

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Química

Vinicius Tadeu Kartnaller Montalvão

**METODOLOGIA DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA, ASSOCIADA À TÉCNICA
DE ATR-FTIR EM TEMPO REAL, PARA O MONITORAMENTO QUANTITATIVO
DA SÍNTESE DE BIODIESEL COM DIFERENTES CATALISADORES**

Rio de Janeiro
2013

Vinicius Tadeu Kartnaller Montalvão

METODOLOGIA DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA, ASSOCIADA À TÉCNICA DE ATR-FTIR EM TEMPO REAL, PARA O MONITORAMENTO QUANTITATIVO DA SÍNTESE DE BIODIESEL COM DIFERENTES CATALISADORES

Projeto final apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro com objetivo de obtenção de grau para conclusão do curso de Química com Atribuições Tecnológicas.

Campo de Conhecimento: Química Orgânica

Orientador: Prof^a. Michelle Jakeline Cunha Rezende

Rio de Janeiro
2013

Vinicius Tadeu Karnaller Montalvão

METODOLOGIA DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA, ASSOCIADA À TÉCNICA DE ATR-FTIR EM TEMPO REAL, PARA O MONITORAMENTO QUANTITATIVO DA SÍNTESE DE BIODIESEL COM DIFERENTES CATALISADORES

Projeto final apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro com objetivo de obtenção de grau para conclusão do curso de Química com Atribuições Tecnológicas.

Campo de Conhecimento: Química Orgânica

Data de Aprovação:

01/03/2013

Banca Examinadora:

Michelle Jakeline Cunha Rezende

Prof. Michelle Jakeline Cunha Rezende, D.Sc.

Elizabeth R. Lachter

Prof. Elizabeth Roditi Lachter, D.Sc.

Leandro Soter de Mariz e Miranda

Prof. Leandro Soter de Mariz e Miranda, D.Sc.

Rio de Janeiro
2013

Aos meus pais, Antônio Montalvão e Cláudia Kartnaller por sempre confiarem na minha capacidade e estarem do meu lado, me apoiando.

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre, muito unida, acreditou em mim, mesmo quando eu ainda não acreditava, me apoiando e me fazendo seguir em frente, sempre de cabeça erguida. Aos meus pais, à minha irmã, às minhas avós, aos meus tios e tias, primos e primas, o maior agradecimento só poderia ser a eles.

Aos meus amigos, que foram a minha força durante esse período e com quem dividi as maiores alegrias e tristezas nesse tempo. À Renata, Pedro, Anna, Lincoln, Marllon, Nikolas, obrigado por estarem comigo nesses anos de faculdade.

Aos meus amigos de laboratório, Adriana, Andreia, Luíza, Victor, Marcos Vinicius, Flávio, e tantos que já passaram e que convivi desde o início da minha graduação. Obrigado pelos ensinamentos e companheirismo.

E obrigado principalmente aos meus orientadores, que foram minha fonte de aprendizado. Um obrigado especial à Prof^a Michelle, por toda sua paciência e sua ajuda. E por fim, ao Prof.^o João Cajaíba, aquele que acreditou em mim desde o primeiro dia em que entrei na faculdade e quem me proporcionou as maiores oportunidades de aprendizado que eu jamais poderia esperar.

RESUMO

PROJETO DE CURSO

TÍTULO: METODOLOGIA DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA, ASSOCIADA À TÉCNICA DE ATR-FTIR EM TEMPO REAL, PARA O MONITORAMENTO QUANTITATIVO DA SÍNTESE DE BIODIESEL COM DIFERENTES CATALISADORES

ALUNO: Vinicius Tadeu Kartnaller Montalvão

ORIENTADOR: Prof. Michelle Jakeline Cunha Rezende, DQO – Instituto de Química-UFRJ

COLABORADORES: Prof. João Francisco Cajaiba da Silva, DQO – Instituto de Química
Prof. Rodrigo Octávio de Souza, DQO – Instituto de Química

Nesse trabalho foi estudada a esterificação do ácido oleico com etanol na presença de catalisadores enzimáticos (Novozym 435, Lipozyme TL e Lipozyme RM) e mineral (Ácido Clorídrico). Para tal, fez-se o acompanhamento quantitativo de cada componente da reação através de uma calibração multivariada por PLS, a partir de dados obtidos por ATR-FTIR. Dos catalisadores, os enzimáticos mostraram um poder de conversão bem maior que o mineral, sendo a Novozym 435 a com maior conversão (aprox. 90 %). O perfil de concentração calculado para cada reação foi então otimizado e utilizado para modelar qualitativamente o mecanismo cinético das reações enzimáticas.

Palavras-chave: biodiesel, calibração multivariada, PLS, ATR-FTIR, cinética enzimática.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Biodiesel e produção	1
1.2. Métodos de análise da reação de síntese de biodiesel.....	6
1.3. ATR-FTIR.....	7
1.4. Calibração multivariada.....	8
2. OBJETIVOS.....	12
3. EXPERIMENTAL.....	12
3.1. Reagentes e solventes.....	12
3.2. Aparelho de ATR-FTIR.....	12
3.3. Calibração multivariada.....	13
3.4. Síntese de oleato de etila.....	13
3.5. Quantificação por CG-EM.....	15
4. Resultados e Discussão.....	16
4.1. Calibração multivariada e otimização do modelo.....	16
4.2. Monitoramento da síntese de oleato de etila.....	19
4.3. Repetitividade no monitoramento das reações.....	21
4.4. Avaliação do modelo de calibração a partir da comparação com a técnica de CG-EM.....	22
4.5. Comparação entre catalisadores.....	23
4.5.1. Novozym 435.....	23
4.5.2. Lipozyme RM.....	24
4.5.3. Lipozyme TL.....	25
4.5.4. Ácido clorídrico.....	26
4.5.5. Comparação por regressão.....	27
4.6. Cinética enzimática.....	28
5. CONCLUSÃO.....	34
6. BIBLIOGRAFIA.....	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Ácidos graxos típicos e composição de óleos comuns	2
Tabela 2 - Comparação de diferentes tecnologias para a produção de biodiesel	5
Tabela 3 - Principais técnicas para análise da reação de biodiesel	6
Tabela 4 - Diferentes pré-processamentos aplicados em modelos multivariados	11
Tabela 5 - Variação na concentração de diferentes misturas padrão usadas na calibração multivariada	14
Tabela 6 - Diferentes ajustes de pré-processamento dos dados para a calibração multivariada	17
Tabela 7 - Erros calculados para cada resposta do modelo de PLS selecionado	18
Tabela 8 - Comparação entre valores de conversão calculados pelo modelo de calibração de ATR-FTIR e por CG-EM, para a reação utilizando Novozym 435 como catalisador	23
Tabela 9 - Valores de conversão média (entre as triplicatas), medidos pelo modelo de calibração para a reação, utilizando Lipozyme RM como catalisador	25
Tabela 10 - Valores de conversão média (entre as triplicatas), medidos pelo modelo de calibração para a reação, utilizando Lipozyme TL como catalisador	26
Tabela 11 - Valores de conversão média (entre as triplicatas), medidos pelo modelo de calibração para a reação, utilizando HCl como catalisador	27
Tabela 12 - Valores dos parâmetros otimizados para o mecanismo Ping Pong Bi Bi, para cada enzima	31
Tabela 13 - Valores dos parâmetros otimizados para o mecanismo de rápido equilíbrio Bi Bi Aleatório, para cada enzima	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ácidos graxos comuns em óleos naturais: (a) Ácido palmítico; (b) Ácido linoleico; (c) Ácido oleico	2
Figura 2 - Esquema da reação de síntese de biodiesel, por via de esterificação ou transesterificação	2
Figura 3 - Diagrama esquemático de etapas do mecanismo de esterificação enzimática em sistema monofásico	4
Figura 4 - Esquema do mecanismo Ping Pong Bi Bi	5
Figura 5 - Representação de um cristal de ATR	7
Figura 6 - Etapas de um pré-processamento para o tratamento de um modelo multivariado...10	
Figura 7 - Foto do equipamento de ATR-FTIR (ReactIR 45m)	13
Figura 8 - Fotos do sistema utilizado para as reações	15
Figura 9 - Perfil de variação nos espectros dos padrões de calibração	16
Figura 10 - Espectros individuais de cada componente da reação e atribuição de algumas bandas espectrais	17
Figura 11 - Gráfico de valores de concentração de oleato de etila previsto x real encontradas pelo Modelo 6	18
Figura 12 - Cálculo estatístico de variância para cada amostra, onde o limite superior é dado para um grau de confiança de 95 %	18
Figura 13 - Superfície 3D mostrando a variação dos espectros ao longo do tempo da reação	19
Figura 14 - Perfil de variação para as bandas C=O de ácido e éster em diferentes tempos de reação e em superfície 3D	20
Figura 15 - Perfil de variação de bandas referentes ao éster e ao álcool em diferentes tempos de reação e em superfície 3D	21
Figura 16 - Comparação entre o monitoramento por área e por calibração multivariada	22
Figura 17 - Comparação da repetitividade no monitoramento da reação através da calibração multivariada	22
Figura 18 - Média da variação de concentração de cada componente da reação, na reação com Novozym 435 como catalisador	24

Figura 19 - Média da variação de concentração de cada componente na reação com Lipozyme RM como catalisador	25
Figura 20 - Média da variação de concentração de cada componente na reação com Lipozyme TL como catalisador	26
Figura 21 - Média da variação de concentração de cada componente na reação com HCl como catalisador	27
Figura 22 - Curvas de conversão modeladas para os diferentes catalisadores de trabalho	28
Figura 23 - Gráficos de velocidade experimental e velocidade modelada pelo mecanismo Ping Pong Bi Bi para: (a) Novozym 435; (b) Lipozyme RM e (c) Lipozyme TL	30
Figura 24 - Esquema do mecanismo Bi Bi Aleatório	32
Figura 25 - Gráficos de velocidade experimental e velocidade modelada pelo mecanismo Rápido-Equilíbrio Bi Bi Aleatório para: (a) Lipozyme RM e (b) Lipozyme TL	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biodiesel e Produção

Combustíveis fósseis ainda são hoje a maior fonte de energia usada em veículos no mundo. Proveniente da degradação de matéria orgânica, em um processo que dura milhares de anos, esse produto, o Petróleo, é uma mistura de hidrocarbonetos de diferentes espécies, que pode ser usada para a geração de energia por suas reações de combustão. Essa reação leva à geração de água e gás carbônico, onde este último está comumente associado ao aumento do Efeito Estufa e na conseqüente elevação da temperatura do planeta.

De maneira a minimizar o aumento excessivo na quantidade de gás carbônico liberado na atmosfera terrestre, novas fontes de energia mais limpas vêm sendo pesquisadas nas últimas décadas. Além disso, com o aumento no preço do Petróleo e seus recursos limitados, a substituição, pelo menos em parte, desse tipo de combustível se faz necessária (FANGRUI, MILFORD, 1999; MARCHETTI, MIGUEL, ERRAZU, 2007)

Nessa vertente da substituição de combustíveis, um dos que possui maior pesquisa e utilização no mercado mundial, no momento, é o biodiesel. Este é miscível ao diesel em qualquer proporção, e tem sido usado como uma mistura binária, em diferentes proporções, de acordo com a legislação em cada país (KNOTHE, 2006). No Brasil, o biodiesel foi introduzido pela lei 11.097/05, em que foi instituída a obrigatoriedade de 2 % deste no óleo diesel comercializado, a partir de 2008. Neste mesmo ano, a ANP (Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) criou a especificação em que aumentava a obrigatoriedade da adição de biodiesel para 5 % (B5), através da Resolução nº 7 (LÔBO, 2009).

Biodiesel é produzido a partir de fontes de lipídios, como óleos vegetais e gordura animal, e é composto por mono-álquil ésteres de ácidos graxos (MARCHETTI; ERRAZU, 2008). Por vir de fonte natural, é biodegradável, não-tóxico e com baixo perfil de emissão, sendo assim benéfico ao meio ambiente (CRAWCZYK, 1996).

Os lipídios mais simples constituídos a partir de ácidos graxos são os triacilgliceróis, que são tri-ésteres de glicerina com diferentes tipos de ácidos carboxílicos de cadeia longa, como definido por Nelson e Cox (2008, p. 346). Normalmente, esses lipídios possuem diferentes composições de ácidos graxos na sua estrutura, dependendo da fonte de retirada. Os ácidos que aparecem em maior abundância, em média, são os Linoleico, Oleico e Palmítico. As estruturas desses ácidos são mostradas na Figura 1. A Tabela 1 mostra a composição de diferentes óleos, mais facilmente encontrados e produzidos.

Tabela 1 – Ácidos Graxos típicos e composição de óleos comuns (Kincs, 1985)

Ácido Graxo	Soja	Algodão	Palma	Banha	Sebo	Coco
Láurico	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	46,5
Mirístico	0,1	0,7	1,0	1,4	2,8	19,2
Palmítico	10,2	20,1	42,8	23,6	23,3	9,8
Esteárico	3,7	2,6	4,5	14,2	19,4	3,0
Oleico	22,8	19,2	40,5	44,2	42,4	6,9
Linoleico	53,7	55,2	10,1	10,7	2,9	2,2
Linolenico	8,6	0,6	0,2	0,4	0,9	0,0

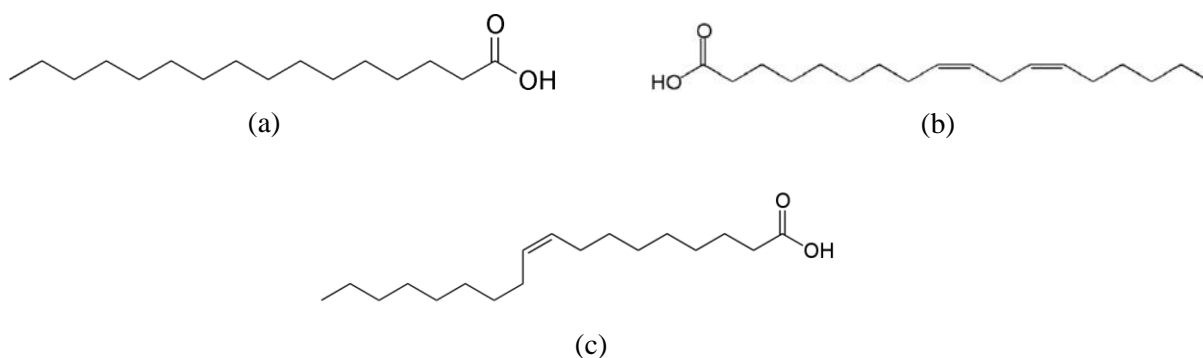


Figura 1 - Ácidos Graxos comuns em óleos naturais: (a) Ácido Palmítico; (b) Ácido Linoleico; (c) Ácido Oleico

O biodiesel pode ser sintetizado tanto pela reação de um álcool com o triacilglicerol (reação de transesterificação), quanto a reação de um álcool com o ácido graxo na sua forma livre (reação de esterificação). Ambas as reações necessitam de catálise para acontecer e podem ser descritas de uma maneira geral como mostrado na Figura 2, onde R e R'' são radicais alquila e R' pode ser H (esterificação) ou também um outro radical alquila (transesterificação).

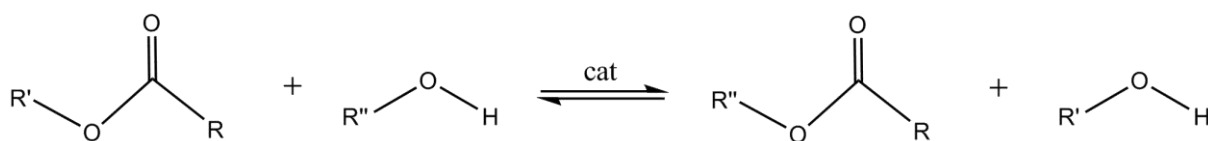


Figura 2 - Esquema da reação de síntese de biodiesel, por via de esterificação ou transesterificação

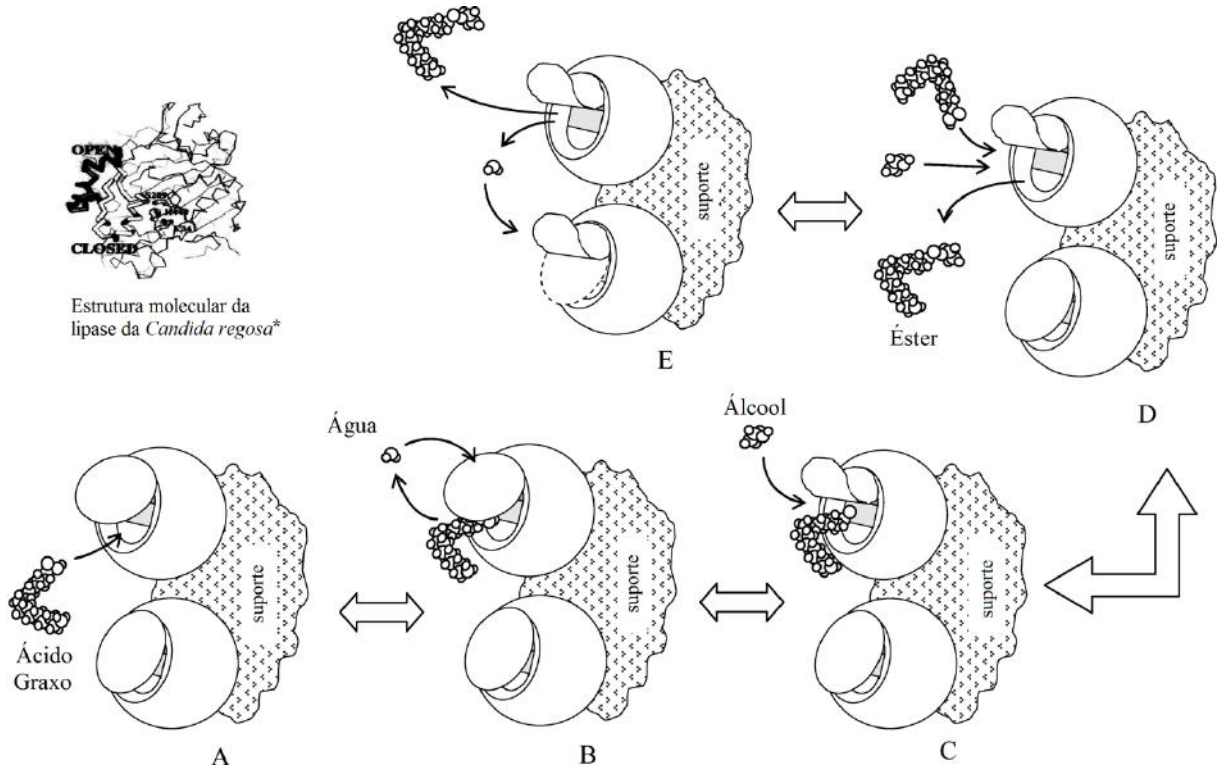
Diversos catalisadores podem ser usados para acelerar esta reação, podendo ser eles do tipo básico, ácido ou enzimático. O catalisador mais utilizado para a reação é uma base homogênea, como hidróxido de sódio ou potássio, ou seus respectivos metóxidos. Entretanto, esse tipo de catalisador, quando em presença de grande quantidade de ácido graxo livre, leva à geração de sabão como co-produto, criando uma maior dificuldade na separação e purificação do biodiesel (MARCHETTI; ERRAZU, 2008). Catálise ácida também é um mecanismo alternativo viável para a reação, de maneira que ácidos homogêneos costumam ser empregados na produção do biodiesel. Entretanto, a eficiência desse tipo de catálise só é maior quando o óleo usado contém uma maior concentração de ácidos graxos livres (MA; HANNA, 1999). Essas reações tendem a ser realizadas com excesso do álcool, o que nem sempre é a melhor escolha para o sistema.

Com os avanços da biotecnologia, novos tipos de catalisadores passaram a ser desenvolvidos em escala comercial. Catalisadores biológicos têm como característica sua alta especificidade e seletividade, além de condições mais amenas para a realização da reação. Para a produção de biodiesel, lipases mostraram um alto poder de catálise e conversão, em condições brandas.

Lipases (triacilglicerol acil-hidrolases) são enzimas capazes de fazer a hidrólise de triacilgliceróis, para a liberação de ácidos graxos no metabolismo da maioria dos organismos. Entretanto, em solventes orgânicos e com apenas traços de água, essa enzima é capaz de catalisar a reação reversa, a esterificação. Além disso, a enzima é capaz também de catalisar reações de transesterificação e interesterificação (OLIVEIRA et al., 2001). A eficiência da lipase nessas reações vai depender do organismo de origem dessa enzima. Comercialmente, há a existência de diversas fontes da enzima, que estão suportadas em polímeros, de maneira a haver rápida e fácil reutilização. Exemplos de lipases comerciais são: Novozym 435 (*Candida antarctica*), Lipozyme TL (*Thermomyces lanuginosus*) e Lipozyme RM (*Rhizomucor miehei*)

Para a ativação deste tipo de enzima, Mahmud et al. (2010) viram que uma quantidade mínima de água (0,2-3 % m/m) era necessária, de modo que um meio completamente livre de água não é o melhor sistema reacional. Paiva, Balcão e Malcata (2000) propuseram um mecanismo de reação que justifica essa necessidade para a ativação da enzima, supondo, da estrutura, que a enzima tem o seu sítio ativo hidrofóbico coberto por uma “tampa” (cuja parte exterior é hidrofílica e a parte interior é hidrofóbica). Primeiramente, o ácido graxo interage com a enzima, sem que haja ainda ligação covalente (Figura 3 - etapa A). Uma molécula de água faz com que mude a conformação da tampa da enzima, permitindo agora que o ácido se ligue à enzima (Figura 3 - etapas B e C), formando um complexo. Esse complexo reage com o

álcool, gerando o éster de produto e mais água, o que garante que a reação seja ativada mais ainda. A Figura 3 representa o esquema proposto por Paiva et al.



Adaptado de Mahmud et al. (2010)

* Estrutura retirada de Leskovac (2004)

O conhecimento cinético das reações pode ajudar significativamente para o cálculo e predição de reações, principalmente para o controle de produção. Independente do tipo de reação (hidrólise, esterificação, transesterificação ou interesterificação), o modelo cinético mais geral e mais acurado para a ação catalítica de lipases é o mecanismo Ping Pong Bi Bi (PAIVA, BALCÃO, MALCATA, 2000). Esse mecanismo está de acordo com as proposições feitas por Paiva et al. (2000) para explicar a dependência de água para a ativação da enzima. A Figura 4 ilustra esse mecanismo, onde A e B são os reagentes, E e F são duas formas da enzima e P e Q são os produtos. Nesse caso, o álcool usado é o reagente B, e este acaba tendo um efeito inibitório à enzima. (BISSWANGER, 2002, p. 110).

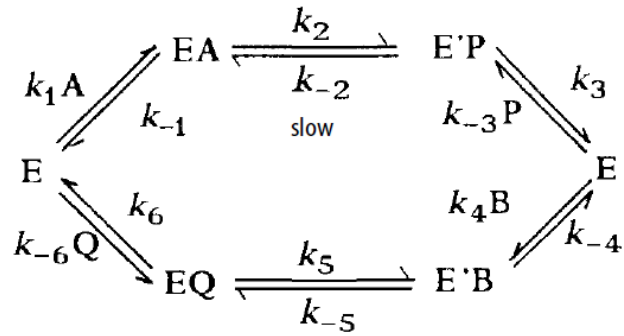


Figura 4 - Esquema do Mecanismo Ping Pong Bi Bi

Para este mecanismo, a taxa de velocidade pode ser escrita através da Equação 1.

$$v = \frac{(k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 k_6 [A][B] + k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} k_{-5} k_{-6} [P][Q])[E]_0}{k_1 k_2 k_3 k_{-4} k_{-6} [A] + k_{-1} k_3 k_4 k_5 k_6 [B] + k_1 k_3 k_4 k_6 (k_2 + k_5) [A][B] + k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} k_6 [P] + k_{-1} k_3 k_{-4} k_5 k_{-5} k_{-6} [Q] + k_{-1} k_{-3} k_{-4} k_{-6} (k_{-2} + k_{-5}) [P][Q] + k_1 k_{-3} k_{-4} k_6 (k_2 + k_{-2}) [A][P] + k_{-1} k_3 k_4 k_{-6} (k_5 + k_{-5}) [B][Q]} \quad (1)$$

Por fim, uma comparação entre os três tipos de catálise pode ser feita, de maneira a avaliar os pontos positivos e negativos para a produção de biodiesel em escala industrial. A comparação é apresentada na Tabela 2. Pode-se ver que a catálise enzimática não só apresenta condições de reação mais amenas, como também evita problemas tais como formação de sabão e corrosão de reatores. Além disso, os catalisadores enzimáticos, por serem suportados, podem ser facilmente separados do meio reacional e recuperados para reutilização. O lado desfavorável do seu uso é ainda o alto preço de produção, mas que tende a cair com novos desenvolvimentos biotecnológicos.

Tabela 2 - Comparação de diferentes tecnologias para a produção de biodiesel (MARCHETTI; MIGUEL; ERRAZU, 2007)

Variável	Catálise Alcalina	Catálise Ácida	Catálise Enzimática
Temperatura reacional (°C)	60-70	55-80	30-40
Ácido graxo livre presente no material cru	Produtos Saponificados	Ésteres	Ésteres
Água no material cru	Interferência	Interferência	Sem Influência
Recuperação de glicerol	Difícil	Difícil	Fácil
Purificação do produto	Lavagem repetitiva	Lavagem repetitiva	Desnecessária
Corrosão	Não	Sim	Não
Custo de produção do catalisador	Baixo	Baixo	Alto

1.2. Métodos de análise da reação de síntese de biodiesel

Extensivo número de trabalhos relatando a análise da reação de síntese de biodiesel já foram publicados, utilizando diferentes técnicas. Entre as principais metodologias estão a utilização de técnicas cromatográficas e espectroscópicas. No entanto, outros métodos alternativos de análise vêm sendo publicados, fazendo utilização de técnicas calorimétricas e físico-químicas. A Tabela 3 abaixo ilustra algumas aplicações dessas técnicas, como relatadas em diferentes publicações.

Tabela 3 - Principais Técnicas para análise da reação de Biodiesel (de SOUZA, 2011, adaptada).

Técnica	Método	Vantagens/Des vantagens	Referência
CG/DIC	A partir das áreas relativas dos picos obtidos no cromatograma foi possível obter a porcentagem de cada éster graxo na composição do biodiesel	Alta precisão	Marques et al. (2010)
		Flutuação da linha de base; dificuldade na separação dos picos; utiliza o processo de derivatização e necessita de um padrão interno	
CLAE	A conversão foi calculada em relação à porcentagem de volume final de óleo de soja na amostra	Método analítico confiável, preciso e com boa reprodutibilidade	Battisti et al. (2009)
		Uso de solventes e padrões	
IV próx.	A base para a quantificação da reação de transesterificação são as diferenças no espectros. O ésteres metílicos mostram bandas em 6005 cm^{-1} e na faixa de $4425\text{-}4430\text{ cm}^{-1}$, enquanto os triglicerídeos mostram somente ombro	A utilização de solvente não é necessária	Knothe (1999)
		As reações dos intermediários não podem ser monitoradas	
Raman	A quantificação também é realizada a partir das diferenças espectrais entre o óleo e o biodiesel	Espectros Raman apresentam bandas bem definidas e uma menor possibilidade de sobreposição de bandas, tornando simples as medidas quantitativas	Ghesti (2007)
		As reações dos dois intermediários não podem ser monitoradas	
Teste de Combustão	A emissão de hidrocarbonetos proveniente da utilização do biodiesel é inferior ao diesel convencional	Métodos analítico simples e de baixo custo	Ramos (2001)
		Não permite uma análise quantitativa	

Dentre essas técnicas, as espectroscópicas apresentam uma maior diferenciação, pela possibilidade de tomada de dado sem a necessidade de amostragem, como acontece para as outras técnicas. Esse tipo de análise é caracterizada como em Tempo Real, já que não há a necessidade de retirada, transporte e tratamento da amostra que vai ser analisada para que se obtenha a informação. Isso diminui erros sistemáticos da análise, dando uma maior acurácia às medidas. Além disso, facilitam e agilizam o processo, sem que haja demanda de tempo e novos reagentes e é não-destrutiva à amostra. Dentre as técnicas de análise em tempo real

espectroscópica, uma das mais difundidas faz uso de ATR-FTIR (Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada).

1.3. ATR-FTIR

A espectroscopia de Reflectância Total Atenuada (ATR) faz uso de um fenômeno de reflexão interna, onde uma amostra é colocada em contato com um cristal especial – elemento de reflexão interna – (MAN, 2010). O feixe da radiação que entra no cristal sofre reflexão interna ao entrar em contato na interface, quando o ângulo de incidência é maior que o ângulo crítico (dependente do índice de refração dos meios). O feixe entra em contato com a amostra que pode, ou não, absorver parte do comprimento de onda, antes da reflexão. A intensidade do sinal de absorção é atenuado devido às múltiplas reflexões ao longo do comprimento da amostra/cristal (MENDHAM, 2002). A Figura 3 representa uma célula de ATR.

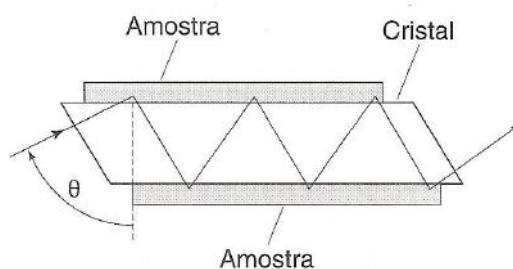


Figura 5 - Representação de um cristal de ATR.

No caso do ATR-FTIR, o laser usado tem comprimento de onda na região de infravermelho e pode ser usado para análises rápidas de bandas vibracionais moleculares e suas mudanças durante uma reação. Com isso, o acompanhamento e o monitoramento de reações são possíveis, de maneira que isso pode ser usado para estudar o comportamento das reações de síntese de biodiesel. Normalmente são usados cristais de diamante ou seleneto de zinco (ZnSe) para as técnicas de ATR.

1.4. Calibração Multivariada

Há mais de dois séculos a dependência da transmissão de luz em um meio que a absorve com a sua concentração já é conhecida. A lei, atribuída a Lambert (1760) e Beer (1852), diz que a absorvância de luz em um determinado comprimento de onda é proporcional à concentração do meio e à distância percorrida. Sua aplicação mais direta, está mostrada na Equação 2, onde Abs_{λ} é a absorvância em determinado comprimento de onda, ϵ_{λ} é a absortividade molar para determinado comprimento de onda, b é o caminho ótico do feixe e C é a concentração do meio.

$$Abs_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times b \times C \quad (2)$$

Com a equação, pode-se associar a absorção em um comprimento de onda com a concentração de uma solução, desde que se conheça a absortividade molar da amostra. Para encontrar esse valor, o método mais comum é utilizando a Regressão Linear. Realizando-se leituras, em determinado comprimento de onda, de n soluções padrão com diferentes concentrações, pode-se construir uma curva $Abs \times C$. De acordo com a Eq. 2, essa curva é uma reta de coeficiente angular “ $\epsilon \times b$ ”. Para o cálculo desse coeficiente angular, faz-se uso do Método dos Mínimos Quadrados, de maneira a minimizar a variância do modelo. Matematicamente, pode-se escrever esses cálculos como mostrado na Equação 3, onde \mathbf{r} é o vetor de dados das n absorvâncias medidas, α é o inverso do coeficiente angular, \mathbf{c} é o vetor concentração das n amostras e ϵ é o vetor correspondendo ao erro de predição do modelo. Quer-se então achar o valor de α que leve o vetor \mathbf{r} ao vetor \mathbf{c} , com os mínimos valores para o vetor ϵ .

$$\vec{c} = \alpha \vec{r} + \vec{\epsilon} \quad (3)$$

$$\vec{r} = \begin{pmatrix} Abs(1) \\ Abs(2) \\ \vdots \\ Abs(n) \end{pmatrix}, \quad \vec{c} = \begin{pmatrix} C_1 \\ C_2 \\ \vdots \\ C_n \end{pmatrix}$$

Tendo achado α e o vetor ϵ , pode-se então calcular a concentração de qualquer amostra desconhecida, apenas com o valor de absorvância encontrado para o determinado comprimento de onda.

Entretanto, esse tipo de calibração faz uso apenas da informação de um único comprimento de onda, e por isso é chamada de Calibração Univariada. A adição de outras fontes de informação ao sistema possibilita um cálculo de maior acurácia e precisão, já que minimiza possíveis erros pontuais. Esse tipo de calibração é chamado de Calibração Multivariada e faz uso de mais de um comprimento de onda como a fonte de informação do sistema.

Existem diferentes métodos de análise multivariada relatados na literatura e com diferentes aplicações. A possibilidade de criação destes cresceu com o desenvolvimento de computadores passíveis de realizar suas contas, que têm um peso algébrico muito mais complexo. Dentre os métodos mais comuns, pode-se citar o MLR (Multiple Linear Regression), o PCR (Principal Component Regression) e o PLS (Partial Least Squares). O mais simples deste é o MLR, que trata de regressões lineares, assim como no caso univariado, mas em dimensões mais elevadas. A diferença é que, no MLR, agora \mathbf{r} e ϵ não são mais vetores e sim as matrizes \mathbf{R} e \mathbf{E} , onde cada linha está associada às diferentes n amostras e cada coluna associada aos m diferentes comprimentos de onda em análise. Além disso, α deixa de ser um escalar e passa a ser o vetor \mathbf{a} , em que cada linha corresponde proporcionalmente à absorvidade molar para cada comprimento de onda. A equação fica escrita como mostrado na Equação 4.

$$\vec{c} = \mathbf{R}\vec{a} + \vec{\epsilon} \quad (4)$$

$$\mathbf{R} = \begin{bmatrix} Abs(1, \lambda_1) & \dots & Abs(1, \lambda_m) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ Abs(n, \lambda_1) & \dots & Abs(n, \lambda_m) \end{bmatrix}, \quad \vec{a} = \begin{pmatrix} a_1 \\ \vdots \\ a_m \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1/b\epsilon_{\lambda_1} \\ \vdots \\ 1/b\epsilon_{\lambda_m} \end{pmatrix}$$

Entretanto, tanto para o MLR quanto para a Regressão Linear Univariada, qualquer informação irrelevante presente nos dados, por exemplo ruídos, são contabilizados para o modelo. No caso acima, supõe-se que uma nova coluna ($m+1$) seja adicionada à matriz \mathbf{R} com valores aleatórios e sem qualquer relação com o fenômeno real medido. O método ainda assim seria capaz de calcular e estimar os parâmetros finais, que teriam sido construídos a partir de valores sem sentido para o modelo, e estariam mascarados por eles.

Com isso, novos métodos surgiram de modo a minimizar esse efeito, e entre eles o PLS. Nesse método, a matriz com a entrada de dados, \mathbf{R} , é decomposta em matrizes do tipo “score” e “loadings”, através de seus autovetores. Autovetores são os vetores que, quando

multiplicado pela matriz, resultam nos mesmos ou múltiplos destes. O conjunto de autovalores da matriz \mathbf{R} forma um subespaço da própria matriz, que pode ter dimensão igual ou menor à dimensão de \mathbf{R} .

As matrizes do tipo “score” são matrizes cujas colunas são preenchidas pelos autovetores de \mathbf{R} . O método de PLS consegue fazer uma seleção desses autovetores (chamados aqui de fatores), de acordo com a influência que esses têm no modelo final. Na verdade, o que é visto é que nem todos os fatores são necessários para o modelo, existindo um número mínimo que leva à menor variância entre modelo-experimento. Deste modo, os fatores de menor influência podem ser desprezados, eliminando informações irrelevantes que apenas adicionariam ruído ao modelo. Assim, o método possibilita a eliminação destes, e leva a matriz \mathbf{R} a um espaço de dimensão menor que o de entrada.

Além disso, o método de PLS possibilita o trabalho com diferentes respostas ao mesmo tempo, de maneira que o vetor \mathbf{c} passa agora a ser uma matriz \mathbf{C} . Pelo método, esta também é decomposta pelos seus autovetores, e juntamente com a decomposição de \mathbf{R} fazem o cálculo do modelo. Assim, com novos métodos de Calibração Multivariada é possível calcular concentrações (além de outros tipos respostas) simultaneamente, utilizando toda uma região espectral.

Hoje, muitos softwares já contêm algoritmos diretos para o processamento dos dados e cálculo dos parâmetros de modelos de calibração. Por exemplo, em um tipo de análise espectroscópica, pode-se fazer o tratamento em cima dos espectros gerados para cada padrão. A Figura 6 ilustra alguns destes pré-processamentos e a Tabela 4 mostra um resumo de como estes são aplicados sobre os dados.

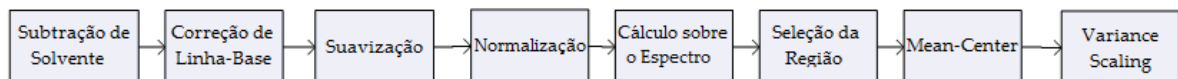


Figura 6 - Etapas de um pré-processamento para o tratamento de um modelo multivariado

Tabela 4 - Diferentes pré-processamentos aplicados em modelos multivariados

Processamento	Aplicação
Subtração de Solvente	Válido para amostras cujo solvente pode ser um interferente ou para pequenas quantidades de amostra. O espectro do solvente puro é subtraído de cada espectro das amostras.
Correção de Linha-Base	Para cada espectro, um ponto é escolhido para corrigir a linha de base. Esse ponto é levado ao zero e o resto do espectro é corrigido em relação a ele.
Suavização	O espectro é suavizado com a média entre as absorções de pontos vizinhos.
Normalização	Para cada espectro, um ponto é escolhido e levado a valor de absorção igual a 1. O resto do espectro é corrigido em relação a ele.
Cálculo sobre o Espectro	Possibilita fazer derivadas do espectro, e cálculos matemáticos sobre ele.
Seleção da Região	Escolha de região que melhor se ajusta para o cálculo do modelo (por exemplo, com maior variação do analito).
Mean-Center	O espectro médio é subtraído do espectro de cada amostra, de maneira a aumentar a diferença entre os espectros individuais em si.
Variance Scaling	Divide cada valor pelo desvio padrão, de maneira a normalizar a grandeza destes e minimizar a variância.

Após um modelo ser construído, é importante avaliar quão bem ele representa seu universo experimental. Para isso, testes estatísticos podem ser usados para avaliar os erros do modelo e a correlação dos valores experimentais e calculados, a partir de testes de hipóteses. Para a avaliação dos erros, três tipos são normalmente estudados: RMSEC (Valor Quadrático Médio do Erro de Calibração), RMSECV (Valor Quadrático Médio do Erro por Validação Cruzada) e RMSEP (Valor Quadrado Médio do Erro de Predição). O primeiro representa o erro da própria calibração e modelagem; já o segundo representa o erro usando a técnica de validação cruzada, em que os pontos são retirados da curva de calibração e usados para testar o modelo, um a um; já o terceiro representa o erro médio para a predição de amostras fora da curva de calibração.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi a aplicação de análise multivariada para monitoramento quantitativo, em tempo real, da reação de esterificação de ácidos graxos utilizando espectrometria no infravermelho e a avaliação do desempenho de diferentes catalisadores na cinética de esterificação.

3. Experimental

3.1. Reagentes e solventes

- Álcool Etílico P.A. 95 % - Vetec Química Fina Ltda.
- Ácido Oleico P.S. – Vetec Química Fina Ltda.
- Ciclohexano P.A. – Vetec Química Fina Ltda.
- Novozyme 435 – Novozymes (Dinamarca)
- Lipozyme TL IM –Novozymes (Dinamarca)
- Lipozyme RM IM – Novozymes (Dinamarca)
- Ácido Clorídrico P.A. –Vetec Química Fina Ltda.

3.2. Aparelho de ATR-FTIR

Foi usado para tomada de espectros um aparelho ReactIR 45m (Mettler Toledo), para a realização da calibração, medidas e monitoramento das reações. O aparelho é equipado com uma sonda DiComp (cristal de Diamante), conectada por uma fibra AgX 9,5 mm x 2 m (Haleto de Prata) e com um Detector MCT usando apodização HappGenzel. As amostras foram analisadas na faixa de 2000 a 650 cm^{-1} , numa resolução espectral de 8 número de ondas e em um intervalo de 15 segundos. O equipamento possibilita a coleta de espectros de líquidos e gás, através da tecnologia de ATR. A Figura 7 mostra uma foto do equipamento.

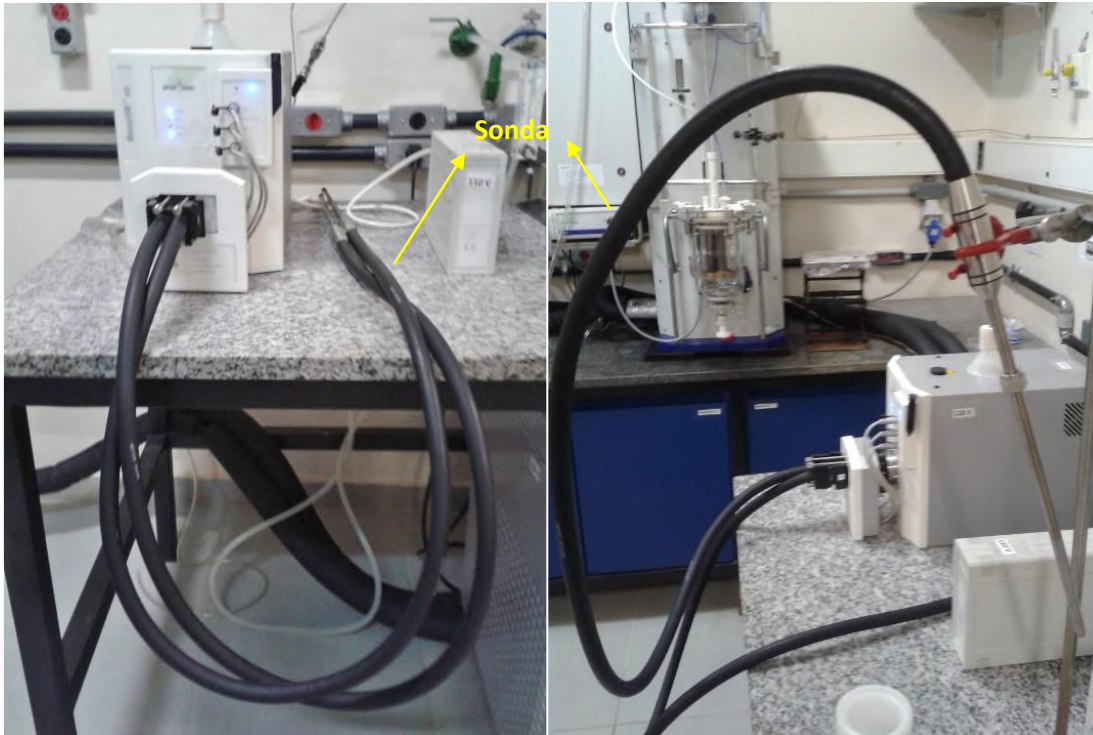


Figura 7 - Foto do equipamento de ATR-FTIR (ReactIR 45m)

3.3. Calibração Multivariada

Onze misturas padrão foram preparadas, simulando diferentes tempos da reação, em que cada um representava um ponto de conversão, como mostrado na Tabela 5. Os componentes da reação, em suas devidas quantidades, foram misturados e levados à temperatura de 57 °C, sob refluxo e agitação de 200 rpm, onde então foram coletados os espectros. Estes espectros foram usados para a construção do modelo de calibração multivariada, a partir do método PLS. Usou-se o software iCQuantTM (Mettler Toledo) para tal fim.

Tabela 5 - Variação na concentração de diferentes misturas padrão usados na calibração multivariada

Padrão	Conversão Teórica (%)	Concentração (M)				
		Ciclohexano	Ácido Oleico	Etanol	Oleato de Etila	Água
1	0	8,326	0,206	0,712	0,000	0,000
2	10	8,326	0,186	0,691	0,021	0,021
3	20	8,326	0,165	0,671	0,041	0,041
4	30	8,326	0,144	0,650	0,062	0,062
5	40	8,326	0,124	0,629	0,083	0,083
6	50	8,326	0,103	0,609	0,103	0,103
7	60	8,326	0,083	0,588	0,124	0,124
8	70	8,326	0,062	0,567	0,144	0,144
9	80	8,326	0,041	0,547	0,165	0,165
10	90	8,326	0,021	0,526	0,186	0,186
11	100	8,326	0,000	0,505	0,206	0,206

3.4. Síntese de oleato de etila

Todas as reações de esterificação foram realizadas, em triplicatas, em reatores de capacidade de 100 mL, acoplados com um condensador de bolas, e controlados pelo equipamento EasyMax™ Workstation (Mettler Toledo). A temperatura de trabalho escolhida foi de 57 °C, regulada pelo equipamento por um sensor de temperatura Pt100 e através de um sistema de jaqueta Peltier. O meio reacional foi mantido sob agitação de 200 rpm, controlado pelo equipamento através de um agitador mecânico Propeller. A reação foi acompanhada utilizando a sonda de ATR-FTIR com coleta espectral de 15 segundos, por um tempo de 180 minutos. Para todas as reações, partiu-se de concentrações de 0,206 M de ácido oleico e 0,712 M de etanol. Os catalisadores foram adicionados ao meio com uma concentração de 10 % m/m em relação ao ácido oleico. A Figura 8 mostra a foto do sistema utilizado para realização e acompanhamento de reação.

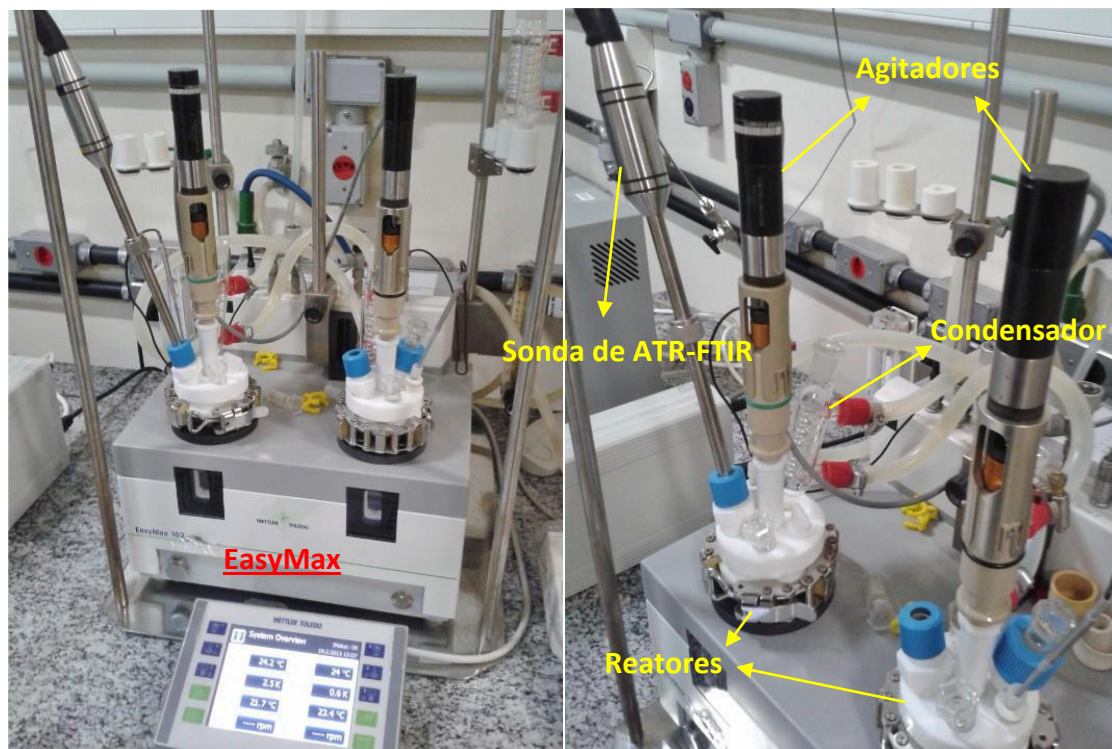


Figura 8 - Fotos do sistema utilizado para as reações

3.5. Quantificação por CG-EM

CG-EM foi usado para a quantificação da conversão final da reação, após o tempo estipulado, utilizando-se a enzima Novozym 435. Ao final da reação, a agitação foi desligada, de maneira a decantar a enzima em suspensão, e retirou-se uma alíquota do meio. Para a derivatização das amostras, adicionou-se 100 μL de MSTFA a 10 μL da amostra, aquecendo à 60 $^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. A mistura foi então dissolvida em 1 mL de ciclohexano e injetada no equipamento.

Todas as amostras foram analisadas usando um cromatógrafo Shimadzu CG2010, equipado com uma coluna DB 5-HT (10 m x 0,32 mm x 0,10 μm), detector de massas no modo de ionização por elétrons (70 eV) e utilizando-se hélio como gás carreador. A temperatura do injetor foi ajustada para 260 $^{\circ}\text{C}$ e a temperatura da coluna foi programada para iniciar em 80 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, aumentando até 150 $^{\circ}\text{C}$ em uma taxa de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e então aumentar para 270 $^{\circ}\text{C}$ em uma taxa de 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Todas as análises de CG-EM foram realizadas externamente e os resultados foram retomados para o trabalho.

4. Resultados e Discussão

Nesse trabalho foi estudada a esterificação do ácido oleico com etanol na presença dos seguintes catalisadores enzimáticos (Novozym 435, Lipozyme TL e Lipozyme RM) e um catalisador mineral (HCl). A análise quantitativa das reações foi feita usando-se um modelo de PLS aplicado aos dados experimentais obtidos por ATR-FTIR. Foi feita a avaliação de desempenho dos diferentes catalisadores empregados na cinética de esterificação.

4.1. Calibração multivariada e otimização do modelo de PLS

Os padrões de calibração tiveram seus espectros coletados à temperatura de 57 °C com agitação mecânica de 200 rpm, de maneira que se pudesse mimetizar o meio reacional o máximo possível. Como não havia catalisador presente, a reação não ocorreria durante essa coleta, não havendo risco de mudança no sinal de absorção de radiação no infravermelho pelo consumo ou produção de algum componente. A Figura 9 mostra o perfil de variação dos espectros coletados para a calibração.

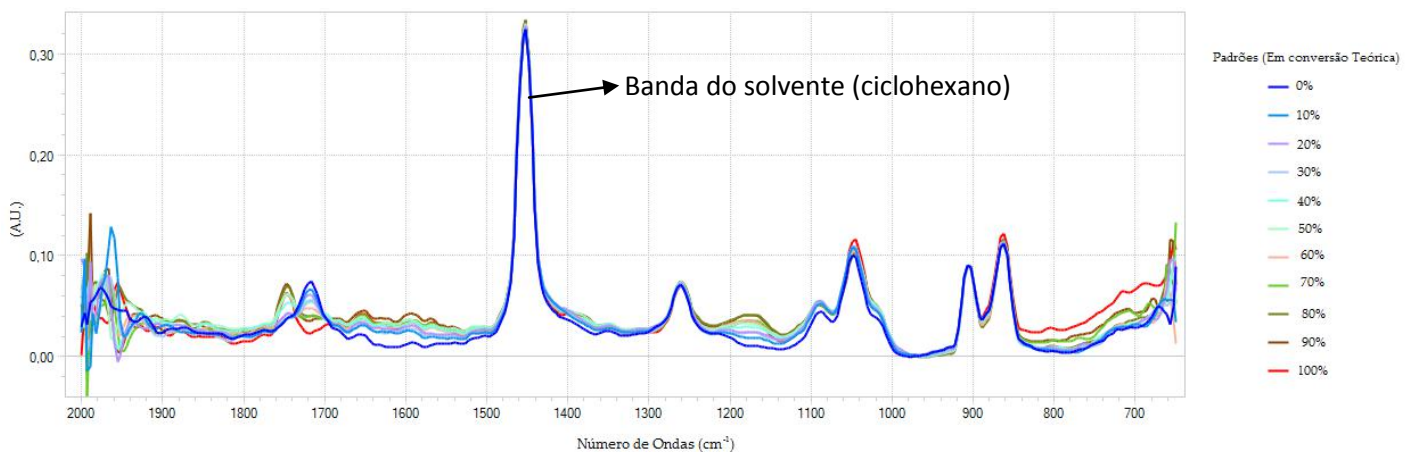


Figura 9 - Perfil de variação nos espectros dos padrões de calibração.

A partir desses espectros, construiu-se o modelo de calibração de PLS, utilizando o software iCQuantTM. De maneira a aperfeiçoá-lo e diminuir erros inerentes ao método, testaram-se 6 combinações de pré-processamento, analisando os erros relativos às respostas. A Tabela 6 mostra as condições dos diferentes modelos testados e seu erro médio.

Tabela 6 - Diferentes ajustes de pré-processamento dos dados para a calibração multivariada^(a)

Modelo	Região Espectral (cm ⁻¹)	Variance Scale	Correção de Linha-Base	Normalização	Cálculo de Espectro	Erro Médio ^(b)
1	1800-770	Não	Não	Não	Não	0,0107
2	1800-770	Sim	Não	Não	Não	0,0088
3	1800-770	Não	Sim (795 cm ⁻¹)	Não	Não	0,0083
4	1800-770	Não	Não	Sim (1452 cm ⁻¹)	Não	0,0055
5	1800-770	Não	Não	Não	1ª Derivada	0,0049
6	1800-1540,1400-1100	Não	Não	Não	1ª Derivada	0,0041

(a) Para todos os modelos usados também foi usado o pré-processamento de Mean Center

(b) Erro médio calculado entre RMSEC, RMSECV e RMSEP para as 3 respostas de concentração.

Os modelos foram construídos usando quatro pontos de testes (20 %, 40 %, 70 % e 80 %), para o cálculo dos erros de predição e para melhor estimação dos parâmetros. Dentre os modelos testados, o que apresentou menor erro médio foi o Modelo 6, de modo que ele foi selecionado para ser usado no monitoramento das reações. Nesse caso, a divisão da região espectral levou a uma melhor resposta do modelo, pois entre 1540-1400 cm⁻¹ há uma grande banda de absorção do próprio solvente, que não conta como informação para o modelo em si. Isso pode ser visto melhor na Figura 10, que mostra o espectro individual de cada componente da reação. O solvente, ciclohexano, possui uma forte absorção perto de 1460 cm⁻¹, que acaba encobrindo por completo as bandas dos componentes da reação que também caem nessa região. Já abaixo de 1100 cm⁻¹, tem-se pouca variação que resultou ser relevante ao modelo, de modo que estava levando uma grande contribuição de ruído.

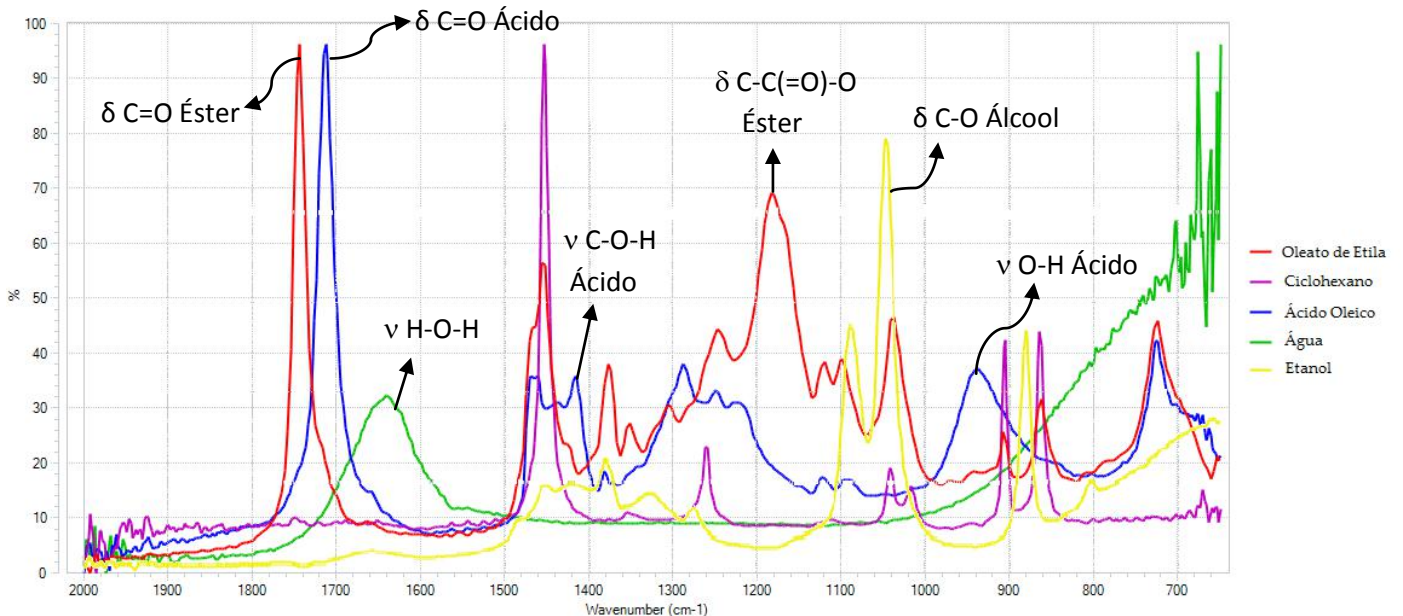


Figura 10 - Espectros individuais de cada componente reacional e atribuição de algumas bandas espectrais.

As Figuras 11 e 12 mostram alguns dos gráficos referentes aos resultados deste modelo.

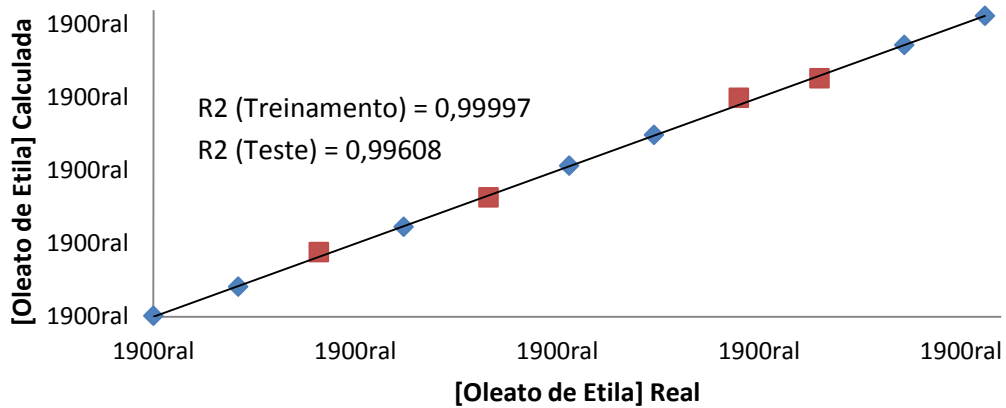


Figura 11 - Gráfico de valores de concentração de oleato de etila Previsto x Real encontradas pelo Modelo 6, onde (◆) são pontos usados no modelo e (■) são pontos de amostras para teste.

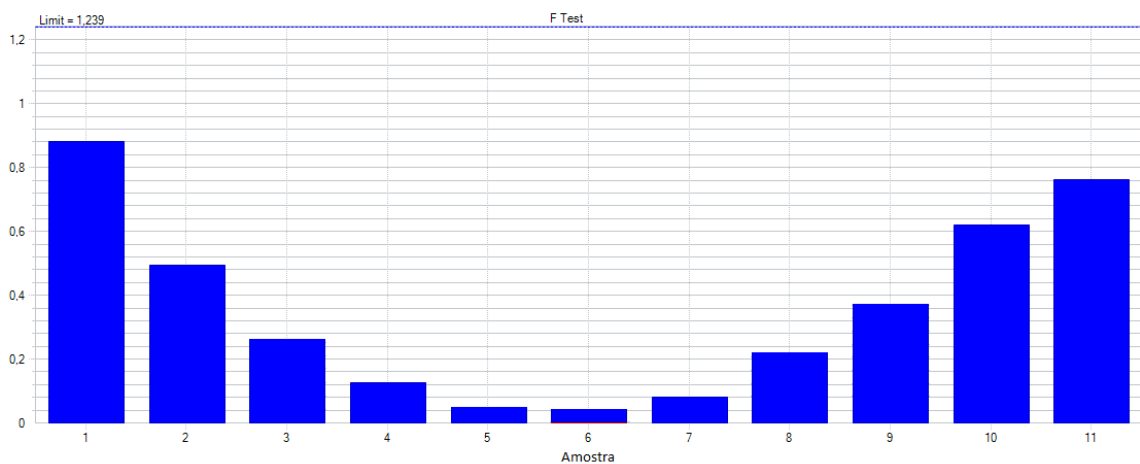


Figura 12 - Cálculo estatístico de variância para cada amostra, onde o limite superior é dado para um grau de confiança de 95 %.

Tabela 7 - Erros calculados para cada resposta do modelo de PLS selecionado

Erro	Resposta		
	[Etanol]	[Ácido Oleico]	[Oleato de Etila/Água]
RMSEC	$4,61 \times 10^{-4}$	$4,58 \times 10^{-4}$	$4,09 \times 10^{-4}$
RMSECV	$6,96 \times 10^{-3}$	$6,94 \times 10^{-3}$	$6,61 \times 10^{-3}$
RMSEP	$3,57 \times 10^{-3}$	$3,67 \times 10^{-3}$	$3,57 \times 10^{-3}$

O modelo mostrou uma boa resposta de predição, tendo um R^2 de treinamento (referente às amostras padrão utilizadas para o cálculo direto do modelo), igual a 1,000. Já o R^2 de teste (referente às amostras padrão utilizadas para avaliar quão bem o modelo prevê a

resposta) igual a 0,9961, para a concentração de oleato de etila. O modelo mostrou um acordo entre todos os espectros das misturas padrão, a partir do teste-F, pela comparação da variância de cada um. O valor de F de cada amostra é então comparado com o valor tabelado (igual a 1,239 para um grau de confiança de 95 %), para então ser julgado se aceitável ou não. Como todos estão abaixo do limite, todos estão de acordo e podem ser usados pelo modelo. Na Tabela 7, são mostrados os valores dos erros para cada resposta. Pode-se ver pelo erro de predição (RMSEP) que o modelo se mostrou bastante preciso e exato para determinar a concentração das soluções de amostras padrão utilizadas para teste, onde o erro foi de $\pm 0,004$ M.

4.2. Monitoramento da síntese de oleato de etila

A reação foi monitorada durante um tempo de 180 minutos, onde se pôde observar o aparecimento e desaparecimento de bandas na região de análise. Devido à maior quantidade de solvente, nem todas as bandas observadas nos compostos puros puderam ser facilmente observadas nas misturas reacionais. Isso já havia sido visto no caso das misturas de calibração, na Figura 9. A Figura 13 mostra a superfície em 3D da variação dos espectros ao longo do tempo de reação.

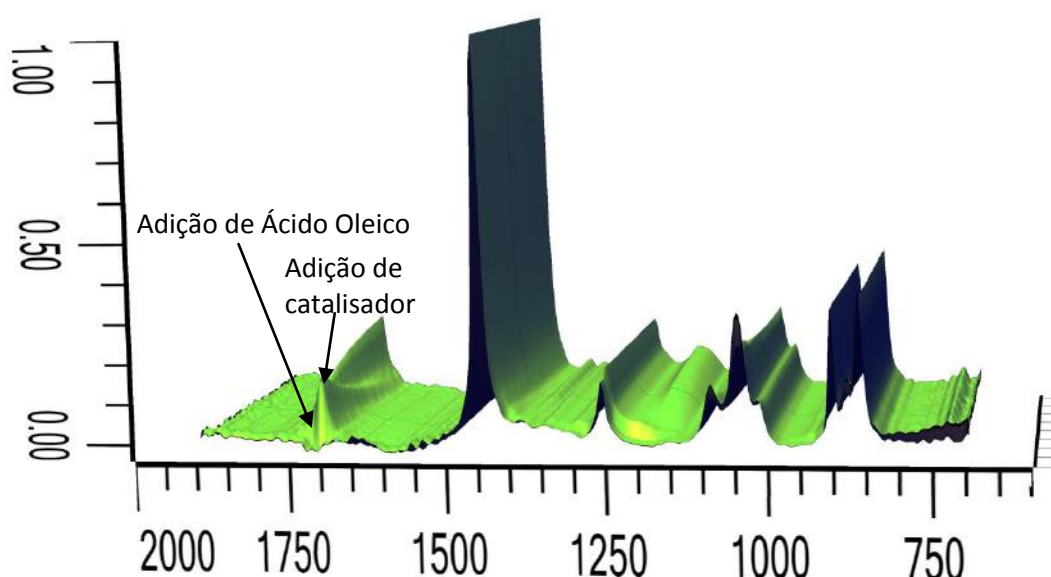


Figura 13 - Superfície 3D mostrando a variação dos espectros ao longo do tempo da reação

Uma vez adicionado o catalisador, tem-se imediatamente o início da reação, podendo-se observar principalmente o decaimento da banda referente à carbonila (C=O) do ácido

oleico, e o aumento das bandas referentes à carbonila e às ligações C-C(=O)-O do éster. Pode-se também ver um perfil de queda relacionada ao etanol em 1090 cm^{-1} e o deslocamento da banda de C-O do etanol para o do éster, indo de 1047 cm^{-1} a 1040 cm^{-1} . Esse perfis são mostrados na Figura 14 e 15, para a reação utilizando a enzima Novozym 435.

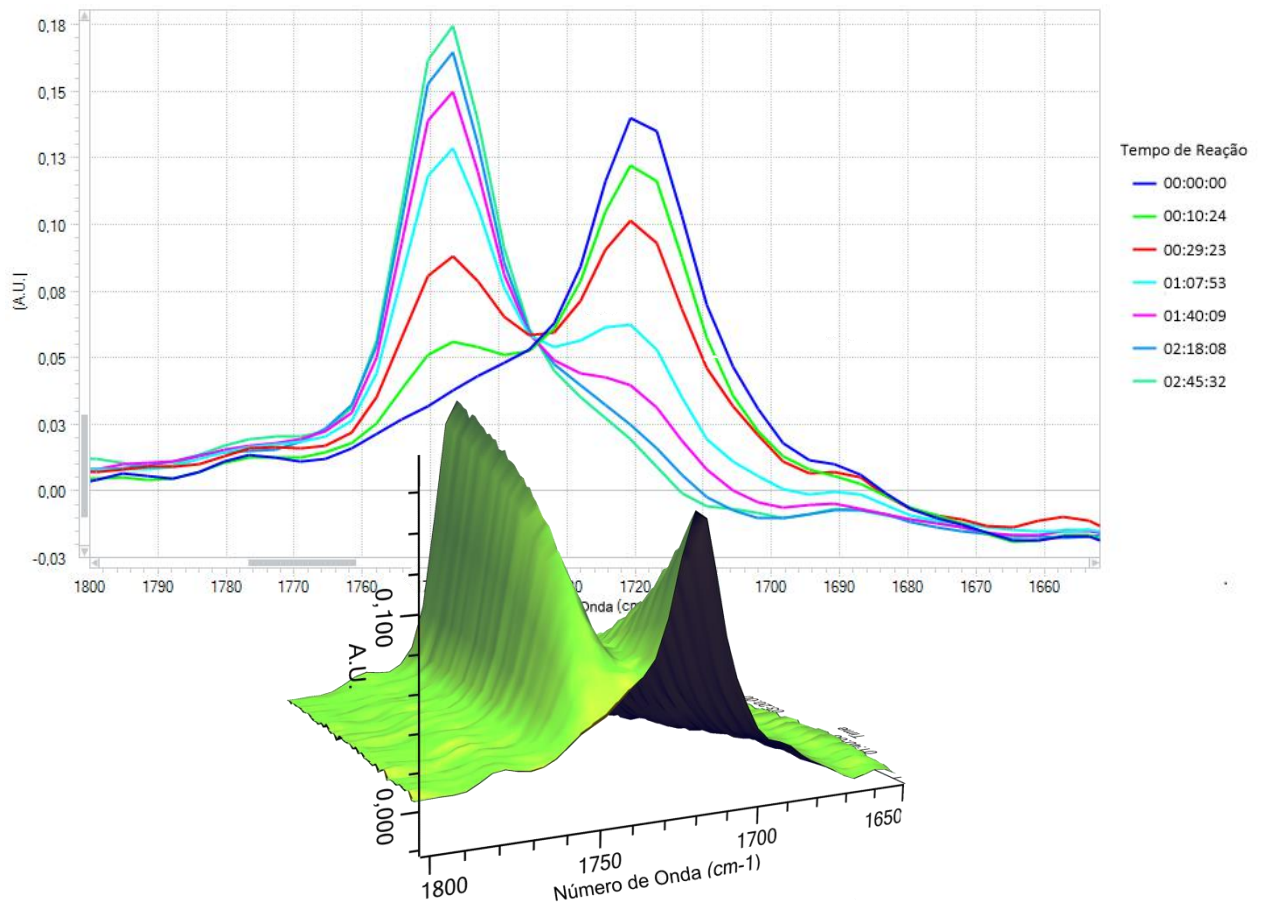


Figura 14 - Perfil de variação para as bandas C=O de ácido e éster em diferentes tempos de reação e em superfície 3D.

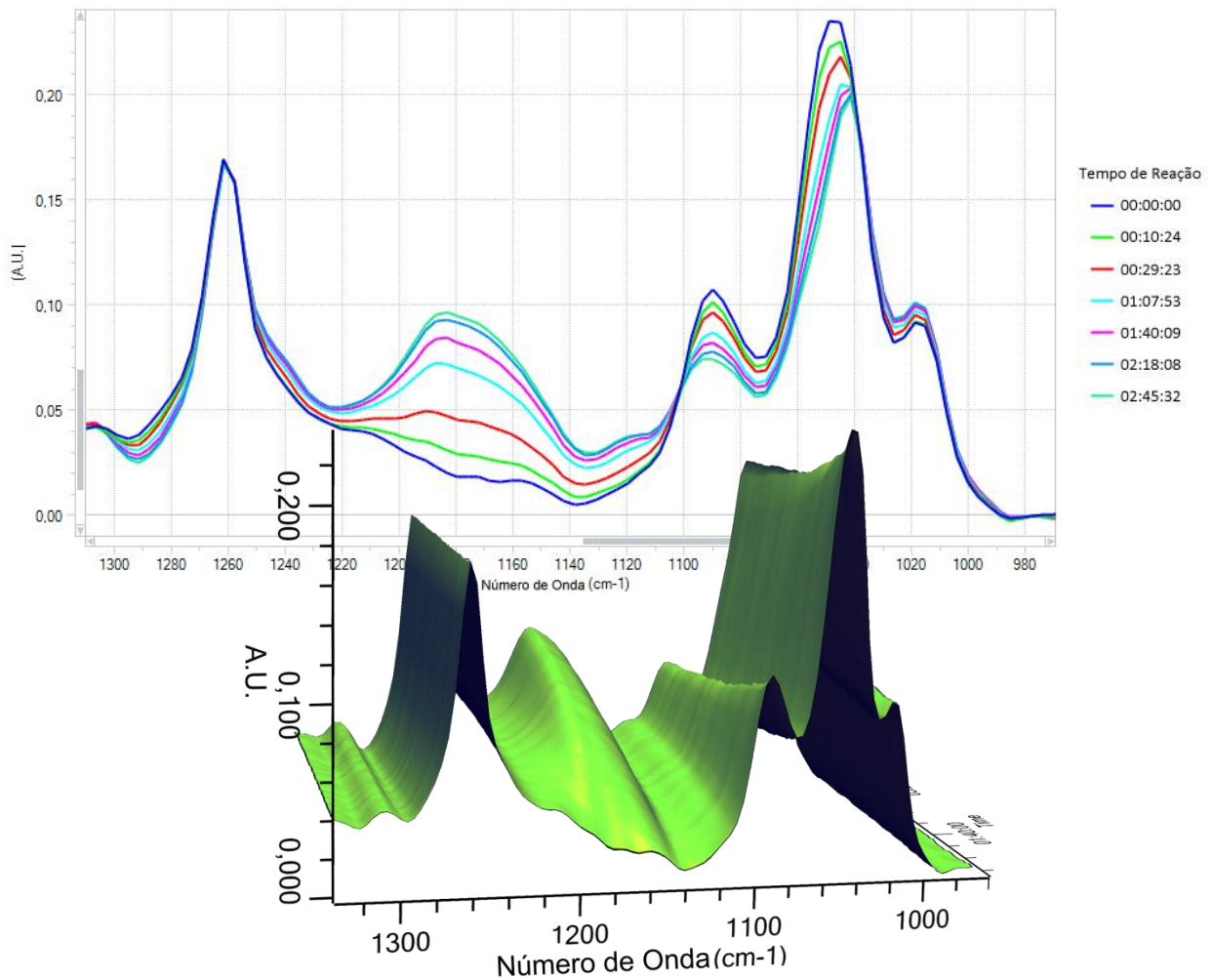


Figura 15 - Perfil de variação de bandas referentes ao éster e ao álcool em diferentes tempos de reação e em superfície 3D.

Um monitoramento prévio do comportamento da reação pode ser realizado a partir do acompanhamento da área abaixo de cada banda espectral. À medida que houver variação causada pela reação, isso afetará a área calculada e, portanto, indicará uma diminuição ou aumento da concentração do composto representado pela banda. Esse tipo de monitoramento é simples e permite determinar a variação de cada composto do meio reacional até o término da reação. Entretanto, esse acompanhamento é pontual e não permite, por si só, uma avaliação quantitativa da reação. Para isso, utilizou-se da calibração multivariada para analisar a variação de cada componente. A Figura 16 mostra a comparação do monitoramento a partir da área de cada banda e através da calibração multivariada.

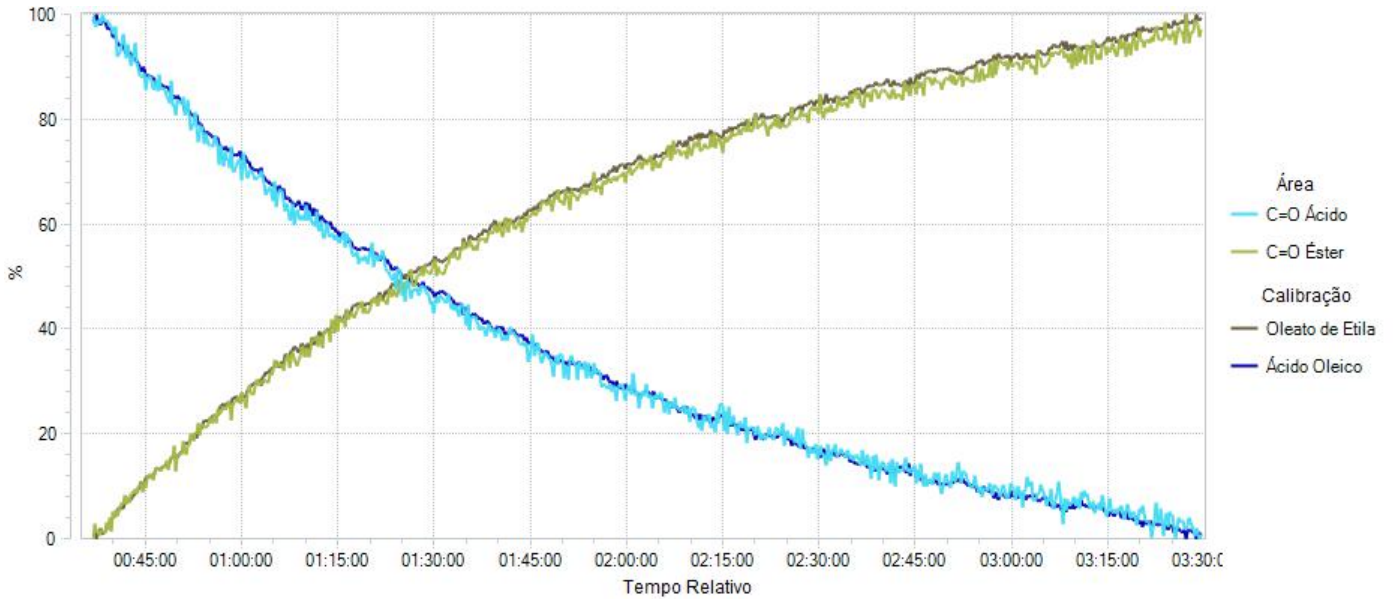


Figura 16 - Comparação entre o monitoramento por Área e por Calibração Multivariada.

Pode-se notar que realmente o perfil de variação é o mesmo e se mantém entre os dois métodos. Entretanto, no caso da calibração, além do monitoramento da própria concentração em si, tem-se uma curva mais suave e com menos ruído. Isso se dá justamente por usar informações de mais de uma banda no espectro.

4.3. Repetitividade no monitoramento das reações

Realizaram-se testes de repetitividade, de modo a avaliar se o acompanhamento pela curva de calibração, para experimentos iguais, não seria afetado. Para isso, fez-se a mesma reação em três dias diferentes, para então comparar os resultados. A Figura 17 mostra o gráfico de concentração por tempo, para a reação utilizando a Lipozyme RM como catalisador.

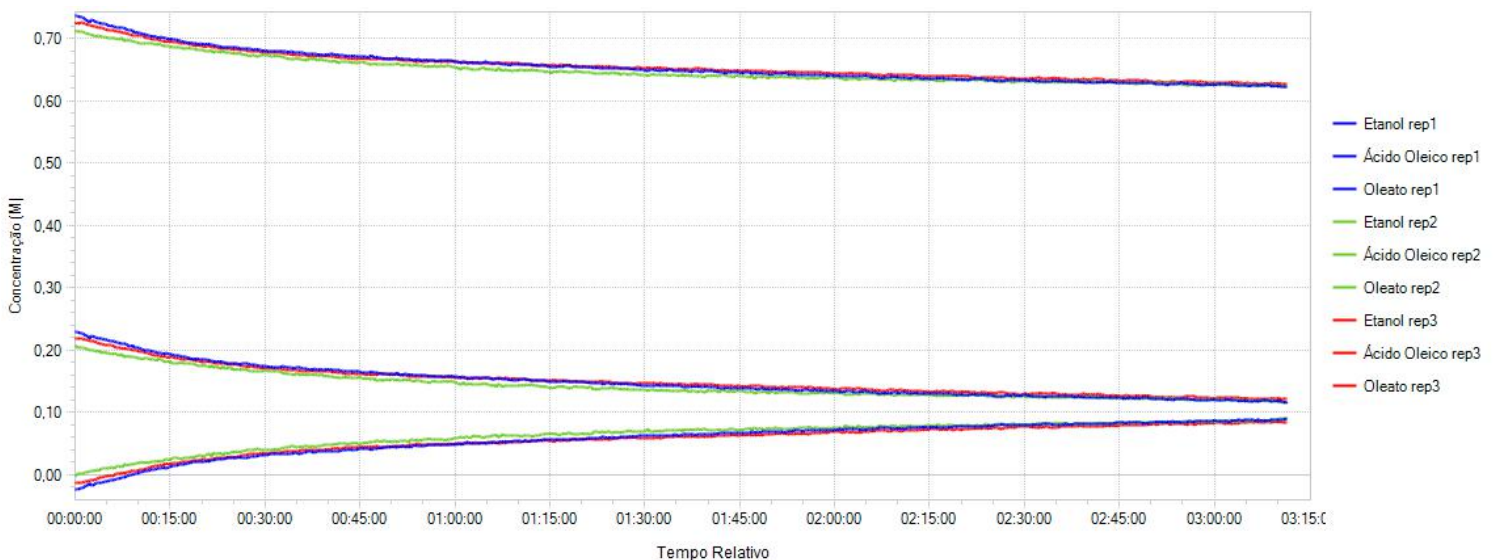


Figura 17 - Comparação da repetitividade no monitoramento da reação através da calibração multivariada.

Pode-se ver que os experimentos se mostraram bastante repetitivos, apesar de haver uma maior variação nas concentrações iniciais da reação. Esse perfil também foi encontrado para os diferentes catalisadores, indicando que o modelo de calibração possui um maior erro nessa faixa inicial. Essa variação representa, então, o erro máximo de predição da curva de calibração. No caso dessa enzima, o intervalo de confiança calculado para a concentração é de $\pm 0,02$ M.

Apesar da variação, a curva ainda assim mostrou uma boa precisão na medição dos valores de concentração. Entretanto, há a necessidade de estipular um intervalo de confiança e melhoria nos valores calculados daqui para frente, de modo que todas as reações foram realizadas em triplicatas.

4.4. Avaliação do modelo de calibração a partir da comparação com a técnica de CG-EM

Para testar agora a exatidão do modelo, acompanhou-se a reação utilizando a enzima Novozym 435 e retirando uma alíquota após 180 minutos. A alíquota tirada foi analisada por CG-EM. Os valores das triplicatas determinados por cada resposta da curva de calibração foram então comparados com os determinados por CG-EM. Os resultados estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Comparação entre valores de conversão calculados pelo modelo de calibração de ATR-FTIR e por CG-EM, para a reação utilizando Novozym 435 como catalisador

Resposta	Conversão calculada (%)
Etanol (Modelo)	92
Ácido oleico (Modelo)	93
Oleato (Modelo)	92
CG-EM	89

O resultado medido pela curva de calibração foi muito próximo da conversão encontrada por CG-EM. Esse último pode, por exemplo, apresentar erro na etapa de preparação da amostra. Ainda assim, a partir do erro de precisão dos dois métodos, pode-se considerar que as duas médias são iguais. Com isso, conclui-se que o modelo também possui uma boa exatidão, uma vez que a conversão encontrada foi muito próxima à calculada por um método clássico.

4.5. Comparação entre catalisadores

4.5.1. Novozym 435

A primeira reação monitorada foi catalisada pela enzima Novozym 435, que é a lipase proveniente da *Candida antarctica* e uma das mais utilizadas na área de catálise. A enzima mostrou um alto poder de conversão, tendo convertido quase completamente os reagentes, no tempo de análise. A Figura 18 mostra a média da concentração dos componentes da reação, entre as triplicatas, onde se pode ver a quase completa conversão para a reação.

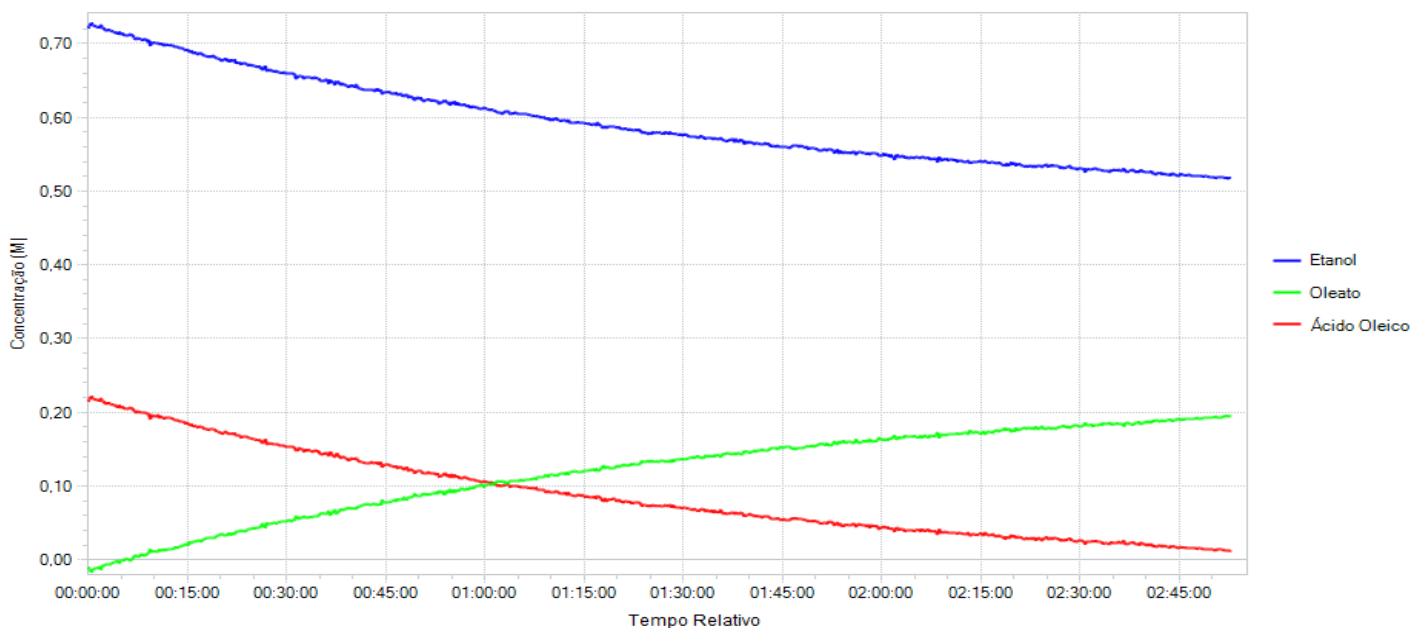


Figura 18 - Média da variação de concentração de cada componente reacional, na reação com Novozym 435 como catalisador.

A conversão final, calculada para cada resposta do modelo de calibração, é mostrada na Tabela 8, onde foi comparada à média do CG-EM. Pôde-se determinar uma conversão média de 92 %, com 180 minutos de reação.

4.5.2. Lipozyme RM

A utilização da enzima Lipozyme RM também é bastante relatada para as reações de produção de biodiesel, onde junto com a Lipozyme TL mostram um menor poder de conversão. Isso também foi observado nesse trabalho, onde se teve uma conversão final

média de 43 %, após o tempo estabelecido. A Figura 19 mostra o perfil de variação médio da concentração dos componentes da reação e a Tabela 9 apresenta a conversão encontrada para cada resposta do modelo de calibração.

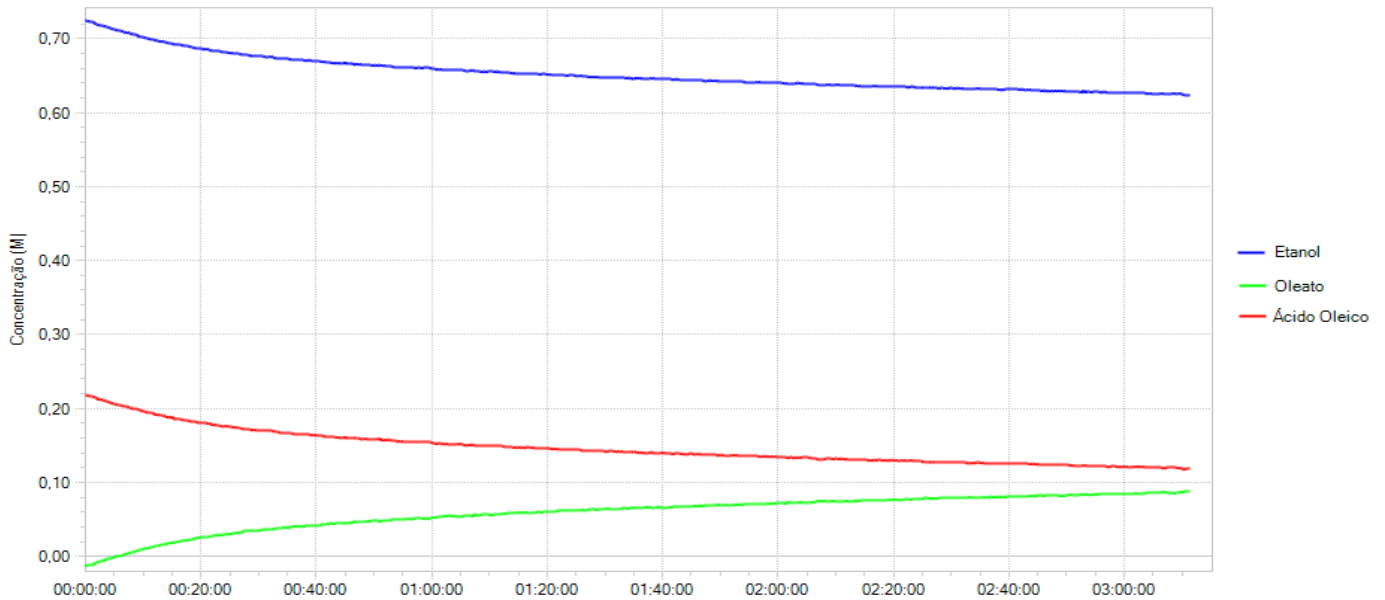


Figura 19 - Média da variação de concentração de cada componente na reação com Lipozyme RM como catalisador.

Tabela 9 - Valores de conversão média (entre as triplicatas), medidos pelo modelo de calibração para a reação, utilizando Lipozyme RM como catalisador

Resposta	Conversão (%)
Etanol (Modelo)	43,4
Ácido oleico (Modelo)	43,4
Oleato (Modelo)	43,4

4.5.3. Lipozyme TL

A reação utilizando a enzima Lipozyme TL se mostrou um pouco inferior em relação à conversão alcançada pela Lipozyme RM. Pôde-se determinar uma conversão média de 39 %, o que mostra que as duas enzimas não apresentam muita diferença para produção de biodiesel. A Figura 20 mostra o perfil de variação médio da concentração dos componentes da reação e a Tabela 10 a conversão encontrada para cada resposta do modelo de calibração.

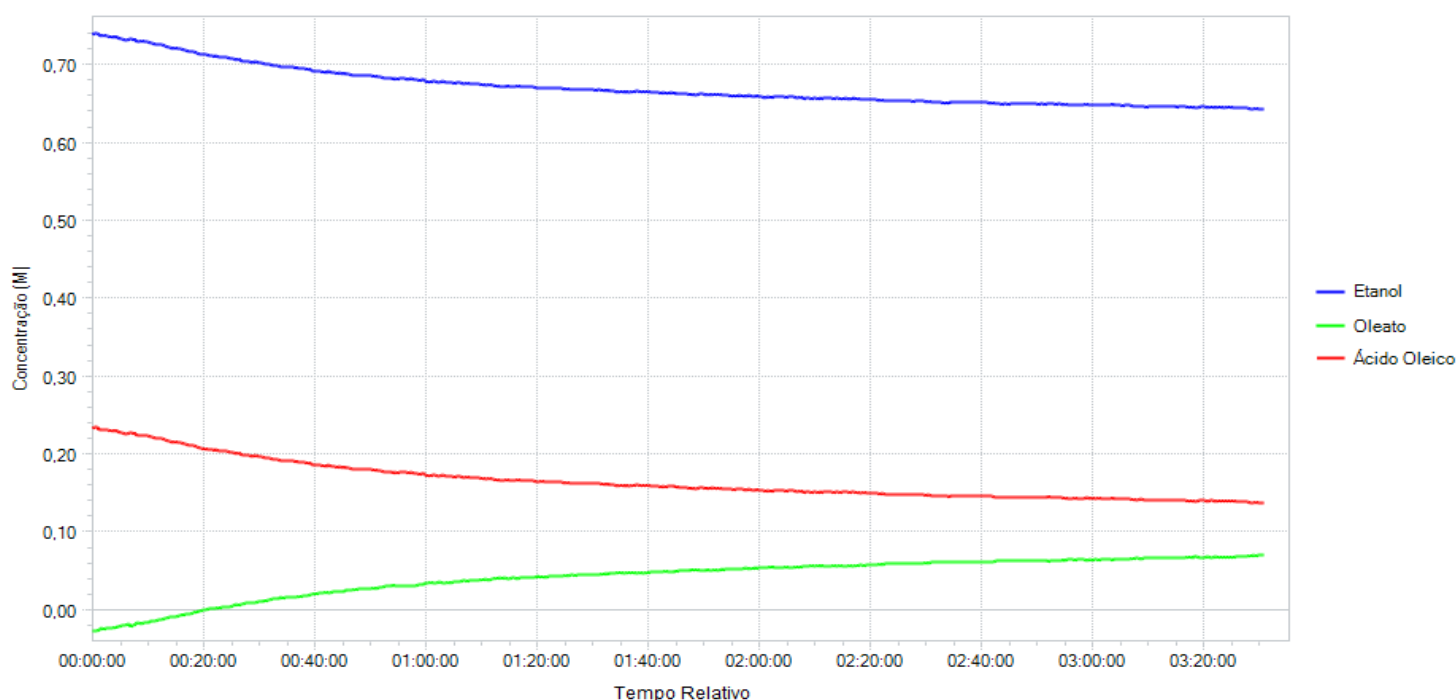


Figura 20 - Média da variação de concentração de cada componente na reação com Lipozyme TL como catalisador.

Tabela 10 - Valores de conversão média (entre as triplicatas), medidos pelo modelo de calibração para a reação, utilizando Lipozyme TL como catalisador

Resposta	Conversão (%)
Etanol (Modelo)	38,6
Ácido oleico (Modelo)	38,2
Oleato (Modelo)	38,6

4.5.4. Ácido Clorídrico

A reação catalisada por ácido clorídrico também foi realizada, de maneira que se pudesse avaliar o uso da curva de calibração para catalisadores homogêneos. A reação obteve rendimento muito baixo, comparado aos outros catalisadores, onde a média da conversão medida pelo modelo de calibração foi de 15 %. Industrialmente, catalisadores minerais são empregados para a produção de biodiesel, mas sob maior temperatura de trabalho, e com a utilização do próprio álcool em excesso como solvente. Nesse caso, a conversão para esse tipo de catalisador é alta e eficaz. Já para as condições de reação deste trabalho, catalisadores minerais têm pouca eficiência e não seriam as melhores escolhas. A Figura 21 mostra o perfil de variação médio da concentração dos componentes da reação e a Tabela 11 a conversão encontrada para cada resposta do modelo de calibração.

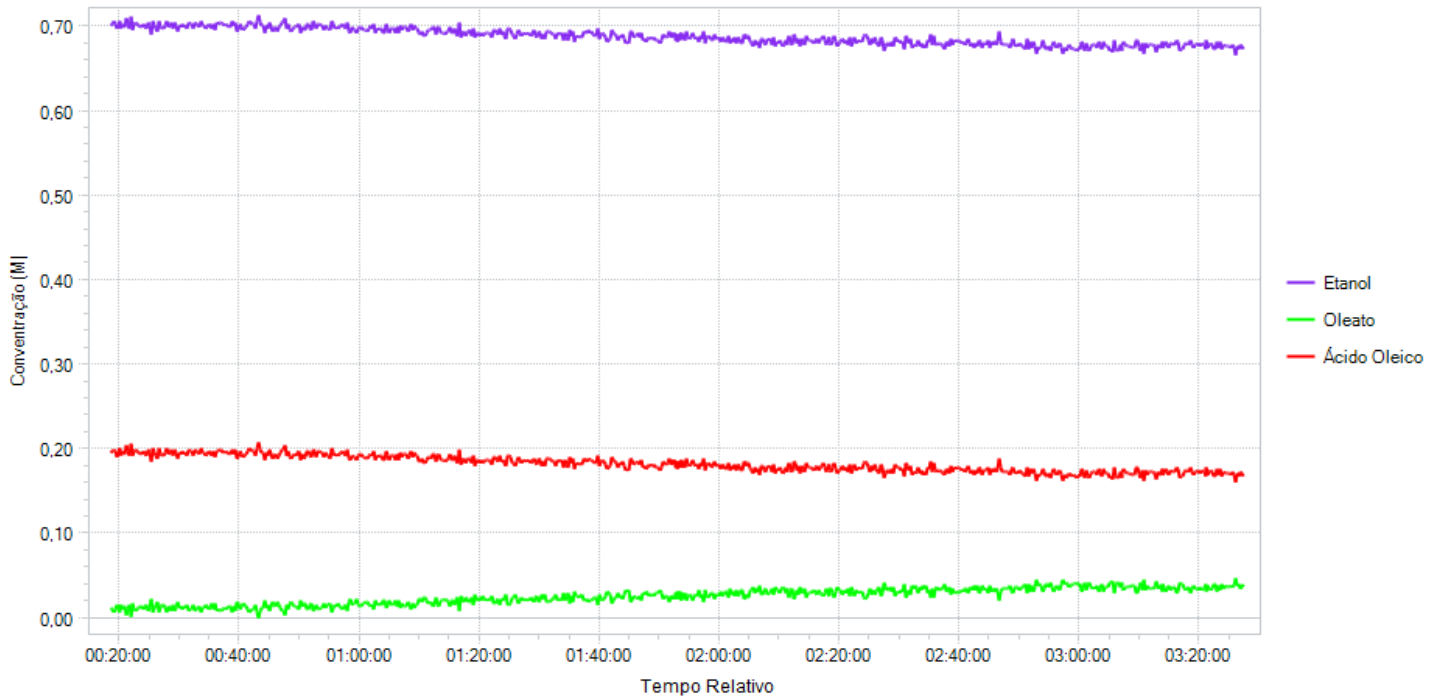


Figura 21 - Média da variação de concentração de cada componente na reação com HCl como catalisador.

Tabela 11 - Valores de conversão média (entre as triplicatas), medidos pelo modelo de calibração para a reação, utilizando HCl como catalisador

Resposta	Conversão (%)
Etanol (Modelo)	13,1
Ácido oleico (Modelo)	14,2
Oleato (Modelo)	16,0

4.5.5. Comparação por Regressão

Pôde-se ver no modelo que há um maior erro associado às conversões medidas no início da reação, onde muitas vezes assumem valores negativos. Entretanto, viu-se que, ainda assim, o modelo de calibração possui um bom nível de exatidão, principalmente para as taxas finais de conversão. Com isso, pode-se estimar uma curva exponencial que represente o aumento na concentração de oleato de etila (MAHMUD, 2010), da forma:

$$C_{OE} = C_{OE,ES}[1 - \exp(-\lambda t)] \quad (5)$$

Onde, C_{OE} é a concentração de oleato de etila, $C_{OE,ES}$ é a concentração de oleato de etila no estado estacionário da reação, λ é o coeficiente exponencial de aumento e t é o tempo da reação.

Dessa forma, sabendo-se que se tem um crescimento do tipo exponencial, consegue-se construir uma curva em que se minimize a variação experimental, a partir das triplicatas. Além disso, a curva elimina o erro maior a baixas conversões. A Figura 22 ilustra a comparação das curvas experimental e modelada, para o caso em que se tem a Lipozyme RM como catalisador.

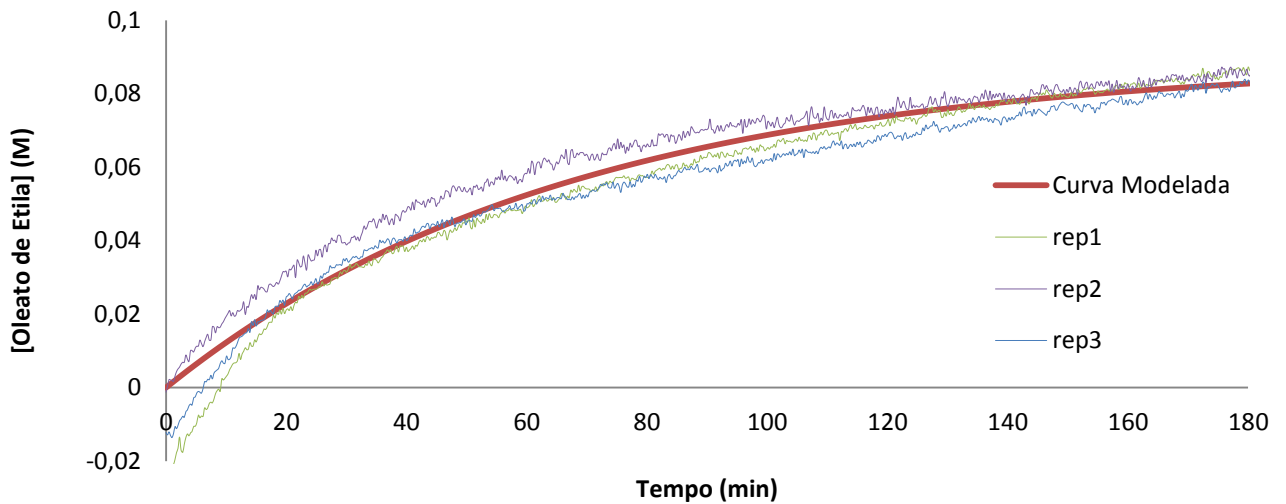


Figura 22 - Comparação da curva modelada e as curvas experimentais para a concentração de Oleato de Etila

A partir dessa curva modelada, pôde-se então ter uma estimativa mais suave do comportamento das reações, de maneira a comparar a conversão de cada uma. A Figura 23 mostra o gráfico de conversão para todos os catalisadores estudados, onde se pode ver que realmente a Novozym 435 é o melhor catalisador.

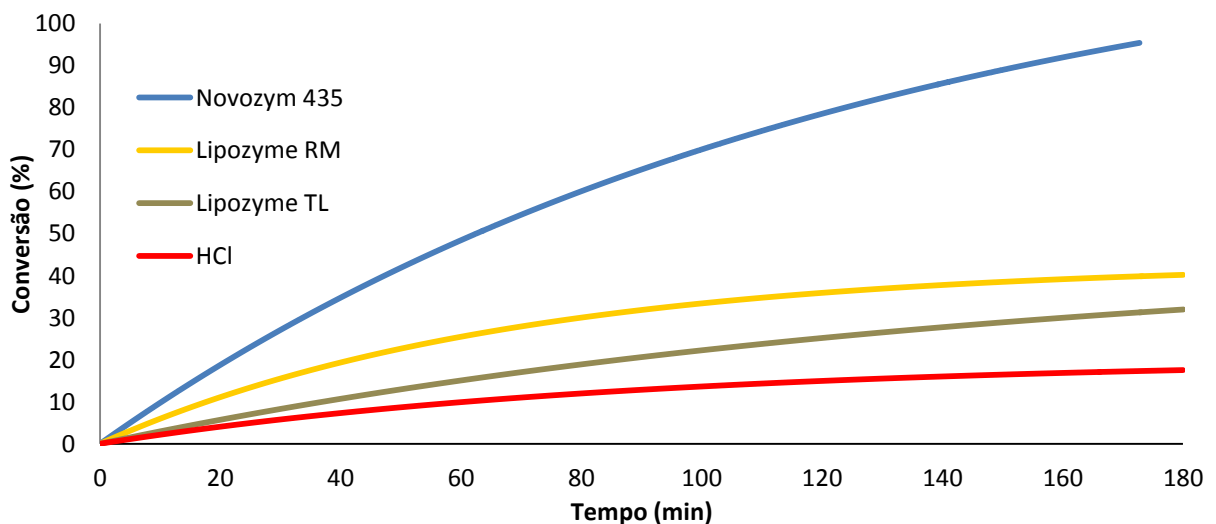


Figura 22 - Curvas de conversão modeladas para os diferentes catalisadores de trabalho

Os resultados encontrados nesse estudo são muito próximos aos relatados por Côrrea et al., para a síntese de biodiesel a partir de óleo de palma. Nesse estudo, os autores também testam essas três enzimas, em condições similares, mas monitorando a partir de análises cromatográficas. O nosso estudo, além de minimizar efeitos de amostragem, também possibilita uma análise mais aprofundada da reação, já que as curvas são construídas com um número maior de pontos.

4.6. Avaliação da cinética enzimática

O acompanhamento quantitativo e *inline* das reações permite uma análise mais aprofundada sobre seu comportamento, já que cada curva possui uma grande quantidade de pontos. Com isso, não há a necessidade de tratamentos mais simples, como o Método das Velocidades Iniciais, onde se estuda somente o comportamento nos primeiros minutos de reação. Esse tipo de tratamento acaba deixando muita informação de fora, o que o leva a ser mais dispendioso (pois exige um maior número de experimentos). Com isso, a partir das curvas experimentais obtidas pelo método proposto nesse trabalho, podem-se testar modelos cinéticos que consigam responder ao sistema e avaliar mecanismos de reação.

A partir dos experimentos realizados, avaliou-se então a cinética das reações enzimáticas, partindo do modelo proposto por Paiva et al. (2000) e o mecanismo do tipo Ping Pong Bi Bi. Para tal, inicialmente calculou-se a curva de regressão para a variação de oleato de etila, descrita pela Equação 5, a partir das triplicatas de cada reação. Da curva, pode-se obter a velocidade de reação experimental a partir da sua derivada, e esta pode ser usada para modelar uma equação cinética.

Para o modelo calculado de velocidade, estimaram-se os parâmetros da Equação 5 que minimizassem o erro em referência à velocidade experimental, pelo método dos mínimos quadrados. A Figura 24 mostra os gráficos relacionados à velocidade experimental e à velocidade calculada pelo modelo da Equação 5. A Tabela 12 apresenta os valores para os parâmetros otimizados.

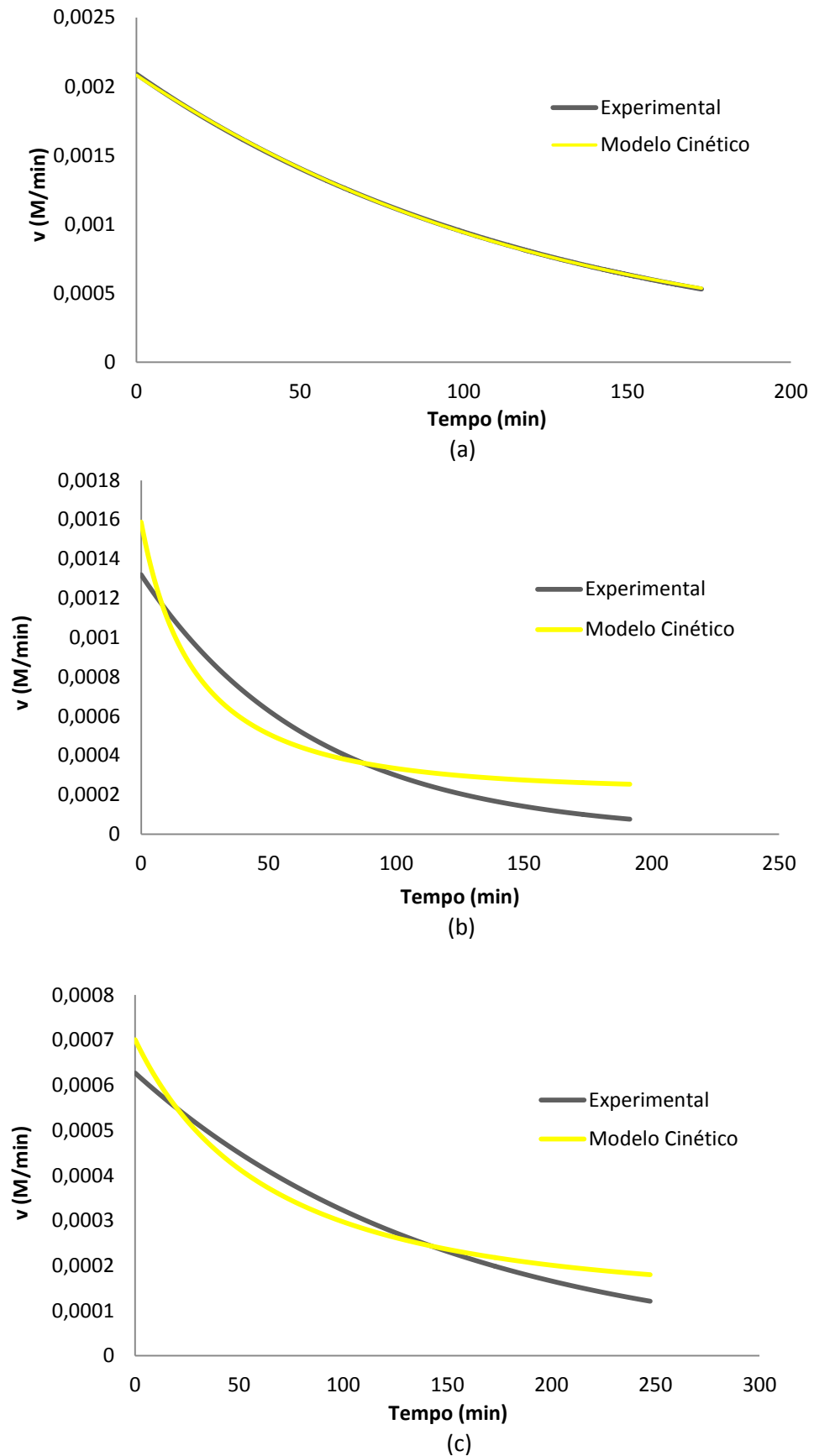


Figura 23 - Gráficos de velocidade experimental e velocidade modelada pelo mecanismo Ping Pong Bi Bi para: (a) Novozym 435; (b) Lipozyme RM e (c) Lipozyme TL

Tabela 12 - Valores dos parâmetros otimizados para o mecanismo Ping Pong Bi Bi, para cada enzima

Parâmetros	Novozym 435	Lipozyme RM	Lipozyme TL
$k_1k_2k_3k_4k_5k_6$	143	9	6
$k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}k_{-6}$	59	0	0
$k_1k_2k_3k_{-4}k_{-5}k_{-6}$	5467	220	4371
$k_{-1}k_3k_4k_5k_6$	8630	1054	41
$k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_6$	194	9961	9421
$k_{-1}k_3k_{-4}k_5k_{-5}k_{-6}$	1662	9985	9469
$k_1k_3k_4k_6(k_2+k_5)$	19033	377	1991
$k_{-1}k_{-3}k_{-4}k_{-6}(k_2+k_5)$	5160	9991	9727
$k_1k_{-3}k_{-4}k_6(k_2+k_{-2})$	1272	10	1940
$k_{-1}k_3k_4k_{-6}(k_5+k_{-5})$	4185	6110	8532
R^2	1,000	0,9067	0,9559

Pode-se notar que, embora o modelo tenha se ajustado muito bem à Novozym 435, ele se mostrou bem falho para as outras duas enzimas. Essa falha pode ser vista analisando o segundo parâmetro, que apresenta valor zero para ambas as enzimas. Isso pode indicar que o mecanismo não descreve bem, principalmente no que se refere às etapas de volta da reação. A única maneira encontrada para o modelo descrever bem a velocidade dessas duas enzimas foi quando esse parâmetro assumiu valores negativos. Como se sabe que as constantes de velocidade cinéticas não podem assumir valores negativos, os parâmetros tiveram que ser otimizados com restrição para valores positivos.

Com isso, um novo mecanismo precisa ser testado para avaliar a cinética das enzimas Lipozyme RM e Lipozyme TL. O Modelo Ping Pong Bi Bi descreve um mecanismo ordenado, em que se tem a interação dos reagentes em ordem específica com a enzima, o que está de acordo com a proposição de Paiva et al. (2000). Outro tipo de mecanismo muito comum em cinética enzimática de multisubstratos trata de interações desordenadas com a enzima. Isto é, ambos reagentes podem se ligar à mesma, em ordem aleatória, para a formação do produto. A Figura 25 ilustra um esquema do mecanismo Bi Bi Aleatório, e a Equação 6 representa a velocidade para esse mecanismo (BISSWANGER, 2002, p. 110). Para tal equação, é levada uma simplificação significativa, em que é assumido que os equilíbrios são muito mais rápidos que a conversão do complexo ternário enzimático (EAB) e (EPQ) – Mecanismo de Rápido Equilíbrio Aleatório.

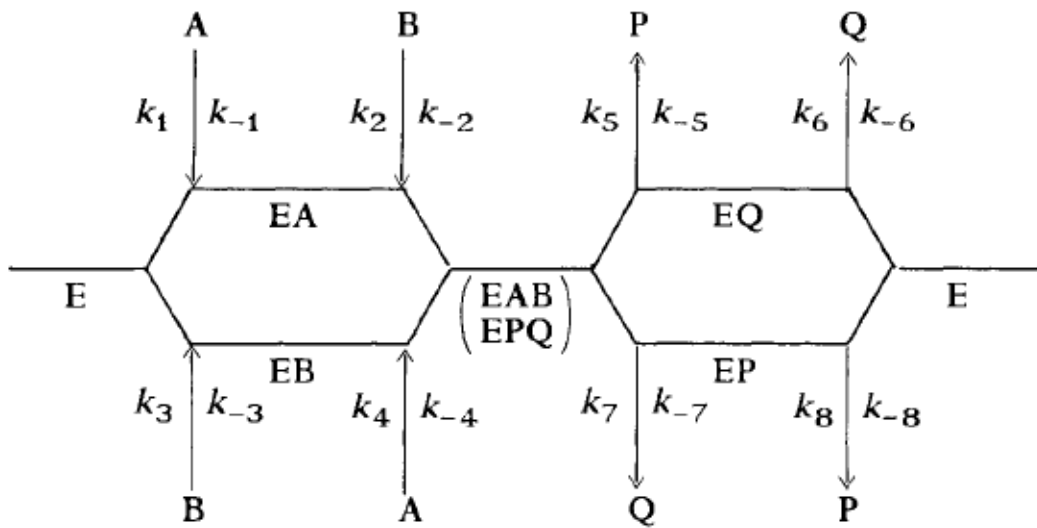
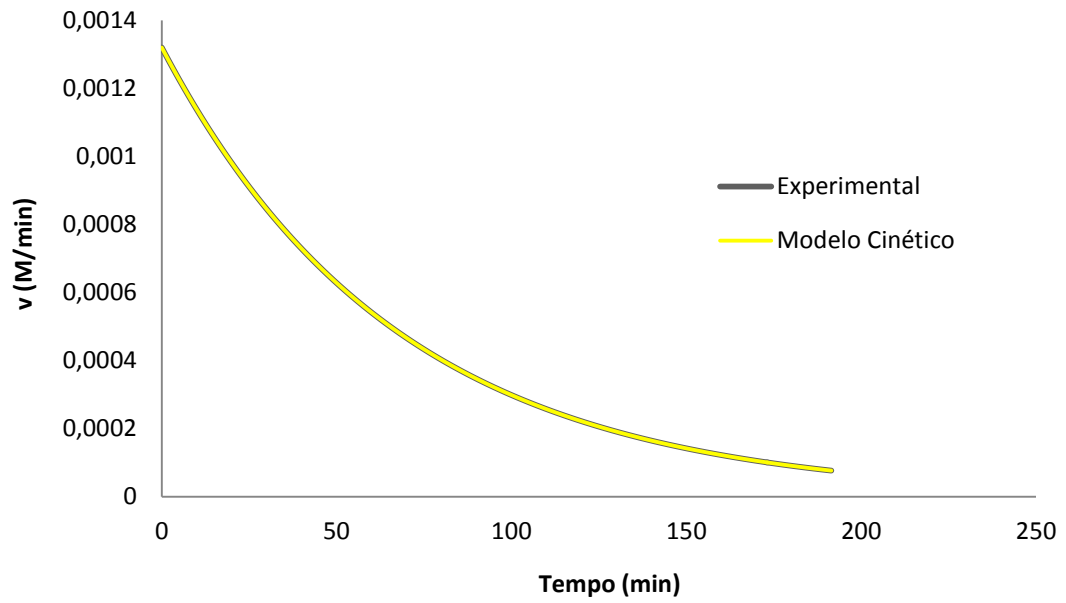


Figura 24 - Esquema do Mecanismo Bi Bi Aleatório

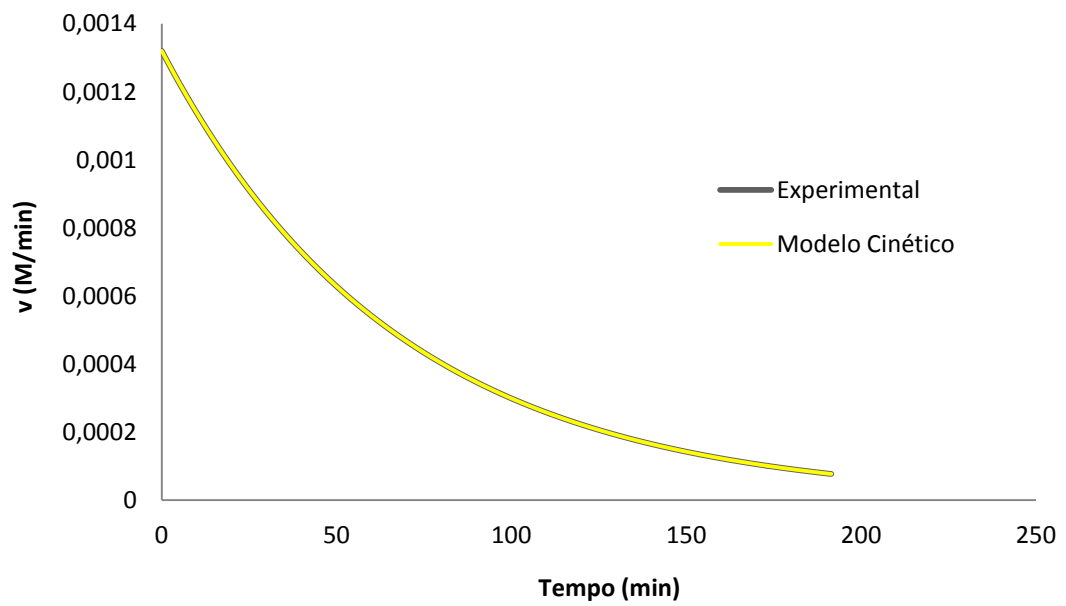
$$v = \frac{V_1 V_2 \left([A][B] - \frac{[P][Q]}{K_e} \right)}{K_{iA} K_{mB} V_2 + K_{mB} V_2 [A] + K_{mA} V_2 [B] + \frac{K_{mQ} V_1 [P]}{K_e} + \frac{K_{mP} V_1 [Q]}{K_e} + V_2 [A][B] + \frac{V_1 [P][Q]}{K_e}} \quad (6)$$

Testou-se, então, o mecanismo para as duas enzimas Lipozyme, de maneira a avaliar se o mesmo responderia bem para modelar a velocidade das duas reações. A Figura 26 mostra o gráfico da velocidade experimental e modelada para as duas enzimas, e a Tabela 13 os valores para os parâmetros otimizados.

Pode-se ver que agora o modelo conseguiu representar perfeitamente a velocidade no caso das duas enzimas, indicando que este mecanismo seria mais adequado para explicar o comportamento da reação. Desta forma, as duas enzimas não seguiriam o mecanismo proposto por Paiva et al. (2000), e não sofreriam a dependência direta da interação inicial de ácido oleico à enzima.



(a)



(b)

Figura 25 - Gráficos de velocidade experimental e velocidade modelada pelo mecanismo Rápido-Equilíbrio Bi Bi Aleatório para: (a) Lipozyme RM e (b) Lipozyme TL

Tabela 13 - Valores dos parâmetros otimizados para o mecanismo de Rápido Equilíbrio Bi Bi Aleatório, para cada enzima

Parâmetros	Lipozyme RM	Lipozyme TL
V_1	8415	9443
V_2	276	119
K_{eq}	0,108	0,127
K_{iOA}	1817	2192
K_{mEtOH}	513	1008
K_{mOA}	2407	7597
$K_{mH_2O/OE}$	9261	7592
$K_{mH_2O/OE}$	7300	7399
R^2	1,000	1,000

De acordo com os parâmetros otimizados, tem-se que a afinidade do ácido oleico com a enzima é maior que a do etanol com a mesma, nos dois casos, e que há também uma parcela de inativação pelo próprio oleato. A constante de equilíbrio representada na equação é relacionada à reação como um todo. Ou seja, isso indica que o equilíbrio final das duas reações estarão muito próximos, de modo que a conversão no equilíbrio deve estar muito perto para as duas. Apesar de os experimentos não terem ido até o equilíbrio, pode-se ver que realmente as duas tendiam a um valor muito próximo.

Esse método para a análise cinética é, entretanto, eficiente para ter uma ideia qualitativa do comportamento da reação, como apresentado aqui. Novas reações, com diferentes razões molares, por exemplo, deveriam ser realizadas para melhorar a estimativa dos parâmetros. Entretanto, ainda assim o número de experimentos seria bem menor do que os realizados pelos métodos clássicos para análises de cinética.

5. Conclusão

O uso de calibração multivariada, associada a análises em tempo real, gerou um conteúdo de informações muito grande a respeito de reações, de maneira simples e direta. Essa metodologia pode ser aplicada na área de catálise, de forma a comparar a eficiência de um conjunto de catalisadores, sejam eles homogêneos ou heterogêneos. Além disso, os dados gerados na reação podem ser usados para avaliar a cinética da mesma, de maneira direta, sem precisar recorrer a metodologias clássicas com maior número de experimentos.

Dentre os catalisadores utilizados, para as condições do trabalho, a enzima Novozym 435 se mostrou o melhor, onde conseguiu uma conversão quase completa. Já as enzimas Lipozyme RM e Lipozyme TL obtiveram uma conversão bastante próxima entre si, mas quase a metade da alcançada pela Novozym 435. Já a utilização de ácido clorídrico como catalisador se mostrou ineficiente, tendo uma conversão muito baixa.

Das enzimas utilizadas, pôde-se avaliar que duas delas (Lipozyme RM e Lipozyme TL) não mostraram seguir o mecanismo cinético clássico sugerido por Paiva et al. (2000), do tipo Ping Pong Bi Bi. Elas se ajustaram bem ao modelo de aleatoriedade quanto à interação com a enzima, definida pelo modelo do tipo Rápido Equilíbrio Bi Bi Aleatório. Já a Novozym 435 mostrou estar de acordo com o primeiro modelo.

6. Referências Bibliográficas

BATTISTI, A.P.; ELIAS, D.T.; DIAS, R.; QUADRI, M.B., Determinação da Conversão do Óleo em Biodiesel por RMN ¹H e HPLC na Reação de Transesterificação, *VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, Uberlândia, Minas Gerais (2009) <http://www.cobeqic2009.feq.ufu.br/uploads/media/91722801.pdf>, acessado em 03/02/2013.

BISSWANGER, H., *Enzyme Kinetics – Principles and Methods*. Tradução: Leonie Bubenheim, Darmstadt: Wiley-VCH, 2002.

Côrrea, I. N. S., et al., Enzymatic Biodiesel Synthesis Using a Byproduct Obtained from Palm Oil Refining, *Enzyme Research*, v. 2011, 8 páginas, 2011.

de SOUZA, A. V. A., Monitoramento, em tempo real, da transesterificação do óleo de soja para a obtenção de biodiesel utilizando espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR – FTIR). 2011. 186 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, 2011.

de SOUZA, A. V. A.; da SILVA, J. F. C., Biodiesel synthesis by using real-time ATR-FTIR, *Org. Process Res. Dev.*, v. 17, 1, p. 127–132, 2013.

FANGRUI, M.; MILFORD, A. H., Biodiesel production: a review, *Bioresource Technology*, v. 70, p. 1-15, 1999.

GHESTI, G.F.; de MACEDO, J.L.; RESCK, I.S.; DIAS, J.A.; DIAS, S.C.L., FT-Raman Spectroscopy Quantification of Biodiesel in a Progressive Soybean Oil Transesterification Reaction and its Correlation with ¹H NMR Spectroscopy Methods, *Energy & Fuels*, v. 21, p. 2475-2480, 2007.

KINCS, F. R., Meat fat formulation, *Journal of American Oil Chemistry Society*, v. 62, p. 815-818, 1985.

KNOTHE, G., KRAHL, J., GERPEN, J.V., Ramos, L.P., *Manual de Biodiesel*, 1ª Edição. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2006.

KNOTHE, G., Rapid Monitoring of Transesterification and Accessing Biodiesel Fuel Quality by Near-Infrared Spectroscopy Using a Fibre Optic Probe, *Journal of the American Oil Chemistry Society*, v.77, p. 795-800, 1999.

KRAWCZYK, T., Biodiesel – Alternative fuel makes inroads but hardles remain, *INFORM*, v. 7, p. 801-829,1996.

LESKOVAC, V., Cooperative and Allosteric Effect, *In Comprehensive Enzyme Kinetics*, New York: Kluwer Academic Publisher, 2004.

LÔBO, I.P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S., Biodiesel: Parâmetro de Qualidades e Métodos Analíticos, *Química Nova*, n° 32, v. 6, p. 1596-1608, 2009.

MAHMUD, M.S., SAFINSKI, T., NELSON, M. I., SIDHU, H.S., ADESINA, A.A., Kinetic Analysis of Oleic Acid Esterification Using Lipase as Catalyst in a Microaqueous Environment, *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 49, p. 1071-1078, 2010.

MAN, Y.B.C., SHYAHARIZA, Z.A., ROHMAN, A., Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy: Development, Techniques and Application in the analyses of Fats and Oils, Editor: Oliver J. Ree, Nova Science Publishers, 2010.

MENDHAM, J., Análise Química Quantitativa, Edição 6, Rio de Janeiro: LTC Editora, 2002.

MARCHETTI, J. M.; MIGUEL, V. U.; ERRAZU, A. F., Possible methods for biodiesel production, *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 11, p. 1300-1311,2007.

MARCHETTI, J. M.; ERRAZU, A. F., Comparison of different heterogenous catalysts and different alcohols for the esterification reaction of Oleic Acid, *Fuel*, v. 87, p.3477-3480, 2008.

MARQUES, M. V. et al., Determinação do teor de ésteres graxos em biodiesel metílico de soja por cromatografia gasosa utilizando oleato de etila como padrão interno, *Química Nova*, n°33, v. 4, p. 978-980, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company, 2008.

OLIVEIRA, A. C., ROSA, M.F., AIRES-BARROS, M.R., CABRAL, J.M.S., Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid – a kinetic study, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 999-1005, 2001.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X., Kinetic and mechanism of reaction catalyzed by immobilized lipases, *Enzyme and Microbiological Technology*, v. 27, p. 187-204, 2000.

RAMOS, L.P. et al., Transesterificação de óleo comestível usado para a produção de biodiesel e uso em transportes, Estudo: Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel - Biodiesel Eco Óleo, acessado em 04/02/2013.
www.biodieselecooleo.com.br/biodiesel/estudos/biocombustivel%20alternativo.htm

