

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

Milena Jimenes Manzolli Lopes Sanches

**CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA APLICADA AO  
MONITORAMENTO DA SINTESE ENZIMÁTICA DE BIODIESEL  
ETÍLICO UTILIZANDO LIPASE SOLÚVEL**

São Carlos – SP

2022

**Milena Jimenes Manzolli Lopes Sanches**

**CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA APLICADA AO  
MONITORAMENTO DA SINTESE ENZIMÁTICA DE BIODIESEL  
ETÍLICO UTILIZANDO LIPASE SOLÚVEL**

Trabalho de Graduação apresentado ao  
Departamento de Engenharia Química da  
Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro

São Carlos – SP

2022

## **BANCA EXAMINADORA**

Trabalho de Graduação apresentado no dia 13 de setembro de 2022 perante a seguinte banca examinadora:

**Orientador:** Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro, DEQ/UFSCar

**Convidado:** Felipe Fernando Furlan, DEQ/UFSCar

**Convidada:** María Carlota Villegas Aguilar, PPGEQ/UFSCar

**Professor da Disciplina:** Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro, DEQ/UFSCar

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pela força, sabedoria e bençãos concedidas durante cada etapa da minha vida.*

*À minha família, pelo constante apoio e cuidado. Em especial a meus pais, Moisés e Líslei, por todas as oportunidades de desenvolvimento colocadas em meu caminho, e ao meu namorado, Rafael, pela segurança e por me ajudar a acreditar que tudo isso seria possível.*

*Aos meus amigos e aos colegas de faculdade, em especial Daniela, Isabele, Rosana, Maria Gabriela, Alessandro e Jéssica, por todo o suporte e paciência e por me motivarem a ser cada dia melhor.*

*Ao meu orientador Dr. Marcelo Ribeiro, que me apresentou o projeto em 2019 e desde então tem acompanhado cada uma das etapas, com muito apoio e sempre disposto a ensinar.*

*Aos órgãos de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Código Financeiro 001), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Proc. 2016/10636-8) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Proc. 800939/2018-2), pelo financiamento nas diversas partes envolvidas no desenvolvimento deste projeto de pesquisa.*

## RESUMO

A produção de biodiesel requer um processo de monitoramento e modelagem de sua reação que oriente o controle da produção. Portanto, desenvolveu-se um modelo de calibração multivariada que interprete os dados obtidos a partir de testes de síntese de biodiesel e permita o monitoramento em tempo real da reação. Por cromatografia líquida, foram obtidos os teores de monoglicerídeos (MG), diglicerídeos (DG), triglicerídeos (TG) e éster etílico (ES) e com espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) foram obtidas varreduras de espectro, dados de referência que foram aplicados na entrada do modelo. Os métodos multilineares aplicados no tratamento dos dados foram o de mínimos quadrados parciais (PLS) e da análise de projeções sucessivas (SPA). A análise das amostras coletadas foi realizada em um procedimento de validação cruzada *leave one out* e a complexidade do modelo (número de variáveis latentes - LV's) foi otimizada para cada componente com a raiz quadrada média do erro de validação cruzada (RMSECV). Os modelos obtidos em PLS foram de 4 LV's para MG, 3 para DG, 4 para TG e 4 para ES, com respectivos erros de 17; 15; 5,67 e 8,28%. Os modelos obtidos em SPA foram de 7 LV's para MG, 8 para DG, 11 para TG e 6 para ES, com respectivos erros de 20; 17,1; 11,7 e 14,1%, mostrando uma maior precisão dos modelos desenvolvidos no PLS. Além disso, os resultados obtidos para TG e ES apresentam uma melhor adaptação dos componentes ao modelo proposto, pois resultam em erros menores em ambas as metodologias, possibilitando monitorar a conversão de TG e o rendimento de ES. Portanto, os resultados mostram uma boa capacidade preditiva para TG e ES com erros em torno de 7% para PLS e 13% para SPA em relação à fração máxima obtida desses analitos. Além disso, o método PLS foi mais preciso, resultando em erros menores a partir de modelos menos complexos.

**Palavras-chave:** Biodiesel. NIR. PLS. SPA. Validação cruzada. Monitoramento.

## ABSTRACT

The production of biodiesel requires a process of monitoring and modeling of its reaction that guides the control of the production. Therefore, a multivariate calibration model that interprets the data obtained from biodiesel synthesis tests and allows in-line monitoring of the reaction was developed. Using liquid chromatography, the contents of monoglycerides (MG), diglycerides (DG), triglycerides (TG) and ethyl ester (ES) were obtained, and using near infrared spectroscopy (NIR), spectrum scans were obtained, reference data that was applied at the entry of the model. The analysis of the collected samples was conducted in a leave one out cross-validation procedure and the complexity of the model (number of latent variables - LV's) was optimized for each component with the root mean square error of cross-validation (RMSECV). The multilinear methods applied in the treatment of data were partial least squares (PLS) and successive projection analysis (SPA). The models developed in PLS had 4 LV's for MG, 3 for DG, 4 for TG and 4 for ES, with respective errors of 17; 15; 5.67 e 8.28%. The models developed in SPA had 7 LV's for MG, 8 for DG, 11 for TG and 6 for ES, with respective errors of 20; 17.1; 11.7 e 14.1%, showing a greater precision of the models developed in PLS. Moreover, the results obtained for TG and ES presented a better adaptation of the components to the proposed model, as they result in minor errors in both methodologies, making it possible to monitor the conversion of TG and the yield of ES. Therefore, the results show a good predictive capacity for TG and ES with errors around 7% for PLS and 13% for SPA in relation to the maximum concentration obtained from these analytes. In addition, the PLS method was more accurate as it resulted in minor errors from less complex models.

**Key words:** Biodiesel. NIR. PLS. SPA. Cross validation. Monitoring.

## SUMÁRIO

<b>BANCA EXAMINADORA</b> .....	i
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	ii
<b>RESUMO</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>ABREVIACÕES E SIGLAS</b> .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1. Objetivo Geral</b> .....	4
<b>1.2. Objetivos Específicos</b> .....	4
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
<b>2.1. Biodiesel</b> .....	5
<b>2.2. Síntese Enzimática de Biodiesel</b> .....	5
<b>2.3. Espectroscopia no Infravermelho Próximo para Monitoramento da Síntese do Biodiesel</b> .....	7
<b>2.4. Métodos de Calibração Multivariada</b> .....	9
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	11
<b>3.1. Materiais</b> .....	11
<b>3.2. Equipamento</b> .....	11
<b>3.3. Procedimento Experimental</b> .....	11
<b>3.4. Métodos Analíticos</b> .....	12
3.4.1. Varreduras de Espectro (NIRA) .....	12
3.4.2. Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) .....	12
<b>3.5. Procedimento de Cálculo</b> .....	13
3.5.1. Métodos Numéricos .....	13
3.5.2. Calibração .....	13
3.5.3. Pré-tratamento dos dados .....	15
3.5.4. Quantificação dos teores de analitos .....	15
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	17
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	25
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	26

<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	30
<b>APÊNDICE A</b> .....	33



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1. Reação de Transesterificação.....</b>	<b>2</b>
<b>Figura 2.1. Equação geral da transesterificação.....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 2.2. Espectros de infravermelho próximo na região 7300–4300 cm<sup>-1</sup> de óleo de soja e éster metílico.....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 3.1. Cromatograma de HPLC obtido da reação de transesterificação com identificação dos componentes. ....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 4.1. Espectros da mistura obtidos com NIRA na região 4500–4500 cm<sup>-1</sup> tratados com filtro de Savitzky-Golay. ....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 4.2. Resultados de validação cruzada obtidos para cada analito em modelo de PLS, utilizando espectros NIRA.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 4.3. Resultados de validação cruzada obtidos para cada analito em modelo de SPA, utilizando espectros NIRA. ....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 4.4. Fração mássica experimental aferida por HPLC (experimental) versus estimada utilizando PLS. As barras de erro correspondem a 2x o RMSECV. ....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 4.5. Fração mássica experimental aferida por HPLC (experimental) versus estimada utilizando SPA. As barras de erro correspondem a 2x RMSECV. ....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 4.6. Monitoramento da síntese enzimática de biodiesel no ensaio 8 com espectros de NIRA em modelo PLS.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 4.7. Monitoramento da síntese enzimática de biodiesel no ensaio 8 com espectros de NIRA em modelo SPA.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 4.8. Resultados de validação cruzada (a) e calibração (b) obtidos para cada modelo e analito. ....</b>	<b>24</b>
<b>Figura A.1. Monitoramento de MG na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo PLS.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura A.2. Monitoramento de DG na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo PLS.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura A.3. Monitoramento de TG na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo PLS.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura A.4. Monitoramento de ES na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo PLS.....</b>	<b>37</b>

<b>Figura A.5. Monitoramento de MG na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo SPA.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura A.6. Monitoramento de DG na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo SPA.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura A.7. Monitoramento de TG na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo SPA.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura A.8. Monitoramento de ES na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo SPA.....</b>	<b>41</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1. Composição mássica do óleo de soja. ....</b>	<b>5</b>
<b>Tabela 2.2. Comparação entre processos de transesterificação catalítica para produção de biodiesel. ....</b>	<b>6</b>
<b>Tabela 3.1. Condições iniciais dos ensaios da síntese do biodiesel em temperatura controlada de 35 °C. ....</b>	<b>12</b>
<b>Tabela 4.1. Modelo de PLS para cada analito otimizado pelos resultados de validação cruzada utilizando espectros do NIRA.* ....</b>	<b>20</b>
<b>Tabela 4.2. Modelo de SPA para cada analito otimizado pelos resultados de validação cruzada utilizando espectros do NIRA.* ....</b>	<b>20</b>

## ABREVIACÕES E SIGLAS

ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
DG	Diglicerídeo
ES	Éster etílico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (sigla em inglês) Cromatografia Líquida de Alta Performance
LV	<i>Latent Variable</i> (sigla em inglês) Variável Latente
MG	Monoglicerídeo
NIR	<i>Near Infrared</i> (sigla em inglês) Infravermelho próximo
NIRA	<i>Near Infrared Reflectance Accessory</i> (sigla em inglês) Acessório de Refletância de Infravermelho Próximo
PLS	<i>Partial Least Squares</i> (sigla em inglês) Mínimos Quadrados Parciais
RMSEcal	<i>Root Mean Square Error of calibration</i> (sigla em inglês) Raíz Quadrada do Erro Médio de Calibração
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i> (sigla em inglês) Raíz Quadrada do Erro Médio de Validação Cruzada
SPA	<i>Successive Projection Analysis</i> (sigla em inglês) Análise da Projeção Sucessiva
TG	Triglicerídeo

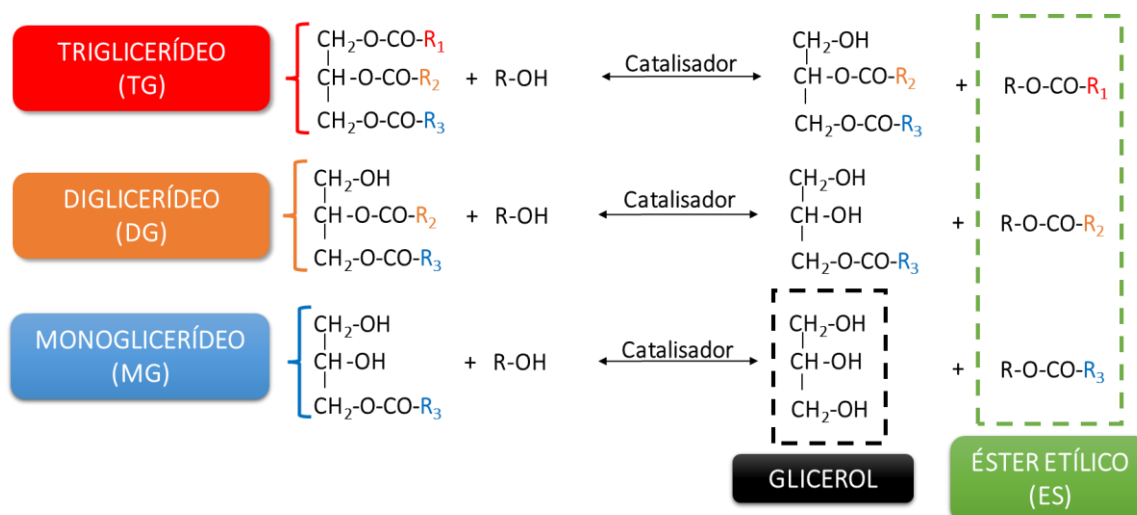
## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um aumento no número de acordos e agendas ambientais tendo como principais pautas ações voltadas a questões climáticas. Na última Conferência das Nações Unidas sobre Mudanças Climáticas (COP26), foi aprovado o Pacto Climático de Glasgow visando acelerar ações climáticas ainda nessa década. Segundo o relatório oficial da COP26, o acordo exorta as partes à implantação de geração de energia limpa e eliminação dos subsídios aos combustíveis fósseis (UNFCCC, 2022).

Por conseguinte, observa-se um aumento na participação global de biocombustíveis na matriz energética, muitos países vêm adotando políticas de misturas destes em combustíveis fósseis (NORIEGA et al., 2016). A implementação do biodiesel na matriz brasileira, tem sido cada vez mais expressiva, gerando uma diminuição no consumo de combustíveis fósseis (KNOTHE, et al., 2006), indo de encontro com a medida prevista na Resolução 16, de 2018, do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), que autoriza a ANP a elevar esse percentual até 15%, até 2023 (UDOP<sup>2</sup>, 2021). Atualmente, porém, devido à desvalorização cambial da moeda brasileira o que favorece à exportação de soja, reduziu-se de 13% para 10% o teor de biodiesel no diesel comercializado (UDOP<sup>1</sup>, 2021).

Formado por ésteres alquila de ácidos graxos de cadeia longa derivados de fontes renováveis como óleos vegetais, o biodiesel pode ser obtido principalmente pela reação de transesterificação, processo em que um óleo (ou gordura) reage com um álcool, especialmente metanol ou etanol, na presença de um catalisador (ZHANG W., 2012). A reação conta com três etapas reversíveis, a cada uma delas é formado um mol de éster etílico (ES) e a combinação dos ésteres ao final do processo constitui o biodiesel. Na primeira etapa o triglicerídeo (TG) é reduzido a diglicerídeo (DG), em seguida o DG é reduzido a monoglicerídeo (MG) que por fim é reduzido a glicerol, como demonstrado na Figura 1.1.

**Figura 1.1. Reação de Transesterificação.**



Fonte: Adaptado de Aguilar (2018)

Na indústria, o biodiesel é comumente produzido a partir da catálise básica de óleos vegetais com metanol, combinação conhecida por sua rápida e elevada conversão (SALES *et al.*, 2017). No entanto, a utilização alternativa de etanol e lipase solúvel como reagentes apresenta diversas vantagens.

As lipases possuem excelente atividade catalítica, estabilidade em meio não-aquoso e ampla seletividade, o que permite que sejam utilizadas em várias aplicações como na reação de hidrólise de triglicerídeos ou na transesterificação. A sua utilização possibilita a operação em temperaturas mais amenas quando comparada a outros catalisadores, além de permitir a utilização de óleos de baixo custo (óleos de baixa qualidade ou de reuso), em razão de sua atuação não ser afetada pela presença de ácidos graxos livres ou água (AGUILAR *et al.*, 2018).

O etanol, além de ser considerado um recurso renovável, é menos tóxico que o metanol (POURZOLFAGHAR *et al.*, 2016), ademais sua cadeia carbônica mais longa o torna mais solúvel no óleo, o que favorece a reação enzimática e provoca um aumento na massa e volume do biodiesel produzido (NIELSEN *et al.*, 2016).

Apesar das vantagens ambientais em utilizar lipases e etanol para a produção do biodiesel, o uso de enzimas para esse processo é criticado por seu alto custo. Assim, operar o processo de síntese enzimática de biodiesel de forma mais eficiente possível é importante para competir com a rota química. Na literatura há trabalhos que sugerem o uso de batelada alimentada para reduzir efeitos aparentes de inibição da enzima pelo álcool. O

monitoramento da reação em tempo real pode ajudar a manter a reação a percorrer um perfil ótimo controlado tornando o processo mais eficiente.

Grande parte dos métodos de monitoramento e controle da síntese do biodiesel já desenvolvidos se baseiam em cromatografia líquida e gasosa, os quais são demorados e podem ser caros por exigirem um pré-tratamento das amostras com uso de solventes. Em contrapartida, a espectroscopia na região do infravermelho próximo (*Near Infrared* - NIR) mostra-se um método barato, que permite a análise simultânea de multicomponentes de forma rápida e não destrutiva, sem exigir pré-tratamentos das amostras (PINZI *et al.*, 2012).

Na região NIR, os analitos podem absorver mais de um comprimento de onda e a absorbância em cada comprimento pode ter contribuições de mais de um componente da amostra, formando matrizes complexas de dados (BURNS e CIURCZAK, 2001), por isso ferramentas de análise de multicomponentes bem estabelecidas como mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares* – PLS) e análise da projeção sucessivas (*Successive Projection Analysis* – SPA) têm sido utilizadas para classificar e quantificar a síntese do biodiesel.

Em artigos recentes, técnicas de calibração multivariada combinadas a espectros na região NIR e MIR (infravermelho médio) têm sido aplicadas no monitoramento da síntese do biodiesel. Os trabalhos de Killner (2011) e Sales (2019) apresentam modelos desenvolvidos com PLS para o monitoramento da síntese de biodiesel por catálise básica a partir de espectros no infravermelho; e López-Fernández (2022) apresenta um modelo de PLS para catálise enzimática de biodiesel a partir de óleo de cozinha usado com lipase imobilizada a partir de espectros no infravermelho. No entanto, modelos de monitoramento da síntese enzimática de biodiesel etílico com lipase solúvel a partir do óleo de soja ainda não foram desenvolvidos.

Assim, tomando como base o modelo reacional de transesterificação com óleo de soja refinado, etanol e a enzima NS-40116 (formulação líquida da lipase *Thermomyces lanuginosus* geneticamente modificada) proposto por Aguilar (2018), buscou-se desenvolver modelos de calibração multivariada, utilizando os métodos de mínimos quadrados parciais (PLS) e análise da projeção sucessiva (SPA), capazes de quantificar e monitorar a reação de síntese do biodiesel a partir de espectros obtidos na região NIR com o acessório de refletância de infravermelho próximo (*Near Infrared Reflectance Accessory* – NIRA).

### **1.1. Objetivo Geral**

Desenvolver modelos de calibração multivariada para o monitoramento da síntese enzimática de biodiesel etílico com lipase solúvel.

### **1.2. Objetivos Específicos**

- Obter espectros na região do infravermelho próximo a partir da síntese enzimática do biodiesel para a construção do modelo de calibração, utilizando o equipamento de varredura de espectro NIRA.
- Obter as concentrações experimentais dos analitos com HPLC para utilizar como dados de referência na construção do modelo de calibração.
- Ajustar os modelos de calibração através da aplicação dos métodos multilineares de mínimos quadrados parciais (PLS) e análise da projeção sucessiva (SPA).



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Essa seção aborda aspectos relacionados à produção nacional de biodiesel e à síntese enzimática adotada para o desenvolvimento do trabalho. Em seguida, revisa-se os fundamentos que possibilitam o monitoramento da reação de transesterificação utilizando espectroscopia no infravermelho próximo.

### 2.1. Biodiesel

O biodiesel é um combustível renovável derivado de óleos vegetais, como a soja, girassol, canola, azeite de dendê e outras oleaginosas, ou de gorduras animais, usado em motores a diesel. Comercializado em mistura ao óleo diesel, o biodiesel ganhou destaque nos últimos anos em função da sua queima “limpa” por ser biodegradável e pelo incentivo do governo com a criação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB). A produção brasileira de biodiesel apresentou um crescimento constante na última década, partindo de 2,72 milhões de m<sup>3</sup> em 2012 a 6,77 milhões de m<sup>3</sup> em 2021, segundo dados da ANP (2022).

O biodiesel não apresenta uma molécula única, assim sua composição depende principalmente da estrutura molecular do óleo utilizado no processo de transesterificação. Atualmente, mais de 70% da produção nacional de biodiesel se dá a partir do óleo de soja enquanto outros óleos vegetais compõem apenas 4% da produção, segundo dados da ANP (2022). O óleo de soja é formado por cinco principais ácidos graxos saturados e insaturados: ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico, com a composição mássica apresentada na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1. Composição mássica do óleo de soja.**

Ácidos Graxos Saturados		Ácidos Graxos Insaturados		
Ácido palmítico (C <sub>16:0</sub> )	Ácido esteárico (C <sub>18:0</sub> )	Ácido oleico (C <sub>18:1</sub> )	Ácido linoleico (C <sub>18:2</sub> )	Ácido linolênico (C <sub>18:3</sub> )
10,0	5,0	23,0	51,0	7,0

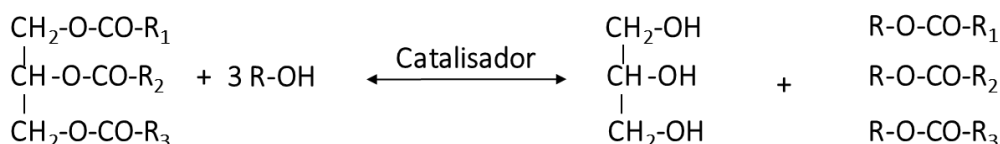
Fonte: Adaptado de Aguilar (2018)

### 2.2. Síntese Enzimática de Biodiesel

O biodiesel é tipicamente produzido pelo processo de transesterificação, por meio do qual os triglicerídeos (óleos ou gorduras) reagem com um álcool primário de cadeia curta,

formando o éster e o glicerol. O éster, após passar por etapas de purificação e adequação às especificações de órgãos reguladores, é comercializado como biodiesel. A Figura 2.1 apresenta a equação geral da transesterificação, sendo R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, as cadeias dos ácidos graxos.

**Figura 2.1. Equação geral da transesterificação**



**Fonte:** Adaptado de Aguilar (2018)

Em comparação com a transesterificação catalisada por ácidos ou bases, a transesterificação enzimática possui muitas vantagens. A Tabela 2.2 apresenta as principais diferenças entre os processos de transesterificação catalítica.

**Tabela 2.2. Comparação entre processos de transesterificação catalítica para produção de biodiesel.**

Parâmetro	Catálise alcalina	Catálise ácida	Catálise enzimática
Temperatura de reação	60 – 70 °C	55 – 80 °C	30 – 40 °C
Presença de ácidos graxos livres no óleo	Saponificação	Ésteres	Formação de metil éster
Presença de água na matéria-prima	Interfere com a reação	Interfere com a reação	Não influencia
Rendimento produção de metil éster	Normal	Normal	Alta
Recuperação do glicerol	Difícil	Difícil	Fácil
Catalisador	KOH / NaOH	Ácido Sulfúrico concentrado	Lipase
Custos de produção do catalisador	Econômico	Econômico	Relativamente caros

**Fonte:** Adaptado de Aguilar (2018); Fukuda et al. (2001); Leung et al. (2010); Narwal e Gupta (2013)

A escolha da relação entre as quantidades de enzima, água e álcool é essencial para o rendimento da síntese enzimática do biodiesel. A velocidade de reação depende

principalmente do conteúdo de enzima e da limitação da sua área interfacial disponível. Uma alternativa para se aumentar essa área é aumentar a velocidade de agitação da mistura, outra possibilidade é adicionar mais água. Segundo Narwal e Gupta (2013), a presença de água é necessária para garantir a atividade da enzima, sendo que um pequeno acréscimo no conteúdo de água da reação pode levar a um aumento significativo na produção de biodiesel, porém sua presença pode aumentar a hidrólise de TG, DG e MG levando à formação de ácidos graxos livres e retardando a transesterificação (AGUILAR, 2018).

A quantidade de álcool também pode afetar a velocidade e rendimento da reação. A formação dos ésteres pode ser limitada se a quantidade de álcool for insuficiente e uma alimentação de álcool em excesso pode levar a uma maior conversão de triglicerídeos e favorecer a formação de produtos na reação reversível. No entanto, o excesso de álcool pode inibir a enzima e diminuir sua atividade (AL ZUHAIR *et al.*, 2007; NORDBLAND *et al.*, 2014).

Ademais, o rendimento da transesterificação pode ser afetado pela temperatura de reação. Uma maior temperatura pode diminuir a viscosidade do óleo, aumentando a velocidade de reação, porém temperaturas muito elevadas podem levar à inativação térmica da enzima.

Com base nesses fatores, o modelo de reação proposto por Aguilar (2018) para transesterificação de biodiesel etílico utilizando a lipase solúvel *Thermomyces lanuginosus* foi adotado nos ensaios de síntese, buscando o desenvolvimento de um modelo para o seu monitoramento.

### **2.3. Espectroscopia no Infravermelho Próximo para Monitoramento da Síntese do Biodiesel**

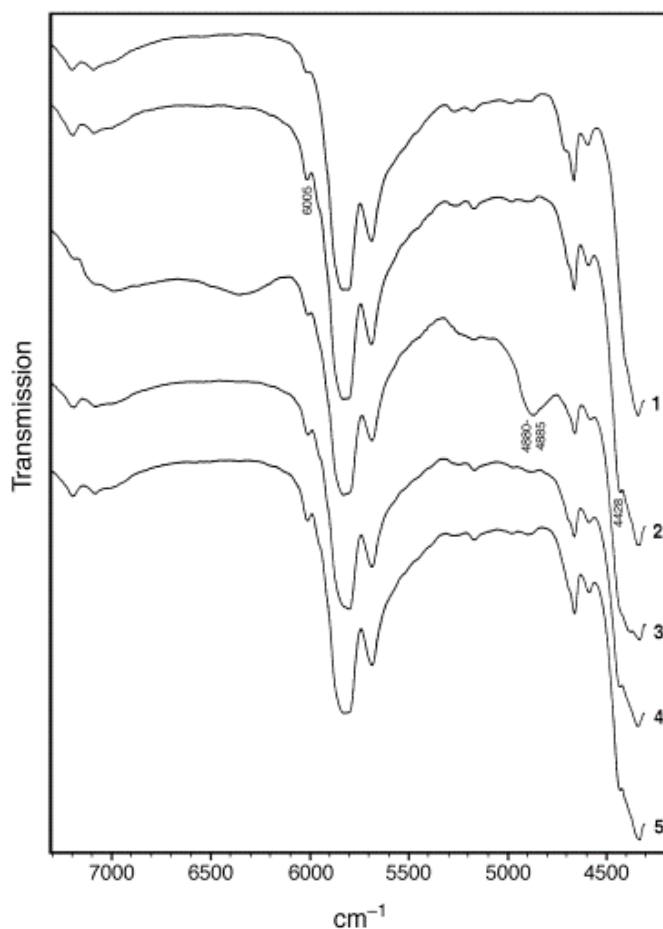
As bases para o monitoramento da reação de transesterificação utilizando espectroscopia no NIR foram estabelecidas por Knothe (2001), que identificou diferenças nos espectros NIR em 6005 e entre 4425-4430  $\text{cm}^{-1}$ , onde os ésteres metílicos apresentavam picos e os triglicerídeos celas, sendo estes os componentes que exibiam melhor absorvidade. Knothe ainda determinou que ésteres etílicos ou de cadeias maiores poderiam ser distinguidos de forma semelhante dos triglicerídeos, apresentando picos nas mesmas regiões de número de onda.

Knothe (1999) também apresenta que diferentes tipos de contaminantes presentes em pequenas quantidades no produto da reação de transesterificação não alterariam as regiões de pico para distinguir entre ésteres metílicos e triglicerídeos. Tais contaminantes incluem

glicerol, mono e diglicerídeos. Porém, se presentes em grande quantidade, podem ocasionar depressões na linha de base dos espectros.

A Figura 2.2 apresenta espectros de infravermelho próximo na região 7300–4300  $\text{cm}^{-1}$  obtidos por Knothe (1999) para o óleo de soja (1) e éster metílico (derivado de óleo de soja) puro (2), contaminado com metanol (3), contaminado com glicerol (4) e contaminado com ácido graxo livre (5).

**Figura 2.2. Espectros de infravermelho próximo na região 7300–4300  $\text{cm}^{-1}$  de óleo de soja e éster metílico.**



**Fonte:** Knothe (1999)

Assim, ao propor o monitoramento online da transesterificação considerada neste presente trabalho, deve-se considerar a possibilidade de desvios nos resultados de ésteres e triglicerídeos causados pela presença de MG, DG e glicerol no meio reacional, bem como a dificuldade de distinção dos conteúdos de MG e DG a partir das leituras de espectro no NIR.

## 2.4. Métodos de Calibração Multivariada

A calibração multivariada tem como objetivo relacionar parâmetros com propriedades que sejam de fácil obtenção a partir de modelos matemáticos que possam ser utilizados para gerar previsões rápidas e precisas dos parâmetros. Assim o processo de calibração consiste em uma etapa de modelagem, para estabelecer a relação matemática entre as entradas e saídas do modelo, e de validação, para otimizar o modelo que melhor descreva os componentes de interesse. Uma vez calibrado, o modelo desenvolvido pode ser utilizado na previsão de outras amostras (HAALAND e THOMAS, 1988).

Métodos clássicos de calibração multivariada como regressão linear múltipla (MLR) e mínimos quadrados clássico (CLS) utilizam toda a informação contida na matriz de dados para a modelagem, o que na prática pode levar a problemas de colinearidade, uma vez que o número de amostras não excede o número de variáveis, e estas não fornecem informações predominantemente únicas (FERREIRA, 1999). Para contornar esse problema, utilizam-se métodos que selecionam um número de variáveis menor que o número de amostras, ao mesmo tempo em que maximizam a quantidade de informações únicas dos dados, como o de mínimos quadrados parciais (PLS) e análise da projeção sucessiva (SPA) utilizados nesse trabalho.

O método de mínimos quadrados parciais (PLS), que tem como base a análise dos componentes principais da matriz de dados buscando-se representar as mudanças das variáveis por meio de um número pequeno de fatores. Para isso o método de PLS realiza uma transformação de base na matriz de absorvâncias construindo um novo sistema de eixos que maximiza a covariância entre os dados de absorvância e concentração, no qual cada uma das variáveis latentes (LV) é uma combinação linear das variáveis originais e a primeira LV é aquela que descreve a direção de máxima covariância entre os dados (HAALAND e THOMAS, 1988).

O método de análise da projeção sucessiva (SPA), que consiste em um método de seleção de variáveis capaz de remover variáveis não informativas e minimizar a colinearidade. Em SPA, parte-se de um vetor da matriz de absorvância e todo o espaço multidimensional das variáveis é analisado com base nesse vetor para buscar aqueles que apresentem a menor projeção entre si, reordenando a matriz de absorvâncias a partir dos vetores com menor colinearidade (ARAÚJO et al., 2001).



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais

Óleo de soja refinado (Liza®) adquirido em comércio local e álcool etílico (99,8%) adquirido de Synth (São Paulo, Brasil).

Lipase comercial NS-40116, formulação líquida modificada geneticamente da lipase *Thermomyces lanuginosus*. A lipase foi doada pela empresa Novozyme – Brasil.

#### 3.2. Equipamento

Acessório de Refletância de Infravermelho Próximo (NIRA – para Frontier, Perkin Elmer) com compartimento de amostra, refletor difuso e placa de amostra para obtenção de varreduras de espectro na região NIR.

Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC – Waters Alliance E 2695) equipado com coluna Ascentis Express C-18 10cmx46mmx2,7µm (Supelco) e sistema gerador de gradiente e detector UV para obtenção dos teores de MG, DG, TG e ES.

Banho Ultratermostato (Nova Ética) para controle da temperatura de reação.

#### 3.3. Procedimento Experimental

Foram realizados ensaios da síntese do biodiesel em temperatura controlada de 35 °C com banho de água em um reator de vidro encamisado de capacidade de 200 mL e diâmetro interno de 5,5 cm. As reações foram conduzidas sob agitação mecânica com um impelidor de duas pás retas (4 cm de diâmetro e 1 cm de altura).

O meio reacional foi constituído por uma emulsão de água destilada, etanol e óleo de soja, com lipase solúvel como catalisador da reação. Em todos os ensaios foram utilizados 75g de óleo de soja e quantidades determinadas de álcool, água e lipase. A quantidade de álcool foi determinada em unidade equivalente (eq), sendo 1eq a quantidade estequiométrica. Já a quantidade de água e lipase foi estabelecida em porcentagem em massa relativa à quantidade de óleo.

Foram realizados 8 experimentos com diferentes condições iniciais, conforme apresentado na Tabela 3.1. As condições foram estabelecidas de acordo com os ensaios de síntese conduzidos por Aguilar (2018).

**Tabela 3.1. Condições iniciais dos ensaios da síntese do biodiesel em temperatura controlada de 35 °C.**

<b>Experimento</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>Óleo (g)</b>	75	75	75	75	75	75	75	75
<b>Álcool (eq)</b>	1,5	2	2	1,5	1,5	1,5	2	2
<b>Água (%m<sub>i</sub>/m<sub>óleo</sub>)</b>	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>Lipase (%m<sub>i</sub>/m<sub>óleo</sub>)</b>	2	1	2	1	1	1	2	2
<b>RPM</b>	1200	800	1200	800	800	800	800	1200
<b>Intervalo de coleta (min)</b>	20	20	20	30	30	30	30	30
<b>Duração total (min)</b>	180	180	180	360	300	300	300	300

**Fonte:** Arquivo Pessoal

Periodicamente foram retiradas duas amostras de 500 µL do reator para obtenção de dados a partir das análises no NIRA e HPLC. A amostra do NIRA foi submetida à varredura de espectro imediatamente. A amostra do HPLC foi centrifugada a 14500 RPM e 5 °C por 5 minutos, para separação entre as fases polar e apolar. A lipase foi separada com a fase polar e descartada e a fase apolar foi tratada para posterior análise cromatográfica.

### 3.4. Métodos Analíticos

#### 3.4.1. Varreduras de Espectro (NIRA)

O acessório de refletância de infravermelho próximo (NIRA – para Frontier com compartimento de amostra, Perkin Elmer) foi utilizado na obtenção das varreduras de espectro. Para a utilização do equipamento pipetou-se uma alíquota de 500µL da emulsão na placa de amostra, o refletor difuso foi colocado no meio da placa e essa posicionada no centro do equipamento para a realização da varredura. O equipamento foi configurado com um J-stop de 4 mm, acumulação de 16 varreduras e o background foi realizado com a amostra padrão do próprio equipamento.

#### 3.4.2. Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

Cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi utilizada para obtenção dos teores de cada analito. A preparação das amostras analisadas no HPLC consistiu em duas diluições com solução de isopropanol-isoexano (5:4 v/v). Primeiramente, uma alíquota de 50 µL da fase apolar do reator foi diluída em 500 µL de solução. Em seguida, 10 µL da



primeira diluição foram diluídos em 1490  $\mu\text{L}$  de solução. Por fim, a mistura formada foi filtrada e transferida para *vials* obtendo-se uma amostra de aproximadamente 1,5 mL.

Determinou-se a fração dos componentes da síntese com cromatografia líquida de gradiente móvel em fase reversa (HOLČAPEK *et al.*, 1999). O equipamento utilizado foi o HPLC (Waters Alliance E 2695) equipado com coluna Ascentis Express C-18 10cmx46mmx2,7 $\mu\text{m}$  (Supelco) e sistema gerador de gradiente e detector UV.

Para a quantificação de TG, DG, MG e ES foi adaptado o método proposto por Holčapek *et al.* (1999) de cromatografia líquida em fase reversa (RP-HPLC), conforme descrito por Aguilar (2018).

Utilizou-se volume de injeção de 20  $\mu\text{l}$  e vazão de fluxo de 1 ml/min. A temperatura da coluna foi mantida constante em 40 °C e a região de detecção espectrofotométrica do UV foi a 205 nm. Para o gradiente da fase móvel, utilizaram-se três reservatórios: A contendo água, B contendo acetonitrila e C contendo uma solução de 2-propanol-hexano (5:4 v/v). O gradiente ternário usado, de 40 min foi: 30%A + 70%B em 0 min, 100%B em 10 min, 50%B + 50%C em 20 min e continuada a eluição isocrática pelos últimos 5 min (AGUILAR, 2018).

### 3.5. Procedimento de Cálculo

#### 3.5.1. Métodos Numéricos

Utilizando a linguagem de programação Scilab® (*software* livre) os algoritmos para os cálculos de regressão foram implementados, baseados nos modelos multilíneares PLS e SPA, seguindo os procedimentos propostos por Haaland e Thomas (1988) e Araújo *et al.* (2001), respectivamente.

#### 3.5.2. Calibração

O modelo linear utilizado para relacionar o espectro da amostra com a concentração de cada um de seus componentes é o inverso da Lei de Lambert-Beer apresentado na seguinte equação:

$$C_{i(m \times 1)} = A_{(m \times n)} \cdot P_{i(n \times 1)} \quad (3.1)$$

onde  $C_i$  é o vetor de concentração do componente  $i$ ,  $P_i$  o vetor de parâmetros lineares do componente  $i$ ,  $A$  é a matriz de absorvâncias,  $m$  é o número de amostras e  $n$  é o número de números de ondas do espectro.

O cálculo dos parâmetros lineares que caracterizam o modelo de cada componente da Equação 3.1 pode ser realizado diretamente pela equação:

$$P_{i(n \times 1)} = (A^T A)^{-1} \cdot (A^T C_i) \quad (3.2)$$

No entanto, para se determinar o modelo  $P_{i(n \times 1)}$  de cada componente conforme apresentado na Equação 3.2, é necessário calcular o inverso da matriz  $(A^T A)$ . Tal matriz possui tamanho  $n \times n$  e seu rank (número de linhas/colunas linearmente independentes) é no máximo o número  $m$  de amostras (muito menor que  $n$ ). Assim, a matriz é singular e, portanto, não invertível.

Para contornar esse problema, aplicam-se métodos de regressão multilinear que têm por objetivo transformar a matriz  $A$  em uma matriz que seja equivalente. Os métodos aplicados neste trabalho foram o de mínimos quadrados parciais (*partial least squares* – PLS), que realiza uma transformação de base na matriz  $A$  buscando maximizar a covariância entre os dados de absorvância e concentração, reordenando-a da maior para a menor covariância (HAALAND e THOMAS, 1988); e o de análise da projeção sucessiva (*successive projection analysis* – SPA), que é um método combinatório que varre o espaço multidimensional das variáveis para buscar os vetores da matriz que apresentam a menor projeção entre si (maior informação ainda não representada pelos demais vetores), reordenando-a (ARAÚJO et al., 2001).

As amostras coletadas foram analisadas em procedimento de validação cruzada deixando uma amostra fora do ajuste de cada vez (*leave one out cross validation*) (NELLES, 2001). A complexidade do modelo (número de regressores/variáveis latentes) foi otimizada para cada componente a partir da raiz quadrada do erro médio de validação cruzada (*root-mean-square error of cross-validation* – RMSECV), uma aproximação do desvio padrão do erro de validação, calculada pela seguinte equação:

$$RMSECV^{(i)} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{k=1}^n (c_k^{(i)} - \hat{c}_k^{(i)})^2} \quad (3.3)$$

onde  $n$  é o número de amostras utilizadas na validação cruzada e  $c_k^{(i)}$ ,  $\hat{c}_k^{(i)}$  são valores de referência e preditos das concentrações do componente  $i$  na amostra de validação  $k$ .

### 3.5.3. Pré-tratamento dos dados

Os espectros na região NIR obtidos com o NIRA foram submetidos a um conjunto de pré-tratamentos. Semelhantemente à abordagem adotada por López-Fernández (2022), o filtro de Savitzky-Golay foi empregado para obtenção dos espectros de primeira derivada, para correção da linha de base e alisamento dos dados, com uma média móvel de 15 pontos e polinômio de segunda ordem.

Além disso, a partir de uma inspeção visual da varredura de espectros obtida, foi identificada uma região de elevada absorvidade abaixo de  $4500\text{ cm}^{-1}$  e uma região de espectral ruidosa acima de  $8000\text{ cm}^{-1}$ . Assim apenas a região entre  $4500$  e  $8000\text{ cm}^{-1}$  foi utilizada.

### 3.5.4. Quantificação dos teores de analitos

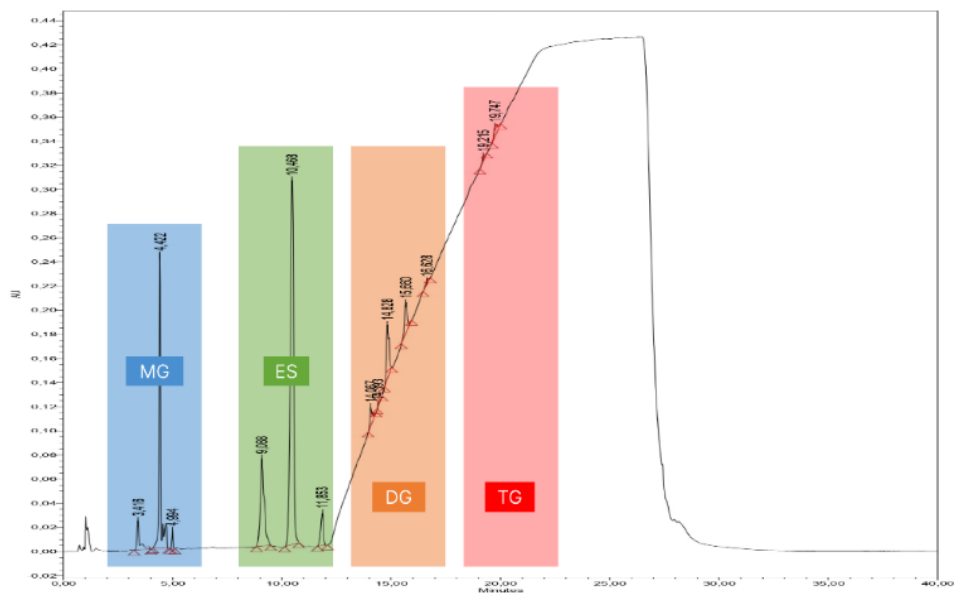
Os teores de cada analito (MG, DG, TG e ES) foram obtidos a partir de amostras de síntese analisadas no HPLC. Para quantificar o teor de cada analito foi calculada a composição percentual relativa para cada componente de acordo com a seguinte equação:

$$x_i \left( \% \frac{m}{m} \right) = \frac{\sum A_i}{\sum A_{total}} \times 100 \quad (3.4)$$

Onde  $x_i$  é a fração mássica de cada componente  $i$  na amostra total,  $\sum A_i$  a soma das áreas de todos os picos do componente  $i$  e  $\sum A_{total}$  a soma das áreas de todos os picos do cromatograma.

O intervalo de tempo de retenção considerado para cada componente seguiu o método utilizado por Aguilar (2018), sendo MG entre 3 e 8 min, ES entre 9 e 12 min, DG entre 13 e 17 min e TG entre 18 e 22 min aproximadamente. A Figura 3.1 apresenta um cromatograma obtido durante ensaios de síntese com a identificação dos componentes em cada intervalo de tempo de retenção, sendo MG (azul), ES (verde), DG (laranja) e TG (vermelho).

**Figura 3.1. Cromatograma de HPLC obtido da reação de transesterificação com identificação dos componentes.**

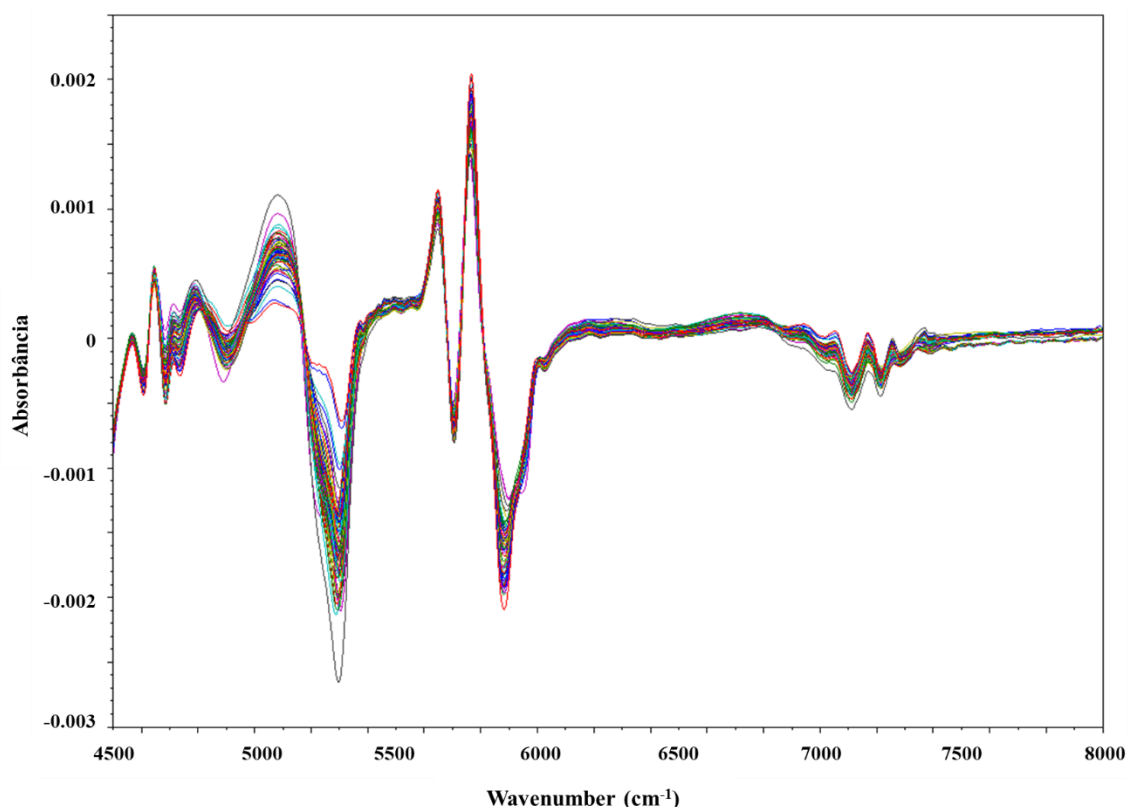


Fonte: Arquivo Pessoal

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Durante os ensaios de síntese conduzidos foram obtidas as varreduras de espectro utilizando espectroscopia na região do NIR com o auxílio do equipamento NIRA. A Figura 4.1 apresenta os espectros tratados utilizando o filtro de Savitzky-Golay e a região de corte utilizada.

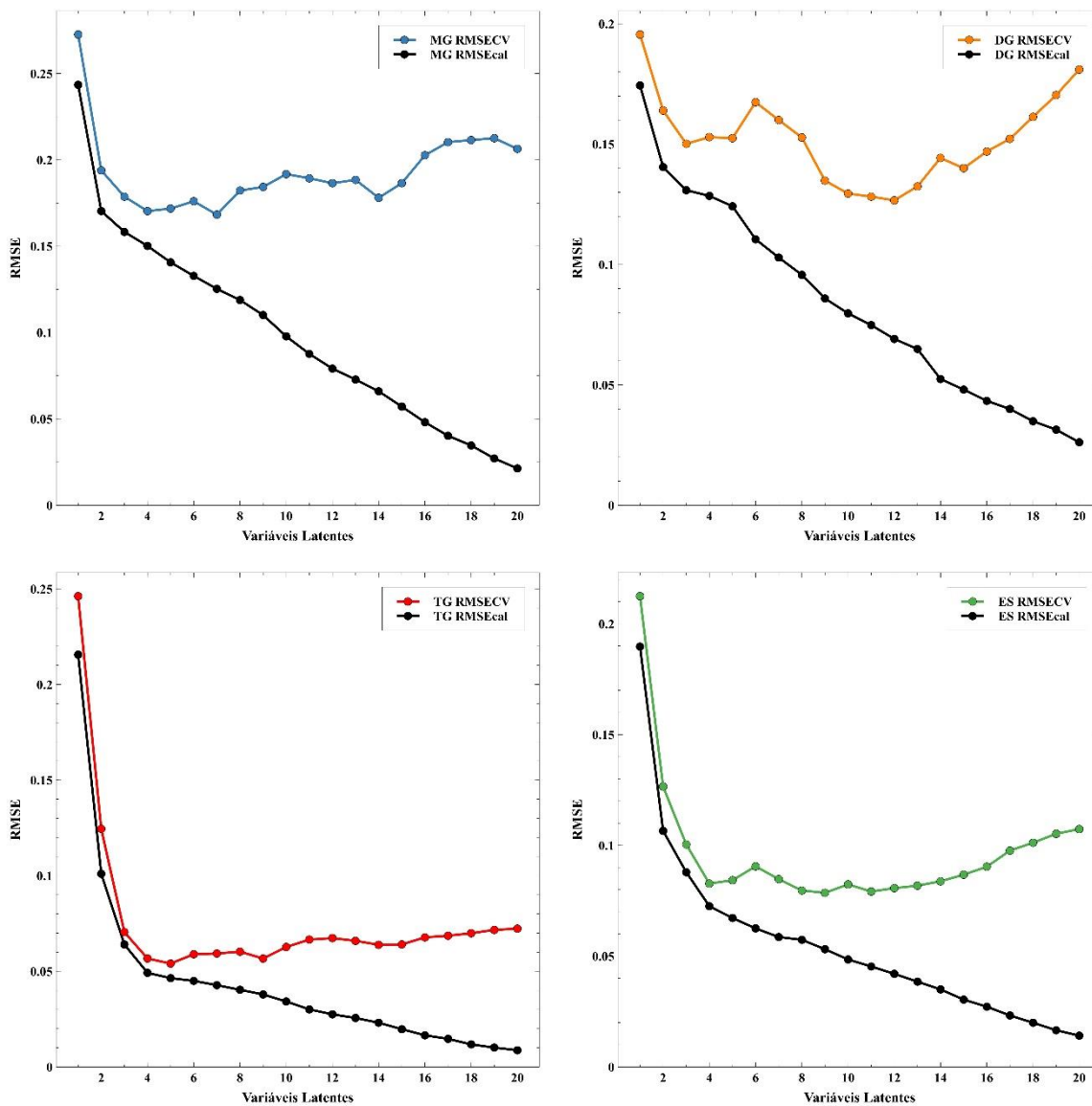
**Figura 4.1. Espectros da mistura obtidos com NIRA na região 4500–4500  $\text{cm}^{-1}$  tratados com filtro de Savitzky-Golay.**



**Fonte:** Arquivo Pessoal

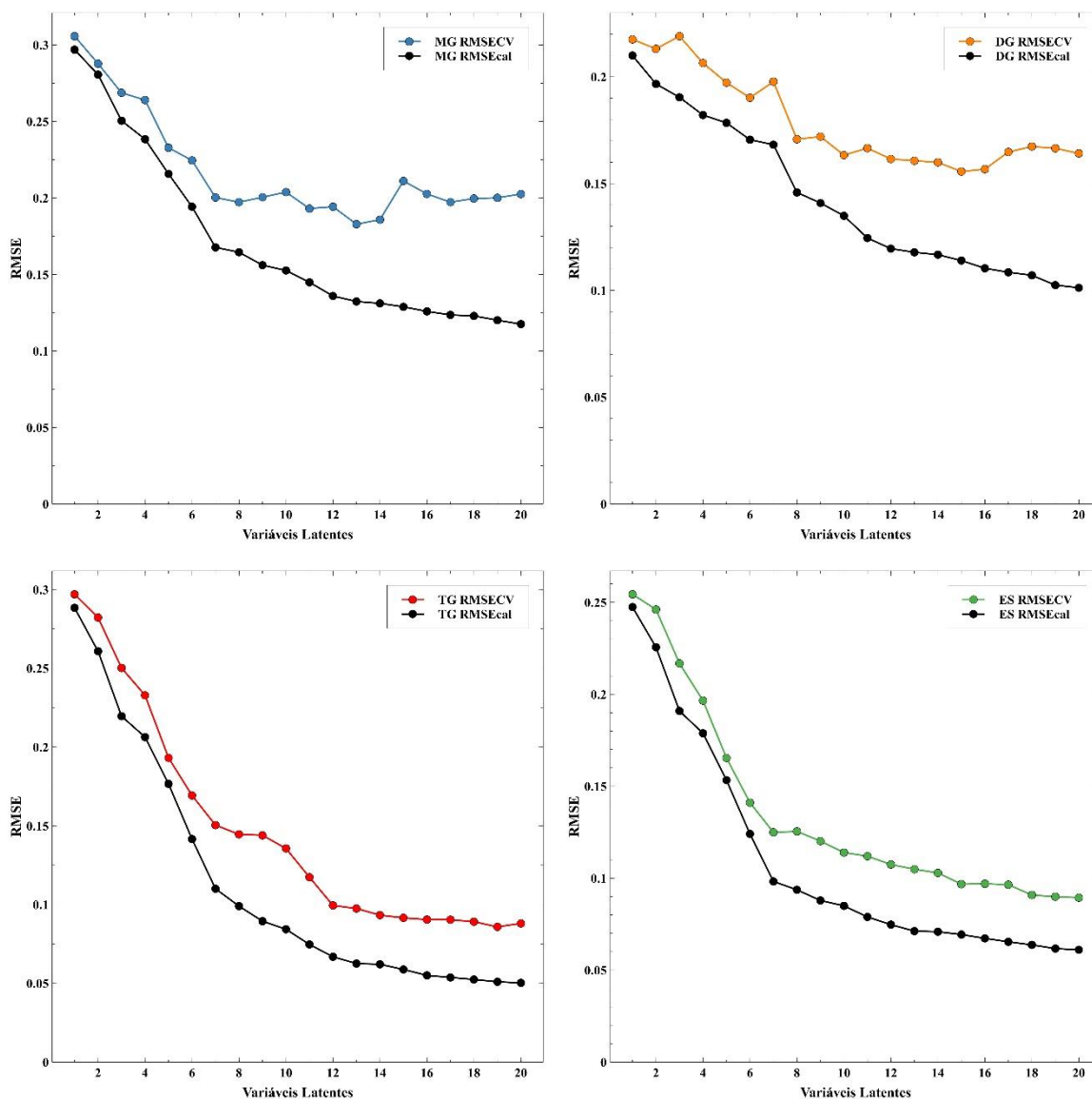
Os dados de referência de absorvância (espectros tratados) e fração mássica (obtidos via HPLC) foram utilizados como entrada dos modelos de calibração. Aplicando-se o procedimento de validação cruzada foram obtidos os valores de erro de validação cruzada e calibração para cada analito e método multilinear aplicado, em função do número de variáveis latentes (LV's). As Figuras 4.2 e 4.3 apresentam a relação entre variáveis latentes e RMSE para cada componente em modelo de PLS e SPA, respectivamente, sendo MG (azul), DG (laranja), TG (vermelho) e ES (verde).

Figura 4.2. Resultados de validação cruzada obtidos para cada analito em modelo de PLS, utilizando espectros NIRA.



Fonte: Arquivo Pessoal

**Figura 4.3. Resultados de validação cruzada obtidos para cada analito em modelo de SPA, utilizando espectros NIRA.**



**Fonte:** Arquivo Pessoal

A complexidade do modelo (número de LV's) foi otimizada utilizando a RMSE, buscando-se reduzir os erros de previsão ao utilizar o modelo mais simples possível para cada analito. Observa-se pelas Figuras 4.2 e 4.3 que, à medida em que o número de LV's aumenta (modelo se torna mais complexo), os erros de calibração e de validação cruzada decrescem concomitantemente até um certo ponto. Após este ponto, o erro de calibração continua a diminuir, indicando o sobre-ajuste dos dados, enquanto o erro de validação cruzada começa a aumentar, indicando que o modelo começou a calibrar o ruído. Portanto,

o número de LV's ideal para cada componente é aquele que corresponde ao erro mínimo de calibração e validação cruzada, enquanto as duas curvas decrescem juntas.

As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam respectivamente os modelos em PLS e SPA escolhidos para cada componente, com o número ideal de variáveis latentes (LV's) e os erros de validação cruzada (RMSECV) e calibração (RMSEcal) normalizados pela fração máxima de cada analito.

**Tabela 4.1. Modelo de PLS para cada analito otimizado pelos resultados de validação cruzada utilizando espectros do NIRA.\***

Componente	LV's	RMSECV	RMSEcal
MG	4	0,1703	0,1502
DG	3	0,1502	0,1309
TG	4	0,0567	0,0492
ES	4	0,0828	0,0726

\*Valores de RMSE normalizados pela fração máxima de cada analito.

Fonte: Arquivo Pessoal

**Tabela 4.2. Modelo de SPA para cada analito otimizado pelos resultados de validação cruzada utilizando espectros do NIRA.\***

Componente	LV's	RMSECV	RMSEcal
MG	7	0,2002	0,1677
DG	8	0,1708	0,1458
TG	11	0,1173	0,0747
ES	6	0,1411	0,1241

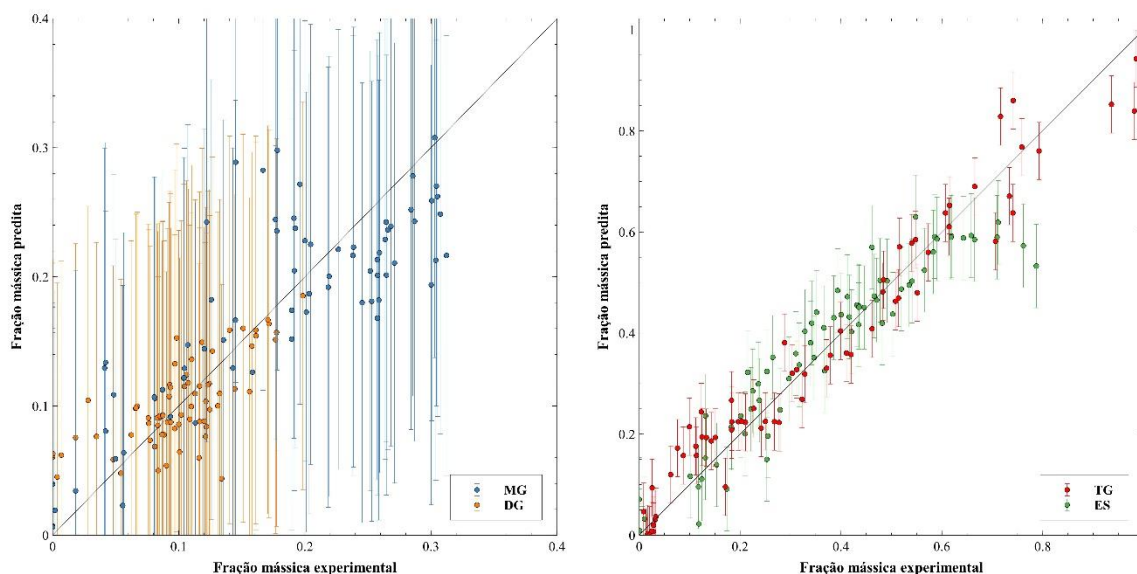
\*Valores de RMSE normalizados pela fração máxima de cada analito.

Fonte: Arquivo Pessoal

Do modelo de PLS e SPA obtido para cada analito, tem-se um valor predito de fração mássica. As Figuras 4.4 e 4.5 apresentam as frações estimadas pelos métodos de PLS e SPA, respectivamente, em função das frações experimentais de referência (HPLC), com as barras de erro calculadas a partir da RMSECV de cada componente.

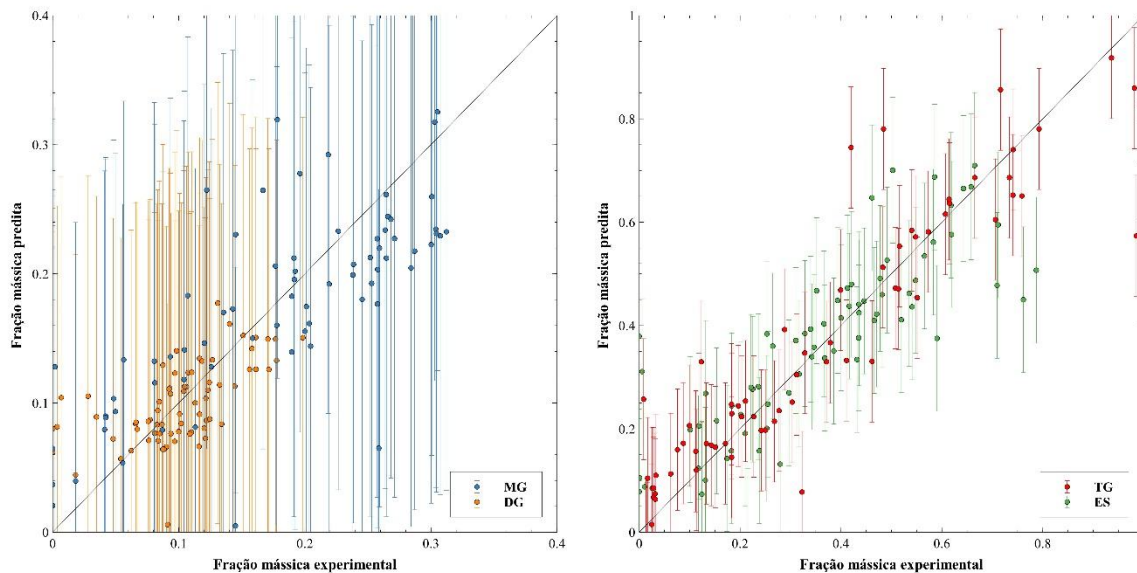


**Figura 4.4. Fração mássica experimental aferida por HPLC (experimental) versus estimada utilizando PLS. As barras de erro correspondem a 2x o RMSECV.**



Fonte: Arquivo Pessoal

**Figura 4.5. Fração mássica experimental aferida por HPLC (experimental) versus estimada utilizando SPA. As barras de erro correspondem a 2x RMSECV.**



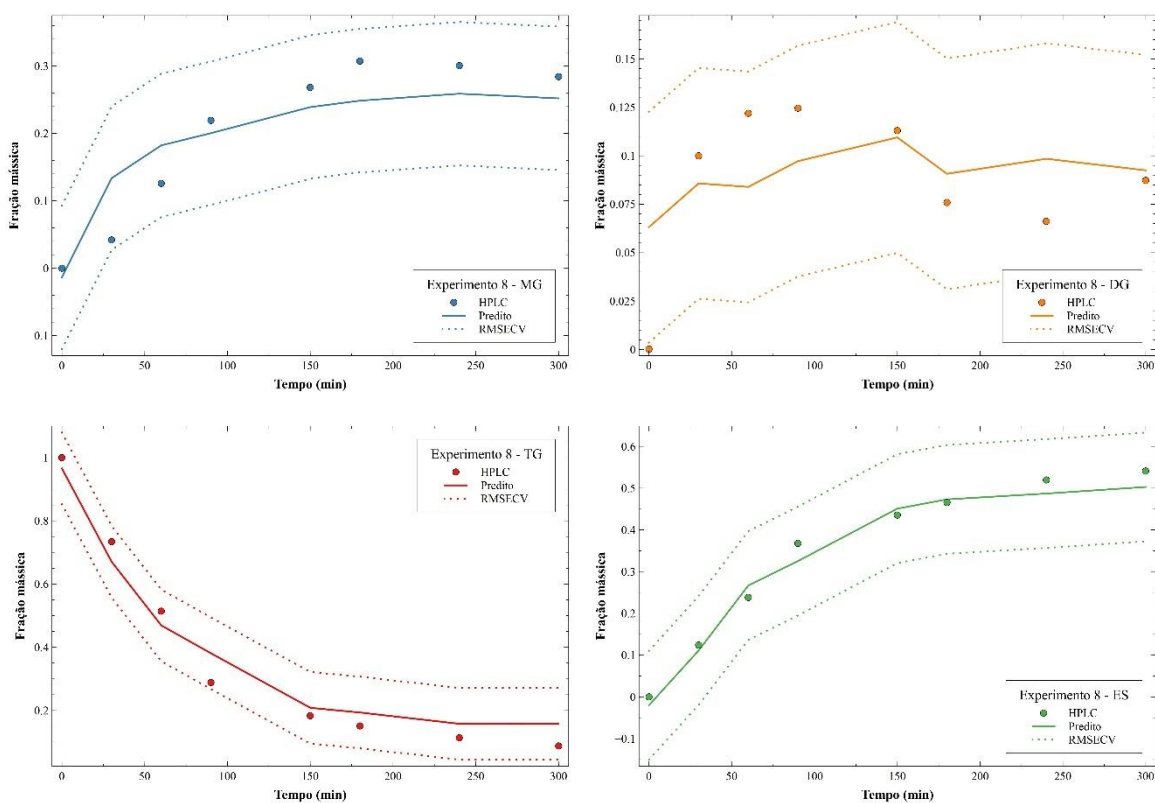
Fonte: Arquivo Pessoal

Os resultados obtidos para MG (azul) e DG (laranja) demonstram uma maior dispersão ao redor da bisetritz com amplitudes de erros maiores, ao passo que TG (vermelho) e ES (verde) apresentam um comportamento mais preciso, com uma menor dispersão ao redor da bisetritz e amplitudes de erros menores. Tais ocorrências estão diretamente relacionadas

com os erros obtidos nos modelos de cada componente, assim os analitos com menores erros (RMSECV e RMSEcal) adequam-se melhor aos modelos propostos.

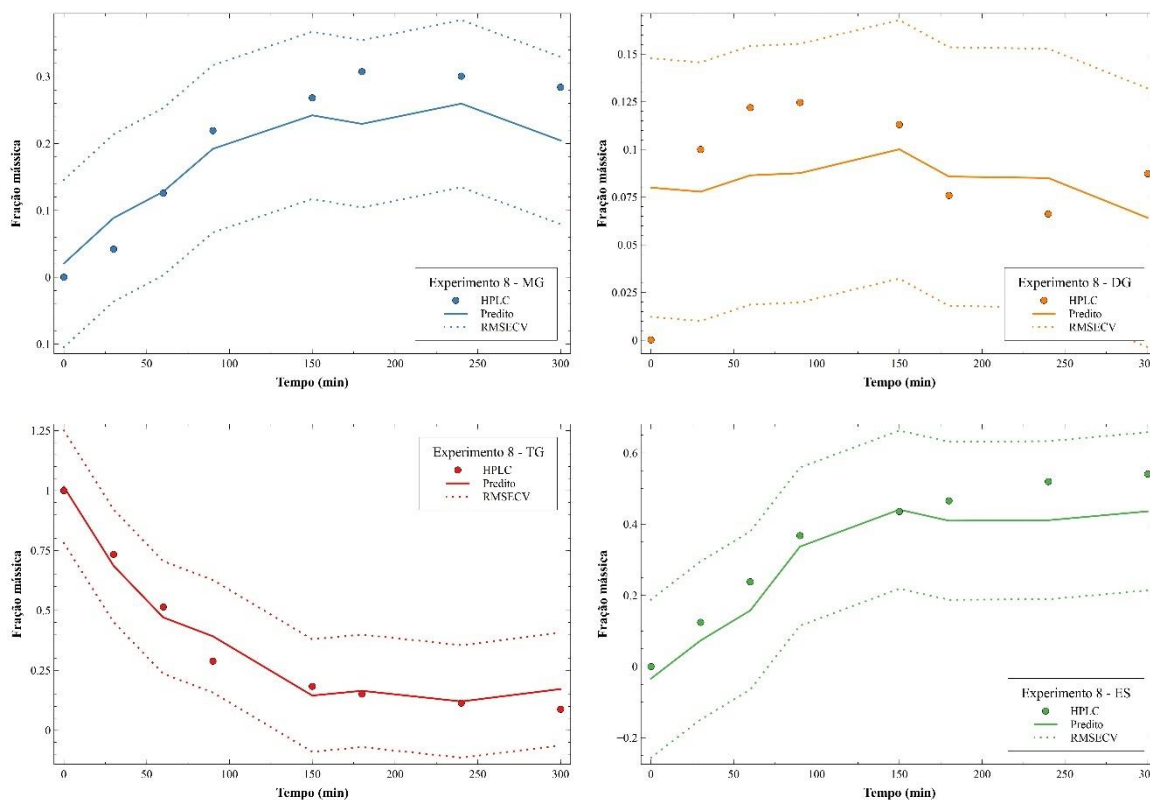
Os perfis de fração mássica versus tempo foram traçados para cada um dos analitos em todos os ensaios de síntese, a fim de validar os resultados dos modelos obtidos em PLS e SPA. As Figuras 4.6 e 4.7 apresentam os perfis do ensaio de síntese 8 e o Apêndice A apresenta a compilação de todos os experimentos. Nas figuras, os pontos representam os valores obtidos experimentalmente por HPLC, as linhas sólidas o resultado estimado pelo modelo e as linhas pontilhadas os erros padrões para cada modelo, calculados a partir da RMSECV, delimitando o intervalo de confiança.

**Figura 4.6. Monitoramento da síntese enzimática de biodiesel no ensaio 8 com espectros de NIRA em modelo PLS.**



Fonte: Arquivo Pessoal

**Figura 4.7. Monitoramento da síntese enzimática de biodiesel no ensaio 8 com espectros de NIRA em modelo SPA**



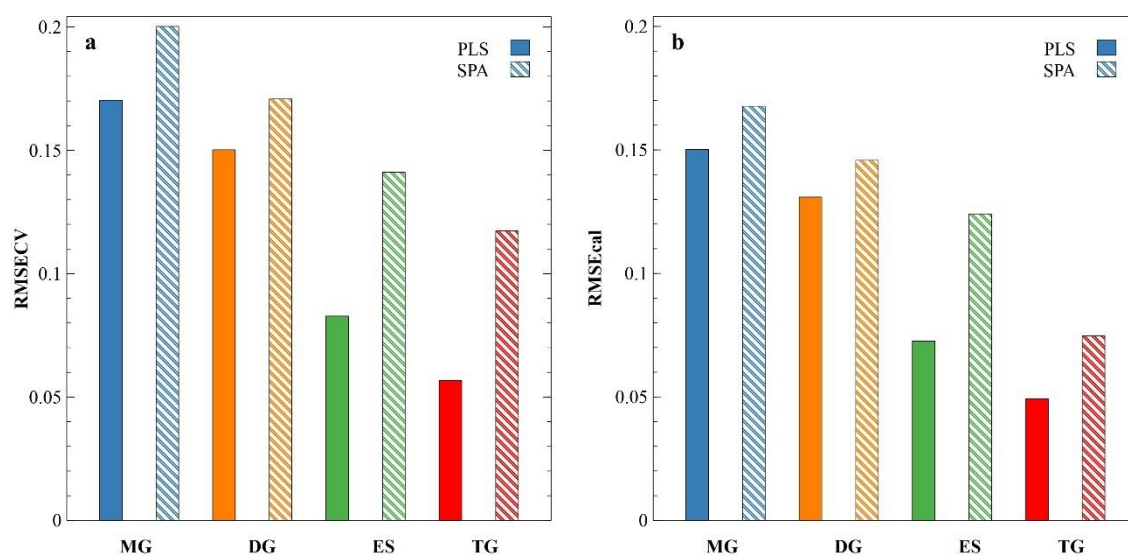
Fonte: Arquivo Pessoal

Pode-se observar uma alta correlação entre os resultados do NIRA e do HPLC ao avaliar a previsão de cada espectro com base no erro de validação cruzada (RMSECV). As frações mássicas previstas de cada analito, quando quantificadas para cada um dos modelos multilíneares, apresentaram um perfil coerente com os resultados alcançados por Aguiar (2018) utilizando o mesmo modelo reacional. É importante ressaltar que existem erros não desprezíveis relacionados às frações experimentais obtidas por HPLC, como falhas na diluição e no método. Desta forma, os erros obtidos no modelo também se devem às imprecisões nos dados de referência.

Além disso, ao se propor o monitoramento da transesterificação enzimática de biodiesel utilizando espectros no NIR, considerou-se a possibilidade de desvios nos resultados de ésteres e triglicerídeos que possam ter sido causados pela presença de MG, DG e glicerol no meio reacional, bem como a dificuldade de distinção dos conteúdos de MG e DG a partir das leituras de espectro do NIRA que podem ter contribuído para o maior erro relacionado aos modelos de tais analitos.

A Figura 4.8 apresenta uma comparação gráfica entre os erros de validação cruzada (RMSECV) e calibração (RMSEcal) obtidos para cada componente e método multilinear utilizado.

**Figura 4.8. Resultados de validação cruzada (a) e calibração (b) obtidos para cada modelo e analito.**



Fonte: Arquivo Pessoal

A comparação entre os erros de calibração e validação cruzada obtidos para cada analito reforça a conclusão levantada de que os modelos desenvolvidos para TG e ES apresentam um comportamento mais preciso quando comparados com os de MG e DG, o que está relacionado com a maior absorvidade mássica de triglicerídeos e ésteres nos espectros na região do infravermelho próximo, conforme apresentado nos estudos de Knothe (2001). Além disso, nota-se que para todos os componentes os erros obtidos pelo método de SPA foram maiores que os erros de PLS.

Portanto, em vista dos resultados apresentados, o modelo de calibração multivariada desenvolvido que utiliza o método de mínimos quadrados parciais para interpretar os espectros obtidos a partir da transesterificação enzimática de biodiesel etílico com lipase solúvel é válido para a classificação e quantificação dos conteúdos de triglicerídeos e ésteres da reação, com erros respectivos de 5,67% e 8,28% (normalizados pela fração máxima dos analitos), bem como o monitoramento em linha do processo.

## 5. CONCLUSÕES

Os modelos de calibração multivariada desenvolvidos apresentaram resultados satisfatórios na utilização de métodos de espectroscopia no NIR para monitoramento em linha da reação de transesterificação enzimática de biodiesel etílico com lipase solúvel.

A composição da mistura reacional (ES, TG, DG e MG) prevista pelos modelos apresentou resultados bem correlacionados com os valores experimentais de referência (HPLC), ou seja, os modelos de regressão PLS e SPA foram satisfatórios em prever uma distribuição de frações mássicas em função do tempo de reação que fosse coerente com o modelo reacional adotado.

A estratégia de PLS pode ser considerada a melhor opção para esse caso, tendo otimizado modelos menos complexos (menor número de variáveis latentes) com erros menores. O modelo de calibração multivariada desenvolvido em PLS para TG e ES pode ser utilizado para o monitoramento da conversão de triglicerídeos e rendimento de biodiesel (éster etílico), com erros respectivos de 5,67% e 8,28%.

Por conseguinte, os resultados obtidos atestam para o potencial da espectroscopia NIR como uma ferramenta robusta a ser aplicada no controle e monitoramento da produção industrial de biodiesel, o que possibilitaria a identificação em tempo real de mudanças no processo, bem como reduziria o tempo e custo despendidos atualmente em análises realizadas por cromatografia líquida e gasosa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, M. C. V.; GIORDANO, R. C.; RIBEIRO, M. P. A. Síntese de biodiesel etanólico utilizando lipase solúvel. **Blucher**, São Paulo, ISSN 2359-1757, p. 3466-3469. 2018.

AL-ZUHAIR, S. *et al.* Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, 42, 951 – 960, 2007.

ANP. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2022. In: gov.br. **ANP/SPC**. 28 Ago 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/anuario-estatistico/anuario-estatistico-2022#Secao4>. Acesso em: 31 ago. 2022.

ARAÚJO, M. C. U.; SALDANHA, T. C. B.; GALVÃO, R. K. H.; YONEYAMA, T.; CHAME, H. C.; VISANI, V. The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis. *Chemom. **Intell. Lab. Syst.*** 57(2):65-73, 2001

BURNS, D.; CIURCZAK, E. W. **Handbook of near-infrared analysis. Revised and expanded.** 3rd ed. New York: ERC Press. 2001.

FUKUDA, H. *et al.* Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 92, 405 – 416, 2001.

HAALAND, D. M.; THOMAS, E. V. Partial Least-Squares Methods for Spectral Analyses.1. Relation To Other Quantitative Calibration Methods and The Extraction Of Qualitative Information. **Analytical Chemistry**. 60(11):1193-1202. 1988.

HOLČAPEK, M. *et al.* Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. **Journal of Chromatography A**, 858, 13 – 31, 1999.

KILLNER, M. H. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; & PASQUINI, C. A PLS regression model using NIR spectroscopy for on-line monitoring of the biodiesel production reaction. **Fuel**, 90(11), 3268–3273. 2011.

KNOTHE G. Determining the blend level of mixtures of biodiesel with conventional diesel fuel by fiber-optic near-infrared spectroscopy and H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy. **JAACS**, 78:1025–8. 2001.

KNOTHE G. Rapid Monitoring of Transesterification and Assessing Biodiesel Fuel Quality by Near-Infrared Spectroscopy Using a Fiber-Optic Probe. **JAACS**, 76, 795–800, julho 1999.

KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. Manual de biodiesel. São Paulo: **Edgard Blücher**, 2006.

LEUNG *et al.* A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, 87, 1083 – 1095. Abril 2010.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, J.; MOYA, D.; DOLORS BENAIGES, M.; VALERO, F.; ALCALÀ, M. Near Infrared Spectroscopy: A useful technique for inline monitoring of the enzyme catalyzed biosynthesis of third-generation biodiesel from waste cooking oil. **Fuel**, 319, 2022.

NARWAL, S. K.; GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. **Biotechnology Letters**. 35, 479-490. 2013.

NELLES, O. **Nonlinear System Identification**. 1st. ed. Springer. 2001.

NIELSEN, P. M.; RANCKE-MADSEN, A.; HOLM, H. C.; BURTON, R. Production of Biodiesel Using Liquid Lipase Formulations. **JAACS**, 93, 905-910. 2016.

NORDBLAD, M. *et al.* Identification of critical parameters in liquid enzyme-catalyzed biodiesel production. **Biotechnol. Bioeng.**, 111: 2446–2453, 2014.

NORIEGA, M. A.; NARVÀEZ, P. C.; IMBACHI, A. D.; CADAVID, J. G.; HABERT, A. C. Liquid-liquid equilibrium for biodiesel-glycerol-methanol or ethanol systems using UNIFAC correlated parameters. **Energy**. V. 111, p. 814-849, 2016.

PINZI, S.; ALONSO, F.; GARCÍA OLMO, J.; DORADO, M. P. Near infrared reflectance spectroscopy and multivariate analysis to monitor reaction products during biodiesel production. **Fuel**, 92(1), 354–359. 2012.

POURZOLFAGHAR, H.; WAN, F. A.; ASHRI, M.; MOHAMED, W. D.; AROUA, K. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 61, 245 – 257. 2016.

SALES, R. F.; DE LIMA, S. M.; STRAGEVITCH, L.; PIMENTEL, M. F.; DE JUAN, A. NIR monitoring and modelling of soybean oil methanolysis with multivariate curve resolution-alternating least squares with correlation constraint. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 28(5), 695–706. 2017.

SALES, R.; DA SILVA, N. C.; DA SILVA, J. P.; FRANÇA, H. H.; PIMENTEL, M. F.; STRAGEVITCH, L. Handheld near-infrared spectrometer for on-line monitoring of biodiesel production in a continuous process. **Fuel**, 254, 115680. 2019.

UDOP<sup>1</sup>. **Boletim mensal do biodiesel**: abril 2021. Araçatuba. Disponível em: <https://www.udop.com.br/noticia/2021/04/12/governo-confirma-reducao-da-mistura-do-biodiesel-no-diesel-de-13-para-10.html>. Acesso em: 06 set. 2022.

UDOP<sup>2</sup>. **Boletim mensal do biodiesel**: agosto 2021. Araçatuba. Disponível em: <https://www.udop.com.br/noticia/2021/08/10/ministro-de-minas-energia-garante-que-percentual-de-biodiesel-no-diesel-fossil-sera-de-15-em-2023.html>. Acesso em: 06 set. 2022.

UNFCCC. Decision 1/CMA.3 Glasgow Climate Pact. *In*: UNFCCC. Conference of the Parties serving as the meeting of the Parties to the Paris Agreement (CMA). **United Nations Climate Change**. 08 Mar 2022. Disponível em: <https://unfccc.int/documents/460950>. Acesso em: 25 ago. 2022.



ZHANG, W. Review on analysis of biodiesel with infrared spectroscopy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 16(8), 6048-6058. 2012.

## BIBLIOGRAFIA

CÂMARA, A. B. F.; DE CARVALHO, L. S.; DE MORAIS, C. L. M.; DE LIMA, L. A. S.; DE ARAÚJO, H. O. M., DE OLIVEIRA, F. M.; DE LIMA, K. M. G. MCR-ALS and PLS coupled to NIR/MIR spectroscopies for quantification and identification of adulterant in biodiesel-diesel blends. **Fuel**, 210, 497–506, 2017.

CÂMARA, A. B. F.; DE CARVALHO, L. S.; DE MORAIS, C. L. M.; DE LIMA, L. A. S.; DE ARAÚJO, H. O. M., DE OLIVEIRA, F. M.; DE LIMA, K. M. G. MCR-ALS and PLS coupled to NIR/MIR spectroscopies for quantification and identification of adulterant in biodiesel-diesel blends. **Fuel**, 210, 497–506, 2017.

CONSTANTINO, A. F. *et al.* Determination of physicochemical properties of biodiesel and blends using low-field NMR and multivariate calibration. **Fuel**, 237, 745–752, 2019.

COSTA, V. L.; KOVALESKI, J. L.; JUNIOR, P. P. DE A.; COSTA, D. L.; MORSCHEL, E. L. A introdução do Biodiesel na matriz energética brasileira : contextualização histórica, cadeia produtiva e processo produtivo. **Revista ADM** pg., 5(1), 43–51. 2012.

CUNHA, C. L.; TORRES, A. R.; LUNA, A. S. Multivariate regression models obtained from near-infrared spectroscopy data for prediction of the physical properties of biodiesel and its blends. **Fuel**, 261, 2020.

DE FÁTIMA BEZERRA DE LIRA, L.; DE VASCONCELOS, F. V. C.; PEREIRA, C. F., PAIM, A. P. S.; STRAGEVITCH, L.; PIMENTEL, M. F. Prediction of properties of diesel/biodiesel blends by infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Fuel**, 89(2), 405–409, 2010.

DE LIMA, S. M.; SILVA, B. F. A.; PONTES, D. V.; PEREIRA, C. F.; STRAGEVITCH, L.; PIMENTEL, M. F. In-line monitoring of the transesterification reactions for biodiesel production using NIR spectroscopy. **Fuel**, 115, 46–53, 2014.

FERREIRA, M. M. C., ANTUNES, A. M., MELGO, M. S., & VOLPE, P. L. O. Chemometrics i: Multivariate calibration, a tutorial. **Quimica Nova**, 22(5), 724–731, 1999.

GALVAN, D.; DE AGUIAR, L. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; BORSATO, D.; KILLNER, M. H. M. Online monitoring of transesterification reaction by medium-resolution benchtop <sup>1</sup>H NMR and NIR spectroscopy. **Fuel Processing Technology**, 208, 106511, 2020.

GELINSKI, E. K.; HAMERSKI, F.; CORAZZA, M. L.; SANTOS, A. F. Biodiesel Synthesis Monitoring using Near Infrared Spectroscopy. **The Open Chemical Engineering Journal**, 12(1), 95–110, 2018.

KILLNER, M. H. M.; GARRO LINCK, Y.; DANIELI, E.; ROHWEDDER, J. J. R.; BLÜMICH, B. Compact NMR spectroscopy for real-time monitoring of a biodiesel production. **Fuel**, 139, 240–247, 2015.

KILLNER, M. H. M.; GARRO LINCK, Y.; DANIELI, E.; ROHWEDDER, J. J. R.; BLÜMICH, B. Compact NMR spectroscopy for real-time monitoring of a biodiesel production. **Fuel**, 139, 240–247, 2015.

MANCINI, M.; TAAVITSAINEN, V. M.; TOSCANO, G. Comparison of three different classification methods performance for the determination of biofuel quality by means of NIR spectroscopy. **Journal of Chemometrics**, 33(7), 2019.

MULRENNAN, K.; MUNIR, N.; CREEDON, L.; DONOVAN, J.; LYONS, J. G.; MCAFEE, M. NIR-Based Intelligent Sensing of Product Yield Stress for High-Value Bioresorbable Polymer Processing. **Sensors**, 22(8), 2022.

PAIVA, E. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; PASQUINI, C., PIMENTEL, M. F.; PEREIRA, C. F. Quantification of biodiesel and adulteration with vegetable oils in diesel/biodiesel blends using portable near-infrared spectrometer. **Fuel**, 160, 57–63, 2015.

RICHARD, R.; DUBREUIL, B.; THIEBAUD-ROUX, S.; PRAT, L. On-line monitoring of the transesterification reaction carried out in microreactors using near infrared spectroscopy. **Fuel**, 104, 318–325, 2013.

RICHARD, R.; LI, Y.; DUBREUIL, B.; THIEBAUD-ROUX, S.; PRAT, L. On-line monitoring of the transesterification reaction between triglycerides and ethanol using near infrared spectroscopy combined with gas chromatography. **Bioresource Technology**, 102(12), 6702–6709, 2011.

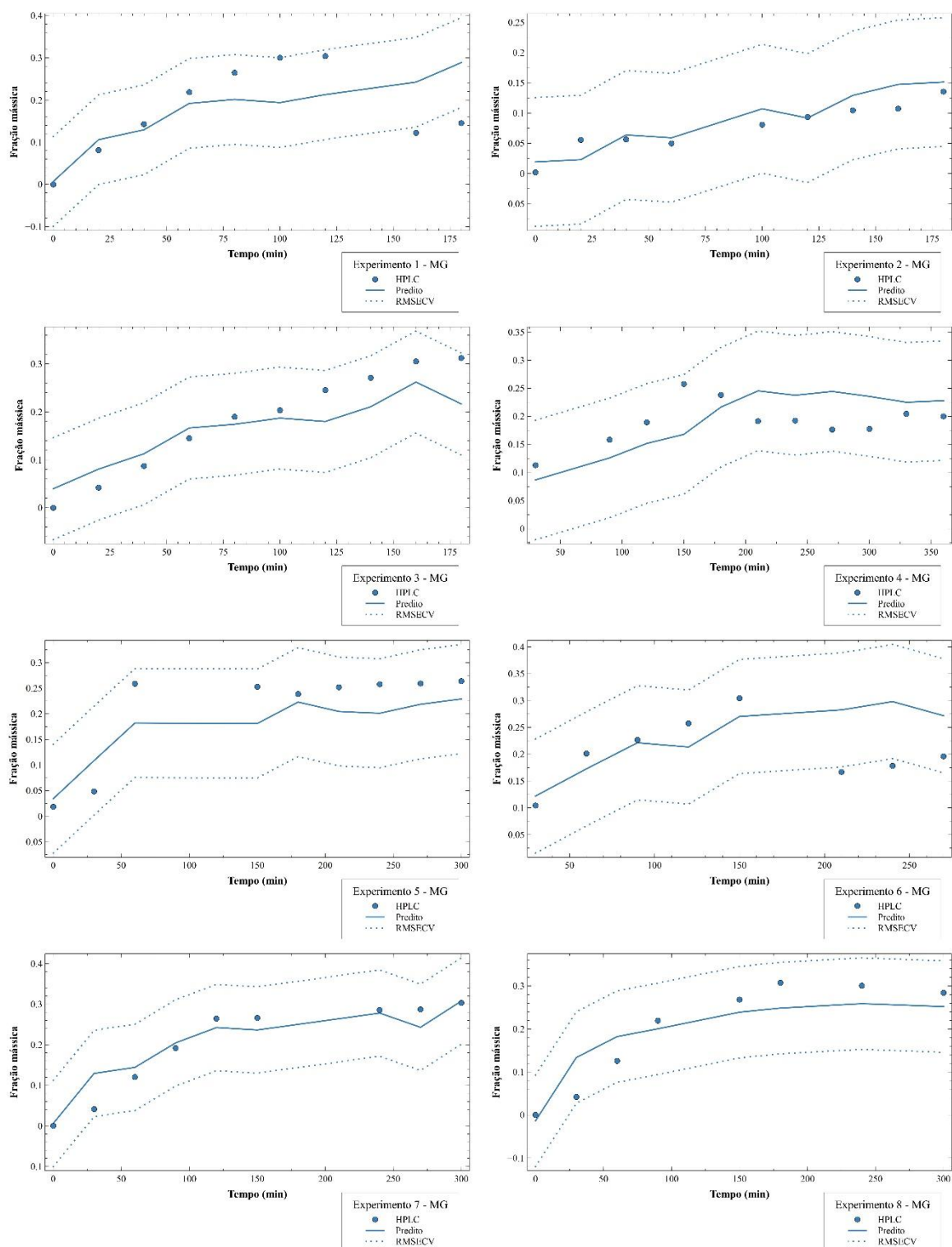
SINGH, K.; KUMAR, S. P.; BLÜMICH, B. Monitoring the mechanism and kinetics of a transesterification reaction for the biodiesel production with low field <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Fuel**, 243, 192–201, 2019.

TREVISAN, M. G.; GARCIA, C. M.; SCHUCHARDT, U.; POPPI, R. J. Evolving factor analysis-based method for correcting monitoring delay in different batch runs for use with PLS: On-line monitoring of a transesterification reaction by ATR-FTIR. **Talanta**, 74(4), 971–976, 2008.

## APÊNDICE A

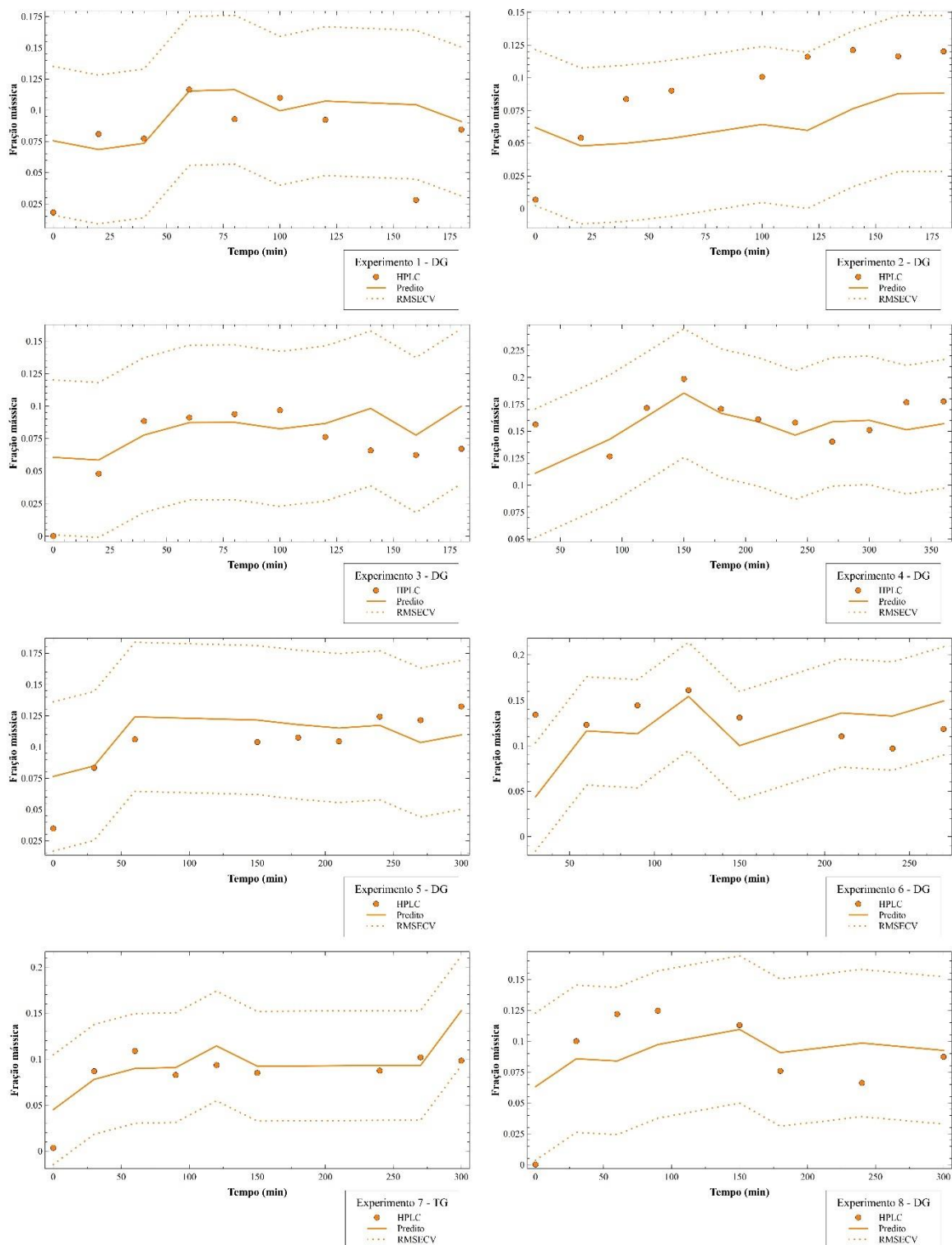
Nesse apêndice são apresentados os perfis de fração mássica versus tempo traçados para cada analito em cada ensaio de síntese. Nas figuras, os pontos representam os valores obtidos experimentalmente por HPLC, as linhas sólidas o resultado estimado pelo modelo e as linhas pontilhadas os erros padrões para cada modelo, calculados a partir do RMSECV, delimitando o intervalo de confiança.

**Figura 0.1. Monitoramento de MG na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo PLS.**



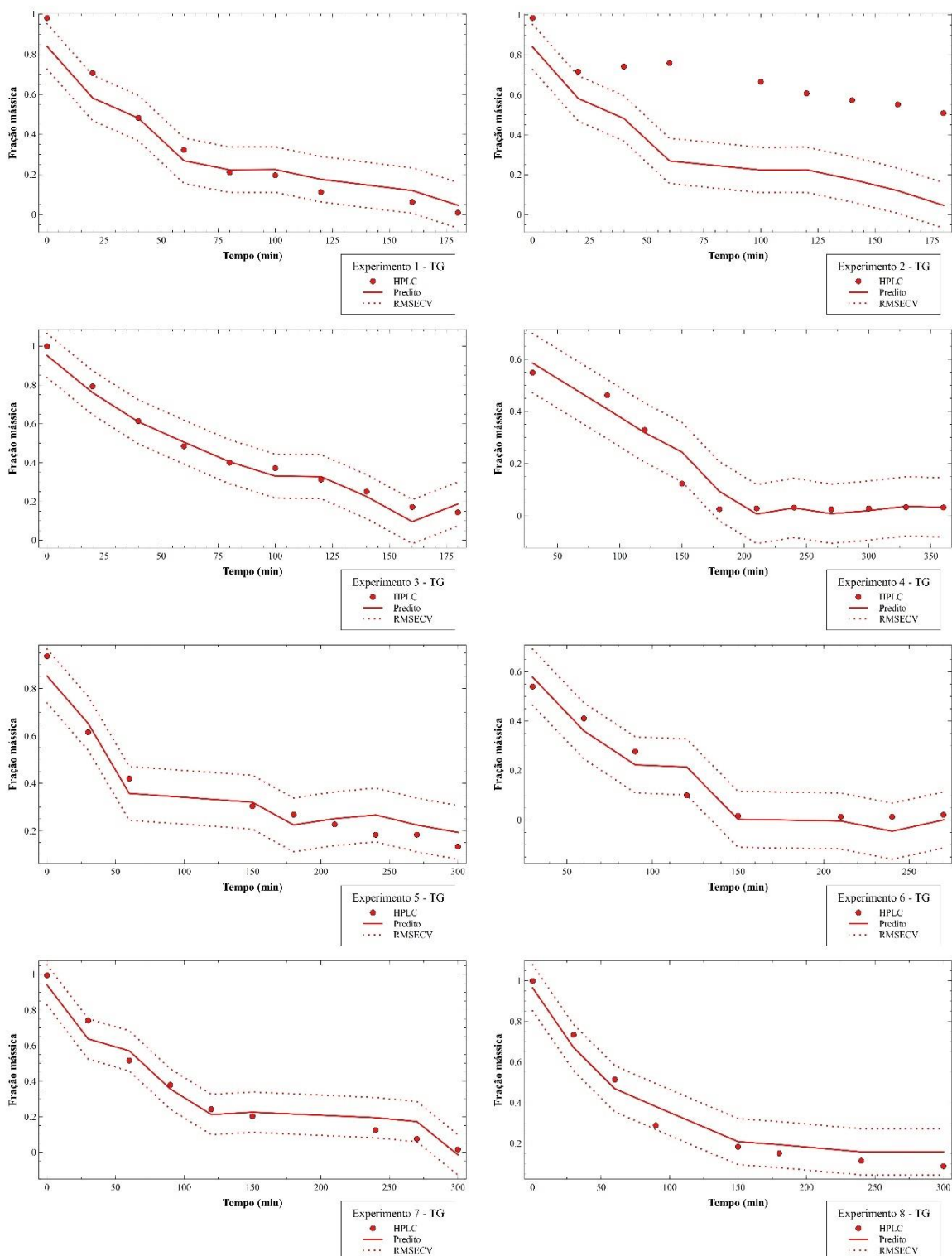
Fonte: Arquivo Pessoal

**Figura 0.2. Monitoramento de DG na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo PLS.**



Fonte: Arquivo Pessoal

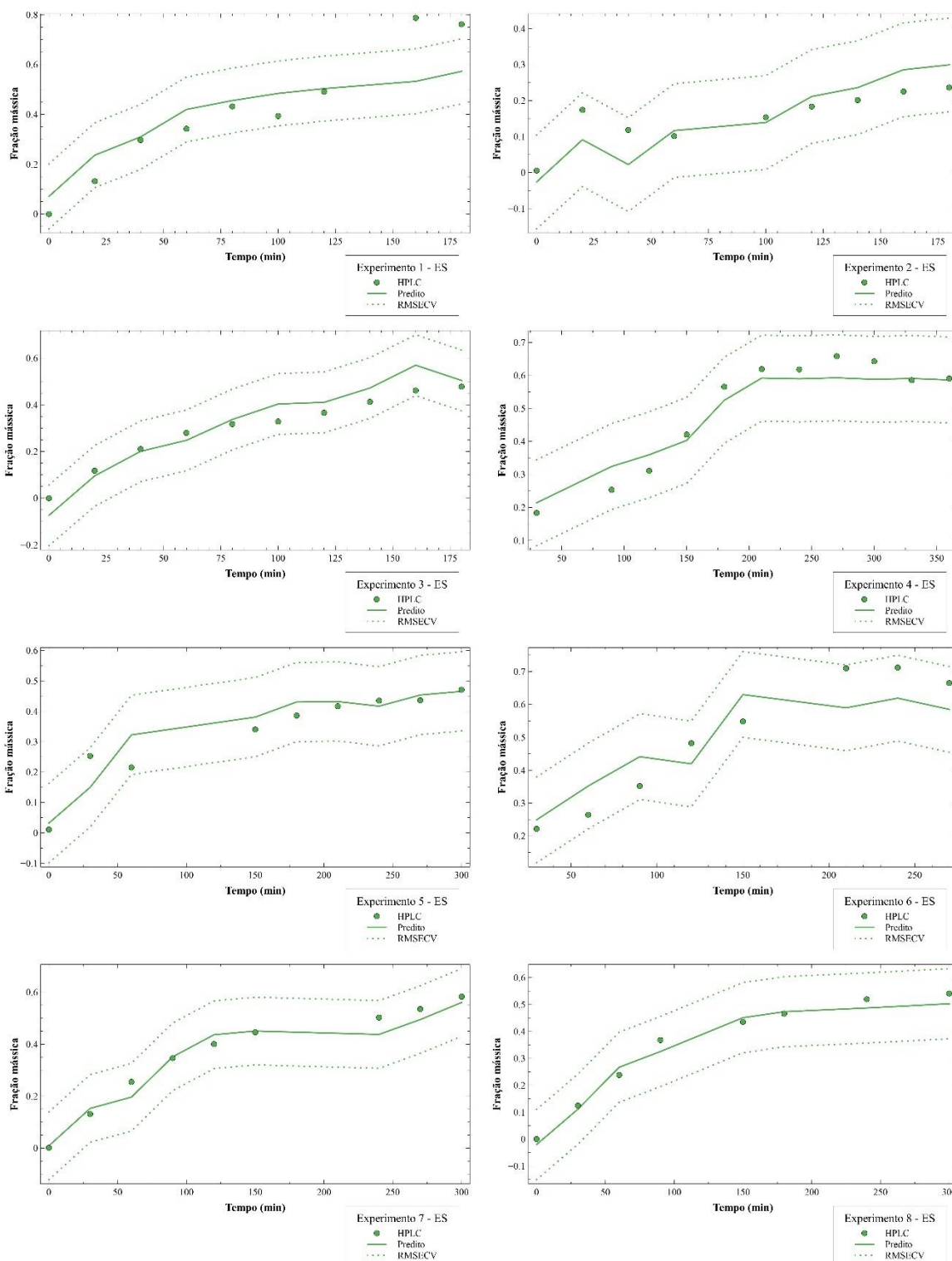
**Figura 0.3. Monitoramento de TG na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo PLS.**



Fonte: Arquivo Pessoal

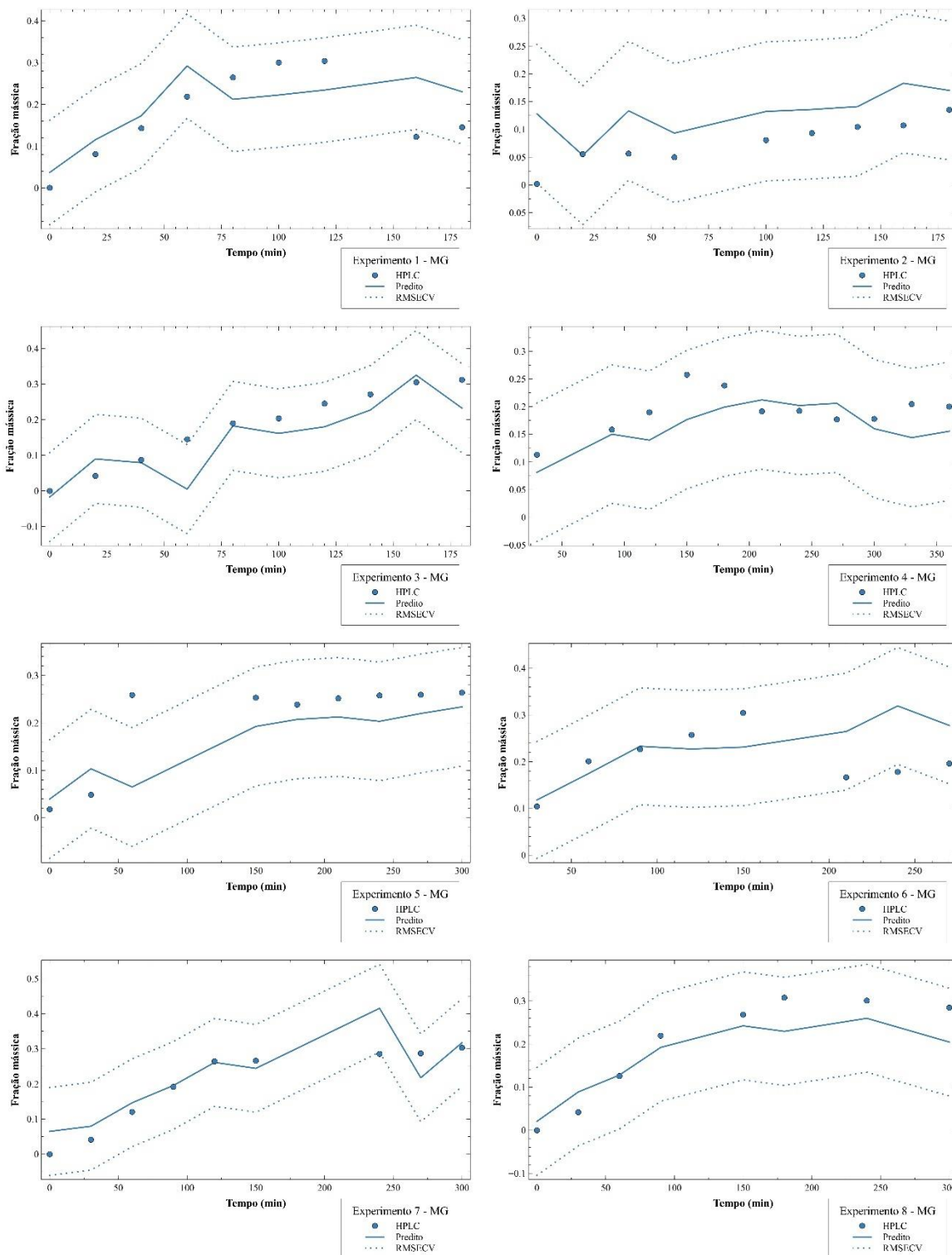


**Figura 0.4. Monitoramento de ES na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo PLS.**



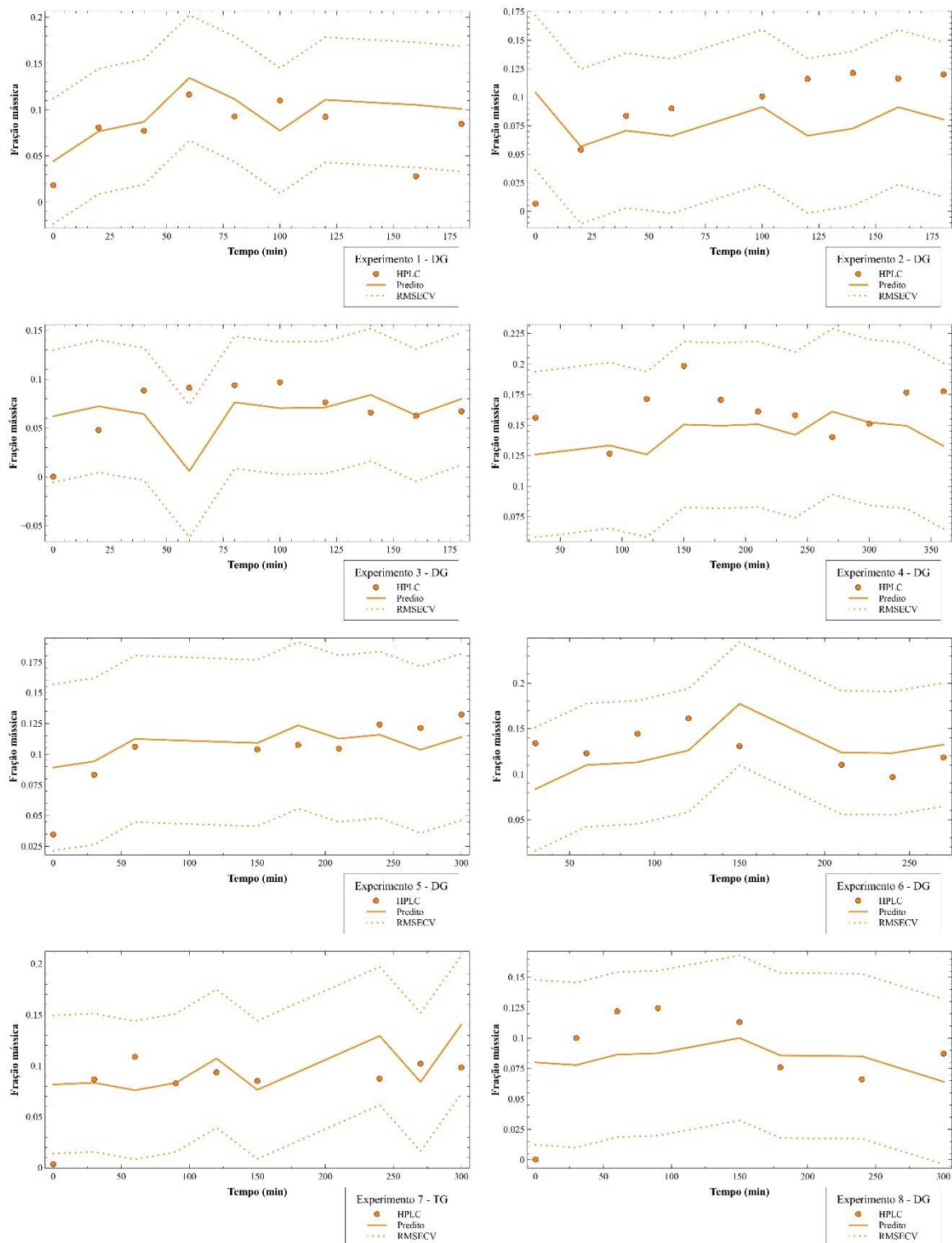
Fonte: Arquivo Pessoal

**Figura 0.5. Monitoramento de MG na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo SPA.**



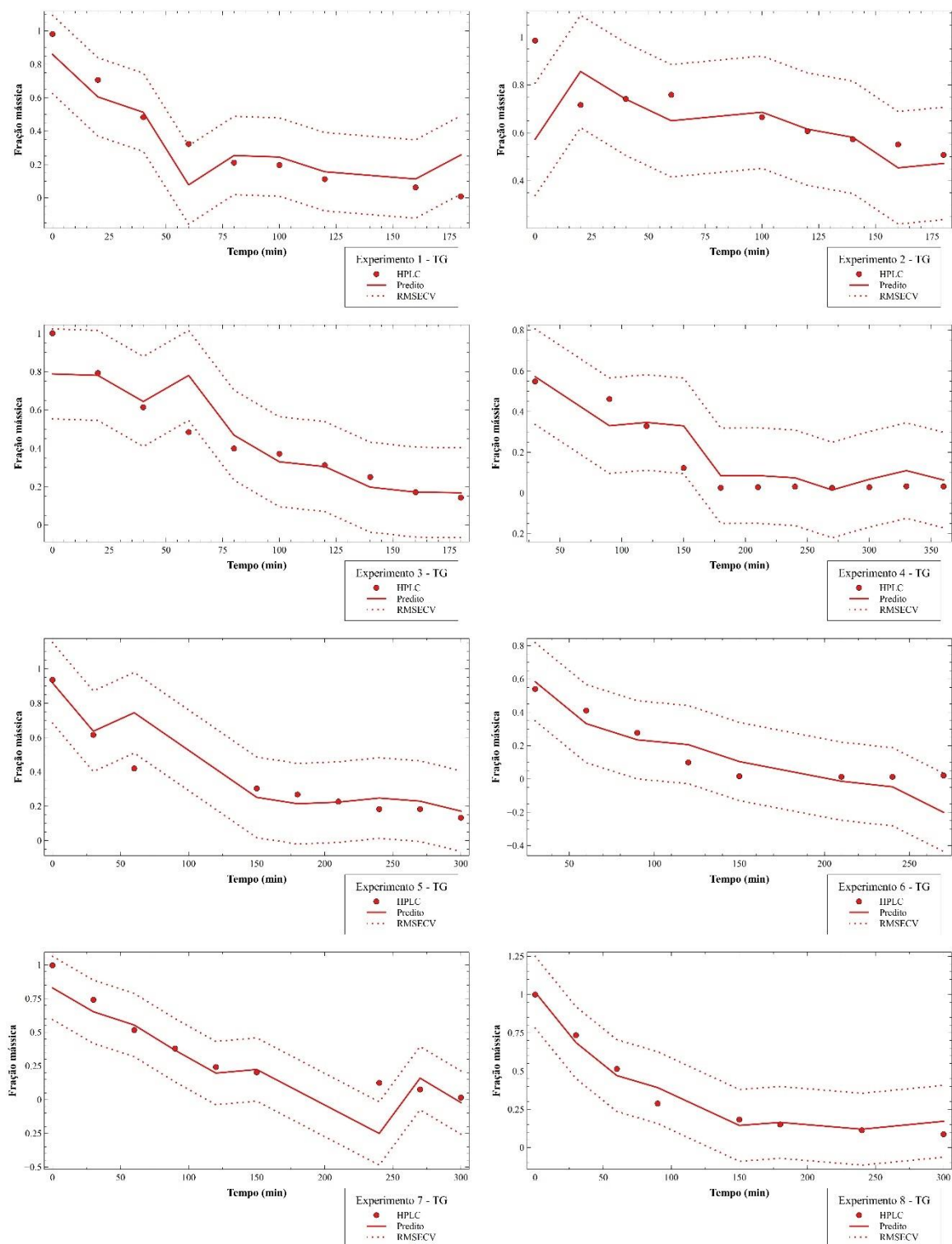
Fonte: Arquivo Pessoal

**Figura 0.6. Monitoramento de DG na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo SPA.**



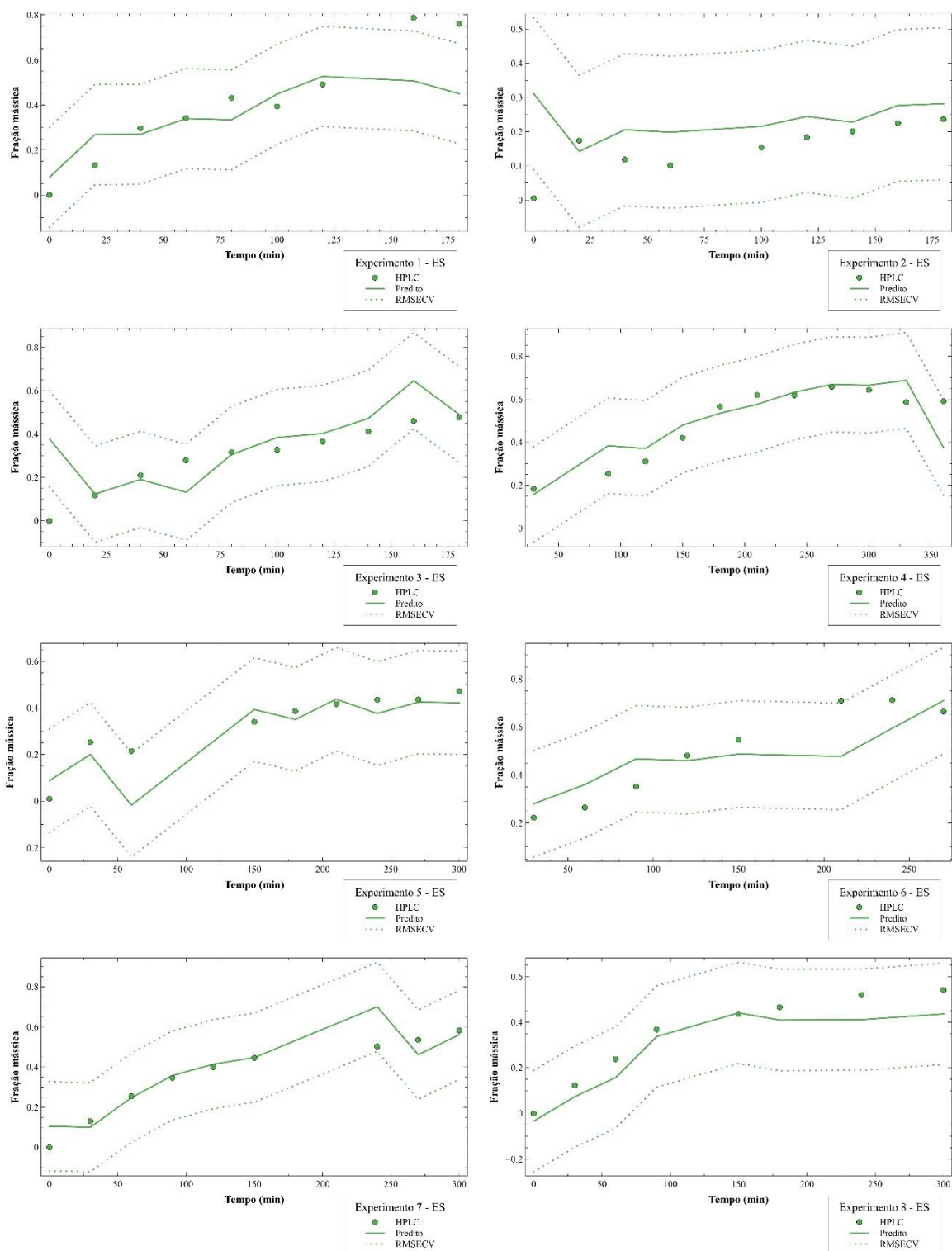
Fonte: Arquivo Pessoal

**Figura 0.7. Monitoramento de TG na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo SPA.**



Fonte: Arquivo Pessoal

**Figura 0.8. Monitoramento de ES na síntese enzimática de biodiesel com espectros de NIRA em modelo SPA.**



Fonte: Arquivo Pessoal