Magno Ronan
2009 Obtenção de Biodiesel via Catálise Enzimática e
D Caracterização Através de Técnicas Cromatográficas e
Espectrometria de Infravermelho Associada à Calibração
Multivariada . / Magno Ronan de Oliveira. 2009.

XIII; 92 f. : il.

Orientadora: Isabel Cristina Pereira Fortes
Co-orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.

Bibliografia p. 78-87

1. Química analítica - Teses 2. Biodiesel - Teses
3. Lipase - Teses 4. Quimiometria - Teses I. Fortes,
Isabel Cristina Pereira, Orientadora. II. Takahashi,
Jacqueline Aparecida, Co-orientadora III. Título.

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



**"Obtenção de Biodiesel Via Catálise Enzimática e Caracterização Através de
Técnicas Cromatográficas e Espectrometria de Infravermelho Associada à
Calibração Multivariada"**

Magno Ronan de Oliveira

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Profª. Isabel Cristina Pereira Fortes - Orientadora
UFMG


Profª. Jacqueline Aparecida Takahashi - Co-Orientadora
UFMG


Prof. Gecernir Colen
UFMG


Profª. Vânia Márcia Duarte Pasa
UFMG

Belo Horizonte, 14 de dezembro de 2009.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida.

Ao meu pai (in memoriam), minha mãe e aos meus irmãos pelo amor, carinho e incentivos, que me fizeram chegar até aqui.

À Silvéria por todo amor, carinho e incondicional apoio em todos os momentos.

À minha orientadora Isabel Cristina Pereira Fortes pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos e toda paciência dispensada para a realização deste trabalho científico.

À minha co-orientadora Jacqueline Aparecida Takahashi pela disponibilidade e valiosa orientação.

Ao Ravi, parceiro de laboratório, pela valorosa amizade e companheirismo.

À Camila, Itânia, Adriana e Lilian pela amizade, atenção e colaboração indispensável em todos os momentos em que foram solicitadas.

À Milene, Joel e Rosângela pelo auxílio nas análises.

A todos os colegas do Labiomass e do Laboratório de Ensaio de Combustíveis (LEC) pela convivência.

Aos queridos amigos da graduação Thiago, Leonel, Sérgio, Luiz, Márcio, Cleiton, Filipe, Darliane e Fabíola.

Aos professores do Departamento de Química que participaram da minha formação acadêmica.

À CNPq pela bolsa de mestrado concedida e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A liberdade de procurar e dizer a verdade é um elemento essencial da comunicação humana, não só com relação aos fatos e à informação, mas também e especialmente sobre a natureza e destino da pessoa humana, com respeito à sociedade e o bem comum, com respeito à nossa relação com Deus.

Papa João Paulo II

RESUMO

O biodiesel (ésteres alquílicos derivados de ácidos graxos) está se tornando um provável substituto ao diesel graças a algumas características semelhantes como o seu número de cetano e a sua viscosidade. Sua produção convencional é baseada em uma reação de transesterificação ou alcoólise através de catálise química, a qual possuiu uma série de inconvenientes. Uma alternativa para evitar estas desvantagens é a produção enzimática de biodiesel através do uso de lipases microbianas (fungos e bactérias). Esta técnica vem acompanhada das seguintes vantagens: um custo energético menor comparado à catálise química, um processo menos complexo de remoção de catalisador sendo que na catálise química não se pode reutilizar no processo e o tratamentos de resíduos não é demandado. Assim, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo estudar alguns fungos que possuíssem uma boa capacidade de produção de lipases, e que possam ser utilizadas na produção de biodiesel, ou seja, na produção de ésteres alquílicos derivados de ácidos graxos. A partir da coleção de fungos do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (LaBB), foram selecionados sete fungos (*Mucor plumbeus*, *Penicillium citrinum*, *Syncephalastrum racemosum*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium janthinellum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus níger*) visando a avaliação destes como produtores de lipase. Desta forma, estes fungos foram adicionados em uma matriz contendo óleo de soja pura e álcool (MeOH:ButOH(1:1)) e submetidos a condições reacionais (temperatura, agitação e etc.). O produto obtido foi monitorado por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE), espectrometria de infravermelho (ATR-FTIR) e quantificado por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC). Os dados espectrais do infravermelho foram tratados por ferramentas de calibração multivariada. Dentre os fungos pesquisados o *Syncephalastrum racemosum* mostrou-se um fungo com grande potencial para ser utilizado para este fim.

Palavras-chave: Biodiesel, fungos, lipase, quimiometria, CG, CLAE.

ABSTRACT

Biodiesel (alkyl esters derived from fatty acids) is becoming a likely substitute for diesel due to similar characteristics, such as, its cetane number and viscosity. Its standard production is based on a transesterification reaction or alcoholysis by chemical catalysis, which leads to a number of drawbacks. An alternative to overcome these disadvantages is the enzymatic production of biodiesel by lipase-producing microorganisms (fungi and bacteria). This technique provides the following benefits: a lower energy cost compared to chemical catalysis, a less complex process of catalyst removal compared to the chemical catalysis which cannot be reused in the process, and waste treatment is not required. This work was carried out with the objective of studying some fungi that display a good potential as producers of lipases, which can be used to produce biodiesel, i.e. the production of alkyl esters derived from fatty acids. The fungi were acquired from the collection of fungi of the Biotechnology Laboratory and Bioassays (LABB), seven fungi were selected (*Mucor plumbeus*, *Penicillium citrinum*, *Syncephalastrum racemosum*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium janthinellum*, *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger*) in order to assess them as producers of lipase. Thus, these fungi were added to an array containing pure soybean oil and alcohol (MeOH: ButOH (1:1)) then subjected to reaction conditions (temperature, agitation, etc.). The product was monitored with high resolution liquid chromatography (HPLC), infrared spectrometry (ATR-FTIR) and quantified with gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). The infrared spectral data were processed by multivariate calibration tools. Among the studied fungi, the *Syncephalastrum racemosum* displayed great potential to be used for this purpose.

Keywords: Biodiesel, fungi, lipase, chemometrics, GC, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Reação de Transesterificação.....	2
Figura 2.1 – Ácidos Graxos presentes no óleo de soja: a) ácido hexadecanóico (palmítico), b) ácido octadecanóico (esteárico), c) ácido (Z)-9-octadecenóico (oléico), d) ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienóico (linoléico) e e) ácido (Z, Z, Z)-9,12,15-octadecatrienóico (linolênico).....	8
Figura 2.2 – Evolução da quimiometria nos últimos 10 anos. Fonte: http://www.sciencedirect.com , usando a palavra-chave “chemometrics”. Acesso em 28/11/2009.	16
Figura 2.3 – Matriz de dados gerada a partir de um espectro de Infravermelho.	17
Figura 3.1 – Desenho esquemático da Câmara de Neubauer utilizada para determinação da concentração de esporos para preparo do inóculo.....	31
Figura 4.1 – Espectros de ATR-FTIR de amostras de óleo de soja puro e biodiesel de soja.....	32
Figura 4.2 – Espectros de ATR-FTIR utilizados na calibração e validação do modelo. .	34
Figura 4.3 – Relação entre RMSECV e variável latente. a) modelo 1, b) modelo 2, c) modelo 3, d) modelo 4.....	36
Figura 4.4 – Valores preditos pela validação cruzada pelo modelo 1	39
Figura 4.5 – Valores preditos pela validação cruzada pelo modelo 2	40
Figura 4.6 – Valores preditos pela validação cruzada pelo modelo 3.	41
Figura 4.7 – Valores preditos pela validação cruzada pelo modelo 4	42
Figura 4.8 – Gráfico dos resíduos versus valores de referência. a) modelo 1, b) modelo 2, c) modelo 3, d) modelo 4.....	43
Figura 4.9 – Predição de teores de ésteres nos controles pelo método 1 (Pré-processamento OSC e CM)	44

- Figura 4.10 – Concentração de ésteres formados em função do tempo de reação a) *Mucor plumbeus*, b) *Penicillium citrinum* e c) *Syncephalastrum racemosum*.....47
- Figura 4.11 – Concentração de ésteres formados em função do tempo de reação a) *Rhizopus oryzae*, b) *Penicillium janthinellum* e c) *Rhizopus stolonifer*.....48
- Figura 4.12 – Concentração de ésteres formados em função do tempo de reação para o fungo *Aspergillus Níger*49
- Figura 4.13 – Pesos dos comprimentos de onda no modelo 1.....49
- Figura 4.14 – Gráficos relacionando o a) erro RMSECV com o numero de variáveis latentes, b) os teores preditos e medidos e c) os resíduos da curva de calibração51
- Figura 4.15 – Cromatogramas das amostras de a) biodiesel de soja, b) óleo de soja e c) controle (60 h).56
- Figura 4.16 – Cromatogramas obtidos por HPLC das amostras retiradas no tempo de 60 horas de reação. a) *Mucor plumbeus*, b) *Penicillium citrinum*, c) *Penicillium janthinellum*, d) *Rhizopus stolonifer*, e) *Aspergillus niger*, f) *Rhizopus oryzae* e g) *Syncephalastrum racemosum*.....57
- Figura 4.17 – Cromatogramas obtidos por HPLC das alíquotas retiradas no tempo de a) 12 h, b) 24 h, c) 36 h, d) 96 h, e) 108 h, f) 120 h para o fungo *Syncephalastrum racemosum*.....58
- Figura 4.18 – Cromatogramas obtidos por HPLC das alíquotas retiradas no tempo de a) 12 h, b) 24 h, c) 36 h, d) 96 h, e) 108 h, f) 120 h para o fungo *Rhizopus oryzae*.59
- Figura 4.19 – TIC da alíquota retirada no tempo de reação de 60h. **1**- hexadecanoato de metila; **2**- octadecanoato de metila; **3**- (Z)-9-octadecenoato de metila; **4**- (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metila; **5**- (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoato de metila; **6**- hexadecanoato de t-butila; **7**- octadecanoato de t-butila; **8**- (Z)-9-octadecenoato de t-butila; **9**- (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de t-butila; **10**- (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoato de t-butila.....61
- Figura 4.20 – Exemplo de mecanismo de fragmentação de ésteres metílicos saturados de formação do íon molecular e pico base.....63
- Figura 4.21 – Estruturas de ressonância do íon m/z 74.....64
- Figura 4.22 – Mecanismos de fragmentação do (Z)-9-octadecenoato de metila.....64

Figura 4.23 – Mecanismo de fragmentação do (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metila (C18:2).	65
Figura 4.24 - Proposta de formação dos íons m/z 236, 108, 95, 79 (íon ciclohexadienila) do (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoato de metila.	66
Figura 4.25 – log k' versus número de carbono para as séries homólogas de ésteres metílicos saturados e ésteres butílicos saturados	68
Figura 4.26 – Índice de retenção versus número de insaturações das moléculas C18:0, C18:1 e C18:2.	69
Figura 4.27 – Determinação da concentração de ésteres alquílicos das alíquotas do fungo <i>S. racemosum</i> analisadas por CG-FID.....	71
Figura 4.28 – Gráfico de pareto referente ao planejamento experimental para o fungo <i>S. racemosum</i>	72
Figura 4.29 – a) Superfície de resposta da % de conversão dos ésteres alquílicos a partir de óleo de soja e lipase de <i>S. racemosum</i> e b) Projeção da % de conversão em função das variáveis tempo e relação molar álcool/óleo de soja.....	73
Figura 4.30 - Gráfico dos valores observados versus valores preditos	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Algumas propriedades físicas e químicas do biodiesel de soja e do diesel.	7
Tabela 2.2 – Composição do óleo de soja em ácidos graxos	7
Tabela 3.1 – Concentração do biodiesel nas misturas binárias usadas como soluções padrão utilizadas na curva analítica	25
Tabela 3.2 – Ensaio realizado no planejamento experimental para avaliação do biodiesel produzido a partir de <i>S. racemosum</i>	30
Tabela 4.1 - Atribuição das bandas da região do infravermelho do óleo de soja e do biodiesel de soja.....	33
Tabela 4.2 – Valores dos parâmetros da calibração/validação (PLS) para determinação do conteúdo (%) de ésteres para os modelos estudados.	35
Tabela 4.3 – Teste <i>F</i> para comparação dos modelos de previsão dos teores de ésteres.	37
Tabela 4.4 – Valores preditos para as amostras de calibração e validação.....	38
Tabela 4.5 - Predição das amostras do controle 1 e 2	44
Tabela 4.6 – Valores preditos de teores de ésteres referentes ao modelo 1.	46
Tabela 4.7 – Valores dos parâmetros da calibração/validação (PLS) para determinação do conteúdo (%) de ésteres metílicos para o modelo 1 nas regiões entre 1762,81 e 1720,38 cm ⁻¹ , 1444,58 e 1427,22 cm ⁻¹ , 1215,10 e 1051,13 cm ⁻¹	50
Tabela 4.8 – Valores preditos para as amostras de calibração e validação.....	52
Tabela 4.9 – Valores preditos para as amostras de validação.	53
Tabela 4.10. Determinação do teor de ésteres alquílicos das amostras do controle 1 e 2	53

Tabela 4.11 - Valores preditos de teores de ésteres alquílicos referentes ao modelo 1.	54
Tabela 4.12 – Dados do conjunto de ésteres alquílicos encontrados via CG-FID.....	62
Tabela 4.13 - Cálculo dos parâmetros cromatográficos: tempo ajustado (t') e fator capacidade (k').....	67
Tabela 4.14 – Índice de retenção dos ésteres octadecanoato de metila; (Z)-9-octadecenoato de metila; (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metila; octadecanoato de t-butila; (Z)-9-octadecenoato de t-butila; (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de t-butila.....	69
Tabela 4.15 – Quantificação dos ésteres sintetizados na reação com o fungo <i>Syncephalastrum racemosum</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL – Acilglicerol

ANP – Agência Nacional do Petróleo

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionization

ASTM – American Society for Testing and Materials

ATR – FTIR – Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier por Atenuação de Reflectância Total (*Attenued Total Reflectance – Fourier Transformer Infrared Spectrometry*)

B100 – Biodiesel puro

BX – Diesel com concentração X de biodiesel

CM – Centrado na média

CNPE - Conselho Nacional de Política Energética

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento

DGs – Diacilgliceróis

DOU – Diário Oficial da União

IE – Impacto Eletrônico

FAB – MS – MS – Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry

Fapemig – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FID – Detector de Ionização de Chama

CG – DIC - Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (*Gas Chromatography Flame Ionization Detector*)

CG – EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*)

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC – UV – *High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Visible detector*

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology

LaBB – Laboratório de Bioensaios e Biotecnologia

IC – Ionização Química

ESY- modo de ionização eletrospray

LV – Latent Variable

MGs – Monoacilgliceróis

OSC – Correção de Sinal Ortogonal (*Orthogonal Signal Correction*)

PLS – Partial Least Square

R^2 – Coeficiente de Correlação

R^2 – Coeficiente de Determinação

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMSEC – Root Mean Square Error of Calibration

RMSECV – Root Mean Square Error of Cross-Validation

RMSEP – Root Mean Square Error of Prediction

RPD – Residual Predictive Deviation

SDV - Standard Desviation of Validation

SPF – Solid Phase Fluorescence

TGs – Triacilgliceróis

TSI – Ionização por Termospray (Thermospray Ionization)

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de tabelas	viii
Lista de Abreviaturas.....	x
1. Introdução	2
1.1 Objetivos.....	3
1.2 Estrutura da tese	4
2. Revisão da Literatura	6
2.1 Biodiesel	6
2.2 Rotas de produção de Biodiesel.	10
2.3 Catálise enzimática.....	11
2.4 Quimiometria	15
2.4.1 Calibração Multivariada	17
2.5 Caracterização do biodiesel através de técnicas analíticas.....	19
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	23
3.1 Reagentes e solventes	23

3.2 Triagem de espécies de fungos produtoras de lipase.....	23
3.3 Preparo das soluções padrão utilizadas para construção da curva analítica.....	24
3.4 Técnicas analíticas	25
3.4.1 Espectrometria de infravermelho (ATR – FTIR).....	25
3.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC).....	26
3.4.3 Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chama.....	26
3.4.4 Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas(CG/EM)	27
3.5 Calibração e Validação dos modelos.....	28
3.6 Planejamento experimental	30
4. Resultados e discussão.....	32
4.1. Espectrometria de Infravermelho ATR-FTIR.....	32
4.2. Calibração e validação dos modelos	34
4.2.1 – Predição das amostras pela calibração PLS	44
4.2.2. Avaliação da Calibração e validação para o modelo 1 a partir das regiões de maiores pesos do modelo 1	49
4.2.2 – Predição das amostras dos fungos <i>S. racemosum</i> e <i>R. oryzae</i> pelo modelo com seleção de variáveis	53
4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC).....	55
4.4. CG/EM.....	61
4.5. Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização por Chama (CG-FID).....	70
4.6. Planejamento experimental	72
5. Conclusões.....	76
5.1. Propostas Futuras	77
6. Referências Bibliográficas.....	79
Anexo A.....	88
Anexo B.....	91

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, é crescente o interesse na produção de combustíveis renováveis tais como biodiesel, hidrogênio e bioetanol face à grande dependência de combustíveis fósseis no mundo. Estes combustíveis têm de fato, grande importância neste contexto devido às suas características ambientalmente interessantes, especialmente no que diz respeito à sua baixa toxicidade, fácil degradação e redução da emissão dos gases nocivos como CO₂, CO, SO_x e de matéria particulada (RAMADHAS *et al.*, 2004; SUBRAMANIAN *et al.*, 2005). A redução de gases como o CO₂ está relacionada ao ciclo fechado do carbono, ou seja, a planta utilizada como matéria-prima absorve o CO₂ da atmosfera e o libera após o processo de combustão nos motores.

O biodiesel (ésteres alquílicos derivados de ácidos graxos) está se tornando um provável substituto ao diesel graças a algumas características semelhantes como o seu número de cetano e a sua viscosidade. Sua produção convencional é baseada em uma reação de transesterificação (Figura 1.1) ou alcoólise através de catálise química. Embora se tenha altas conversões utilizando este processo, observam-se desvantagens que limitam a produtividade: formação de sabão, a necessidade da ausência de água, problemas para retirada do catalisador e excesso de álcool, problemas na recuperação do glicerol e alto gasto energético.

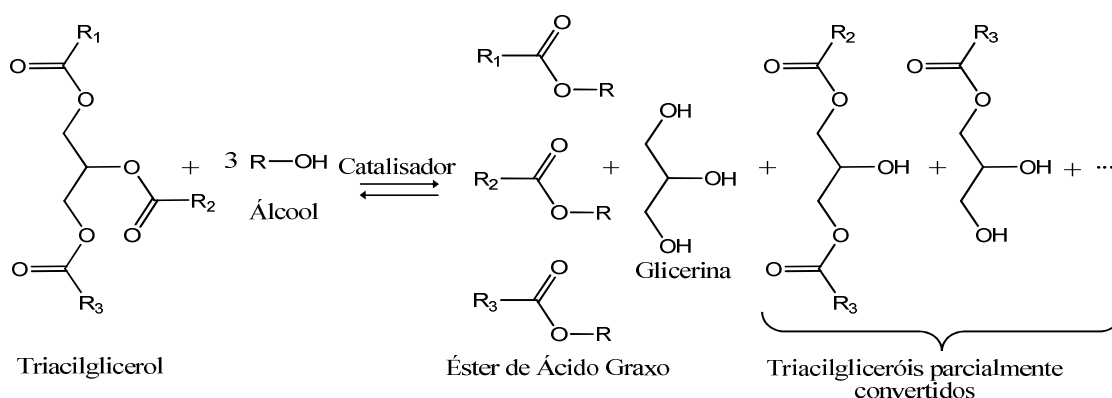


Figura 1.1 – Reação de Transesterificação.

Uma alternativa para evitar estas desvantagens é a produção enzimática de biodiesel com o emprego de lipases microbianas (fungos e bactérias). Este método vem acompanhado das seguintes vantagens: um custo energético menor comparado à catálise química, um processo menos complexo de remoção de catalisador sendo que na catálise química não se pode reutilizar no processo e o tratamento de resíduos não é demandado.

É, portanto, consensual que a produção de biodiesel por rota enzimática é de interesse comercial e que os problemas inerentes a este processo têm sido resolvidos com grande êxito. Porém, o custo das lipases é alto e, para países como o Brasil, detentores de enorme biodiversidade, uma solução adequada para este problema seria a busca de microrganismos produtores de lipases. A otimização da produção dessas enzimas permitiria a obtenção de um produto de menor custo (atualmente as lipases são importadas) que seriam, então, usadas na obtenção do biodiesel.

1.1 Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo a busca por fungos produtores de lipases que possam ser utilizadas na produção de biodiesel, ou seja, na produção de ésteres alquílicos derivados de ácidos graxos e o desenvolvimento de uma metodologia analítica para quantificação de ésteres via FTIR associada à calibração multivariada. Assim, a partir da coleção de fungos do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (LaBB) do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, foram selecionados sete fungos (*Mucor plumbeus*, *Penicillium citrinum*, *Syncephalastrum racemosum*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium janthinellum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus níger*) visando a avaliação destes como produtores de lipase. Assim, estes fungos foram adicionados em uma matriz contendo óleo de soja puro e álcool (MeOH:ButOH (1:1)) e submetidos a condições reacionais (temperatura, agitação e etc.). O produto obtido foi monitorado por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE), espectrometria de infravermelho (ATR_FTIR) e quantificado por cromatografia

gasosa com detector de ionização de chama (CG_DIC). Os dados espectrais do infravermelho foram tratados por ferramentas de calibração multivariada.

1.2 Estrutura da tese

Após essa introdução, uma revisão da literatura sobre os principais assuntos tratados é apresentada no Capítulo 2 e no Capítulo 3 são descritos os materiais e métodos empregados nos experimentos. Informações adicionais sobre os experimentos realizados e a discussão dos resultados obtidos foram apresentadas nos Capítulos 4. O Capítulo 5 é dedicado às conclusões finais e sugere alguns estudos para desenvolvimento futuro. As referências bibliográficas são listadas no Capítulo 6.

Capítulo 2

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biodiesel

Combustíveis renováveis e alternativos para motores a diesel tais como produtos derivados de biomassa têm recebido uma atenção crescente devido à diminuição das reservas de petróleo e dos problemas ambientais gerados pelos gases de exaustão dos motores que usam combustíveis fósseis (FUKUDA *et al.*, 2001; SUBRAMANIAN *et al.*, 2005). Eles promovem eficiência no uso de energia, reduzem a emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa e outras emissões prejudiciais. Além disso, a dependência de importações de óleo é reduzida e a flutuação dos preços de energia no mercado internacional poderá ser enfrentada com a substituição parcial, de parte desta demanda, por combustíveis subsidiados, oriundos de fontes renováveis (SUBRAMANIAN *et al.*, 2005).

Biodiesel*, biocombustíveis e bio-óleos são materiais de origem biológica, tais como óleos vegetais, óleos de fritura reciclados, gordura animal e resíduos de plantas e florestas.

Estes produtos são combustíveis que podem ser misturados com os destilados de petróleo para serem usados nos motores de ciclo Diesel, aquecimento interno e processos industriais para ajudar a compensar a demanda de energia crescente. O biodiesel possui propriedades semelhantes às do diesel (Tabela 2.1), mas essencialmente não contém componentes indesejáveis tais como, o enxofre, o nitrogênio e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

O biodiesel é, na maioria dos casos, um derivado originado da transesterificação de óleo vegetal puro, tais como, soja, canola, algodão e muitos outros, podendo ser produzido também a partir de sebo bovino e óleo residual (Medina *et al.*, 2009).

* Pronunciada pela primeira vez nos Estados Unidos em 1992 pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento de Soja e Diesel - atualmente Conselho Nacional de Biodiesel (VYAS *et al.*, 2010),

Tabela 2.1 – Algumas propriedades físicas e químicas do biodiesel de soja e do diesel.

Propriedades	Biodiesel	Diesel
Viscosidade cinemática (mm ² /s)	4,5 (37,8 °C)	12 – 3,5 (40 °C)
Número de cetano	45	51
Densidade (g/L)	0,885	0,830 – 0,840 (15 °C)
Poder calorífico (MJ/L)	33,5	35,5

Adaptado de Fukuda *et al.*, 2001

O Biodiesel é composto basicamente de ésteres de uma mistura de ésteres derivados de ácidos graxos com cadeias de hidrocarbonetos que podem variar de C₁₄ a C₂₄ (KLASS, 1998 & RAMADHAS *et al.*, 2004). Estudos mostram que o uso deste combustível puro ou misturado ao petrodiesel promove uma grande redução nos níveis de emissão dos principais poluentes (monóxido de carbono, hidrocarbonetos, compostos sulfurados, material particulado, entre outros) (LEE *et al.*, 2004).

A principal fonte oleaginosa utilizada na produção de biodiesel no Brasil é o óleo de soja (ANTCZAK *et al.*, 2009). A Tabela 2.2 apresenta a composição do óleo de soja em ácidos graxos. A Figura 2.1 mostra as estruturas de alguns destes ácidos graxos.

Tabela 2.2 – Composição do óleo de soja em ácidos graxos

Ácido Graxo	Nomenclatura	Composição (g/100g)
C < 14	-	< 0,1
C 14:0	Mirístico	< 0,5
C 16:0	Palmítico	7,0 - 14,0
C 16:1	Palmitoléico	< 0,5
C 18:0	Estearico	1,4 - 5,5
C 18:1	Oléico	19,0 - 30,0
C 18:2	Linoléico	44,0 - 62,0
C 18:3	Linolênico	4,0 - 11,0
C 20:0	Araquídico	< 1,0
C 20:1	Eicosenóico	< 1,0
C 22:1	Behênico	< 0,1

Valores de referência: RDC Nº482, de 23/09/1999, da Agência Nacional da Vigilância Sanitária - ANVISA.

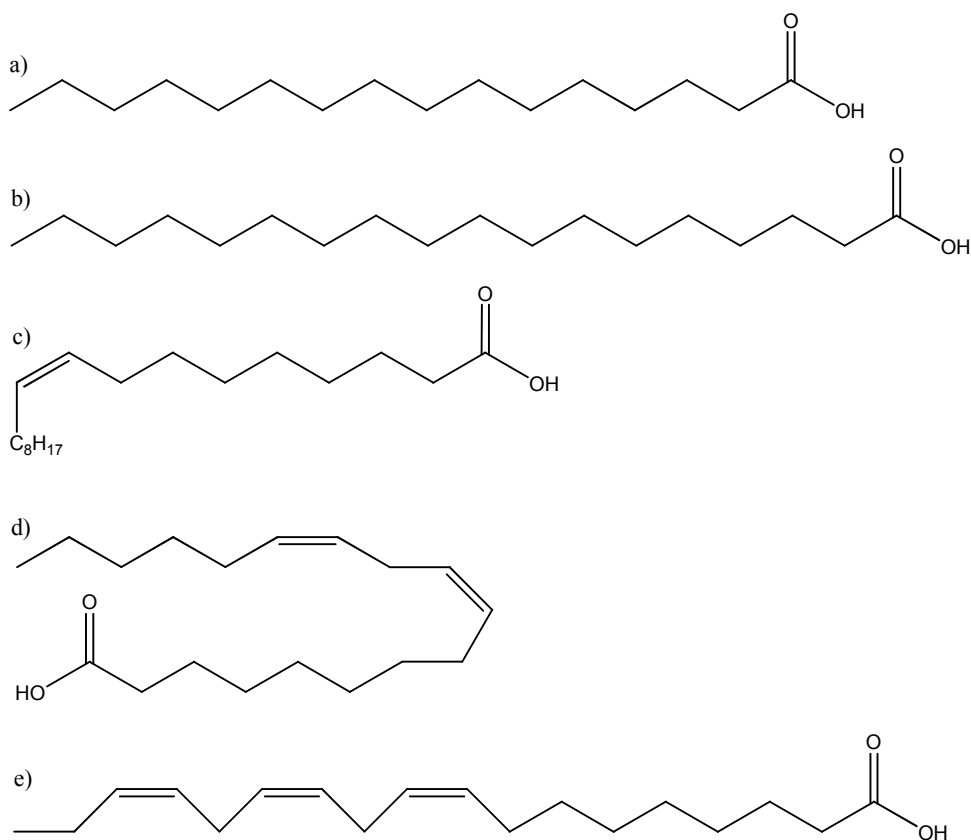


Figura 2.1 – Ácidos Graxos presentes no óleo de soja: a) ácido hexadecanóico (palmítico), b) ácido octadecanóico (esteárico), c) ácido (Z)-9-octadecenóico (oléico), d) ácido (Z,Z)-9,12-octadecadienóico (linoléico) e e) ácido (Z, Z, Z)-9,12,15-octadecatrienóico (linolênico).

Para a utilização de biodiesel é necessário que o produto seja 100% puro, ou seja, que siga as especificações da ANP (*vide anexo A*) para assegurar seu desempenho tanto como estoque para ser misturado ao diesel, como para ser usado diretamente nos motores. O biodiesel puro é denominado B100 e as suas misturas com diesel são referidas como BX.

Se estas energias renováveis puderem ser usadas como tem sido os combustíveis derivados do petróleo, sem nenhuma ou com pequenas modificações no motor, muitos benefícios poderão ser conseguidos com relação aos custos de energia, economia agrícola regional, redução de emissão e extensão da vida útil do motor. Por tudo isso, os combustíveis alternativos derivados de biomassa e as aplicações do biodiesel ganharam reconhecimento crescente e apoio das agências reguladoras e

setores industriais, especialmente para equipamento com máquinas de ignição de compressão tais como, veículos de transporte (ônibus, caminhões e etc.) e equipamentos industriais (ANP, 2009; ANP Portaria nº 309). Com relação ao biodiesel é também observado um balanço energético muito mais positivo quando comparado ao etanol, que é outro produto de fonte alternativa (ANP, Portaria nº 274, 2001)

Por outro lado, o biodiesel apresenta alguns problemas e desafios que devem ser superados. O maior desafio técnico deste combustível é o seu baixo desempenho a baixas temperaturas. O biodiesel tem temperaturas de ponto de congelamento mais altas do que os combustíveis derivados de petróleo, o que pode apresentar problemas de fluxo a frio devido ao congelamento do combustível. Outro problema é a estabilidade termoxidativa deste combustível, o que causa problemas em seu armazenamento que também é um tema em investigação. Além disso, o biodiesel pode apresentar incompatibilidade com algumas partes internas do motor de combustão. O preço e disponibilidade de biodiesel também representam um papel importante na aceitação de consumidor. Nos últimos quatro leilões da ANP, o biodiesel foi comercializado na média de R\$ 2800,00/m³ (ANP, 2009).

No momento, os dados que mostram a potencialidade do uso de biodiesel em motores não veiculares, particularmente em aquecedores de ambiente e água e em processos industriais, onde benefícios energéticos e ambientais significativos existem tem sido limitados. Para a indústria de óleo, o uso completo ou parcial de biocombustíveis oferecerá benefícios imediatos com relação à emissão de gases. Por tudo exposto acima, conclui-se que é necessária mais pesquisa nesta área para prover maiores e novas informações no sentido de se solucionar os problemas apresentados bem como esclarecer os benefícios do seu uso e do seu desempenho com relação à combustão e emissão deste combustível em diferentes tipos de motores.

De acordo com a Resolução 2/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), publicada no Diário Oficial da União (DOU) em 19 de março de 2008, desde 1º de julho de 2009, o Brasil está comercializando óleo diesel contendo 4% v/v de biodiesel (Resolução ANP nº 7, 2009). Esta medida visa tanto à redução da emissão de gases como também aquecer a economia agrícola regional no país. Com este novo cenário, torna-se importante obter maiores informações com relação às

dificuldades técnicas da utilização do biodiesel, tais como, desenvolver testes de qualidades mais acessíveis, desenvolver uma tecnologia que venha recuperar o glicerol obtido como subproduto a custos reduzidos, desenvolver aditivos que melhorem as propriedades a frio deste combustível e previnam a oxidação deste quando armazenado, dentre outros.

2.2 Rotas de produção de Biodiesel.

Muitos trabalhos sobre o biodiesel têm sido desenvolvidos em todo o mundo, em sua maioria, usando os processos convencionais de produção de biodiesel, que utilizam catálise básica ou ácida e diversas matérias primas tais como, soja (FERRARI *et al.*, 2005), canola (ALBUQUERQUE, 2006), algodão (JOSHI *et al.*, 2008), mamona (SILVA *et al.*, 2006), sebo bovino e óleo residual (SAIFUDDIN; CHUA, 2004) dentre outros. O problema destes métodos é que eles são demorados e, no caso da catálise básica, dependem de valores altos de temperatura e pressão. A reação é inicialmente lento devido à natureza do sistema bifásico metanol/óleo e demora ainda mais devido ao problema de polaridade (SHWAB *et al.*, 1987). Além disso, no final do processo há a necessidade de se separar o produto saponificado do catalisador e purificar o material. Outras rotas sintéticas têm sido estudadas com alternativas para esta rota clássica tais como mistura de óleos vegetais com diesel (Rakopoulos *et al.*, 2006), microemulsão (GOERING; FRY, 1984), craqueamento térmico (Pirólise) (WEILL *et al.*, 1992) e aplicação de óxidos metálicos utilizando fluido supercrítico, além da transesterificação por biocatalisadores (lipase) (ZENG *et al.*, 2006).

Esta última rota é a que será abordada neste trabalho. Neste processo de obtenção de biodiesel a conversão de óleos vegetais a ésteres metílicos e outros de cadeia pequena pode ser catalisada em uma única reação de transesterificação usando lipases em solventes orgânicos. Entretanto, a produção em escala industrial tem até então sido pouco utilizada devido ao alto custo do biocatalisador apropriado (RANGANATHAN *et al.*, 2007).

2.3 Catálise enzimática

Uma boa alternativa a ser estudada para obtenção de biodiesel é a transesterificação por biocatalisadores (lipases). Segundo o comitê de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (do inglês International Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB) as lipases (EC 3.1.1.3 – 3. Hidrolase, 1. atuam em ligações de ésteres; 1. ésteres carboxílicos; 3 lipase de triacilglicerol) são enzimas classificadas como hidrolases e atuam principalmente na transformação de triacilgliceróis em monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol (Villeneuve, et al., 2000).

Embora a produção do biodiesel por via química já esteja comprovada, existem problemas a ela associados, tais como a recuperação da glicerina e a necessidade do uso de óleos e ou gorduras refinados como matéria prima de origem (KRAMER, 1995). As desvantagens de se utilizar catalisadores químicos podem ser superadas pelo emprego da lipase como biocatalisador para a síntese de ésteres (HAAS *et al.*, 2002). Duas estratégias foram apresentadas recentemente para solucionar este problema. Iso *et al.* (2001) mostrou que a imobilização da lipase *P. fluorescens* aumenta sua estabilidade mesmo após ser reutilizada. Matsumoto *et al.* (2001) construiu uma célula catalítica por meio intracelular utilizando a lipase de *Rhizopus oryzae* que catalisa a metanólise em um sistema livre de solvente.

As vantagens da catálise lipásica sobre a catálise química para a produção de ésteres alquílicos simples incluem: a habilidade de esterificar o ácido graxo presente tanto na forma de acilgliceróis como na forma livre em uma única etapa; a produção de uma fração glicerínica com teor mínimo de água e pouco ou nenhum material inorgânico contaminante; e a possibilidade de reciclagem do catalisador. Os gargalos para o uso de catálise enzimática incluem o alto custo das lipases em comparação com os catalisadores inorgânicos (na ausência de esquemas efetivos para a reciclagem das enzimas) e a inativação das lipases por contaminação da matéria-prima e por álcoois polares de baixa massa molar.

Os primeiros trabalhos sobre a aplicação de enzimas para a síntese de biodiesel foram realizados em éter de petróleo empregando o óleo de girassol como

matéria-prima (MITTELBACH, 1990) e lipases de várias origens. Das lipases investigadas, apenas três foram capazes de catalisar a alcoólise, sendo que a preparação imobilizada da *Pseudomonas sp.* forneceu o melhor rendimento em ésteres.

Em estudos subseqüentes, Linko *et al.* (1998) investigaram a alcoólise de óleo de canola com baixos teores de ácido erúcio em reatores de leito agitado, empregando lipases na ausência de solventes orgânicos. Os melhores resultados foram obtidos com a lipase de *Candida rugosa* e, sob condições otimizadas, uma conversão em ésteres praticamente completa foi atingida. Selmi *et al.* (1998) relataram a etanólise de óleos de girassol com Lipozyme TM (uma lipase comercial imobilizada de *Rhizomucor meiheii*) em meio totalmente composto pelo óleo vegetal e etanol. As variáveis estudadas mostraram que os rendimentos em ésteres etílicos não excedem 85%, mesmo sob condições otimizadas de reação. Os resultados mostraram também que a adição de água (10% m/m) reduz a potencialidade da enzima significativamente. Por outro lado a adição de sílica no meio racional mostra um efeito positivo atribuído à adsorção do co-produto polar glicerol sobre a superfície, o que reduziu a desnaturação da enzima pelo contato com o glicerol.

Em estudos posteriores (SHIMADA *et al.*, 1999 & WU *et al.*, 1999) foram realizados com mistura dos óleos de canola e soja tratada com preparações de várias lipases imobilizadas na presença de metanol. A lipase de *C. antarctica* foi a mais efetiva em promover a formação de ésteres metílicos. Kaieda *et al.* (1999) mostraram que as lipases de *Rhizopus oryzae* catalisam a metanólise do óleo de soja na presença de 4 a 30% de água nas matérias-primas de origem, mas as mesmas se apresentaram inativas na ausência de água. Rendimentos de ésteres metílicos superiores a 90% puderam ser obtidos quando o metanol foi adicionado à reação em etapas subseqüentes. Du *et al.* (2004) demonstraram a conversão de óleo de soja em biodiesel em um reator de batelada contínua em que a catálise com enzimas imobilizadas de *Thermomyces lanuginosa* foi empregada. Em outro trabalho dos mesmos autores ficou evidenciado que, quando o óleo de soja bruto foi utilizado como substrato, um rendimento muito menor em ésteres metílicos foi observado do que quando se utilizou o óleo de soja refinado (DU *et al.*, 2003).

Várias lipases disponíveis comercialmente foram investigadas em relação às suas capacidades em transesterificar sebo bovino com álcoois de cadeia curta (NELSON *et al.*, 1996). A utilização da lipase imobilizada de *R. miehei* levou a uma conversão acima de 95% deste produto. As eficiências de esterificação com metanol e etanol foram sensíveis ao teor de água presente nas misturas reacionais havendo uma redução do teor de ésteres produzidos. Ésteres obtidos de álcoois de cadeia maior do que C₂ também foram preparados sob altas taxas de conversão (94-100%), nestes casos pequenas quantidades de água não afetaram a produção de ésteres.

Na transesterificação de sebo bovino com álcoois secundários, lipases de *C. antarctica* (de nome comercial SP435) e *Pseudomonas cepacia* (PS30) foram as que obtiveram melhores conversões em ésteres (NELSON *et al.*, 1996). Reações realizadas sem adição de água foram pouco eficientes para ambas as lipases, e conversões de apenas 60-84% foram obtidas em tempos de reação de 16h. Por outro lado, um efeito oposto foi observado para o caso da metanólise que se mostrou extremamente sensível à presença de água. Foglia *et al.* (1998) investigaram os álcoois ramificados iso-propanol e butan-2-ol, e obtiveram as melhores taxas de conversões quando as reações foram realizadas sem a adição de solvente. Além disso, apresentaram rendimentos limitados, quando metanol e etanol foram utilizados em reações livres de solvente, o que foi atribuído à desativação das enzimas por álcoois mais polares. Conversões equivalentes também puderam ser obtidas na metanólise e na iso-propanólise dos óleos de soja e de canola (FOGLIA *et al.*, 1998). Wu *et al.* (1998) estudaram o desempenho em motores dos ésteres etílicos e iso-propílicos de sebo bovino, bem como suas propriedades a baixas temperaturas que foram comparáveis aos valores observados para os ésteres metílicos de sebo bovino e de óleo de soja. Watanabe *et al.* (2000) relataram a conversão enzimática de gordura de porco a ésteres metílicos e etílicos utilizando a adição do álcool ao substrato em três etapas seqüenciais, em meio livre de solvente. A conversão a ésteres simples de alquila do óleo de palma nigeriano e dos óleos láuricos da polpa da palma e do coco foi relatada para uso como biodiesel (ABIGOR *et al.*, 2000) sendo que as melhores conversões (~85%) se deram para ésteres etílicos, e os autores investigaram várias propriedades combustíveis destes ésteres.

Lipídeos de baixo valor agregado, como gorduras de descarte utilizadas em fritadeiras de imersão geralmente apresentam altos teores de AGL (>8%). As lipases são especialmente interessantes para catalisar a produção de ésteres graxos a partir destas matérias-primas, porque podem aceitar ácidos graxos tanto livres quanto ligados como acilgliceróis como substratos para síntese de ésteres. Em contraste, catalisadores inorgânicos requerem uma multiplicidade de etapas para a produção de biodiesel a partir deste tipo de material (óleo residual, gordura animal, etc.) (MITTELBACH; ENZELSBERGER, 1999). Para explorar estas particularidades atraentes da catálise enzimática, estudos foram realizados por Wu *et al.* (1999) utilizando reatores em batelada empregando a lipase de *P.cepacia*, em óleos reciclados de restaurante e etanol 95%. Outros trabalhos investigaram a formação de ésteres metílicos e etílicos de gordura de porco através da alcoólise catalisada por lipases imobilizadas de *T. lanuginosa* e *C. antarctica* e *P. cepacia* em sistemas livres de solventes (LEE *et al.* 2002 & HSU *et al.* 2002 & HSU *et al.* 2004).

Outras matérias primas de baixo custo para a produção de biodiesel incluem o óleo residual presente em terras clarificantes e nas borras de refino produzidas durante o refino de óleos vegetais brutos. Estes materiais contêm 40 a 50% (m/m) de óleo, respectivamente. Estudos foram realizados com óleos residuais presentes em terras clarificantes derivadas do refino dos óleos de soja, canola e palma que foram extraídos com hexano, recuperados e submetidos à metanólise pelas lipases de *R. oryzae* na presença de um alto teor de água e com uma adição única de metanol (PIZARRO; PARK, 2003). No entanto, a taxa de conversão foi muito baixa, cerca de 55% devido à adversidade em relação à viscosidade e a inativação das lipases pelos fosfolipídios residuais do óleo recuperado (DU *et al.*, 2003). Enzimas imobilizadas sobre suportes sólidos também foram utilizadas como biocatalisadores para a produção de ésteres alquílicos simples dos AGL e dos lipídios glicéridicos presentes em borra de refino (HAAS *et al.*, 2000). No entanto, as taxas de produção de ésteres foram relativamente baixas. Isto foi provavelmente devido à mistura entre a borra, as lipases e álcool, resultando em má eficiência na mistura entre o catalisador e os substratos.

Uma combinação inteligente de biocatalisadores melhorados e a otimização das condições reacionais irão abrir os caminhos para processos biocatalíticos mais

eficientes. As enzimas são otimizadas pela evolução direta das técnicas e várias novas abordagens tem sido descritas recentemente para melhorar ainda mais o rendimento e a pureza dos produtos de reação (JAEGER; EGGERT, 2002).

Estudos que objetivam o entendimento da dinâmica cinética das reações que ocorrem nos processos biocatalíticos (PAMIES; BACKVALL, 2001 & PAMIES; BACKVALL, 2002) são muito importantes para otimizar o rendimento das reações bem como a pureza dos produtos obtidos.

Líquidos iônicos mostraram serem solventes ideais para a transformação catalisada por enzimas em substratos altamente polares. Park & Kazlauskis (2001) desenvolveram um estudo visando à investigação e a compreensão da chave do perfil estrutural dos líquidos iônicos que controlam as reações catalisadas por enzimas.

O dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) com suas características físico-químicas peculiares mostrou ser outro solvente promissor para reações catalisadas por lipase. A remoção completa e fácil deste solvente oferece significantes vantagens para os processos de “downstream” incluindo a purificação de produtos. Lipases de *Rhizomucor miehei* (Lypozyme) (AL-DURI *et al.*, 2001) e *C. antarctica* (Novozyme435) (MATSUMURA *et al.*, 2001) mostraram uma eficiência catalítica ideal com relação à atividade e estabilidade quando testadas em sc CO₂ como solvente de reação.

2.4 Quimiometria

O grande avanço nos últimos anos na área de computação e instrumentos analíticos ligados a softwares permitiu a coleta de um enorme conjunto de dados onde o tratamento destes gerou uma busca por ferramentas adequadas para retirar informações úteis na tomada de decisões.

O termo “quimiometria” do inglês “chemometrics”, surgiu na década de 70 (GEMPERLINE, 2006) através do sueco Svante Wood que descreveu o crescimento do uso de modelos matemáticos no ramo da química. O desenvolvimento da quimiometria nos últimos anos no mundo pode ser visualizado na Figura 2.2 onde mostra número de trabalhos já publicados desde 1999. Têm-se trabalhado três grandes áreas:

planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões, calibração multivariada (NETO *et al.*, 2006; GEMPERLINE, 2006).

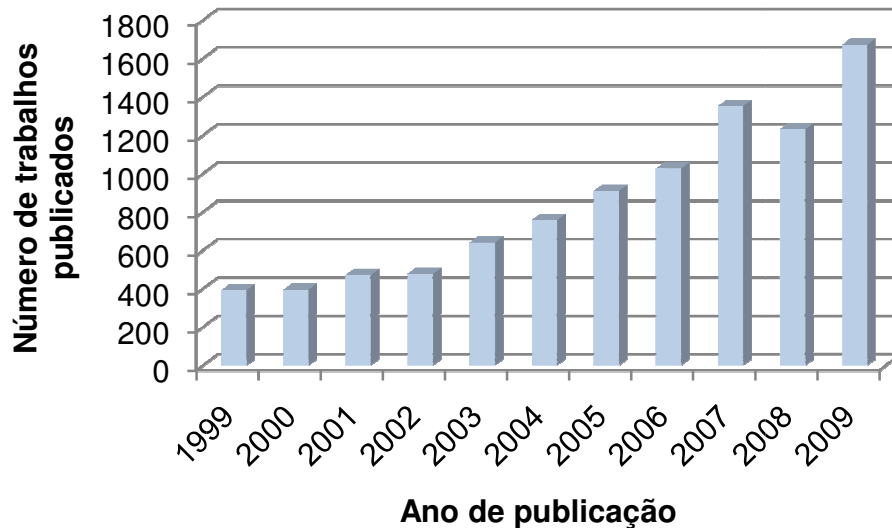


Figura 2.2 – Evolução da quimiometria nos últimos 10 anos. Fonte: <http://www.sciencedirect.com>, usando a palavra-chave “chemometrics”. Acesso em 28/11/2009.

No planejamento de experimentos busca-se a extração de informações de um sistema em estudo fazendo um número reduzidos de experimentos (NETO *et al.*, 2007) e são investigados as influências de todas as variáveis experimentais de interesse (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

O estudo de reconhecimento de padrões passa pela análise dos parâmetros (variáveis) de forma que se tenha uma representação gráfica de todo o conjunto de dados facilitando a interpretação dos resultados. Alguns algoritmos foram desenvolvidos para elaborar gráficos que representem a maior quantidade possível das informações contidas em um conjunto de dados analíticos. Entre eles, destacam-se, por exemplo, a análise por agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA) (CORREIA; FERREIRA, 2007).

A calibração multivariada será tratada em tópico específico.

2.4.1 Calibração Multivariada

A determinação de uma propriedade de interesse em qualquer tipo de sistema é um procedimento usual na química analítica. E essa medida é sempre, na maioria das vezes, realizada de forma indireta através de outras grandezas como absorção ou emissão de luz (NETO *et al.*, 2006) geradas através de técnicas como UV Visível, Raman, Infravermelho, RMN e Espectrometria de massas (FORINA *et al.*, 2007). Portanto, a calibração, desenvolve uma relação quantitativa entre as respostas, registradas em uma matriz de dados m e as concentrações, registradas em uma matriz de dados n (FABER; RAIKJÓ, 2007). Esta matriz de dados pode ser construída conforme ilustrado na Figura 2.3. As linhas representam as diferentes amostras e as colunas são as variáveis (absorvâncias) em diferentes números de onda.

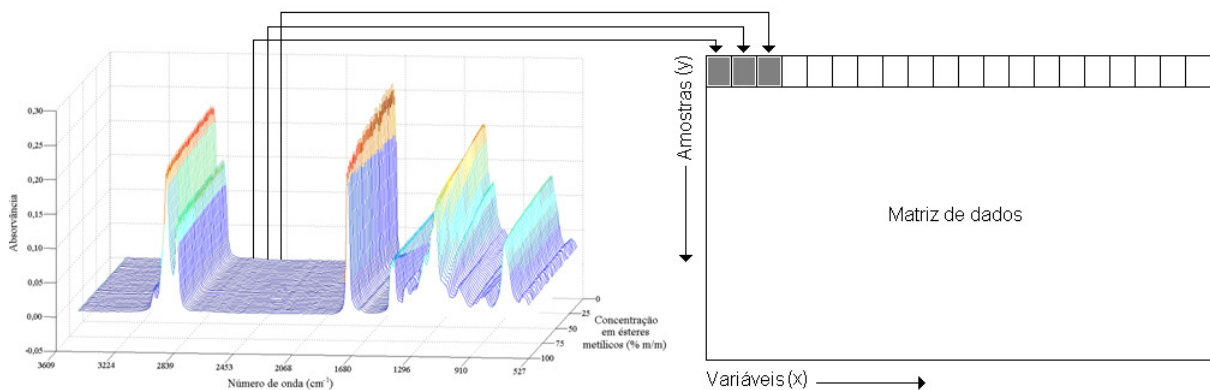


Figura 2.3 – Matriz de dados gerada a partir de um espectro de Infravermelho.

Uma calibração é dita univariada quando a resposta é relacionada a uma medida instrumental. Embora simples este método venha acompanhado de desvantagens como a presença de interferentes que podem ocasionar desvios na sua relação linear. A calibração multivariada permite relacionar duas ou mais medidas instrumentais a uma resposta de interesse possibilitando análises na presença de interferentes e são mais eficientes para lidar com ruídos experimentais, colinearidade e falta de linearidade. Um dos métodos que apresentam este requisito é o PLS (Mínimos

Quadrados Parciais – do inglês *Partial Least Square*) (FERREIRA, *et al*, 1999; BRAGA; POPPI, 2004).

A técnica PLS foi inicialmente desenvolvida por Herman Wold 1975 (WOLD, 1975, citado por GEMPERLINE, 2006). PLS é um dos métodos de regressão onde correlacionamos uma matriz de dados X com o vetor da função resposta Y através de uma combinação linear e das componentes principais. Estas componentes principais são otimizadas para melhor descreverem a interação entre os blocos X e Y e então recebem a denominação de variáveis latentes (FERREIRA *et al.*, 2002).

Duas etapas importantes no delineamento de um modelo PLS são a calibração e validação. As amostras de calibração devem ter concentrações de padrões ou mistura de padrões conhecidas. Nesta etapa, a relação entre as matrizes X e Y é modelada gerando valores preditos que geralmente contém desvios aleatórios dos valores verdadeiros. Assim, os valores preditos e medidos são usados para o cálculo da raiz quadrada do erro médio de calibração (do inglês *Root Mean Squared Error of Calibration - RMSEC*). O RMSEC mostra o nível de concordância entre os valores de concentração preditos pelo modelo e os valores medidos (verdadeiros). Segundo Gemperline (2006), o RMSEC fornece estimativas otimistas da habilidade de predição de um modelo de calibração para amostras medidas posteriormente. Isto ocorre devido a uma porção do ruído nos padrões que são inadvertidamente modelados pelos parâmetros calculados.

Na validação podemos realmente avaliar a eficiência de previsão de um modelo. Nesta etapa são usadas amostras independentes da etapa de calibração o que demanda um gasto de tempo e custo para a análise. O erro pode ser avaliado em termos da raiz quadrada do erro médio de previsão (do inglês – *Root Mean Squared Error of Prediction – RMSEP*). Outra alternativa é a utilização da validação cruzada onde para um dado conjunto de dados, numa serie de experimentos, cada qual envolve a remoção de um subconjunto dos objetos (blocos), com subsequente aplicação do modelo resultante aos objetos removidos. Wold *et al.* (2001) sugere a utilização de cinco a nove blocos. Neste caso é calculada a raiz quadrado do erro médio da validação cruzada (do inglês *Root Mean Squared Error of Cross-Validation - RMSECV*).

No caso, o RMSECV também gera valores otimistas da habilidade de previsão do modelo de calibração.

2.5 Caracterização do biodiesel através de técnicas analíticas

A presença mesmo de pequenas quantidades de compostos originários do óleo no biodiesel pode causar problemas ao motor e resultar em um aumento da produção de emissões perigosas (ZAGONEL *et al.*, 2004). Assim, um método analítico sensível e confiável é necessário para monitorar a composição de triacilgliceróis (TGs), diacilgliceróis (DGs) e monoacilgliceróis (MGs) no biodiesel. Vários trabalhos já foram realizados (PLANK; LORBEER, 1995 & HOLCAPEK *et al.*, 1999) utilizando técnicas cromatográficas (CG e HPLC) associadas a diversos detectores (FID, índice de refração e etc.) dentre eles a espectrometria de massas (EM), para a determinação estrutural e caracterização dos materiais contendo ácidos graxos e seus derivados. Holcapec *et al.* (1999) monitoraram a conversão de triacilgliceróis do óleo de canola em ésteres metílicos de ácidos graxos e quantificou os TGs residuais através da técnica HPLC com fase reversa.

A espectrometria de massas utilizando várias técnicas de ionização tem sido usada com sucesso para a determinação de lipídios. Barber *et al.* (1964) sugeriram o padrão de fragmentação de TGs usando impacto eletrônico (EI). Mais recentemente técnicas de ionização como termospray (TSI) (KIM; SALEM JR, 1987), eletrospray (ESI) (MOTTRAN *et al.*, 1997) ionização química a pressão atmosférica (APCI) (BYRDWELL; EMKEN, 1995 & NEFF; BYRDWELL, 1995) mostraram ser superiores a EI e CI no campo de análise de lipídios. Um método muito eficiente para a elucidação de TGs usando bombardeamento rápido de átomos (FAB) MS-MS (CHENG *et al.* 1998) foi reportado. Vários métodos de HPLC-MS para análise de lipídios têm sido revisados (BYRDWELL, 1998 & KIM; SALEM JR, 1993). A técnica de ionização de maior sucesso neste campo é provavelmente a APCI (BYRDWELL; EMKEN, 1995 & NEFF; BYRDWELL, 1995 & BYRDWELL *et al.*, 1996) que fornece uma detecção sensível para o HPLC, tanto para informações estruturais e massa molecular e total compatibilidade com as condições normais de HPLC para a separação de TGs (KALLIO *et al.*, 1989)

contendo grupos hidróxi (BYRDWELL, NEFF, 1998), hidroperóxi (KUSAKA *et al.*, 1996) e epóxi (LAAKSO; MANNINEN, 1997). A cromatografia com fluido supercrítico acoplada a espectrometria de massa foi usada para a caracterização de triglicérides da manteiga e, mais recentemente, a técnica SFC-APCI-MS tem sido usada para elucidar informações tanto de massas moleculares como da composição da cadeia alquílica dos TGs (LECHNER *et al.*, 1997).

Uma das técnicas analíticas que tem sido comumente empregada, juntamente com análise multivariada no estudo de biodiesel é a espectrometria no infravermelho. Soares *et al.* (2008) utilizaram espectrometria de infravermelho médio com transformada de Fourier, acessório de reflectância total atenuada (ATR/FTIR) e Mínimos Quadrados Parciais (PLS) com métodos de seleção de variáveis forward e stepwise para determinar a adulteração de biodiesel de várias oleaginosas com óleo de soja conduzindo a bons resultados. Modelos construídos usando os métodos de seleção de variáveis apresentaram alta concordância entre valores reais e preditos do que aqueles modelos os quais foram construídos sem o método de seleção. Em um trabalho posterior, Soares *et al.* (2009) determinaram adulteração de B2 (mistura de 2 % v/v no diesel) com óleo residual, utilizando dados de ATR/FTIR e calibração multivariada por PLS.

Knothe (1999) tem usado a espectrometria de infravermelho próximo (NIR) e PLS para monitorar o final da reação de transesterificação do biodiesel. Oliveira *et al.* (2006) usou FTIR e espectroscopia NIR para construir modelos de calibração para determinar o conteúdo de ésteres metílicos em misturas de biodiesel (ésteres metílicos + diesel). Pimentel *et al.* (2006) desenvolveu modelos de calibração multivariada baseados em espectrometria de infravermelho médio e próximo para determinar o conteúdo de biodiesel em misturas de diesel, considerando a presença de óleo vegetal cru.

Estudos recentes tem mostrado que muitas outras metodologias podem ser usadas para determinar o conteúdo de biodiesel misturados com diesel mineral. Por exemplo, Knothe (2001) usou as técnicas de espectroscopia NIR e $^1\text{H-NMR}$ (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio) para determinar o conteúdo de biodiesel derivado de soja em misturas de diesel mineral. Monteiro *et al.* (2009)

obtiveram bons resultados usando a técnica de H^1NMR para determinar a proporção biodiesel/ diesel usando amostras de biodiesel derivados de mamona e soja misturados com diesel de três diferentes grupos. Corgozinho *et al.* (2008) utilizaram dados de espectrofluorimetria sincronizada para gerar modelos PLS para quantificar óleo residual em B2. O adulterante foi determinado com teores de zero a 25% m/m no combustível.

Capítulo 3

Parte Experimental

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e solventes

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC, Metanol (100 % - J. T. Baker), Isopropanol (99,7 % - Vetec) e Hexano (97 % - Vetec). Portanto não houve nenhuma etapa adicional de purificação, sendo necessária apenas uma etapa de desgaseificação.

O metanol (99,8%) e t-butanol (99%) utilizados na síntese foram reagentes pa, marca Vetec.

O óleo de soja (Tipo 1, 100 % puro) utilizado na síntese foi adquirido no comércio.

O biodiesel (B100) foi gentilmente cedido pela REGAP (Refinaria Gabriel Passos/Betim-MG).

Na elaboração de meio de cultura para o crescimento microbiano foram usados como ingredientes: Peptona Bacteriológica G (Acumedia), $\text{NaNO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (P.A. 99 % - Fmaia), KH_2PO_4 (P.A. 99 % - Synth), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (P.A. 98 – 102 % - Synth).

3.2 Triagem de espécies de fungos produtoras de lipase

Foram realizados experimentos no intuito de se selecionar linhagens de fungos que tenham como característica, a capacidade de produção da enzima lipase capaz de realizar transesterificação dos triacilglicerídeos presentes no óleo de soja pra formação de ésteres alquílicos. Foram testadas as linhagens de fungos filamentosos a partir da coleção do Laboratório de Bioensaios e Biotecnologia do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais. Assim foram escolhidas sete espécies de fungos: *Mucor plumbeus*, *Penicillium citrinum*, *Syncephalastrum racemosum*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium janthinellum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus Níger*.

Os fungos foram cultivados por um período de sete dias em tubos de ensaio contendo meio de cultura sólido do tipo ágar batata dextrosado de concentração 39 g/L. Os esporos de cada espécie foram extraídos com 10 mL de água destilada esterilizada. Uma alíquota de 1 mL da suspensão de esporos foi transferida para erlenmeyers de 500 mL onde foram adicionados 100 mL do seguinte meio de cultura: Peptona bacteriológica G 50 g/L, $\text{NaNO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, KH_2PO_4 1,2 g/L e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L. Foram preparadas as amostras para cada espécie em triplicata. Além disso, foram preparadas duas amostras controles. Estas amostras foram colocadas em incubadora (TECNAL – modelo TE - 421) sob agitação de 130 rpm, por 72 horas, para permitir o crescimento celular. Em seguida, foram adicionados, em cada frasco, por meio de pipeta volumétrica, 25,00 mL de álcool metílico, 25,00 mL de álcool tert-butílico e 50,00 mL de óleo de soja. Todos os meios de cultura e reagentes, com exceção dos alcoóis foram esterilizados em autoclave vertical (FANEM – modelo 415) ($T = 120\text{ }^\circ\text{C}$ ou $P \approx 1\text{ kgf/cm}^2$).

3.3 Produção de biodiesel

Os sete fungos selecionados foram adicionados a uma mistura de óleo de soja e MeOH/BuOH(1:1). Inicialmente utilizou-se o álcool tert-butílico como solvente orgânico para facilitar o contato entre o álcool metílico e o óleo de soja. Em seguida, eles foram colocados em uma incubadora orbital para reagir por 120h (5 dias) a temperatura ambiente. Alíquotas de 2,00 mL foram retiradas, através de pipeta volumétrica, a cada 12 h e estas foram analisadas por infravermelho na região de médio IR.

3.4 Preparo das soluções padrão utilizadas para construção da curva analítica

As soluções padrão para construção da curva analítica para seleção dos melhores fungos produtores de lipase foram preparadas a partir da amostra de

Biodiesel de soja (B100) (99% de ésteres m/m) que foi cedida pela REGAP (Refinaria Gabriel Passos/Betim-MG). Utilizaram-se 30 amostras para a validação e 7 para a previsão (Tabela 3.1) totalizando 37 amostras binárias com biodiesel metílico de soja e óleo de soja.

Tabela 3.1 – Concentração do biodiesel nas misturas binárias usadas como soluções padrão utilizadas na curva analítica

Calibração (% m/m)				Validação (% m/m)			
1	0,00	11	17,52	21	47,49	1	6,02
2	2,01	12	19,98	22	52,44	2	12,54
3	3,10	13	22,58	23	54,98	3	25,03
4	4,11	14	27,49	24	60,03	4	39,02
5	5,08	15	30,07	25	64,93	5	49,97
6	7,05	16	32,56	26	74,36	6	69,95
7	7,99	17	34,99	27	79,84	7	94,98
8	9,01	18	39,98	28	84,97		
9	10,01	19	42,50	29	89,82		
10	15,05	20	45,00	30	99,00		

3.5 Técnicas analíticas

3.5.1 Espectrometria de infravermelho (ATR – FTIR)

Para a obtenção dos espectros de ATR-FTIR foi utilizado um espectrômetro de IR ABB Bomem modelo MB 102 do Laboratório de Ensaio de Combustíveis da UFMG equipado com um acessório de reflectância atenuada total (ATR) e com um detector de sulfato de triglicerina deuterado $[(ND_2CD_2COOD)_3D_2SO_4]$. A temperatura foi mantida em 16 ± 1 °C durante a aquisição dos espectros os quais foram obtidos da média de 16 scans em uma resolução espectral de $1,9282\text{ cm}^{-1}$. A região selecionada para análise foi o infravermelho médio (MID – IR) entre 3500 e 527 cm^{-1} .

As amostras foram adicionadas sobre a célula de forma que cobrissem todo o cristal e após aquisição do espectro, o acessório foi limpo sucessivamente com acetona.

3.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC)

Os perfis cromatográficos foram obtidos em cromatógrafo líquido da marca SHIMADZU do Departamento de Química da UFMG, modelo LC- 20AT, com sistema de gradiente binário e detector de UV/VIS, modelo SPD – 20 A, à temperatura de 40 °C. Uma coluna ODS HYPERSIL de dimensão 250 mm x 46 mm foi utilizada. As amostras foram diluídas em metanol para perfazerem uma solução de concentração 1% (v/v). Uma alíquota de 20 µL das amostras foi injetada.

Foram utilizados os seguintes solventes como fase móvel: metanol, 2-propanol e hexano. No reservatório A foi adicionado metanol e no reservatório B uma solução contendo 2-propanol e hexano em uma proporção de 5:4 (v/v). Foi empregado um gradiente linear de 100% de A para 50% de A e 50% de B em 15 minutos. A eluição foi feita isocriticamente com 100% de B, por mais 5 minutos, totalizando um tempo de análise de 20 minutos. O fluxo da fase móvel foi de 1mL/min. O comprimento de onda de detecção utilizado foi o $\lambda = 205$ nm.

3.5.3 Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chama

A quantificação dos ésteres foi realizada com base em uma adaptação na norma EN14103: Derivados de Óleos e Gorduras - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos – Determinação de Éster e conteúdo de Ésteres Metílicos de Ácidos Linolênico (C18:3). A solução do padrão interno foi preparada pesando-se cerca de aproximadamente 200 mg de heptadecanoato de metila e transferindo quantitativamente esta massa para um balão de 100 mL. Completou-se o volume com heptano. A solução amostra foi preparada pesando-se aproximadamente 100 mg do biodiesel em um vial de 10 mL e

acrescentando-se 5,0 mL da solução padrão. O teor de ésteres %(m/m) foi calculado utilizando-se a seguinte equação:

$$\% \text{ m/m} = \frac{(\text{área de éster total} - \text{área do padrão}) \times (\text{massa do padrão na solução amostra})}{(\text{área do padrão}) \times (\text{massa da amostra pesada})}$$

3.5.4 Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

A ionização de moléculas orgânicas é gerada pelo bombardeamento de elétrons com energia suficiente para remover um elétron e conseqüentemente a formação do íon molecular (M^+) segundo a equação:



Para identificação dos constituintes presentes nos produtos das reações foi utilizado um sistema GC/EM. As análises foram conduzidas em um equipamento da Shimadzu (GC-17A/GC-MS-QP5050A) do Laboratório de Ensaio de Combustíveis do Departamento de Química da UFMG utilizando uma coluna capilar de sílica fundida do tipo Wax (Stabil-WAX, 30m x 0,25mm x 0,25 μ m). O gás de arraste utilizado foi hélio a um fluxo de 1,2 mL/min. Alíquotas de 0,50 μ L das amostras foram injetadas nas seguintes condições: Modo de injeção split (1:10). A temperatura do injetor e detector foi mantida a 240 $^{\circ}$ C. A coluna foi mantida a 210 $^{\circ}$ C por 9 min, e então foi aquecida até 240 $^{\circ}$ C a uma taxa de aquecimento de 7 $^{\circ}$ C/min. A temperatura final foi mantida por 25 min.

O modo de ionização utilizado foi o de impacto eletrônico a uma tensão de 70 eV sendo que o analisador de massas foi um quadrupolo. Os espectros de massa foram obtidos no modo scan entre 45 a 500 m/z, com uma taxa de varredura de 1000 u.m.a./s. (unidade de massa atômica por segundo).

Foram obtidos os espectros de massas de todos os compostos e identificados conforme o padrão de fragmentação dos ésteres e pela comparação com os espectros do software ChemStation do banco de dados da biblioteca Wiley. Foram

considerados identificados aqueles compostos que tiveram uma similaridade acima de 90%.

3.5 Calibração e Validação dos modelos

Para a validação do modelo de calibração foram realizados quatro tratamentos a fim de se escolher o modelo mais adequado para a predição da concentração de ésteres metílicos nas amostras. O método de validação cruzada utilizado foi o “Venetian Blinds” com cinco separações (blocos). Os dados foram pré-processados pelo modo “Centrar na média” e pela “Correção de Sinal Ortogonal” sendo os cálculos realizados usando o software PLS Toolbox versão 5.0 (Eigenvector Research Inc., Manson, WA, USA).

Foi avaliado a presença de erros sistemáticos nos modelos pelos valores de Bias. O Bias é calculado de acordo com a equação 1:

$$\text{bias} = \frac{\sum_{i=1}^{n_v} (y_i - \hat{y}_i)}{n_v} \quad \text{Equação 1}$$

onde n_v é o número de amostras da validação; y_i e \hat{y}_i correspondem aos valores de referência e aos previstos pelo modelo, respectivamente.

A seguir, o valor de SDV (Standard Desviation of Validation) medido pela equação:

$$\text{SDV} = \sqrt{\frac{\sum [(y_i - \hat{y}_i) - \text{bias}]^2}{n_v - 1}} \quad \text{Equação 2}$$

e então o valor de t_{bias} é estimado pela equação:

$$t_{\text{bias}} = \frac{|\text{bias}| \sqrt{n_v}}{\text{SDV}} \quad \text{Equação 3}$$

O valor de t_{bias} calculado é comparado com o seu valor de t crítico para $n_v - 1$ graus de liberdade.

Para comparação da qualidade de previsão de dois modelos utilizou-se o teste F . Os valores F calculados foram baseados nos valores das variâncias dos modelos e da equação:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad \text{Equação 4}$$

onde n é o número de amostras de validação, RMSEP é a raiz quadrada do erro médio de predição.

Esta expressão fornece o valor do desvio padrão. A variância é dada pelo quadrado do desvio padrão e o valor de F é dado pela razão das variâncias:

$$F_{\text{calculado}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{Equação 5}$$

onde s_1 e s_2 são os desvios padrão de dois modelos a serem comparados sendo o numerador sempre maior que o denominador.

As variáveis latentes dos modelos foram determinadas de acordo com os valores de RMSECV (do inglês Root Mean Square Error of Cross-Validation) e utilizadas aquelas sugeridas pelo software.

A exatidão dos modelos de calibração desenvolvidos (RPD) foi determinada pelas equações 6, 7 e 8.

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_i (r_i - m)^2}{n-1}} \quad \text{Equação 6}$$

$$m = \frac{\sum r_i}{n} \quad \text{Equação 7}$$

$$RPD = \frac{s_r}{RMSEP} \quad \text{Equação 8}$$

onde s_r é o erro do desvio padrão dos valores da população de referência da previsão, r_i são os valores de referência da previsão, m é a média dos valores de referência, n o número de amostras da previsão.

A qualidade da previsão também foi avaliada pelos parâmetros RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration), RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction), RMSECV, e R^2 .

3.6 Planejamento experimental

Para otimização dos resultados preliminares obtidos foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com ponto central para verificar as variáveis mais importantes na reação de transesterificação por rota enzimática utilizando o fungo *Syncephalastrum racemosum*. Analisaram-se os fatores razão molar metanol/óleo e tempo como descrito abaixo e construiu-se a tabela de contrastes (Tabela 3.2).

Fatores	-	+	Ponto Central
1: Razão molar metanol/óleo	1,1:1	5,5:1	3,3:1
2: Tempo (h)	6	24	15

Tabela 3.2 – Ensaio realizados no planejamento experimental para avaliação do biodiesel produzido a partir de *S. racemosum*

Ensaio	1	2	1	2
1	-	-	5:1	6
2	+	-	25:1	6
3	-	+	5:1	24
4	+	+	25:1	24
5	0	0	15:1	15
6	0	0	15:1	15
7	0	0	15:1	15

As variáveis, massa de óleo adicionado (10 g), massa de álcool tert-butílico, temperatura de reação (30 °C) e o tamanho do inóculo/concentração de esporos foi mantido constante em todos os ensaios, variando se a relação molar MeOH/óleo e o tempo.

A contagem de esporos foi realizada em Câmara de Neubauer (Figura 3.1). Cada um dos 9 quadrados grandes possui área de 1 mm² e a distância entre uma lamínula e a superfície da câmara é de 0,1 mm. O volume que é retido então nesse espaço é de 0,1 mm³ ou 1x10⁻⁴ mL. O número de esporos por mL foi então a partir da equação 9:

$$\text{Concentração de esporos/mL} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de esporos sobre o quadrado grande} \times F_d}{\text{Volume do quadrado grande}} \quad \text{Equação 9}$$

onde o número de esporos no quadrado grande é a média de 4 contagens realizadas no quadrado central; o volume do quadrado grande corresponde ao valor de 1x10⁻⁴ mL e F_d é o fator de diluição.

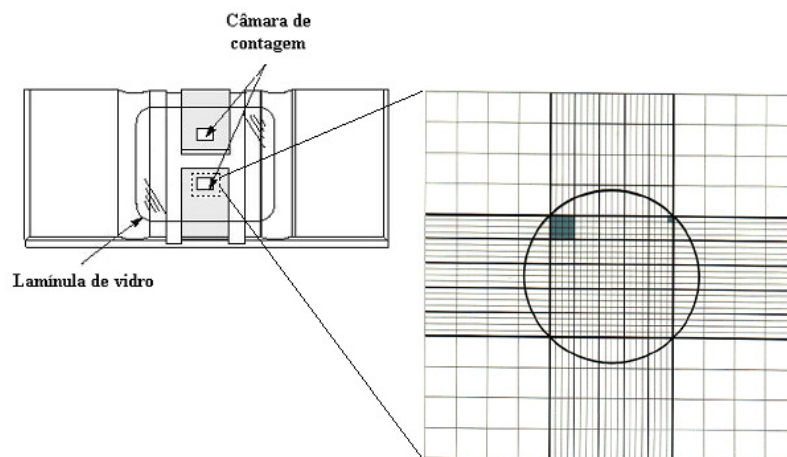


Figura 3.1 – Desenho esquemático da Câmara de Neubauer utilizada para determinação da concentração de esporos para preparo do inóculo.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Espectrometria de Infravermelho ATR-FTIR

Os espectros de infravermelho do óleo de soja e de Biodiesel de soja são apresentados na Figura 4.1. As maiores diferenças entre os espectros podem ser observadas na região chamada de “impressão digital” (1400-900 cm^{-1}) (LOPES; FASCIO, 2004).

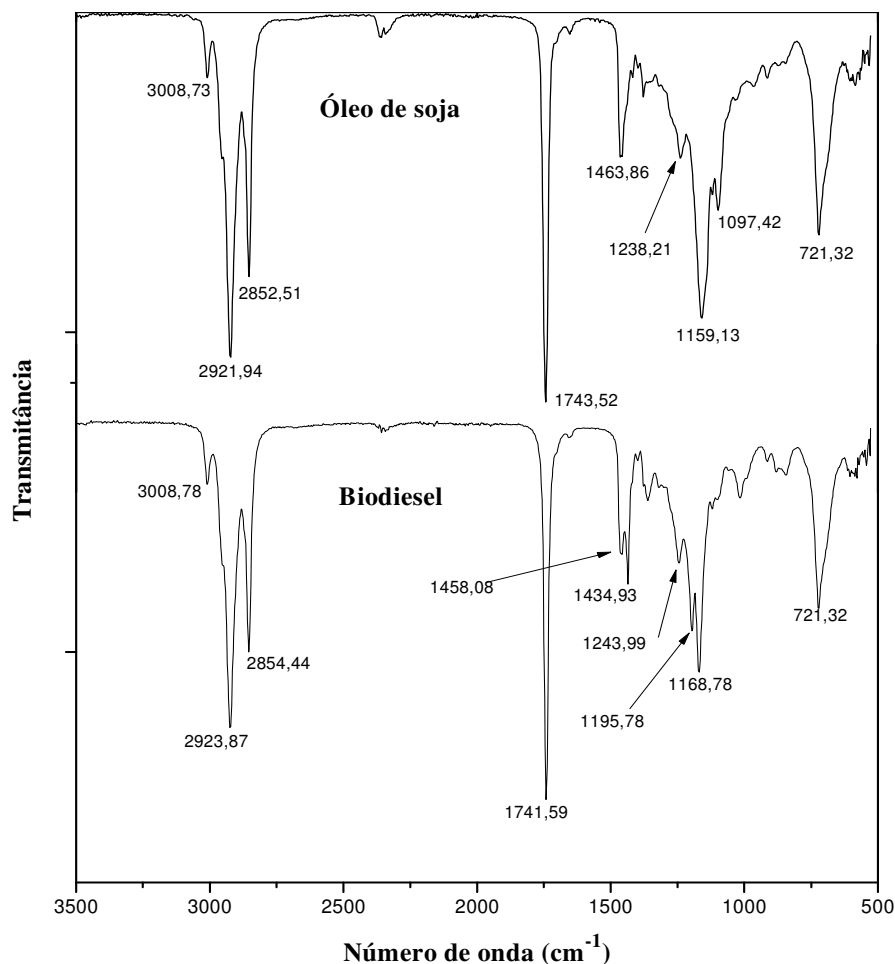


Figura 4.1 – Espectros de ATR-FTIR de amostras de óleo de soja puro e biodiesel de soja

A banda de carbonila (C=O) de ésteres alifáticos ocorre entre 1750 e 1735 cm^{-1} e as da ligação C-O de ésteres que são, na verdade, duas vibrações assimétricas acopladas: C-C(=O)-O e O-C-C, ocorrem entre 1300 e 1000 cm^{-1} (SILVERSTEIN *et al.*, 1991). Ainda segundo este autor, os ésteres metílicos de ácidos graxos de cadeia longa apresentam um padrão com três bandas próximas de 1250, 1205 e 1175 cm^{-1} . As principais bandas estão especificadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Atribuição das bandas da região do infravermelho do óleo de soja e do biodiesel de soja.

Especificação	nº de onda (cm^{-1})	
	Óleo de soja	Biodiesel
ν C-H	3008,70	3008,70
ν_{as} CH ₂	2921,94	2923,87
ν_s CH ₂	2852,51	2854,44
ν C=O	1743,52	1741,59
δ_s CH ₂	1463,86	1458,08
		1434,93
ν C-O	1238,21	1243,99
	1159,13	1195,78
	1097,42	1168,78
δ_{as} CH ₂	721,32	721,32

ν = deformação axial; δ = deformação angular;
 s = simétrico e as = assimétrico

4.2. Calibração e validação dos modelos

Realizaram-se duas etapas para construção dos modelos. A primeira etapa (descritiva) relacionou as medidas realizadas no conjunto de padrões com a concentração da espécie de interesse. Logo em seguida, na etapa preditiva, utilizou-se o modelo para prever as concentrações de novas amostras. Para que o modelo seja útil em um determinado objetivo, torna-se necessário a validação. Isso é feito pela avaliação de parâmetros que certifiquem que o modelo proporcione um desempenho adequado.

Os modelos foram gerados a partir dos valores de absorvância dos espectros de ATR-FTIR dos padrões da curva analítica (Figura 4.2) com concentrações variando de 0 a 99% (m/m) de ésteres.

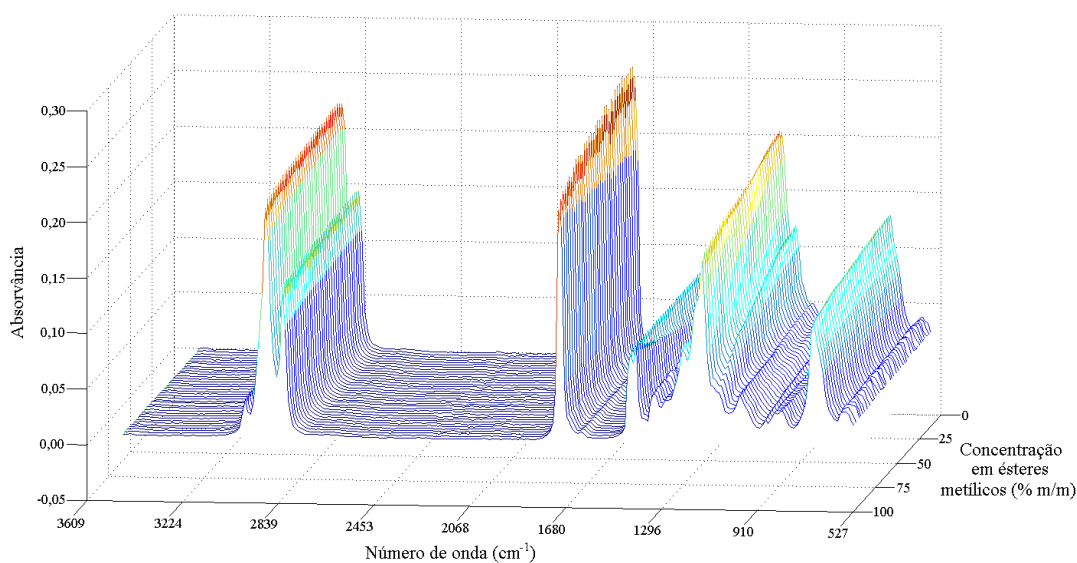


Figura 4.2 – Espectros de ATR-FTIR utilizados na calibração e validação do modelo.

Foram construídos e validados quatro modelos a partir dos parâmetros mostrados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Valores dos parâmetros da calibração/validação (PLS) para determinação do conteúdo (%) de ésteres para os modelos estudados.

Parâmetros	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4
Pré-processamento	OSC e CM	CM	OSC	Nenhum
LV	1	4	2	2
R^2 calibração	1,000	1,000	0,999	0,999
R^2 validação cruzada	0,999	0,999	0,999	0,998
RMSEC (% m/m)	0,005	0,398	0,6985	0,9982
RMSECV (% m/m)	0,883	0,902	0,951	1,123
RMSEP (% m/m)	0,566	0,583	0,635	0,722
Bias (% m/m)	-0,016	0,164	-0,140	0,211
SDV (% m/m)	0,610	0,607	0,668	0,746
t_{bias}^*	0,07 (2,45)	0,72 (2,45)	0,55 (2,45)	0,75 (2,45)
RPD	56,46	54,46	50,35	44,18

* Valores entre parênteses referem-se ao valor da distribuição t de student para 6 graus de liberdade e 95% de confiança. OSC = Correção de Sinal Ortogonal; CM = Centrado na Média; LV = Variável Latente; SDV = Standard Deviation of Validation

As variáveis latentes em todos os modelos foram escolhidas pelo software e determinadas no ponto onde a variação do valor de RMSECV com o aumento da variável latente é mínima. Na Figura 4.3 é mostrado o gráfico que relaciona os valores de RMSECV e variável latente dos modelos estudados.

Todos os modelos mostraram valores altos de R^2 calibração e R^2 validação cruzada demonstrando uma boa eficiência das curvas analíticas. A estimativa desses valores permite dizer sobre a qualidade da curva e quanto mais próximo de um melhor será o modelo. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), recomenda um valor mínimo de $R = 0,99$ para considerar um modelo como sendo linear (ANVISA, 2003). Já para o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), um valor de R acima de 0,9 é requerido para se atender ao conceito de linearidade (INMETRO 2003).

O quarto modelo mostra a importância do pre-processamento para os modelos obtidos. Este modelo apresentou os menores valores de $R^2_{\text{calibração}}$ e $R^2_{\text{validação}}$ e os maiores valores dos erros médios de calibração, previsão e validação cruzada.

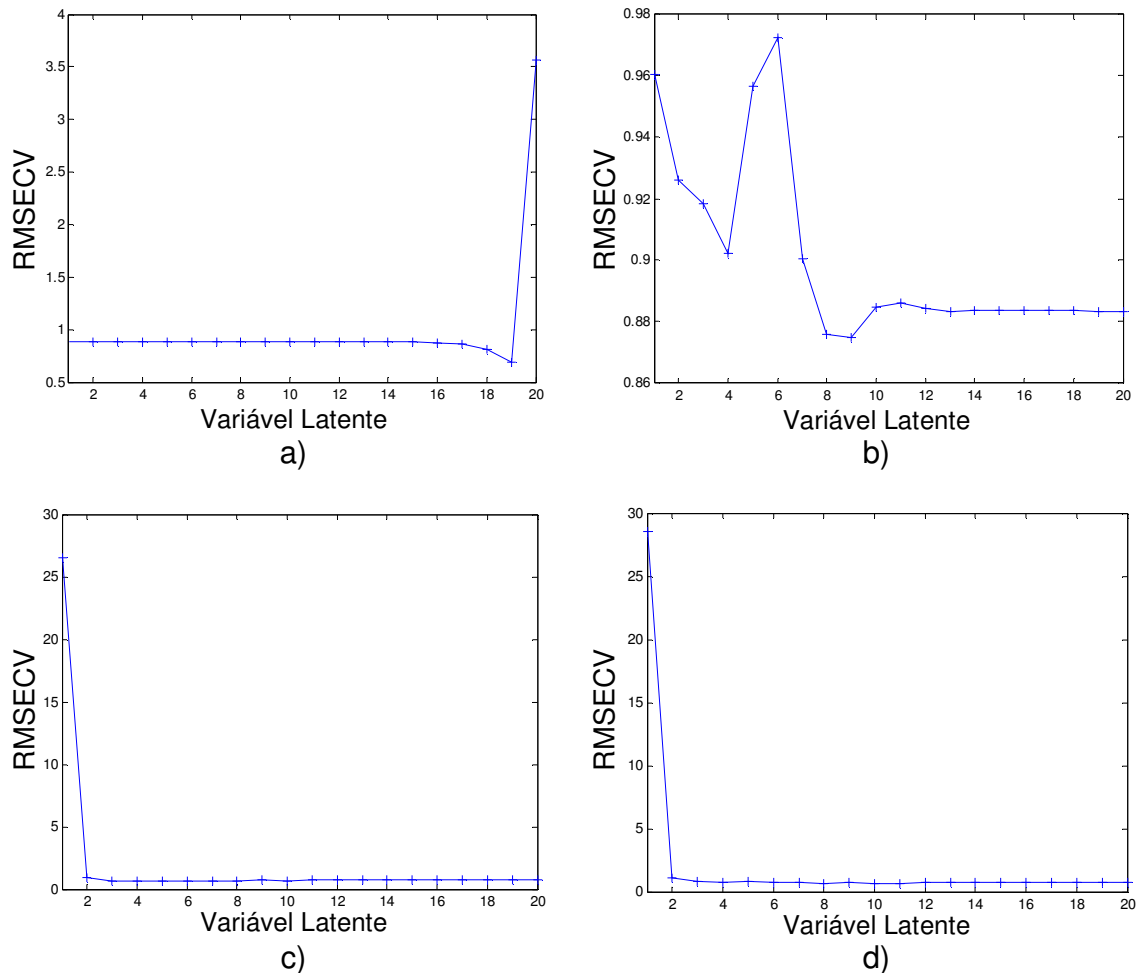


Figura 4.3 – Relação entre RMSECV e variável latente. a) modelo 1, b) modelo 2, c) modelo 3, d) modelo 4

Como mostrado na Tabela 4.3, os valores de t_{bias} para os quatro modelos são menores que o valor de $t_{\text{crítico}}$ com 95% de confiança. Portanto, o erro sistemático incluído no modelo multivariado pode ser considerado não significativo e desprezado. Observa-se valores bem distintos para os valores e RMSEC sendo o 1º modelo com um valor bem próximo do zero. Já para os erros RMSECV e RMSEP não se nota valores muito diferentes, sendo que o 1º modelo apresenta os menores valores.

RPD é definido como sendo a razão dos desvio padrão dos valores de referência das amostras do conjunto de validação e o valor de RMSEP (FEARN, 2002). Os valores de RPD encontrados (44,18 – 56,46) foram considerados altos e demonstram uma boa exatidão dos modelos. Alguns trabalhos utilizaram RPD como parâmetro para avaliar a exatidão de modelos de calibração aliado a técnica de espectroscopia de infravermelho. WU *et al.* (2008) monitorando componentes de leite por espectroscopia de infravermelho próximo encontrou calibrações com RPD variando de 15 a 200. Segundo WILLIAMS e NORRIS (2002) modelos com valores de RPD maiores que 5 são avaliados como bons para controle de qualidade. Já para ZHANG *et al.* (2008) uma boa calibração deve ter valores de RPD acima de 3.

Tabela 4.3 – Teste *F* para comparação dos modelos de previsão dos teóres de ésteres.

Comparação entre Modelos	RMSEP (Desvio Padrão)	Variância	<i>F</i> calculado
1	0,5658	0,3202	1,0600
2	0,5826	0,3394	(4,2837)*
1	0,5658	0,3202	1,2587
3	0,6348	0,4030	(4,2837)*
1	0,5658	0,3202	1,6284
4	0,7221	0,5214	(4,2837)*

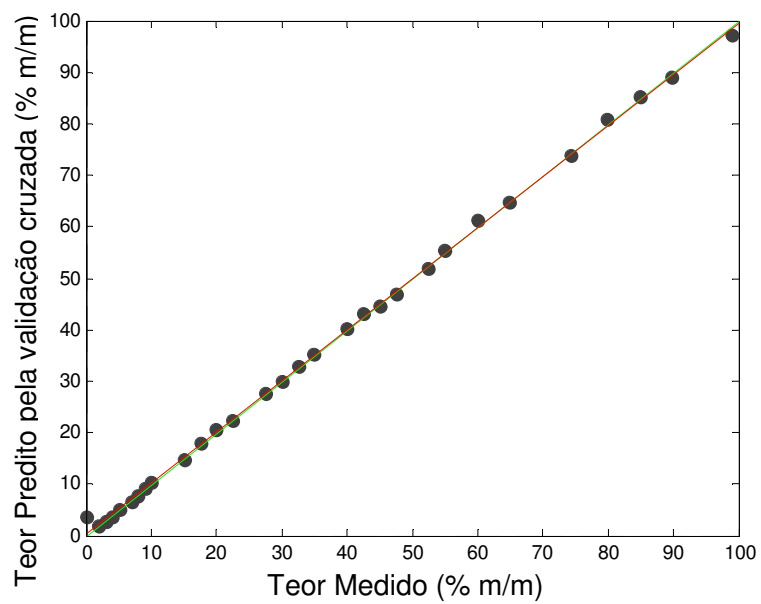
*Valores entre parênteses refere-se a *F* para 6 graus de liberdade e 95% de nível de confiança

De acordo com a Tabela 4.3, todos os valores de *F* calculado são menores que o valor de *F* tabelado indicando que não há diferença significativa entre os modelos a nível de 95% de confiança, ou seja, poderia-se fazer uso de qualquer um dos modelos para previsão da porcentagem de ésteres.

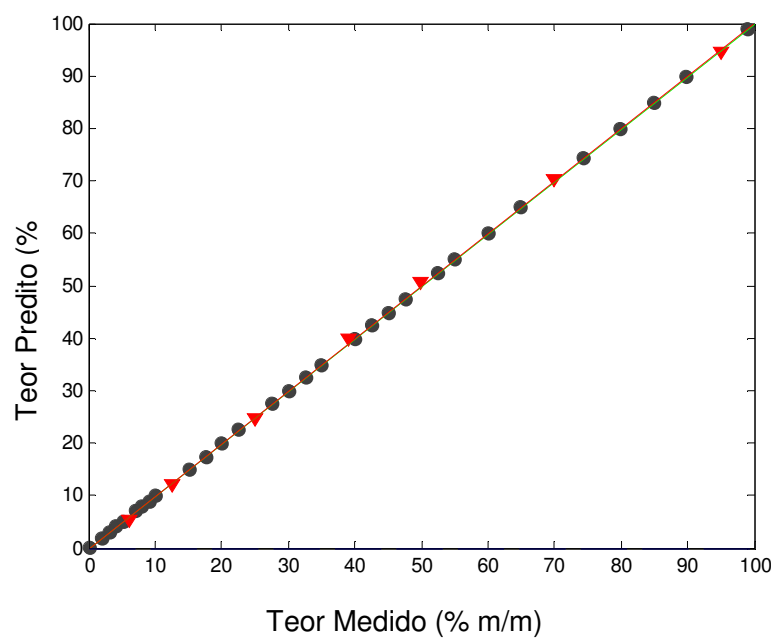
Na Tabela 4.4 encontram-se os valores de referência da calibração e validação bem como os valores preditos pelos modelos 1, 2, 3 e 4 e as Figuras 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8 apresentam as curvas de calibração e os resíduos gerados pelos modelos. De acordo com a Figura 4.8 d), apenas uma das amostra não está dentro de um nível de confiança de 95%. Como o modelo 4 não foi utilizado não foi preciso a retirada deste ponto anômalo.

Tabela 4.4 – Valores preditos para as amostras de calibração e validação.

	Teor Medido (%)	Teor Predito (%)			
		Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4
Calibração	0,00	0,00	0,59	-0,05	-0,88
	2,01	2,01	2,19	1,18	1,65
	3,10	3,09	2,79	3,67	2,75
	4,11	4,11	3,57	3,71	4,08
	5,08	5,08	4,94	4,51	4,24
	7,05	7,05	6,37	6,91	6,86
	7,99	7,99	7,41	7,81	9,00
	9,01	9,00	9,16	9,74	9,00
	10,01	10,02	10,02	9,05	10,27
	15,05	15,03	14,90	16,72	13,28
	17,52	17,52	17,56	17,18	17,48
	19,98	19,98	20,13	19,99	18,79
	22,58	22,58	22,59	22,76	23,00
	27,49	27,49	27,80	27,43	27,54
	30,07	30,07	30,03	29,26	29,91
	32,56	32,56	32,64	32,82	33,59
	34,99	34,99	35,55	35,60	35,41
	39,98	39,98	40,29	41,08	40,60
	42,50	42,51	42,88	41,65	43,65
	45,00	45,00	44,91	45,23	45,38
47,49	47,49	47,45	46,88	48,34	
52,44	52,43	51,97	53,83	52,15	
54,98	54,98	55,24	55,44	55,48	
60,03	60,04	60,87	58,84	62,33	
64,93	64,93	64,76	65,79	65,40	
74,36	74,36	74,66	74,21	74,58	
79,84	79,85	80,38	79,19	80,13	
84,97	84,97	84,84	84,55	84,52	
89,82	89,81	89,04	90,14	89,64	
99,00	98,99	98,39	98,55	95,56	
Validação	6,02	5,50	5,20	5,68	5,33
	12,54	12,09	11,74	11,83	12,82
	25,03	24,59	24,65	26,23	25,87
	39,02	39,77	39,49	39,56	39,32
	49,97	50,84	50,65	50,53	49,90
	69,95	70,25	70,13	70,05	68,82
	94,98	94,58	94,50	94,61	93,97

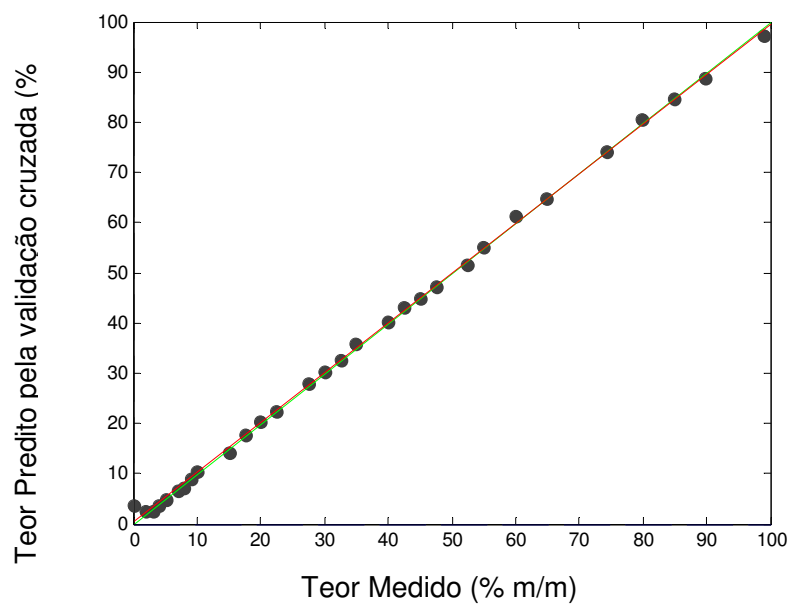


a)

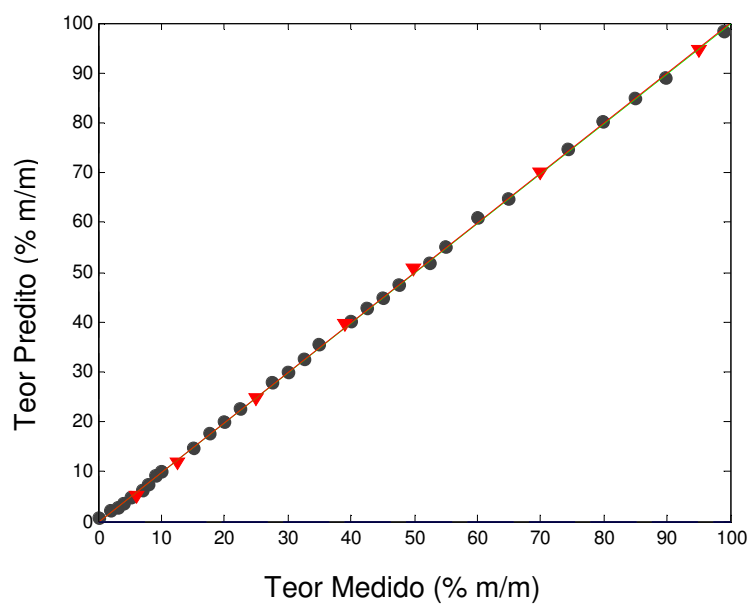


b)

Figura 4.4 – Valores preditos pela validação cruzada pelo modelo 1

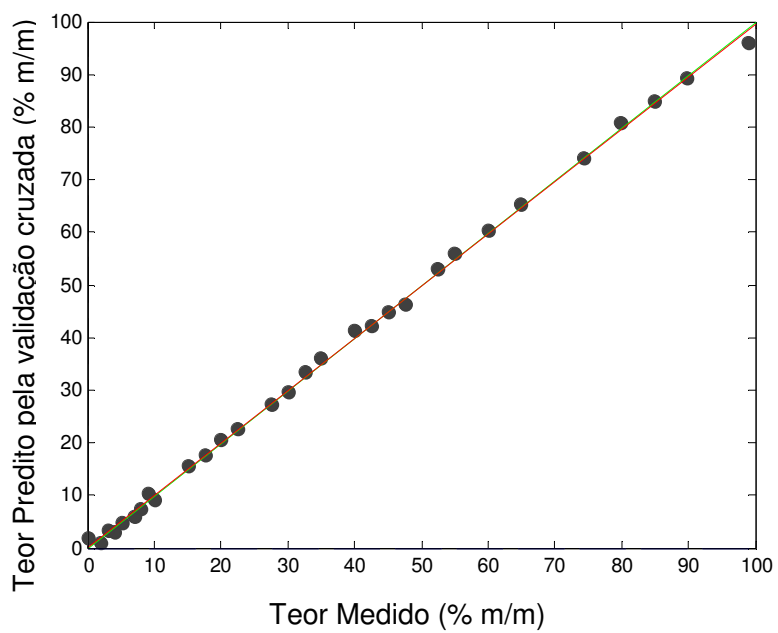


a)

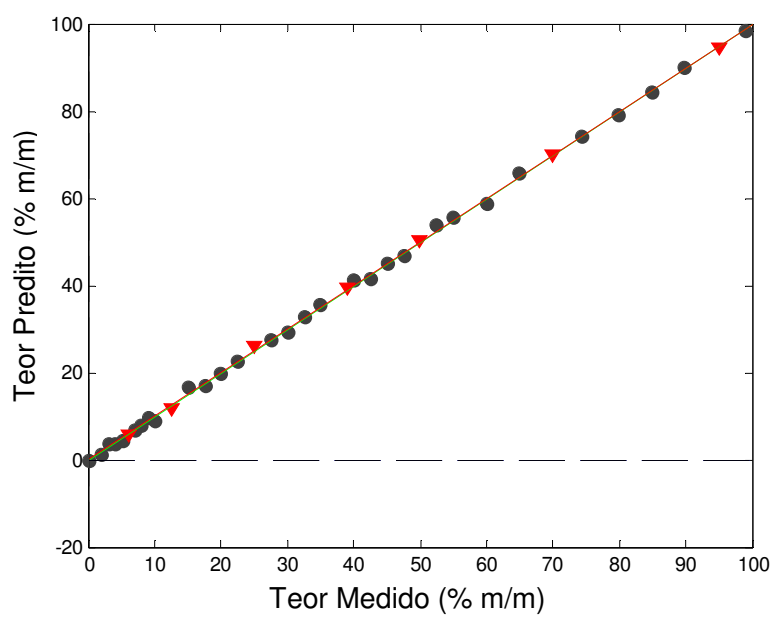


b)

Figura 4.5 – Valores preditos pela validação cruzada pelo modelo 2

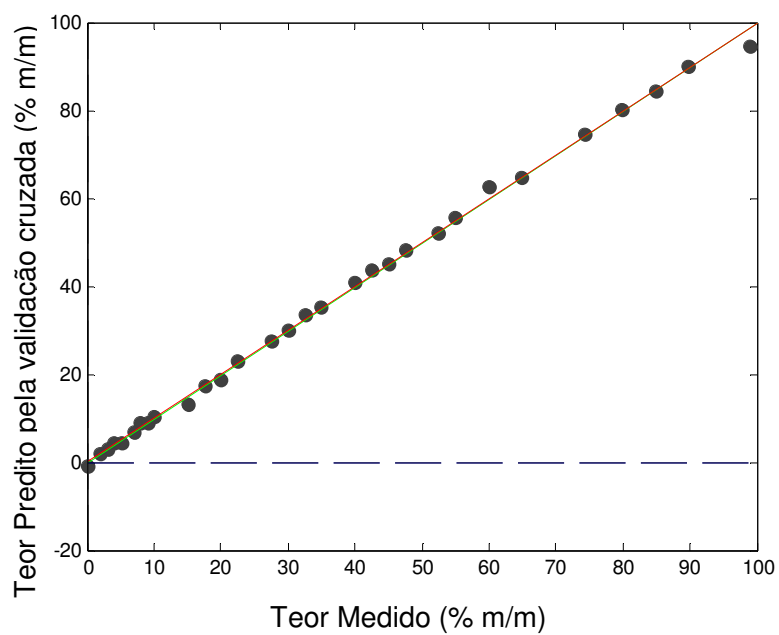


a)

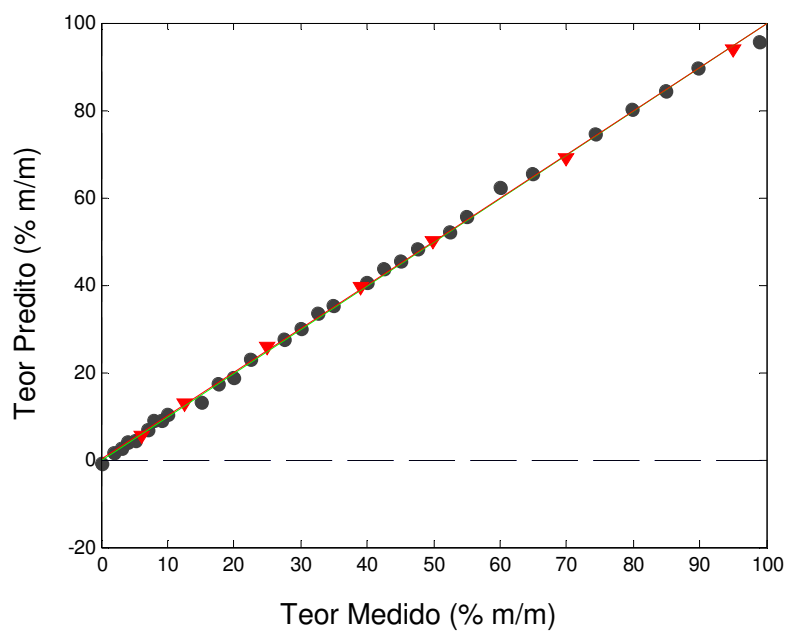


b)

Figura 4.6 – Valores preditos pela validação cruzada pelo modelo 3.



a)



b)

Figura 4.7 – Valores preditos pela validação cruzada pelo modelo 4.

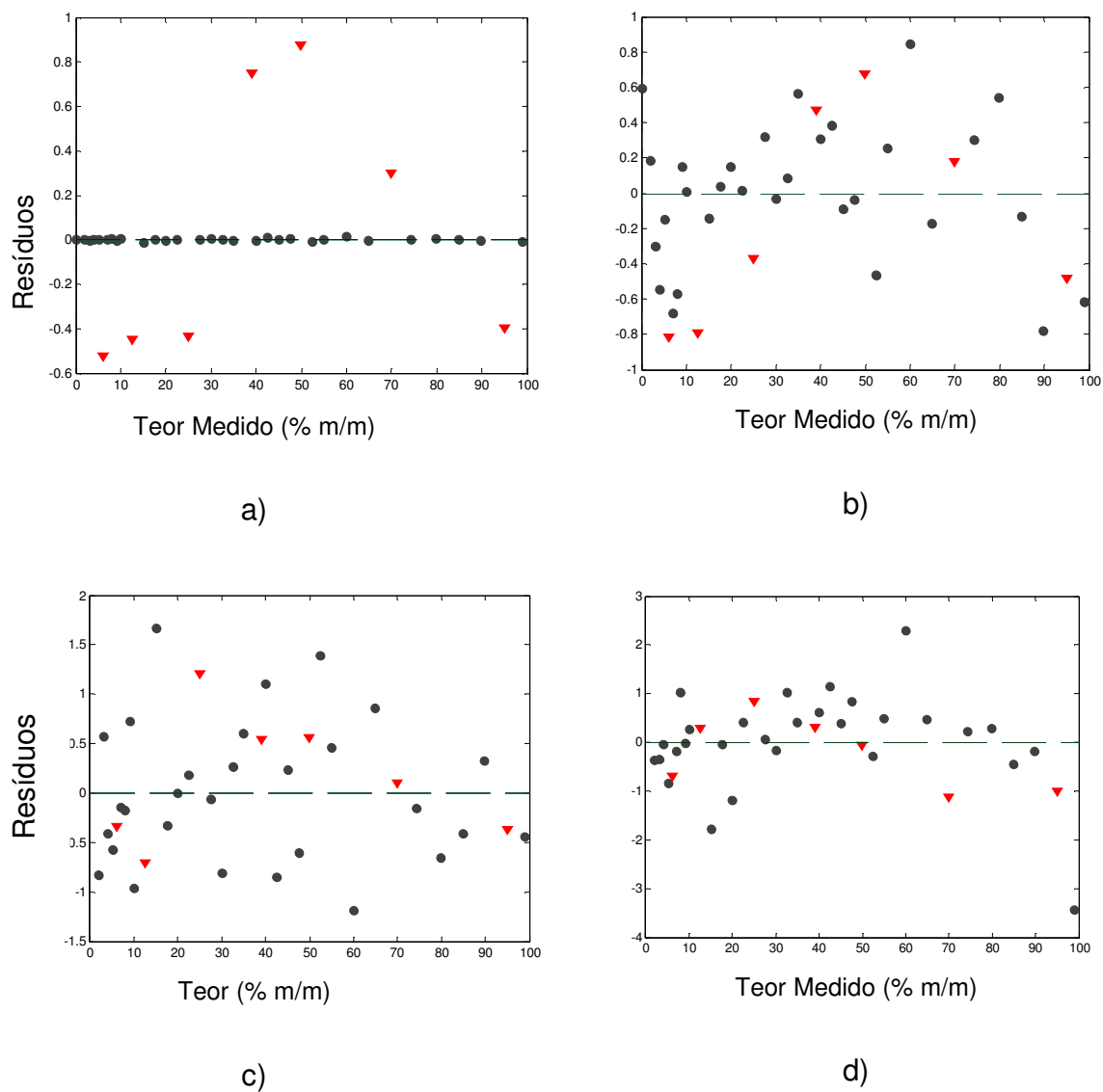


Figura 4.8 – Gráfico dos resíduos versus valores de referência. a) modelo 1, b) modelo 2, c) modelo 3, d) modelo 4.

4.2.1 – Predição do teor de ésteres das amostras pela calibração PLS

Para continuação dos trabalhos foi utilizado o modelo 1 por possuir menor valor de RMSEP. Foram feitas predições das amostras do controle 1 e 2 (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Predição das amostras do controle 1 e 2

Controle	Concentração (%)	Controle	Concentração (%)
1 - 12	0,75	2 - 12	2,50
1 - 24	1,84	2 - 24	0,64
1 - 36	1,57	2 - 36	ND
1 - 48	2,15	2 - 48	1,98
1 - 60	3,04	2 - 60	4,17
1 - 72	1,95	2 - 72	1,87
1 - 84	2,82	2 - 84	4,51
1 - 96	1,61	2 - 96	3,83
1 - 108	4,48	2 - 108	1,13
1 - 120	2,48	2 - 120	0,53

ND = Não determinado

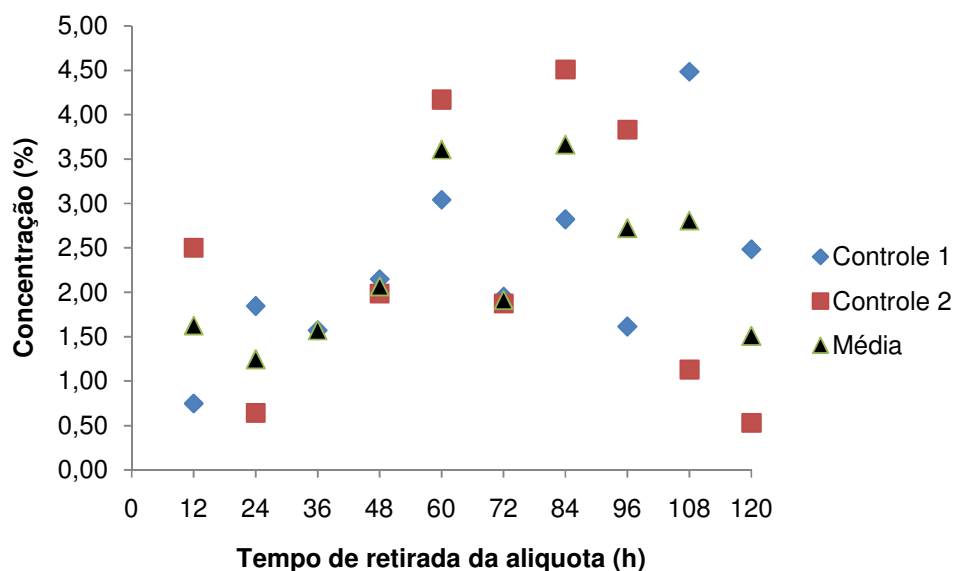


Figura 4.9 – Predição de teores de ésteres nos controles pelo método 1 (Pré-processamento OSC e CM)

De acordo com a Figura 4.9, o perfil das amostras do controle 1 e 2 se mostrou aleatório em função do tempo de retirada da alíquota e a concentração predita variou de 0,53 a 4,51 ambas no controle 2. A predição das amostras dos fungos está disposta na Tabela 4.6. Observa-se que para os fungos *Mucor plumbeus*, *Penicillium citrinum* (Figura 4.10 a) e b) respectivamente), *Penicillium janthinellum*, *Rhizopus stolonifer* (Figura 4.11 b) e c) respectivamente) e *Aspergillus Níger* (Figura 4.12), os valores se apresentaram semelhantes aos do controle 1 e 2 bem como para o perfil apresentados na figura 4.9.

Nas amostras do fungo *S. racemosum* obtiveram-se valores entre 6,11 % (m/m) na triplicata 3 e 39,50 % (m/m) na triplicata 1. A discrepância entre os valores das triplicatas se deve a não padronização da adição dos esporos o que acarretou maior crescimento de biomassa no ensaio 1. O perfil descrito na Figura 4.10 c) para este fungo mostra, no geral, um crescimento inicial, seguido de uma estabilização e depois um pequeno decréscimo. Este decréscimo sugere que reações de hidrólise foram mais eficientes que as reações de transesterificação nesta região do gráfico. Para o fungo *R. oryzae* obteve-se valores de conversão entre 1,20 % m/m na triplicata 3 e 11,13 % (m/m) na triplicata 2. Na Figura 4.11 a) nota-se um perfil semelhante ao do *S. racemosum* a exceção da triplicata 2.

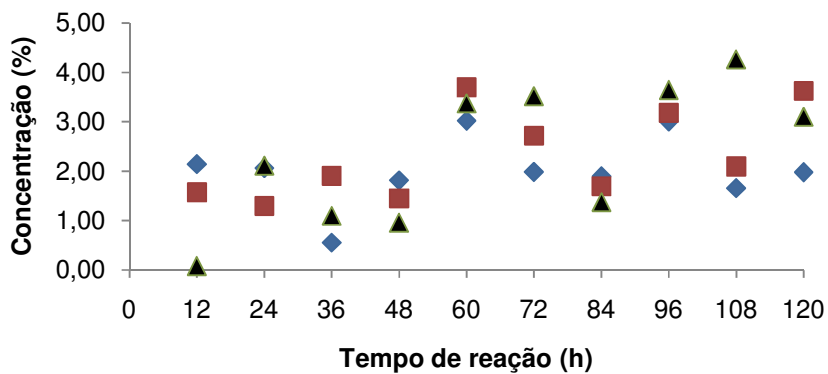
Diversos trabalhos têm sido realizados na síntese de ésteres a partir do fungo *R. oryzae*. Zeng *et al* (2006) estudou os parâmetros de cultivo da espécie e aplicou as células fúngicas na síntese de Biodiesel a partir de óleos vegetais. Sob condições otimizadas conseguiram 86% de rendimento adicionando metanol em três etapas. Ban *et al.* (2000) aplicou lipases imobilizadas de *R. oryzae* e alcançou rendimento de 90% de ésteres metílicos na presença de 15% de água. Li *et al.* (2008) utilizou meio de t-butanol na síntese de ésteres metílicos a partir de ácido oléico e células de *R. oryzae* imobilizadas. Um rendimento de 91% foi alcançado em 48 horas de reação na ausência de água.

A lipase de *S. racemosum* foi citada em alguns trabalhos (CHOPRA; CHANDER, 1981 & CHOPRA *et al.* 1982) onde reportaram os fatores que afetam a produção da lipase e a sua atividade lipolítica. Até então não existiam trabalhos aplicando a lipase de *S. racemosum* na síntese de ésteres alquílicos.

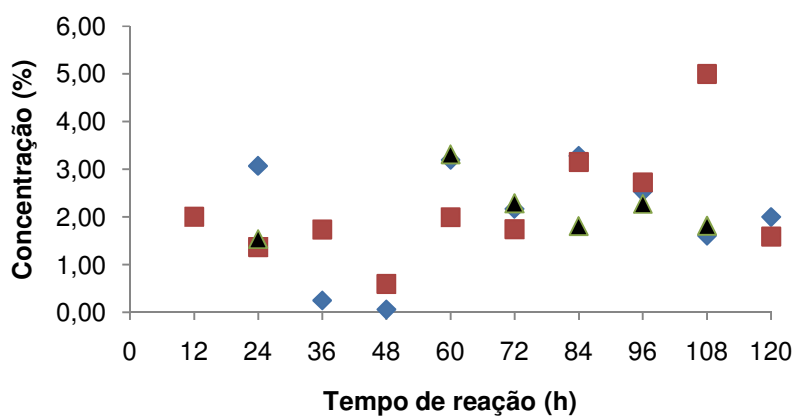
Tabela 4.6 – Valores preditos de teores de ésteres referentes ao modelo 1.

Replicata /Tempo (h)	<i>Mucor plumbeus</i> (% m/m)	<i>Penicillium citrinum</i> (% m/m)	<i>Syncephalastrum racemosum</i> (% m/m)	<i>Rhizopus oryzae</i> (% m/m)	<i>Penicillium janthinellum</i> (% m/m)	<i>Rhizopus stolonifer</i> (% m/m)	<i>Aspergillus Níger</i> (% m/m)
1 - 12	2,1	ND	17,9	4,3	1,3	1,6	0,3
1 - 24	2,1	3,1	27,0	6,3	0,9	2,2	1,0
1 - 36	0,6	0,3	23,3	4,0	1,7	1,3	ND
1 - 48	1,8	0,1	27,4	4,8	ND	1,1	3,6
1 - 60	3,0	3,2	35,0	6,2	2,2	2,6	2,4
1 - 72	2,0	2,2	37,5	6,9	2,1	1,7	3,7
1 - 84	1,9	3,3	37,8	7,3	2,0	1,9	4,3
1 - 96	3,0	2,5	38,2	7,9	4,0	5,9	4,9
1 - 108	1,7	1,6	39,5	7,5	1,8	3,3	3,3
1 - 120	2,0	2,0	32,0	5,7	2,6	2,6	1,8
2 - 12	1,6	2,0	9,9	8,3	2,2	3,8	2,6
2 - 24	1,3	1,4	15,1	9,5	1,8	4,2	1,8
2 - 36	1,9	1,7	11,5	3,1	1,2	2,2	1,7
2 - 48	1,5	0,6	11,2	6,0	1,4	3,0	2,9
2 - 60	3,7	2,0	16,7	10,8	3,0	3,7	2,2
2 - 72	2,7	1,7	14,9	9,8	3,0	4,2	2,8
2 - 84	1,7	3,2	15,3	11,1	2,5	4,8	2,2
2 - 96	3,2	2,7	15,9	7,6	4,7	5,6	4,1
2 - 108	2,1	5,0	14,1	10,3	2,0	3,1	2,8
2 - 120	3,6	1,6	12,2	6,6	2,0	4,2	1,0
3 - 12	0,1	ND	6,1	2,6	2,6	3,1	0,2
3 - 24	2,1	1,5	14,0	1,8	0,8	ND	2,4
3 - 36	1,1	ND	10,4	2,8	3,0	0,2	1,9
3 - 48	1,0	ND	9,9	1,2	0,4	3,0	3,4
3 - 60	3,4	3,3	12,9	3,7	3,4	4,1	4,6
3 - 72	3,5	2,3	12,1	3,9	3,3	2,3	4,3
3 - 84	1,4	1,8	12,3	3,2	3,5	4,3	4,4
3 - 96	3,6	2,3	15,8	2,9	3,0	3,1	5,1
3 - 108	4,3	1,8	13,4	2,5	1,9	2,1	4,6
3 - 120	3,1	ND	11,2	1,8	1,6	2,6	3,2

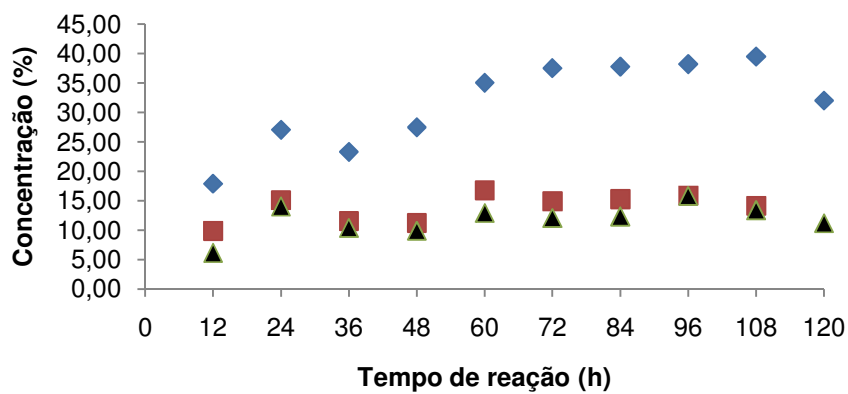
ND – não detectado



a)

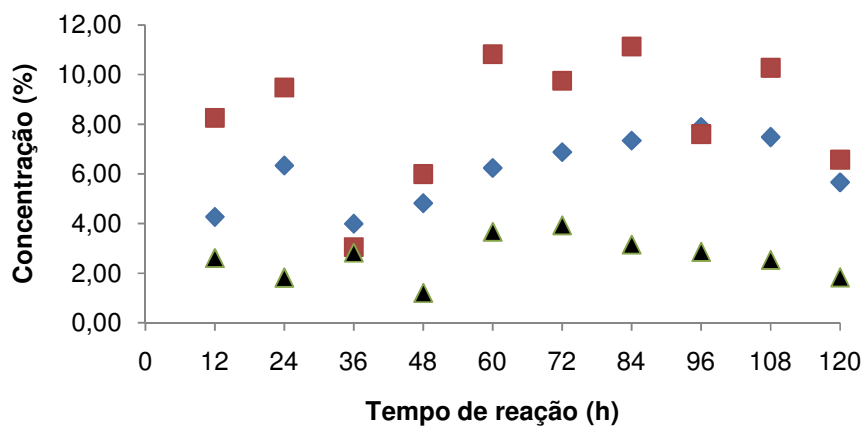


b)

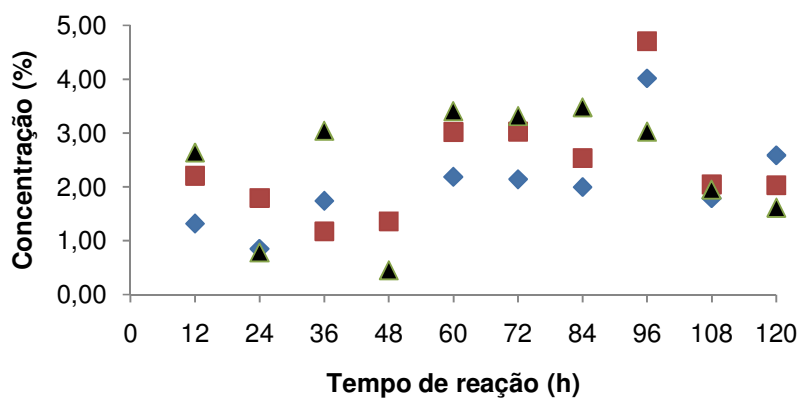


c)

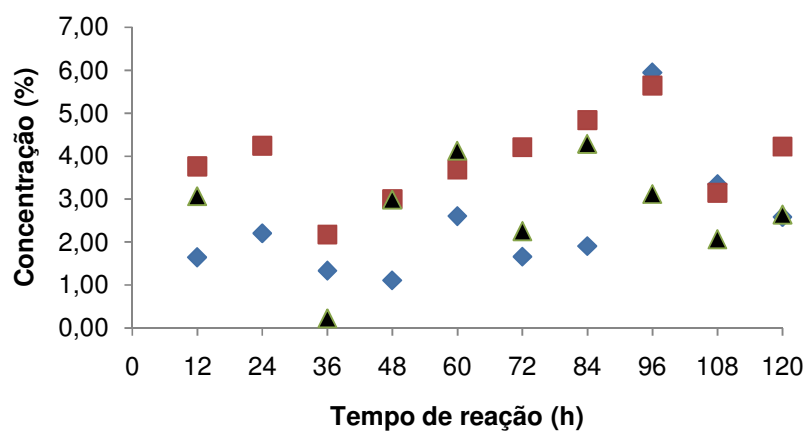
Figura 4.10 – Concentração de ésteres formados em função do tempo de reação a) *Mucor plumbeus*, b) *Penicillium citrinum* e c) *Syncephalastrum racemosum*



a)



b)



c)

Figura 4.11 – Concentração de ésteres formados em função do tempo de reação a) *Rhizopus oryzae*, b) *Penicillium janthinellum* e c) *Rhizopus stolonifer*

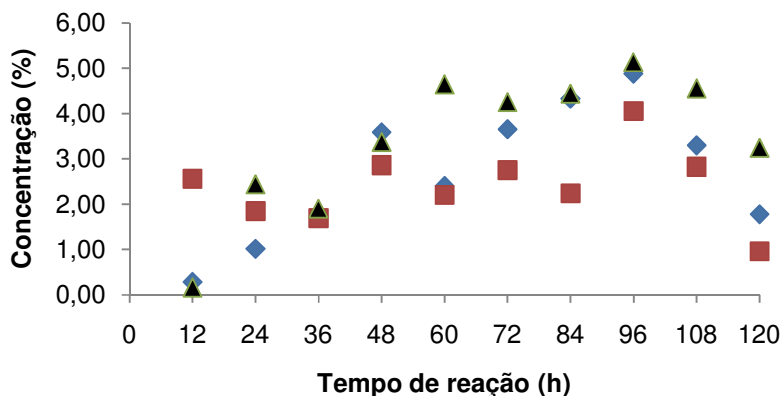


Figura 4.12 – Concentração de ésteres formados em função do tempo de reação para o fungo *Aspergillus Níger*.

4.2.2. Avaliação da Calibração e validação para o modelo 1 a partir das regiões de maiores pesos do modelo

Uma análise da Figura 4.13 permitiu identificar as variáveis que apresentaram maior peso no modelo 1 (Pré-processamento OSC e CM). As regiões entre $1720,38\text{ cm}^{-1}$, $1444,58$ e $1427,22\text{ cm}^{-1}$, $1215,10$ e $1051,13\text{ cm}^{-1}$ e os números de ondas $1749,31$, $1432,94$, $1195,78$, $1139,85$ e $1103,20\text{ cm}^{-1}$ tiveram maior influência no modelo.

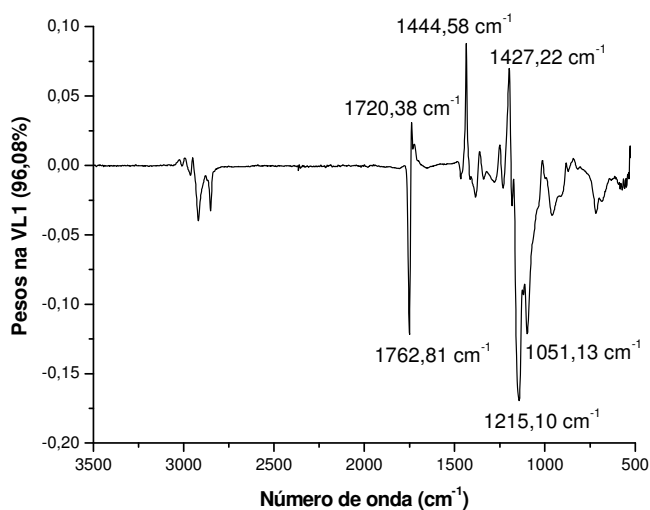


Figura 4.13 – Pesos dos comprimentos de onda no modelo 1.

O parâmetros gerados pela calibração PLS do modelo 1 nas regiões selecionadas estão dispostas na Tabela 4.7 e foram comparados com aqueles obtidos antes da seleção das variáveis. Apenas o erro RMSEC foi maior comparando-se com aquele obtido pelo modelo sem a seleção de variáveis, o que não prejudicou a calibração visto os alto valores de $R^2_{\text{calibração}}$ e $R^2_{\text{validação cruzada}}$ e o perfil apresentado pela curva de regressão (Figura 4.14 b)). O valor de t_{bias} para o modelo é menor que o valor de $t_{\text{crítico}}$ com 95% de confiança. Portanto, o erro sistemático incluído no modelo multivariado pode ser considerado não significativo e desprezado.

Foram necessárias quatro variáveis latentes para descrever este modelo (Tabela 4.7 e Figura 4.14 a)). Estas explicaram 100% da variância do bloco x (valores de absorvâncias) e 99,99% da variância do bloco y (concentrações). O valor de RPD aumentou em relação ao modelo anterior demonstrando uma pequena melhoria na exatidão do modelo de calibração.

Tabela 4.7 – Valores dos parâmetros da calibração/validação (PLS) para determinação do conteúdo (%) de ésteres metílicos para o modelo 1 nas regiões entre 1762,81 e 1720,38 cm^{-1} , 1444,58 e 1427,22 cm^{-1} , 1215,10 e 1051,13 cm^{-1} .

Parâmetros	Modelo 1 (Regiões selecionadas)
Pré-processamento	OSC e CM
LV	4
$R^2_{\text{calibração}}$	1,000
$R^2_{\text{validação cruzada}}$	1,000
RMSEC (% m/m)	0,253
RMSECV (% m/m)	0,655
RMSEP (% m/m)	0,529
Bias (% m/m)	0,051
SDV (% m/m)	0,664
t_{bias}^*	0,42 (2,45)
RPD	60,33

* Valores entre parêntes referem-se a t para 6 graus de liberdade e 95% de confiança. OSC = Correção de Sinal Ortogonal; CM = Centrado na Média; LV = Variável Latente; SDV = Standard Deviation of Validation.

O gráfico dos resíduos (Figura 4.14 c) mostra que os dados da calibração estão dispostos em torno do eixo zero evidenciando que a regressão linear é adequada. Os pontos em vermelho em 40 e 50 % m/m demonstram ser outliers, ou seja, pontos que não são adequados a calibração. Porém estão dentro do nível de confiança de 95% de probabilidade.

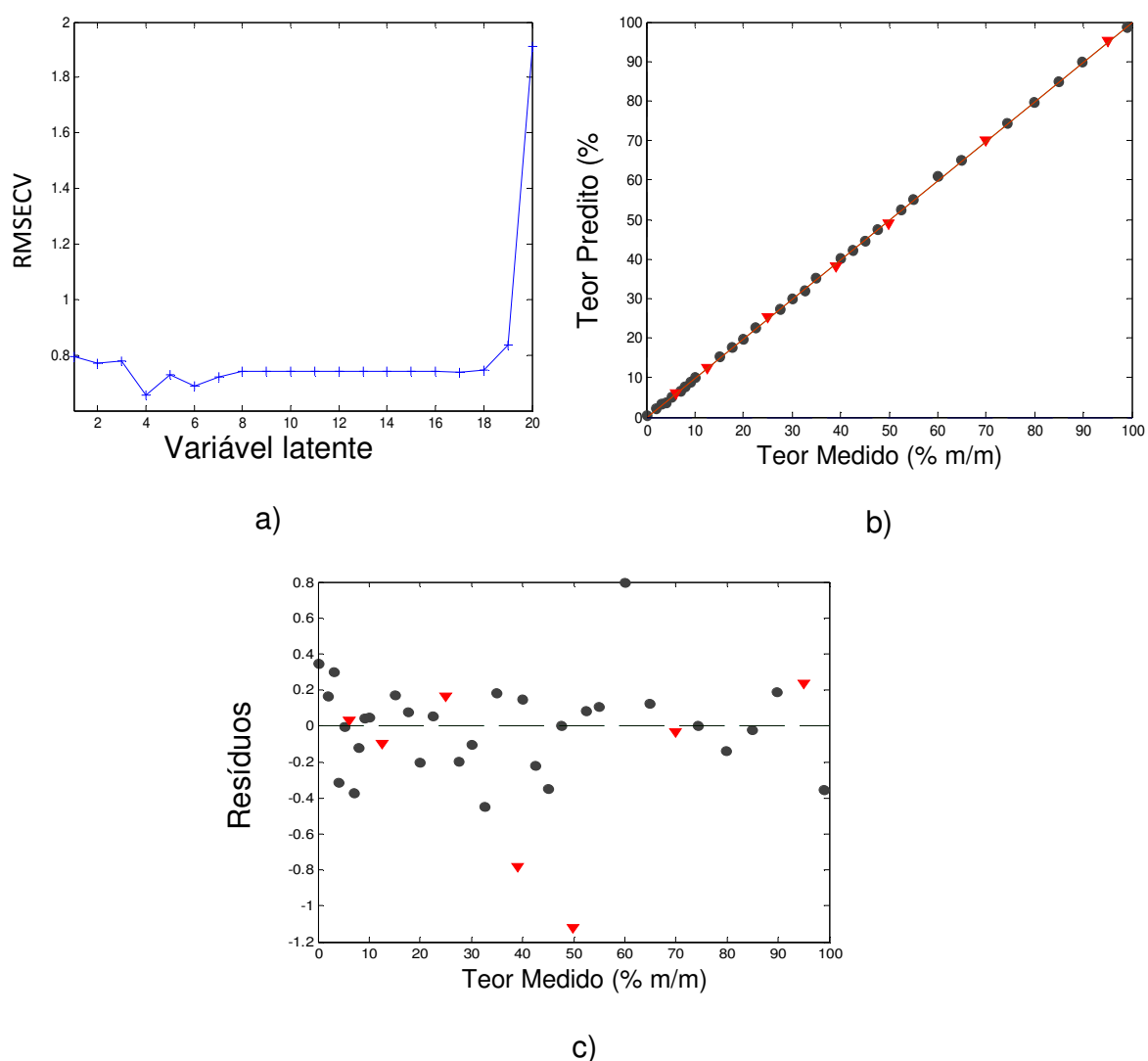


Figura 4.14 – Gráficos relacionando o a) erro RMSECV com o numero de variáveis latentes, b) os teores preditos e medidos e c) os resíduos da curva de calibração.

Na Tabela 4.8 e 4.9 encontram-se os valores de referência da calibração e validação bem como os valores preditos pelo modelo.

Tabela 4.8 – Valores preditos para as amostras de calibração e validação.

	Teor Medido (% m/m)	Teor Predito (% m/m)	Teor Predito CV (% m/m)
Calibração	0,00	0,35	2,70
	2,01	2,18	2,20
	3,10	3,40	3,50
	4,11	3,80	3,80
	5,08	5,08	5,10
	7,05	6,68	7,00
	7,99	7,87	7,90
	9,01	9,05	9,10
	10,01	10,06	10,00
	15,05	15,22	15,10
	17,52	17,60	17,40
	19,98	19,78	19,70
	22,58	22,63	22,70
	27,49	27,29	27,30
	30,07	29,97	30,00
	32,56	32,11	32,20
	34,99	35,18	35,20
	39,98	40,13	40,20
	42,50	42,27	42,30
	45,00	44,65	44,70
	47,49	47,49	47,40
	52,44	52,53	52,50
	54,98	55,09	55,10
	60,03	60,83	61,00
	64,93	65,05	65,10
	74,36	74,36	74,30
79,84	79,71	79,60	
84,97	84,95	84,90	
89,82	90,01	90,20	
99,00	98,64	97,10	

Tabela 4.9 – Valores preditos para as amostras de validação.

	Teor Medido (% m/m)	Teor Predito (% m/m)
Validação	6,02	6,05
	12,54	12,44
	25,03	25,19
	39,02	38,24
	49,97	48,85
	69,95	69,91
	94,98	95,22

4.2.3 – Predição do teor de ésteres alquílicos formados nas amostras dos fungos *S. racemosum* e *R. oryzae* pelo modelo com seleção de variáveis

A partir dos resultados vistos anteriormente, foram selecionados os fungos *S. racemosum* e *R. oryzae* para analisar a adequabilidade dos dados ao modelo com seleção das variáveis. Os valores previstos das amostras controle e das amostras dos fungos estão dispostos na Tabela 4.10 e 4.11 respectivamente.

Como será visto mais adiante nos resultados da cromatografia gasosa, houve a síntese de ésteres metílicos e t-butílicos. Embora o modelo não fosse adequado para prever o teor de ésteres totais, foi adequado para esta fase inicial do trabalho que teve a proposta de triagem inicial dos fungos que deram melhores resultados.

Tabela 4.10. Determinação do teor de ésteres alquílicos das amostras do controle 1 e 2

Replicata/Tempo (h)	Concentração (%)	Replicata/Tempo (h)	Concentração (%)
1 - 12	ND	2 - 12	ND
1 - 24	ND	2 - 24	1,43
1 - 36	ND	2 - 36	ND
1 - 48	ND	2 - 48	0,14
1 - 60	1,84	2 - 60	3,18
1 - 72	2,20	2 - 72	2,81
1 - 84	3,48	2 - 84	3,71
1 - 96	1,54	2 - 96	2,94
1 - 108	ND	2 - 108	ND
1 - 120	ND	2 - 120	ND

ND = Não determinado

Tabela 4.11 - Valores preditos de teores de ésteres alquílicos referentes ao modelo 1.

Replicata/Tempo (h)	<i>Syncephalastrum racemosum</i> (% m/m)	<i>Rhizopus oryzae</i> (% m/m)
1 - 12	ND	ND
1 - 24	1,52	0,20
1 - 36	ND	ND
1 - 48	3,13	0,14
1 - 60	12,53	2,35
1 - 72	17,97	4,28
1 - 84	18,44	5,30
1 - 96	20,52	4,81
1 - 108	23,32	4,93
1 - 120	4,11	2,62
2 - 12	ND	0,09
2 - 24	ND	ND
2 - 36	ND	ND
2 - 48	0,62	ND
2 - 60	7,09	5,51
2 - 72	8,34	5,34
2 - 84	7,13	5,71
2 - 96	8,60	3,38
2 - 108	7,14	5,84
2 - 120	2,41	ND
3 - 12	ND	ND
3 - 24	0,64	0,53
3 - 36	ND	ND
3 - 48	ND	ND
3 - 60	5,90	2,42
3 - 72	5,38	3,22
3 - 84	6,38	3,23
3 - 96	8,88	3,63
3 - 108	7,23	2,49
3 - 120	2,88	ND

ND = Não determinado

4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC)

Normalmente, a detecção de compostos orgânicos através da espectroscopia de absorção no ultravioleta se dá nas transições n ou π para o estado excitado π^* . A energia necessária para essas transições situam-se na região espectral entre 200 e 700 nm (SKOOG *et al.*, 2002). Além disso, ésteres alquílicos e acilgliceróis não absorvem em comprimentos maiores que 220 nm (Holcapek *et al.*, 1999). Nesse sentido não se observará nos cromatogramas ésteres de ácidos graxos que não contenham insaturações na cadeia carbônica.

A Figura 4.15 mostra o perfil cromatográfico de uma amostra de óleo de soja pura, uma amostra de B100 e uma amostra de controle retirada no tempo de 60 h. No cromatograma do biodiesel a), a região dos ésteres se encontra entre 4,5 e 6,5 minutos. Nota-se também uma quantidade quase imperceptível de traços de triacilgliceróis não esterificados na região entre 15 e 18 minutos. Uma pequena quantidade de ácidos graxos livres permaneceu no meio sem sofrer esterificação.

Com relação ao cromatograma do óleo de soja b), observa-se a região dos triacilgliceróis entre 14 e 19 minutos e outra região, de 7 a 12 minutos, referente aos mono- e diacilgliceróis. Pela figura, não se observa a presença de ácidos graxos livres.

O cromatograma do controle [c)] é semelhante ao cromatograma do óleo de soja. Porém, devido à presença de água no meio reacional, ocorreu uma reação de hidrólise de parte dos triacilgliceróis levando a formação de uma pequena quantidade de ácidos graxos livres.

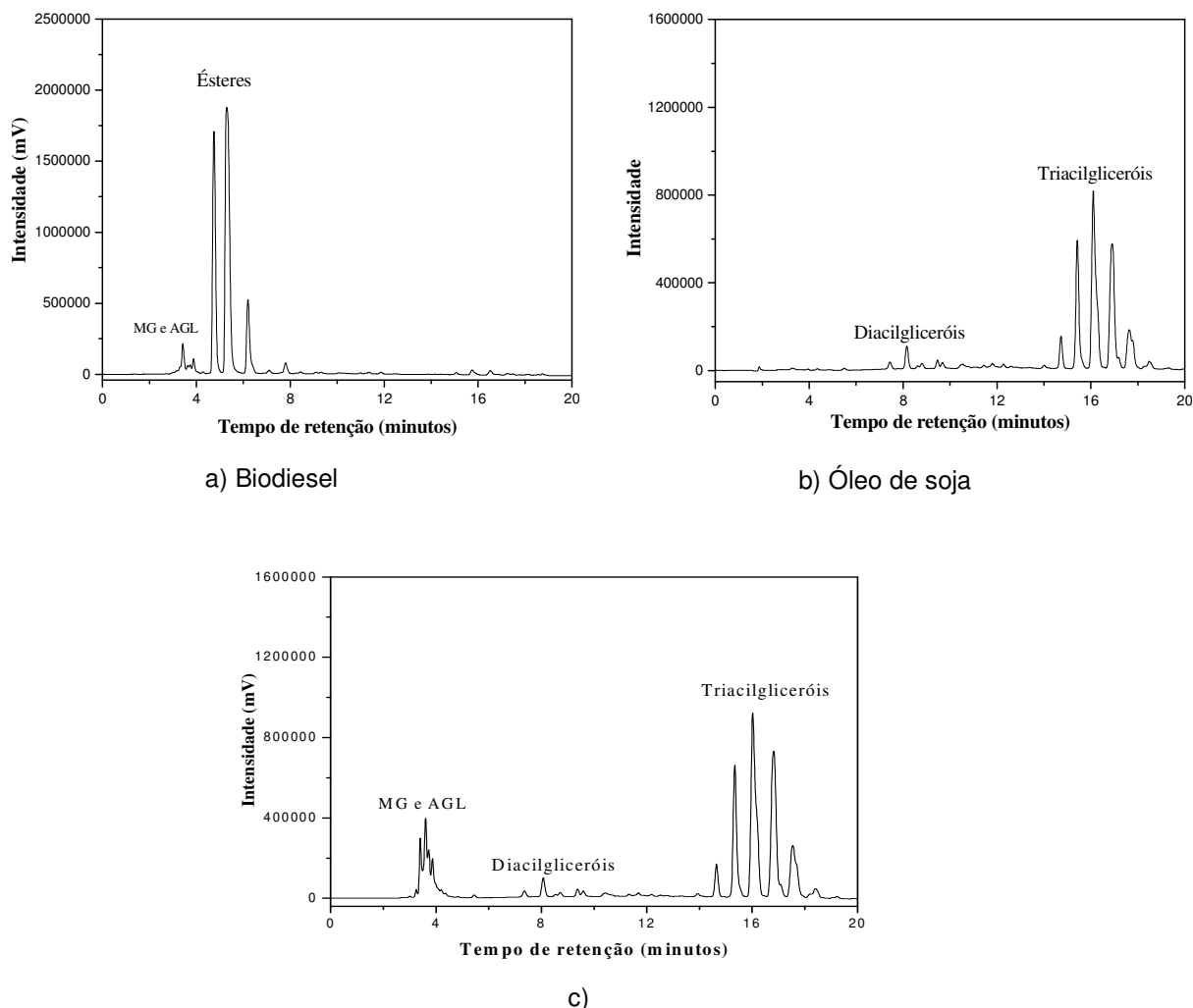


Figura 4.15 – Cromatogramas das amostras de a) biodiesel de soja, b) óleo de soja e c) controle (60 h).

Obtiveram-se os cromatogramas com as amostras dos fungos no tempo de 60 horas de reação da triplicata 1 (Figura 4.16). A sequência de saída dos compostos se resume em: ácidos graxos, monoacilgliceróis, ésteres alquílicos, diacilgliceróis, triacilgliceróis (Holkapec *et al.*, 1999). Não se observaram os picos correspondentes aos ésteres metílicos e butílicos para os fungos *M. plumbeus*, *P. citrinum*, *P. Janthinellum*, *R. stolonifer* e *A. Niger* os quais não foram utilizados em análises posteriores. Já para os fungos *R. oryzae* e *S. racemosum* observou-se a presença dos picos de ésteres na região entre 4,5 e 6,5 minutos. A análise comparativa dos cromatogramas f) e g)

permitiu identificar o fungo *S. racemosum* como melhor produtor da enzima lipase com base nas intensidades dos sinais relativos aos ésteres alquílicos.

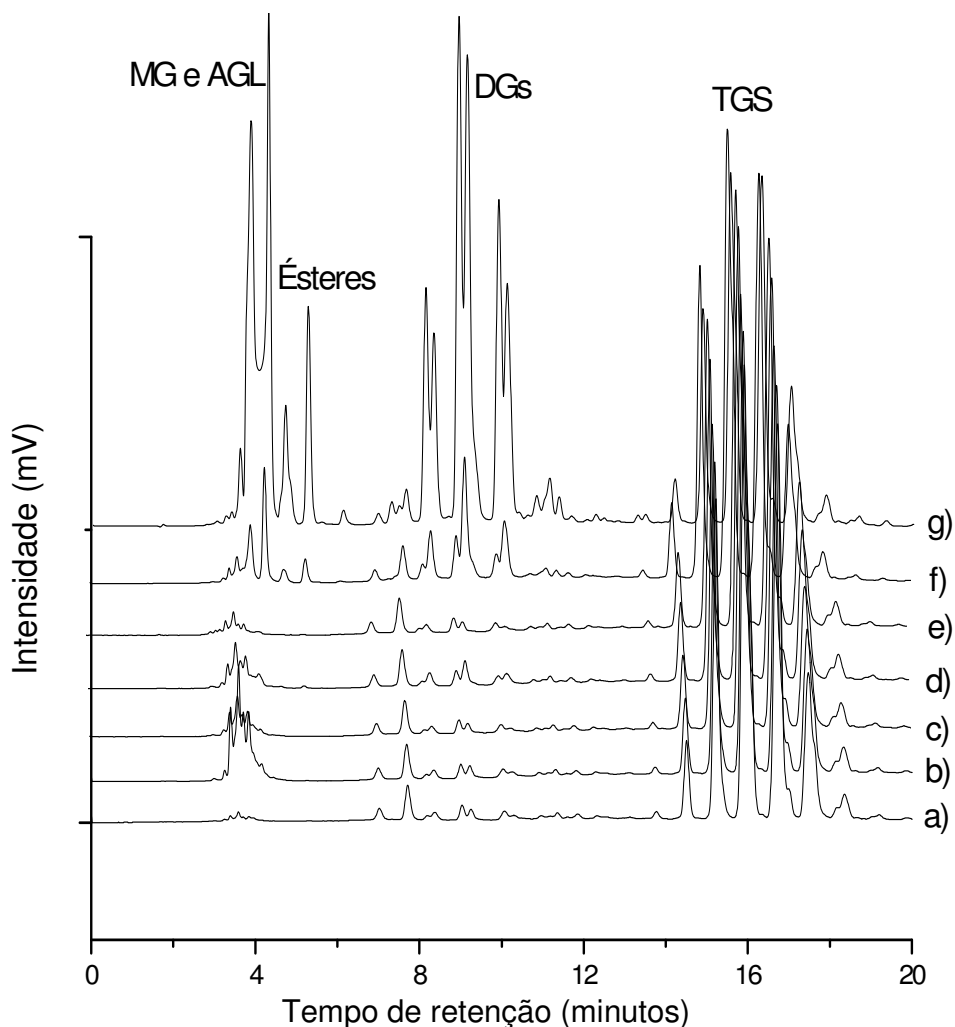
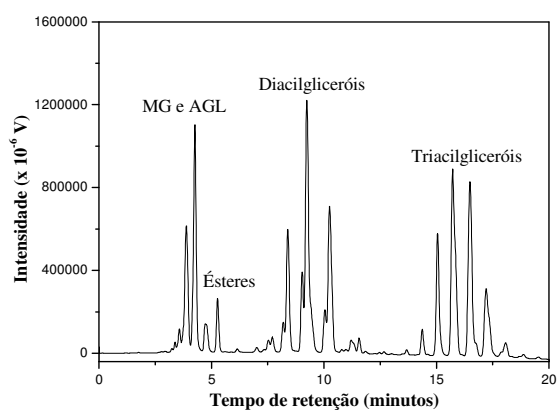
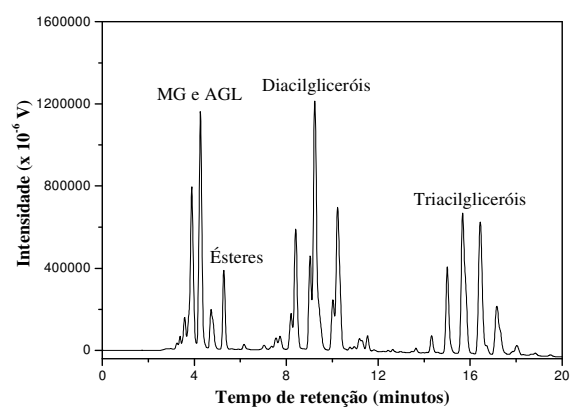


Figura 4.16 – Cromatogramas obtidos por HPLC das amostras retiradas no tempo de 60 horas de reação. a) *Mucor plumbeus*, b) *Penicillium citrinum*, c) *Penicillium janthinellum*, d) *Rhizopus stolonifer*, e) *Aspergillus niger*, f) *Rhizopus oryzae* e g) *Syncephalastrum racemosum*.

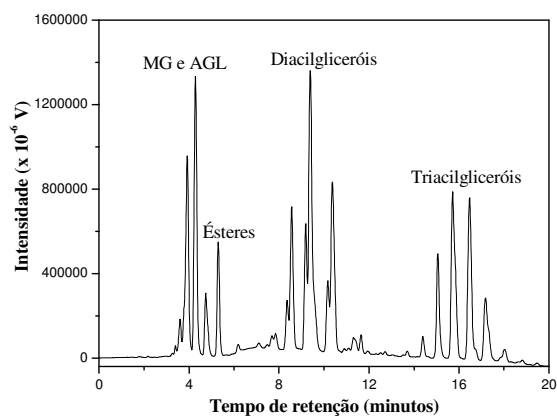
A partir desses dados estudaram-se mais profundamente os cromatogramas dos fungos *R. oryzae* e *S. racemosum* nos tempos de 12, 24, 36, 96, 108 e 120 h (Figura 4.17 e 4.18)



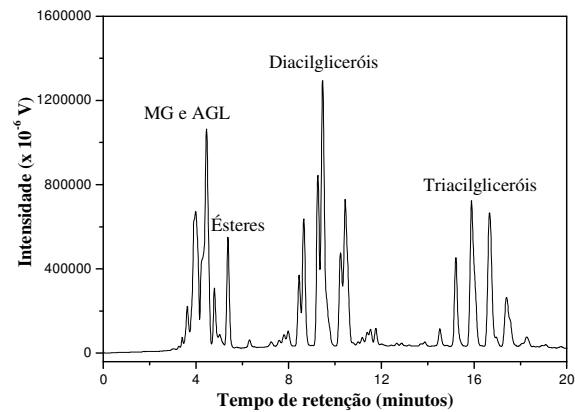
a)



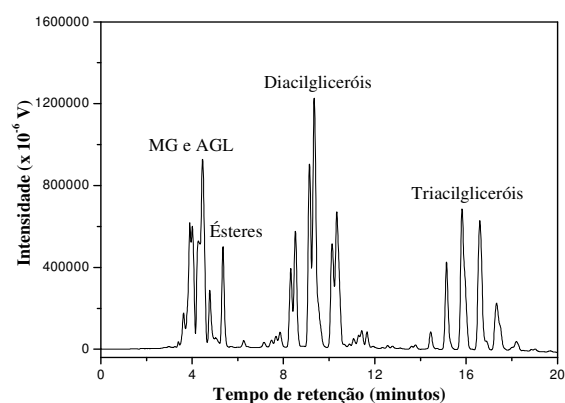
b)



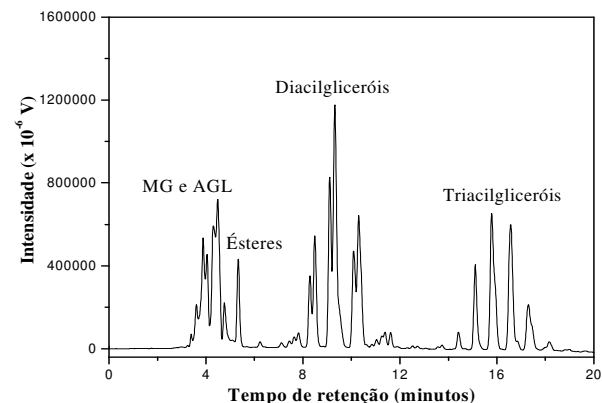
c)



d)

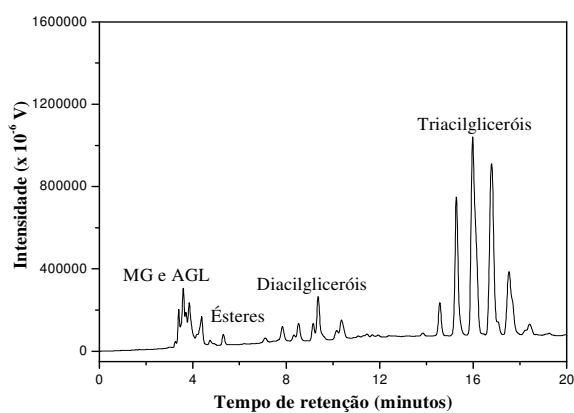


e)

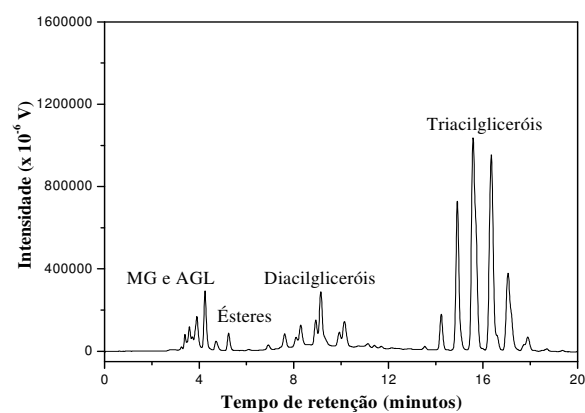


f)

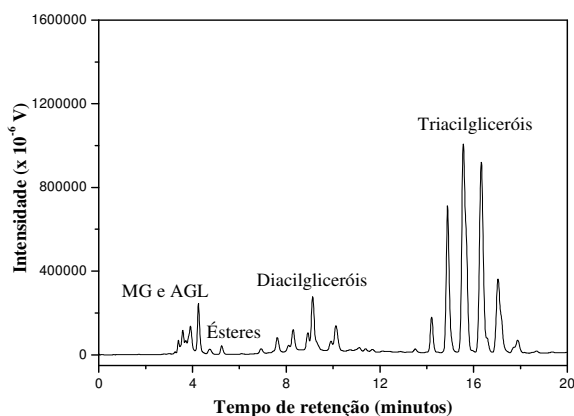
Figura 4.17 – Cromatogramas obtidos por HPLC das alíquotas retiradas no tempo de a) 12 h, b) 24 h, c) 36 h, d) 96 h, e) 108 h, f) 120 h para o fungo *Syncephalastrum racemosum*.



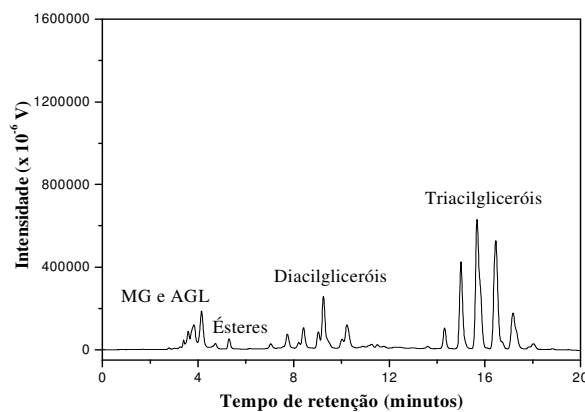
a)



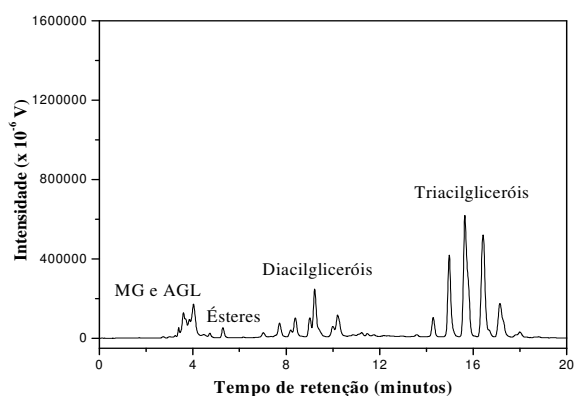
b)



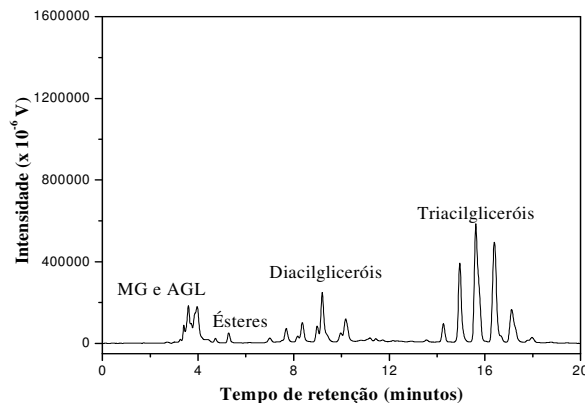
c)



d)



e)



f)

Figura 4.18 – Cromatogramas obtidos por HPLC das alíquotas retiradas no tempo de a) 12 h, b) 24 h, c) 36 h, d) 96 h, e) 108 h, f) 120 h para o fungo *Rhizopus oryzae*.

O método usado foi adequado para separação dos ésteres e triacilgliceróis e visualização das regiões de compostos semelhantes. No entanto não houve uma boa resolução na separação dos ácidos graxos livres, monoacilgliceróis e diacilgliceróis. Os componentes da mistura reacional da fase orgânica foram separados em aproximadamente 20 minutos.

Constata-se pelas Figuras 4.17 e 4.18 a redução dos picos dos triacilgliceróis e o aumento dos picos relativos aos ésteres, ácidos graxos livres, monoacilgliceróis e diacilgliceróis em relação ao tempo de retirada das alíquotas. No entanto, é bastante evidente a maior eficiência da lipase do fungo *S. racemosum* na síntese dos ésteres alquílicos. A pequena porcentagem de transesterificação pode ser devida a grande quantidade de água do meio o que causou um deslocamento do equilíbrio da reação em favor da hidrólise em detrimento a reação de transesterificação ou devido à desativação da enzima pelos álcoois adicionados na reação.

4.4. CG/EM

Com o objetivo de se identificar os produtos de reação obtidos pelo fungo *Syncephalastrum racemosum*, a amostra relativa ao tempo de reação de 60 horas, foi analisada pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, conforme apresentado na Figura 4.19. De acordo com esta figura o produto da reação é constituído de 10 compostos.

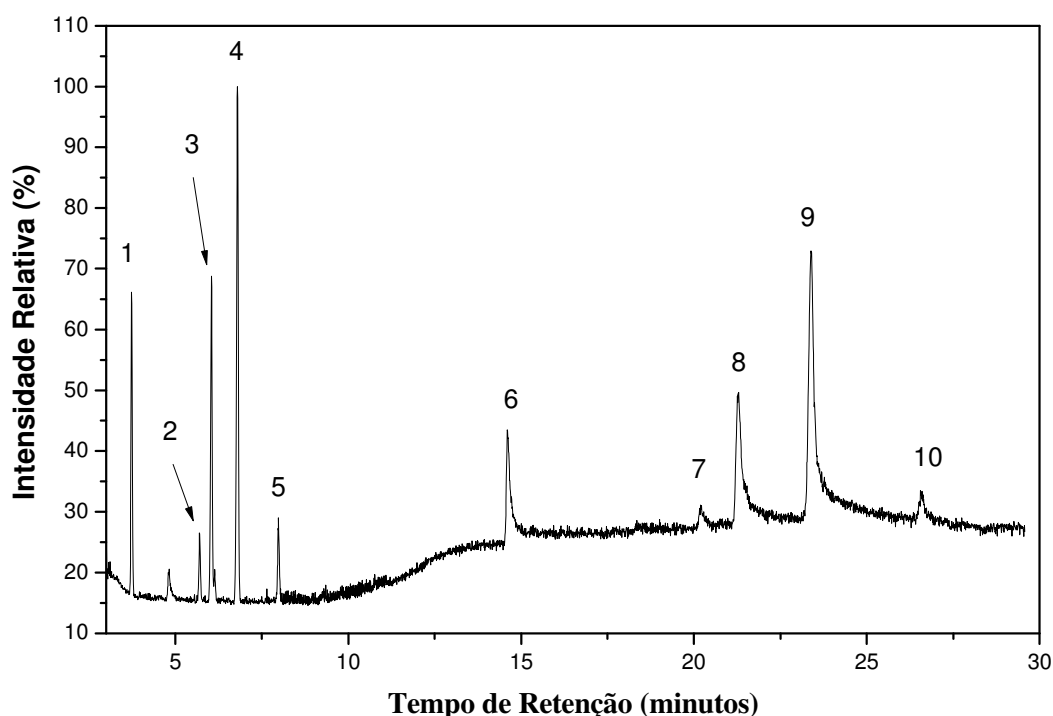


Figura 4.19 – TIC da alíquota retirada no tempo de reação de 60h. **1**- hexadecanoato de metila; **2**- octadecanoato de metila; **3**- (Z)-9-octadecenoato de metila; **4**- (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metila; **5**- (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoato de metila; **6**- hexadecanoato de t-butila; **7**- octadecanoato de t-butila; **8**- (Z)-9-octadecenoato de t-butila; **9**- (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de t-butila; **10**- (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoato de t-butila.

Observam-se na Figura 4.19 dois conjuntos de picos, o primeiro composto pelos picos 1 a 5 e outro pelos picos 6-10. Os espectros relativos a cada composto estão mostrados no anexo B.

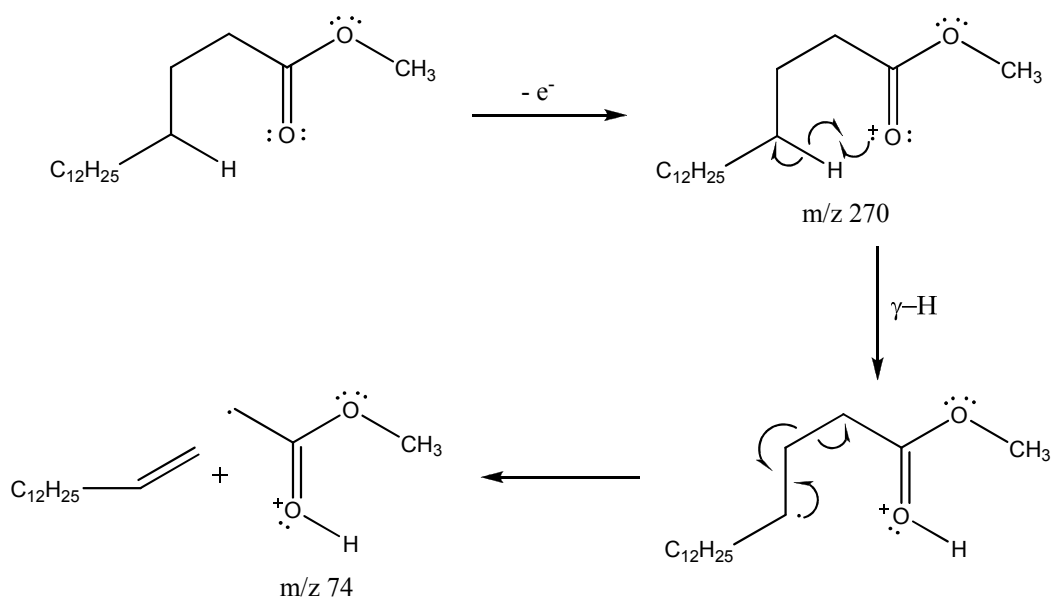
A Tabela 4.12 apresenta os dados relativos a cada um dos compostos.

Tabela 4.12 – Dados do conjunto de ésteres alquílicos encontrados via CG-FID.

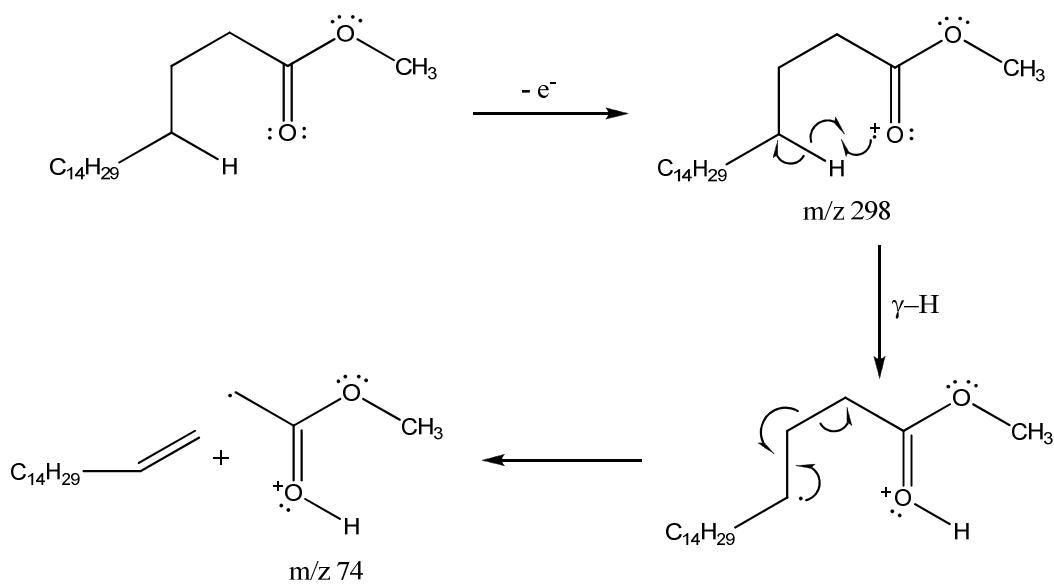
	t_r (min)	Atribuição	Íon Molecular (m/z)	Pico Base (m/z)	Similaridade (%)	Formula
1	3.727	hexadecanoato de metila	270	74	94	$C_{17}H_{34}O_2$
2	5.693	octadecanoato de metila;	298	74	87	$C_{19}H_{38}O_2$
3	6.043	(Z)-9-octadecenoato de metila	296	55	95	$C_{19}H_{36}O_2$
4	6.793	(Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metila;	294	67	95	$C_{19}H_{34}O_2$
5	7.985	(Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoato de metila;	292	79	87	$C_{19}H_{32}O_2$
6	14.602	hexadecanoato de t-butila	312	45	-	$C_{20}H_{44}O_2$
7	20.193	octadecanoato de t-butila;	340	45	-	$C_{22}H_{42}O_2$
8	21.293	(Z)-9-octadecenoato de t-butila;	338	45	-	$C_{22}H_{40}O_2$
9	23.385	(Z,Z)-9,12-octadecadienoato de t-butila	336	32	-	$C_{22}H_{38}O_2$
10	26.593	(Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoato de t-butila	334	32	-	$C_{22}H_{36}O_2$

O primeiro conjunto de picos foi identificado como os ésteres metílicos derivados dos ácidos graxos do óleo de soja.

Os ésteres metílicos saturados apresentam um pico base de m/z 74 que se origina da fragmentação do íon molecular. Este íon molecular sofre um rearranjo de McLafferty onde o hidrogênio γ é transferido ao átomo de oxigênio da carbonila. Em seqüência ocorre uma clivagem entre os carbonos α e β formando-se o íon m/z 74, conforme mostrado na Figura 4.20. Este íon é bastante estável como é mostrado pelas estruturas de ressonância da Figura 4.21.



a)



b)

Figura 4.20 – Exemplo de mecanismo de fragmentação de ésteres metílicos saturados de formação do íon molecular e pico base.

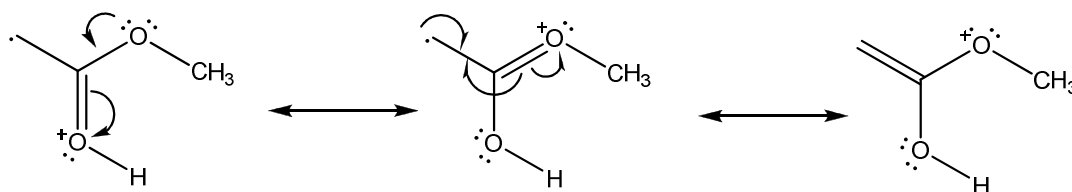


Figura 4.21 – Estruturas de ressonância do íon m/z 74.

A presença de insaturação leva a mecanismos diferenciados de fragmentação e conseqüentemente a picos base de m/z diferentes como mostrado na Tabela 4.12. No caso do (Z)-9-octadecenoato de metila (Figura 4.22), sofre um rearranjo de McLafferty com conseqüente formação do íon $[M-32]^+$. Em seguida, forma-se o íon m/z 69 pela quebra de uma ligação C-C. O pico base surgiu da transferência da ligação dupla (não mostrada no mecanismo) do carbono 9 para o carbono 16 seguida de uma clivagem da ligação C-C.

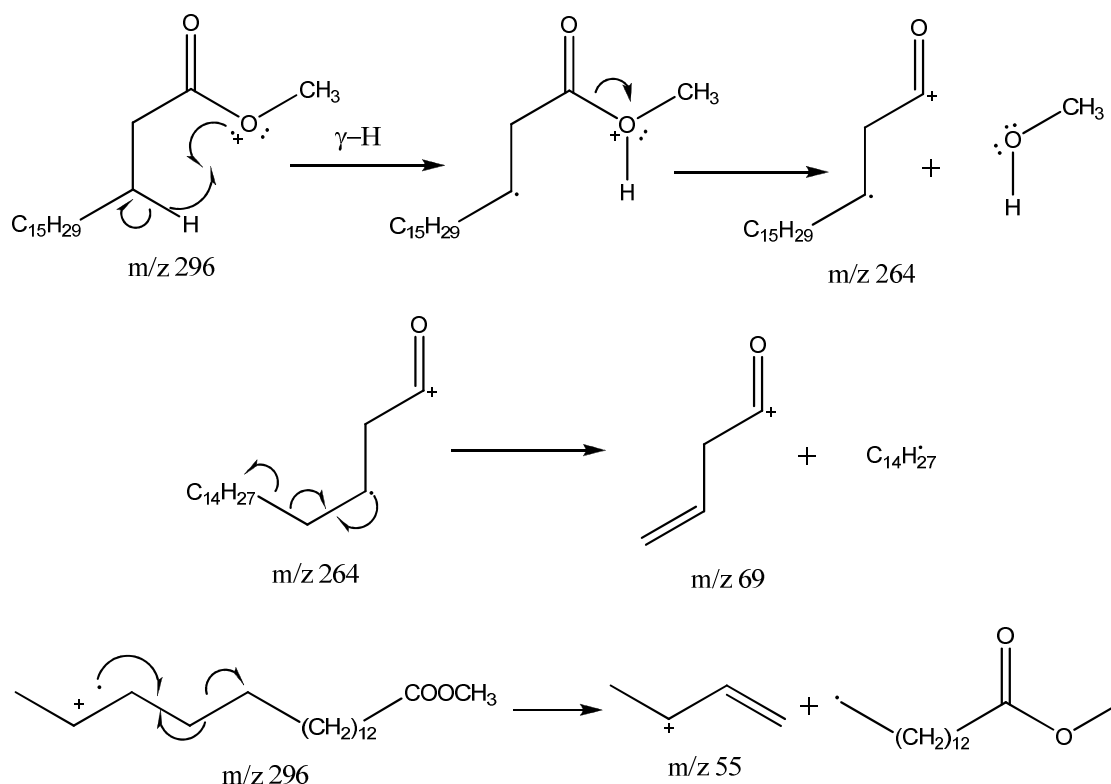


Figura 4.22 – Mecanismos de fragmentação do (Z)-9-octadecenoato de metila.

O mecanismo de fragmentação do (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metila (C18:2) é mostrado na Figura 4.23. O pico $[M-31]^+$ surge da clivagem da ligação C-O adjacente à carbonila. A formação do íon $C_5H_7^+$ ocorre com uma transferência de uma ligação dupla (não mostrada no mecanismo) seguida de clivagem da ligação C-C.

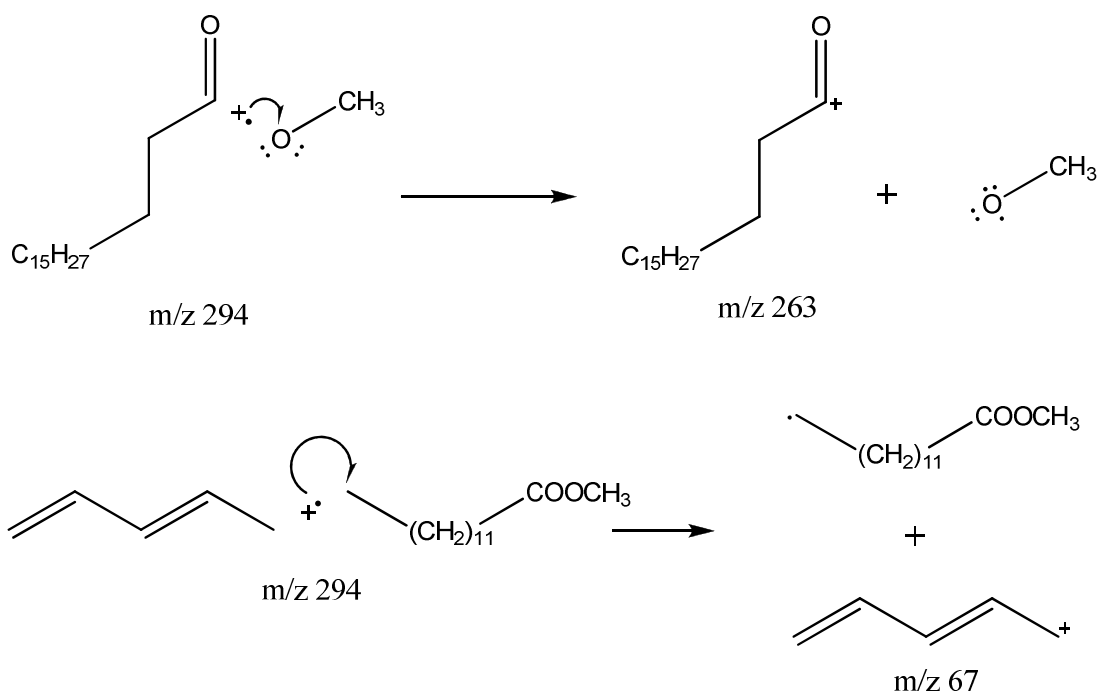


Figura 4.23 – Mecanismo de fragmentação do (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metila (C18:2).

Já para o Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoato de metila (C18:3) o pico base é m/z 79. Segundo Budzikiewicz (1967), o mecanismo de fragmentação gera o cátion ciclohexadienila que é facilitado na conformação cis da molécula (Figura 4.24).

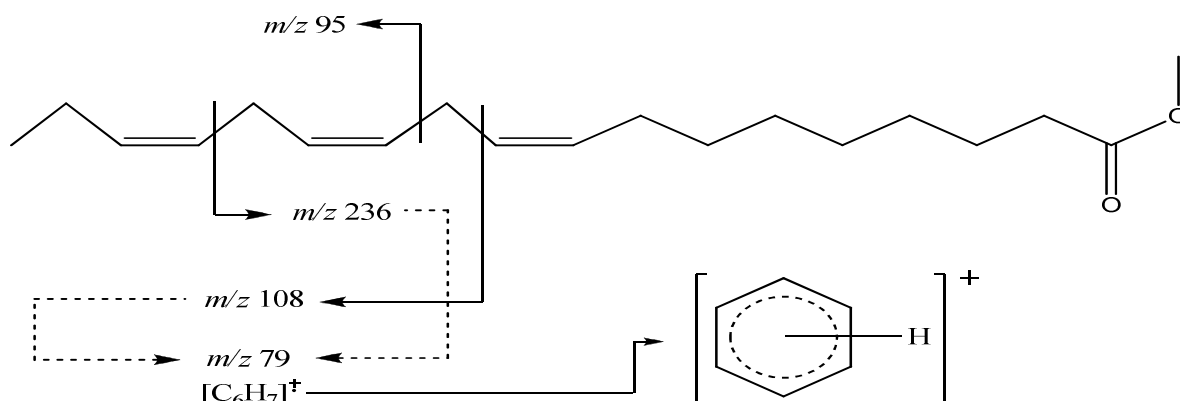


Figura 4.24 - Proposta de formação dos íons m/z 236, 108, 95, 79 (íon ciclohexadienila) do (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoato de metila.

O segundo conjunto que apresenta picos mais deformados (alargamento de banda) e com cauda foram atribuídos aos ésteres butílicos derivados dos mesmos ácidos graxos, uma vez que meio reacional havia a presença dos dois alcoóis, e assim os ésteres formados poderiam ter sido gerados por ambos os alcoóis presentes. A identificação pelos espectros de massas destes compostos ficou muito comprometida por uma série de razões. A ausência do sinal do íon molecular destes compostos gerou a dificuldade de comparação com a biblioteca, a falta de padrões cromatográficos comerciais que pudessem ser utilizados como referência e os padrões de fragmentação destes compostos são inexistentes na literatura.

Uma tentativa para tentar confirmar a nossa suposição foi o cálculo do fator capacidade k' para todos os compostos. Segundo Schomburg (1990) há uma correlação linear entre o $\log k'$ e o número de carbonos (NC) de uma série homóloga, que possuam cadeias alquílicas longas, dependendo da polaridade e da geometria do grupo funcional. A retenção de membros homólogos de diferentes classes de compostos e suas posições na escala de $\log k'$ bem como a diferença entre os diversos homólogos depende da polaridade e do número de carbono de um grupo funcional. Mesmo as ramificações de grupamentos metila de uma cadeia alquílica ou uma dupla ligação podem ser consideradas como grupos funcionais, se eles estão localizados no final de uma cadeia longa e não no meio desta. Assim, os ésteres alquílicos que contêm uma, duas ou três insaturações não podem ser considerados como da mesma série

homóloga. Desta forma, a partir da Tabela 4.13 construiu-se o gráfico da Figura. 4.25. Apesar de termos apenas dois membros de cada uma das séries homólogas é possível visualizar duas retas de inclinação distintas, sendo que a curva para os ésteres butílicos apresenta valores maiores por serem estes ligeiramente mais polares do que os seus respectivos ésteres metílicos.

Tabela 4.13 - Cálculo dos parâmetros cromatográficos: tempo ajustado (t') e fator capacidade (k')

Ésteres	t_r (min)	t_m (min)	t' (min)	K'	$\log k'$	NC	Insat.
1	3,727	0,789	2,938	3,724	0,571	17	0
2	5,693	0,789	4,904	6,215	0,793	19	0
3	6,043	0,789	5,254	6,659	0,823	19	1
4	6,793	0,789	6,004	7,610	0,881	19	2
5	7,985	0,789	7,196	9,120	0,960	19	3
6	14,602	0,789	13,813	17,507	1,243	20	0
7	20,193	0,789	19,404	24,593	1,391	22	0
8	21,293	0,789	20,504	25,987	1,415	22	1
9	23,385	0,789	22,596	28,639	1,457	22	2
10	26,593	0,789	25,804	32,705	1,515	22	3

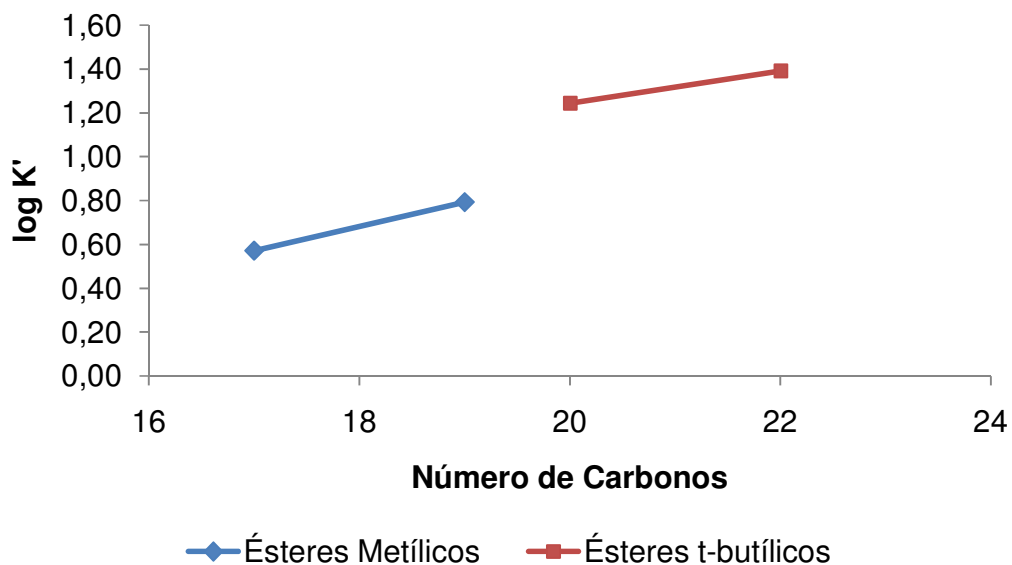


Figura 4.25 – $\log k'$ versus número de carbono para as séries homólogas de ésteres metílicos saturados e ésteres butílicos saturados.

A análise da Tabela 4.13 permitiu verificar a semelhança entre os valores dos índices de retenção dos ésteres metílicos e dos ésteres butílicos comparando-se os compostos com mesmo número de carbonos e mesmo número de insaturações. Verificaram-se também linhas de tendências polinomiais semelhantes entre as equações de regressão construídas para os ésteres metílicos e butílicos comprovando a presença de uma série homóloga (Figura 4.25).

Tabela 4.14 – Índice de retenção dos ésteres octadecanoato de metila; (Z)-9-octadecenoato de metila; (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metila; octadecanoato de t-butila; (Z)-9-octadecenoato de t-butila; (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de t-butila

Ésteres	Tempo de Retenção (min)	Número de carbonos	Número de insaturações	Índice de Retenção
1	3,727	16	0	
2	5,693	18	0	1688
3	6,043	18	1	1834
4	6,793	18	2	1842
5	7,985	18	3	

a	14,602	16	0	
b	20,193	18	0	1686
c	21,293	18	1	1836
d	23,385	18	2	1842
e	26,593	18	3	

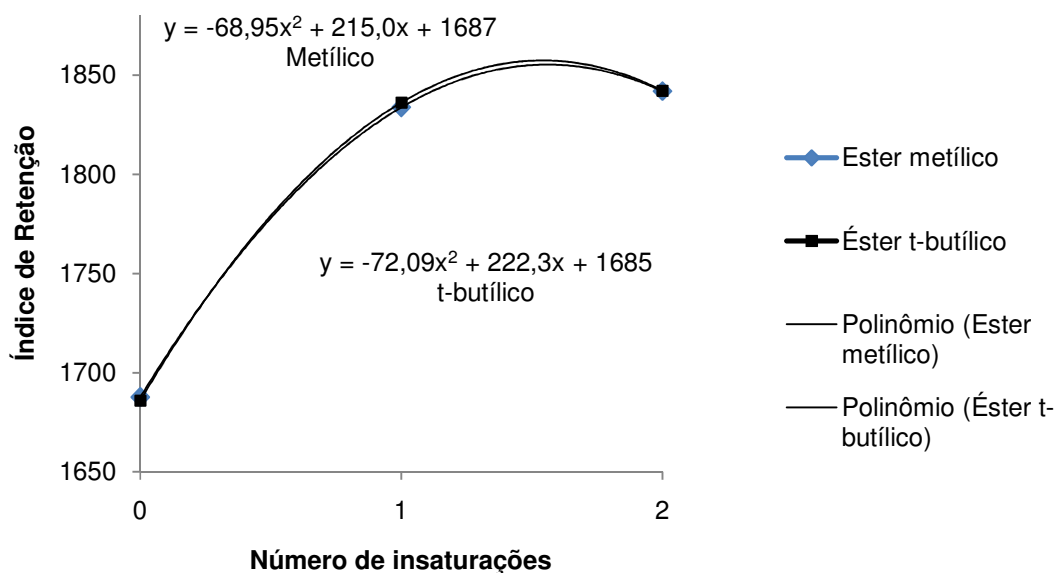


Figura 4.26 – Índice de retenção versus número de insaturações das moléculas C18:0, C18:1 e C18:2.

4.5. Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização por Chama (CG-FID)

As alíquotas das amostras do fungo *Syncephalastrum racemosum* foram analisadas por GC-FID visando à quantificação dos teores de ésteres metílicos e butílicos (Tabela 4.15 e Figura 4.27). Vale ressaltar aqui que na verdade os valores encontrados são semi-quantitativos em relação aos teores de ésteres butílicos e total de ésteres, pois o padrão interno utilizado foi o heptadecanoato de metila e a análise foi baseada na norma EN14103 que foi desenvolvida para análise de ésteres metílicos. Porém, isto possibilitou ter uma ordem de grandeza da extensão em que a reação de transesterificação ocorreu.

Tabela 4.15 – Quantificação dos ésteres sintetizados na reação com o fungo *Syncephalastrum racemosum*.

Tempo (horas)	Teor de Ésteres Totais (% m/m)	Teor de Ésteres Metílicos (% m/m)	Teor de Ésteres Butílicos (% m/m)
12	19,54	2,74	16,80
24	24,44	4,52	19,92
36	26,98	5,68	21,30
48	20,55	2,97	17,58
60	24,92	4,69	20,23
72	23,91	4,82	19,09
84	25,10	4,90	20,20
96	25,89	5,22	20,67
108	25,01	4,87	20,14
120	23,16	4,38	18,78

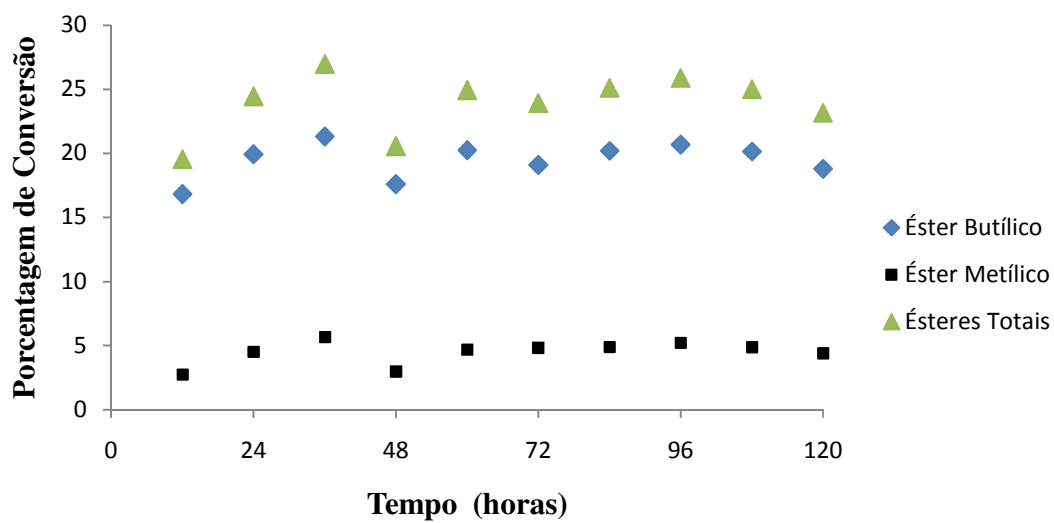


Figura 4.27 – Determinação da concentração de ésteres alquílicos das alíquotas do fungo *S. racemosum* analisadas por CG-FID.

4.6. Planejamento experimental

Foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com ponto central a fim de verificar a melhor condição experimental da reação de transesterificação do óleo de soja pelo fungo *S. racemosum*. Utilizou-se o tempo de reação até 24 h de acordo com os resultados da cromatografia gasosa com detector de chama. De acordo com o gráfico de pareto (Figura 4.28) a variável “tempo” foi considerada significativa e o efeito positivo, ou seja, um aumento do tempo de reação provoca um aumento do rendimento da reação. A variável “relação molar metanol/óleo de soja” foi considerada significativa e o efeito negativo, ou seja, um aumento do valor ocasiona um decréscimo no rendimento da reação. A curvatura também foi avaliada e neste experimento não houve efeito positivo e não significativo. Igualmente, a interação entre as variáveis não foi significativa, porém o efeito sendo positivo.

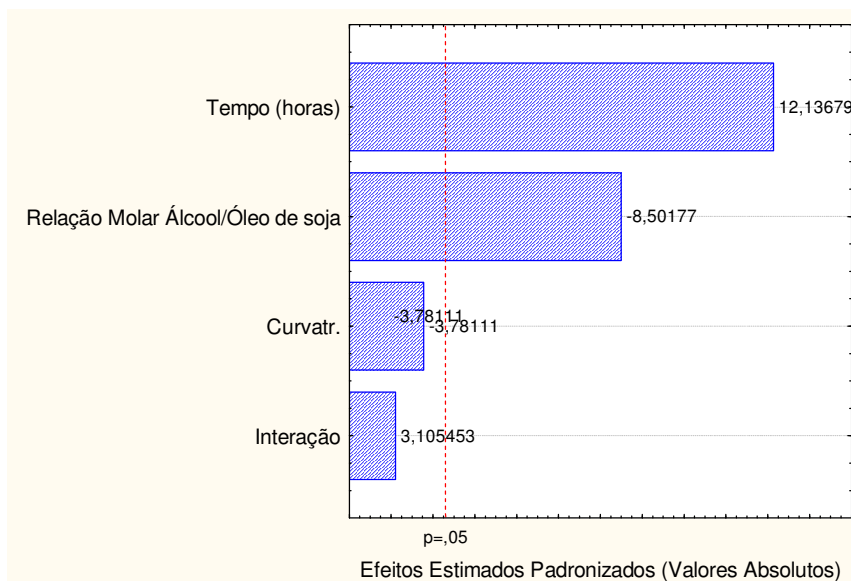


Figura 4.28 – Gráfico de pareto referente ao planejamento experimental para o fungo *S. racemosum*

A Figura 4.29 apresenta a superfície de resposta da % de conversão em ésteres alquílicos e sua projeção em função das variáveis razão molar e tempo. A inclinação em direção ao seu ponto máximo sugere que as condições experimentais

devem ser alteradas no sentido de se aumentar o tempo de reação e diminuir a relação molar álcool/óleo de soja.

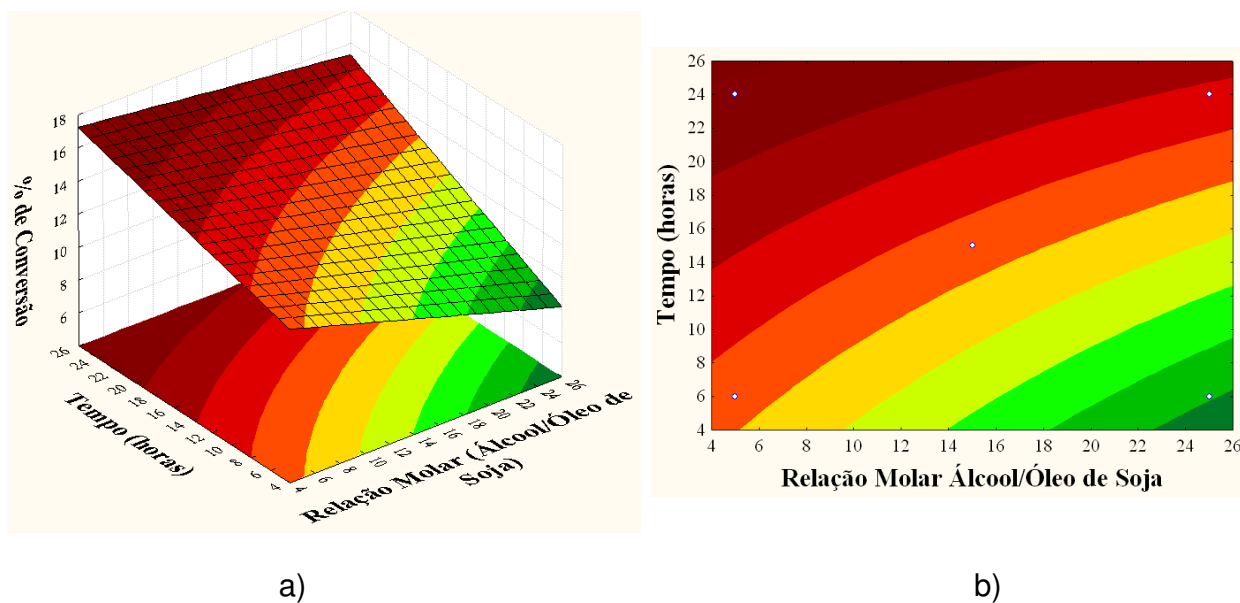


Figura 4.29 – a) Superfície de resposta da % de conversão dos ésteres alquílicos a partir de óleo de soja e lipase de *S. racemosum* e b) Projeção da % de conversão em função das variáveis tempo e relação molar álcool/óleo de soja

Os dados se adequaram bem ao modelo como se pode observar no gráfico dos valores observados versus valores preditos (Figura 4.30).

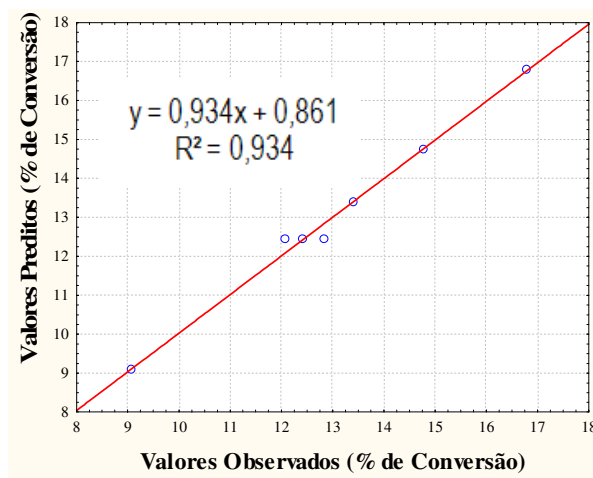


Figura 4.30 - Gráfico dos valores observados versus valores preditos

Capítulo 5

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Dentre os fungos inicialmente selecionados, o *Mucor plumbeus*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium janthinellum*, *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus Níger* não foram capazes de provocar transesterificação nas condições experimentais estudadas enquanto, o *Syncephalastrum racemosum* e *Rhizopus oryzae* forneceram os melhores resultados na transesterificação parcial do óleo de soja em ésteres alquílicos.

Os resultados deste trabalho mostram que a técnica ATR-FTIR combinada a calibração multivariada foi adequada, para a determinação do teor (% m/m) de ésteres alquílicos. O teste F realizado provou que os modelos são estatisticamente iguais e poderiam ser utilizados nesta determinação. No entanto foi escolhido aquele que mostrou o menor valor de RMSEP. Através dos modelos de calibração e análise dos dados dos espectros de ATR-FTIR das amostras selecionaram-se, na triagem inicial dos microrganismos melhores produtores de lipase, os fungos *Syncephalastrum racemosum* e *Rhizopus oryzae*.

A comparação dos cromatogramas obtidos pela técnica de HPLC permitiu identificar não só o melhor fungo produtor de lipase bem como as regiões dos compostos presentes nas alíquotas do meio reacional da fase orgânica.

A técnica de GC/EM comprovou a síntese dos ésteres metílicos pela análise do perfil de padrão de fragmentação bem como pela comparação com o banco de dados da biblioteca Wiley. Já a confirmação da formação dos ésteres butílicos, como produto da reação, ficou bastante prejudicada por vários fatores, dentre eles, a ausência; do íon molécula, de padrões de fragmentação bem definidos e padrões cromatográficos comerciais. No entanto, o gráfico de $\log k'$ versus número de carbono mostrou que há a formação de duas séries homólogas bem definidas

O teor de ésteres t-butílicos quantificada por GC_FID mostrou uma relação de 3 a 6 vezes maior da formação destes ésteres em relação aos ésteres metílicos, quando estes são adicionados sob a relação de 1:1 (v/v). No entanto, esta avaliação é apenas preliminar, uma vez que se necessita de padrões cromatográficos de ésteres butílicos para uma quantificação mais confiável.

O planejamento fatorial aplicado sugeriu que há a necessidade de um aumento do tempo de reação e uma redução da relação molar álcool/óleo para que se chegue a um ponto de máximo, ou seja, onde teremos um rendimento máximo em teor de ésteres.

5.1. Propostas Futuras

Serão elencadas algumas possibilidades para continuação deste presente trabalho.

- Estudar novos modelos de calibração com outros tipos de validações-cruzadas e pré-processamento visando à melhoria da predição do teor de ésteres alquílicos.
- Otimizar os parâmetros de crescimento dos fungos como o tempo de incubação e meios de cultura.
- Pesquisar novos microrganismos sintetizadores de lipase e sua resistência frente a variedades de álcoois de cadeia curta.
- Realizar ensaios analíticos de qualidade do biodiesel para verificar as especificações enunciadas pela ANP no anexo A.
- Aperfeiçoar os parâmetros reacionais (tempo de reação, relação molar álcool/óleo, temperatura etc.) para os fungos *Rhizopus oryzae* e *Syncephalastrum racemosum*.

- Sintetizar padrões de ésteres butílicos a partir de padrões cromatográficos de seus ácidos graxos para se determinar de maneira inequívoca tanto o teor real de ésteres produzidos como calcular o índice de Kovat's para estes compostos.
- Realizar análises de GC/EM utilizando a técnica de ionização química tendo com gás reagente amônia para a obtenção da massa molar dos compostos formados.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIGOR, R. D., UADIA, P. O., FOGLIA, T. A, HAAS, M. J., JONES, K. C., OKPEFA, E., OBIBUZOR, J. U., BAFOR, M. E.. *Lipase catalyzed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils*. **Biochem. Soc. Trans.**, 28:979-981, 2000.

Agência Nacional do Petróleo. *Boletim Mensal de Qualidade dos Combustíveis Líquidos Automotivos Brasileiros* - setembro de 2009.

Agência Nacional do Petróleo. *Portaria nº 274 de 1º de novembro de 2001*.

Agência Nacional do Petróleo. *Portaria nº 309 de 27 de dezembro de 2001*.

ALBUQUERQUE, G. A.. *Obtenção e caracterização físico-química do biodiesel de canola (Brassica napus)*. Dissertação de mestrado UFBA (CCEN) João Pessoa, 2006.

AL-DURI, B., GODDARD, R., BOSLEY, J.. *Characterization of novel support for biocatalysis in supercritical carbon dioxide*. **J.Mol.Cata.B.Enzymatic**, 11: 825-834, 2001.

ANTCZAC, M. S., KUBIAK, A., ANTCZAC, T., BIELECKI, S.. *Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process*. **Renewable Energy**. 34:1185-1194, 2009.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RE nº899*. 2003.

BARBER, M., MERREN, T. O., KELLY, W., *The mass spectrometry of large molecules I. The triglycerides of straight chain fatty acids*. **Tetrahedron letters** 18:1063-1067, 1964.

BRAGA, J. W. B., POPPI, R. J.. *Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo*. **Quim. Nova**. 27:1004:1011, 2004.

BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C., WILLIAMS, D. H.. *Mass spectrometry of organic compounds*. Holden-Day, Inc. San Francisco, 690pp., 1967.

BYRDWELL W.C., EMKEN, E.A., NEFF, W.E., ADLOF, R.O.. *Quantitative analysis of triglycerides using atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry*. **Lipids**, 31:919-935, 1996.

BYRDWELL, W.C., *APCI-MS for lipid analysis*. **Inform**, 9: 986-997, 1998.

BYRDWELL, W.C., EMKEN, E.A.. *Analysis of triglycerides using atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. **Lipids**, 30: 173-175, 1995.

BYRDWELL, W.C., NEFF, W.E.. *Analysis of Hydroxy-Containing Seed Oils Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry* **J. Liq. Chromatogr.**, 21:1485-1501, 1998.

CHENG, C., GROSS, M.L., PITTENAUER, E.. *Complete structural elucidation of triacylglycerols by tandem sector mass spectrometry*. **Anal. Chem.** 70: 4417-4426, 1998.

CORGOZINHO, C.N.C.; PASA, V.M.D. *Determination of residual oil in diesel oil by spectrofluorimetric and chemometric analysis*. **Talanta**. 76:479-484, 2008.

CORREIA, P. R. M., FERREIRA, M. M. C.. *Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos*. **Quim. Nova**. 30:481-487, 2007.

DU, W., XU Y. Y., ZENG, J., LIU, D. H.. *Novozyme 435-catalyzed transesterification from crude soya bean oils for biodiesel production in a solvent-free medium*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 40: 187-190, 2004.

DU, W., XU, Y., LIU, D.. *Lipase-catalyzed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 38:103-106, 2003.

FABER, N. M., RAIKJÓ, R.. *How to avoid over-fitting in multivariate calibration – The conventional validation approach and an alternative*. **Analytica Chimica Acta**. 595:98-106, 2007.

FEARN, T.. *Assessing calibration; SEP, RPD, RER and R2*. **NIR News**, 13:12–14, 2002.

FERRARI, R. A., OLIVEIRA, V. S., SCABIO, A.. *Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia*. **Quim. Nova**, 28:19-23, 2005.

FERREIRA, M. M. C., ANTUNES, A. M., MELGO, M. S., VOLPE, P. L. O.. *Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial*. **Quim. Nova**. 25:439-448, 1999.

FERREIRA, M. M. C., MONTANARI, C. A., GAUDIO, A.C.. *Seleção de variáveis em QSAR*. **Quim. Nova**. 22:724-731, 1999.

FOGLIA, T. A., NELSON, L. A., MARMER, W. N.. *Production of biodiesel, lubricants, and fuel and lubricant additives*. Patente dos EUA n°. 5,713,965, 1998.

FORINA, M., LANTERI, S., CASALE, M. *Multivariate calibration*. **J. Chromatogr. A.** 1158:61-93, 2007.

FUKUDA H., KONDO A., NODA H.. *Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils*. **J. Biosci. Bioeng.**, 92: 405-416. 2001.

GEMPERLINE, P.. *Practical guide to chemometrics*. CRC Press, Taylor & Francis group, LLC, 2006.

GOERING, C. E., FRY, B.. *Engine durability screening test of a diesel oil/soy oil/alcohol microemulsion fuel*. **J.Am.Oil.Chem.Soc.** 61:1627-1632, 1984.

HAAS, M. J., BLOOMER, S., SCOTT, K.. *Simple, high-efficiency synthesis of fatty acid methyl esters from soapstock*. **J.Am.Oil.Chem.Soc.**, 77:373-379, 2000.

HAAS, M. J., PIAZZA, G. J., FOGLIA, E T. A.. *Enzymatic approaches to the production of biodiesel fuels*, em *Lipid Biotechnology*, editado por T. M. Kuo e H. W. Gardner, Marcel Decker, NewYork, NY, pp 587-598, 2002.

HOLCAPEK, M., JANDERA, P., FISHER, J., PROKES, B.. *Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods*. **J. Chromatogr. A**, 858: 13-31, 1999.

HSU, A-F., JONES, K. C., FOGLIA, T. A, MARMER W. N.. *Continuous production of ethyl esters of grease using an immobilized lipase*. **J. Am. Oil Chern. Soc.** 81:749-752, 2004.

HSU, A-F., JONES, K., FOGLIA, T. A, MARMER, W. N.. *Immobilized lipase-catalyzed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 36:181-186, 2002.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos* - DOQ-CGCRE-008. 2003.

ISO, M., CHEN, B., EGUCHI, M., KUDO, T., SHRESTHA, S.. *Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase*. **J. Mol. Catal. B. Enzymatic**, 16; 53-58, 2001.

JAEGER, K-E, EGGERT, T.. *Lipases for biotechnology*. **Protein technologies and commercial enzymes**, 13:390-397, 2002.

JOSHI, H. C., TOLER, J., WALKER, T.. *Optimization of Cottonseed Oil Ethanolysis to Produce Biodiesel High in Gossypol Content*. **J Am Oil Chem Soc.**, 85:357–363, 2008.

KAIEDA, M., SAMUKAWA, T., MATSUMOTO, T., BAN, K., KONDO A., SHIMADA, Y., NODA, H., NOMOTO, F., OHTSUKA, K., IZUMOTO, E., FUKUDA, H.. *Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent*. **J. Biosci. Bioeng.**, 88:627-631, 1999.

KALLIO. H., LAAKSO, P., HUOPALAHTI, R., LINKO, R.R., OKSMAN, P.. *Analysis of butter fat triacylglycerols by supercritical fluid chromatography/electron impact mass spectrometry*. **Anal. Chem.**, 61:698, 1989.

KIM, H-Y., SALEM JR., N.. *Application of thermospray high-performance liquid chromatography/mass spectrometry for the determination of phospholipids and related compounds*. **Anal. Chem.**, 59: 722-726, 1987.

KIM, H-Y.; SALEM JR, N.. *Liquid chromatography mass-spectrometry of lipids*. **Prog. Lipid Res.** 32: 221-245, 1993.

KLASS, D.L. *Biomass for renewable energy, fuels, and chemicals*. 1^a ed.. New York: Academic Press: 1998.

KNOTHE, G.. *Rapid monitoring of transesterification and assessing biodiesel fuel quality by near-infrared spectroscopy using a fiber-optic probe*. **J Amer. Oil Chem. Soc.** 76:795-800, 1999.

KNOTHE, G.. *Determining the blend level of mixtures of biodiesel with conventional diesel fuel by fiber-optic near-infrared spectroscopy and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy*. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 78:1025-1028, 2001.

KRAMER, W. *The potential of biodiesel production*. **Oils and Fats International**, 11:33-34, 1995.

KUSAKA, T., ISHIKARA, S., SAKAIDA, M., MIFUNE, A., NAKANO, Y., TSUDA, K., IKEDA, M., NAKANO, H.. *Composition analysis of normal plant triacylglycerols and hydroperoxidized rac-1-stearoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-sn-glycerols by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. **J. Chromatogr. A**, 730:1-7, 1996.

- LAAKSO, P., MANNINEN, P.. *Identification of Milk Fat Triacylglycerols by Capillary Supercritical Fluid Chromatography–Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry*. **Lipids**, 32:1285-1295, 1997.
- LECHNER, M., BAUER-PLANK, C., LORBEER, E.. *Determination of acylglycerols in vegetable oil methyl esters by on-line normal phase LC-GC*. **J. High Resolut. Chromatogr.**, 20:581-585, 1997.
- LEE, K-T, FOLGIA, T.A., CHANG, K-S. . *Production of alkyl esters as biodiesel fuel from fractionated lard and restaurant grease*. **J.Am.Oil.Chem.Soc**, 79:191-195, 2002.
- LEE, S.W., HERAGE, T., YOUNG, B.. *Emission reduction potential from the combustion of soy methyl ester fuel blended with petroleum distillate fuel*. **Fuel**, 83: 1607–1613, 2004.
- LI. W., DU, W., LIU, D.. *Rhizopus oryzae Whole-Cell Catalyzed Biodiesel Production from Oleic Acid in tert-Butanol Medium*. **Energy & Fuels**. 22:155-158, 2008.
- LINKO, Y-Y, LAMSA, M., WU, X., UOSUKAINEN, E., SEPPALA, J., LINKO, E P. *Biodegradable products by lipase biocatalysis*. **J. Biotechnol.**, 66:41-50, 1998.
- LOPES, W.A, FASCIO. M.. *Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho*. **Química Nova**, 27:670-673, 2004.
- MANNINEN,P., LAAKSO, P.. *Capillary Supercritical Fluid Chromatography–Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry of γ - and α -Linolenic Acid Containing Triacylglycerols in Berry Oils*. **Lipids**, 32:825-831, 1997.
- MATSUMOTO, T., TAKAHASHI, S., KAIEDA, M., UEDA, M., TANAKA, A., FUKUDA, H., KONDO, A.. *Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of Rhizopus oryzae lipase is applicable to biodiesel fuel production*. **Appl. Microbiol Biotechnol**, 57: 515-520, 2001.
- MATSUMURA, S.,H. EBATA, R.KONDO, K.TOSHIMA. *Organic solvent-free enzymatic transformation of poli(ϵ -caprolyctone) into repolymerizable oligomers in supercritical carbon dioxide*. **Macromol.Rapid.Comm.**,22: 1325-1329, 2001.
- MEDINA, A. R., MORENO, P. A. G., CERDAN, L.E., GRIMA, E. M.. *Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production*. **Biotechnology Advances**. 27:398-408, 2009.
- MITTELBAACH, M. *Lipase-catalyzed alcoholysis of sunflower oil*. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 61:168-170, 1990.

MITTELBACH, M., ENZELSBERGER, H.. *Transesterification of heated rapeseed oil for extending diesel fuel. J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76:545-550, 1999.

MONTEIRO, M. R.; AMBROZIN, A. R. P.; LIAO, L. M.; FERREIRA, A. G.. *Determination of biodiesel blend levels in different diesel samples by ¹H NMR. Fuel.* 88:691-696, 2009.

MOTTRAM H.R., S.E. WOODBURY, R.P. EVERSHERD, *Identification of Triacylglycerol Positional Isomers Present in Vegetable Oils by High Performance Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11: 1240-1252, 1997.

NEFF, W.E., BYRDWELL, W.C.. *Triacylglycerol Analysis by High Performance Liquid Chromatography- Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry: Crepis Alpina and Vernonia Galamensis Seed Oils. J. Liq. Chromatogr.*, 18: 4165-4181, 1995.

NELSON, L. A., FOGLIA, T. A, MARMER, W. N.. *Lipase-catalyzed production of biodiesel. J. Am.Oil Chern. Soc.*, 73:1191-1195, 1996.

NETO, B. B., SCARMÍNIO, I. S., BRUNS, R. E.. *25 Anos de quimiometria no Brasil. Quím. Nova* 29:1401-1406, 2006.

NETO, B. B., SCARMÍNIO, I. S., BRUNS, R. E.. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na indústria.* 3ª ed. – Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2007.

OLIVEIRA, J.S.; MONTALVÃO, R.; DAHER, L.; SUAREZ, A.Z.; RUBIM, J.C. *Determination of methyl ester contents in biodiesel blends by FTIR-ATR and FTNIR spectroscopies. Talanta.*, 69:1278-1284, 2006.

PAMIES, O., BACKVALL, J-E,. *Efficient lipase-catalyzed kinetic resolution and dynamic kinetic resolution of β -hydroxi nitriles. A route to useful precursors for γ -amino alcohols. Adv.Synth.Catal*, 343:726-731, 2001.

PAMIES, O., BACKVALL, J-E.. *Enzymatic kinetic resolution and chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of δ -hydroxi esters. An efficient route to chiral δ -lactones. J.Org.Chem.* 67:1261-1265, 2002.

PARK, S, KAZLAUSKAS, R.J.. *Improved preparation and use of room temperature ionic liquid in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. J.Org.Chem.*, 66:8395-8401, 2001.

PIMENTEL, F. P.; TEIXEIRA, L. S. G.; RIBEIRO, G. M. S.; CRUZ, R. S.; STRAGEVITCH, L.; FILHO, J. G. A. P.. *Determination of biodiesel content when*

blended with mineral diesel fuel using infrared spectroscopy and multivariate calibration. Microchemical Journal. 82:201-206, 2006.

PIZARRO, A.V.L., PARK, E.Y.. *Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oil contained in waste activated bleaching earth. Process. Biochem.*, 38:1077-1082,2003.

PLANK, C., LORBEER, E.. *Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. J. Chromatogr. A*, 697: 461-468, 1995.

RAKOPOULOS, C. D., ANTONOPOULOS, K. A, RAKOPOULOS, D. C., HOUNTALAS, D. T., GIAKOURIS, E. G.. *Comparative performance and emissions study of a direct injection Diesel engine using blends of Diesel fuel with vegetable oils or bio-diesels of various origins. Energy Conversion and Management.* 47:3272-3287, 2006.

RAMADHAS, A.S., JAYARAJ, S., MURALEEDHARAN, C.. *Use of vegetable oils as I.C. engine fuels - A review. Renewable Energy* 29: 727-742, 2004.

RANGANATHAN, S. V., NARASIMHAN, S. L., MUTHUKUMAR, K.. *An overview of enzymatic production of biodiesel. Bioresource Technology.* 99:3975-3981, 2008.

Resolução ANP nº 7. Disponível em <http://www.anp.gov.br/petro/legis_biodiesel.asp>. Acesso em: 1 de nov. 2009.

Resumo dos leilões ANP. Disponível em <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/leilao_biodiesel.asp>. Acesso em: 1 de Nov. 2009.

SAIFUDDIN, N., CHUA, K. H.. *Production of ethyl ester (Biodiesel) from used frying oil: optimization of transesterification process using Microwave Irradiation. Malaysian Journal of Chemistry*, 6:077 – 082, 2004.

SELMI, B., THOMAS, D.. *Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium. J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75:691-695, 1998.

SHIMADA, Y., WATANABE, Y., SAMUKAWA, T., SUGIHARA, A., NODA, H., FUKUDA, H., TOMINAGA, Y.. *Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized Candida antarctica lipase. J. Am. Oil Chem. Soc.*,76:789-793, 1999.

SHWAB, A.W., BAGBY, M.O., FREEDMAN, B.. *Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils, Fuel*, 66:1372-1378, 1987.

SILVA, N. L., MACIEL, M. R. W., BATISTELLA, C. B., FILHO, R. M.. *Optimization of Biodiesel Production From Castor Oil*. **Appl. Bioch. Biotechnol.**, 130:405-414, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C.. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th. ed., John Wiley & Sons: New York, 1991.

SOARES, I. P.; REZENDE, T. F.; SILVA, R. C.; CASTRO, E. V. R.; FORTES, I. C. P.. *Multivariate Calibration by Variable Selection for Blends of Raw Soybean Oil/Biodiesel from Different Sources Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Spectra Data*. **Energy & Fuels**. 22:2079-2083, 2008.

SOARES, I. P.; REZENDE, T. F.; FORTES, I. C. P.. *Study of the Behavior Changes in Physical-Chemistry Properties of Diesel/Biodiesel (B2) Mixtures with Residual Oil and Its Quantification by Partial Least-Squares Attenuated Total Reflection–Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (PLS/ATR–FTIR)*. **Energy & Fuels**. 23:4143-4148, 2009.

SUBRAMANIAN, K.A., SINGAL, S.K., SAXENA, M., SINGHAL, S.. *Utilization of liquid biofuels in automotive diesel engines: An Indian perspective*. **Biomass Bioenergy** 29: 65-72, 2005.

TEÓFILO, R. F., FERREIRA, M. M. C.. *Quimiometria II: planilhas eletrônicas para o cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial*. **Quim. Nova**. 29: 338-350, 2006.

VILENEUVE, P., MUDERHWA, J. M., GRAILLE, J., HASS, M. J.. *Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 9: 113-148, 2000.

VYAS, A. P. VERMA, J. L., SUBRAHMANYAM, N.. *A review on FAME production process*. **Fuel**, 89: 1-9, 2010.

WATANABE, Y., SHIMADA, Y., SUGIHARA, A., NODA, H., FUKUDA, H., TOMINAGA, Y.. *Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase*. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 77:355-359, 2000.

WEILL, J., BROUTIN, P., BILLAUD, F., GUERET, C.. *Coke Formation During Hydrocarbons Pyrolysis. Part One: Steam Cracking*. **Oil & Gas Science and Technology** 47:537-549, 1992.

WILLIAMS, P.C.. *Implementation of near-infrared technology*. In: Williams PC, Norris KH (eds) *American Association of Cereal Chemists*, St Paul, Minnesota, USA, 2001.

WOLD, H., *Soft modeling by latent variables: the nonlinear iterative partial least squares approach*, in **Perspectives in Probability and Statistics**, Papers in Honor of M.S. Bartlett, Gani, J., Ed., Academic Press, London, 1975.

WOLD, S., SJOSTROM, M., ERIKSSON, L.. *PLS-Regression: a basic tool of chemometrics*. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. 58:109-130, 2001.

WU, D., FENG, S., HE, Y.. *Short-Wave Near-Infrared Spectroscopy of Milk Powder for Brand Identification and Component Analysis*. **Journal of Dairy Science**. 91:939-949, 2008.

WU, W. H., FOGLIA, T. A., MARMER, W. N., PHILLIPS, J. G., *Optimizing production of ethyl esters of grease using 95% ethanol by response surface methodology*. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 76:517-521, 1999.

WU, W-H., FOGLIA, T. A, MARMER, W. N., DUNN, R. O., GOERING, C. E., BRIGGS, T. E.. *Low temperature properties and engine performance evaluation of ethyl and isopropyl esters of tallow and grease*. **J. Am. Oil Chern. Soc.**, 75:1173-1178,1998.

ZAGONEL, G. F., ZAMORA, P.P., RAMOS, L.P.. *Multivariate monitoring of soybean oil ethanolysis by FTIR*. **Talanta**, 63: 1021-1025, 2004.

ZANG, X-B., FENG, Y-C., HU, C-Q.. *Feasibility and extension of universal quantitative models for moisture content determination in beta-lactam powder injections by near-infrared spectroscopy*. **Anal. Chim. Acta**. 630:131-140, 2008.

ZENG, J., DU, W., LIU, X., LIU, D., DAI, L.. *Study on effect of cultivation parameters and pretreatment on *Rhizopus oryzae* cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production*. **J. Mol. Catal. B: Enzymatc**, 43:15-18, 2006.

<<http://www.iubmb.org/>> Acesso em: 15 de out. 2009.

ANEXO A

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS

RESOLUÇÃO ANP Nº 7, DE 19.3.2008 - DOU 20.3.2008

Tabela I: Especificação do Biodiesel

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1)	-	-	-
Massa específica a 20 °C	kg/m ³	850-900	7148	1298	EN ISO 3675
			14065	4052	- EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40 °C	mm ² /s	3,0-6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de Água, máx. (2)	mg/kg	500	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total, máx.	mg/kg	24	-	-	EN ISO 12662
Ponto de fulgor, mín. (3)	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
			-	-	-
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15342 (4) (5)	-	EN 14103
Resíduo de carbono (6)	% massa	0,050	-	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	50	-	5453	-
			-		EN ISO 20846
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554	-	EN 14108
			15555		EN 14109
			15553		EN 14109
			15556		EN 14538

Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538
Fósforo, máx.	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número de Cetano (7)	-	Anotar	-	613 6890 (8)	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	19 (9)	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448 -	664 -	- EN 14104 (10)
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 (5) - -	6584 (10) -	- EN 14105 (10) EN 14106 (10)
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344 (5) -	6584 (10) -	- EN 14105 (10)
Mono, di, triacilglicerol (7)	% massa	Anotar	15342 (5) 15344 (5)	6584 (10)	- EN 14105 (10)
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
Índice de lodo (7)	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111
Estabilidade à oxidação a 110 °C, mín.(2)	h	6	-	-	EN 14112 (10)

Nota:

(1) LII – Límpido e isento de impurezas com anotação da temperatura de ensaio.

(2) O limite indicado deve ser atendido na certificação do biodiesel pelo produtor ou importador.

(3) Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130 °C, fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol.

(4) O método ABNT NBR 15342 poderá ser utilizado para amostra oriunda de gordura animal.

(5) Para biodiesel oriundo de duas ou mais matérias-primas distintas das quais uma consiste de óleo de mamona:

a) teor de ésteres, mono-, diacilgliceróis: método ABNT NBR 15342;

b) glicerol livre: método ABNT NBR 15341;

c) glicerol total, triacilgliceróis: método ABNT NBR 15344;

d) metanol e/ou etanol: método ABNT NBR 15343.

(6) O resíduo deve ser avaliado em 100% da amostra.

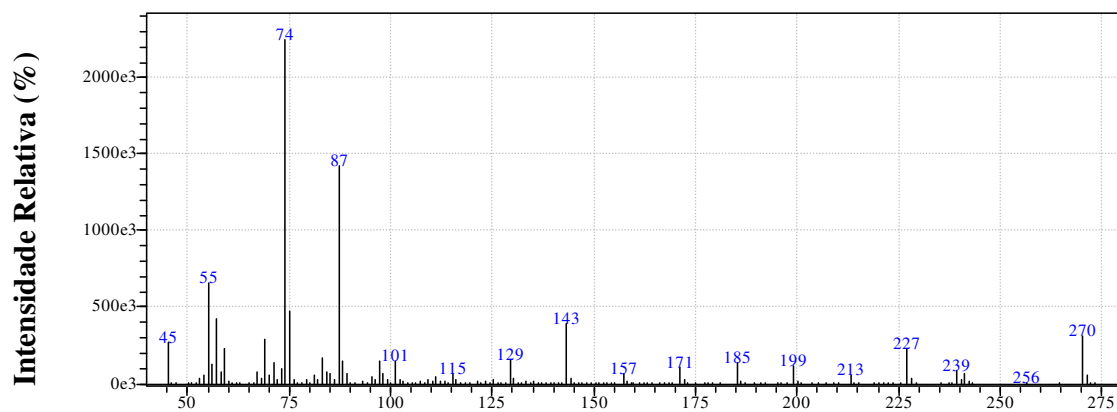
(7) Estas características devem ser analisadas em conjunto com as demais constantes da tabela de especificação a cada trimestre civil. Os resultados devem ser enviados pelo produtor de biodiesel à ANP, tomando uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre e, em caso de neste período haver mudança de tipo de matéria-prima, o produtor deverá analisar número de amostras correspondente ao número de tipos de matérias-primas utilizadas.

(8) Poderá ser utilizado como método alternativo o método ASTM D6890 para número de cetano.

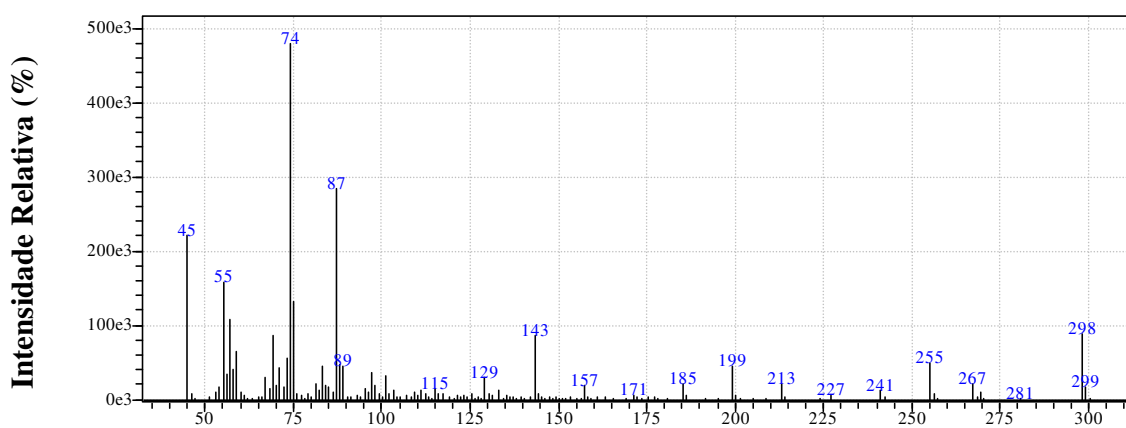
(9) O limite máximo de 19 °C é válido para as regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Bahia, devendo ser anotado para as demais regiões. O biodiesel poderá ser entregue com temperaturas superiores ao limite supramencionado, caso haja acordo entre as partes envolvidas. Os métodos de análise indicados não podem ser empregados para biodiesel oriundo apenas de mamona.

(10) Os métodos referenciados demandam validação para as matérias-primas não previstas no método e rota de produção etílica.

ANEXO B

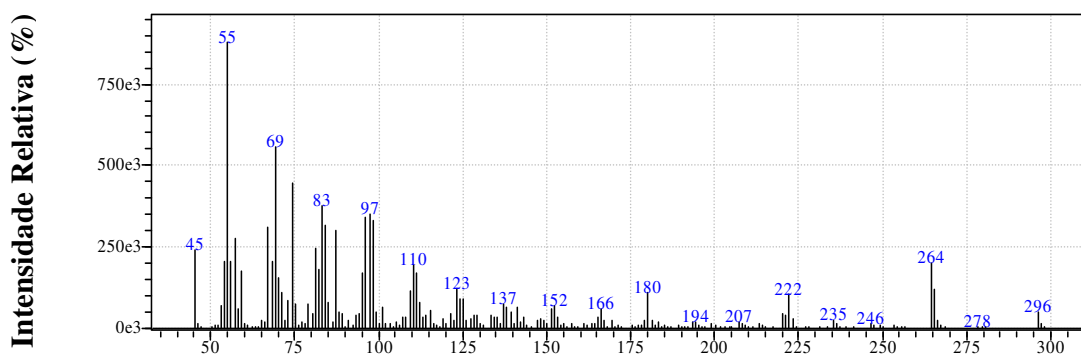


a)

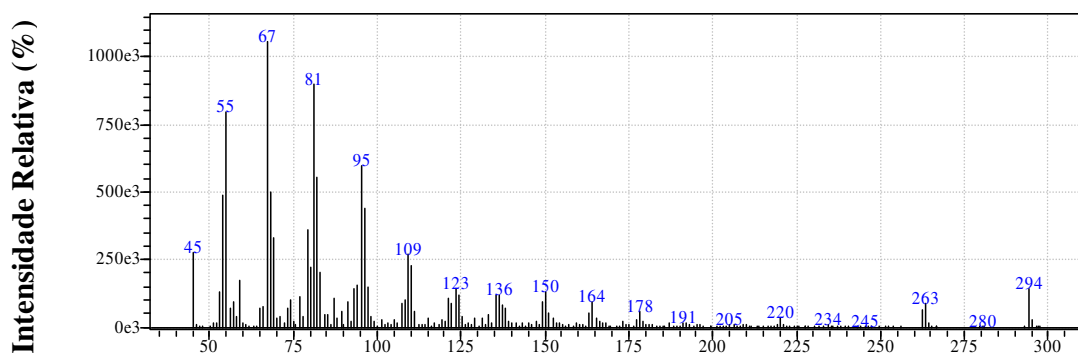


b)

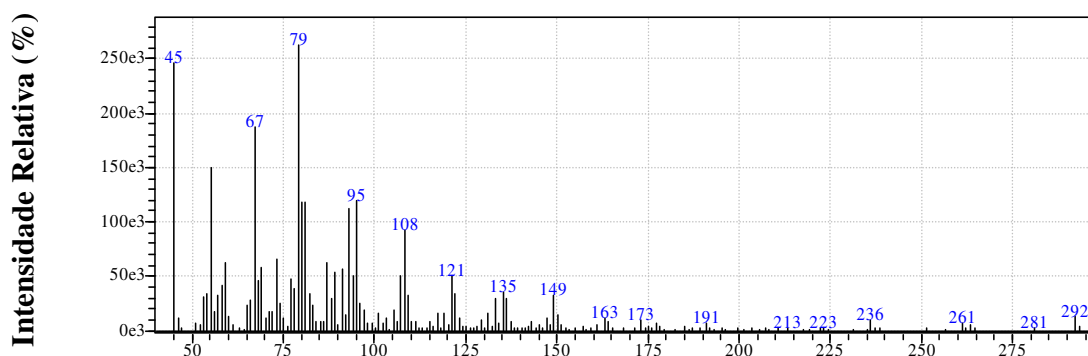
Espectros de massa do a) hexadecanoato de metila (94% de similaridade) e b) octadecanoato de metila (87% de similaridade).



Espectro de massa do (Z)-9-octadecenoato de metila (95% de similaridade).



Espectro de massa do (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metila (95% de similaridade).



Espectro de massa do (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoato de metila (87% de similaridade).