

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO E TÉCNICAS  
QUIMIOMÉTRICAS PARA A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E  
SUSCETIBILIDADE À MICODETERIORAÇÃO DO BODIESEL**

JULIANA MÔNICA DA COSTA

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCO FLÔRES FERRÃO  
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. VALERIANO ANTÔNIO CORBELLINI

JANEIRO/2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**APLICAÇÕES DA ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO E TÉCNICAS  
QUIMIOMÉTRICAS PARA A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E  
SUSCETIBILIDADE À MICRODETERIORAÇÃO DO BIODIESEL**

**Tese apresentada como requisito parcial para  
à obtenção do grau de Doutor em Química**

**Orientador: Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão  
Co-Orientador: Prof. Dr. Valeriano Antônio Corbellini**

**JANEIRO/2022**

## AGRADECIMENTOS

*Ao finalizar esta etapa, me sinto feliz, e com o coração cheio de alegria. Para chegar a este momento muitas pessoas foram importantes e dividiram comigo seus conhecimentos, e contribuíram para que dificuldades fossem superadas. Será impossível nominar a todas nesta página, porém alguns agradecimentos especiais vão para:*

*À minha mãe, e aos meus filhos Arthur e Alexandre pelo carinho, apoio, incentivo e compreensão neste longo período de vivências, e muita aprendizagem.*

*Ao meu orientador, Professor Dr. Marco Flôres Ferrão, e ao meu co-orientador Professor Dr. Valeriano Antônio Corbellini, pela oportunidade de trabalharmos juntos, pela amizade, confiança, respeito e dedicação, por dividirem sua experiência e compartilharem seus conhecimentos, ao longo de todo esse tempo de trabalho.*

*À Universidade de Santa Cruz do Sul, pelo uso dos laboratórios, materiais e equipamentos. Aos Professores do Departamento de Química, Wolmar Severo, Cláudia Mahlmann, Rosana Schneider, Ana Lucia Rohlfes, e Nádia de Monte Baccar. Aos funcionários dos laboratórios de Ensino, Carlos Eduardo dos Santos, Felipe Gonzatti de Moraes, á Luciane Gobbi do Laboratório de Microbiologia pelo carinho, respeito, incentivo, amizade e gentileza. Á Valéria Louzada Leal, da Tenco Unisc, por todo o auxílio e incentivo. Á Jocelene Soares pelo auxílio nas análises.*

*A Professora Dr<sup>a</sup> Fátima Menezes Bento, pelo uso do seu laboratório, e por compartilhar o seu conhecimento. As meninas do Laboratório, Sabrina e Juciana, por me receberem com muito carinho, e me proporcionarem muito aprendizado.*

*A Professora Lucélia Hoehne da UNIVATES e as funcionária do CTPPA, Martha, Liana e Letícia.*

*Ao Professor Alexandre Fuentesfria da Faculdade de Farmácia da UFRGS, ao Anderson Carvalho e a Luana Bazana, pela valiosa colaboração na parte microbiológica.*

*Aos colegas de estudo, de laboratório, amigos, pela imensa ajuda e colaboração, pela paciência, pela convivência harmoniosa, carinho e respeito em especial à Camila Correa, Carla Ruschel, Marcelo Marcelo, Fábio Weiler, André Rech, Fernanda Böck, Layane Lenardon, Manuella Schneider e Gilson Helfer.*

*À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, funcionários e professores do Instituto de Química pela grande contribuição e auxílio, durante este período.*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1.1.1 História do Biodiesel.....	2
1.1.2 Biodiesel.....	4
1.1.3 RenovaBio.....	4
1.1.4 Matérias-primas.....	5
1.1.4.1 Matérias-primas de Primeira Geração.....	6
1.1.4.1.1 Óleo de Palma.....	7
1.1.4.1.2 Óleo de Soja.....	7
1.1.4.1.3 Óleo de Algodão.....	7
1.1.4.1.4 Óleo de Linhaça.....	7
1.1.4.2 Matérias-primas de Segunda Geração.....	8
1.1.4.2.1 Karanja.....	8
1.1.4.2.2. Jatropha.....	8
1.1.4.3 Matérias-primas de Terceira Geração.....	9
1.1.4.3.1 Gordura de Origem Animal.....	9
1.1.4.3.2 Óleo Residual.....	9
1.1.4.3.3 Microalgas.....	10
1.1.4.4 Matérias-primas de Quarta Geração.....	10
1.1.5 Produção de Biodiesel de Gordura Animal versus Óleo Vegetal.....	11
1.1.6 Características Físicas e Químicas do Biodiesel.....	13
1.1.7 Propriedades do Biodiesel Inerentes às Estruturas Moleculares.....	15
1.1.7.1 Massa Específica.....	15
1.1.7.2 Viscosidade Cinemática.....	15
1.1.7.3 Índice de Iodo.....	15

1.1.7.4 Ponto de Fulgor.....	16
1.1.7.5 Número de Cetano.....	16
1.1.7.6 Ponto de Entupimento a Frio, Ponto de Névoa e Ponto de Fluidez.....	17
1.1.8 Propriedades para o Monitoramento da Qualidade do Biodiesel durante o Processo de Estocagem.....	17
1.1.8.1 Índice de Acidez.....	18
1.1.8.2 Estabilidade Oxidativa.....	18
1.1.8.3 Teor de Água.....	18
1.1.9 Estabilidade do Biodiesel.....	19
1.1.10 Processos de produção.....	20
1.1.10.1 Transesterificação.....	21
1.1.10.1.1 Catálise Básica.....	22
1.1.10.1.2 Catálise Ácida.....	24
1.1.11 Processo de Transesterificação em Duas Etapas (TDSP).....	25
1.1.12 Adulterantes em Biodiesel.....	26
1.1.13 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	27
1.1.14 Quimiometria.....	31
1.1.14.1 Análise de Componentes Principais (PCA).....	32
1.1.14.2 Mínimos Quadrados Parciais (PLS) .....	33
1.1.14.3 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).....	34
1.1.14.4 Cartas de Controle Multivariadas (MCC).....	36
1.1.15 Quimiometria associada a técnicas espectroscópicas....	37
1.1.16 Biodeterioração do Biodiesel.....	38
1.1.16.1 Armazenamento.....	38
2. Caracterização de Biodiesel de Gordura Animal, Óleo Vegetal, e Adulterante por Espectrometria no Infravermelho Combinada com Métodos Quimiométricos.....	45
2.1 Objetivos.....	45
2.2 Materiais e Métodos.....	45

2.2.1 Instrumentação.....	45
2.2.2 Amostras e Reagentes.....	45
2.2.3 Abordagens Quimiométricas.....	52
2.2.3.1 Cartas de Controle Multivariadas.....	52
2.2.3.2 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA).....	53
2.2.3.3 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	54
2.3 Resultados e Discussão.....	55
2.3.1 Grau de Conversão das Sínteses de Biodiesel.....	55
2.3.2 Espectros FTIR das Amostras Puras.....	56
2.3.3 Cartas de Controle Multivariadas (MCCs).....	57
2.3.4 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS- DA).....	60
2.3.5 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS).....	64
3. Efeito da Concentração de Inóculo na Produção de Biomassa, de Proteínas Totais e na Degradação de Biodiesel de Soja por <i>Aspergillus niger</i> .....	70
3.1 Objetivos.....	70
3.2 Materiais e Métodos.....	70
3.2.1 Primeira Etapa: Isolamento de Micro-organismos a partir de Biodiesel de Sebo, Banha e Soja Sintetizados.....	70
3.2.1.1 Síntese do Biodiesel.....	70
3.2.1.2 Esterilização e Inoculação das Amostras de Biodiesel.....	71
3.2.1.3 Isolamento de Micro-organismos.....	71
3.2.2 Segunda Etapa: Inoculação em Sistema Bifásico do <i>Aspergillus niger</i> em Diferentes Concentrações.....	71
3.2.2.1 Síntese do Biodiesel.....	71
3.2.2.2 Grau de Conversão da Síntese de Biodiesel.....	72
3.2.2.3 Esterilização.....	72
3.2.2.4 Fase Aquosa.....	72
3.2.2.5 Inoculação.....	72
3.2.3 Análise da Fase Aquosa.....	73
3.2.3.1 Produção de Biomassa.....	73

3.2.3.2 <i>Determinação de Proteínas Totais</i> .....	73
3.2.4 <i>Análise da Fase Oleosa</i> .....	73
3.2.4.1 <i>Análise por FTIR</i> .....	73
3.2.4.2 <i>Quantificação de Ésteres Metílicos de Biodiesel de Soja</i> .....	73
3.2.5 <i>Análise e Processamento dos Dados</i> .....	74
3.3 <i>Resultados e Discussão</i> .....	74
3.3.1 <i>Primeira Etapa</i> .....	74
3.3.1.1 <i>Identificação dos Fungos Filamentosos</i> .....	74
3.3.2 <i>Segunda Etapa</i> .....	76
3.3.2.1 <i>Grau de Conversão da Síntese de Biodiesel</i> .....	76
3.3.2.2 <i>Determinação de Biomassa</i> .....	76
3.3.2.3 <i>Proteínas Totais</i> .....	78
3.3.2.4 <i>Quantificação de Ésteres</i> .....	80
3.3.2.5 <i>Análises por Espectrometria no Infravermelho</i> .....	85
3.3.2.6 <i>Análise por Componentes Principais (PCA)</i> .....	87
4. <i>Predição de Produção de Biomassa de Fungos Filamentosos Cultivados em Biodiesel de Soja Empregando Espectrometria no Infravermelho Associada a Técnicas Quimiométricas</i> .....	90
4.1 <i>Objetivos</i> .....	90
4.2 <i>Materiais e Métodos</i> .....	90
4.2.1 <i>Síntese do Biodiesel</i> .....	90
4.2.2. <i>Grau de Conversão da Síntese de Biodiesel</i> .....	91
4.2.3. <i>Esterilização</i> .....	91
4.2.4. <i>Fase aquosa</i> .....	91
4.2.5 <i>Amostras, Padronização e inoculação</i> .....	91
4.2.6 <i>Determinação de Biomassa</i> .....	91
4.2.7 <i>Leitura do Micélio por Infravermelho</i> .....	92
4.2.8 <i>Análise de Dados e Quimiometria</i> .....	92
4.3 <i>Resultados e Discussão</i> .....	93
4.3.1 <i>Grau de Conversão da Síntese de Biodiesel</i> .....	93
4.3.2 <i>Leitura do Micélio por Infravermelho</i> .....	94
4.3.3 <i>Análise por Componentes Principais (PCA)</i> .....	97
4.3.4 <i>Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)</i> .....	100

5. Conclusões.....	105
6. Referências Bibliográficas.....	107
7. Anexos.....	130
Anexo A.....	130



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas reacionais envolvidas na reação transesterificação de triacilglicerídeos.....	22
Figura 2. Mecanismo de transesterificação homogênea catalisada por base.....	23
Figura 3. Mecanismo de transesterificação homogênea catalisada por ácidos.....	25
Figura 4. Parte do espectro eletromagnético região do infravermelho com outros tipos de radiação.....	28
Figura 5. Representação das (a) vibrações de estiramento; (b) deformações angulares.....	29
Figura 6. Esquema representativo de um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	30
Figura 7. Esquema representativo de um acessório de refletância total atenuada (ATR).....	31
Figura 8. Decomposição da matriz $\mathbf{X}$ de $m$ amostras com $n$ variáveis em um produto de outras duas matrizes, <i>scores</i> $\mathbf{T}$ (amostras) e <i>loadings</i> $\mathbf{P}$ (peso das variáveis), mais a matriz de resíduos $\mathbf{E}$ .....	33
Figura 9. Representação da divisão do espectro $\mathbf{r}$ nos vetores: $\mathbf{r}$ ( $\text{NAS}^\perp + \text{resíduo}$ ), $\mathbf{r}_K^*$ (vetor NAS), $\mathbf{r}_{\text{INT}}$ (vetor de interferência) e $\mathbf{r}_{\text{RES}}$ (vetor residual).....	37
Figura 10. Processo de hidrólise de um éster de ácido graxo, produzindo um ácido graxo e um álcool.....	40
Figura 11. Espectros NMR $^1\text{H}$ de biodiesel: (a) linhaça; (b) banha; (c) soja; (d) sebo.....	55
Figura 12. Espectros brutos de óleo de soja e biodiesel provenientes de diferentes matérias-primas.....	57
Figura 13. (a) Carta de controle - NAS, (b) de Interferentes e (c) de Resíduos. Amostras de calibração (o) e Amostras de validação (+), com base nos espectros de FTIR-ATR.....	60
Figura 14. À esquerda: Gráficos de escores em LV1 <i>versus</i> LV2 para os conjuntos de calibração e de predição dos modelos ATR/OSC-PLS-	

DA para os diferentes componentes das blendas de biodiesel de soja, linhaça, sebo, banha e adulterante óleo de soja. À direita: representação de valores de referência versus valores preditos dos respectivos modelos.....	63
Figura 15. <i>Loadings</i> para LV1 para os cinco modelos OSC-PLS-DA de classificação de misturas de biodiesel de soja, linhaça, sebo e banha e adulterante óleo de soja, com destaque para as regiões 1800-1500 cm <sup>-1</sup> e 1500-1150 cm <sup>-1</sup> .....	64
Figura 16. À esquerda: Gráficos de escores em LV1 <i>versus</i> LV2 para os conjuntos de calibração e de predição dos modelos ATR/OSC-PLS para os diferentes componentes das blendas de biodiesel de soja, linhaça, gordura bovina, gordura suína e adulterante óleo de soja. À direita: representação de valores de preditos versus valores de referência dos respectivos modelos e figuras de mérito.....	68
Figura 17. Gráfico peso seco em (mg) relacionado com os dias de cultivo do inóculo nas concentrações 10 <sup>4</sup> esporos.mL <sup>-1</sup> (preto) e 10 <sup>6</sup> esporos.mL <sup>-1</sup> (vermelho). * p<0,05 (Teste T de Tukey).....	77
Figura 18. Gráfico de proteínas totais (µg.mL <sup>-1</sup> ) nas duas concentrações testadas 10 <sup>4</sup> esporos.mL <sup>-1</sup> (preto) e 10 <sup>6</sup> esporos.mL <sup>-1</sup> (vermelho) durante 8 dias de cultivo. * p<0,05 (Teste T de Tukey).....	79
Figura 19. Quantificação de ésteres metílicos durante 8 dias de incubação de <i>Aspergillus niger</i> na concentração de 10 <sup>4</sup> esporos.mL <sup>-1</sup> .....	82
Figura 20. Quantificação de ésteres metílicos durante 8 dias de incubação de <i>Aspergillus niger</i> na concentração de 10 <sup>6</sup> esporos.mL <sup>-1</sup> .....	82
Figura 21. (a) Espectros médios, fase orgânica (10 <sup>4</sup> esporos.mL <sup>-1</sup> ; (b) Espectros médios, fase orgânica (10 <sup>6</sup> esporos.mL <sup>-1</sup> ).....	86
Figura 22. Destaque para a região espectral 1800-1600cm <sup>-1</sup> . (a) espectros médios, fase orgânica 10 <sup>4</sup> esporos.mL <sup>-1</sup> (b) espectros médios, fase orgânica 10 <sup>6</sup> esporos.mL <sup>-1</sup> .....	86
Figura 23. Ligações ésteres no biodiesel possivelmente hidrolisadas por lipases e/ou esterases (indicadas por setas).....	87

Figura 24. Análise por Componente Principais (PC1xPC2) do conjunto de espectros ATR-FTIR de fases orgânicas (biodiesel) de cultivo bifásico de <i>A. niger</i> (concentrações de inóculo de $10^4$ e $10^6$ esporos.mL <sup>-1</sup> ) coletadas diariamente entre 1 e 8 dias: a) Distribuição de escores; b) Pesos das três primeiras PCs.....	89
Figura 25. a) Conjunto total de espectros; b) Espectros médios (com atribuições das principais bandas) normalizados das amostras de biomassa fúngica cultivadas em meio sólido BDA em 24h e 48h. c) Conjunto total de espectros após transformação pela 1ª derivada; d) Conjunto total de espectros após transformação pela 2ª derivada.....	94
Figura 26. Gráficos de PC1xPC2 e respectivos pesos de PC1, PC2 e PC3 para o dois conjuntos de espectros ATR normalizados e centrados na média das amostras de biomassa fúngica cultivadas em meio sólido BDA em 24h e 48h: a) Gráfico dados originais; b) Gráfico de pesos dados originais; c) Gráfico de 1ª derivada; d) Gráfico de pesos 1ª derivada; e) Gráfico de 2ª derivada; d) Gráfico de pesos 2ª derivada.....	99
Figura 27. Análises realizadas por PLS: a) LV1 X LV2 para o conjunto de calibração e o conjunto de validação micélio de 24h; b) LV1 X LV2 para o conjunto de calibração e o conjunto de validação micélio de 48h; c) Gráfico de correlação entre o conjunto de calibração e o conjunto de predição do micélio de 24h; d) Gráfico de correlação entre o conjunto de calibração e o conjunto de predição do micélio de 48h; e) Gráfico de resíduos micélio de 24h; f) Gráfico de resíduos micélio de 48h; g) Vetor de regressão comparado ao espectro médio do micélio de 24h; h) Vetor de regressão comparado ao espectro médio do micélio de 48h.....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificações do biodiesel impostas pela ANP 45 <sup>71</sup> no Brasil.	13
Tabela 2. Artigos de revisão sobre a origem do biodiesel e o uso de adulterantes usando técnicas espectroscópicas e ferramentas quimiométricas.....	42
Tabela 3. Concentração de biodiesel nas amostras e conjunto de validação externa.....	47
Tabela 4. Figuras de mérito dos modelos OSC-PLS-DA de diferentes misturas de biodiesel produzido com diferentes matérias-primas, e o adulterante óleo de soja analisado por ATR FTIR.....	61
Tabela 5. Figuras de mérito dos modelos PLS de diferentes misturas de biodiesel produzido com diferentes matérias-primas, e o adulterante óleo de soja analisado por FTIR-ATR.....	65
Tabela 6. Identificação de fungos filamentosos isolados em biodiesel.....	75
Tabela 7. Quantificação de ésteres no cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em diferentes concentrações de inóculo.....	81
Tabela 8. Características da Análise por Componentes Principais aplicada sob diferentes transformações de variáveis ao conjunto de impressões digitais metabólicas de biomassa fúngica cultivada em 24 e 48h em meio sólido BDA.....	98
Tabela 9. Figuras de mérito dos modelos de micélio analisado em diferentes tempos por ATR-FTIR supervisionado pelo peso seco.....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS

*A. niger* - *Aspergillus niger*

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis

ATR–FTIR - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance*)

ATR - Reflectância Total Atenuada (do inglês *Attenuated Total Reflectance*)

BDA – Batata Dextrose Ágar

CC - Conjunto de Calibração

CC-NAS - Cartas de Controle com base no Sinal de Analito Líquido

CFPP - Ponto de Entupimento do Filtro a Frio (do inglês *Cold-filter plugging point*)

CNPE - Conselho Nacional de Política Energética

CP - Conjunto de Predição

CP - Ponto de névoa (do inglês *Cloud point*)

DPR - Desvio Padrão Relativo

FAME - Éster Metílico de Ácido Graxo (do inglês *Fatty Acid Methyl Ester*)

FTIR - Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

CG - Cromatografia em fase Gasosa

CG-MS - Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

HCA – Análise de Agrupamento por Métodos Hierárquicos (do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*)

KNN – K-ésimo Vizinho mais Próximo (do inglês *k-Nearest Neighbour*)

LOOCV- Validação Cruzada Deixando um de Fora (do inglês *Leave One Out Cross -Validation*)

MCCs - Cartas de Controle Multivariadas (do inglês *Multivariate Control Charts*)

MIC - Concentração Inibitória Mínima (do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*)

NAS - Sinal Analítico Líquido (do inglês *Net Analyte Signal*)

NIR - Infravermelho Próximo (do inglês *Near-infrared Spectroscopy*)

OPLS - Regressão por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais (do inglês *Partial Least Squares Orthogonal*)

OSC - Correção do Sinal Ortogonal (do inglês *Orthogonal Signal Correction*)

PCA - Análise por Componentes Principais (do inglês *Principal Component Analysis*)

PCR - Regressão por Componentes Principais (do inglês *Principal Component Regression*)

PC - Componentes Principais (do inglês *Principal Component*)

PLS - Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês *Partial Least Squares*)

PLS-DA – Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*)

PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel

PP - Ponto de Fluidez (do inglês *Pour Point*)

R<sup>2</sup> - Coeficiente de Determinação

R2A - Ágar-Heterotrof

RMN <sup>1</sup>H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMSE - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático (do inglês *Root Mean Square Error*)

RMSECV - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada (do inglês *Root Mean Square Error of Cross Validation*)

RMSEP- Erro Quadrático Médio de Previsão (do inglês *Root Mean Square Error of Prediction*)

R<sub>r</sub> - Coeficiente de Correlação entre Resíduos

SIMCA - Modelagem Independente Flexível por Analogias de Classe (do inglês *Soft Independent Modelling of Class Analogy*)

TDSP - Processo de Transesterificação em Duas Etapas (do inglês *Transesterification Double Step Process*)

TSA - do inglês *Tryptic Soy Agar*

VL - Variável Latente

## RESUMO

Os combustíveis fósseis são a matriz energética de maior utilização mundial, porém por questões econômicas, sociais e ambientais, é necessário buscar alternativas para complementar este consumo. O biodiesel apresenta-se como um combustível promissor, mas que ainda necessita de estudos para melhorar sua performance diante das necessidades do mercado. A avaliação da qualidade e suscetibilidade aos processos de micodeterioração no biodiesel, foi realizada em três estudos. O primeiro apresentou como objetivo identificar e quantificar matérias primas de origem animal e vegetal, e a presença do adulterante óleo de soja, em misturas de biodiesel puro (B100). Para tanto, utilizamos a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com acessório de reflectância total atenuada (ATR-FTIR), associada a ferramentas quimiométricas de classificação e quantificação. O conteúdo de biodiesel na mistura foi avaliado por cartas de controle multivariadas (MCCs). Os espectros de ATR-FTIR combinados com as MCCs foram capazes de identificar corretamente a maioria das informações de conteúdo de gordura animal na carta NAS, bem como a variação da matriz na carta de interferentes. Sobre o mesmo conjunto de dados foram aplicados os modelos supervisionados como a análise discriminante empregando mínimos quadrados parciais (PLS-DA), e de regressão multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS). Para os modelos PLS-DA, observou-se baixos erros de calibração e predição para a detecção dos diversos componentes das amostras, confirmando que esta ferramenta quimiométrica, se apresenta como um modelo robusto na classificação das matérias-primas e do adulterante utilizados neste estudo. Já o método de regressão PLS foi muito eficiente na identificação e quantificação de matérias-primas de origem animal, vegetal, e o adulterante óleo de soja, apresentando valores do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV), para todos os analitos testados, entre 0,019 % w/w e 0,103 % w/w, e do erro quadrático médio de predição (RMSEP) entre 0,009 % w/w e 0,105% w/w, com um coeficiente de correlação de 0,999. Estes resultados permitem concluir que a utilização destas ferramentas é viável para qualificar e quantificar as matérias-primas e o adulterante utilizados neste estudo. Em um segundo momento foi estudada a suscetibilidade do B100 produzido com óleo de soja, ao processo de biodeterioração, já que esta é uma

das vulnerabilidades do biocombustível durante o período de armazenamento. Foram comparadas duas concentrações de inóculo do isolado *Aspergillus niger*, com relação a produção de biomassa, proteínas totais, e degradação de ésteres. As amostras com 100 vezes mais esporos ( $10^6$  em relação a  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>) demonstraram produzir maior quantidade de biomassa durante os oito dias do experimento, podendo ser um fator agravante no processo de biodeterioração. Diferenças na concentração de inóculo para este fungo pouco influenciaram na produção de proteínas totais ao fim de 8 dias de cultivo em sistema bifásico, a despeito de uma maior produção pontual entre o sexto e o sétimo dias. A biodeterioração neste sistema ocorre preferencialmente por hidrólise da ligação éster podendo ser monitorado por ATR-FTIR e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-SM), da fase orgânica. Através destes resultados, podemos inferir que o fungo *A. niger* possui potencial deteriogênico, utilizando nutrientes do sistema bifásico para o seu crescimento, onde ocorreu a seguinte variação quantitativa decrescente de ésteres metílicos linoleato, oleato, palmitato e estearato. No terceiro estudo, os dados espectrais por ATR-FTIR de biomassa de fungos filamentosos anemófilos após 8 dias de cultivo em sistema bifásico, tendo biodiesel de soja como substrato em meio mineral, foi correlacionada pela análise de regressão PLS, com o micélio dos mesmos fungos cultivados em meio sólido batata dextrose por 24 e 48h. A utilização de ATR-FTIR, associada a análise por PLS, mostrou ser uma ferramenta robusta na predição de acúmulo de biomassa de 19 fungos testados, sendo que o cultivo por 24h mostrou ser o tempo necessário para correlacionar as características químicas do micélio com o filme de biomassa formado na interface entre a fase aquosa e o biodiesel. O bom desempenho deste método está associado principalmente à informações espectrais relativas a presença de componentes intracelulares como quitina, triacilgliceróis, fosfolípidos, ácidos graxos livres, aminoácidos e proteínas. Os três estudos utilizando ATR-FTIR associada a quimiometria, permitem inferir que este é um recurso analítico com grande potencial de aplicação tanto no controle de qualidade do biodiesel, como na avaliação de sua susceptibilidade à deterioração fúngica.

**Palavras-chave:** Biodiesel, Infravermelho, Quimiometria, Fungos, Micodeterioração.



## ABSTRACT

Fossil fuels are the most widely used energy matrix worldwide, but because of economic, social, and environmental issues, alternatives to this type of fuel are needed. Biodiesel is a thriving option; however, further studies on its performance should be conducted, considering the current market needs. Both quality and susceptibility to micodeterioration were assessed in three studies. The first study aimed to identify and quantify animal and vegetable feedstocks and the presence of soybean oil as adulterant in pure biodiesel (B100) blends. Therefore, Fourier transform infrared-attenuated total reflectance (FTIR-ATR) was used in conjunction with chemometric tools for the classification and quantification of the adulterant. Biodiesel content in the blend was evaluated by multivariate control charts (MCCs). FTIR-ATR spectra combined with MCCs could accurately identify most data on animal fat in the NAS chart, as well as matrix variability in the interference chart. Supervised models such as partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) and PLS regression were applied to the same dataset. PLS-DA models exhibited few calibration and prediction errors for the detection of several components, confirming that this chemometric tool is robust for the classification of the feedstocks and of the adulterant used in the present study. PLS regression was efficient in identifying and quantifying animal and vegetable feedstocks and soybean oil (adulterant), demonstrating root mean square errors of cross validation (RMSECV) values between 0.019 % w/w and 0.103 % w/w and root mean square error of prediction (RMSEP) values between 0.009 % w/w and 0.105% w/w for all analytes, with a correlation coefficient of 0.999. These findings point out that these tools can be used to qualify and quantify the feedstocks and adulterant used in this study. The second study assessed the susceptibility to biodeterioration of B100 produced with soybean oil, given that this is one of the vulnerabilities of biofuel during the storage period. Two concentrations of inoculum of an *Aspergillus niger* isolate were compared with biomass and total protein production and ester degradation. The samples with 100 times more spores ( $10^6$  vs.  $10^4$  spores.mL<sup>-1</sup>) produced a higher amount of biomass during the experiment (8 days), and this might accelerate biodeterioration. Differences in the concentration of inoculum for *Aspergillus niger* had little influence on the production of total proteins at the end of 8 days in the

dual-phase culture medium, despite higher production between day 6 and day 7. Biodeterioration in this system occurs preferably via hydrolysis of the ester bond and can be monitored by FTIR-ATR and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS), in the organic phase. Based on these findings, we can infer that fungus *A. niger* has detriogenic potential, using nutrients from the biphasic system for its growth, where the following decreasing quantitative variation of linoleate, oleate, palmitate and stearate methyl esters occurred. In the third study, the FTIR-ATR spectral data on the biomass of airborne filamentous fungi after 8 h of culture in a dual-phase medium, with soybean biodiesel used as substrate in a mineral medium, was correlated by PLS regression with the mycelium of the same fungi cultured on potato dextrose agar for 24 h and 48 h. The use of FTIR-ATR combined with PLS analysis proved to be a robust tool for the prediction of biomass accumulation of 19 tested fungi, indicating that culture for 24 h was enough for the correlation of the chemical characteristics of the mycelium with the biofilm formed at the interface between the aqueous phase and biodiesel. The good performance of this method is associated mainly with spectral data on the presence of intracellular components, such as chitin, triacylglycerols, phospholipids, free fatty acids, amino acids, and proteins. The three studies that used FTIR-ATR combined with chemometric tools allow inferring that this is an analytical alternative with a great potential for application in quality control of biodiesel and in the assessment of its susceptibility to fungal degradation.

**Key words:** Biodiesel, Infrared, Chemometrics, Fungi, Micodeterioration

## 1. INTRODUÇÃO

A dependência do combustível fóssil, como o diesel para a indústria e veículos, levou à busca de fontes alternativas de energia para substituir ou suplementar o combustível fóssil. Segundo projeções, a demanda global por energia deverá aumentar em torno de 50% até 2030. Assim, o biodiesel pode ser uma opção para reduzir as emissões e apoiar o setor de transportes, reduzindo a poluição ambiental<sup>1</sup>. De acordo com o Ministério de Minas e Energia do Brasil, a proposta do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE 16 de 29/10/2018) estabelece que a adição de biodiesel deve aumentar 1 ponto% ao ano, superando o nível atual de 13% (mistura B13) colocado em prática em 1º de março de 2021, com aumentos sucessivos até que uma mistura B15 seja alcançada em 2023<sup>2</sup>. Porém, por questões econômicas, alto custo do biodiesel, em abril de 2021 a mistura de biodiesel no diesel, foi reduzida provisoriamente de 13% para 10%<sup>3</sup>. Esta decisão foi tomada em função da forte demanda do mercado mundial pela soja, a qual no Brasil, responde por aproximadamente 71% (média em 2020) da matéria-prima utilizada na produção do biodiesel. Outras matérias-primas, como sebo e algodão também são usadas no Brasil, responsáveis por 12 e 2% da produção de biodiesel, respectivamente<sup>4</sup>. Sendo que atualmente, a maior parte do biodiesel produzido no mundo é de origem vegetal, e a soja corresponde a 27% da produção mundial.

O biodiesel é mais suscetível à degradação química e biológica a longo prazo do que o óleo diesel. Essa suscetibilidade está associada à sua composição química que varia consideravelmente dependendo da matéria-prima utilizada. Uma ampla variedade de matérias-primas de origem vegetal, animal e resíduos, é adequada para a produção de biodiesel. No entanto, a seleção da matéria-prima deve ser cuidadosa, considerando principalmente dois fatores: baixo custo e disponibilidade para produção em massa. Assim, a seleção de uma fonte barata é crucial para permitir a sua produção<sup>5</sup>. Neste sentido uma alternativa é a utilização de misturas de diferentes matérias-primas, que atendam aos requisitos mencionados, e ainda possam garantir características como maior estabilidade durante a estocagem que ainda é motivo de preocupação. O biodiesel obtido de matérias-primas, como a soja, por exemplo, na qual os ácidos graxos insaturados predominam, é considerada mais suscetível à degradação

química do que o biodiesel obtido a partir de sebo bovino, no qual predominam os ácidos graxos saturados. No entanto, outros fatores, como o processo de produção e as condições de armazenamento, também podem influenciar na degradação do combustível. Os processos degradativos mais comuns para o biodiesel estão relacionados umidade e exposição ao ar e ao calor. A ação do oxigênio promove a oxidação do biodiesel. A umidade do ar tende a induzir a incorporação de água, levando ao processo de degradação hidrolítica. A hidrólise do biodiesel altera seu aspecto físico e características químicas. Além disso, quando o teor de água aumenta, ela tende a se depositar no fundo dos tanques, favorecendo assim o crescimento microbiano. Quando isso acontece, surgem problemas como corrosão, entupimento de filtros e bicos injetores, além de outros danos nos motores de veículos. Portanto o crescimento microbiano representa uma ameaça às atividades operacionais.<sup>6</sup>

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica bastante usada para matrizes complexas como o biodiesel, e pode ser considerada uma técnica analítica verde, possibilitando análises de baixo custo<sup>7,8</sup>. Ela vem sendo usada em análises de produtos agrícolas<sup>9</sup>, drogas ilícitas<sup>10</sup>, combustíveis entre outros<sup>11,12</sup>. Além disso, as técnicas espectroscópicas têm sido associadas com análise multivariada para serem obtidos melhores resultados qualitativos e quantitativos, bem como para facilitar a interpretação dos resultados e avaliar informações que, de outra forma, não seriam evidentes.

## **1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1.1 História do Biodiesel**

Rudolf Diesel inventou o motor diesel na década de 1890. Desde o início, esse motor poderia funcionar com uma variedade de combustíveis, incluindo óleo vegetal. Em 1900, um dos novos motores diesel apresentados na Exposição de Paris eram movidos a óleo de amendoim. No entanto, como os combustíveis de petróleo eram baratos e facilmente disponíveis, poucas pessoas estavam interessadas em conhecer outras alternativas<sup>13</sup>. Já na década de 1930, havia interesse em separar os ácidos graxos da glicerina do óleo vegetal para

criar um produto mais fino, semelhante ao diesel de petróleo. Em 1937, G. Chavanne obteve a patente belga de um éster etílico de óleo de palma (que hoje chamaríamos de biodiesel). Em 1938, um ônibus de passageiros movido a éster etílico de óleo de palma fazia a rota entre Bruxelas e Louvain<sup>14</sup>. Durante a Segunda Guerra Mundial (1939 a 1945), quando o fornecimento de petróleo foi interrompido, o óleo vegetal foi usado como combustível por vários países, incluindo Brasil, Argentina, China, Índia e Japão. No entanto, quando a guerra terminou e os suprimentos de petróleo tornaram-se baratos e abundantes, o óleo vegetal foi esquecido novamente. Então, no começo da década de 1970, as nações produtoras começaram a regular o escoamento da produção petrolífera por conta de sua natureza não renovável. Em 1973, o valor do barril mais que triplicou em um curto período de tempo, isso fez com que muitos países considerassem o óleo vegetal como um possível substituto aos combustíveis fósseis. Cientistas na Áustria, nos Estados Unidos, na África do Sul e em muitos outros países redescobriram que o óleo vegetal puro poderia ser usado para fazer funcionar motores a diesel; entretanto, eventualmente, a má qualidade do combustível causada pela espessura (viscosidade) do óleo vegetal causou danos aos motores. Neste momento foram realizados os primeiros experimentos para converter o óleo vegetal em biodiesel. A palavra “biodiesel” foi provavelmente usada pela primeira vez por volta de 1984<sup>15</sup>.

No Brasil, as pesquisas sobre o biodiesel iniciaram na década de 1920 no Instituto Nacional de Tecnologia (INT). Nos anos 1970, começava a ganhar destaque com a criação do Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Energéticos (Pró-Óleo), após o choque dos preços de petróleo. No entanto, o sucesso inicial do Pró-Álcool e a queda do preço do petróleo nos anos 1980 deixaram o Pró-Óleo em segundo plano na política energética<sup>16</sup>. Apenas em 2004 o governo brasileiro voltou sua atenção ao biodiesel, com a elaboração do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), cujo objetivo é a inserção do biodiesel da matriz energética brasileira a partir da produção de matérias-primas pela agricultura familiar. Atualmente o biodiesel está sendo usado em todo o mundo, devido principalmente a preocupações com o aquecimento global. E o seu futuro está na capacidade mundial de produção de matérias-primas renováveis, a fim de manter o custo do biodiesel competitivo

com o do petróleo e na capacidade de resolver os problemas de estabilidade e qualidade do produto pronto.

O custo de produção ainda é uma das barreiras para o uso extensivo de biodiesel em maiores proporções como matriz energética<sup>17,18</sup>

### **1.1.2 Biodiesel**

O biodiesel é um combustível alternativo, que veio a complementar o uso de óleo diesel, podendo ser obtido através de matérias primas de primeira, segunda e terceira geração<sup>19</sup>. É biodegradável, menos tóxico isento de enxofre e compostos aromáticos, emite menos poluentes atmosféricos e gases de efeito estufa, exceto óxido de nitrogênio, o que o torna mais vantajoso do que combustíveis derivados de petróleo. Porém a redução no custo de produção ainda é um desafio<sup>20</sup>.

A respeito disso, várias possibilidades estão sendo estudadas para torná-lo um combustível mais competitivo. Dentre algumas alternativas, está se utilizando catalisadores mais baratos<sup>17,21</sup>, bem como uma reação de transesterificação mais rápida<sup>22,23</sup>. Porém o que mais impacta no custo de produção, é a matéria-prima<sup>24,25</sup>. As matérias-primas mais baratas são óleos usados ou gorduras, e oleaginosas não comestíveis, que geralmente estão associadas a ácidos graxos livres, e presença de água<sup>26,27</sup>. Estas características podem prejudicar o rendimento e a qualidade do biodiesel. Uma opção, é corrigir estes problemas, adicionando etapas ao processo de produção, o que por sua vez incorrem em mais custos.

### **1.1.3 RenovaBio**

Recentemente, o governo brasileiro lançou o Programa RenovaBio Resolução ANP nº 791<sup>28</sup>, cujo objetivo é expandir a produção de biocombustíveis no Brasil. A partir desta expansão, almeja-se um importante papel aos biocombustíveis, no sentido de contribuir para a mitigação efetiva de emissões de gases causadores do efeito estufa e de poluentes no país, além de buscar um canal de diálogo mais próximo com o setor privado. O RenovaBio está alicerçado em três eixos estratégicos: discutir o papel dos biocombustíveis na

matriz energética; ampliar a sua participação no segmento de transportes, baseado na previsibilidade e na sustentabilidade econômica, ambiental e social; e estabelecer regras de comercialização<sup>28</sup>.

#### **1.1.4 Matérias-primas**

A Europa é o principal produtor mundial de biodiesel em função da sua política ambiental. Diversas matérias-primas podem ser empregadas na produção de biodiesel, porém na produção mundial são predominantemente utilizados óleos vegetais como: soja, colza e óleo de palma. Nos Estados Unidos a principal matéria-prima utilizada é o óleo de soja, com 63% de participação no biodiesel total, seguida do óleo de canola e óleo de milho com 13% cada, dados de 2020<sup>29</sup>. No Canadá o óleo de canola domina a produção. O óleo de colza ainda é a matéria-prima de biodiesel dominante na União Européia, representando 38% em 2020. O óleo de colza usado foi a segunda matéria-prima mais importante neste período, representando 23% do total. E o óleo de palma foi o terceiro mais usado, na Espanha, Itália, França e Holanda, representando 18%<sup>30</sup>. Os óleos de coco e palma são usados na Indonésia e na Malásia, e óleo de colza usado na Itália, Alemanha, Finlândia e Reino Unido. Sendo a karanja e a jatropha consideradas as futuras matérias-primas para biodiesel na Índia. No Brasil a soja é responsável por mais de 70% da produção, seguida pelo sebo 12% e o algodão 2%<sup>4</sup>. A utilização de óleos comestíveis como matéria-prima de biodiesel têm grandes problemas, porque isso afeta diretamente a economia.

O biodiesel pode ser obtido a partir de diferentes matérias-primas, como óleos vegetais, microalgas, óleo microbiano e gorduras animais. Isto representa um produto final com diferente grau de pureza e composição, influenciando também no rendimento e custo do biodiesel<sup>31</sup>. A seleção de matérias-primas para produção está diretamente relacionada com a região, disponibilidade, e os aspectos econômicos do país.

A partir de várias pesquisas, concluiu-se que a utilização de óleo não comestível apresenta benefícios, como ser biodegradável, apresentar baixo teor de enxofre, aromáticos e o principal não ter efeito na cadeia alimentar, no que se refere as consequências econômicas sobre o abastecimento de alimentos e

insumos. Existem certas matérias-primas crescentes para a produção de biodiesel como gorduras de origem animal (sebo, banha), óleo de peixe e microalgas, óleo de fritura usado, dentre outras. Desta forma elas foram categorizadas em quatro grupos, primeira, segunda, terceira e quarta geração<sup>32</sup>.

#### *1.1.4.1 Matérias-primas de Primeira Geração*

A primeira geração refere-se ao biodiesel derivado de óleos vegetais comestíveis. Os mais comumente utilizados são óleo de colza, palma, soja, coco, amendoim e girassol, além de linhaça, amendoim, mostarda, arroz, etc. Os óleos vegetais são amplamente disponíveis e relativamente mais fáceis de converter em biodiesel. No entanto, o uso de óleos vegetais comestíveis para a produção de biocombustíveis levanta várias questões éticas, ambientais e econômicas. O uso de terras aráveis, água e fertilizantes no "crescimento do combustível" ao invés de alimentos, não afeta apenas o preço dos alimentos mas também as questões de sustentabilidade<sup>33</sup>.

Além disso, mesmo que a quantidade total de óleos comestíveis disponíveis fosse usada na produção de biodiesel, não seria suficiente para atender às necessidades atuais. Essas preocupações levam a uma crescente busca por outras opções, como a utilização de óleos não comestíveis, resíduos, e fontes renováveis como matéria-prima para produção de biodiesel

No início da era do biodiesel, o uso de matéria-prima comestível foi bastante popular. Disponibilidade de safras, e procedimento de conversão fácil são os principais benefícios da primeira geração. O risco de limitação no fornecimento de alimentos é a principal desvantagem no uso dessas matérias-primas<sup>34</sup>. Adaptabilidade às condições ambientais, alto custo e área limitada de cultivo também são obstáculos para a produção de biodiesel de matéria-prima comestível. Essas desvantagens, levaram os produtores a buscarem fontes alternativas.<sup>35</sup> A seguir seguem as matérias-primas de primeira geração de maior destaque.



#### *1.1.4.1.1 Óleo de Palma*

Nas últimas décadas, Malásia e Indonésia foram os principais produtores de óleo de palma. Nigéria e Brasil têm alto potencial para a produção. Na Europa, a demanda de biodiesel produzido com óleo de palma tem aumentado. Os principais benefícios do óleo de palma são rendimentos muito elevados por hectare, quando comparados a outros óleos comestíveis. O óleo de palma contém majoritariamente em sua composição ácido palmítico (37-45%), ácido oléico (38-46%), e linolêico (5-9%)<sup>36</sup>.

#### *1.1.4.1.2 Óleo de Soja*

A soja é a principal oleaginosa cultivada globalmente. No Brasil e nos Estados Unidos é a matéria-prima mais utilizada na produção de biodiesel. Em comparação com outras matérias-primas, a soja tem menor rendimento de óleo por hectare, porém sua produção é abundante<sup>36,37</sup>. O óleo de soja contém em sua composição ácido linolêico (50–60%), ácido oléico (20–30%), ácido palmítico (6–10%), e ácido linolênico (5-11%)<sup>38</sup>.

#### *1.1.4.1.3 Óleo de Algodão*

Os maiores produtores mundiais de óleo de algodão, são Europa, China e Estados Unidos<sup>39</sup>. As sementes de algodão possuem óleo na proporção de 17–25%. Os principais ácidos graxos são o oléico (19 -23%), palmítico (11-20%), e ácido linoléico (55%)<sup>40</sup>.

#### *1.1.4.1.4 Linhaça*

É uma cultura do tipo herbácea. Os principais países produtores de linhaça são Argentina, Índia, Europa e Canadá. A linhaça é composta por grande percentual de ácidos graxos insaturados, como ácido linolênico (46 -51%), ácido oleico (20 -24%) e ácido linoléico (13 -14%). E uma pequena parte de ácidos graxos saturados, ácido palmítico (5 -6 %) e ácido esteárico (5%)<sup>41,42</sup>.

#### 1.1.4.2 Matérias-primas de Segunda Geração

Biodiesel de segunda geração é produzido a partir de matérias-primas não comestíveis, como os óleos de neem, *Jatropha curcas*, *Karanja*<sup>43</sup>, óleo de semente de seringueira<sup>44</sup>, tabaco<sup>43</sup>, dentre outros<sup>45</sup>. Estas matérias-primas tem como principais vantagens, em sua maioria possuem menor custo de produção, erradicam a competitividade alimentar, utilizam uma quantidade menor de terras para serem cultivadas, oferecendo assim benefícios para a produção de biodiesel. Como desvantagem, em geral produzem uma quantidade menor de óleo do que as comestíveis.

##### 1.1.4.2.1 *Karanja*

A *karanja* pertence à família das leguminosas. Os principais países produtores, são o sudeste da Ásia, Austrália, China e Estados Unidos. O óleo de *Karanja* contém ácido esteárico (2 - 9%), ácido linoléico (10 -18%) e ácido oleico (44 -71 %) <sup>46,47</sup>.

##### 1.1.4.2.2 *Jatropha*

A *Jatropha* é cultivada na Índia, China, Etiópia, Moçambique, Gâna, México e Brasil<sup>48</sup>. Na Índia a *Jatropha* é uma das mais importantes matérias-primas para a produção de biodiesel. A semente da *Jatropha* tem aproximadamente 47% de óleo<sup>49</sup>. A composição do óleo, é principalmente de ácidos graxos insaturados, como o ácido oléico (34-35%) e ácido linoléico (29-44%), e ácidos graxos saturados, como ácido palmítico (14-15%)<sup>50,51</sup>.

Dentre as matérias-primas de segunda geração, a *Jatropha* (*Jatropha curcas*) não é a única cultura oleaginosa não comestível proeminente. Outras culturas como polanga (*Calophyllum inophyllum*) e neem (*Azadirachta indica*) também foram consideradas promissoras como matérias-primas alternativas de biodiesel<sup>52</sup>. O óleo da semente de seringueira (*Hevea brasiliensis*)<sup>53</sup> e o mahua (*Madhuca indica*) também apresentam potencial e precisam ser explorados como matéria-prima do biodiesel<sup>52</sup>.

#### *1.1.4.3 Matérias-primas de Terceira Geração*

As principais fontes de biodiesel de terceira geração são as gorduras de origem animal, e óleos residuais, e com futuro promissor, o óleo extraído de microalgas<sup>54,55</sup>. Atualmente, as pesquisas para produção de biodiesel a partir de biomassa de microalgas está voltada para o aumento nas taxas de produção de óleo, e também no aprimoramento do processo de extração. Alguns benefícios do biodiesel da terceira geração são baixo custo, gorduras de origem animal e óleos residuais, e facilidade de obtenção. Sendo bastante viáveis, pois em sua maioria apresentam dificuldades para destinação final, e quando não descartadas de forma adequada, acabam se tornando um sério problema ambiental. A seguir seguem as matérias-primas de terceira geração de maior destaque.

##### *1.1.4.3.1 Gordura de Origem Animal*

O biodiesel de gordura animal pode ser obtido de gado, porco, peixe, e frango. No momento, estas matérias-primas são utilizadas para a produção de biodiesel, principalmente porque tem baixo preço no varejo, e sua utilização para alimentação humana não é recomendada. Podem ser obtidas como sub-produto em frigoríficos/abatedouros de aves, porém o volume não atende a necessidade como única fonte para a produção de biodiesel. São ricas em ácidos graxos saturados, o que melhora algumas propriedades do biodiesel, como maior número de cetano<sup>32</sup>, e valor calorífico quando comparado aos óleos vegetais, porém apresentam maior ponto de entupimento do filtro a frio<sup>56</sup>. O uso destas matérias-primas, traz benefícios ao meio ambiente, pelo destino nobre que é dado a este subproduto da agroindústria.

##### *1.1.4.3.2 Óleo Residual*

A utilização de óleo residual na produção de biodiesel, é um destino ecologicamente correto para um material que teria que ser descartado. Geralmente os óleos usados são baratos<sup>57</sup>. Os óleos usados podem ser classificados em três categorias: óleo usado da indústria alimentícia, indústria

não alimentícia, doméstico, e de restaurante. A presença de resíduos, ácidos graxos livres, e água, exige etapas adicionais no processo de produção do biodiesel com óleo de fritura usado. Resíduos de óleos da indústria como resíduos de óleo de plástico, de pneus, dentre outros, podem ser utilizados para produzir biodiesel através do processo de pirólise<sup>58</sup>.

#### *1.1.4.3.3 Microalgas*

As microalgas são organismos do reino protista que possuem células com possibilidade de gerar grandes quantidades de lipídios que são adequados para a produção de biodiesel<sup>59</sup>. No entanto, a utilização de biomassa de microalgas para produção de biodiesel requer tecnologia avançada para a extração do óleo, e remoção do açúcar fermentável de sua biomassa<sup>60</sup>.

#### *1.1.4.4 Matérias-primas de Quarta Geração*

Combustíveis fotobiológicos, solares e eletrocombustíveis são considerados a quarta geração de biodieseis. São baseados em tecnologias de biologia sintética. No futuro, espera-se que tais biocombustíveis solares sejam produzidos por microrganismos fotossintéticos modificados ou em fábricas vivas completamente sintéticas<sup>61</sup>.

Cada geração de o biodiesel tem seus próprios benefícios e limitações. A evolução nas gerações tem focado principalmente na melhoria da qualidade do biodiesel, menor suscetibilidade a deterioração, e menos danos ao meio ambiente. A primeira geração de biodiesel produzido a partir de óleos comestíveis, apresenta o processo de conversão mais fácil. Porém o rendimento do óleo produzido por estas matérias-primas é baixo. E por serem originárias de óleos comestíveis promovem uma competição entre alimento e combustível, não sendo adequado para uso comercial. Neste contexto as matérias-primas de segunda e terceira gerações de biodiesel fornecem uma solução alternativa. A segunda geração de biodieseis é produzida a partir de óleos vegetais não comestíveis, enquanto a terceira geração de biodieseis é produzida a partir de resíduos de óleo, gorduras, ou óleo de algas. As matérias-primas dessas duas

gerações podem ser cultivadas em terras não aráveis, tornando-se uma alternativa promissora na produção de biodiesel. A quarta geração de biodiesel usa tecnologia de biologia sintética, uma nova alternativa para o futuro, na produção de biodiesel.

### **1.1.5 Produção de Biodiesel de Gordura Animal versus Óleo Vegetal**

As características das gorduras e óleos vegetais dependem do comprimento e do grau de insaturação dos ésteres de ácidos graxos. Assim, os ácidos graxos desempenham um papel importante na determinação das características do biodiesel. A quantidade de cada ácido graxo, o comprimento da cadeia e o número de ligações duplas presentes na cadeia de hidrocarbonetos influenciam as propriedades do biodiesel. A estabilidade do biodiesel também depende das propriedades da matéria-prima usada para a produção de biodiesel. Os ácidos graxos mais abundantes nas amostras de óleo não comestível, são o oleico, linoléico, linolênico, palmítico e esteárico. O ácido oleico compreende a maior parte dos ácidos graxos totais, independentemente do óleo não comestível. Todos os óleos vegetais têm ácidos graxos insaturados elevados (até 80%), o que significa que eles têm boas propriedades em baixa temperatura e são adequados como matéria-prima para produção de biodiesel. Concentrações mais altas de ácidos graxos saturados podem aumentar o ponto de névoa, e ponto de entupimento a frio, propriedades indesejáveis para combustíveis líquidos<sup>62</sup>. No entanto os óleos com maior proporção de ácidos graxos saturados, tendem a ser mais estáveis do que aqueles com maior porção de ácidos graxos insaturados na produção de biodiesel. Em termos de emissão de gases poluentes, o óleo diesel quando comparado ao biodiesel produzido de gorduras animais ou obtidas de óleos vegetais são semelhantes, uma vez que as emissões de gases oriundas do processo de combustão, geram resultados semelhantes. No entanto, um estudo com três misturas de biodiesel B20 à base de gorduras animais obtido a partir de banha de porco, sebo bovino e gordura de frango apresentaram níveis de emissão de óxido de nitrogênio (NOx) menores do que uma mistura B20 produzida a partir de óleo de soja<sup>63</sup>.

O biodiesel produzido a partir de gordura animal, apresenta algumas vantagens quando comparado ao óleo vegetal. Devido ao seu menor teor de

ácidos graxos insaturados, o biodiesel produzido a partir de gorduras animais tem um número de cetano maior do que o biodiesel da maioria dos óleos vegetais, e do que o óleo diesel<sup>63,64</sup>, devido a cadeias maiores de ácidos graxos, e maior grau de saturação. Um maior número de cetano reduz as emissões de NOx. Biocombustíveis produzidos com gorduras animais também têm um maior valor calórico quando comparado aos óleos vegetais<sup>56</sup>. Uma questão não consensual é a estabilidade oxidativa de biodiesel de origem animal. Alguns autores afirmam que o biodiesel à base de gordura animal é menos estável para oxidação devido à ausência de antioxidantes naturais em comparação ao biodiesel de óleo vegetal<sup>65,66</sup>. Por outro lado, outros estudos afirmam que a partir do teor de ácidos graxos saturados, a adição de gordura animal melhora a estabilidade oxidativa do biocombustível<sup>56,67,68</sup>. Matérias-primas ricas em ácidos graxos poliinsaturados são mais suscetíveis à oxidação, devido à presença de ligações duplas nas cadeias, do que matérias-primas ricas em ácidos graxos saturados ou monoinsaturados<sup>69</sup>.

Uma mistura de biodiesel de soja/sebo bovino, foi comparada ao biodiesel de soja puro, em relação a degradação oxidativa, neste estudo a mistura de soja e sebo, apresentou o melhor resultado<sup>68</sup>. Wyatt *et al.*<sup>63</sup> relataram que a estabilidade oxidativa do biocombustível de banha, sebo bovino e gordura de frango é equivalente ou melhor do que o biodiesel de soja. No entanto, em outro estudo Sendzikiene *et al.*<sup>70</sup> demonstrou que o biocombustíveis de origem animal, como banha e sebo são menos estáveis para oxidação do que os produzidos com óleo de colza e linhaça. Biocombustíveis produzidos a partir de gorduras também têm algumas desvantagens, como o maior ponto de entupimento a frio (CFPP) devido ao seu conteúdo significativo de ácidos graxos saturados<sup>65,66</sup>. O CFPP se refere à temperatura mais baixa na qual um determinado volume de combustível líquido ainda fluirá através de um filtro específico em um tempo especificado quando resfriado sob certas condições<sup>71</sup>. Esta é uma propriedade importante para países com baixa temperatura.

O custo de produção do biodiesel é alto quando comparado ao óleo diesel, o que também dificulta o seu uso em escala comercial. O atual taxa de produção de biodiesel de diferentes gerações não atende a demanda mundial de combustível líquido, bem como suas propriedades quando analisadas de forma individual, por matéria-prima, ou geração, não apresentam o melhor

desempenho<sup>32</sup>. Esses são fatores que demonstram a importância de misturas de diferentes matérias-primas, na busca do melhor desempenho do biocombustível nos motores, além do incentivo para a maior produção principalmente de matérias-primas de segunda geração, e aproveitamento das fontes de terceira geração, o que trará benefícios econômicos e ambientais para produtores e consumidores.

### 1.1.6 Características Físicas e Químicas do Biodiesel

A Resolução ANP Nº 45<sup>72</sup> é utilizada para estabelecer parâmetros de qualidade, e limite de contaminantes ao biodiesel, independente da matéria-prima de sua origem. Além de garantir o desempenho nos motores, e a segurança em todo o processo de manejo desde a produção até o usuário final.

Tabela 1. Especificações do biodiesel impostas pela ANP 45<sup>72</sup> no Brasil.

<b>Característica</b>	<b>Especificação</b>	<b>Limite</b>	<b>Unidade</b>
	Aspecto	Límpido e isento de impurezas	adimensional
	Massa específica a 20° C	850 a 900	kg m <sup>-3</sup>
	Viscosidade cinemática a 40°C	3,0 a 6,0	mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
	Ponto de fulgor	mín.100,0	°C
	Cinzas sulfatadas	máx. 0,020	% massa
	Corrosividade ao cobre, 3h a 50°C	máx. 1	adimensional
	Número cetano	Anotar	adimensional

<b>Propriedades</b>	Ponto de entupimento a frio	máx. 5 a 19 (depende do estado do Brasil e do mês)	°C
	Índice de acidez	máx. 0,50	mg KOH g <sup>-1</sup>
	Índice de lodo	Anotar	g (100 g) <sup>-1</sup>
	Estabilidade à oxidação a 110°C	mín. 12 *	h
<b>Concentrações</b>	Teor de água	máx. 200,0	mg kg <sup>-1</sup>
	Contaminação total	máx. 24	mg kg <sup>-1</sup>
	Teor de éster	mín. 96,5	% massa
	Enxofre total	máx. 10	mg kg <sup>-1</sup>
	Sódio + Potássio	máx. 5	mg kg <sup>-1</sup>
	Cálcio + Magnésio	máx. 5	mg kg <sup>-1</sup>
	Fósforo	máx. 10	mg kg <sup>-1</sup>
	Glicerol livre	máx. 0,02	% massa
	Glicerol total	máx. 0,25	% massa
	Monoacilglicerol	máx. 0,7	% massa
	Diacilglicerol	máx. 0,20	% massa
	Triacilglicerol	máx. 0,20	% massa
	Metanol e/ou Etanol	máx. 0,20	% massa

\* ANP 798/2019<sup>73</sup>



As propriedades físico-químicas do biodiesel estão diretamente relacionadas com as matérias-primas utilizadas em sua produção. Existe uma tendência na utilização de blends de matérias-primas de primeira e segunda geração, o que exige um maior controle de qualidade do produto final. Alguns dos parâmetros que são mais suscetíveis a variações quando utiliza-se misturas de matérias-primas são comentados a seguir.

### **1.1.7 Propriedades do Biodiesel Inerentes às Estruturas Moleculares**

#### *1.1.7.1 Massa Específica*

A massa específica é uma propriedade determinada pela estrutura química dos compostos que constituem o biodiesel. Ela está diretamente relacionada ao tamanho da cadeia carbônica e ao número de insaturações, os quais influenciam diretamente na densidade. Quanto maior o comprimento da cadeia carbônica do alquil éster, maior será a densidade; entretanto, este parâmetro diminuirá quanto maior for o número de insaturações presentes na molécula. Além disso, impurezas e aditivos também podem influenciar na massa específica<sup>74</sup>.

#### *1.1.7.2 Viscosidade Cinemática*

A viscosidade também está diretamente relacionada às estruturas moleculares e é uma propriedade fluidodinâmica, que expressa a resistência oferecida pelo fluido ao fluxo. A viscosidade cinemática do biodiesel aumenta com o comprimento da cadeia e é fortemente influenciada pela natureza e pelo número de ligações duplas. Além disso, aumenta acentuadamente com a polimerização<sup>75</sup>. A alta viscosidade gera heterogeneidade na combustão do biodiesel, ocasionando a deposição de resíduos no motor<sup>74</sup>.

#### *1.1.7.3 Índice de Iodo*

É um indicador da quantidade de iodo absorvida pelas duplas ligações de moléculas de metil ésteres de ácidos graxos, em 100g de combustível. É

utilizado para avaliar o grau de insaturação, e a tendência de oxidação do combustível quando estiver em contato com o ar. O índice de iodo é usado para garantir estabilidade oxidativa aceitável ao biodiesel<sup>32</sup>.

Alguns fatores que influenciam o índice de iodo são as condições de armazenamento, e a idade do biodiesel ou do óleo vegetal utilizado como matéria-prima, especialmente se a amostra sofreu processos de oxidação<sup>76,77</sup>. Com a degradação do biocombustível, espera-se que haja uma diminuição no número de insaturações.

#### *1.1.7.4 Ponto de Fulgor*

O ponto de fulgor é a temperatura mínima onde é observada a liberação de vapores de um líquido, em quantidade suficiente para formar uma mistura inflamável com o ar. Para o biodiesel, os valores de ponto de fulgor são, consideravelmente, mais elevados que os valores encontrados para o diesel mineral. Este comportamento torna o ponto de fulgor um parâmetro muito importante quanto à segurança no armazenamento e no transporte, principalmente quando a transesterificação foi realizada com metanol que, além de altamente inflamável, apresenta elevada toxidez<sup>74</sup>. A principal razão para avaliar o ponto de fulgor é certificar-se de que o biocombustível produzido foi adequadamente purificado, removendo o produtos voláteis indesejados, e principalmente o excedente de metanol residual<sup>32</sup>.

#### *1.1.7.5 Número de Cetano*

O número de cetanos é indicativo do tempo de atraso na ignição de combustíveis para motores do ciclo diesel, logo, reflete a qualidade da ignição do combustível. Quanto maior o número de cetanos mais curto será o tempo de ignição<sup>78</sup>.

O número de cetanos diminuem com o aumento da insaturação e aumentam com o aumento comprimento da cadeia, isto é, porções CH<sub>2</sub> ininterruptas. Assim, uma cadeia longa e reta é suficiente para conferir um alto índice de cetano, mesmo se a outra porção for ramificada<sup>78</sup>. O biodiesel tem número de cetano

mais alto, pois contém mais oxigênio e, portanto, melhor eficiência de combustão<sup>79</sup>.

#### *1.1.7.6 Ponto de Entupimento a Frio, Ponto de Névoa e Ponto de Fluidez*

O desempenho do biocombustível em baixas temperaturas é um fator importante a ser considerado pelos usuários de regiões de clima frio, principalmente porque pode levar ao entupimento do filtros, e ao baixo desempenho do motor, devido ao fluxo reduzido de combustível.

A baixa temperatura, o biodiesel tende a solidificar-se parcialmente ou a perder sua fluidez, levando à interrupção do fluxo do combustível e entupimento do sistema de filtração, ocasionando problemas na partida do motor<sup>80</sup>. Três ensaios de laboratório foram desenvolvidos para monitorar este comportamento: ponto de névoa (CP), que é a temperatura do combustível em um processo de resfriamento, onde se observa formação dos primeiros cristais (método ASTM D2500); ponto de entupimento de filtro a frio, que é a temperatura em que o combustível perde a filtrabilidade quando resfriado (método EN ISO 116/método similar americano: LTFT - *low temperature flow test* - ASTM D 4539); ponto de fluidez (PP), que é a temperatura em que o combustível perde sua fluidez quando sujeito a resfriamento sob determinadas condições de teste (método EN ISO 3016). Quanto maior for o tamanho da cadeia e/ou o caráter saturado das moléculas do biodiesel, mais alto serão os valores destes parâmetros. O biodiesel produzido a partir de gordura animal apresenta valores mais elevados para estes parâmetros, quando comparado ao biodiesel proveniente de gordura vegetal, devido ao seu alto teor de ácidos graxos saturados<sup>74</sup>.

#### **1.1.8 Propriedades para o Monitoramento da Qualidade do Biodiesel durante o Processo de Estocagem**

Os procedimentos de estocagem e transporte do biodiesel (B100) devem levar em conta suas características de elevada reatividade ao contato com o ar, e de alta higroscopicidade (capacidade de absorver água).

#### *1.1.8.1 Índice de Acidez*

O índice de acidez quantifica, de certo modo, os produtos ácidos formados nas reações de degradação do óleo, gordura, ou do biodiesel e é expresso em miligramas de KOH por grama de amostra<sup>74</sup>. A determinação deste parâmetro ao longo do armazenamento é importante para monitorar a ocorrência de reações de degradação, já que estas formam diferentes tipos de ácidos, cetonas, sedimentos insolúveis e outros compostos que comprometem a qualidade do biocombustível<sup>81</sup>.

#### *1.1.8.2 Estabilidade Oxidativa*

A estabilidade oxidativa é um dos principais problemas para o armazenamento de combustível. Geralmente, a oxidação de combustíveis ocorre durante o armazenamento em condições aeróbias. A estabilidade oxidativa está relacionada ao número de ligações duplas na estrutura dos ácidos graxos da matéria-prima<sup>82,83</sup>, o que torna o biodiesel suscetível à degradação em presença de oxigênio<sup>84</sup>. Outros fatores também podem influenciar a estabilidade oxidativa como índice de acidez, índice de peróxido, calor, luz, metal presente no tanque de armazenamento, e também o contato com o ar dentro do tanque<sup>85</sup>. O uso de antioxidantes é uma forma de melhorar a estabilidade oxidativa.

#### *1.1.8.3 Teor de Água*

Um dos indicadores de pureza do biodiesel, é a presença de água. O poder calorífico do biodiesel diminui com a presença de água no combustível, e também traz como consequência a corrosão do motor<sup>86</sup>. O teor de água além de promover a hidrólise do biodiesel resultando em ácidos graxos livres pode influenciar a proliferação de microrganismos, afetando a qualidade, levando a corrosão em tanques de estocagem com deposição de sedimentos<sup>85</sup>. Como o biodiesel apresenta alto grau de hidroscopticidade, o teor de água deverá ser monitorado durante todo o tempo de armazenamento.

### 1.1.9 Estabilidade do Biodiesel

Existem muitos fatores que podem influenciar a estabilidade do biodiesel. Dentre eles a exposição a luz, a variação de temperatura e exposição a íons metálicos, sua natureza higroscópica, e sua suscetibilidade a reações de oxidação. A degradação do biodiesel também tem forte influência na corrosão de metais, em tanques de armazenamento. A presença de água e a exposição ao oxigênio, favorecem a reação de oxidação. Os ésteres de ácidos graxos insaturados são mais suscetíveis à oxidação. Quando o biodiesel é exposto ao oxigênio, este se liga ao sítio bis-alílico diretamente adjacente as duplas ligações. Assim se iniciam as reações em cadeia de auto-oxidação, até a formação de peróxidos. Em reações de auto-oxidação, normalmente radicais livres de oxigênio são gerados. Esses radicais livres irão excluir um átomo de hidrogênio da cadeia de hidrocarbonetos e, assim, levar à polimerização. A auto-oxidação de biodiesel pode causar degradação da qualidade do combustível, formando produtos como aldeídos, álcoois, ácidos carboxílicos de cadeia mais curta, gomas insolúveis, sedimentos, etc.<sup>87</sup>. Esses produtos de oxidação podem reduzir a vida útil do motor introduzindo diferentes tipos de problemas, como, entupimento do filtro de combustível, entupimento do injetor, formação de depósitos, bem como desgaste<sup>88</sup>.

Algumas propriedades dos biocombustíveis durante o armazenamento, que podem sofrer alterações:

- Índice de acidez: O peróxido formado durante a reação de oxidação se transforma em ácidos orgânicos, que são determinados pelo índice de acidez. A acidez também aumenta, com o acúmulo de água no biodiesel, o que causa a hidrólise de ésteres, produzindo ácidos graxos livres<sup>89</sup>.
- Valor de peróxido: Determina a progressão da reação de oxidação, e indica a formação dos produtos da oxidação secundária. Valores mais altos, indicam maior formação de peróxidos<sup>90</sup>.
- Período de indução: Indica o início do processo de oxidação, através da medida de condutividade do combustível. Baixo valor no período de indução, indica baixa estabilidade a oxidação<sup>89</sup>.

- Índice de iodo: Mede o nível de insaturação em compostos orgânicos, como FAME (éster metílicos de ácidos graxos). Menor índice de iodo é resultado de um menor grau de insaturação<sup>90</sup>.
- Densidade e Viscosidade: Os produtos da reação de oxidação possuem elevados pesos moleculares e, assim, aumentam a densidade e a viscosidade do biodiesel<sup>88</sup>.
- Concentração de FAME: Determina a composição do biodiesel, sendo um indicador da degradação do combustível<sup>88</sup>.

### **1.1.10 Processos de Produção**

Embora o óleo vegetal possa ser usado diretamente como combustível no motor, do ponto de vista técnico, a alta viscosidade de óleos vegetais causa má atomização do combustível nas câmaras de combustão, e eventualmente resulta em problemas operacionais, como depósito de resíduos no motor. Soluções para o problema de viscosidade têm sido abordada de pelo menos quatro maneiras possíveis: diluição de óleos vegetais, microemulsão de óleos, pirólise, e transesterificação de óleos e gorduras<sup>91</sup>. A diluição, microemulsão e pirólise, são as abordagens que respondem por uma quantidade significativa de literatura, mas parece ter recebido pouca atenção após o uso da reação de transesterificação que resulta em um combustível mais limpo e ambientalmente seguro, enquanto que a pirólise e a microemulsão são métodos caros que produzem um biodiesel de baixa qualidade<sup>92</sup>.

Os processos para produção de biodiesel têm como objetivo, em menor tempo de reação, um alto índice de conversão, baixa razão molar de álcool para óleo, baixa concentração do catalisador, e o mais importante, menor custo operacional e consumo de energia para purificação de biodiesel e recuperação de glicerol, catalisador e excesso de álcool. Além disso, o processo de produção precisa apresentar flexibilidade na escolha das matérias-primas, permitindo produção contínua e separação dos produtos de reação. Alto rendimento e qualidade no produto final, com baixo impacto ambiental.

### 1.1.10.1 Transesterificação

É amplamente aceito que o mecanismo da reação de transesterificação ocorre em três etapas consecutivas e reversíveis, nas quais são formados os ésteres desejados (biodiesel), e diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos como intermediários, conforme apresentado na Figura 1<sup>93</sup>. Apesar da estequiometria geral da equação requerer três mols do álcool para cada mol de triacilglicerídeo, a reversibilidade das reações envolvidas faz com que seja necessário o emprego de um excesso de álcool no meio de reação para promover um aumento no rendimento em ésteres. Esses ésteres constituem os componentes do biodiesel. A reação inclui pelo menos um componente catalítico. Na realidade, o processo de transesterificação nunca ocorre no formato ideal. Então, depois de terminar a reação, devemos contar com a presença de triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ésteres de biodiesel, glicerol, álcool e componentes catalíticos e no caso de catálise básica, porções de sabão. Na literatura, não há evidência de transesterificação com 100% de eficiência de conversão<sup>94</sup>.

Geralmente, a reação de transesterificação envolve alguns parâmetros que influenciam significativamente na conversão final. As variáveis mais importantes são: temperatura da reação, teor de ácido graxo livre no óleo, teor de água no óleo, tipo de catalisador, quantidade de catalisador, tempo de reação, razão molar entre o álcool e o óleo, tipo ou fluxo de álcool, e uso de co-solvente. Muitos processos foram desenvolvidos para a produção de biodiesel, mas a transesterificação tornou-se o processo de interesse industrial. Sendo utilizado para produzir biodiesel em países de todo o mundo<sup>95</sup>.

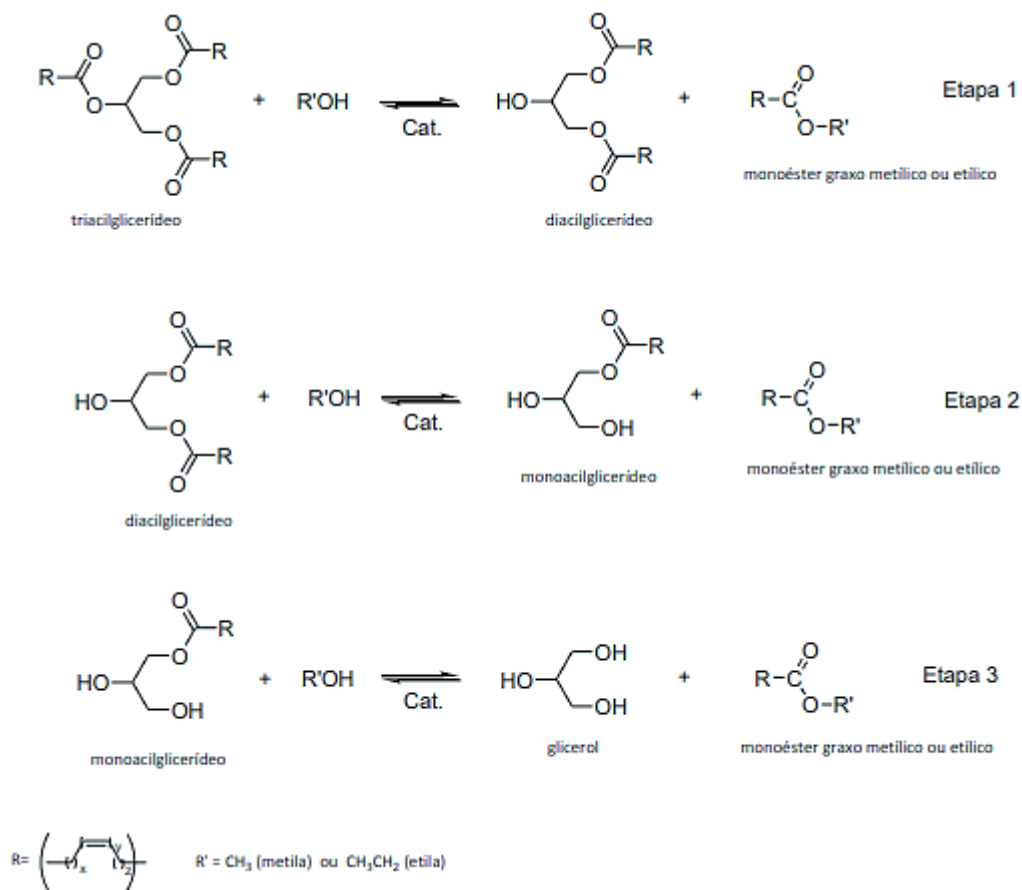


Figura 1. Etapas reacionais envolvidas na reação transesterificação de triacilglicerídeos<sup>93</sup>.

#### 1.1.10.1.1 Catálise Básica

Na transesterificação por catálise básica utiliza-se de hidróxido de sódio ou de hidróxido de potássio ou bases de Lewis como catalisadores. Neste processo é preferível produzir um alcóxido (mistura do catalisador com o metanol ou etanol) antes da reação para se obter uma melhor eficiência global. Estas espécies ativas atacam a carbonila dos triacilglicerídeos, dando origem a um intermediário, a partir do qual o éster de alquila é formado<sup>96</sup>.

Conforme apresentado na Figura 2, na etapa 1 ocorre a produção de espécies ativas RO<sup>-</sup>; na etapa 2 ocorre o ataque nucleofílico de RO<sup>-</sup> ao grupo carbonila no triacilglicerídeo, formando um intermediário tetraédrico; na etapa 3 é evidenciada a quebra do intermediário; e na etapa 4 ocorre a regeneração das espécies RO<sup>-</sup>.<sup>97</sup>.



A reação de transesterificação por catálise básica é a mais utilizada a nível industrial para a produção de biodiesel pois apresenta um rendimento elevado (cerca de 98%) e é menos corrosiva que o processo de produção utilizando a transesterificação por catálise ácida<sup>96</sup>. No entanto existem limitações, uma vez que este processo é sensível à pureza dos reagentes, principalmente no que diz respeito ao conteúdo em ácidos graxos livres e ao teor em água. A presença de água pode provocar, em paralelo com a transesterificação, uma reação de saponificação e dar origem a sabões<sup>98</sup>. O processo catalisado por base é o mais comumente usado devido à sua relativa facilidade. Pode ser realizado em baixa temperatura e pressão em um curto espaço de tempo<sup>96</sup>. A limitação mais importante do método de catálise de base é a sensibilidade do processo aos conteúdos de ácidos graxos livres, e presença de água. Exigindo na maioria dos casos uma etapa de pré-tratamento. A presença de ácidos graxos livres promove a formação de sabão, consome o catalisador, e diminui o rendimento da reação, além de dificultar a separação e purificação de subprodutos da reação.

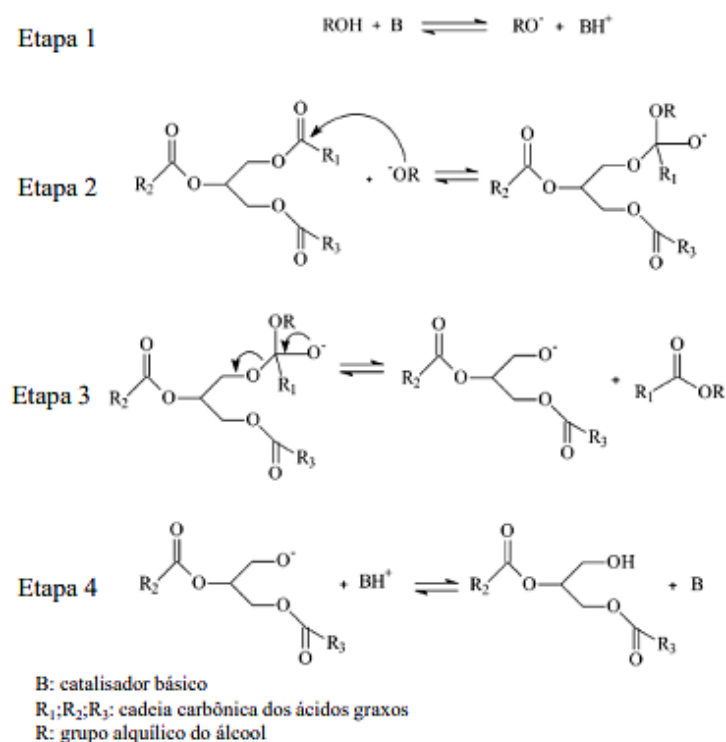


Figura 2. Mecanismo de transesterificação homogênea catalisada por base<sup>97</sup>.

#### 1.1.10.1.2 Catálise Ácida

Essa forma de produção é a segunda forma convencional de fazer o biodiesel. A ideia é usar os triglicerídeos com álcool e em vez de uma base utilizar um ácido - os mais comumente usados são o ácido sulfúrico, ácido clorídrico, e o trifluoreto de boro<sup>98</sup>. A catálise ácida ocorre de forma bem mais lenta do que a catálise básica, tornando o tempo da reação muito maior, além da concentração do catalisador, a proporção molar álcool/ triacilglicerídeo, a temperatura e a pureza dos reagentes também irão influenciar na velocidade da reação. Um excesso de álcool é utilizado para deslocar o equilíbrio da reação, para evitar reações reversíveis, e para acelerar o processo. A temperatura influencia a velocidade do ataque eletrofílico e desta forma afeta os rendimentos e, conseqüentemente, diminui o custo de produção. As presenças de impurezas, nas matérias-primas, podem promover reações paralelas, o que pode ser minimizado com o aumento da temperatura e pressão, mas isso não otimiza o rendimento da reação. As reações de transesterificação química catalisadas por ácidos são altamente benéficas para o matéria-prima com maior teor de ácidos graxos livres<sup>99</sup>.

Como já mencionado, a transesterificação de triacilglicerídeos, catalisada por bases ou ácidos, consiste em três reações reversíveis consecutivas. Na sequência de reação, o triacilglicerídeo é convertido gradativamente em diglicerídeo, monoglicerídeo e, finalmente, glicerol acompanhado pela liberação de um éster em cada etapa. A via química de transesterificação mostrada na Figura 3 para uma reação catalisada por ácido, indica como na interação catalisador-substrato a etapa chave é a protonação do oxigênio carbonil, que corresponde a etapa 1. Isso, por sua vez, aumenta a eletrofilia do átomo de carbono adjacente, tornando-o mais suscetível ao ataque nucleofílico, e formando um intermediário tetraédrico, conforme etapa 2. Na etapa 3 ocorre a migração do próton e a quebra do intermediário. Em contraste, a catálise básica segue uma rota mais direta, criando primeiro um íon alcóxido, que atua diretamente como um forte nucleófilo, dando origem a uma via química diferente para a reação. A formação de uma espécie mais eletrofílica (catálise ácida) versus aquela de um nucleófilo mais forte (catálise de base), é responsável pelas diferenças observadas nos dois processos<sup>97</sup>.

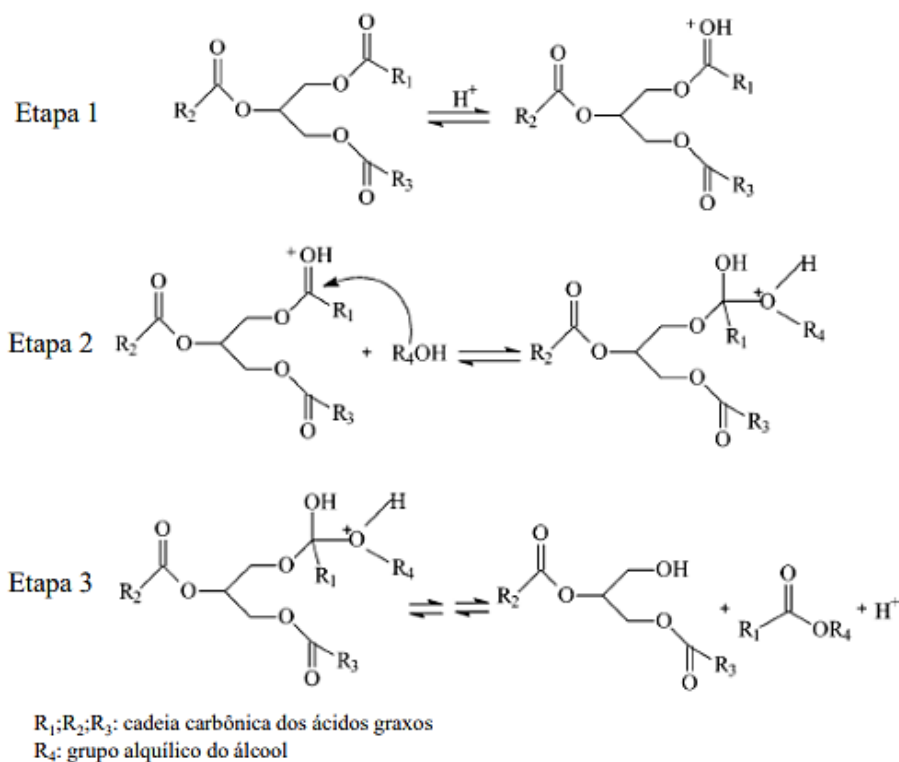


Figura 3. Mecanismo de transesterificação homogênea catalisada por ácidos<sup>97</sup>.

### 1.1.11 Processo de Transesterificação em Duas Etapas (TDSP)

A produção de ésteres metílicos de ácidos graxos por TDSP (Processo de Transesterificação em Duas Etapas) foi testada inicialmente por Samions e colaboradores<sup>100</sup> em óleos vegetais de girassol, e linhaça, o resultado mostrou-se muito promissor, com altos índices de conversão, e fácil separação entre as fases. O Método TDSP, pode ser descrito como uma transesterificação ácida e básica consecutivas. As duas primeiras reações constituem a primeira etapa e descrevem a catálise básica típica. A primeira reação está relacionada à preparação do alcóxido, enquanto que a segunda corresponde à transesterificação básica. A segunda etapa operacional ocorre com a adição de ácido sulfúrico, e excesso de álcool, quando o pH da mistura está entre 12 e 14, ou seja, aproximadamente ausência total de  $H^+$ . A espécie ativa ácida produzida pela adição do ácido seria responsável pela neutralização e, simultaneamente, a produção de uma espécie  $R1^+$ , que ataca diretamente os grupos carbonílicos. A espécie reativa  $R1^+$  reage imediatamente com mono, di e triglicerídeos residuais, bem como, sabão, já presentes na mistura da reação, resultando em

um processo rápido, e com grau de conversão muito alto, que é evidenciado pela pureza do produto final. É importante observar que de acordo com o mecanismo TDSP, os ésteres metílicos de ácidos graxos produzidos pelo processo de catálise básica, não sofrem qualquer degeneração pela catálise ácida<sup>100,101</sup>.

O método TDSP, supera várias dificuldades dos processos por catálise básica ou ácida convencionais. E possibilita também o uso em outras matérias-primas, como banha, sebo, e óleo de fritura usado<sup>101</sup> e a produção de biodiesel etílico<sup>102</sup>. Sendo um procedimento muito mais rápido do que a catálise ácida, de fácil e clara separação entre as fases e temperatura de operação relativamente baixa. Elimina a necessidade de empregar materiais anidros, permite o uso de matérias-primas com alto índice de acidez, suprimindo os problemas referentes à formação de sabão e emulsão, que frequentemente ocorrem no processo de transesterificação com catalisadores básicos homogêneos e resulta em um biodiesel de alta pureza.<sup>100</sup>

### **1.1.12 Adulterantes em Biodiesel**

Apesar das inúmeras vantagens já citadas, o biodiesel inspira grandes preocupações relacionadas a manutenção da qualidade do produto pronto. No Brasil, o biodiesel para ser misturado ao óleo diesel deve ter no mínimo 96,5% de ésteres de ácidos graxos metílicos ou etílicos, esta é uma especificação da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis<sup>72</sup>.

Práticas irregulares relacionadas à adição de óleos vegetais ao óleo diesel ao invés de biodiesel podem ocorrer e são, na maioria das vezes, motivadas pelo alto preço do biodiesel em relação a alguns óleos vegetais de baixo custo disponíveis no mercado. Além disso, a semelhança na composição físico-química entre os óleos vegetais e o biodiesel também contribuem para esse tipo de adulteração. Estas práticas ilegais envolvendo o uso de adulterantes ao biodiesel, afetaram amplamente o mercado interno, trazendo prejuízos ao transporte da produção nacional<sup>103</sup>. Combustíveis adulterados também aumentam a poluição, e causam danos potenciais aos motores dos automóveis<sup>104</sup>. Para minimizar estes problemas é de crucial importância o desenvolvimento de metodologias que permitam identificar a matéria-prima de origem do biodiesel, bem como a possível presença de adulterantes.

Neste sentido, a espectroscopia no infravermelho tem sido amplamente utilizada para análise de matrizes complexas, como por exemplo produtos agrícolas, drogas ilícitas<sup>9</sup>, combustíveis<sup>10</sup>, entre outros<sup>11,12</sup>. Pode ser considerada uma técnica analítica verde, por não ser destrutiva, apresentar a análise de forma rápida e não exigir preparo prévio da amostra na maioria dos casos, além de ter baixo custo<sup>7</sup>. Além disso, as técnicas espectroscópicas têm sido associadas com análise multivariada para serem obtidos melhores resultados qualitativos e quantitativos, bem como para facilitar a interpretação dos resultados e avaliar informações que, de outra forma, não seriam evidentes.

### **1.1.13 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A maioria dos compostos que possuem ligações covalentes, orgânicos ou inorgânicos, tem a capacidade de absorver em várias frequências de radiação eletromagnética na região do infravermelho do espectro eletromagnético. A região vibracional do infravermelho é a que possui mais aplicabilidade na química. Nesta região temos comprimentos de onda maiores do que aqueles da luz visível, de 400 a 800 nm, mas menores do que os das micro-ondas, que são maiores que 1mm. Através do espectro eletromagnético, Figura 4, podemos ver a relação inversamente proporcional do comprimento de onda ( $\lambda$ ) em relação à frequência ( $\nu$ ):  $\nu = c / \lambda$ , onde  $c$  = velocidade da luz. A energia, por sua vez, é diretamente proporcional à frequência:  $E = h\nu$ , onde  $h$  = constante de Planck. Por meio desta equação pode-se concluir que a região de raios X possui radiação de alta energia, o suficiente para quebrar ligações químicas. Por outro lado, as energias mais baixas como aquelas em forma de radiofrequência são capazes apenas de causar transições de *spins* nucleares ou eletrônicos, dentro das moléculas, isto é, Ressonância Magnética Nuclear (RMN)<sup>105,106</sup>.

As moléculas quando absorvem radiação no infravermelho, são excitadas para atingir um estado maior de energia. Este é um processo quantizado, onde uma molécula absorve apenas frequências ou energias selecionadas de radiação do infravermelho. Esta radiação corresponde a alterações de energia da ordem de 8 a 40 KJ/mol. A radiação nesta faixa corresponde a frequências vibracionais, de estiramento e dobramento das ligações na maioria das

moléculas mais covalentes. No processo de absorção, são absorvidas as frequências de radiação no infravermelho que equivalem às frequências vibracionais naturais da molécula analisada, sendo que a energia absorvida serve para aumentar a amplitude dos movimentos vibracionais das suas ligações. Apenas as ligações que têm um momento de dipolo, que muda como uma função do tempo, são capazes de absorver radiação no infravermelho<sup>106</sup>.

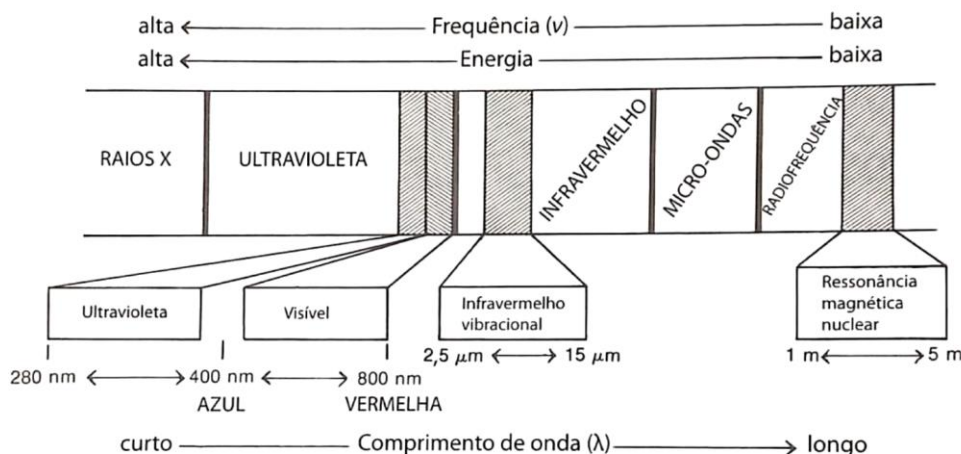


Figura 4. Parte do espectro eletromagnético região do infravermelho com outros tipos de radiação<sup>105</sup>.

Em uma molécula, a posição dos átomos não está fixa, estas variam continuamente em função de inúmeros tipos de vibrações e rotações em torno das ligações da molécula. As vibrações podem ser de estiramento e deformação. No estiramento ocorre uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. Já os modos de deformação são caracterizados por variações no ângulo de duas ligações e podem ser: balanço no plano, tesoura no plano, sacudida fora do plano, e torção fora do plano, Figura 5<sup>107</sup>.

As bandas características de grupamentos químicos úteis para a identificação da estrutura molecular envolvem frequentemente vibrações acopladas. Interações de acoplamento ocorrem entre deformações axiais, entre deformações angulares, ou entre deformações axiais e angulares. Podem ocorrer também interações entre modos fundamentais e modos harmônicos ou modos de combinação<sup>108</sup>.

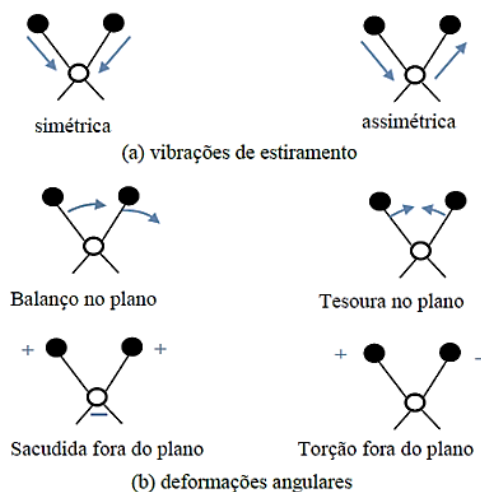


Figura 5. Representação das (a) vibrações de estiramento; (b) deformações angulares<sup>107</sup>.

A FTIR foi desenvolvida a fim de superar as limitações encontradas com instrumentos dispersivos. A principal dificuldade era o lento processo de varredura. Um método para medir todas as frequências de infravermelho simultaneamente, ao invés de individualmente, era necessário. Isso levou ao emprego do interferômetro<sup>109</sup>, que nada mais é que um dispositivo utilizado para modular um sinal de alta frequência para um sinal de frequência mensurável<sup>106</sup>.

No equipamento de FTIR o interferômetro controla a energia enviada para a amostra analisada. Essa energia vinda da fonte atravessa o divisor de feixes e um espelho num ângulo de 45 graus em relação a radiação de entrada, a separa em dois feixes perpendiculares: um segue a direção inicial e outro percorre um desvio num ângulo de 90 graus. Este último bate num espelho fixo e é refletido de volta. O outro vai para um espelho móvel e também é refletido. Isto é feito para variar a trajetória do segundo feixe. Quando os dois feixes se reencontram e se recombinam, porém, as diferenças nos caminhos causam interferências construtivas e destrutivas. Esse feixe origina o interferograma. Em seguida ele atravessa a amostra, a qual absorve simultaneamente em todas as frequências do espectro. O sinal do interferograma que chega ao detector informa a quantidade de energia absorvida em cada frequência. Como não se usam monocromadores em instrumentos FTIR, a totalidade da faixa de radiação passa simultaneamente pela amostra com enorme ganho de tempo, permitindo

resoluções altas, Figura 6. Além disso, como os dados sofrem conversão analógico-digital, os resultados são manipulados facilmente<sup>106</sup>.

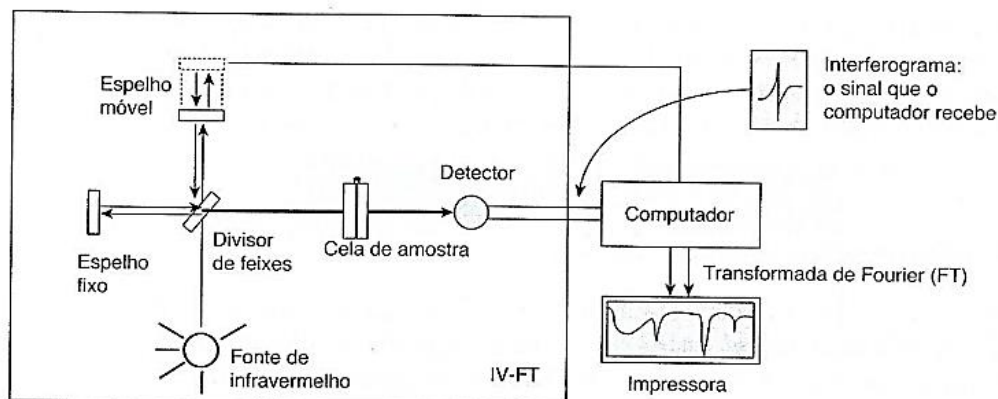


Figura 6. Esquema representativo de um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)<sup>105</sup>.

A aplicação da transformada de Fourier ao final desse processo permite extrair as frequências individuais e produzir o espectro. Os programas atuais subtraem automaticamente o espectro de fundo também chamado de branco (*background*) que contém somente informações atmosféricas e do caminho ótico, ou seja, um espectro obtido sem a amostra. O espectro final é o resultado dessa subtração<sup>105,106</sup>.

Já a espectroscopia na região do infravermelho acoplada a um acessório de refletância total atenuada (ATR), é uma técnica simples que se destaca por não necessitar preparo de amostra, e ser muito utilizada para analisar líquidos tanto quantitativamente quanto qualitativamente. A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e reflectância total atenuada (ATR - FTIR) emprega cristais com alto índice de refração, como os de seleneto de zinco (ZnSe), muito utilizado, interagindo com a amostra sobre a superfície do cristal, no qual ocorrem múltiplas reflexões da radiação do infravermelho. O ATR mede as variações que ocorrem no feixe de infravermelho que sofre a reflexão quando interage com a amostra.

A radiação que penetra na amostra recebe a denominação de onda evanescente e quando a amostra absorve num determinado comprimento de onda evanescente ocorre a atenuação do feixe cujo comprimento de onda



corresponde às bandas de absorção apresentadas no espectro de infravermelho<sup>110,111</sup>. A Figura 7 apresenta simplificada o esquema de um ATR horizontal.

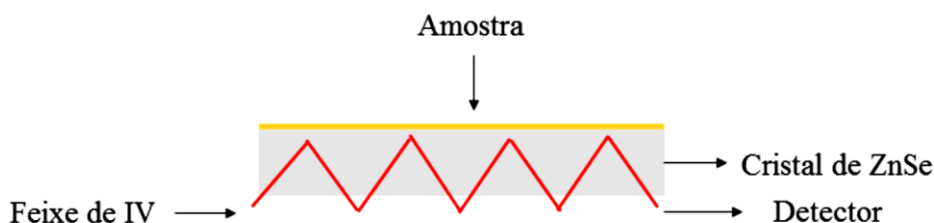


Figura 7. Esquema representativo de um acessório de refletância total atenuada (ATR).

A técnica de ATR tem trazido ganhos para a análise no infravermelho, no que se refere ao preparo de amostras e a reprodutibilidade espectral, tanto para a análise de amostras líquidas quanto sólidas. Destaca-se por empregar pequena quantidade de amostra, e por não envolver processos laboriosos no seu preparo, e em função destas características vem sendo empregada na análise do biodiesel em conjunto com técnicas e análise multivariadas.

#### 1.1.14 Quimiometria

A quimiometria é a aplicação de métodos estatísticos e matemáticos para permitir a extração máxima de informações úteis de dados químicos .

Em 1971, o termo “Quimiometria” foi utilizado pela primeira vez pelo químico orgânico Svante Wold. Em 1972 o próprio Wold menciona o termo “quimiometria” em uma publicação de uma revista sueca<sup>112,113</sup>. Em 1976 foi organizado o primeiro Simpósio Chemometrics: Theory and Applications, o qual resultou no primeiro livro dedicado especificamente a quimiometria. Em 1980 a revista *Analytical Chemistry* utiliza o título “Chemometrics” em sua revisão bianual. E finalmente em 1987 dois jornais específicos para a área da quimiometria foram lançados, *Journal of Chemometrics* e o *Chemometrics and*

*Intelligent Laboratory Systems*, consolidando desta forma a quimiometria como uma nova área da química<sup>114</sup>.

Segundo Edenir R. Pereira Filho, a Quimiometria pode ser dividida em quatro vertentes: (I) Análise exploratória de dados químicos com a utilização de Análise de Agrupamento por Métodos Hierárquicos (HCA) e Análise por Componentes Principais (PCA); (II) Calibração multivariada com a utilização da Regressão por Componentes Principais (PCR) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS); (III) Modelos de classificação através de ferramentas como K-ésimo Vizinho mais Próximo (KNN), Modelagem Independente Flexível por Analogias de Classe (SIMCA) e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS); (IV) Planejamento experimental e modelagem de misturas<sup>115</sup>.

Dentre as áreas tradicionais da química, a química analítica é, atualmente, a mais influenciada pela quimiometria<sup>116</sup>. Dentre as diferentes técnicas analíticas, as ferramentas quimiométricas se tornaram mais populares na área de espectroscopia, em especial na região do infravermelho próximo (NIR)<sup>117</sup>.

#### *1.1.14.1 Análise de Componentes Principais (PCA)*

A Análise de Componentes Principais é um método não supervisionado, por isso é chamada de análise exploratória de dados. A PCA é utilizada para projetar um conjunto de dados multivariados, em um espaço de dimensão reduzido, sem que as relações entre as amostras sejam afetadas<sup>118</sup>. A aplicação mais freqüente do método PCA ocorre nos casos em que as colunas em X são altamente colineares, i.e., as variáveis são correlacionadas e apresentam redundâncias. Tais colinearidades indicam que a matriz X apresenta algum tipo de variabilidade dominante que carrega a maioria da informação disponível. Estas redundâncias e pequenas variabilidades devem então ser removidas. A proposta da PCA é expressar as informações mais significativas contidas nas variáveis originais em um pequeno número de novas variáveis, as então chamadas componentes principais (PCs) de X<sup>119,120</sup>. Isto resulta num novo conjunto de variáveis com as informações que se deseja. Na PCA essas novas variáveis passam a se chamar componentes principais. Estas PCs são ditas não correlacionadas e ortogonais uma em relação a outra, ou seja, a informação

contida numa PC é exclusiva e, portanto, não está presente nas outras PCs. A PC1 descreve a máxima variância dos dados ortogonais, já a PC2 tem a direção da máxima variância ortogonal dos dados no subespaço ortogonal a PC1. As demais PCs são ortogonais às anteriores, e orientadas de maneira que descrevam uma a uma, a máxima variância restante<sup>114</sup>. O procedimento de PCA decompõe a matriz original de dados  $\mathbf{X}$  em um produto de outras duas matrizes  $\mathbf{T}$  (*scores*) e  $\mathbf{P}^t$  (*loadings*) mais uma matriz de resíduos  $\mathbf{E}$  (Figura 8). Enquanto a matriz de *scores* traz informações relacionadas às amostras, a matriz de *loadings* apresenta informações das variáveis<sup>121</sup>. Os *scores* representam as coordenadas das amostras no novo sistema de eixos, formado pelas componentes principais. Cada PC é construída pela combinação linear das variáveis originais e os coeficientes da combinação são chamados *loadings*, que representam o quanto cada variável original contribui para a formação de uma PC específica<sup>121</sup>.

$$\begin{matrix} n \\ \boxed{\mathbf{X}} \\ m \end{matrix} = \begin{matrix} d \\ \boxed{\mathbf{T}} \\ m \end{matrix} \times \begin{matrix} n \\ \boxed{\mathbf{P}^t} \\ d \end{matrix} + \begin{matrix} n \\ \boxed{\mathbf{E}} \\ m \end{matrix}$$

Figura 8. Decomposição da matriz  $\mathbf{X}$  de  $m$  amostras com  $n$  variáveis em um produto de outras duas matrizes, *scores*  $\mathbf{T}$  (amostras) e *loadings*  $\mathbf{P}$  (peso das variáveis), mais a matriz de resíduos  $\mathbf{E}$ <sup>121</sup>.

Esta descrição pode ser considerada para outros métodos multivariados, pois muitos diferem apenas no critério utilizado para determinar como as componentes são construídas<sup>122</sup>. Assim, a PCA constitui, em muitas maneiras, a base para a análise multivariada dos dados<sup>123</sup>.

#### 1.1.14.2 Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

O método de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *partial least squares*) é um procedimento de calibração multivariada que utiliza análise de componentes principais (PCA) para reduzir a dimensão do conjunto de dados<sup>121</sup>.

Na calibração multivariada por PLS, é feita uma correlação entre um conjunto de dados, tais como espectros na matriz **X**, e as propriedades de interesse, organizadas em outra matriz, denominada **Y**. As propriedades de interesse podem ser características físico-químicas ou químicas como, por exemplo, a concentração de um analito<sup>124</sup>.

A matriz **X** é decomposta por PCA como na Figura 8 (Equação 1) e a matriz **Y** é decomposta de forma análoga de acordo com a Equação 2.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^t + \mathbf{E} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U} \cdot \mathbf{Q}^t + \mathbf{F} \quad (\text{Equação 2})$$

Os valores dos *scores* nas matrizes **T** e **U** são alterados até que o melhor modelo linear seja estabelecido entre eles e assim, a maior covariância entre **X** e **Y** seja obtida. Isso é realizado em várias etapas, que são repetidas para cada PC, estimada a partir de um processo iterativo. Um fator importante para o modelo PLS é as variáveis latentes que mantêm uma relação entre a explicação da variância em **X** e a predição da variável dependente **y**. Como no cálculo das PCs, os valores da propriedade de interesse presentes em **Y** são levados em consideração (sendo, portanto um método supervisionado), onde as PCs passam a ser nomeadas de variáveis latentes, LV (do inglês, *latent variables*)<sup>124</sup>. Além disso, no método PLS cada variável latente é obtida, a fim de maximizar a covariância entre os escores da matriz **X** e variável dependente **y** e esta definição de fatores otimiza a decomposição no sentido da predição da propriedade de interesse<sup>114,125</sup>.

#### 1.1.14.3 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

O PLS-DA é um método de classificação supervisionado, ou seja, é um método que determina a qual classe pertence uma amostra desconhecida a partir das informações fornecidas ao sistema. Os métodos supervisionados exigem o conhecimento inicial sobre as amostras e suas classes para definir as regras que serão utilizadas para a classificação das amostras. O método de classificação PLS-DA utiliza a técnica de regressão multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS). O PLS é um método de calibração inversa, no qual se

busca uma relação direta entre a resposta instrumental (matriz **X**) e a propriedade de interesse (matriz **Y** ou vetor **y**). O procedimento utilizado para a construção do modelo de classificação é o mesmo utilizado pelo PLS, no entanto, a propriedade de interesse em modelos de classificação é uma variável categórica que descreve a atribuição de classe da amostra. Geralmente, o valor 1 é atribuído à classe de interesse e o valor 0 é atribuído à(s) outra(s) classe(s).<sup>126,127</sup>. O resultado do modelo PLS-DA geralmente é expresso através de um gráfico de estimativas de classes, onde as amostras posicionadas acima da linha tracejada (*threshold*) são classificadas como pertencentes à classe 1, classe de interesse, e as amostras posicionadas abaixo do valor de *threshold* são classificadas como pertencentes à classe 0, ou seja, a classe que não é de interesse.

A avaliação do desempenho do modelo de classificação é feita através dos critérios de estatísticas de respostas verdadeiras: sensibilidade e especificidade<sup>128</sup>.

A sensibilidade é a capacidade que o modelo tem de classificar corretamente as amostras verdadeiras positivas e, a especificidade é a capacidade que o modelo tem de classificar corretamente as amostras verdadeiras negativas. Os parâmetros sensibilidade e especificidade são calculados de acordo com as equações (3) e (4), respectivamente<sup>129</sup>.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN} \quad (\text{Equação 3})$$

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP} \quad (\text{Equação 4})$$

onde:

- VP (Verdadeiros Positivos) é a probabilidade de uma amostra positiva (pertencente à classe) ser classificada como uma amostra positiva;
- VN (Verdadeiros Negativos) é a probabilidade de uma amostra negativa (não pertencente à classe) ser classificada como uma amostra negativa;
- FP (Falsos Positivos) é a probabilidade de uma amostra negativa (não pertencente à classe) ser classificada como uma amostra positiva (pertencente à classe);

- FN (Falsos Negativos) é a probabilidade de uma amostra positiva (pertencente à classe) ser classificada como uma amostra negativa (não pertencente a classe).

Para avaliação da capacidade preditiva dos modelos de regressão multivariados PLS-DA, são utilizados parâmetros estatísticos, conhecidos como figuras de mérito. Dentre elas, a raiz quadrada do erro médio quadrático (RMSE, do inglês Root Mean Square Error) e o bias são comumente utilizadas. Esses parâmetros são calculados a partir dos valores preditos pelo modelo e os valores de referência<sup>130</sup>. O parâmetro RMSE é demonstrado pela Equação 5, e corresponde à raiz quadrada da razão entre o somatório do quadrado da diferença entre o valor predito de cada amostra ( $y_r$ ) e o respectivo valor de referência ( $y_p$ ), e o número ( $n$ ) de amostras para um modelo. É importante destacar que a unidade do erro calculado pela Equação 5 é a mesma das medidas originais realizadas, facilitando a avaliação do resultado.

$$RMSE = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(y_r - y_p)^2}{n}} \quad \text{Equação 5}$$

#### 1.1.14.4 Cartas de Controle Multivariadas (MCC)

O uso da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade do processo resultou na aplicação das cartas de controle multivariadas (MCCs) em conjunto de dados espectrais. Esta técnica é um método multivariado baseada no sinal analítico líquido (NAS) que separa o sinal instrumental em três partes: sinal analítico líquido, sinal do interferente e sinal dos resíduos. Para cada parte, é construído um gráfico de controle baseado em um conjunto de amostras de calibração (analito mais matriz) que definem a condição no qual o processo ou produto encontram-se sob controle. O objetivo das MCCs é separar a variação analítica e sistemática da variação da matriz<sup>131</sup>.

A base para o desenvolvimento dos gráficos de controle é representada na Figura 9, onde um espectro de amostra (vetor  $\mathbf{r}$ ) é dividido em três

contribuições diferentes:  $\mathbf{r}_K^*$  (vetor NAS),  $\mathbf{r}_{INT}$  (vetor de interferência) e  $\mathbf{r}_{RES}$  (vetor residual), Equação 6.

$$\mathbf{r} = \mathbf{r}_K^* + \mathbf{r}_{INT} + \mathbf{r}_{RES} \quad \text{Equação 6}$$

A construção das cartas de controle consiste em definir o espaço de interferentes (PP<sup>+</sup>), que descreve as variações baseado em outros componentes da amostra, através de uma análise por PCA. Seguida do cálculo do vetor de regressão NAS ( $b_K$ ) (para o analito) do vetor de interferente, e do vetor de resíduo. Para isso são necessários dois conjuntos de amostras, um com todos os elementos exceto o analito, para a construção do espaço de interferentes, e outro conjunto incluindo o analito<sup>131</sup>.

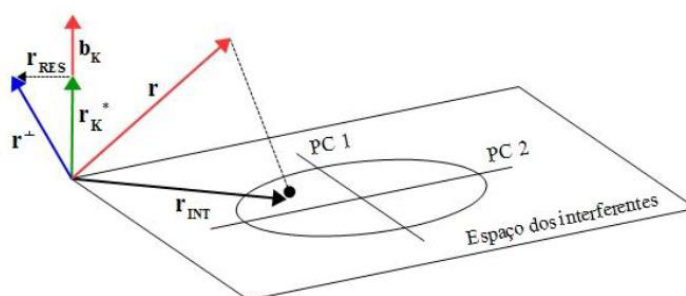


Figura 9. Representação da divisão do espectro  $\mathbf{r}$  nos vetores:  $\mathbf{r}^\perp$  (NAS + resíduo),  $\mathbf{r}_K^*$  (vetor NAS),  $\mathbf{r}_{INT}$  (vetor de interferência) e  $\mathbf{r}_{RES}$  (vetor residual)<sup>131</sup>

### 1.1.15 Quimiometria Associada a Técnicas Espectroscópicas

A utilização de ferramentas quimiométricas associadas a técnicas espectroscópicas, tem se mostrado um caminho assertivo na diferenciação de matérias primas, tanto para qualificação quanto para quantificação, assim como para detectar a presença de adulterantes. A tabela 2 apresenta um apanhado de artigos publicados neste sentido, demonstrando que este estudo se faz relevante por estar trabalhando com duas matéria-primas de origem animal (banha e sebo), e duas de origem vegetal (soja e linhaça) além da presença do adulterante, óleo de soja. No segundo estudo, demonstramos a robustez dos métodos quimiométricos associados a pré-tratamentos que permitem com 100%

de sensibilidade e especificidade ao quantificar e qualificar estas matérias primas e o adulterante expondo os diferenciais deste estudo quando comparado aos demais.

#### **1.1.16 Biodeterioração do Biodiesel**

O período de armazenamento de combustíveis é o mais preocupante, pois é comum o aparecimento de uma fase de água livre no fundo dos tanques. Esta água se forma principalmente por condensação da umidade do ar nas paredes, vazamentos ou ainda pode acompanhar o combustível. A degradação do biodiesel pela atividade microbiana está intimamente relacionada à presença de água. Ocorre principalmente por mecanismos como acúmulo de biomassa, degradação de aditivos e produção de metabólitos corrosivos. Como consequência, verifica-se a perda de qualidade do produto e outros problemas de ordem operacional tais como entupimento de filtros e corrosão dos tanques e tubulações, acarretando enormes prejuízos financeiros ao mercado. A natureza higroscópica do biodiesel e a baixa complexidade desta molécula que pode ser mais facilmente degradada por microrganismos são as principais causas da biodeterioração.<sup>6,132,133,134</sup>

##### *1.1.16.1 Armazenamento*

Um dos critérios estabelecidos pela nova resolução tem relação direta com o armazenamento. As especificações descritas na Resolução ANP Nº 7, de 19.3.2008, definem que o biodiesel deve ser recertificado caso não seja comercializado em um prazo de 30 dias após a emissão do Certificado de Qualidade. Quando esse prazo é atingido, devem ser novamente analisadas a massa específica a 20°C (densidade), o teor de água, o índice de acidez e a estabilidade à oxidação a 110°C. Caso a análise de massa específica aponte diferença superior a 3,0 kg/m<sup>3</sup>, deverá ser feita a recertificação completa do produto<sup>135</sup>.

A Distribuidora Petrobras, por exemplo, recomenda que o prazo ideal de estocagem seja de no máximo três meses, dando preferência para tanques de aço carbono. Zinco, chumbo, estanho e ligas à base de cobre, como bronzes,



e determinadas classes de borrachas, são incompatíveis com o biodiesel. Esta recomendação pode ser explicada, pois o biodiesel apresenta um poder de solvência elevado em relação a determinados polímeros. Outro fato a ser considerado, são contaminantes abióticos decorrentes de inadequações em seu processo de produção, como resíduos de metanol, e ácidos graxos livres que podem gerar problemas de corrosão em materiais<sup>136</sup>.

A contaminação microbiana durante o armazenamento de combustíveis, apresenta-se como um problema em refinarias e sistemas de distribuição. Muitos fatores, como a presença de água no fundo dos reservatórios durante o armazenamento, foram citados como responsáveis pelo aumento do crescimento microbiano, podendo levar ao bloqueio de dutos e filtros, afetando a qualidade final do combustível, e contribuindo para a corrosão dos tanques<sup>137,138</sup>. Uma concentração de apenas 1% de água em um sistema de armazenamento é suficiente para o crescimento de microorganismos, bactérias e leveduras, bem como para o desenvolvimento de biomassa fúngica na interface óleo/água, e até mesmo aderido a parede do tanque<sup>137,139,140</sup>.

O processo de biodeterioração do biodiesel em tanques de armazenamento não é totalmente claro, porém uma possível rota inicia pela hidrólise do etil ou metil éster de ácido graxo, por uma lipase ou esterase, resultando em um ácido graxo e um álcool, (Figura 10). Em uma segunda etapa, os ácidos graxos são oxidados via  $\beta$ -oxidação e degradados a um ácido acético e a um ácido graxo com dois carbonos a menos. Nesta reação, ocorre a conversão do ácido graxo a éster coenzima A (CoA). Após o éster-CoA é oxidado na posição beta, e dois átomos de carbono no final da molécula são clivados para produzir acetil-CoA. O processo de encurtamento da molécula continua até o ácido graxo degradar-se totalmente em acetil-CoA. No caso do ácido linoléico por exemplo, ele sofrerá nove reações oxidativas perdendo em cada uma delas dois átomos de carbono na forma de acetil-CoA. Em ácidos graxos com duplas ligações, a  $\beta$ -oxidação é interrompida para que duas reações adicionais ocorram, convertendo a dupla ligação em ligação simples, e após a  $\beta$ -oxidação continua. Quando a cadeia de ácidos graxos for ímpar, o produto final da  $\beta$ -oxidação será o propionil-CoA, que ao incorporar  $\text{CO}_2$ , e consumir ATP, se transforma em succinil-CoA que é um composto do ciclo de Krebs. Estes compostos por sua vez podem ser utilizados para a síntese de biomassa celular<sup>141,142</sup>.

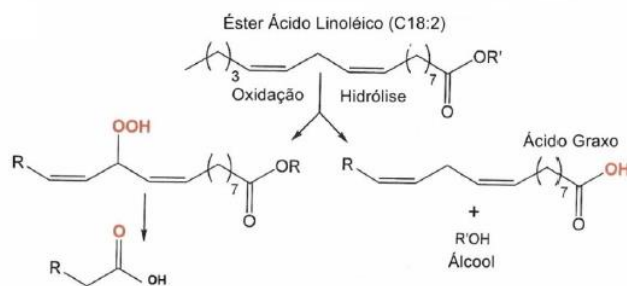


Figura 10. Processo de hidrólise de um éster de ácido graxo, produzindo um ácido graxo e um álcool<sup>143</sup>.

A importância dos processos de biodeterioração do biocombustível, motivaram vários estudos, em sua maioria comparando o processo de biodeterioração do óleo diesel com e sem misturas de biodiesel. Um aumento da biodegradabilidade de misturas de diesel / biodiesel foi demonstrado em muitas investigações<sup>144,145,146,147</sup>. Muitos autores que têm relatado a biodegradabilidade de misturas de biodiesel em ambientes como solo<sup>146,147</sup> e água<sup>148,149</sup> Zhang *et al.*<sup>148</sup> encontraram uma taxa de biodegradação do diesel na água que pode ser até três vezes maior na presença de biodiesel. De acordo com Mariano *et al.*<sup>146</sup>, embora o biodiesel seja mais fácil e rapidamente biodegradado do que o óleo diesel, entre as misturas diesel / biodiesel avaliadas (2%, 5%, e 20%), apenas aqueles com as maiores proporções de biodiesel foram significativamente degradados de forma mais eficiente do que o diesel puro no solo.

A degradação do biodiesel de soja (B100) foi avaliada por Bucker *et al.*<sup>150</sup> a partir da fase oleosa de culturas de 60 dias de *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces sp.* e de culturas de 168 h de *Candida silvicola* e *Rhodotorula sp.* *A. fumigatus* teve melhor desempenho que *Paecilomyces sp.* Ambos degradaram preferencialmente o C16 (ácido palmítico) e C18 (ácido esteárico); no entanto, esses ácidos graxos foram degradados em maior grau por *A. fumigatus* (cerca de 15% para ambos os ésteres) do que por *Paecilomyces sp.* (0,6% e 3,5%, respectivamente). Também foi constatado, que *A. fumigatus* cresceu muito bem em B100, atingindo quase três vezes a biomassa produzida em B0. Esses resultados concordam com outros estudos que demonstram que o biodiesel é biodegradado mais facilmente do que o diesel convencional<sup>133,134</sup>.

A biodeterioração do biodiesel por fungos já tem sido estudada, e algumas rotas metabólicas sugeridas. Cazarolli *et al.*<sup>151</sup> em um estudo sobre a suscetibilidade a biodegradação, avaliou ao longo de 60 dias o crescimento do fungo *Pseudallescheria boydii* em meio aquoso contendo biodiesel de oliva, soja e linhaça, verificando que os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa presentes nos três biodieseis, migraram parcialmente para a fase aquosa do microcosmo, o que por sua vez pode influenciar na utilização destes ésteres pelos microorganismos.

Bücker e colaboradores<sup>152</sup> avaliaram o efeito do biodiesel (5%, 10%, 50% e 100%) e o crescimento microbiano e a formação de biofilme na interface óleo/água. Após 40 dias B100 e B50 apresentaram os maiores valores de biomassa, onde o *Cladosporium sp.* foi o fungo predominante. As maiores porcentagens de biodeterioração de ésteres de ácidos graxos foram C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2.

Uma vez que, em alguns casos, o biodiesel pode permanecer estocado por períodos superiores aos 30 dias sugeridos pela legislação, é de suma importância evidenciar processos de biodeterioração no menor tempo possível, para que a utilização de medidas preventivas sejam adotadas, a fim de preservar as características originais do biodiesel até a sua comercialização, evitando assim perdas para a indústria e para o consumidor final.

Os estudos 3 e 4 irão abordar micro-organismo envolvidos no processo de deterioração, os ésteres metílicos preferenciais neste processo, e a utilização de ferramentas quimiométricas.

Tabela 2. Artigos de revisão sobre a origem do biodiesel e o uso de adulterantes usando técnicas espectroscópicas e ferramentas quimiométricas

Amostra/ Técnica Espectroscópica	Abordagem Quimiométrica	Referência
Biodiesel (algodão, mamona e palma) adulterados com óleo de soja Infravermelho Médio	PCA e regressão por PLS	doi:10.1590/s0103-50532011000700005 <sup>118</sup>
Biodiesel (girassol, coco, palma, colza, soja, algodão, mamona, jatropha, linhaça, óleo de fritura usado) foram classificados pela matéria-prima de origem Infravermelho Próximo	RDA, PLS-DA, KNN e SVMs	doi:10.1016/j.aca.2011.01.041 <sup>153</sup>
Classificação de 7% de biodiesel (mafurra, moringa, e algodão) e 93% de óleo diesel Infravermelho Médio	Regressão por PLS	doi:10.1080/00032719.2016.1267186 <sup>154</sup>
Biodiesel (algodão, girasol, milho e soja) em misturas com biodiesel (B5) Imagem Digital	SIMCA, PLS-DA, SPA-LDA.	doi:10.1039/c6ay01158f <sup>155</sup>
Biodiesel de milho/diesel S10 e biodiesel de soja/diesel S10 Mixture 0 -10 %; 10% - 30%; 30% -100% Infravermelho Médio Espectrometria de massa de razão isotópica	LDA e PLS-DA	doi:10.1016/j.chemolab.2016.12.004 <sup>156</sup>

Adulteração de biodiesel metílico e etílico de jatropha com óleo de soja e óleo de fritura usado; adulteração do óleo diesel com óleo lubrificante usado e gasolina, ambos na proporção de 0-30% em B7 Infravermelho Médio	Carta NAS	doi:10.1016/j.fuel.2016.11.078 <sup>157</sup>
Misturas de biodiesel de gordura animal e biodiesel de soja com S50, gerando o B20 Infravermelho Próximo	PLS, SVR, siPLS e siSVR	doi:10.1016/j.talanta.2013.11.056 <sup>158</sup>
Misturas B7 de metil ésteres de jatropha/ diesel, e metil ésteres de crambe /diesel Infravermelho Médio	Carta NAS	doi:10.1021/acs.energyfuels.5b02489 <sup>159</sup>
Misturas de diesel com biodiesel de algodão, girasol e óleo de soja Infravermelho Próximo	PCA – LDA e SIMCA	doi:10.1007/s11746-012-2028-8 <sup>160</sup>
Seis classes de biodieseis: ésteres etílicos de óleo de soja; ésteres metílicos de óleo de jatropha; ésteres metílicos de óleo de fritura usado; ésteres metílicos de óleo de soja; ésteres etílicos de óleo de fritura usados; e ésteres etílicos do óleo de jatropha. Infravermelho Médio	PLS-DA	doi:10.1016/j.fuel.2014.11.014 <sup>161</sup>
Biodiesel etílico e metílico de soja / diesel (B5), adulterado com óleo de soja Infravermelho Médio	PLS	doi:10.1007/s11746-015-2656-x <sup>103</sup>
Biodiesel / diesel metílico de soja (B5), adulterado com: gasolina, óleo lubrificante automotivo residual, óleo de soja e óleo de fritura usado Infravermelho Médio	PLS-DA	doi:10.1021/ef502122w <sup>104</sup>

Classificação de misturas B5 de diesel e ésteres etílicos de óleo de soja (SOEE), ésteres metílicos de óleo de pinhão manso (JOME), ésteres metílicos de óleo de fritura usados (UFOME), ésteres metílicos de óleo de soja (SOME), ésteres etílicos de óleo de fritura usado (UFOEE), e Ésteres Etílicos do Óleo de Jatropha (JOEE), quanto ao tipo de álcool e ao tipo de matéria-prima. Infravermelho Médio	PLS-DA	doi:10.1016/j.fuel.2014.11.014 <sup>163</sup>
Quantificação de biodiesel de gordura animal ( 0% -69%) em biodiesel de soja e misturas B20 com diesel Infravermelho Próximo	PLS, SVR, siPLS e siSVR	doi:10.1016/j.talanta.2013.11.056 <sup>164</sup>
Classificar as amostras de biocombustível em 10 grupos de acordo com sua origem: girassol, coco, palma, soja, algodão, mamona, jatropha, linhaça, colza e óleo de fritura usado Infravermelho Próximo	RDA, PLS-DA, KNN, SVMs	doi:10.1016/j.aca.2011.01.041 <sup>165</sup>

## **2. Caracterização de Biodiesel de Gordura Animal, Óleo Vegetal, e Adulterante por Espectrometria no Infravermelho Combinada com Métodos Quimiométricos**

### **2.1 Objetivos**

Utilizar a análise por espectrometria na região do infravermelho médio combinada com regressão por mínimos quadrados parciais, com análise discriminante por mínimos quadrados parciais, e empregando cartas de controle multivariadas para verificar :

- (i) a presença de diferentes matérias-primas em um grupo de amostras;
- (ii) a porcentagem da composição destas matérias-primas;
- (iii) a presença ou ausência do mais comum adulterante “óleo de soja”, e suas blends com biodiesel.

### **2.2 Materiais e Métodos**

#### *2.2.1 Instrumentação*

Os espectros no infravermelho foram coletados em espectrofotômetro Agilent Cary 630 FTIR com acessório de reflectância total atenuada (ATR). Todas as amostras foram analisadas diretamente em triplicata, na faixa de 4000 a 800  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 varreduras. O branco foi medido entre cada amostra. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram coletados empregando um equipamento Varian INOVA 300, com pulso de 90s e tempo de relaxamento de 3s.

#### *2.2.2 Amostras e Reagentes*

As amostras de biodiesel foram sintetizadas a partir de banha de porco de Rio Pardo (RS), sebo bovino da Agroindústria Carne Comesul Eireli (RS), óleo de linhaça comercial e óleo de soja comercial. Metanol (Neon, Brasil) foi utilizado como agente transesterificante. Hidróxido de sódio e ácido sulfúrico (Synth, Brasil) foram usados como catalisadores. Sulfato de sódio foi usado para

remover a água. O clorofórmio-D (Cambridge Isotope Laboratories, EUA) foi utilizado como solvente para a obtenção dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ . A síntese de biodiesel foi realizada através da reação de transesterificação com base no *Transesterification Double Step Process* (TDSP)<sup>100,102</sup>. Foram sintetizadas três amostras de 100 mL de biodiesel para cada matéria-prima (banha, sebo bovino, soja e linhaça). Todas as amostras resultantes da síntese foram caracterizadas por RMN  $^1\text{H}$ . Para as análises quimiométricas, foram elaborados três grupos de calibração de quinze amostras: a) misturas com 70% de biodiesel de soja, 15% de biodiesel de sebo bovino e 15% de biodiesel de banha; b) misturas com 70% de biodiesel de soja e 30% de biodiesel de banha; e c) misturas com 70% de biodiesel de soja e 30% de biodiesel de sebo bovino. Além disso, 45 misturas de biodiesel adulteradas com óleo de soja foram preparadas com as concentrações apresentadas na Tabela 3, conjunto de validação externa. O planejamento experimental das misturas foi realizado por planejamento fatorial, no qual as proporções mínimas e máximas de biodiesel foram determinadas aleatoriamente para evitar colinearidade. As proporções foram 5–50% para biodiesel de gorduras animais, 10–90% para biodiesel de origem vegetal, e 10–70% para o adulterante. As proporções mínimas e máximas do adulterante foram estabelecidas a fim de avaliar a eficiência do modelo quimiométrico em sua quantificação (PLS), pois o óleo de soja contém principalmente triacilgliceróis, enquanto o biodiesel contém uma mistura de ésteres derivados de diferentes ácidos graxos. Em outros estudos, as proporções de óleo de soja como adulterante variou de 30%<sup>118</sup> a 40%<sup>166</sup>. Proporções de até 70% foram usadas no presente estudo, a fim de avaliar a linearidade dentro de uma faixa mais ampla para os modelos PLS e PLS-DA. Para a construção dos modelos, uma matriz com 135 linhas (45 amostras em triplicata) e 3351 variáveis foram empregadas.



Tabela 3. Concentração de biodiesel nas amostras e conjunto de validação externa.

Sample	Biodiesel de soja		Óleo de soja		Biodiesel de sebo		Biodiesel de banha		Biodiesel de linhaça	
	%(w/w)	PLS(%)	%(w/w)	PLS(%)	%(w/w)	PLS(%)	%(w/w)	PLS(%)	%(w/w)	PLS(%)
A01 *	90	89,84	0	0,02	10	10,01	0	0,00	0	0,07
	90	89,79	0	0,03	10	10,02	0	-0,01	0	0,10
	90	89,67	0	0,08	10	10,04	0	-0,02	0	0,22
A02*	80	79,9	0	0,01	20	20,00	0	0,00	0	0,03
	80	79,95	0	-0,01	20	19,99	0	0,01	0	0,02
	80	79,87	0	0,02	20	20,00	0	-0,01	0	0,03
A03	70	69,96	0	0,05	30	30,01	0	-0,01	0	0,14
	70	69,97	0	0,02	30	29,99	0	0,00	0	0,09
	70	69,97	0	0,03	30	29,99	0	0,00	0	0,12
A04 *	60	59,99	0	0,00	40	39,97	0	0,00	0	0,04
	60	59,92	0	0,02	40	39,99	0	0,00	0	0,11
	60	59,97	0	-0,01	40	39,97	0	0,00	0	0,06
A05*	50	49,98	0	0,01	50	49,97	0	0,01	0	0,04
	50	49,97	0	0,01	50	49,97	0	0,00	0	0,06
	50	50,02	0	-0,01	50	49,96	0	0,01	0	0,04
A06	90	89,94	0	0,03	0	0,02	10	9,99	0	0,09
	90	89,98	0	-0,02	0	0,00	10	10,00	0	-0,01
	90	89,97	0	-0,01	0	-0,01	10	10,01	0	0,00
A07	80	79,97	0	0,01	0	0,00	20	20,00	0	0,02
	80	79,96	0	-0,04	0	-0,04	20	20,02	0	-0,09
	80	79,98	0	-0,03	0	-0,02	20	20,00	0	-0,05
A08 *	70	70,05	0	-0,03	0	-0,02	30	29,99	0	-0,06
	70	70,00	0	-0,01	0	0,01	30	29,98	0	0,03
	70	70,07	0	-0,04	0	-0,02	30	30,00	0	-0,06

A09	60	59,99	0	-0,04	0	-0,02	40	39,98	0	-0,05
	60	59,99	0	-0,04	0	-0,03	40	39,99	0	-0,07
	60	59,99	0	-0,02	0	0,00	40	39,97	0	0,02
A10	50	50,02	0	-0,02	0	-0,01	50	49,98	0	-0,04
	50	49,98	0	0,00	0	-0,01	50	49,99	0	0,00
	50	49,98	0	-0,02	0	-0,01	50	49,99	0	-0,03
A11*	80	79,93	0	0,00	5	5,01	15	14,98	0	0,08
	80	79,98	0	-0,01	5	4,99	15	15,00	0	0,02
	80	79,99	0	-0,02	5	4,99	15	15,00	0	0,01
A12	80	79,97	0	0,01	15	15,01	5	4,99	0	0,08
	80	79,97	0	0,02	15	15,02	5	4,98	0	0,09
	80	79,97	0	0,01	15	15,01	5	4,99	0	0,09
A13	70	69,98	0	0,01	15	15,00	15	14,99	0	0,08
	70	69,97	0	0,01	15	15,00	15	14,99	0	0,07
	70	70,01	0	0,01	15	15,00	15	14,99	0	0,06
A14 *	60	59,98	0	0,01	30	29,99	10	10,00	0	-0,01
	60	59,91	0	0,01	30	30,00	10	9,99	0	0,10
	60	59,88	0	0,04	30	30,01	10	9,98	0	0,11
A15	60	59,98	0	0,04	10	10,00	30	29,99	0	0,00
	60	59,97	0	0,04	10	10,01	30	29,98	0	0,08
	60	59,97	0	0,02	10	9,99	30	29,99	0	0,00
A16	0	0,03	0	0,01	10	10,00	0	-0,01	90	89,85
	0	0,02	0	-0,04	10	9,98	0	0,01	90	89,72
	0	0,02	0	0,00	10	10,00	0	0,00	90	89,82
A17 *	0	-0,08	0	0,05	30	30,01	0	-0,02	70	69,98
	0	-0,10	0	0,06	30	30,02	0	-0,02	70	69,98
	0	-0,19	0	0,09	30	30,03	0	-0,03	70	70,04
A18	0	0,04	0	-0,01	50	49,96	0	0,00	50	49,98
	0	0,05	0	0,00	50	49,97	0	-0,01	50	50,01

	0	0,04	0	0,02	50	49,98	0	-0,01	50	50,05
A19 *	0	0,03	0	0,00	0	0,01	10	10,00	90	89,87
	0	-0,04	0	0,03	0	0,02	10	9,99	90	89,94
	0	0,06	0	-0,01	0	0,00	10	10,00	90	89,83
A20	0	-0,07	0	0,06	0	-0,01	30	29,97	70	69,85
	0	-0,07	0	0,03	0	-0,02	30	29,98	70	69,81
	0	-0,10	0	0,04	0	-0,03	30	29,97	70	69,83
A21*	0	0,01	0	0,03	0	0,01	50	49,96	50	49,95
	0	0,08	0	0,00	0	0,01	50	49,97	50	49,92
	0	0,03	0	0,01	0	0,01	50	49,96	50	49,97
A22	0	0,05	0	-0,01	10	10,01	10	9,99	80	79,84
	0	0,04	0	-0,01	10	10,00	10	10,00	80	79,86
	0	0,03	0	-0,01	10	10,01	10	9,99	80	79,87
A23 *	0	0,05	0	0,00	10	10,01	20	19,98	70	69,87
	0	0,04	0	0,01	10	10,01	20	19,99	70	69,90
	0	0,04	0	0,01	10	10,00	20	19,99	70	69,91
A24	0	0,01	0	0,01	20	19,98	10	10,00	70	69,81
	0	0,01	0	0,02	20	19,99	10	9,99	70	69,86
	0	0,00	0	0,00	20	19,97	10	10,01	70	69,78
A25 *	0	0,09	0	-0,03	20	19,98	20	20,00	60	59,88
	0	0,12	0	-0,04	20	19,98	20	20,00	60	59,86
	0	0,09	0	-0,02	20	19,99	20	20,00	60	59,90
A26 *	60	60,02	10	10,04	30	29,96	0	0,01	0	-0,22
	60	60,02	10	10,04	30	29,96	0	0,01	0	-0,23
	60	60,09	10	10,01	30	29,94	0	0,02	0	-0,28
A27 *	40	40,05	30	29,96	30	29,97	0	0,00	0	-0,06
	40	40,05	30	29,96	30	29,97	0	0,00	0	-0,06
	40	40,08	30	29,94	30	29,96	0	0,01	0	-0,12
A28	20	19,98	50	49,95	30	29,98	0	0,01	0	-0,05

	20	19,98	50	49,94	30	29,97	0	0,01	0	-0,08
	20	20,00	50	49,94	30	29,98	0	0,01	0	-0,08
A29	0	-0,01	70	69,91	30	29,97	0	0,00	0	-0,10
	0	-0,01	70	69,92	30	29,98	0	0,00	0	-0,10
	0	-0,01	70	69,91	30	29,97	0	0,00	0	-0,12
A30	60	59,97	10	10,01	0	0,01	30	29,98	0	0,03
	60	59,98	10	10,01	0	0,01	30	29,99	0	0,02
	60	60,00	10	9,96	0	-0,02	30	30,00	0	-0,10
A31	40	39,97	30	29,92	0	-0,02	30	30,00	0	-0,10
	40	39,96	30	29,93	0	-0,02	30	30,00	0	-0,12
	40	39,97	30	29,95	0	-0,01	30	29,99	0	-0,06
A32*	20	20,05	50	49,94	0	0,00	30	30,00	0	-0,10
	20	20,02	50	49,95	0	0,01	30	29,99	0	-0,05
	20	20,05	50	49,94	0	0,00	30	30,00	0	-0,08
A33 *	0	-0,13	70	69,85	0	0,00	30	29,92	0	0,09
	0	-0,33	70	69,78	0	0,01	30	29,85	0	0,29
	0	-0,40	70	69,76	0	0,02	30	29,83	0	0,34
A34 *	60	60,01	20	19,97	0	0,00	20	20,00	0	0,09
	60	59,99	20	19,97	0	0,00	20	20,00	0	0,29
	60	59,91	20	20,00	0	0,02	20	19,99	0	0,34
A35 *	40	39,97	40	39,97	0	0,01	20	19,99	0	0,09
	40	39,89	40	40,01	0	0,02	20	19,98	0	0,29
	40	39,91	40	40,00	0	0,02	20	19,99	0	0,34
A36	40	39,99	20	19,97	0	0,00	40	39,99	0	-0,02
	40	40,01	20	19,97	0	0,00	40	39,99	0	0,00
	40	40,00	20	19,96	0	-0,01	40	39,99	0	-0,02
A37	20	20,00	40	39,89	0	0,00	40	39,99	0	-0,15
	20	19,99	40	39,89	0	0,00	40	39,99	0	-0,11
	20	20,00	40	39,89	0	0,00	40	39,99	0	-0,10

A38	60	59,97	20	19,99	20	20,00	0	0,00	0	0,04
	60	59,99	20	19,97	20	20,00	0	0,00	0	0,00
	60	59,98	20	19,96	20	19,98	0	0,01	0	-0,01
A39 *	40	40,08	40	39,92	20	19,99	0	0,01	0	-0,12
	40	39,99	40	39,96	20	20,00	0	0,01	0	-0,02
	40	40,07	40	39,92	20	20,00	0	0,00	0	-0,07
A40	40	39,99	20	19,94	40	39,96	0	0,02	0	-0,08
	40	39,99	20	19,95	40	39,97	0	0,01	0	-0,02
	40	40,01	20	19,96	40	39,98	0	0,01	0	-0,04
A41 *	20	20,05	40	39,95	40	39,96	0	0,01	0	-0,05
	20	20,08	40	39,93	40	39,95	0	0,00	0	-0,09
	20	20,03	40	39,95	40	39,97	0	0,00	0	-0,04
A42 *	60	60,05	20	19,96	5	4,98	15	15,00	0	-0,07
	60	60,06	20	19,95	5	4,98	15	15,01	0	-0,09
	60	60,06	20	19,95	5	4,98	15	15,00	0	-0,07
A43 *	40	40,04	40	39,95	15	14,98	5	5,00	0	-0,06
	40	40,05	40	39,94	15	14,99	5	5,00	0	-0,07
	40	40,05	40	39,94	15	14,98	5	5,00	0	-0,05
A44	40	39,98	20	19,98	30	29,98	10	10,00	0	-0,03
	40	39,96	20	20,01	30	30,00	10	9,98	0	0,10
	40	39,98	20	19,98	30	29,98	10	10,00	0	0,01
A45	20	19,98	40	39,97	10	9,99	30	30,00	0	-0,03
	20	19,96	40	39,94	10	9,98	30	30,00	0	-0,07
	20	19,98	40	39,94	10	9,98	30	30,00	0	-0,05
<b>Média ER%</b>		0,08		0,17		0,09		0,06		0,16

\* Amostras do conjunto de previsão externa

ER – Erro relativo

### 2.2.3 Abordagens Quimiométricas

As análises quimiométricas foram realizadas por MCCs usando MATLAB R2012b, por PLS-DA e pelo método de regressão PLS usando Pirouette 4.0, Infometrix.

#### 2.2.3.1 Cartas de Controle Multivariadas

Este é um método multivariado baseada no *Net Analyte Signal* (NAS) que separa o sinal instrumental em três partes: sinal analítico líquido (NAS), sinal do interferente e sinal dos resíduos. Para cada parte, é construído um gráfico de controle baseado em um conjunto de amostras de calibração (analito mais matriz) que definem a condição no qual o processo ou produto encontram-se sob controle. O objetivo das MCCs é separar a variação analítica e sistemática da variação da matriz. Mais detalhes sobre cartas de controle multivariadas podem ser obtidas no artigo publicado por Skibsted et. al, 2005<sup>131</sup>. Quinze amostras foram usadas para calibrar as cartas e 5 amostras puras (amostras sem o analito) foram usadas para construir a carta de interferentes. Antes da construção das cartas, os espectros de infravermelho foram suavizados (15 pontos por janela, polinômio de 1ª ordem) e aplicada 1ª derivada (15 pontos por janela, polinômio de 2ª ordem, 1ª derivada) pelo algoritmo de Savitzky-Golay.

Foram utilizadas três diferentes misturas como conjunto de calibração: (a) 70% de biodiesel de soja e 30% de biodiesel de sebo bovino; (b) 70% de biodiesel de soja e 30% de biodiesel de banha; e (c) 70% de biodiesel de soja, 15% de biodiesel de sebo bovino e 15% de biodiesel de banha. A carta NAS foi construída para representar o conteúdo de biodiesel de gordura animal; a carta de interferentes foi construída para representar a variação da matriz amostral; e a carta de resíduos a variação não sistemática restante. Foi selecionada a região do infravermelho médio 1500-900  $\text{cm}^{-1}$  para construção das cartas de controle multivariadas, região esta que compreende a impressão digital, onde as bandas vibracionais estão correlacionadas a ligações moleculares únicas ou grupos funcionais importantes para a identificação dos compostos<sup>167</sup>.

### 2.2.3.2 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

O PLS-DA é uma variação do algoritmo de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), onde as variáveis da matriz  $\mathbf{X}$  (dados espectrais) são relacionadas com a propriedade de interesse categórica (discreta) contidas em um vetor  $\mathbf{y}$ <sup>168</sup>. O vetor  $\mathbf{y}$  é constituído por valores inteiros (0 e 1), onde 0 é usado para classe que não tem interesse e 1 para a classe de interesse<sup>169</sup>. Idealmente, os valores previstos pelo modelo PLS-DA seriam 0 ou 1, mas na prática os valores previstos são próximos de 0 e 1. A utilização da correção do sinal ortogonal (OSC) antes da aplicação do PLS-DA, tem como objetivo, reduzir a variação dos dados, já que a OSC está relacionada com a ideia de que grande parte da variabilidade do conjunto de dados possui baixo valor preditivo, ou seja, não está correlacionada com o parâmetro que se quer prever. Assim, é possível encontrar e remover a variabilidade do conjunto de dados que é ortogonal ao parâmetro de interesse. Inicialmente, a ferramenta propunha uma correção em que as etapas de ortogonalização e regressão eram realizadas de forma interativa<sup>170</sup>, mas posteriormente essa proposta foi modificada sendo que o número de componentes ortogonais ao parâmetro de interesse passou a ser definido antes da etapa de regressão<sup>171</sup>.

Antes da construção do modelo PLS-DA, toda a faixa espectral foi normalizada, e aplicada 1ª derivada (15 pontos por janela, polinômio de 2ª ordem, 1ª derivada) pelo algoritmo de Savitzky-Golay, e foi realizada a correção de sinal ortogonal (OSC). A divisão das amostras entre os conjuntos de calibração e predição externa seguiu a segregação sistemática alternada de um por vez ou 1:1, a partir do conjunto em ordem crescente de concentração de matéria-prima nas misturas. Nesta segregação, tomou-se o cuidado para que as amostras de maior e menor valor de concentração fizessem parte do conjunto de calibração. Assim, o conjunto de calibração foi composto por 23 amostras e o de previsão externa por 22 amostras. O limite (*threshold*) entre as classes ( $y$ ) foi atribuído resolvendo a equação:

$$(s_B^2 - s_A^2)y^2 + (2\bar{y}_B s_A^2 - 2\bar{y}_A s_B^2)y + \bar{y}_A^2 s_B^2 - \bar{y}_B^2 s_A^2 - 2s_A^2 s_B^2 \ln(P(A)_{s_B}/P(B)_{s_A}) = 0$$

Obtido pela igualdade entre o produto da função densidade e probabilidade a priori para a classe A (= 0, blendas sem o analito) e o mesmo produto da classe B (= 1, blendas com o analito presente)<sup>114</sup>. Os parâmetros  $\bar{y}_A / \bar{y}_B$  e  $S_A / S_B$  são os valores médios e desvios padrão previstos do conjunto de calibração para os modelos OSC-PLS-DA das classes A e B, respectivamente. P (A) e P (B) são as probabilidades a priori (número de elementos) das respectivas classes.

### 2.2.3.3 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

O método de regressão PLS é uma ferramenta multivariada aplicada para modelar sinais instrumentais (matrix **X**) em relação a uma resposta (**y**), otimizando a covariância entre **X** e **y** por meio das variáveis latentes e pesos<sup>172,173</sup>. Neste estudo buscou-se encontrar a máxima correlação entre, os espectros e as concentrações de biodiesel obtidos de diferentes matérias-primas. A definição do grupo de calibração e predição seguiu a mesma sistemática aplicada para os modelos PLS-DA, sendo que o número de amostras usadas na calibração e previsão foi de 23 e 22, respectivamente. O conjunto de espectros de infravermelho total, foi normalizado e aplicada 1ª derivada (15 pontos por janela, polinômio de 2ª ordem, 1ª derivada) pelo algoritmo de Savitzky-Golay, foi realizada a correção de sinal ortogonal (OSC) com uma componente. O número otimizado de variáveis latentes foi selecionado de acordo com a porcentagem variância explicada em **X** (espectros FTIR) e bloco **y** (concentração) e com a minimização do erro quadrático médio da validação cruzada (RMSECV), respeitando-se o número máximo de VLs para o número amostras de **X**, conforme a norma ASTM E 1665-17<sup>174</sup>. A exatidão dos modelos foi determinada pelo cálculo RMSECV e do erro quadrático médio previsão (RMSEP). O ajuste dos modelos PLS foi avaliado correlacionando os valores de referência versus os valores previstos pelo conjunto de previsão (**y** fit).



## 2.3 Resultados e Discussão

### 2.3.1 Grau de Conversão das Sínteses de Biodiesel

Para verificar o grau de conversão total em ésteres metílicos, bem como verificar a presença de impurezas no biodiesel produzido a partir de óleo de soja, óleo de linhaça, gordura bovina e suína, foram realizadas análises por RMN  $^1\text{H}$ . O conteúdo de ésteres para as sínteses foi de 98,5% para biodiesel de linhaça; 97,9% para biodiesel de gordura suína; 99% para biodiesel de soja; e 98,7% para biodiesel de sebo, demonstrando que todas as amostras submetidas a reação de transesterificação apresentaram adequada conversão dos triglicerídeos de ácidos graxos em ésteres metílicos, Figura 11.

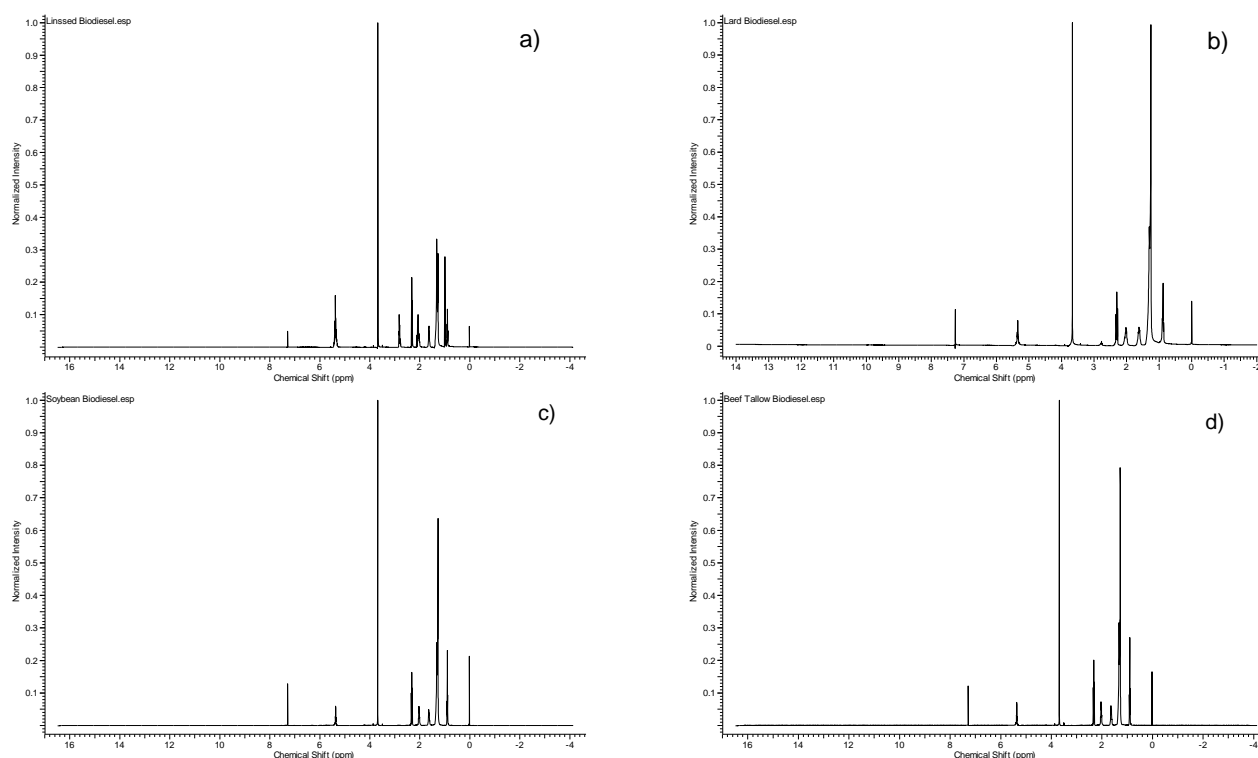


Figura 11: Espectros NMR  $^1\text{H}$  de biodiesel: (a) linhaça; (b) banha; (c) soja; (d) sebo

O cálculo foi baseado no sinal dos átomos de hidrogênio do grupo metileno adjacente ao éster carbonila ( $\alpha\text{-CH}_2$ ), que corresponde a dois átomos de hidrogênio a 2,3 ppm, não sendo adicionados aos sinais dos demais átomos de hidrogênio presentes no biodiesel e de outros intermediários de reação,

Equação 7. Portanto,  $I_{\alpha\text{-CH}_2}$  é o sinal do valor integral correspondente aos prótons do grupo metileno. Os fatores 3 e 2 são adicionados para correção das integrais de acordo com o número de átomos de hidrogênio para cada sinal. O grupo éster metílico tem três átomos de hidrogênio (-COOCH<sub>3</sub> - 3,6 ppm) e o grupo metileno adjacente ao carbonila tem dois átomos de hidrogênio ( $\alpha\text{-CH}_2$  - 2,3 ppm)<sup>102</sup>.

$$C_{ME} = 100 \left( \frac{\frac{I_{ME}}{3}}{\frac{I_{\alpha\text{-CH}_2}}{2}} \right) \quad \text{Equação 7}$$

### 2.3.2 Espectros FTIR das Amostras Puras

A Figura 12 mostra o espectro infravermelho para os quatro biodiesel puros e o óleo de soja. A faixa de absorção na região de 1200-1100 cm<sup>-1</sup> e em torno de 1750 cm<sup>-1</sup> está associada ao estiramento das ligações C-O e C=O, respectivamente, enquanto as bandas de absorção na região em torno de 3000-2800 cm<sup>-1</sup> estão associadas as ligações de C-H da cadeia saturada. A faixa de absorção em torno de 3050 cm<sup>-1</sup> está relacionada com as ligações de C-H dos carbonos insaturados, sendo a principal diferença entre o biodiesel de fonte vegetal (soja e linhaça) que apresentam maiores teores de carbonos insaturados do que o biodiesel de fonte animal (banha e sebo bovino). Além disso, as bandas de absorção na faixa de 1450-1150 cm<sup>-1</sup> estão associadas às ligações C-C = O (-O) e C-C-O.

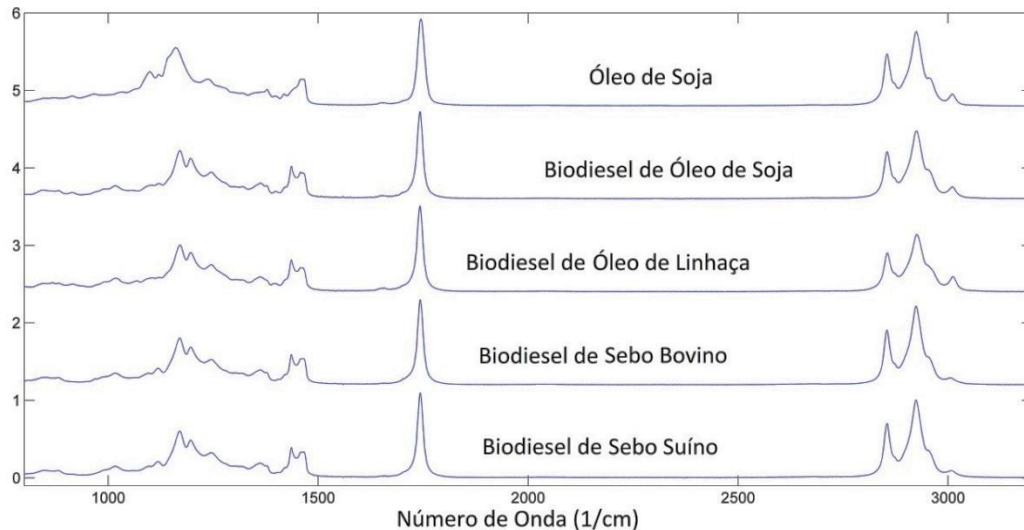


Figura 12. Espectros brutos de óleo de soja e biodiesel provenientes de diferentes matérias-primas.

### 2.3.3 Cartas de Controle Multivariadas (MCCs)

As MCCs foram construídas para avaliar a sua potencialidade em quantificar o teor de biodiesel de gordura animal em diferentes matérias-primas, bem como da adulteração do biodiesel com óleo de soja. Três cartas foram construídas: sinal analítico líquido (NAS), carta de interferentes e carta de resíduos. A Figura 13 apresenta as cartas (a) NAS, (b) interferentes e (c) resíduos com conjunto de calibração (círculos) com 70% de biodiesel de soja, 15% biodiesel de sebo bovino e 15% biodiesel de banha e o conjunto de validação (asteriscos) com as 45 misturas apresentadas na Tabela 3. Os limites inferior e superior da NAS são as linhas horizontais com valores de  $4,353 \times 10^{-5}$  e  $4,805 \times 10^{-5}$ , enquanto que o limite para as cartas de interferentes e resíduos são de 4,6 e  $3,646 \times 10^{-6}$ , respectivamente. Foi retido 1 componente principal para a construção das MCCs.

De acordo com a Figura 13, todas as amostras de calibração (círculos) mostram valores de NAS, interferentes e resíduos dentro dos limites das três cartas, como esperado. Por outro lado, as amostras de validação possuem diferentes comportamentos relacionados ao conteúdo de gordura animal e composição da mistura. Na carta NAS, as misturas de biodiesel de soja e gordura animal (A01-A15) apresentaram valores crescentes de NAS de acordo com o

crescente teor de biodiesel de gordura animal: 10 a 20% de biodiesel de gordura animal (A01, A02, A06, A07, A11 e A12) apresentaram valor NAS, abaixo do limite; 30% do conteúdo biodiesel de gordura animal (A03 e A08) estão dentro dos limites (com uma excessão, A13 que está no terceiro conjunto de calibração); 40 e 50% (A04, A05, A09, A10, A14 e A15) possuem valores NAS acima do limite. Todas as misturas de linhaça e biodiesel de gordura animal estão abaixo do limite inferior da carta NAS, mesmo aquelas que possuem conteúdo de 40 e 50% de biodiesel de gordura animal, revelando que a mudança de soja por linhaça no conjunto de validação levou a uma modificação espectral capaz de alterar os valores de NAS dessas amostras. No entanto, esta mudança na matéria-prima não modificou o padrão crescente do valor de NAS associada ao conteúdo de biodiesel de gordura animal, o que também foi demonstrado nas misturas de biodiesel de soja.

Por outro lado, as misturas adulteradas de óleo de soja apresentam um padrão crescente relacionado não apenas ao teor de biodiesel de gordura animal, mas também ao aumento da proporção de óleo de soja. Além disso, as misturas com 40% de teor de óleo de soja (A37, A39, A41, A43 e A45) apresentaram maior valor de NAS do que as misturas com 40% de biodiesel de gordura animal (A34, A36, A38, A40, A42 e A44), o que mostra que o teor de óleo de soja está relacionado a um aumento do valor do NAS maior que o aumento do conteúdo de biodiesel de gordura animal.

Finalmente, os três conjuntos de calibração avaliados apresentaram resultados quase idênticos na carta NAS. O mesmo padrão de validação (Figura 13a) ocorreu mesmo com diferentes conjuntos de calibração, mostrando que diferentes matérias-primas de gordura animal, (sebo e banha) em conjuntos de calibração não influenciaram significativamente os padrões de NAS nas amostras de validação, com a excessão da amostra A13 que estava dentro dos limites na calibração (a) e (b). Além disso, as misturas de biodiesel de sebo bovino e banha apresentam padrões NAS similares com diferentes matérias-primas vegetais, o que pode ser explicado devido a sua semelhante composição de ácidos graxos, ambas possuem alto teor de ácido esteárico (C18: 0), ácido palmítico (C16: 0) e ácido mirístico (C14: 0).

A carta de interferentes (Figura 13b) representa a variação da matriz, que é, neste caso, a composição do biodiesel de soja. Portanto, a modificação

do conteúdo de biodiesel de soja (A01 - A15), sua mudança pelo biodiesel de linhaça (A16 - A25) e sua adulteração com óleo de soja (A26 - A46) devem ser destacadas na carta de interferentes. As misturas de biodiesel de soja e gordura animal (A01 - A15) estão todas abaixo do limite, mostrando que a proporção de biodiesel de soja não está mudando significativamente. Todas as amostras deveriam ser consideradas dentro da carta controle, porém as amostras 2, 6, 7, 8, 11, 12 e 13 ficaram levemente acima do limite para essa carta, esta diferença entre as amostras de calibração e validação, pode ter ocorrido em função do preparo das amostras ou análise no infravermelho.

As amostras 18, 21 e 25 deveriam ter ficado acima do limite, pois o biodiesel de soja foi substituído por biodiesel de linhaça, porém ficaram abaixo do limite, sendo que todas as amostras desse subconjunto ficaram muito próximas das amostras do conjunto de calibração. As misturas de linhaça (A16 - A25) e as misturas adulteradas de óleo de soja (A26 - A45) estão todas acima do limite, como esperado, sendo que o valor do interferente aumenta intensamente e gradualmente à medida que aumenta a quantidade de óleo de soja na blenda. As misturas de linhaça têm um valor interferente menor do que as misturas adulteradas de óleo de soja, pois sua composição é mais semelhante ao biodiesel de soja do que o óleo, o que pode ser facilmente visualizado na Figura 12. A carta de resíduos mostra todas as informações que não foram modeladas pelas duas cartas de controle anteriores (NAS e carta de interferentes). Semelhante a carta de interferentes, a carta de resíduos (Figura 13c) destaca as misturas com substituição parcial do biodiesel de soja e de sebo bovino pelo biodiesel de linhaça ou adulteradas com óleo de soja. Desta forma, as MCCs avaliaram o conteúdo de mistura de gordura animal na carta NAS. Entretanto, não houve diferença entre o biodiesel de gordura animal proveniente de diferentes matérias-primas (banha e sebo bovino), uma vez que os três grupos de calibração apresentaram resultado quase idêntico. Além disso, a carta NAS não modelou toda a informação do conteúdo de biodiesel de gordura animal porque o padrão representado na carta de interferentes para os três conjuntos de calibração mostrou não apenas a variação sistemática da matriz, mas também a variação do conteúdo de biodiesel de gordura animal. A carta de interferentes também não modelou toda a variação da matriz, uma vez que essas informações estão descritas na carta de resíduos. Esses resultados podem ser

devido à similaridade entre a composição do biodiesel de banha e sebo, no caso da carta NAS, e as misturas que apresentaram grande variabilidade de conteúdo. O número de componentes principais utilizados para a construção das MCCs também foi alterado, mas a adição de mais informações não contribuiu para a interpretação dos resultados.

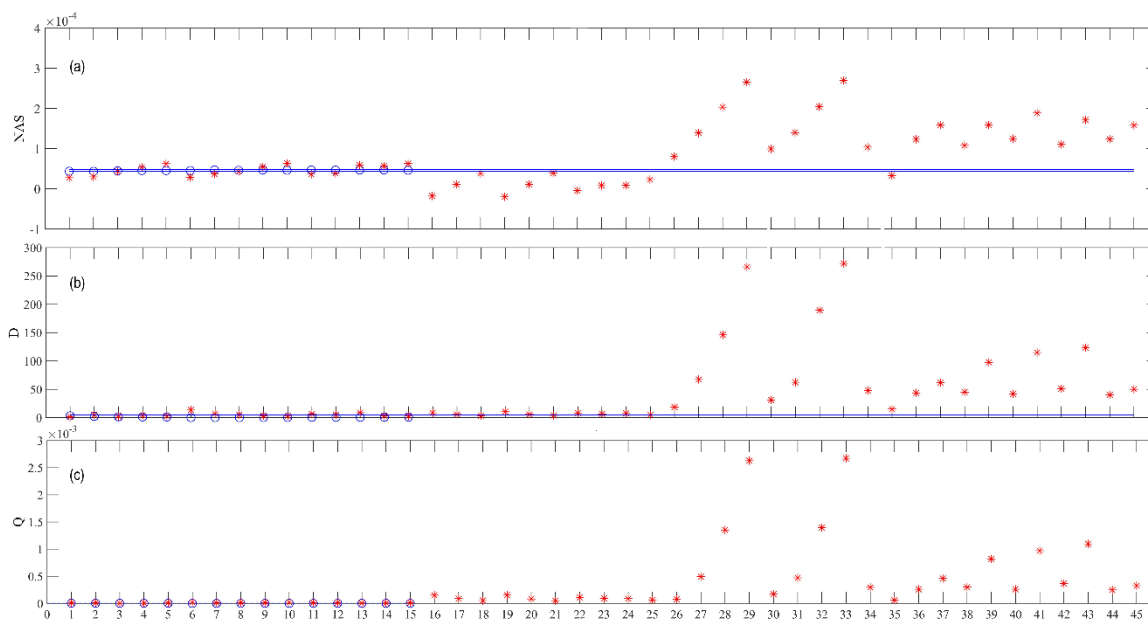


Figura 13. (a) Carta de controle - NAS, (b) de Interferentes e (c) de Resíduos. Amostras de calibração (o) e Amostras de validação (+), com base nos espectros de ATR-FTIR.

#### 2.3.4 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

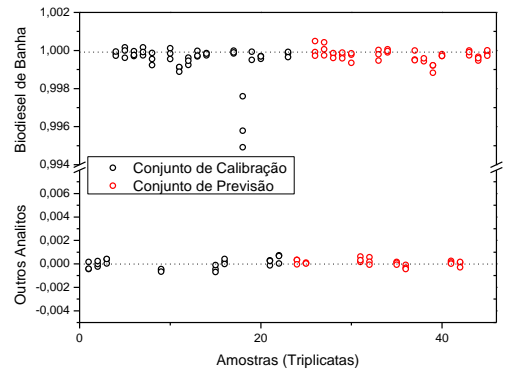
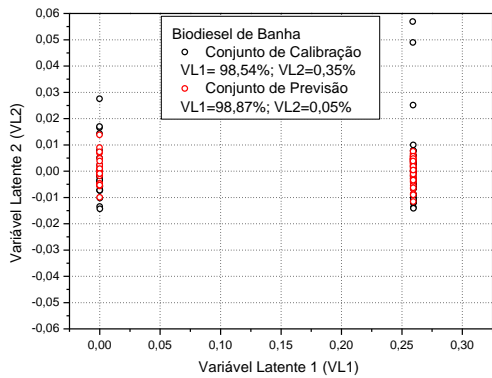
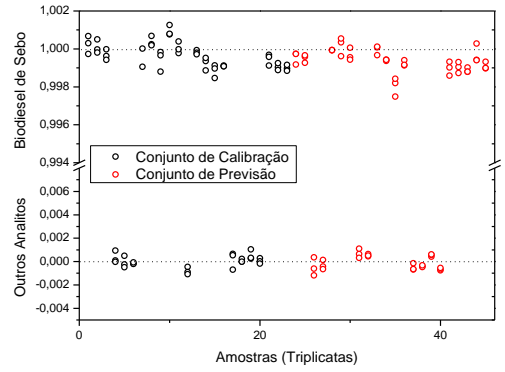
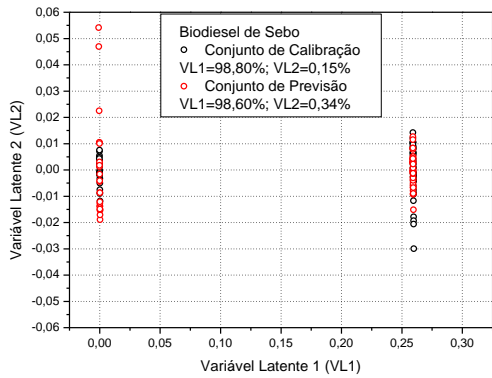
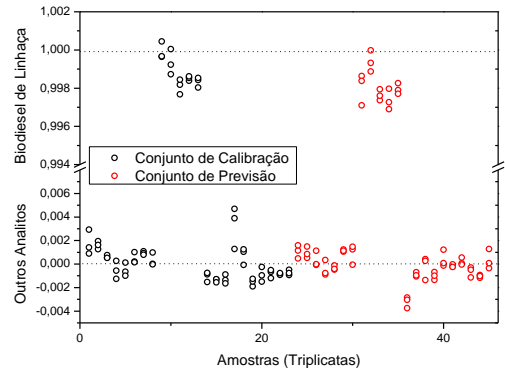
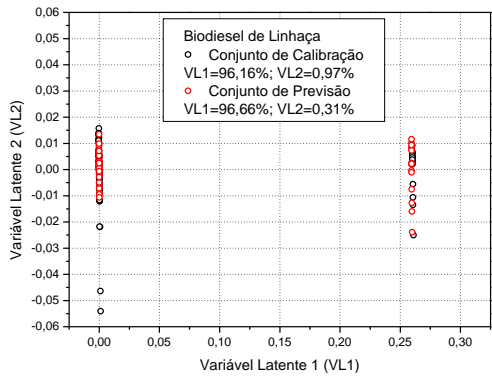
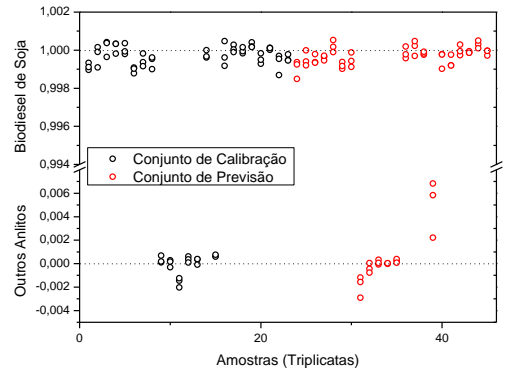
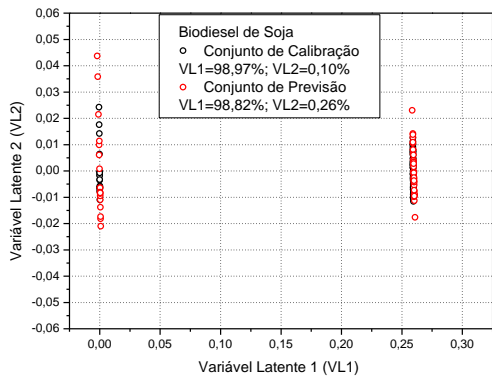
A tabela 4 apresenta os resultados obtidos para o modelo PLS-DA, onde foi realizado o pré- tratamento do conjunto de espectros através da primeira derivada, para correção da linha de base, seguido pela utilização da OSC, com o objetivo de classificar misturas B100, de diferentes matérias-primas e um adulterante. Para todos os biodieseis testados provenientes de diferentes matérias primas, e o adulterante óleo de soja, a primeira variável latente acumulou entre de 96-99% da variância original dos dados. A completa separação entre amostras positivas e negativas para a presença de cada analito nas misturas testadas ocorreu ao nível de LV1 (figura 14). Desta maneira, todos os cinco modelos FTIR-ATR/OSC-PLS-DA forneceram 100% de sensibilidade,

de especificidade e de acurácia, para todos os analitos. A combinação entre a primeira derivada e a OSC foi adequada para o estudo proposto assim como método PLS-DA. Figuras de mérito RMSECV, Rcv<sup>2</sup>, RMSEP e Rp<sup>2</sup> reforçam a qualidade dos modelos obtidos.

Tabela 4. Figuras de mérito dos modelos OSC-PLS-DA de diferentes misturas de biodiesel produzido com diferentes matérias-primas, e o adulterante óleo de soja analisado por ATR-FTIR.

Parâmetros de modelagem PLS-DA	Analitos				
	Biodiesel de soja	Biodiesel de linhaça	Biodiesel de sebo	Biodiesel de banha	Óleo de soja
<b>Calibração</b>					
LV <sup>(a)</sup>	1	1	1	1	1
Variância (%)	98,82	96,66	98,60	98,87	98,33
RMSECV <sup>(b)</sup> (%)	0,0006	0,0014	0,0007	0,0009	0,0010
Rcv <sup>2</sup> <sup>(c)</sup>	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999
<i>Threshold</i> (limite)	0.6270	0.6359	0.4478	0.2896	0.2592
<b>Predição</b>					
LV <sup>(a)</sup>	1	1	1	1	1
Variância (%)	98,97	96,16	98,80	97,28	98,04
RMSEP <sup>(d)</sup> (%)	0,001	0,001	0,0008	0,0004	0,0005
Rp <sup>2</sup> <sup>(e)</sup>	0,999	0,999	0,999	1,00	0,999

<sup>a</sup>LV= Variável latente; <sup>b</sup>RMSECV= Erro Quadrático Médio de Validação Cruzada <sup>c</sup>Rcv<sup>2</sup> = coeficiente de determinação da validação cruzada ; <sup>d</sup>RMSEP= Erro Quadrático Médio de Predição; <sup>e</sup>Rp<sup>2</sup> = coeficiente de determinação de predição





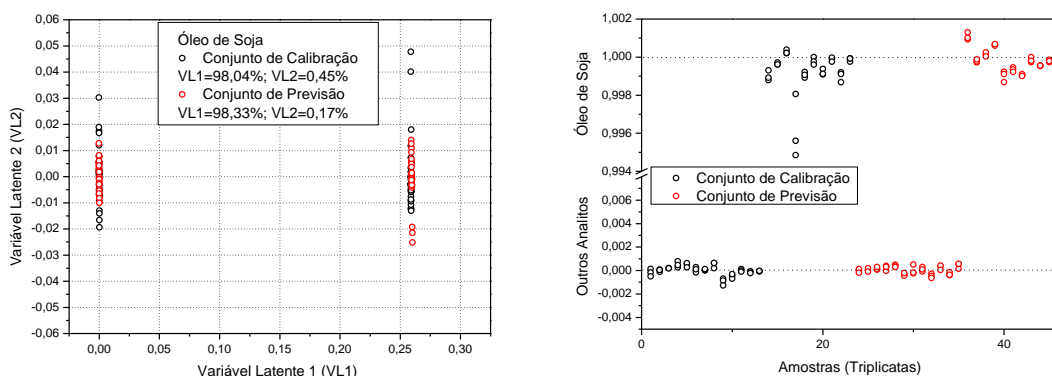


Figura 14. À esquerda: Gráficos de escores em LV1 versus LV2 para os conjuntos de calibração e de predição dos modelos ATR/OSC-PLS-DA para os diferentes componentes das blendas de biodiesel de soja, linhaça, sebo, banha e adulterante óleo de soja. À direita: representação de valores de referência versus valores preditos dos respectivos modelos.

Três regiões mais significativas para a separação das misturas pelo método PLS-DA se destacam no gráfico de *loadings*, Figura 15: i) a região entre 1800 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ , é atribuída ao estiramento da carbonila C=O e a vibração C=C; ii) e a região espectral entre 1500-1150  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento C-O e C-C, e também é o início da região do “finger print”. Já a região entre 3100 e 2700  $\text{cm}^{-1}$  que também aparece nos loadings, corresponde ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H dos carbonos  $\text{sp}^2$  e  $\text{sp}^3$  <sup>175,176</sup>. As regiões selecionadas correspondem as cadeias de ésteres nos biodieseis investigados, e a cadeia de triacilglicerídeo em óleo de soja.

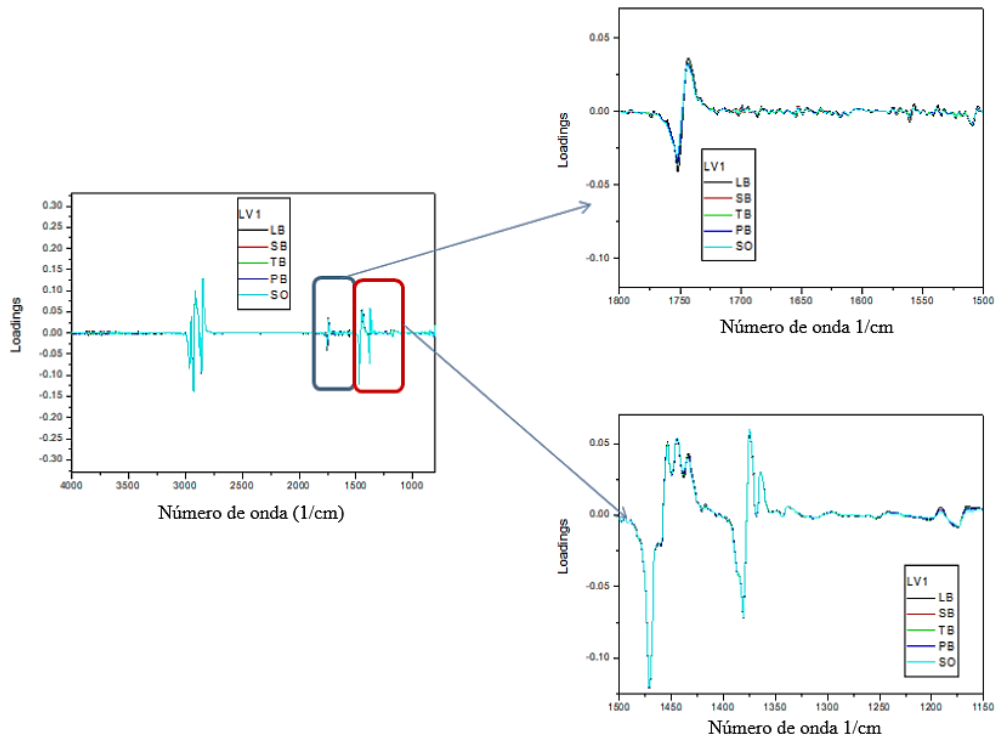


Figura 15. *Loadings* para LV1 para os cinco modelos OSC-PLS-DA de classificação de misturas de biodiesel de soja, linhaça, sebo e banha e adulterante óleo de soja, com destaque para as regiões 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$  e 1500-1150  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.3.5 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Modelo PLS otimizados, para os diferentes analitos estudados, foram definidos com uma variável latente, onde o acúmulo de variância em LV1 ficou acima de 96% (Tabela 5) após a aplicação de 1 componente de OSC. Estes valores são decorrentes da homogeneidade na natureza química entre as amostras analisadas, ou seja, mesmos ésteres metílicos, porém em proporções diferentes, à exceção do óleo de soja. Embora a partir de duas variáveis latentes os valores de RMSECV e RMSEP diminuam, e demonstrem uma tendência a estabilizar, a partir da quarta variável latente (VL) a análise dos gráficos de loadings indica ruído espectral nesta modelagem. LV1 discriminou as amostras em ordem crescente de concentração (Figura 16, à esquerda) e o comportamento foi similar no conjunto de calibração (CC) e conjunto de predição

(CP). Este resultado ressalta a representatividade similar de variância espectral em LV1 entre os dois conjuntos correlacionada com as respectivas concentrações de cada analito. Os valores de RMSECV para todos os analitos testados está entre 0,019 % w/w e 0,103 % w/w sendo o menor erro de calibração para o biodiesel de sebo, e o maior para a linhaça. Valores de RMSEP acompanharam os valores de RMSECV e se situaram entre 0,009 % w/w para o biodiesel de banha, o maior 0,105% w/w também para o biodiesel de linhaça. Os valores de predição para o modelo PLS são descritos na Tabela 3.

Os principais erros nos grupos de validação e previsão ocorrem em amostras de biodiesel produzidas a partir de óleo de linhaça. Isso pode ser explicado porque o biodiesel de linhaça tem mais de 50% de metil linolenato em sua composição, um éster em baixas concentrações ou ausente nos demais biodiesels estudados. Portanto, as regiões que caracterizam biodiesel de óleo de linhaça, sinais espectrais nas regiões de 3000–3050  $\text{cm}^{-1}$  (vCH vinil) e 1600–1610  $\text{cm}^{-1}$  (vC=C)<sup>177</sup> não são relevantes para a realização do modelo. Mesmo com tal limitação, é possível afirmar que o modelo tem o potencial de quantificar matérias-primas ou interferentes com estas características.

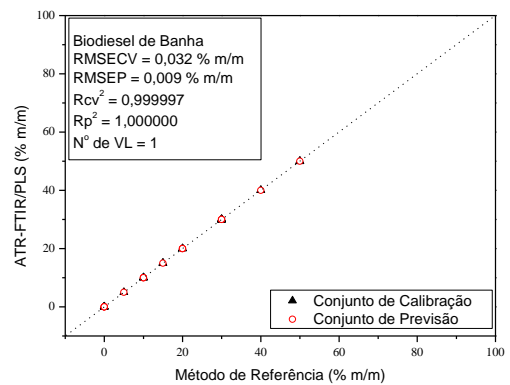
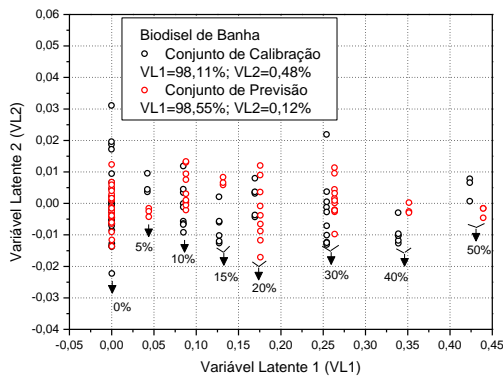
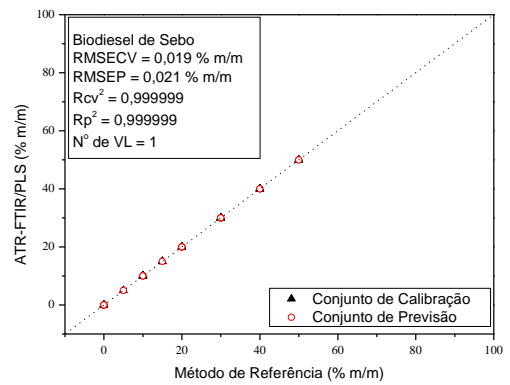
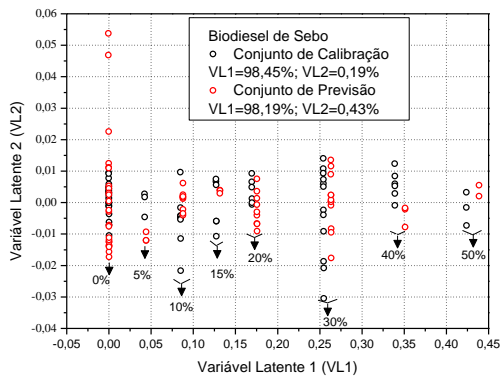
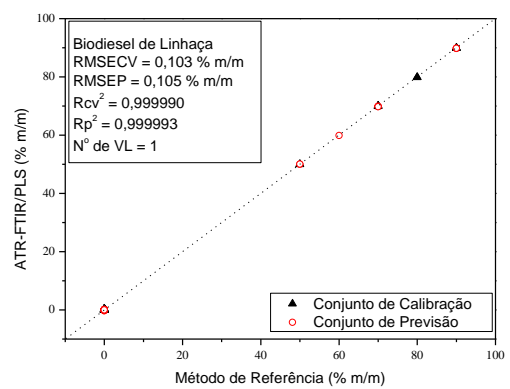
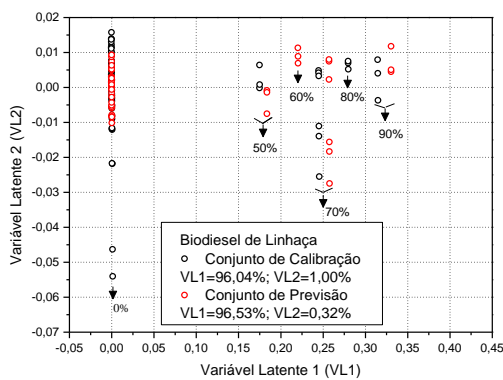
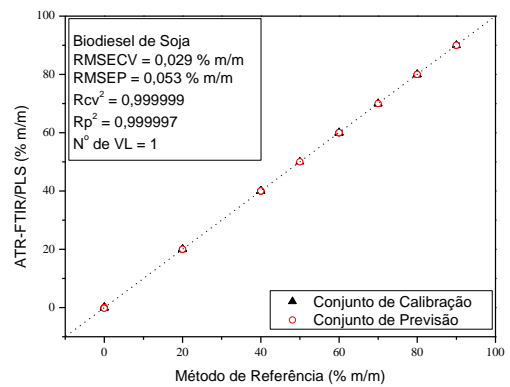
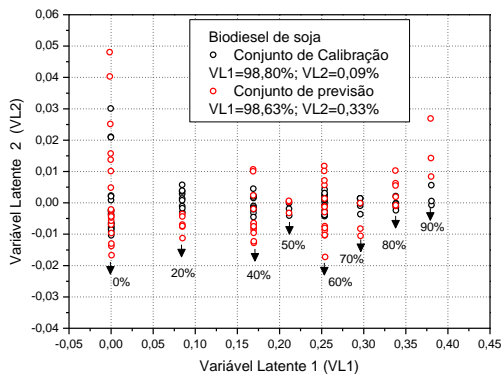
A classificação de matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel é extremamente importante, pois os óleos vegetais de diferentes fontes têm composições de ácidos graxos diferentes, além de apresentarem diferenças quando comparados com a gordura animal. Tais características irão se refletir diretamente sobre as propriedades do biodiesel, como a presença de éster de metil linolenato, que interfere na estabilidade oxidativa. Essa estabilidade está principalmente relacionada ao número de grupos bis-alil metileno adjacentes ao duplo vínculo<sup>178</sup>. Além da susceptibilidade à oxidação, esta característica também resulta em um menor número de cetano, que caracteriza a qualidade da ignição. Um baixo número de cetano causa dificuldade em produzir combustão no momento da ignição<sup>179</sup>.

Tabela 5. Figuras de mérito dos modelos PLS de diferentes misturas de biodiesel produzido com diferentes matérias-primas, e o adulterante óleo de soja analisado por ATR-FTIR.

Parâmetros de modelagem PLS	Analitos				
	Biodiesel de soja	Biodiesel de linhaça	Biodiesel de sebo	Biodiesel de banha	Óleo de soja
<b>Calibração</b>					
LV <sup>(a)</sup>	1	1	1	1	1
Variância (%)	98,62	96,26	98,19	98,55	97,91
RMSECV <sup>(b)</sup> (%)	0,029	0,103	0,019	0,032	0,061
Rcv <sup>2</sup> <sup>(c)</sup>	0,999	0,999	0,999	0,999	0,999
DPR (%) <sup>(d)</sup>	0,07	0,66	0,13	0,21	0,42
Faixa (%)	0-90	0-90	0-50	0-50	0-70
<b>Predição</b>					
LV <sup>(a)</sup>	1	1	1	1	1
Variância (%)	98,80	96,03	98,45	98,10	97,61
RMSEP <sup>(e)</sup> (%)	0,053	0,105	0,020	0,009	0,038
Rp <sup>2</sup> <sup>(f)</sup>	0,999	0,999	0,999	1,000	0,999
DPR (%) <sup>(d)</sup>	0,26	0,68	0,14	0,06	0,25
Faixa (%)	0-90	0-90	0-50	0-50	0-70

<sup>a</sup>LV= Variável latente; <sup>b</sup>RMSECV= Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada <sup>c</sup>Rcv<sup>2</sup> = coeficiente de determinação da validação cruzada ; <sup>d</sup>DPR =Desvio padrão relativo ; <sup>e</sup>RMSEP= Erro Quadrático Médio de Predição; <sup>f</sup>Rp<sup>2</sup> = coeficiente de determinação de predição

Características semelhantes são atribuídas ao biodiesel de soja, que contém 80-85% de ésteres insaturados, caracterizado principalmente por altos níveis de ácidos linoléico e linolênico<sup>180,181</sup>. Por outro lado, a presença de gordura animal confere ao biodiesel um alto grau de cetano devido ao maior percentual de saturação das cadeias<sup>182</sup>, contribuindo também para uma maior estabilidade oxidativa<sup>85</sup>.



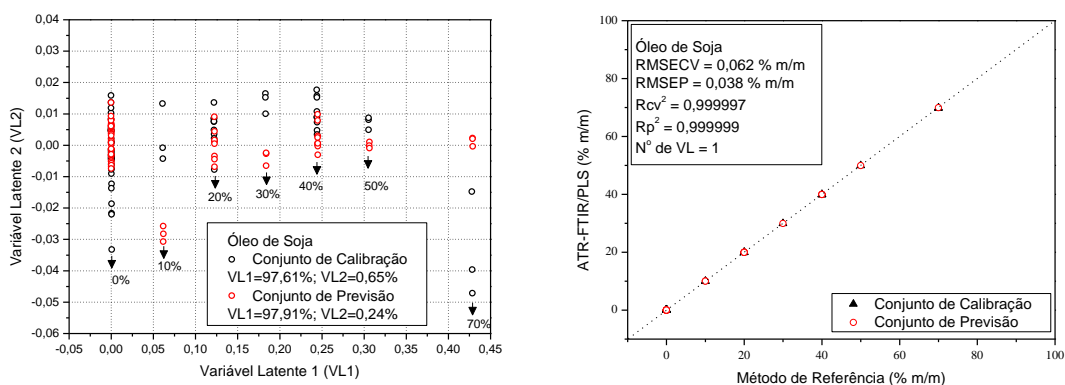


Figura 16. À esquerda: Gráficos de escores em LV1 *versus* LV2 para os conjuntos de calibração e de predição dos modelos ATR/OSC-PLS para os diferentes componentes das blendas de biodiesel de soja, linhaça, gordura bovina, gordura suína e adulterante óleo de soja. À direita: representação de valores de preditos *versus* valores de referência dos respectivos modelos e figuras de mérito.

A viscosidade é uma propriedade importante do biodiesel que afeta o desempenho do motor. A viscosidade aumenta de acordo com o comprimento da cadeia de carbonos, e com o grau de saturação dos ésteres<sup>79</sup>. Isso é de particular preocupação no caso do biodiesel de sebo e banha, cuja composição apresenta alto teor de ácidos graxos com longas cadeias de carbono (C16, C18 e C20). A alta viscosidade causa a heterogeneidade na combustão do biodiesel, reduzindo a eficiência de atomização na câmara de combustão, e levando a deposição de resíduos nas partes internas do motor. Dentre as tentativas para reduzir a viscosidade está a adição de adulterantes como óleo de soja. No entanto, seu contato direto com os motores pode produzir depósitos de carbono, bloqueio do sistema de injeção, e combustão incompleta devido a sua baixa volatilidade, alta viscosidade e formação de goma que é característica de polimerização e oxidação<sup>183</sup>, tornando indispensável sua detecção em biodiesel.

As duas ferramentas de classificação quimiométrica usadas neste estudo, cartas de controle multivariados e PLS-DA, apresentaram resultados satisfatórios, indicando a presença ou ausência de diferentes matérias-primas no biodiesel, e o óleo de soja como um adulterante nas amostras estudadas.

Dentre as duas ferramentas de classificações, o PLS-DA mostrou ser mais eficaz.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) representa a variabilidade dos dados explicada pelo modelo de regressão. O  $R^2$  obtido neste estudo, indica que todos os modelos obtidos com uma LV para misturas contendo biodiesel de sebo bovino e biodiesel de banha na concentração 5–50% pode ser explicada com  $R^2 > 0,999$  ou 99,9%, confirmando que a relação entre espectros de infravermelho, o tipo de éster e a concentração destas matérias-primas, foram reconhecidos e diferenciados dos demais. O mesmo coeficiente de correlação foi obtido para as outras matérias-primas e para o adulterante de óleo de soja, indicando uma correlação ótima entre sua concentração na mistura, e o espectros de infravermelho obtidos.

A Figura 16 mostra os gráficos de correlação, em que as amostras de calibração e predição estão alinhadas em uma reta, da função de identidade. O modelo PLS obtido através de espectros de FTIR e usando uma LV é aceitável como um método analítico prático para a quantificação de biodiesel em concentrações de 5–50% (w / w) para gorduras animais (banha e sebo bovino), 20-90% (w / w) para soja, 10-90% (w / w) para linhaça, e 10–70% (w / w) e para óleo de soja usado como adulterante.

O PLS provou ser uma ferramenta com desempenho adequado para ser utilizado pela indústria dentro das faixas de concentração estudadas para as misturas de biodiesel, e óleo de soja como adulterante, possibilitando a quantificação dos cinco analitos, desde que as diferentes matérias-primas e seus respectivos percentuais estejam incluídos no conjunto de calibração. Esses resultados no futuro podem contribuir para a escolha da melhor mistura de matérias-primas de primeiro, segunda, e até terceira geração, em relação ao melhor desempenho dos motores e da região onde o biodiesel será utilizado.

### **3. Efeito da Concentração de Inóculo na Produção de Biomassa, de Proteínas Totais e na Degradação de Biodiesel de Soja por *Aspergillus niger***

#### **3.1 Objetivos**

- I) Selecionar fungos com potencial de crescimento em biodiesel de banha, soja e sebo;
- II) Quantificar e comparar a produção de biomassa e de proteínas totais sob cultivo em fase líquida bifásica de cepa fúngica selecionada sob diferentes concentrações de inóculo;
- III) Quantificar ésteres metílicos da fase orgânica do cultivo bifásico por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas;
- IV) Caracterizar a fase orgânica do cultivo bifásico por Espectroscopia de Absorção Molecular no Infravermelho com transformada de Fourier via Refletância Total Atenuada;
- V) Avaliar padrões de impressão digital metabólica da fase orgânica do cultivo bifásico utilizando Análise por Componentes Principais.

#### **3.2 Materiais e Métodos**

##### **3.2.1 Primeira Etapa: Isolamento de Micro-organismos a partir de Biodiesel de Sebo, Banha e Soja Sintetizados**

###### *3.2.1.1 Síntese do Biodiesel*

A síntese de biodiesel foi realizada por meio de reação de tranterificação com base no Processo de Transesterificação em Duas Etapas (TDSP)<sup>100</sup>, sendo sintetizado um volume de aproximadamente 1 L de biodiesel de sebo, banha e soja. O sebo foi adquirido no frigorífico Sobradinho, em Sobradinho, RS, Brasil, a gordura suína foi adquirida no comércio local, Santa Cruz do Sul, e o óleo de soja marca “Leve” foi adquirido em mercado local de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil.



### *3.2.1.2 Esterilização e Inoculação das Amostras de Biodiesel*

Todo o biodiesel produzido foi esterilizado por filtração a vácuo, utilizando membrana GS de éster de celulose 0,22 µm, Merck. Após a filtração as membranas foram retiradas e colocadas em placas de Petri de 9 cm 15 mL com os meios de cultura R2A (Agar-Heterotrófico), BDA (Ágar Batata Dextrose) e TSA (Tryptic Soy Agar). As placas foram incubadas em estufa a 30° C, por 7 dias.

### *3.2.1.3 Isolamento de Micro-organismos*

Após 7 dias de incubação as placas foram analisadas e 19 colônias microbianas com morfologias diferentes foram identificados macroscopicamente, as quais foram e reinoculadas no mesmo meio de cultura onde cresceram (foram identificados) inicialmente para purificação e posterior identificação. Novamente foi realizada a incubação das placas por 7 dias a 30°C, sendo que as colônias identificadas macroscopicamente como bactérias foram incubadas por 2 dias, enquanto que os fungos permaneceram por 7 dias. Dentre os 19 possíveis isolados, foram detectados 4 fungos filamentosos (J1, J10, J15, J18), interesse deste estudo, destes fungos foi retirada uma alçada e inoculado em frascos de vidro com capacidade de 20 mL, contendo 3 mL de biodiesel de soja ou de banha ou de sebo e 3 mL de meio mineral Bushnell-Haas<sup>184</sup> e após colocados em agitador a 30°C a 200 rpm, por 30 dias. As linhagens foram identificadas por técnicas de macro- e micromorfologia através de microcultivo.

## **3.2.2 Segunda Etapa: Inoculação em Sistema Bifásico do Fungo Filamentoso em Diferentes Concentrações.**

### *3.2.2.1 Síntese do Biodiesel*

Para esta fase foi sintetizado 2500mL de biodiesel de soja conforme item 3.2.1.1.

#### 3.2.2.2 Grau de Conversão da Síntese de Biodiesel

Análise usando RMN  $^1\text{H}$  foi realizada para verificar o grau total de conversão de ácidos graxos em ésteres metílicos, e a presença de impurezas no biodiesel <sup>102</sup>.

#### 3.2.2.3 Esterilização

O biodiesel de soja foi esterilizado através de filtragem a vácuo em kitassato, utilizando membrana GS em éster de celulose 0,22 $\mu\text{m}$ , Merck.

#### 3.2.2.4 Fase aquosa

O meio mineral Bushnell-Haas<sup>184</sup>, (1,0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2  $\text{MgSO}_4$ ; 0,02  $\text{CaCl}_2$ ; 1,0  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,05  $\text{FeCl}_3$ ; 1,0  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $\text{g.L}^{-1}$ )) foi utilizado como fase aquosa. O biodiesel foi utilizado como fonte de carbono, como descrito no item 3.2.2.1.

#### 3.2.2.5 Inoculação

O isolado J15, identificado como *Aspergillus niger* foi cultivado em meio BDA, por 7 dias. Suspensão de esporos foi obtida pela adição de 4 mL de Tween 80 0,005%. A suspensão foi diluída com 10 mL de meio mineral Bushnell-Haas<sup>184</sup> em um frasco Erlenmeyer e agitada em vórtex a 120 rpm por 10 min. A concentração de inóculo de  $10^4$  esporos. $\text{mL}^{-1}$  e  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , foi determinada por contagem dos esporos em câmara de Neubauer, e realizada a diluição necessária com água estéril. Frascos de vidro de 20 mL, contendo 3mL de biodiesel de soja, e 3mL de meio mineral Bushnell-Haas<sup>184</sup>, foram inoculados em triplicata com 100  $\mu\text{L}$  de inóculo previamente padronizado. Os frascos foram cobertos com papel alumínio para evitar foto-oxidação do biodiesel. Os experimentos foram mantidos sem agitação e no escuro, a 30°C por 8 dias. Nos tempos 1,2,3,4,5,6,7,8 três replicatas e um controle sem inoculação de cada concentração foram coletadas e congeladas.

### **3.2.3 Análise da Fase Aquosa**

#### *3.2.3.1 Produção de Biomassa*

Após descongelamento, o conteúdo de cada frasco foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1 previamente pesado e o filtrado bruto armazenado em novo frasco. O resíduo do papel de filtro foi lavado com 3 mL de hexano para remover a fase orgânica residual. As amostras de papel-filtro foram desidratadas a 30° C por 48 h seguido por 24h em dessecador. O peso seco foi registrado e a biomassa foi calculada como peso final menos o peso inicial (em miligramas), para cada triplicata.

#### *3.2.3.2 Determinação de Proteínas Totais*

O ensaio miniaturizado pelo método de Lowry modificado foi utilizado para determinar o índice de proteínas totais<sup>185</sup>. Protocolo Anexo A.

### **3.2.4 Análise da Fase Oleosa**

#### *3.2.4.1 Análise por FTIR*

O filtrado obtido no item 2.3 foi descongelado e quintuplicatas de alíquota de 10 µL da fase orgânica (sobrenadante) foi analisada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada. Os espectros foram obtidos usando o Espectrômetro Spectrum 400 FT-IR/FT-MIR (Perkin Elmer®) na faixa de 4000-650 cm<sup>-1</sup>, 4 varreduras, 4 cm<sup>-1</sup> de resolução. Para cada replicata foram obtidos 5 espectros.

#### *3.2.4.2 Quantificação de Ésteres Metílicos de Biodiesel de Soja*

A quantificação de ésteres na fase oleosa (C16, C18, C18: 1, C18: 2 e C18: 3) foi determinada durante 8 dias (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8) por cromatografia em fase gasosa (CG). O cromatógrafo em fase gasosa estava acoplado a um Detector de Espectrometria de Massas Shimadzu (CGSM-QP 2010 Ultra), com

coluna RTX-5MS 30 m; 0,25 mm ID; 0,25  $\mu\text{m}$ . Rampa de aquecimento: 60  $^{\circ}\text{C}$  por 5 min, > 60  $^{\circ}\text{C}$  – 205  $^{\circ}\text{C}$  a 5  $^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  > 205  $^{\circ}\text{C}$  – 235  $^{\circ}\text{C}$  a 1  $^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  >. Temperatura do injetor de 250  $^{\circ}\text{C}$ , temperatura da fonte de íons de 260  $^{\circ}\text{C}$ , temperatura do detector de 280  $^{\circ}\text{C}$ . Modo de injeção, Split 1:20; volume de injeção de 1  $\mu\text{L}$ . O preparo das amostras foi realizado utilizando-se 1  $\mu\text{L}$  diluído em 1 mL de hexano. Para cada metil éster analisado foi utilizado o padrão correspondente (Sigma - Aldrich).

### **3.2.5 Análise e Processamento dos Dados**

Análise univariada baseada no teste T de Tukey foi aplicada para comparar diferenças entre os valores de biomassa seca, e proteínas totais entre os dias de cultivo nas duas concentrações de esporos.

Os espectros foram normalizados, e processados pela primeira derivada (Savitzky-Golay, 5 pontos) e após realizada a Análise por Componentes Principais (PCA) utilizando Pirouette 4.0, Infometrix. Foi utilizada toda a região espectral analisada 4000-650  $\text{cm}^{-1}$ . O objetivo da PCA, é reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, através da sua representação em um novo sistema de eixos, PCs. Estes eixos são ortogonais entre si, e permitem a visualização das informações em gráficos bi- ou tridimensionais, propiciando a identificação de padrões de similaridade, e/ou diferenças existentes no conjunto de espectros analisados.

## **3.3 Resultados e Discussão**

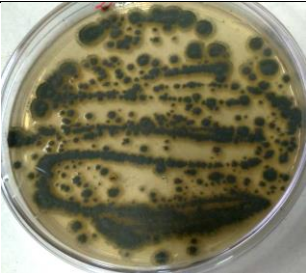

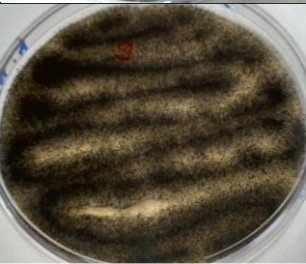
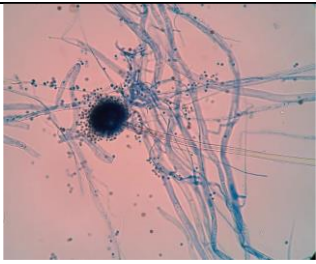
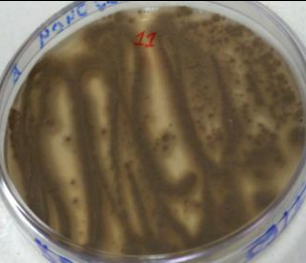
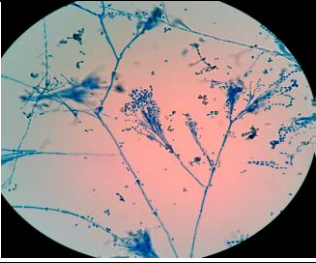

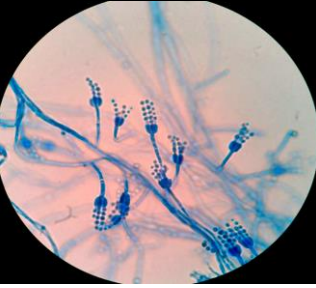
### **3.3.1 Primeira Etapa**

#### *3.3.1.1 Identificação dos Fungos Filamentosos*

Para os quatro fungos filamentosos isolados foi realizada uma primeira caracterização através do microcultivo, que somada às características macromorfológicas fenotípicas identificaram presuntivamente o isolado J1 como *Penicillium sp.*, J15 como *Aspergillus niger*, J18 como *Paecilomyces lilacinus*<sup>183</sup>

e o J10 como *Penicillium* sp. (Tabela 6). O microcultivo dos isolados J1 e J10 identificados como gênero *Penicillium* parecem apresentar corpos de frutificação diferentes, indicando diferentes espécies, porém a análise do microcultivo não foi conclusiva neste sentido.

Tabela 6. Identificação de fungos filamentosos isolados em biodiesel

Identificação	Cultivo em placa	Microcultivo
J1 – <i>Penicillium</i> sp.		
J15 – <i>Aspergillus niger</i>		
J18 – <i>Paecilomyces lilacinus</i>		
J10 – <i>Penicillium</i> sp.		

### 3.3.2 Segunda Etapa

#### 3.3.2.1 Grau de Conversão da Síntese de Biodiesel

A síntese realizada pelo método TDSP<sup>100</sup>, resultou em um biodiesel de alta taxa de conversão, fácil e clara separação entre as fases. Para verificar o grau de conversão total em ésteres metílicos, bem como verificar a presença de impurezas no biodiesel produzido a partir de óleo de soja, foi realizada a análise por RMN <sup>1</sup>H<sup>102</sup>. O conteúdo de ésteres metílicos para a síntese foi de 98,6 %, estando dentro dos parâmetros exigidos pela legislação<sup>72</sup>.

#### 3.3.2.2 Determinação de Biomassa

A avaliação do crescimento do fungo *A. niger*, foi registrada durante 8 dias para o inóculo  $10^4$  e  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>. A formação de biomassa ocorreu na interface entre a fase orgânica e a fase aquosa. A Figura 17, apresenta a sobreposição das curvas de formação de biomassa das duas concentrações de inóculo, onde é possível perceber uma similaridade no formato das curvas, que embora para a menor concentração  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>, tenha se formado uma quantidade menor de biomassa, ambas as concentrações tiveram a quantidade de biomassa aumentada em proporções muito próximas. No quarto dia ambos os inóculos apresentaram a mesma biomassa, sendo a maior diferença apresentada no sétimo dia. Entre os dias 5 e 8, ambas as concentrações de inóculo,  $10^4$  e  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>, do *A. niger* apresentam curvas na fase exponencial, ou seja o fungo está utilizando as fontes de carbono e nutrientes disponíveis no sistema bifásico, e transformando em biomassa. Durante o período de incubação não foi realizada a contagem da viabilidade celular, porém a formação de biomassa indica um aumento exponencial principalmente entre o quinto e o oitavo dias.

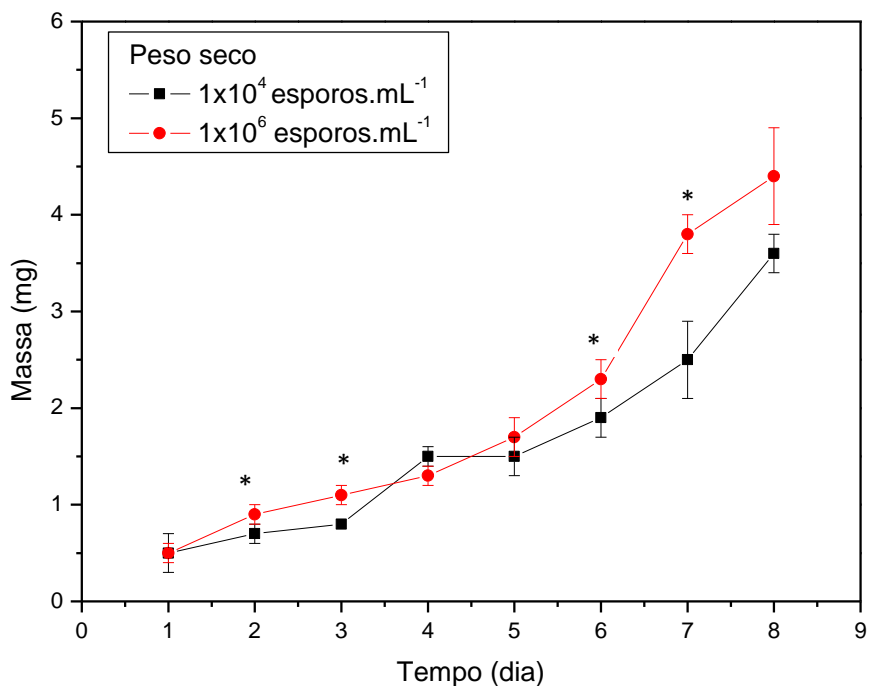


Figura 17. Gráfico peso seco em (mg) relacionado com os dias de cultivo do inóculo nas concentrações  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup> (preto) e  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> (vermelho). \*  $p < 0,05$  (Teste T de Tukey)

Estudos demonstram que a presença de ésteres de ácidos graxos, em misturas com óleo diesel, tornam o combustível mais suscetível ao processo de biodeterioração, do que os combustíveis fósseis<sup>145,187,133</sup>. Durante este processo, a formação de biomassa causa inúmeros prejuízos ao desempenho dos biocombustíveis, sendo um parâmetro de extrema importância no controle de qualidade.

O fungo *Paecilomyces variotii*, nas concentrações de  $10^2$ ,  $10^4$ , e  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>, foi incubado por 60 dias em diferentes concentrações de biodiesel. Durante os primeiros 7 dias de incubação, foi observado um aumento na biomassa independentemente da quantidade de micro-organismos inoculado ou o tipo de combustível usado. Sendo que em B100 a produção de biomassa foi mais significativa<sup>188</sup>.

A formação de biomassa por *A. fumigatus* foi comparada em inoculação realizada em sistema bifásico com B100 e B0. Sendo que o crescimento em B100, atingiu quase três vezes a biomassa produzida em B0<sup>150</sup>.

A linhagem de *A. niger* avaliada em nosso estudo cresceu em um meio que oferecia o biodiesel B100, como única fonte de carbono, concordando com os estudos já citados.

### 3.3.2.3 Proteínas Totais

Para melhor compreender o comportamento do fungo isolado *Aspergillus niger*, foi realizada a análise de proteínas totais, que também será utilizada para correlacionar com a produção de biomassa.

A Figura 18 apresenta a média dos valores de três replicatas para cada dia das amostras com concentração esporos  $10^4$  e  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>, demonstrando que o aumento foi gradual, e proporcional nas duas curvas, somente no oitavo dia os valores ficam praticamente iguais. Na Figura 18, constam os desvios padrão, porém os valores não são perceptíveis, indicando que as três replicatas apresentaram valores muito próximos.

No presente estudo quando comparamos o gráfico de proteínas totais e produção de biomassa, é possível perceber que em ambos a partir do quinto dia houve um aumento exponencial, e pode-se supor que as proteínas, possivelmente enzimas, encontradas na fase aquosa, tenham sido produzidas para degradar o substrato presente no sistema bifásico e convertê-lo em biomassa. Estes resultados também indicam que o fungo está metabolicamente ativo, e se reproduzindo.



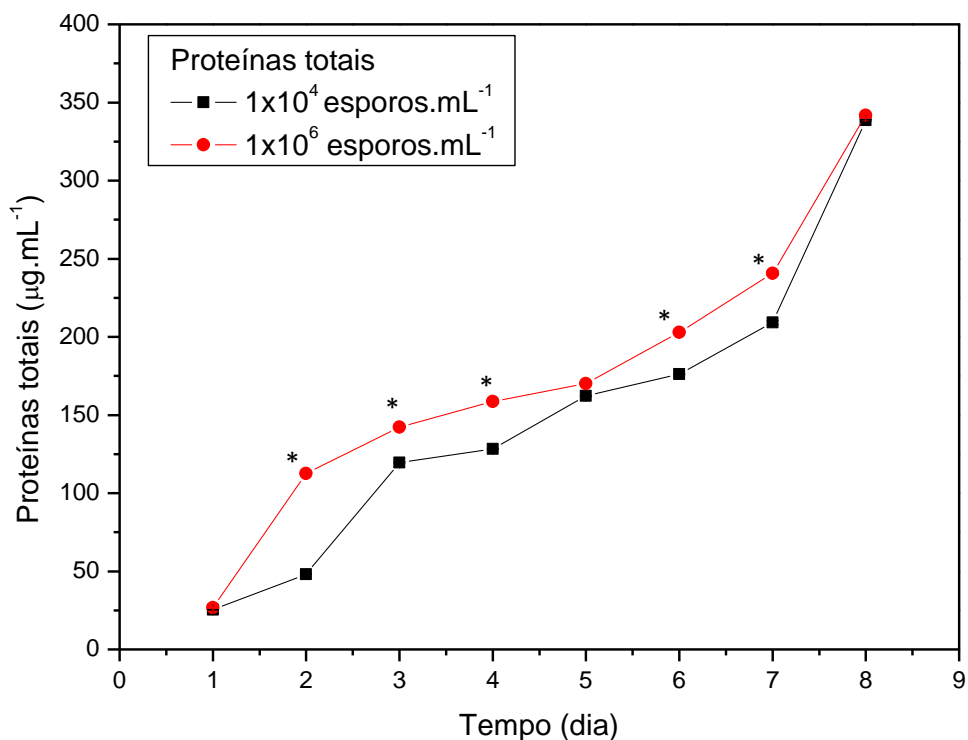


Figura 18. Gráfico de proteínas totais ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) nas duas concentrações testadas  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup> (preto) e  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> (vermelho) durante 8 dias de cultivo. \*  $p < 0,05$  (Teste T de Tukey)

As proteínas desempenham papéis extremamente importantes, na maioria dos processos biológicos, atuando como enzimas, transportadores através das membranas celulares e outros. Sabe-se que os indutores extracelulares são responsáveis por ativar a produção de enzimas, responsáveis pela degradação do substrato, neste estudo ésteres metílicos, para garantir a replicação celular. Sendo que depois as enzimas produzidas são excretadas, para a interface óleo-água no meio extracelular<sup>189</sup>. As enzimas extracelulares mais especificamente, a lipase e a esterase, são responsáveis por degradar moléculas orgânicas complexas em moléculas simples assimiláveis pelos micro-organismos<sup>190</sup>.

Os substratos mais comuns para atuação das lipases são óleos e gorduras principalmente triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa. Geralmente esse grupo de enzimas não requer a presença de cofatores, atuam em ampla faixa de pH, sendo estáveis em altas temperaturas, além de

apresentar elevada especificidade<sup>191,192,193</sup>. As esterases são enzimas capazes de hidrolisar geralmente triacilgliceróis de cadeias com menos de dez carbonos<sup>194,195,196</sup>. Esterases e lipases podem ser produzidas por micro-organismos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Rhodococcus*, *Aspergillus*, *Geotrichum*<sup>197</sup>. Os fungos filamentosos são considerados bons produtores, pois secretam estas enzimas para o meio de cultura em níveis mais elevados do que leveduras e bactérias<sup>198,199</sup>.

Cazarolli, *et al.*<sup>151</sup> observaram a produção de lipase pelo fungo *Pseudallescheria boydii* após 7 dias de cultivo em biodiesel de soja, e o meio mineral Buchnell Haas, sendo menor quando comparada a produção em biodiesel de linhaça e oliva, no mesmo período. O experimento foi monitorado por 60 dias, mas a maior produção ocorreu até o sétimo dia. Boelter *et al.*<sup>200</sup>, avaliaram o potencial deteriogênico de *Pseudallescheria boydii* e *Meyerozyma guilliermondii* em biodegradação de diesel puro (B0), biodiesel puro (B100) e uma mistura de B10 e meio mineral, durante o armazenamento. A produção de biomassa por *P. boydii* durante 45 dias foi maior na mistura B10 após 45 dias de cultivo. A curva de crescimento de *M. guilliermondii* mostrou crescimento em B10 e B100. Apesar de não haver produção significativa de biossurfactante, a produção de lipase foi detectada de forma qualitativa em ágar tributirina para ambos os micro-organismos. Os resultados mostraram que *P. boydii* cresceu, degradando ésteres do biodiesel e hidrocarbonetos presentes no óleo diesel, enquanto que a levedura *M. guilliermondii* cresceu em B100 e B10, porém a degradação não foi detectada.

Os estudos descritos, demonstram uma correlação entre produção de biomassa, produção de lipase e degradação de biodiesel.

#### 3.3.2.4 Quantificação de Ésteres

No presente estudo identificamos um aumento exponencial na produção de biomassa o que nos leva a considerar que houve um consumo dos nutrientes disponíveis no sistema bifásico, dentre eles os ésteres metílicos disponíveis na fase orgânica. Analisando o percentual de variação entre o primeiro dia de cultivo e o oitavo dia, é possível concluir que o oleato e o linoleato de metila são os ésteres que mais variaram durante este experimento, para os dois inóculos de

*A. niger* testados. Para o inóculo com concentração de  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>, o estearato de metila e o palmitato de metila variaram na proporção de 19-22%, já para o inóculo  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> estes dois ésteres não apresentaram variação significativa. A variação na quantificação de ésteres, ocorreu na seguinte ordem, para o inóculo  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>, C18:2 e C18:1 > C 16:0 > C18:0, e para o inóculo  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>, C18:1 > C18:2 > C16:0 > C18:0 (Tabela 7).

Tabela 7. Quantificação de ésteres no cultivo de *Aspergillus niger* em diferentes concentrações de inóculo.

Inóculo/Ésteres metílicos	C16:0 <sup>a</sup>	C18:0 <sup>b</sup>	C18:1 <sup>c</sup>	C18:2 <sup>d</sup>	C18:3 <sup>e</sup>
B100 $10^4$ *	22,70%	19,38%	27,10%	27,10%	n.d.
B100 $10^6$ *	2,49%	0,19%	11,56%	10,85%	n.d.

\*Quantificação de metil ésteres após 8 dias de inoculação. a - palmitato de metila; b - estearato de metila; c - oleato de metila; d - linoleato de metila; e - linolenato de metila.  
\*concentração inicial – concentração final/ concentração inicial x 100.

Ambos os gráficos de quantificação ésteres metílicos na fase orgânica apresentam oscilações entre o primeiro e quarto dia. No gráfico do inóculo  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>, ocorre um decréscimo na quantidade de ésteres, a partir do quinto dia até o oitavo, (Figura 20). Enquanto para o inóculo  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>, verificamos oscilações neste mesmo período, ou seja, ora aumentam, ora diminuem, (Figura 19). Em dados da literatura a quantificação de ésteres é relatada entre o primeiro e último dia de cultivo, não temos como comparar os resultados aqui encontrados, onde realizamos verificações diárias. No entanto podemos apresentar possíveis rotas de degradação para os resultados aqui apresentados.

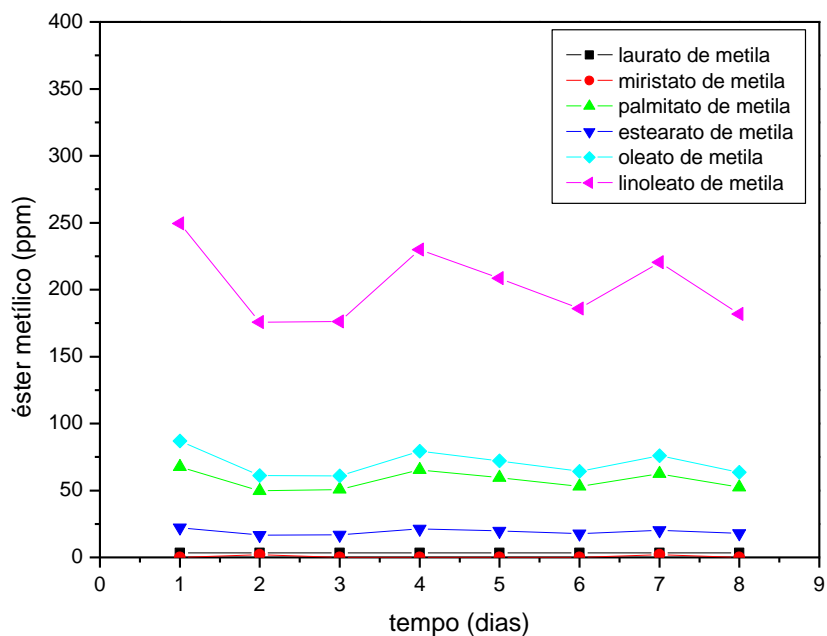


Figura 19. Quantificação de ésteres metílicos durante 8 dias de incubação de *Aspergillus niger* na concentração de  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>.

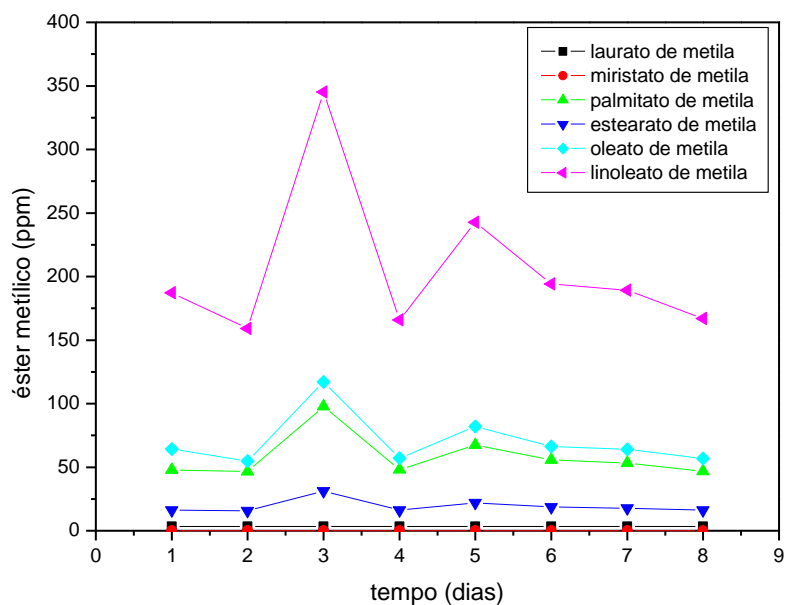


Figura 20. Quantificação de ésteres metílicos durante 8 dias de incubação de *Aspergillus niger* na concentração de  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>.

A variação na presença de ésteres na fase orgânica pode ser avaliada sob quatro condições metabólicas. Primeira, o fungo degrada os ésteres metílicos pela ação de enzimas para produzir energia, se multiplicar, e garantir a sua sobrevivência<sup>200,201</sup>. Segunda, parte dos ésteres podem migrar da fase orgânica para a fase aquosa pela ação de biossurfactantes<sup>151</sup>. Terceira, alguns biossurfactantes possuem ésteres na sua composição e isto pode confundir as quantidades determinadas, ou as oscilações constatadas no período de 8 dias de cultivo<sup>202,203</sup>. E quarta hipótese, é de que a presença de água no sistema bifásico cause a hidrólise do biodiesel<sup>204</sup> que tem ação surfactante, é um detergente poderoso e se emulsiona facilmente nesta condição. A presença de água e a característica detergente do biodiesel, são considerados fatores importantes para o crescimento microbiano, que gastam menos energia na produção de enzimas características da degradação e por isso conseguem crescer mais facilmente, acumulando biomassa.

Srivastava e Prasad<sup>205</sup> notaram que os problemas enfrentados com o armazenamento de biodiesel a longo prazo são principalmente degradação hidrolítica e oxidativa. A degradação hidrolítica consiste na hidrólise de ésteres metílicos quando a água está presente no meio de reação. A solubilidade e a emulsificabilidade em água de combustível são fortemente dependentes da qualidade do biodiesel. Os autores afirmaram que o biodiesel contendo alto teor de produtos intermediários (mono e diglicerídeos) terão a tendência de absorver água em maior grau do que os constituintes do biodiesel principalmente ésteres metílicos<sup>205</sup>.

De acordo com De Mello *et al.*<sup>149</sup>, com base em sua semelhança estrutural com surfactantes, FAMES podem formar associações ordenadas na interface da água, resultando em uma redução da tensão superficial da água/óleo. Em um estudo, compararam a capacidade de emulsificação de várias misturas de diesel e biodiesel, e concluíram que os ésteres de ácidos graxos aumentam a estabilidade de minúsculas gotas de óleo em contato com a água, diminuindo a sua tensão superficial, e reduzindo assim a chance de reagregação.

Outra possibilidade é a presença de biossurfactantes, que são moléculas formadas principalmente como metabólitos microbianos secundários que desempenham papéis críticos na sobrevivência de micro-organismos,

facilitando o transporte, e a captura de nutrientes<sup>206</sup>. São compostos anfifílicos, com grupos hidrofóbicos e hidrofílicos discretos. Estas biomoléculas são lançadas para fora da célula, a fim de facilitar a entrada de compostos pela membrana celular ou para aumentar a biodisponibilidade de um substrato no meio. São capazes de reduzir as tensões superficiais e interfaciais de fluidos como água/óleo ou óleo/água<sup>207</sup>. Todos os biossurfactantes também são moléculas anfipáticas, sendo a porção hidrofílica composta por ésteres, fosfatos e outros, e a porção hidrofóbica um ácido graxo que pode variar de 8-18 carbonos<sup>202, 208</sup>.

Os ascomicetos filamentosos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os gêneros mais estudados para a produção de biossurfactantes<sup>209,210</sup>, com rendimentos mais elevados em comparação com os das leveduras<sup>211</sup>. Além de apresentarem excelente capacidade de redução da tensão superficial e interfacial<sup>212</sup>. *Aspergillus fumigatus* demonstrou alta produção de biossurfactante utilizando resíduos agrícolas como substrato, e óleo diesel<sup>213</sup>. *Aspergillus niger* é capaz de produzir biossurfactante, da classe dos glicosoforolipídios, sendo que esta classe é composta majoritariamente por ácido palmítico, olêico, e linolênico<sup>203</sup>. Em um estudo já foi constatada alta produtividade de biossurfactante por *A. niger* no quarto dia de cultivo<sup>214</sup>.

Sperb *et. al.*<sup>215</sup>, obtiveram resultados diferentes ao realizarem estudo com *Aspergillus niger* durante sete dias, utilizando extrato de malte e óleo de soja como fontes de carbono em diferentes proporções, observaram que em um meio pobre em fontes de carbono houve maior produção de lipase e biossurfactante, e menor produção de biomassa. Enquanto a maior produção de biomassa foi verificada quando havia maior quantidade de fontes de carbono disponíveis, já a produção de lipase e biossurfactante diminuíram nesta condição.

Cazarolli *et al.*<sup>151</sup> constataram a migração de ésteres do óleo fase (biodiesel de soja) para a fase aquosa (meio mineral) em experimento de microcosmo. Após 7 dias de incubação, houve migração de ésteres com longas cadeias de carbono, incluindo palmitato de metila (C16), estearato de metila (C18), oleato de metila (C18: 1), linoleato de metila (C18: 2) e linolenato de metila (C18:3) para o fase aquosa, detectada por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). No caso, não foram observadas

mudanças significativas no percentual de ésteres na fase oleosa (C16, C18, C18: 1, C18: 2 e C18: 3), assim a população microbiana pode ter usado as frações migradas para a fase aquosa, ou outros componentes do biodiesel, como glicerina, ou mesmo compostos de mono, di e triacilglicerídeos, poderiam ter sido consumidos, aumentando a suscetibilidade do biodiesel a contaminação microbiana.

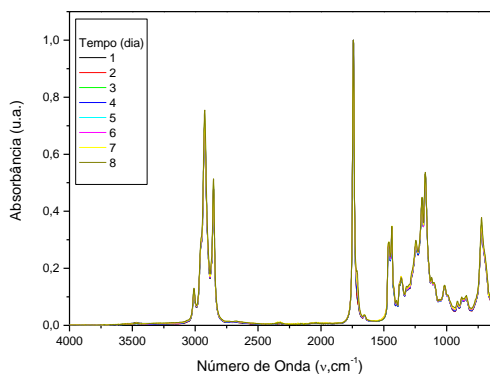
A degradação de ésteres metílicos de soja (B100) também já foi avaliada por Bückner *et al.*<sup>150</sup> a partir da fase oleosa de culturas de 60 dias de *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces sp.*, *Candida silvicola* e *Rhodotorula sp.*. *Aspergillus fumigatus* apresentou maior índice de degradação do que *Paecilomyces sp.* Ambos degradaram preferencialmente o C16 (palmitato de metila) e C18 (estearato de metila); sendo que esses ésteres foram degradados em maior grau por *Aspergillus fumigatus* (cerca de 15% para ambos os ésteres) do que por *Paecilomyces sp.* (0,6% e 3,5%, respectivamente). Em tais experimentos *A. fumigatus* atingiu quase três vezes a biomassa em B100, quando comparado ao B0.

Uma avaliação mais detalhada da fase aquosa e da fase orgânica se faz necessária, para identificarmos as causas da variação da presença de ésteres apresentadas neste estudo.

### 3.3.2.5 Análises por Espectrometria no Infravermelho

A Figura 22 mostra o espectro infravermelho para os inóculos  $10^4$  e  $10^6$  de *A. niger*, durante os oito dias de cultivo. A faixa de absorção na região de  $1200-1100\text{ cm}^{-1}$  e em torno de  $1750\text{ cm}^{-1}$  está associada ao estiramento das ligações C-O e C=O, respectivamente, enquanto as bandas de absorção na região em torno de  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  estão associadas as ligações de C-H da cadeia saturada. A faixa de absorção em torno de  $3050\text{ cm}^{-1}$  está relacionada com as ligações de C-H dos carbonos insaturados.

(a)



(b)

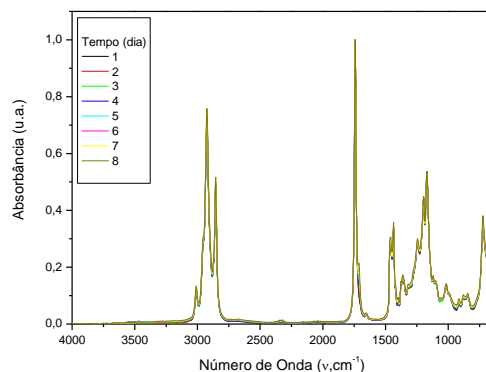


Figura 21. (a) Espectros médios, fase orgânica ( $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>); (b) Espectros médios, fase orgânica ( $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>).

O destaque da região entre  $1800\text{-}1600\text{cm}^{-1}$ , para as duas concentrações de inóculo, apresentado na figura 23 a e 23 b, evidencia o aparecimento de um pico secundário na região entre  $1710\text{ cm}^{-1}$  e  $1725\text{ cm}^{-1}$ , que sugere a formação de intermediários de compostos carbonilados, ácidos graxos livres<sup>105</sup>, consequência do processo de deterioração. Já que o biodiesel é inicialmente clivado em ácidos graxos livres e metanol. No oitavo dia do experimento, é perceptível um pico mais saliente, e a medida que regressamos ao tempo inicial, este pico vai reduzindo, demonstrando as fases do processo de deterioração.

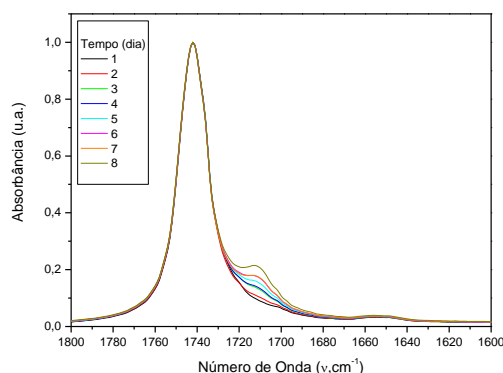
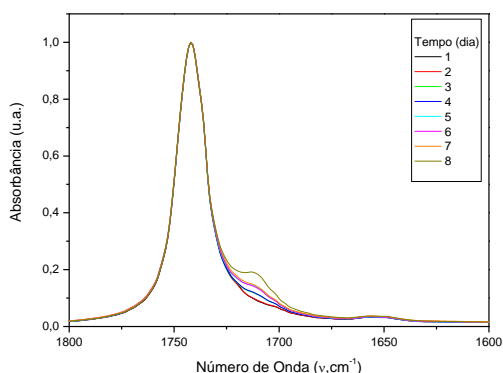


Figura 22. Destaque para a região espectral  $1800\text{-}1600\text{cm}^{-1}$ . (a) espectros médios, fase orgânica  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup> (b) espectros médios, fase orgânica  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>.



A presença de ácidos graxos livres detectada por infravermelho, pode estar relacionada a o processo de hidrólise, ou ainda ao processo de biodeterioração já discutidos anteriormente. Este estudo também identificou o acúmulo de biomassa e a produção de proteínas totais, estas evidências nos levam a concluir que houve ação de enzimas, como esterases e lipases, para clivarem o substrato e proporcionarem a sua absorção pelo fungo *A. niger*. As esterases apresentam capacidade de hidrolisar ésteres solúveis em água, incluindo triacilglicerídeos de cadeia curta, este processo leva a formação de ácidos carboxílicos e álcoois correspondentes. As lipases são enzimas lipolíticas capazes de hidrolisar triacilglicerídeos não solúveis, compostos por ácidos graxos de cadeia longa, presentes em ésteres insolúveis em água, como resultado ocorre a formação de ácidos graxos livres e glicero<sup>l</sup><sup>216,217</sup>. Os ácidos graxos livres podem ser utilizados pela via  $\beta$ -oxidativa<sup>218</sup>. Na figura 21 estão representados três locais possíveis em que lipases e esterases podem atuar nos ácidos graxos.

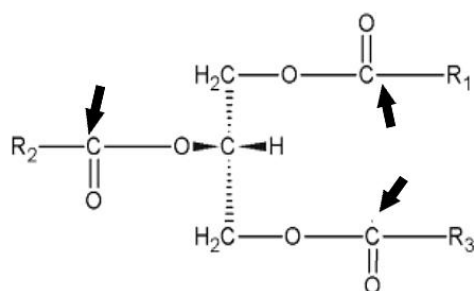


Figura 23. Ligações ésteres no biodiesel possivelmente hidrolisadas por lipases e/ou esterases (indicada por setas) o número da figura muda

### 3.3.2.6 Análise por Componentes Principais (PCA)

A Análise por Componentes Principais para os inóculos  $10^4$  e  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>, foi realizada com os espectros centrados na média. A figura 24a apresenta a PC1 x PC2 das fases orgânicas, para as duas concentrações de inóculo, onde a PC1 acumula 83,35% da informação, e a PC2 8,49%. As amostras separam-se majoritariamente em relação à ordem crescente de tempo

de cultivo em relação à PC1. Amostras referentes aos tempos 1 a 5 nesta concentração de inóculo estão predominantemente sobre o semieixo negativo de PC1 e as demais no semieixo oposto. As amostras referentes ao inóculo  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> estão distribuídos significativamente mais à direita ( $p = 3,10 \cdot 10^{-8}$ , teste *t* de student) com tempos de cultivo 4 a 8 dias projetados sobre o semieixo positivo de PC1. O gráfico de pesos em PC1 (Figura 24b) indica que este perfil de distribuição das fases orgânicas se deve à contribuição positiva em 1711 cm<sup>-1</sup> (máximo da banda  $\nu$ C=O de ácido carboxílico) e contribuição negativa em 1741 cm<sup>-1</sup> (máximo da banda  $\nu$ C=O de éster metílico). Amostras com valores elevados de absorvância em 1711 cm<sup>-1</sup>, e conseqüentemente diminuição da área sob a banda em 1741 cm<sup>-1</sup> são aquelas com maior concentração de ácidos graxos livres sendo deslocadas para a direita em relação à PC1 e vice-versa. Em PC2 a distribuição ocorre no sentido inverso, pois o peso da absorvância em 1711 cm<sup>-1</sup> é negativo (somada a contribuições secundárias em 2924, 1458 cm<sup>-1</sup> e 1414 cm<sup>-1</sup>) junto com absorvâncias positivas em 1731 cm<sup>-1</sup>. e 1171 cm<sup>-1</sup>. Este perfil é característico para as amostras de fases orgânicas obtidas com o inóculo  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>: amostras referentes aos dias 1 a 3 (semieixo de PC1) e 4 a 8 (semieixo positivo de PC1) estão distribuídas em ordem decrescente em relação à PC2. As amostras correspondentes ao oitavo dia de cultivo, para as duas concentrações de inóculo  $10^4$  e  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> estão todas próximas, na PC2 negativa, assim como duas replicatas para o inóculo  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>, correspondente ao sétimo dia de cultivo. Os gráficos de produção de biomassa e proteínas totais também apresentam uma proximidade entre os dois grupos estudados no oitavo dia de cultivo, indicando a degradação de substrato e acúmulo de biomassa.

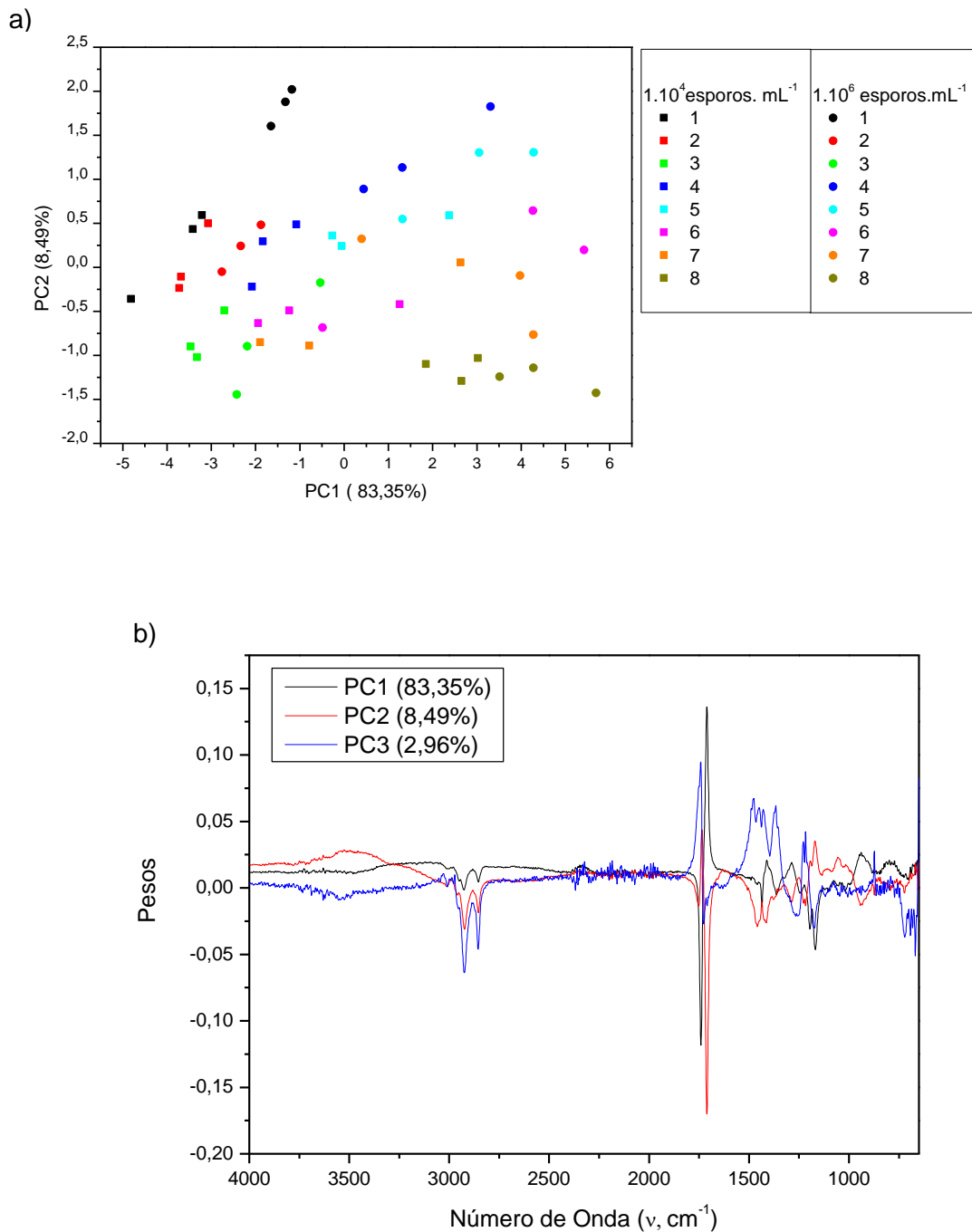


Figura 24. Análise por Componente Principais (PC1xPC2) do conjunto de espectros ATR-FTIR de fases orgânicas (biodiesel) de cultivo bifásico de *A. niger* (concentrações de inóculo de  $10^4$  e  $10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>) coletadas diariamente entre 1 e 8 dias: a) Distribuição de escores; b) Pesos das três primeiras PCs.

## **4. Predição de Produção de Biomassa de Fungos Filamentosos Cultivados em Biodiesel de Soja Empregando Espectrometria no Infravermelho Associada a Técnicas Quimiométricas**

### **4.1 Objetivos**

- I) Quantificar e comparar a produção de biomassa de fungos filamentosos cultivados em fase líquida bifásica de biodiesel de soja e meio mineral;
- II) Caracterizar a biomassa dos fungos sob cultivo em meio sólido padrão BDA por Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier via Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR);
- III) Avaliar padrões de impressão digital metabólica da biomassa fúngica caracterizada por ATR-FTIR utilizando Análise por Componentes Principais (PCA);
- IV) Avaliar a predição de produção de biomassa de fungos filamentosos cultivados em biodiesel de soja através de regressão pelo Método de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e das impressões digitais metabólicas de biomassa cultivada em meio sólido padrão BDA;

### **4.2 Materiais e Métodos**

#### *4.2.1 Síntese do Biodiesel*

A síntese de biodiesel foi realizada por meio de reação de transesterificação com base no método TDSP<sup>100</sup>. Foi sintetizado 1.000 mL de biodiesel de soja, cuja matéria prima, óleo de soja marca “Leve”, adquirido em mercado local em Santa Cruz do Sul, RS, Brasil.

#### *4.2.2 Grau de Conversão da Síntese de Biodiesel*

Análise usando RMN  $^1\text{H}$  foi realizada para verificar o grau de conversão dos ácidos graxos em ésteres metílicos, e para verificar a presença de impurezas no biodiesel<sup>102</sup>.

#### *4.2.3 Esterilização*

O biodiesel de soja foi esterilizado através de filtragem a vácuo em kitassato, utilizando membrana GS em éster de celulose 0,22 $\mu\text{m}$ , Merck.

#### *4.2.4 Fase aquosa*

O meio mineral Bushnell-Haas<sup>184</sup>, (1,0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2  $\text{MgSO}_4$ ; 0,02  $\text{CaCl}_2$ ; 1,0  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,05  $\text{FeCl}_3$ ; 1,0  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )) foi utilizado como fase aquosa. O biodiesel foi utilizado como fonte de carbono, como descrito no item 4.2.1.

#### *4.2.5 Amostras, padronização e inoculação*

Dezenove fungos filamentosos isolados do meio ambiente foram cultivados a 30°C durante 7 dias em meio Ágar Batata Dextrose (BDA). As células fungicas foram preparadas em água destilada, e padronizado em 600 nm para obter uma absorbância entre 0,4 e 0,6, o que corresponde a aproximadamente  $2 \times 10^7$  esporos. $\text{mL}^{-1}$ , nos diferentes isolados testados<sup>219</sup>. Em frascos de 20 mL, foi produzido um microcosmo contendo 4 mL de biodiesel de soja, e 4 mL do meio mineral Bushnel Hass<sup>184</sup>, na interface foi inoculado 300  $\mu\text{L}$  em triplicata dos esporos previamente padronizados, os quais foram cultivados durante 14 dias no escuro e em temperatura ambiente.

#### *4.2.6 Determinação de Biomassa*

Após 14 dias, a biomassa interfacial foi filtrada em papel filtro anteriormente pesado, que foi extraído com 3 mL de hexano para remover o combustível aderido à biomassa. Os papéis filtro foram incubados a 30°C por 48

h, e transferidos para uma câmara de desidratação por 24 h para remover a água. O peso seco foi registrado e a biomassa foi calculada como peso final menos o peso inicial (em gramas), para cada triplicata.

#### 4.2.7 *Leitura do Micélio por Infravermelho*

Alíquota de 900 µL de inóculo preparado anteriormente foi inoculado em placas de Petri de 7 cm de diâmetro e 8 mL de meio BDA a 37°C, nos tempos de 24 h e 48 h. Cinco réplicas (fragmentos com 1 cm x 1 cm) de cada cultura foram cortadas com lâmina de bisturi, depositadas em papel de filtro (0,5 cm x 2,5 cm) Whatman No. 1 (Sigma-Aldrich), conforme protocolo previamente estabelecido para culturas fúngicas filamentosas<sup>220</sup>, colocados em placas de Petri e desidratadas em estufa de secagem a 50°C por 1 hora. Em seguida o fragmento de cultura em papel foi depositado sobre cristal de ZnSe com pressão *gauge* de 70-75 N.m<sup>-2</sup> em acessório UATR Perkin Elmer®, acoplado a um espectrômetro Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR, Perkin Elmer®. Os espectros foram adquiridos na faixa de 4000 - 650 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, e 4 varreduras. Foram feitas 5 leituras para cada amostra.

#### 4.2.8 *Análise de Dados e Quimiometria*

Tratamento quimiométrico foi realizado em software Pirouette 4.0, (Infometrix). O conjunto de espectros de biomassa micelial de 24 e 48h foi normalizado pela amplitude (0-1) e, após, transformados pela 1ª ou 2ª derivadas aplicando algoritmo de Savitzky-Golay (5 pontos) na faixa espectral total.

A análise por componentes principais foi aplicada ao conjunto de dados, após os mesmos serem centrados na média. Teste *t* de Student aplicado em cada componente principal (PC) buscando maximizar discriminação entre biomassa de 24h e de 48h. Foram consideradas significativas as discriminações quando  $p < 0,05$ .

Regressão por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS) foi aplicada buscando correlacionar as informações espectrais da biomassa fúngica sob cultivo em meio sólido a 24/48h (variáveis independentes, matriz **X**) com os

respectivos valores de peso seco de cada amostra obtidos pelo ensaio de cultivo bifásico em biodiesel (variável dependente, matriz **Y**).

Primeiramente, foi aplicada a validação cruzada com mútua exclusão (LOOCV) de cinco por vez foi aplicada ao conjunto total de dados para estabelecer o número mínimo de variáveis latentes para alcançar coeficiente de determinação  $\leq 0,99$ , utilizando-se um máximo de duas componentes de correção de sinal ortogonal.

Em seguida procedeu-se à divisão do conjunto de dados em conjunto de calibração (CC) e de previsão (CP) através da segregação sistemática alternada 1:1, a partir do conjunto de valores de biomassa produzida no ensaio de biodiesel organizado em ordem crescente. Nesta segregação, tomou-se o cuidado para que as amostras de maior e menor valor de biomassa fizessem parte do conjunto de calibração.

Modelo de calibração OPLS foi aplicado a CC nas mesmas condições otimizadas com o conjunto total de espectros, porém respeitando-se o número máximo de VLs (A) conforme a regra:

$$A=(N/6) -1)$$

onde N é o número de colunas da matriz **X** de CC (ASTM, 2017)<sup>174</sup>.

A qualidade do modelo PLS foi avaliado pelas seguintes figuras de mérito (em função do número de variáveis latentes) para CC e CP:

- a) exatidão, através do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV) para CC e erro quadrado médio de previsão (RMSEP) para CP;
- b) ajuste através do coeficiente de determinação  $R^2$ .

## **4.3 Resultados e Discussão**

### *4.3.1 Grau de Conversão da Síntese de Biodiesel*

O conteúdo de ésteres para a síntese de biodiesel de soja foi de 98,5%, estando de acordo com a legislação<sup>72</sup>. A análise foi realizada por RMN <sup>1</sup>H.

### 4.3.2 Leitura do Micélio por Infravermelho

Neste estudo utilizamos espectros no infravermelho médio, para caracterizar o micélio das 19 amostras de isolados fúngicos do ambiente em diferentes tempos de cultivo. Na literatura não foram encontrados estudos específicos sobre esta correlação. Os espectros foram normalizados, e após realizada a transformação pela 1ª ou 2ª derivada (Figura 25).

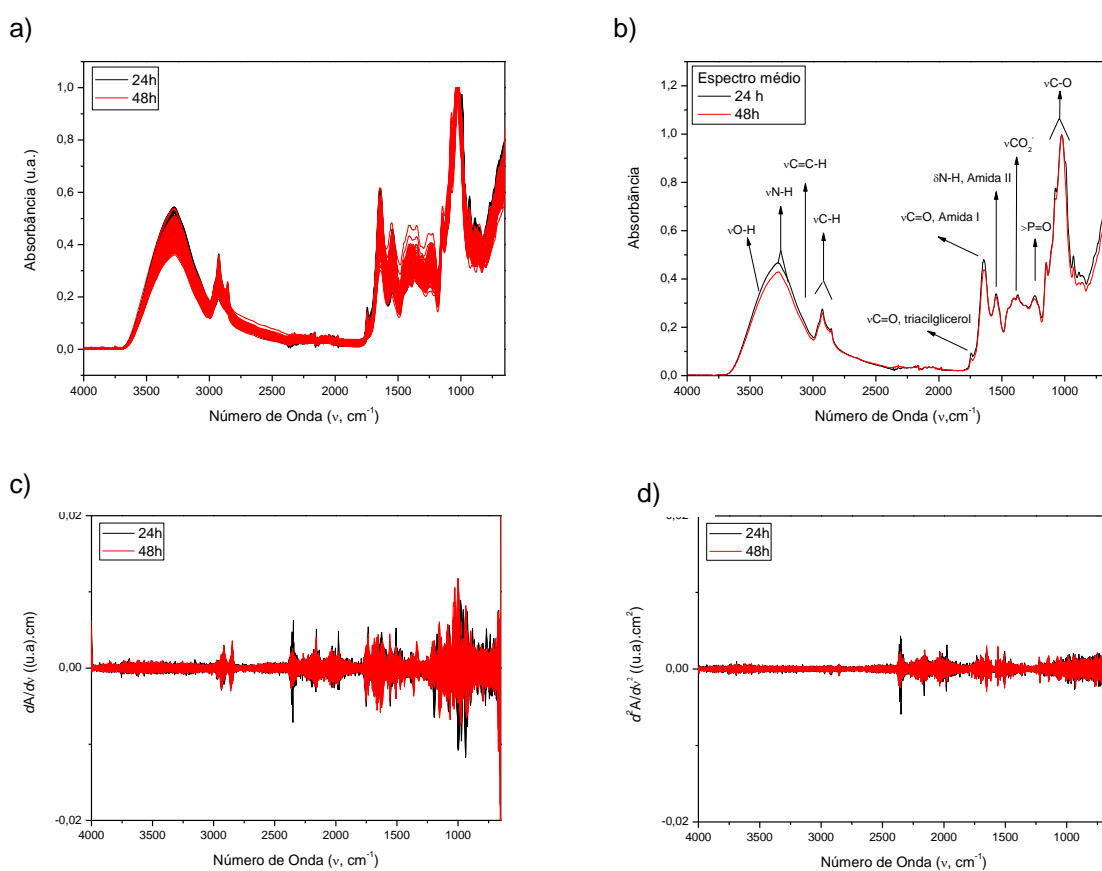


Figura 25: a) Conjunto total de espectros; b) espectros médios (com atribuições das principais bandas) normalizados das amostras de biomassa fúngica cultivadas em meio sólido BDA em 24h e 48h. c) conjunto total de espectros após transformação pela 1ª derivada; d) conjunto total de espectros após transformação pela 2ª derivada.

Diferenças entre os dois conjuntos de espectros originais ocorrem predominantemente nas regiões  $3300\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ ,  $1750\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  e  $1100\text{ a }650$



$\text{cm}^{-1}$ , (Figura 25a). A transformação com a 1ª ou a 2ª derivada intensifica e amplia estas diferenças na região de  $2300\text{-}650\text{ cm}^{-1}$  (Figuras 25c e 25d).

Os espectros médios apresentam bandas características dos principais componentes intracelulares (Figura 25b).

Em  $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  estão as contribuições das deformações  $\nu\text{O-H}$ , predominantemente oriundas de carboidratos de parede celular como quitina, e  $\alpha$  e  $\beta$ -glicanos, e ribose de ácidos nucleicos sobrepostas à deformação  $\nu\text{N-H}$  de bases de ácidos nucleicos e de ligação amida de proteínas (amida A)<sup>221</sup>.

Na sequência, em  $3100\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ , estão as bandas de deformação de cadeias alifáticas ( $\nu\text{C-H}$  vinílica,  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  assimétricas e simétricas) predominantemente de triacilgliceróis, fosfolipídios e ácidos graxos livres sobrepostas à banda de menor intensidade de grupos metinos de carboidratos<sup>221</sup>.

Em  $2550\text{-}1900\text{ cm}^{-1}$  ocorre baixa contribuição de absorções de grupos  $\text{NH}_3^+$  de aminoácidos livres (predominantemente), peptídeos e proteínas protonados<sup>221,222</sup>.

Em  $1750\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$  ocorrem as contribuições da deformação  $\nu\text{C=O}$  de ácidos carboxílicos de ácidos graxos livres e ésteres (predominantemente triacilgliceróis).

Em  $1720\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$  e  $1630\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$  observam-se as bandas de amida I e II, respectivamente, associadas à presença de proteínas e peptídeos. A primeira tem contribuições da deformação  $\text{C=O}$  da ligação amida e a segunda se deve à sobreposição da deformação  $\delta\text{C-N-H}$  no plano e  $\nu\text{C-N}$  da mesma ligação. A estrutura fina destas bandas permite caracterizar estruturas secundárias de proteínas ( $\alpha$ -hélice, folha  $\beta$ -pregueada paralela e antiparalela)<sup>221,222</sup>.

Contribuições do grupo fosfato inorgânico livre e de derivados orgânicos (ácidos nucleicos, fosfolipídeos) ocorrem na faixa de  $1270\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  com máximo em  $1250\text{ cm}^{-1}$  ( $>\text{P=O}$  assimétrica)<sup>221</sup>.

Em  $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  observam-se as deformações  $\text{C-O}$  dos carboidratos de parede celular (predominantemente) e de ácidos nucleicos e de resíduos de cadeias laterais de aminoácidos hidroxilados sobreposta à banda ( $>\text{P=O}$  simétrica)<sup>221</sup>.

As regiões destacadas na Figura 25b, são as principais encontradas na constituição do micélio fúngico. O crescimento micelial é dependente do processo de translocação, onde o material celular é direcionado para as regiões em desenvolvimento<sup>223</sup>, permitindo a formação das estruturas celulares, como a parede, e com isso facilitando a ocupação dos ambientes pelo microrganismo. Em condições normais de desenvolvimento, a estrutura da parede celular é baseada na parede já existente nas células progenitoras, que são estendidas e remodeladas. Neste caso, ela serve como um arcabouço para a incorporação de novos materiais dentro dos pontos de crescimento<sup>224</sup>. A parede celular compreende cerca de 15-30% do peso seco da célula fúngica<sup>225</sup>, sua composição química, estrutura e dimensão variam consideravelmente, dependendo das condições ambientais e/ou de cultivo laboratorial e essa formação é coordenada com o metabolismo celular<sup>224</sup>. A composição química da parede celular é bastante complexa, constituída principalmente por polissacarídeos, ligados ou não a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos formando a matriz de cimentação. Quitina, glucanas, galactomananas e proteínas são compostos mais frequentes, embora sua quantidade varie entre as diferentes espécies de fungos<sup>226</sup>.

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é um método que pode ser usado para caracterizar a composição bioquímica das células microbianas. Em diferentes áreas, como medicina clínica<sup>227,228</sup>, na indústria alimentícia<sup>229,230</sup>, e área ambiental<sup>231,232</sup>, a espectroscopia por FTIR é utilizada, como uma análise de rotina para rápida caracterização, e identificação de microrganismos com baixo custo. Os espectros são obtidos de células em seu estado nativo, embora parcialmente desidratado, sendo que representam uma "impressão digital molecular" da composição química total da célula. O status fenotípico de uma célula microbiana depende fortemente das condições de cultivo, e os espectros representam uma impressão digital única de lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos<sup>229,230</sup>. Através do FTIR é possível detectar constituintes que formam a biomassa fúngica, e empregando ferramentas quimiométricas correlacionar este crescimento com a composição química da célula.

O FTIR já foi utilizado com sucesso para a seleção de cepas fúngicas com potencial para hidrolisar a biomassa de microalgas. A Análise de

Componentes Principais (PCA), e a Análise Hierárquica de Cluster (HCA) foram ferramentas úteis para a triagem das cepas estudadas<sup>233</sup>. Em outro estudo o FTIR foi utilizado para identificar fungos produtores de ácidos graxos poli-insaturados em diferentes fontes de carbono, apresentando ótimos resultados<sup>234</sup>. Um estudo em clínica médica, determinou a concentração inibitória mínima (MIC) de itraconazol para *Fonsecaea pedrosoi*, agente da cromoblastomicose, usando FTIR e quimiometria. Os modelos demonstraram uma alta correlação entre os valores de referência, com os valores preditos<sup>235</sup>.

Através do FTIR associado à ferramentas quimiométricas, é possível também identificar a degradação de biodiesel. Em um estudo foi realizada a avaliação de biodeterioração de B10, com a utilização de biocida em diferentes concentrações, utilizando a intensidade de absorção da região do pico da carbonila, através da HCA e da PCA, apresentando resultados satisfatórios<sup>236</sup>. Outro estudo utilizou diferentes concentrações de esporos, e diferentes concentrações de biodiesel, para avaliar o processo de degradação por FTIR e PCA, onde foi possível identificar diferenças nos espectros para as diferentes concentrações de inóculo. Além de avaliar a formação de biomassa, que também está relacionada com a presença de biodiesel e a sua degradação<sup>188</sup>. Em seu trabalho, Zimmer e colaboradores<sup>237</sup>, monitoraram a degradação de biocombustível, em diferentes tempos por até 60 dias, com diferentes concentrações de inóculo (fungos, bactérias e leveduras), utilizando a região da carbonila. A HCA e PCA foram utilizadas para analisar os espectros obtidos, demonstrando um decréscimo na banda da carbonila ao longo do tempo, estes dados também foram comparados a produção de biomassa, que aumentou neste período.

Os estudos mencionados demonstram que existe uma correlação entre a presença de biodiesel, formação de biomassa, crescimento microbiano, e processos de degradação.

#### 4.3.3 Análise por Componentes Principais (PCA)

A transformação dos dados espectrais influenciou significativamente na distribuição de variância entre as componentes principais e na discriminação dos conjuntos de espectros de 24 e de 48h com base nos seus escores (Tabela 8).

A PCA dos dados originais compacta 91,59% dos dados originais nas quatro primeira PCs. A transformação dos dados com 1ª e 2ª derivadas redistribui a variância original dos dados diminuindo a compactação para 68,88% e 47,78% respectivamente (Tabela 8).

A maior discriminação entre os grupos com os dados originais ocorre ao nível de PC2, seguido por PC1 e (Figura 26a). Contribuições relevantes em PC2 compreendem as regiões de 1500 a 1300 cm<sup>-1</sup> (contribuições negativas) e 1000-900 cm<sup>-1</sup> (contribuições positivas) (Figura 26b).

Tabela 8. Características da Análise por Componentes Principais aplicada sob diferentes transformações de variáveis ao conjunto de impressões digitais metabólicas de biomassa fúngica cultivada em 24 e 48h em meio sólido BDA.

Componentes Principais	Transformação dos dados					
	Dados originais		1ª derivada		2ª derivada	
	VR(%)	p	VR(%)	p	VR(%)	p
PC1	61,68	6,49.10 <sup>-8</sup>	31,06	2,17.10 <sup>-24</sup>	20,44	1,43.10 <sup>-1</sup>
PC2	13,34	1,65.10 <sup>-26</sup>	16,60	9,68.10 <sup>-14</sup>	15,69	1,26.10 <sup>-89</sup>
PC3	10,70	5,76.10 <sup>-6</sup>	15,71	2,08.10 <sup>-6</sup>	6,37	6,66.10 <sup>-2</sup>
PC4	5,77	4,99.10 <sup>-1</sup>	5,51	9,91.10 <sup>-3</sup>	5,28	3,04.10 <sup>-2</sup>
PC5	1,96	1,46.10 <sup>-2</sup>	5,00	3,90.10 <sup>-1</sup>	4,18	3,74.10 <sup>-1</sup>
PC6	1,71	1,18.10 <sup>-1</sup>	2,80	2,99.10 <sup>-1</sup>	3,57	7,88.10 <sup>-1</sup>
PC7	1,34	3,34.10 <sup>-2</sup>	2,39	2,60.10 <sup>-2</sup>	2,42	2,93.10 <sup>-1</sup>
PC8	0,73	6,98.10 <sup>-1</sup>	2,07	1,15.10 <sup>-1</sup>	2,35	1,99.10 <sup>-1</sup>
PC9	0,66	8,10.10 <sup>-1</sup>	1,49	4,91.10 <sup>-3</sup>	1,99	8,34.10 <sup>-1</sup>

VR = Variância relativa; p = nível de significância com base no teste *t* de Student entre escores dos dois conjuntos de dados. Nível de significância mínimo:  $p \leq 5 \cdot 10^{-1}$ . Total de 190 espectros ATR referentes a quintuplicatas de 19 amostras em dois tempos de cultivo (24 e 48h) normalizados pela amplitude e centrados na média sem rotação.

A transformação com 1ª derivada intensifica a discriminação em PC1 (Figura 26c), com forte contribuição positiva próxima à 1000 cm<sup>-1</sup> (Figura 26d). A introdução da 2ª derivada altera a variância original dos dados em PC2 de modo a alcançar a máxima discriminação dos dois conjuntos de espectros de biomassa (Figura 26e). Contribuições relevantes neste caso ocorrem distribuídas ao longa da faixa de 2300 a 2000 cm<sup>-1</sup>, próximas a 1500 cm<sup>-1</sup> e 1200

a  $650\text{ cm}^{-1}$  (Figura 26f) ressaltando a dependência de diversos componentes intracelulares na produção de biomassa micelial. Esta separação pode estar associada com a maior expressão de micélio reprodutor, e de metabólitos primários e/ou secundários naquelas amostras.

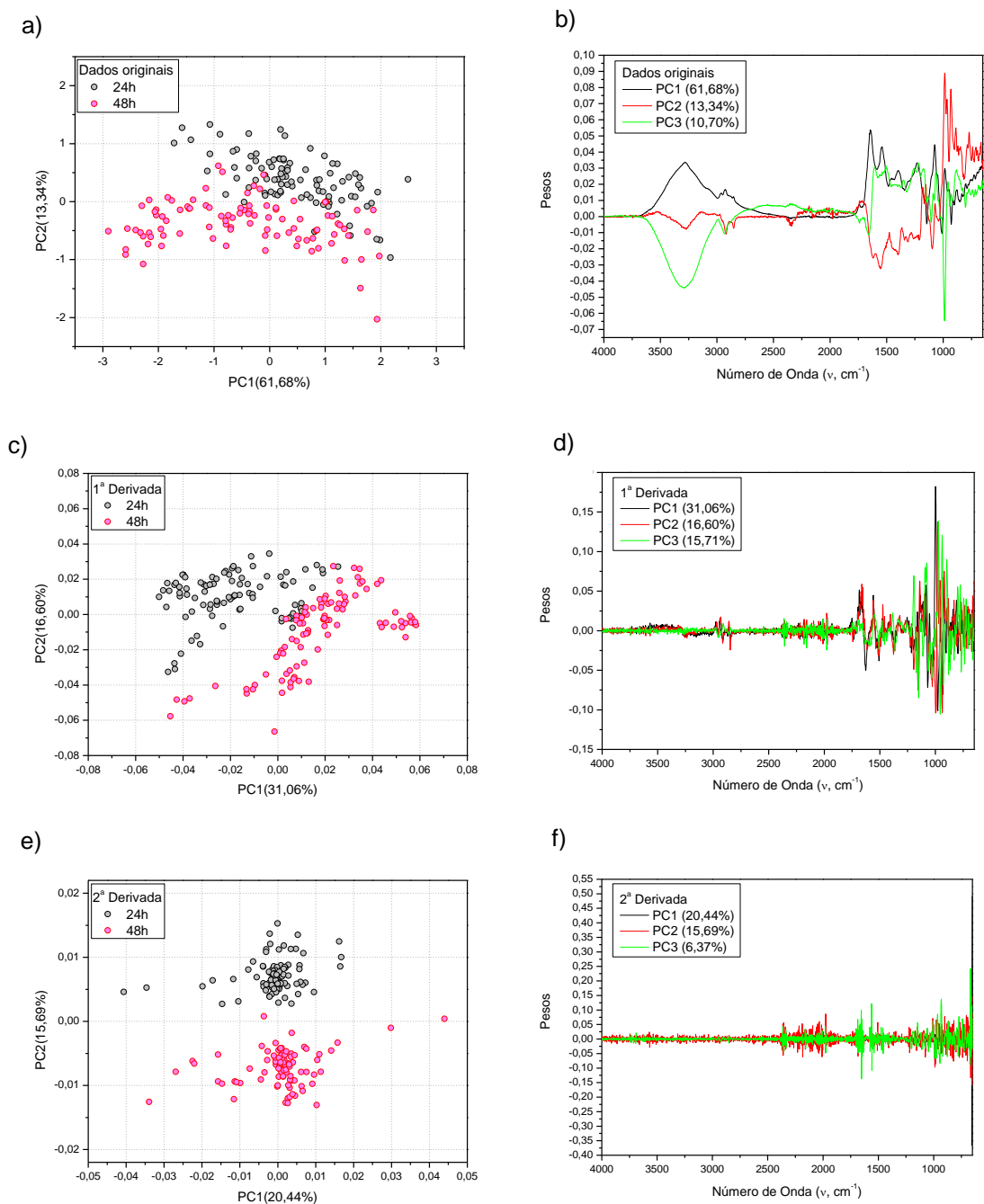


Figura 26. Gráficos de PC1xPC2 e respectivos pesos de PC1, PC2 e PC3 para o dois conjuntos de espectros ATR normalizados e centrados na média das amostras de biomassa fúngica cultivadas em meio sólido BDA em 24h e 48h: a) Gráfico dados originais; b) Gráfico de pesos dados originais; c) Gráfico de 1<sup>a</sup>

derivada; d) Gráfico de pesos 1ª derivada; e) Gráfico de 2ª derivada; d) Gráfico de pesos 2ª derivada .

#### 4.3.4 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Para a análise por PLS as melhores condições de ajuste entre dados espectrais e a produção de biomassa, foram primeira derivada (com janela de 5 pontos) no pré-processamento por amostra e correção de sinal ortogonal (2 componentes).

Em seguida, o conjunto de dados foi separado em um conjunto de calibração (CS, treinamento) e conjunto de previsão externo (PS, teste ou validação) usando o particionamento sistemático alternado de 1:1, ordenado do menor para o maior valor de biomassa. Propositalmente, os valores mínimo e máximo de cada parâmetro foram preservados em CV. Assim, CV foi elaborada com 10 amostras de biomassa fúngica (50 espectros) e CP foi elaborada com 9 amostras (45 espectros).

O número ideal de variáveis latentes no CV foi determinado pela reavaliação da regressão PLS com LOOCV, selecionando o número mínimo de variáveis latentes que geraram um desvio padrão relativo (DPR) menor que 1%. Este método foi utilizado em conformidade com o limite máximo de variáveis latentes permitidas em função do número de elementos CV conforme recomendado pela norma ASTM E1655-17<sup>6</sup>.

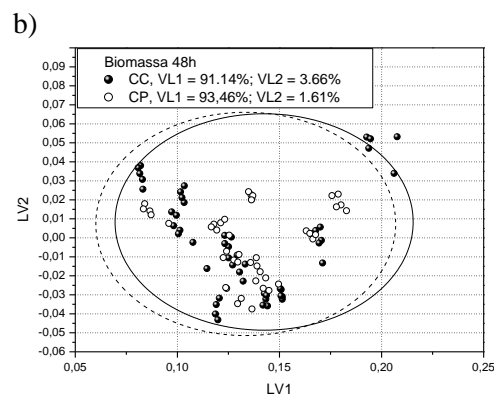
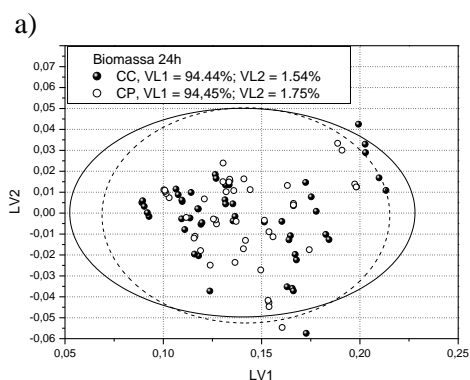
As figuras de mérito e homogeneidade dos modelos PLS obtidos para cada CV foram avaliadas pelo gráfico LV1xLV2, desvio padrão relativo (DPR), pelo erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV) e pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e coeficiente de correlação de resíduos (Rr) (determinado pela análise de regressão entre resíduos e respectivos valores de referência) (Tabela 9). Os valores de CP foram preditos adicionando um elemento de cada vez ao CV, retrabalhando o modelo por LOOCV e identificando o valor previsto para o elemento em questão. O desempenho do CP foi avaliado pelo erro quadrático médio de predição (RMSEP) assim como pelo gráfico LV1xLV2,  $R^2$ , Rr e RSD (substituindo os valores de CV pelos seus respectivos valores de CP) como previamente definido.

Os modelos otimizados de PLS para 24h e 48h de cultivo do micélio foram obtidos com 2 variáveis latentes (Tabela 9). O gráfico LV1xLV2 (Figura 27a), para o micélio analisado após 24h de cultivo, acumula 95,98% da variância para o conjunto de calibração, e 96,20% para o conjunto de predição, mostrando homogeneidade entre os dois conjuntos com poucos outliers (linha sólida para CC, linha pontilhada para CP). Para o conjunto com cultivo de 48h (Figura 27b) o CC acumula 94,80% da variância, e CP 95,07, para esta análise houveram outliers somente para CC, indicando também a homogeneidade entre os dois conjuntos.

As curvas de regressão de 24h (Figura 27c) e 48h (Figura 27d) mostraram uma alta correlação entre os valores de referência e os valores preditos pelo FTIR com  $DPR < 1\%$ ,  $R^2 > 0,999$  para os conjuntos de predição (Tabela 9). O modelo de 24h apresentou o melhor desempenho.

Os gráficos dos resíduos para 24h (Figura 27e) e 48h (Figura 27f) indicam que não existe viés de predição, pois as amostras estão distribuídas aleatoriamente em torno do eixo, não obedecendo a uma lógica de distribuição no sentido crescente ou decrescente.

Os vetores de regressão para 24h (Figura 27g) e 48h (Figura 27h), mostraram grande similaridade com os picos de espectro médio da 1ª derivada, exceto para variações específicas, onde é possível observar que em determinadas regiões ocorrem intensificação, atenuação, ou inversão do sinal do vetor de regressão em relação ao sinal do espectro, podendo sugerir que estas regiões foram as mais significativas para criação do modelo.



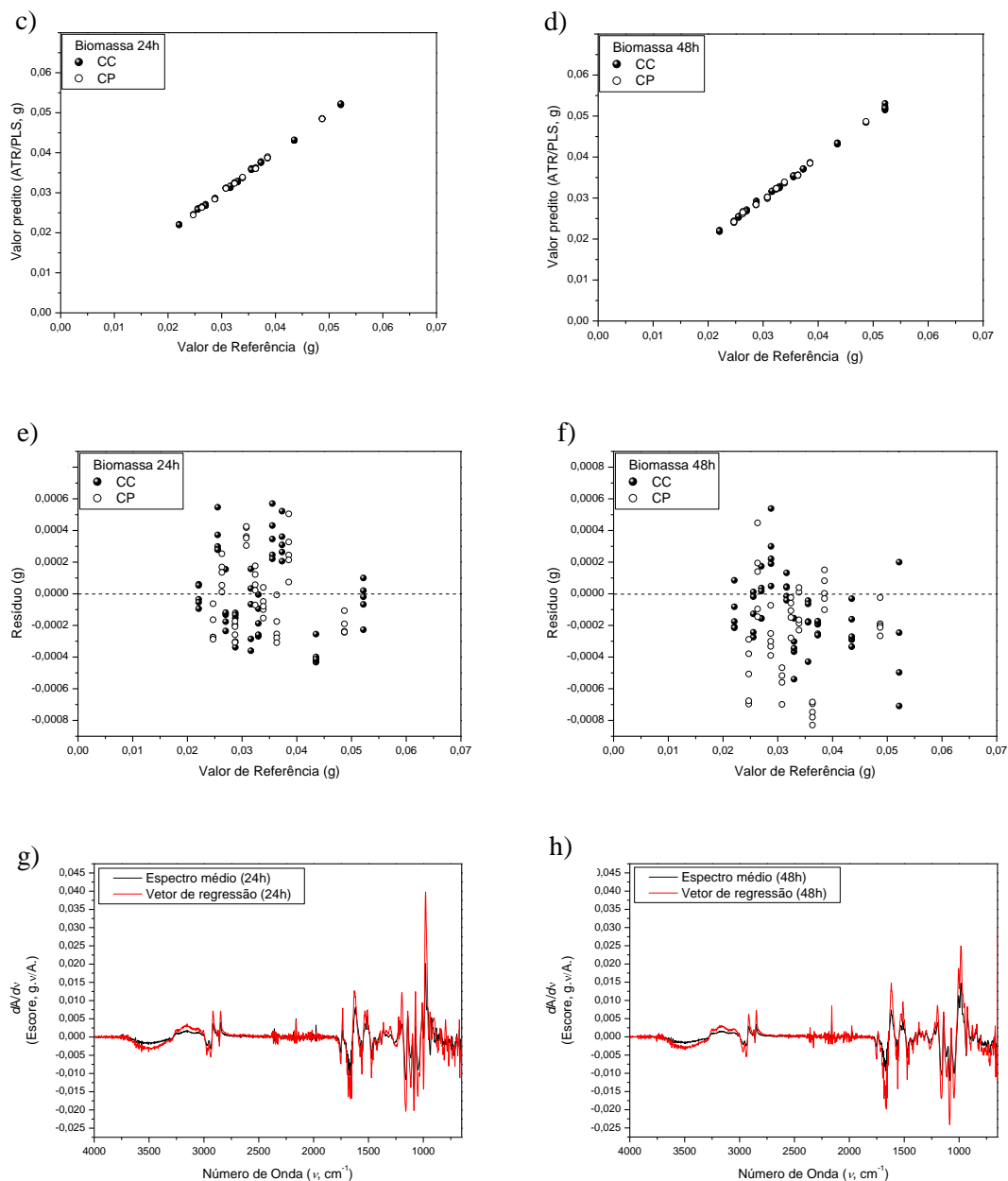


Figura 27. Análises realizadas por PLS: a) LV1 X LV2 para o conjunto de calibração e o conjunto de validação micélio de 24h; b) LV1 X LV2 para o conjunto de calibração e o conjunto de validação micélio de 48h; c) Gráfico de correlação entre o conjunto de calibração e o conjunto de predição do micélio de 24h; d) Gráfico de correlação entre o conjunto de calibração e o conjunto de predição do micélio de 48h; e) Gráfico de resíduos micélio de 24h; f) Gráfico de resíduos micélio de 48h; g) Vetor de regressão comparado ao espectro médio do micélio de 24h; h) Vetor de regressão comparado ao espectro médio do micélio de 48h.



Tabela 9. Figuras de mérito dos modelos de micélio analisado em diferentes tempos por ATR-FTIR supervisionado pelo peso seco.

Conjunto de amostras	LV	Variância (%)	RMSECV(g) RMSEP(g)	R <sup>2</sup>	R <sub>r</sub> <sup>2</sup>	DPR (%)	Faixa de quantificação
Biomassa 24h							
CC	2	95,98	6,61x10 <sup>-4</sup>	0,9970	0,0368	1,97	0,022g - 0,052g
CP	2	96,20	3,99x10 <sup>-4</sup>	0,9968	0,0309	1,20	0,025g - 0,049g
Biomassa 48h							
CC	2	94,79	6,78x10 <sup>-4</sup>	0,9969	3,43.10 <sup>-5</sup>	2,02	0,022g - 0,052g
CP	2	95,08	8,38x10 <sup>-4</sup>	0,9905	0,1395	2,54	0,025g - 0,049g

LV = variável latente; RMSECV = erro quadrático médio da validação cruzada; RMSEP = erro quadrático médio de predição; R<sup>2</sup> = coeficiente de determinação de validação cruzada com exclusão em etapas de cinco por vez; R<sub>r</sub> = coeficiente de correlação entre resíduos e seus respectivos valores de referência; DPR = desvio padrão relativo; CC = conjunto de calibração; CP = conjunto de predição. Todos os modelos foram obtidos com dois componentes de correção do sinal ortogonal.

Regressão PLS baseada em dados espectroscópicos vibracionais na região do MIR é o método comumente usado para quantificar analitos em diferentes matrizes orgânicas<sup>8,9,11,12</sup>. Por outro lado, as aplicações para predição de propriedades do metabolismo celular microbiano são mais restritas<sup>196,197,198</sup>. Previsões desta natureza (produção de biomassa fúngica, por exemplo) são dependentes da presença ou expressão de vários componentes intracelulares o que torna a regressão linear PLS dependente de diversas variáveis (números de onda no espectro ATR) que representam estas substâncias na matriz investigada. Os vetores de regressão mostram a dependência do crescimento de diversos fatores presentes no ambiente intracelular, ressaltando maiores contribuições na faixa de 2200 a 650 cm<sup>-1</sup> com destaque para a região entre 1000 a 950 cm<sup>-1</sup>. Na fase inicial de crescimento fúngico, grande parte da composição da biomassa está associada à formação da parede celular e da presença de ácidos nucleicos em replicação ambos com forte contribuição para a banda νC-O própria desta região espectral.

Soma-se a isto o fato de estarmos correlacionado uma biomassa produzida numa condição diferente (cultivo em fase sólida, meio BDA) daquela em que foi realizado o ensaio de produção de biomassa tendo como substrato o biodiesel (cultivo líquido bifásico). Esta proposição veio para facilitar a avaliação do potencial de fungos filamentosos, particularmente anemófilos, de contaminarem o biodiesel e contribuírem para a sua biodegradação. O ensaio de biodegradação é mais complexo e demorado necessitando de etapas como, preparo ou aquisição do biodeiesel em conformidade com a legislação, esterilização do meio mineral e do biodiesel separadamente além da etapa de filtração, secagem e pesagem da biomassa desidratada. Por outro lado, o ensaio de cultivo em meio sólido BDA é rotineiro em laboratório de microbiologia, com rápida pesagem e diluição do meio, esterilização, plaqueamento e inoculação. Neste contexto, este trabalho trouxe como hipótese, demonstrar o potencial de crescimento de diferentes fungos em sistema bifásico com biodiesel de soja, correlacionando a biomassa formada, com o status fenotípico da célula microbiana produzida em meio BDA e analisada por FTIR. Esta hipótese foi confirmada com os modelos ATR/OPLS obtidos, sendo mais adequado para o método o cultivo de 24h em BDA, demonstrando-se na sua natureza constitutiva a maior parte desta propriedade microbiológica. A exclusão de parte da variância espectral irrelevante da biomassa fúngica foi alcançada aplicando a correção de sinal ortogonal. Esta operação é comumente necessária em se tratando de matriz biológica complexa para alcançar a robustez do método PLS<sup>235</sup>. Dentre as vantagens desta metodologia está a possibilidade de realização de uma rápida triagem de cepas fúngicas, com potencial de crescimento em tanques de abastecimento de biodiesel, com baixo custo e exatidão. Uma das limitações deste estudo é o fato de não termos identificado as espécies fúngicas, portanto o modelo pode apresentar restrições para aplicação a outros gêneros. Neste estudo foram utilizadas somente linhagens reprodutoras de micélio vegetativo hialinos.

## 5. CONCLUSÕES

No primeiro estudo, o conteúdo de biodiesel de gordura animal na mistura foi avaliado por cartas de controle multivariadas. Os espectros de ATR-FTIR combinados com os MCCs foram capazes de identificar corretamente a maioria das informações de conteúdo de gordura animal na carta NAS, bem como a variação da matriz na carta de interferentes, demonstrando ser uma ferramenta confiável para avaliar esses parâmetros com a devida mudança de composição no conjunto de calibração, tais como, inserir o biodiesel de linhaça neste conjunto.

Ao aplicarmos o PLS-DA sobre o mesmo conjunto de dados observou-se baixos erros de calibração e predição para a detecção dos diversos componentes, confirmando que esta ferramenta quimiométrica, se apresenta como um modelo robusto na classificação das matérias-primas e do adulterante utilizados neste estudo.

A análise espectroscópica por ATR-FTIR combinada com PLS foi muito eficiente na identificação e quantificação de matérias-primas de origem animal, vegetal, e adulterante em biodiesel, apresentando também baixo erro de calibração e predição, e um coeficiente de correlação de 0,999. Estes resultados permitem concluir que a utilização destas ferramentas é viável para qualificar e quantificar as matérias-primas e o adulterante utilizados neste estudo. Para ambos os métodos testados uma maior variação nas proporções das matérias-primas, além da inclusão de uma maior diversidade de óleos, gorduras e adulterantes no conjunto de amostras, tornaria os modelos mais robustos e aplicáveis.

Os resultados obtidos através da utilização dos dados de ATR-FTIR, associados às MCCs, e aos métodos PLS-DA e PLS, empregando pré-processamentos simples, tornam este estudo importante para viabilizar um controle de qualidade de baixo custo, primando pela excelência no atendimento das demandas do consumidor final.

No segundo estudo, avaliamos o efeito da concentração de inóculo na produção de biomassa, de proteínas totais e na degradação de biodiesel de soja por *Aspergillus niger*, um fungo previamente selecionado de amostra de

biodiesel de soja. As amostras com 100 vezes mais esporos ( $10^6$  em relação a  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>) demonstraram produzir maior quantidade de biomassa durante os oito dias do experimento, podendo ser um fator agravante no processo de biodeterioração. Diferenças na concentração de inóculo para este fungo pouco influenciaram na produção de proteínas totais ao fim de 8 dias de cultivo em sistema bifásico, a despeito de uma maior produção pontual entre o sexto e o sétimo dias. A biodeterioração neste sistema ocorre preferencialmente por hidrólise da ligação éster podendo ser monitorado por ATR-FTIR e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) da fase orgânica. Através destes resultados, podemos inferir que o fungo *A. niger* possui potencial deteriogênico, utilizando nutrientes do sistema bifásico para o seu crescimento, onde ocorreu a seguinte variação quantitativa decrescente de ésteres metílicos linoleato, oleato, palmitato e estearato.

No terceiro estudo, os dados espectrais por ATR-FTIR de biomassa de fungos filamentosos anemófilos após 8 dias de cultivo em sistema bifásico, tendo biodiesel de soja como substrato em meio mineral, foi correlacionada pela análise de regressão PLS, com o micélio dos mesmos fungos cultivados em meio sólido batata dextrose por 24 e 48h. A utilização de ATR-FTIR, associada a análise por PLS, mostrou ser uma ferramenta robusta na predição de acúmulo de biomassa de 19 fungos testados, sendo que o cultivo por 24h mostrou ser o tempo necessário para correlacionar as características químicas do micélio com o filme de biomassa formado na interface entre a fase aquosa e o biodiesel. O bom desempenho deste método está associado principalmente à informações espectrais relativas a presença de componentes intracelulares como quitina, triacilgliceróis, fosfolípidos, ácidos graxos livres, aminoácidos e proteínas.

Os três estudos utilizando ATR-FTIR associada a quimiometria, permitem inferir que este é um recurso analítico com grande potencial de aplicação tanto no controle de qualidade do biodiesel como na avaliação de sua susceptibilidade à micodeterioração.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chakraborty, R.; Gupta, A.K.; Chowdhury R. Conversion of slaughterhouse and poultry farm animal fats and wastes to biodiesel: Parametric sensitivity and fuel quality assessment. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, 29,120-134.
2. Conselho Nacional de Política Energética - CNPE. Resolução nº 16, de 29/10/2018 <https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/noticias/mme-publica-resolucao-com-aumento-gradual-da-mistura-de-biodiesel-ao-diesel-para-15>. (acessado em 24/07/2020)
3. Conselho Nacional de Política Energética - CNPE. Resolução nº 4, de 09/04/2021. <https://www.in.gov.br/web/dou/-/despacho-do-presidente-da-republica-313697367>. (acessado em 06/05/2021)
4. Associação Brasileira das Indústrias dos Óleos Vegetais. (09/02/2021) <https://abiove.org.br/estatisticas/biodiesel-producao-por-tipo-de-materia-prima>. (acessado em 04/05/2021)
5. Atabani, A.E.; Silitonga, A.S.; Badruddin, I.A.; Mahlia, T.M.I.; Masjuki, H.H.; Mekhilef, S. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2012**, 16, 2070-2093.
6. Cavalcanti; de S., E. H.; Zimmer, A. R.; Bento, F. M.; Ferrão, M. F. Chemical and microbial storage stability studies and shelf life determinations of commercial Brazilian biodiesels stored in carbon steel containers in subtropical conditions. *Fuel*. 2019, 236, 993–1007. doi:10.1016/j.fuel.2018.09.043
7. Moros, J.; Garrigues, S.; Guardia, de la M. Vibrational spectroscopy provides a green tool for multi-component analysis. *Trends. Anal. Chem.* **2010**, 29, 579-591. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.012>.
8. Zhang, W.-B. Review on analysis of biodiesel with infrared spectroscopy. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2012**, 16, 6048–6058.
9. Marcelo, M.C.A.; Martins, C.A.; Pozebon, D.; Ferrão, M.F. Methods of multivariate analysis of NIR reflectance spectra for classification of yerba mate. *Anal. Methods.* **2014**, 6, 7621-7627. [https://doi: 10.1039/c4ay01350](https://doi:10.1039/c4ay01350).
10. Marcelo, M.C.A.; Mariotti, K.C.; Ferrão, M.F.; Ortiz, R.S. Profiling cocaine by ATR-FTIR. *Forensic Sci. Int.* **2015**, 246, 65-71. doi: 10.1016/j.forsciint.2014.11.011.

11. Ortiz, R.S.; Mariotti, K.C.; Fank, B.; Limberger, R.P.; Anzanello, M.J.; Mayorga, P. Counterfeit Cialis and Viagra fingerprinting by ATR-FTIR spectroscopy with chemometry: Can the same pharmaceutical powder mixture be used to falsify two medicines?, *Forensic Sci. Int.* **2013**, 226, 282-289. doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.01.043.
12. Gok, S.; Severcan, M.; Goormaghtigh, E.; Kandemir, I.; Severcan, F. Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis. *Food Chem.* 2015, 170, 234-240. doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.040.
13. Pahl, Greg. Biodiesel: Growing a New Energy Economy. White River Junction, VT: Chelsea Green Publishing Company, 2005.
14. Knothe, Gerhard. The History of Vegetable Oil-Based Diesel Fuels. In Knothe, Krahl, and Van Gerpen (Eds.), *The Biodiesel Handbook*. Champaign, IL: AOCS Press, 2005.
15. Gerpen, V.; Jon, H.; Peterson, L. C.; Goering, C. Biodiesel: An Alternative Fuel for Compression Ignition Engines. St. Joseph, MI: ASABE, 2007.
16. Plá, J. A. Perspectivas do Biodiesel no Brasil. *Indic Econ. FEE*, Porto Alegre. 30, 179-190. 2002
17. Marinković, D.M.; Stanković, M.V.; Veličković, A.V.; Avramović, J.M.; Miladinović, M.R.; Stamenković, O.O.; Veljković, V. B.; Jovanović, D.M. Calcium oxide as a promising heterogeneous catalyst for biodiesel production: current state and perspectives. *Renew. Sustain. Energy Ver.* **2016**, 56, 1387–408.
18. Bateni, H.; Saraeian, A.; Able, C. A comprehensive review on biodiesel purification and upgrading. *Biofuel Res J.* **2017**, 4, 668–690.
19. Singh, D.; Sharma, D.; Soni, S. L.; Sharma, S.; Sharma, P. K.; Jhalani, A. A review on feedstocks, production processes, and yield for different generations of biodiesel. *Fuel*, **2019**, 116553. doi:10.1016/j.fuel.2019.116553
20. Gebremariam, S. N.; Marchetti, J. M. Economics of biodiesel production: Review. *Energy Convers. Manag.* **2018**, 168, 74–84. doi:10.1016/j.enconman.2018.05
21. Reyero, I.; Arzamendi, G.; Gandía, L.M. Heterogenization of the biodiesel synthesis catalysis: CaO and novel calcium compounds as transesterification catalysts. *Chem Eng Res Des.* **2014**, 92, 1519–1530.

22. Karmee, S.K.; Patria, R.D. Lin, C.S.K. Techno-economic evaluation of biodiesel production from waste cooking oil—a case study of Hong Kong. *Int J Mol Sci.* **2015**, *16*, 4362–4371.
23. Colombo, K.; Ender, L.; Barros, A.A.C. The study of biodiesel production using CaO as a heterogeneous catalytic reaction. *Egypt J Pet.* **2017**, *26*, 341–349.
24. Olkiewicz, M.; Torres, C.M.; Jiménez, L.; Font, J.; Bengoa, C. Scale-up and economic analysis of biodiesel production from municipal primary sewage sludge. *Bioresour Technol.***2016**, *214*, 122–131.
25. Reşitoğlu, İ.A.; Keskin, A.; Gürü, M. The optimization of the esterification reaction in biodiesel production from trap grease. *Energy Sources Part A.* **2012**, *34*, 1238–1248.
26. Gui, M.M.; Lee, K.T. Bhatia S. Feasibility of edible oil vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. *Energy*, **2008**, *33*, 1646–1653.
27. Kumar, A.; Sharma, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. *Ind Crops Prod.* **2008**, *28*, 1–10.
28. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP nº 791 de 12/6/2019. <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-n-791-de-12-de-junho-de-2019-163598743>. (acessado em 12/08/2020)
29. Biofuels explained - U.S. Energy Information Administration (EIA) Monthly Biodiesel Production Report 2021. Available online <https://www.eia.gov/biofuels/biodiesel/production/> (acessado em Fevereiro 2022)
30. Flach, B.; Lieberz, S.; Bolla, S. European Union: Biofuels Annual 2021. Available online: [https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Biofuels%20Annual%20The%20Hague\\_European%20Union\\_06-18-2021.pdf](https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Biofuels%20Annual%20The%20Hague_European%20Union_06-18-2021.pdf) (acessado em Fevereiro 2022)
31. Mahdavi, M.; Abedini, E.; Darabi, A.H. Biodiesel synthesis from oleic acid by nanocatalyst (ZrO<sub>2</sub> /Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) under high voltage conditions. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 55027–55032. doi.org/10.1039/C5RA07081C.
32. Singh, D.; Sharma, D.; Soni, S.L.; Sharma, S.; Kumari, D. Chemical compositions, properties, and standards for different generation biodiesels: a review. *Fuel*, **2019**, *253*, 60–71. doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.174

33. Knothe, G.; Razon, L.F. Biodiesel fuels. *Prog. Energy Combust. Sci.* **2017**, *58*, 36–59.
34. Aransiola, E.F.; Ojumu, T.V.; Oyekola, O.O.; Madzimbamuto, T.F.; Ikhu-Omoregbe, D.I.O. A review of current technology for biodiesel production: state of the art. *Biomass Bioenergy.* **2014**, *61*, 276–297.  
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.11.014>.
35. Tariq, M.; Ali, S.; Khalid, N. Activity of homogeneous and heterogeneous catalysts, spectroscopic and chromatographic characterization of biodiesel: a review. *Renew Sustain Energy Rev.* **2012**, *16*, 6303–6316.  
[doi.org/10.1016/j.rser.2012.07.005](https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.07.005).
36. Karmakar A, Karmakar S, Mukherjee S. Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production. *Bioresour Technol.* **2010**, *101*, 7201–7210. doi:10.1016/j.biortech.2010.04.0
37. Istadi, I.; Prasetyo, S.A.; Nugroho, T.S. Characterization of K<sub>2</sub>O/CaO-ZnO catalyst for transesterification of soybean oil to biodiesel. *Procedia Environ Sci.* **2015**, *23*, 394–399. doi.org/10.1016/j.proenv.2015.01.056.
38. Ghazali, W.N.; Mamat, R.; Masjuki, H.H.; Naja, G. Effects of biodiesel from diferente feedstocks on engine performance and emissions: a review. *Renew Sustain Energy Rev.* **2015**, *51*, 585–602. doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.031
39. Fontaras, G.; Tzamkiozis, T.; Hatziemmanouil, E.; Samaras, Z. Experimental study on the potential application of cottonseed oil–diesel blends as fuels for automotive diesel engines. *Process Saf Environ Protect.* **2007**, *85*, 396–403.  
[doi.org/10.1205/psep07017](https://doi.org/10.1205/psep07017).
40. Ilkilic, C.; Yucesu, H. The use of cottonseed oil methyl ester on a diesel engine. *Energy Sour Part A.* **2008**, *30*, 742–753.  
[doi.org/10.1080/15567030701436214](https://doi.org/10.1080/15567030701436214).
41. Puhan, S.; Saravanan, N.; Nagarajan, G; Vedaraman, N. Effect of biodiesel unsaturated fatty acid on combustion characteristics of a DI compression ignition engine. *Biomass Bioenergy.* **2010**, *34*, 1079–1088.  
[doi:10.1016/j.biombioe.2010.02.0](https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.02.0)
42. Dixit S, Rehman A. Linseed oil as a potential resource for bio-diesel: a review. *Renew Sustain Energy Rev.* **2012**, *16*, 4415–4421  
[doi.org/10.1016/j.rser.2012.04.042](https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.04.042).



43. Atabani, A. E.; Silitonga, A. S.; Ong, H. C.; Mahlia, T. M. I.; Masjuki, H. H.; Badruddin, I. A.; Fayaz, H. Non-edible vegetable oils: A critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. *Renew Sustain Energy Rev.* **2013**, *18*, 211-245. doi:10.1016/j.rser.2012.10.013/1016/j.enconman.2013.10.056.
44. Ahmad, J.; Yusup, S.; Bokhari, A.; Kamil, R.N.M. Study of fuel properties of rubber seed oil based biodiesel. *Energy Convers Manage.* **2014**, *78*, 266–275. doi:10.1016/j.enconman.2013.10.056.
45. Shameer, P. M.; Ramesh, K. Green technology and performance consequences of an eco-friendly substance on a 4-stroke diesel engine at standard injection timing and compression ratio. *J Mech Sci Technol.* **2017**, *31*, 1497–1507. doi.org/10.1007/s12206-017-0249-3.
46. Srivastava, P.K.; Verma, M. Methyl ester of karanja oil as an alternative renewable source energy. *Fuel*, **2008**, *87*, 1673–1677. doi.org/10.1016/j.fuel.2007.08.018.
47. Bajpai, S.; Sahoo, P.K.; Das, L.M. Feasibility of blending karanja vegetable oil in petrodiesel and utilization in a direct injection diesel engine. *Fuel*, **2009**, *88*, 705–711. doi.org/10.1016/j.fuel.2008.09.011
48. Antwi-Bediako, R.; Otsuki, K.; Zoomers, A.; Amsalu, A. Global Investment Failures and Transformations: A Review of Hyped Jatropha Spaces. *Sustainability.* **2019**, *11*, 3371. doi:10.3390/su11123371
49. Akintayo, E.T. Characteristics and composition of Parkia biglobbosa and Jatropha curcas oils and cakes. *Bioresour Technol.* **2004**, *92*, 307-310.
50. Berchmans, H.J.; Hirata, S. Biodiesel production from crude Jatropha curcas L. seed oil with a high content of free fatty acids. *Bioresour Technol.* **2008**, *99*, 1716-1721.
51. Verma, R.; Bisen, P.S. Gas chromatography and mass spectroscopy based detection of lipid profile in Jatropha crude oil and its potential as biodiesel feedstock. Mendeley Data, 2019.
52. Shaah, A. H.; M.; Hossain, M.S.; Allafi, F. A. S.; Alsaedi, A.; Ismail, N.; Ab Kadir, M. O.; Ahmad, M. I. A review on non-edible oil as a potential feedstock for biodiesel: physicochemical properties and production technologies. *RSC Advances.* **2021**, *11*, 25018–25037. doi:10.1039/d1ra04311k

53. Ameen, M.; Azizan, M. T.; Ramli, A.; Yusup, S.; Alnarabiji, M. S. Catalytic Hydrodeoxygenation of Rubber Seed Oil over Sonochemically Synthesized Ni-Mo/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Catalyst for Green Diesel Production. *Ultrason Sonochem.* **2018**. doi:10.1016/j.ultsonch.2018.10.0
54. Bhatti, H. N.; Hanif, M. A.; Qasim, M.; Rehman, A.–Ur. Biodiesel production from waste tallow. *Fuel.* **2008**, 87, 2961–2966.
55. Verma, P.; Sharma, M. P.; Dwivedi, G. Impact of alcohol on biodiesel production and properties. *Renew Sustain Energy Rev.* **2016**, 56, 319–333. doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.048.
56. Adewale, P.; Dumont, M. J.; Ngadi, M. Recent trends of biodiesel production from animal fat wastes and associated production techniques. *Renew Sustain Energy Rev.* **2015**, 45, 574–588. doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.039
- 57 Elkady, M.F.; Zaatout, A.; Balbaa, O. Production of Biodiesel from Waste Vegetable Oil via KM Micromixer. *J Chem.* **2015**, 1-9. doi.org/10.1155/2015/630168.
58. Su, G.; Ong, H. C.; Mofijur, M.; Mahlia, T. M. I.; Ok, Y. S. Pyrolysis of waste oils for the production of biofuels: A critical review. *Journal of Hazardous Materials - Part B.* 2022, 424, 27396. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127396.
59. Pienkos, P.T.; Darzins, A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, Bioprod Biorefin.* **2009**, 3, 431–440. doi.org/10.1002/bbb.159.
60. Dong, T.; Knoshaug, E. P.; Davis, R.; Laurens, L. M.; Van Wychen, S.; Pienkos, P. T.; Nagle, N. Combined algal processing: A novel integrated biorefinery process to produce algal biofuels and bioproducts. *Algal Res.* **2016**, 19, 316–323. doi:10.1016/j.algal.2015.12.021
61. Aro, E.-M. From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio.* **2015**, 45, 24–31. doi:10.1007/s13280-015-0730-0
62. Islam, A. K. M. A.; Primandari, S. R. P.; Yaakob, Z. Non-Edible Vegetable Oils as Renewable Resources for Biodiesel Production: South-East Asia Perspective. *Advances in Biofuels and Bioenergy.* Chapter 10. 2018. doi:10.5772/intechopen.73304 <https://www.intechopen.com/chapters/58813>
63. Wyatt, V.T.; Hess, M.A.; Dunn, R.O.; Foglia, T.A.; Haas, M.J.; Marmer, W.N. Fuel properties and nitrogen oxide emission levels of biodiesel produced from animal fats. *J. Amer Oil Chem Soc.* **2005**, 82, 585–591.

64. Banković-Ilić, I.B.; Stojković, I.J.; Stamenković, O.S.; Veljkovic, V.B.; Hung, Y.T. Waste animal fats as feedstocks for biodiesel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *32*, 238–254.
65. Encinar, J.M.; Sánchez, N.; Martínez, G.; García, L. Study of biodiesel production from animal fats with high free fatty acid content. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 10907–10914.
66. Avhad, M.R.; Marchetti, J.M. A review on recent advancement in catalytic materials for biodiesel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *50*, 696–718.
67. Pinzi, S.; Leiva-Candia, D.; López-García, I.; Redel-Macías, M.; Dorado, M. Latest trends in feedstocks for biodiesel production. *Biofuels Bioprod. Biorefin.* **2014**, *8*, 126–143.
68. Pereira, G.G.; Garcia, R.K.A.; Ferreira, L.L.; Barrera-Arellano, D. Soybean and soybean/beef-tallow biodiesel: A comparative study on oxidative degradation during long-term storage. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2017**, *94*, 587–593.
69. Canakci, M.; Sanli, H. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *35*, 431–441.
70. Sendzikiene, E.; Makareviciene, V.; Janulis, P. Oxidation stability of biodiesel fuel produced from fatty wastes. *Pol. J. Environ. Stud.* **2005**, *14*, 335–339.
71. Kumar, M.; Sharma, M.P. Selection of potential oils for biodiesel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2016**, *56*, 1129–1138.
72. Resolução ANP nº 45/2014 - estabelece a especificação do biodiesel contida no Regulamento Técnico ANP nº 3/2014 e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional. <http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resolanp/2014/agosto&item=rانp-45-2014>. (acessado em maio 2020)
73. Resolução ANP nº 798/2019 - altera a Resolução ANP nº 45/2014, que estabelece as especificações de qualidade de biodiesel, para determinar a obrigatoriedade da aditivação do biodiesel com antioxidante e estabelecer novo limite de especificação da característica estabilidade à oxidação. <http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2019/agosto&item=rانp-798-2019>. (acessado em 20/08/2020)

74. Lôbo, I. P.; Ferreira, S. L. C.; Cruz, R. S. da. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Quim. Nova.* **2009**, 32, 1596–1608. doi:10.1590/s0100-40422009000600044
75. Knothe, G.; Steidley, K. R. Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. *Fuel.* **2005**, 84, 1059-1065. doi:10.1016/j.fuel.2005.01.016
76. Shimamoto, G. G.; Favaro, M. M. A.; Tubino, M. Simple Methods via Mid-IR or <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy for the Determination of the Iodine Value of Vegetable Oils. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, 1-7.
77. Knothe, G. Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value? *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2002**, 79, 847–854. doi:10.1007/s11746-002-0569-4
78. Sakthivel, R.; Ramesh, K.; Purnachandran, R.; Shameer, P.M. A review on the properties, performance and emission aspects of the third generation biodiesels. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2018**, 2970–2992. doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.037
79. Knothe, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process. Technol.* **2005**, 86,1059–1070. doi:10.1016/j.fuproc.2004.11.002
80. Saxena, P.; Jawale, S.; Joshipura, M. H. A Review on Prediction of Properties of Biodiesel and Blends of Biodiesel. *Procedia Engineering*, **2013**, 51, 395–402. doi:10.1016/j.proeng.2013.01.055
81. Jakeria, M. R.; Fazal, M. A.; Haseeb, A. S. M. A. Influence of different factors on the stability of biodiesel: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, 30, 154–163. doi:10.1016/j.rser.2013.09.024
82. Giakoumis, E.G. A statistical investigation of biodiesel physical and chemical properties, and their correlation with the degree of unsaturation. *Renew. Energy.* **2013**, 50 858-878.
83. Hoekman, S.K.; Broch, A.; Robbins, C.; Cenicerros, E., Natarajan M. Review of biodiesel composition, properties and specifications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2012**, 16, 143-169.
84. Kumar, N. Oxidative stability of biodiesel: causes, effects and prevention. *Fuel.* **2017**, 190, 328-350.

85. Knothe G. Some aspect of biodiesel oxidative stability. *Fuel Process. Technol.* **2007**, 88, 669 -677.
86. Jhalani, A.; Sharma, D.; Soni, S. L.; Sharma, P. K.; Sharma, S. A comprehensive review on water-emulsified diesel fuel: chemistry, engine performance and exhaust emissions. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**. doi:10.1007/s11356-018-3958-y
87. Silva, F. A. M.; Borges, M. F. M.; Ferreira, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quim. Nova*, **1999**, 22, 94-103.
88. Pullen, J.; Saeed, K. An overview of biodiesel oxidation stability. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2012**, 16, 5924 – 5950. doi:10.1016/j.rser.2012.06.024
89. Zuleta, E. C.; Baena, L.; Rios, L. A.; Calderón, J. A. The oxidative stability of biodiesel and its impact on the deterioration of metallic and polymeric materials: a review. *J Braz Chem Soc.* **2012**, 23, 2159–2175. doi:10.1590/s0103-50532012001200004
90. Horel, AA. Biodegradation of petroleum and alternative fuel hydrocarbons in moderate to cold climate: University of Alaska Fairbanks; 2009.
91. Helwani, Z.; Othman, M.R.; Aziz, N.; Fernando, W.J.N.; Kim, J. Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: a review. *Fuel Process. Technol.* **2009**, 90, 1502–1514
92. Sharma, Y. C.; Singh, B.; Upadhyay, S. N. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel*, **2008**, 87, 2355–2373. doi:10.1016/j.fuel.2008.01.014
93. Meneghetti, S. M. P.; Meneghetti, M. R.; Brito, Y. C. A Reação de Transesterificação, Algumas Aplicações e Obtenção de Biodiesel. *Rev. Virtual Quim.* **2013**, 5, 63-73.
94. Taher, H.; Al-Zuhair, S.; Al-Marzouqi, A. H.; Haik, Y.; Farid, M. M. A Review of Enzymatic Transesterification of Microalgal Oil-Based Biodiesel Using Supercritical Technology. *Enzyme Res.* **2011**, 1-25. doi:10.4061/2011/468292
95. Oh, P. P.; Lau, H. L. N.; Chen, J.; Chong, M. F.; Choo, Y. M. A review on conventional technologies and emerging process intensification (PI) methods for biodiesel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2012**, 16, 5131–5145. doi:10.1016/j.rser.2012.05.014

96. Singh, A.; He, B.; Thompson, J.; Van Gerpen, J. Process optimization of biodiesel production using alkaline catalysts. *Appl Eng Agric.* **2006**, *22*, 597–600. doi:10.13031/2013.21213
97. Lotero, E.; Liu, Y.; Lopez, D. E.; Suwannakarn, K.; Bruce, D. A.; Goodwin, J. G. Synthesis of Biodiesel via Acid Catalysis. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, *44*, 5353–5363. doi:10.1021/ie049157g
98. Marchetti, J. M.; Miguel, V. U.; Errazu A. F. Possible methods for biodiesel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2007**, *11*, 1300-1311.
99. Mumtaz, M. W.; Adnan, A.; Mukhtar, H.; Rashid, U.; Danish, M. Biodiesel Production Through Chemical and Biochemical Transesterification. *Clean Energy for Sustainable Development*. Chapter Fifteen. 2017, 465 – 485. doi:10.1016/b978-0-12-805423-9.00015-6
100. Samios, D.; Pedrotti, F.; Nicolau, A.; Reiznautt, Q.B.; Martini, D.D.; Dalcin, F.M. *Fuel Process. Technol.* **2009**, *90*, 599.
101. Guzatto, R.; Defferrari, D.; Reiznautt, Q.B.; Cadore, Í.R.; Samios, D. *Fuel* **2012**, *92*, 197.
102. Guzatto, R.; de Martini, T.L.; Samios, D. *Fuel Process. Technol.* **2011**, *92*, 2083.
103. Brandão, L. F. P.; Braga, J. W. B.; Suarez, P. A. Z. Determination of vegetable oils and fats adulterants in diesel oil by high performance liquid chromatography and multivariate methods. *J. Chromatogr. A.* **2012**, *1225*, 150–157. doi:10.1016/j.chroma.2011.12.076
104. Guimarães, E.; Mitsutake, H.; Gontijo, L. C.; de Santana, F. B.; Santos, D. Q.; Neto, W. B. Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration for Quantification of Soybean Oil as Adulterant in Biodiesel Fuels. *J Am Oil Chem Soc.* **2015**, *92*, 777–782. doi:10.1007/s11746-015-2656-
105. Pavia, D.L.; Lampman, G.M.; Kriz, G.S.; VyVyan, J.R. Introdução à Espectroscopia. Tradução da 4ª edição norte-americana, Editora Cengage Learnin, 2010.
106. Silverstein, R.M.; Webster, F.X.; Kiemle, D.J.; D.L. Bryce. Spectrometric Identification of Organic Compounds, 8ª Edição, Editora John Wiley & Sons, Inc., 2014.
107. Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. Princípios de Análise Instrumental. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

108. Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, 2004, v. 8.
109. Sun, D. *Infrared Spectroscopy: For Food Quality Analysis and Control*. Academic Press, 2009.
110. Barbosa, L.C. de A. *Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*, 1ª Edição, Editora UFV, 2007.
111. Correa, C. *Aplicação de cartas de controle multivariadas no controle e garantia de qualidade do biodiesel e suas blendas (B100)*, 2014. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
112. Wold, S. *Kemometri – kemi och tillampad matematik*, Svensk Naturvetenskap 201, 1974.
113. Esbensen, K.; Geladi, P. The start and early history of chemometrics - selected interviews .2. *J. Chemometr.* **1990**, 4, 389-412.
114. Ferreira, M.M.C. *Quimiometria Conceitos, Métodos e Aplicações*. 1ª Edição, Editora UNICAMP, 2015.
115. Pereira Filho, E.R. *Planejamento Fatorial em Química*. 1ª Edição, Editora EdUFSCar, 2015.
116. Brereton, R. G. *Chemometrics: Data Analysis for the laboratory and chemical plant*. John Wiley & Sons Inc: Chinchester, 2003, p. 407.
117. R.F. Teófilo, *Métodos Quimiométricos: Uma Visão Geral - Conceitos básicos de quimiometria*, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Vol. 1, 2013.
118. Soares, I. P.; Rezende, T. F.; Pereira, R. de C. C.; Santos, C. G. Dos; Fortes, I. C. P. Determination of biodiesel adulteration with raw vegetable oil from ATR-FTIR data using chemometric tools. *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, 22, 1229-1235. doi:10.1590/s0103-50532011000700005
119. Bro R, Smilde AK. Principal component analysis. *Anal. Methods.* **2014**, 6, 2812–2831.
120. Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P. Principal component analysis. *Chemometr Intell Lab Syst.* **1987**, 2, 37-52. doi:10.1016/0169-7439(87)80084-9
121. Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B. *Chemometrics: A practical guide*, New York: John Wiley & Sons, 1998.
122. Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O. Chemometrics I: Multivariate calibration, a tutorial. *Quim. Nova.* **1999**, 22, 724-731.

123. Phatak, A. Evaluation of some multivariate methods and their applications in chemical engineering. University of Waterloo, Ontario, 1993.
124. De Souza, A. M.; Breikreitz, M. C.; Filgueiras, P. R.; Rohwedder, J. J. R.; Poppi, R. J. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II, *Quim. Nova.* **2013**, 36, 1057-1065.
125. Ferrão, M. F.; Viera, M. de S.; Pazos, R. E. P.; Fachini, D.; Gerbase, A. E.; Marder, L. Simultaneous determination of quality parameters of biodiesel/diesel blends using HATR-FTIR spectra and PLS, iPLS or siPLS regressions. *Fuel.* **2011**, 90, 701-706.
126. Silva, V. A. G. Da; Talhavini, M.; Zacca, J. J.; Trindade, B. R.; Braga, J. W. B. Discrimination of Black Pen Inks on Writing Documents Using Visible Reflectance Spectroscopy and PLS-DA. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, 25, 1552. doi:10.5935/0103-5053.20140140
127. Vitale, R.; Bevilacqua, M.; Bucci, R.; Magrì, A.D.; Magrì, A.L.; Marini, F. A rapid and non-invasive method for authenticating the origin of pistachio samples by NIR spectroscopy and chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2012**, 121, 90.
128. Almeida, M. R. et al. Classification of Amazonian rosewood essential oil by Raman spectroscopy and PLS-DA with reliability estimation. *Talanta.* **2013**, 117, 305–311.
129. Grasel, F. S.; Ferrão, M. F. A rapid and non-invasive method for the classification of natural tannin extracts by near-infrared spectroscopy and PLS-DA. *Anal. Methods.* **2016**, 8, 644–649. doi:10.1039/c5ay02526e
130. Naes, T.; Isaksson, T.; Fearn, T.; Davies, T. A user-friendly guide to Multivariate Calibration and Classification, Chichester: NIR Publications, 2002.
131. Skibsted, E.T.S.; Boelens, H.F.M.; Westerhuis, J.A.; Smilde, A.K.; Broad, N.W.; Rees, D.R.; Witte, D.T. Net Analyte Signal Based Statistical Quality Control. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 7103-7114.
132. Zimmer, A. R.; Pizolatto, T. M.; Bento, F.M.. Toxicity of a free water from simulated storage tanks of diesel/ biodiesel blend (B10) treated with a multifunctional additive-biocide. Editora Pascal LTDA, 2020, 13 p.167-187 doi:10.29327/515543



133. Sørensen, G., Pedersen, D. V., Nørgaard, A. K., Sørensen, K. B., & Nygaard, S. D. Microbial growth studies in biodiesel blends. *Bioresour. Technol.* **2011**, 102, 5259–5264. doi:10.1016/j.biortech.2011.02.0
134. Passman F.J. Microbial contamination and its control in fuels and fuel systems since 1980 e a review. *Int Biodeterior Biodegradation.* **2013**, 81, 88-104.
135. Resolução ANP Nº 7, de 19.3.2008 - DOU 20.3.2008 [https://www.udop.com.br/download/legislacao/comercializacao/juridico\\_legislacao/res\\_7\\_comercializacao\\_biodiesel.pdf](https://www.udop.com.br/download/legislacao/comercializacao/juridico_legislacao/res_7_comercializacao_biodiesel.pdf) (acessado em maio de 2019)
136. Zuleta, E. C.; Baena, L.; Rios, L. A.; Calderón, J. A. The Oxidative Stability of Biodiesel and its Impact on the Deterioration of Metallic and Polymeric Materials: Review. *J. Braz. Chem. Soc.* 2012, 23, 2159-2175.
137. Bento, F. M.; Gaylarde, C. C. Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* **2001**, 47, 107-112. doi:10.1016/s0964-8305(00)00112-8
138. Bento, F.M., Englert, G.E., Gaylarde, C.C., Muller, I.L., 2004. Influence of aqueous phase on electrochemical biocorrosion tests in diesel/water systems. *Materials and Corrosion.* **2004**, 55, 577-585.
139. Gaylarde, C.C.; Bento, F.; Kelley, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Braz. J. Microbiol.* **1999**, 30, 1-10.
140. Chesneau, H.L., 2000. The silent fuel killers (stability and microbiologicals). In: Proceedings of 2000 international joint power generation conference, Florida, pp.1 e 8.
141. Haussmann S.; Jaeger, K-E. Lipolytic Enzymes from Bacteria. In: Timmis, K. (Ed.) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Springer Berlin Heidelberg, 2010, 1099-1126.
142. Medigan M. Brock. Biology of Microorganisms, 13<sup>th</sup> edn. International Microbiology, 2012. doi 10.1016/B978-1-4832-3136-5.50010-3.
143. Cooper, D. G.; Goldenberg, B. G. Surface-Active Agents from Two Bacillus Species. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, 53, 224-229.
144. Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Gaylarde, C.C., Viscardi, S.L., Menendez, A., Daroda, R. Suscetibilidade do Óleo Diesel com 2 e 5% de biodiesel à contaminação microbiana durante a estocagem. *Revista Biodiesel*, **2006**, 4, 24-26.

145. Pasqualino, J.C.; Montané, D.; Salvadó, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass Bioenergy*. **2006**, 30, 874-879.
146. Mariano, A.P., Tomasele, R.C., Oliveira, L.M., Contieiro, J., Angelis, D.F., 2008. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. *Afr. J. Biotechnol.* **2008**, 7, 1323-1328.
147. Junior, J.S.; Mariano, A.P.; Angelis, D.F. Biodegradation of biodiesel/ diesel blends by *Candida viswanathii*. *Afr. J. Biotechnol.* **2009**, 8, 2774-2778.
148. Zhang, X.; Peterson, C.; Reece, D.; Mbller, G.; Haws, R. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *Trans Am Soc Agric Eng.* **1998**, 41,1423-1430.
149. De Mello, J.A.; Carmichael, C.A.; Peacock, E.E.; Nelson, R.K.; Arey, J.S.; Reddy, C.M. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. *Mar. Pollut. Bull.* **2007**, 54, 894-904.
150. Bücke, F., Santestevan, N. A., Roesch, L. F., Seminotti Jacques, R. J., Peralba, M. do C. R., Camargo, F. A. de O., & Bento, F. M. Impact of biodiesel on biodeterioration of stored Brazilian diesel oil. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. **2011**, 65, 172–178. doi:10.1016/j.ibiod.2010.09.008
151. Cazarolli, J. C.; Guzzato, R.; Samios, D.; Peralba, M. do C. R.; Cavalcanti, E. H. de S.; Bento, F. M. Susceptibility of linseed, soybean, and olive biodiesel to growth of the deteriorogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. **2013**, 95, 364–372. doi:10.1016/j.ibiod.2013.09.025
152. Bücke, F.; de Moura, T. M.; da Cunha, M. E.; de Quadros, P. D.; Beker, S. A.; Cazarolli, J. C.; Camarão, E. B.; Frazzon, A. P. G.; Bento, F. M. Evaluation of the deteriorogenic microbial community using qPCR, n-alkanes and FAMES biodegradation in diesel, biodiesel and blends (B5, B10, and B50) during storage. *Fuel*. **2018**, 233, 911–917. doi:10.1016/j.fuel.2017.11.076
153. Balabin, R. M.; Safieva, R. Z. Biodiesel classification by base stock type (vegetable oil) using near infrared spectroscopy data. *Anal. Chim. Acta*. **2011**, 689, 190–197. doi:10.1016/j.aca.2011.01.041
154. Máquina, A. D. V.; Souza, L. M. de; Gontijo, L. C.; Santos, D. Q.; Borges Neto, W. Characterization of Biodiesel by Infrared Spectroscopy with Partial Least Square Discriminant Analysis. *Anal. Lett.* **2017**, 50, 2117–2128. 48.

155. Costa, G. B., Fernandes, D. D. S., Almeida, V. E., Maia, M. S., Araújo, M. C. U., Vêras, G., & Diniz, P. H. G. D. Identification of biodiesel feedstock in biodiesel/diesel blends using digital images and chemometric methods. *Anal. Methods*. **2016**, 8, 4949–4954. doi:10.1039/c6ay01158f
156. Dos Santos, V. H. J. M., Ramos, A. S., Pires, J. P., Engelmann, P. de M., Lourega, R. V., Ketzer, J. M. M., & Rodrigues, L. F. Discriminant analysis of biodiesel fuel blends based on combined data from Fourier Transform Infrared Spectroscopy and stable carbon isotope analysis. *Chemometr Intell Lab Syst*. **2017**, 161, 70–78. doi:10.1016/j.chemolab.2016.12.004
157. Siteo, B. V.; Máquina, A. D. V.; de Santana, F. B.; Gontijo, L. C.; Santos, D. Q.; Borges Neto, W. Monitoring of biodiesel content and adulterant presence in methyl and ethyl biodiesels of jatropha in blends with mineral diesel using MIR spectrometry and multivariate control charts. *Fuel*. **2017**, 191, 290–299. doi:10.1016/j.fuel.2016.11.078
158. Filgueiras, P. R.; Alves, J. C. L.; Poppi, R. J. Quantification of animal fat biodiesel in soybean biodiesel and B20 diesel blends using near infrared spectroscopy and synergy interval support vector regression. *Talanta*. **2014**, 119, 582–589. doi:10.1016/j.talanta.2013.11.056
159. Siteo, B. V., Mitsutake, H., Guimarães, E., Gontijo, L. C., Santos, D. Q., & Borges Neto, W. Quality Control of Biodiesel Content of B7 Blends of Methyl Jatropha and Methyl Crambe Biodiesels Using Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Control Charts Based on Net Analyte Signal. *Energy Fuels*. **2016**, 30, 1062–1070. doi:10.1021/acs.energyfuels.5b02489
160. Silva, G. W. B., Gomes, A. A., da Silva, P., Costa, G. B., Fernandes, D. D. S., Fontes, M. M., & Veras, G. Biodiesel/Diesel Blends Classification with Respect to Base Oil Using NIR Spectrometry and Chemometrics Tools. *J Am Oil Chem Soc*. **2012**, 89, 1165–1171. doi:10.1007/s11746-012-2028-8
161. Mazivila, S. J.; de Santana, F. B.; Mitsutake, H.; Gontijo, L. C.; Santos, D. Q.; Neto, W. B. Discrimination of the type of biodiesel/diesel blend (B5) using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *Fuel*. **2015**, 142, 222–226. doi:10.1016/j.fuel.2014.11.014
162. Mazivila, S. J.; Gontijo, L. C.; Santana, F. B. de; Mitsutake, H.; Santos, D. Q.; Borges Neto, W. Fast Detection of Adulterants/Contaminants in

- Biodiesel/Diesel Blend (B5) Employing Mid-Infrared Spectroscopy and PLS-DA. *Energy Fuels*. **2014**, 29, 227–232. doi:10.1021/ef502122w10.
163. Mazivila, S. J.; de Santana, F. B.; Mitsutake, H.; Gontijo, L. C.; Santos, D. Q.; Neto, W. B. Discrimination of the type of biodiesel/diesel blend (B5) using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *Fuel*. **2015**, 142, 222–226. doi:10.1016/j.fuel.2014.11.014
164. Filgueiras, P. R.; Alves, J. C. L.; Poppi, R. J. Quantification of animal fat biodiesel in soybean biodiesel and B20 diesel blends using near infrared spectroscopy and synergy interval support vector regression. *Talanta*. **2014**, 119, 582–589. doi:10.1016/j.talanta.2013.11.056
165. Balabin, R. M.; Safieva, R. Z. Biodiesel classification by base stock type (vegetable oil) using near infrared spectroscopy data. *Anal. Chim. Acta*. **2011**, 689, 190–197. doi:10.1016/j.aca.2011.01.041
166. Siteo, B. V.; da Costa, L. G.; dos Santos, B. A.; Santos, D. Q.; Neto, W. B. Identificação de adulterantes de biodiesel metílico de crambe em misturas com diesel, usando FT-MIR e cartas de controle multivariadas baseadas no sinal analítico líquido. *Quim. Nova*. **2020**, 43, 1–8.
167. Zhang, W.-B. Review on analysis of biodiesel with infrared spectroscopy. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2012**, 16, 6048–6058.
168. Wold, S.; Sjöström, M.; Eriksson, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2001**, 58, 109–130.
169. Serrano-Lourido, D.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Checa, A. Classification and characterisation of Spanish red wines according to their appellation of origin based on chromatographic profiles and chemometric data analysis. *Food Chem.* **2012**, 135, 1425–1431.
170. Wold, S. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1998**, 44, 175–185.
171. Fearn, T. On orthogonal signal correction. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2000**, 50, 47–52.
172. Barker, M.; Rayens, W. Partial least squares for discrimination. *J. Chemom.* **2003**, 17, 166–173.
173. Felizardo, P.; Baptista, P.; MenezesCorreia, J. C. M. J. N. Multivariate near infrared spectroscopy models for predicting methanol and water content in biodiesel. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 595, 107–113.

174. ASTM. Annual Book of ASTM Standards, Standards Practices for Infrared, Multivariate, Quantitative Analysis, ASTM International E1655-17. Pennsylvania, USA: West Conshohocken, 2017.
175. Oliveira, J. S.; Montalvão, R.; Daher, L.; Suarez, P. A. Z.; Rubim, J. C. Determination of methyl ester contents in biodiesel blends by FTIR-ATR and FTNIR spectroscopies. *Talanta*, **2006**, 69, 1278–1284.
176. Barthus, R. C.; Poppi, R. J. Multivariate quality control applied to detect the soybean oil oxidation using fourier transform infrared spectroscopy. *Spectrosc. Lett.* **2002**, 35, 729–739.
177. Colthup, N. B.; Wiberley, S. E.; Daly, L. H. Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, 3th ed.; Academic Press: Editora, 1994; Vol. 547, ISBN 0-12-182554-X.
178. Bouaid, A.; Martinez, M.; Aracil, J. Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. *Fuel*, **2007**, 86, 2596– 2602.
179. Mata, T.; Mendes, A.; Caetano, N.; Martins, A. Properties and sustainability of biodiesel from animal fats and fish oil. *Chem. Eng. Trans.* **2014**, 38, 175–180.
180. Ramo, M. J.; Fernández, C. M.; Casas, A.; Rodríguez, L.; Pérez, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour. Technol.* **2009**, 100, 261–268.
181. Dunn, R. O. Oxidative stability of soybean oil fatty acid methyl esters by oil stability index (OSI). *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **2005**, 82, 381–387.
182. Bamgboye, A. I.; Hansen, A. C. Prediction of cetane number of biodiesel fuel from the fatty acid methyl ester (FAME) composition. *Int. Agrophys.* **2008**, 22, 21–29.
183. Pontes, M. J. C.; Pereira, C. F.; Pimentel, M. F.; Vasconcelos, F. V. C.; Silva, A. G. B. Screening analysis to detect adulteration in diesel/biodiesel blends using near infrared spectrometry and multivariate classification. *Talanta*. **2011**, 85, 2159–2165.
184. Bushnell, L.D., Haas, H.F. The utilization of hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriol.*, **1941**, 41, 653-673.
185. Wrolstad, R. E. ; Acree, T. E.; Decker, E. A. ; Penner, M. H. ; Reid, D. S.; Schwartz, S. J.; Shoemaker, C. F.; Smith, ; Sporns, P. Handbook of Food Analytical Chemistry, Volume 1: Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates. 2004; 784pg.

186. Lopes, R.S.; Portela, A.P.A.S.; Svedese, V.M.; Albuquerque, A.C.; Luna-Alves Lima, E.A. Aspectos morfológicos de *Paecilomyces farinosus* (Holm ex S.F. Gray) Brown & Smith sobre infecções em *Coptotermes gestroi* (Wasmann) (Isoptera: Rhinotermitidae). *Divulgação Técnica. Biológico*, São Paulo, v.70, n.1, p.29-33, jan / jun., 2008.
187. Scheicher, T.; Werkmeister, R.; Russ, W.; Meyer-Pittroff, R. Microbiological stability of biodiesel–diesel-mixtures. *Bioresour. Technol.*, **2009**,100, 724–730.
188. Gassen, J.; Bento, F.M.; Frazzon, A.P.G.; Ferrão, M.F. Marroni, I.V.; Simonetti, A. B. Growth of *Paecilomyces variotii* in B0 (diesel), B100 (biodiesel) and B7 (blend), degradation and molecular detection. *Braz. J. Biol.*, **2015**, 75, 541-547.
- 189 Salihu, A.; Alam, M. Z.; AbdulKarim, M. I.; Salleh, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resour., Conserv. Recycl.* **2012**, 58, 36–44. doi:10.1016/j.resconrec.2011.10.0
190. Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Stahl, D.A.; Clark, D.P. Brock Biology of Microorganisms. 13. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2012, 93-94.
191. Bharathi, D.; Rajalakshmi, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, 22, 101368.
192. Thapa, S.; Li, H.; OHair, J.; Bhatti, S.; Chen, F.-C.; Nasr, K. A.; Johnson, T.; Zhou, S. Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Mol. Biotechnol.* **2019**, 1-23.
193. Nyonzima, F. N.; Veena, S. M.; More, S. S. Industrial Production and Optimization Of Microbial Enzymes. In: *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries*. Springer, Singapore. 2020,115-135.
194. Bornscheuer, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2002**, 26, 73-81.
195. Avhad, M. R.; Marchetti, J. Uses of enzymes for biodiesel production. In: *Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts*. Woodhead Publishing. 2019,135-152.
196. Sales, J. C. S.; de Castro, A. M.; Ribeiro, B. D.; Coelho, M. A. Z. Supplementation of watermelon peels as an enhancer of lipase and esterase production by *Yarrowia lipolytica* in solid-state fermentation and their potential use as biocatalysts in poly (ethylene terephthalate)(PET) depolymerization reactions. *Biocatal. Biotransformation.* **2020**, 1-12.

197. Sameshima-Yamashita, Y.; Hirokazu, U.; Koitabashi, M.; Kitamoto, H. Pretreatment with an esterase from the yeast *Pseudozyma antarctica* accelerates biodegradation of plastic mulch film in soil under laboratory conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. xx, n. xx, p. 6–11, 2018.
198. França, E. da S.; Marinho, J. dos S.; Cândido, T. R. da S.; Lins, U. M. de B.L.; Andrade, R. F. da S.; de Campos- Takaki, G.M.; da Silva, C. A. A.; Okada, K. Detecção de esterase e lipase produzidas por fungos filamentosos isolados de solos da caatinga / detection of esterase and lipase produced by filamentous fungi isolated of caatinga soil. *Braz. J. of Develop.* **2020**, 6, 91693-9170.
199. Gudiukaite, R.; Sadauskas, M.; Gegeckas, A.; Malunavicius, V.; Citavicius, D. Construction of a novel lipolytic fusion biocatalyst GDEst-lip for industrial application. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, 799–815.
200. Boelter, G.; Cazarolli, J. C.; Beker, S. A.; de Quadros, P. D.; Correa, C.; Ferrão, M. F.; Galeazzi, C. F.; Tânia Mara Pizzolato, T. M.; Bento, F. M. *Pseudallescheria boydii* and *Meyerozyma guilliermondii*: behavior of deteriorogenic fungi during simulated storage of diesel, biodiesel, and B10 blend in Brazil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**. doi:10.1007/s11356-018-3015-x
201. Silva, T. L.; Cazarolli, J. C.; Pizzolato, T. M.; Frazzon, A. P. G.; Mann, M. B.; Frazzon, J.; John, D. K.; Ferrão, M. F.; Rampelotto, P. H.; D'Alessandro, E. B.; Filho, N. R. A.; Bento, F. B. Microbial sludge formation in Brazilian marine diesel oil (B0) and soybean methylic biodiesel blends (B10 and B20) during simulated storage. *Fuel.* **2022**, 308, 121905.
202. Fariq A.; Yasmin, A. Production, characterization and bioactivities of biosurfactants from newly isolated strictly halophilic bacteria *Process Biochem.* **2020**, 98, 1–10.
203. Adekunle, A. T.; Ester, B. B.; Peter, A. O.; Bankole, O. S.; Joshua, I. U. J.; Alfa, S. Characterization of new glycosophorolipid-surfactant produced by *Aspergillus Niger* and *Aspergillus flavus*. *European J. Biotechnol. Biosci.* **2015**, 3, 34-39.
204. Leung, D.Y.C.; Koo, B.C.P.; Guo, Y. Degradation of biodiesel under different storage conditions. *Bioresour. Technol.* **2006**, 97,250–6.
205. Srivastava, A.; Prasad, R. Triglycerides-based diesel fuels. *Renew.Sustain. Energy Rev.* **2000**, 4,111–33

206. Gudiña, E. J., Rangarajan, V., Sen, R. and Rodrigues, L. R., Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, 34, 667-675.
207. Barbosa, C. S.; Bücker, F.; Santestevan, N.; Moreira M.; Bento, F. M. Produção de enzimas lipase e esterase e biossurfactantes por bactérias e leveduras isoladas de borra oleosa. Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2010, Porto Alegre. Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada, 2010, Porto Alegre.
208. Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Gaylarde, C.C. Biossurfactantes. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna. In: Melo, I.S., Ghini, R., Silva, C.M.M.S., Vieira, R.F., Fay, E.F., Abakerli, R.B. (Eds.) *Microbiologia Ambiental*, second ed., 2008, vol. 1, pp. 151-184.
209. Sanches, M. A.; Luzeiro, I. G.; Cortez A. C. A.; de Souza, E. S.; Albuquerque, P. M.; Chopra, H. K.; de Souza J. V. B. Production of Biosurfactants by Ascomycetes. *Int J Microbiol.* **2021**; 2021, 6669263.
210. Ron, E. Z.; Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants, minireview. *Environ. Microbiol.* **2001**, 3, 229–236. doi: 10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x.
211. Bhardwaj, G. Biosurfactants from fungi: a review. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* **2013**, 4. doi: 10.4172/2157-7463.1000160
212. Reis, C. B. L. d.; Morandini, L. M. B.; Bevilacqua, C. B.; Bublitz, F.; Ugalde, G.; Mazutti, M. A.; Jacques, R. J. S. First report of the production of a potent biosurfactant with  $\alpha$ ,  $\beta$ -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. *Braz. J. Microbiol.* **2018**, 49, 185–192. doi: 10.1016/j.bjm.2018.04.004.
213. Castiglioni, G. L.; Bertolin, T. E.; Costa, J. A. V. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. *Quim. Nova.* **2009**, 32, 292-295.
214. Hussain, E., Baig, M. A. and Butt, G. Y., Evaluation of Different Carbon Sources in Production of Biosurfactant by Mycoflora of Southern Punjab Pakistan. *European Academic Research.* **2014**, 2, 2086- 2092.1.
215. Sperb, J. G. C.; Costa, T. M.; Bertoli, S. L.; Tavares, L.B.B. Simultaneous production of biosurfactants and lipases from *Aspergillus niger* and optimization by response surface methodology and desirability functions. *Braz. J. Chem.* **2017**, 35, 857-868.



216. Cruz, J. M., Montagnolli, R. N., & Bidoia, E. D. Biodegradation of Soybean Biodiesel Generates Toxic Metabolites in Soil. *Water Air Soil Pollut.* **2020**, 231. doi:10.1007/s11270-020-04801-w
217. Wu, S.; Yassine, M. H.; Suidan, T. M.; Venosa, A. D. Anaerobic biodegradation of soybean biodiesel and diesel blends under sulfate-reducing conditions. *Chemosphere.* **2016**, 161, 382–389. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.078
218. Thomas, A. O.; Leahy, M. C.; Smith, J. W. N.; Spence, M. J. Natural attenuation of fatty acid methyl esters (FAME) in soil and groundwater. *Q. J. Eng. Geol. Hydrogeol.* **2016**, 50, 12–15. doi:10.1144/qjegh2016-130
219. Giovanella, P.; Bento, F.; Cabral, L.; Gianello, C.; Camargo, F. A. O. Isolamento e seleção de micro-organismos resistentes e capazes de volatilizar mercúrio. *Quim. Nova.* **2011**, 34, 232–236.
220. Heidrich, D.; Koehler, A.; Ramírez-Castrillón, M.; Pagani, D. M.; Ferrão, M. F.; Scroferneker, M. L.; Corbellini, V. A. Rapid classification of chromoblastomycosis agents genera by infrared spectroscopy and chemometrics supervised by sequencing of rDNA regions. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, 254, 119647.
221. Naumann D. Infrared Spectroscopy in Microbiology. In: Meyers RA, editor. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2000. pp. 102–131. 16.
222. Nie M, Luo J, Xiao M, Chen J, Bao K, Zhang W, *et al.* Structural differences between Fusarium strains investigated by FT-IR spectroscopy. *Biochemistry (Moscow).* **2007**, 72, 61–67. doi.org/10.1134/ s0006297907010075 PMID: 17309438
223. Boswell, G. P.; Jacobs, H.; Davidson, F. A.; Gadd, G. M.; Ritz, K. Growth and Function of Fungal Mycelia in Heterogeneous Environments. *Bull Math Biol.* **2003**, 65, 3, 447-477.
224. Klis, F. M.; Boorsma, A.; De Groot, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, Chichester. 2006, 23, 3, 185–202.
225. Klis, F. M.; Ram, A. F. J.; De Groot, P. W. J. A Molecular and Genomic View of the Fungal Cell Wall. *Biology of the Fungal Cell.* 2007, 97–120. doi:10.1007/978-3-540-70618-2\_4

226. Adams, D. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. **2004**, 150, 7, 2029-2035.
227. Balan, V.; Mihai, C-T.; Cojocaru, F-D.; Uritu, C-M.; Dodi, G.; Botezat, D.; Gardikiotis, I. Vibrational spectroscopy fingerprinting in medicine: from molecular to clinical practice. *Materials*. **2019**, 12, 2884. doi: 10.3390/ma12182884.
228. Costa, J. M., Corbellini, V. A., Scroferneker, M. L. Study of different nitrogen sources on glucose uptake and production of melanin precursors and fungal mass of *Fonsecaea pedrosoi* cultured in tricyclazole. *Process Biochem*. **2004**, 39,633–636. doi:10.1016/s0032-9592(03)00191-2
229. Shapaval, V.; Schmitt, J.; Møretrø, T.; Suso, H.P.; Skaar, I.; Åsli, A.W.; Lillehaug, D.; Kohler, A. Characterization of food spoilage fungi by FTIR spectroscopy. *J Appl Microbiol*. **2013**, 114, 788–796.
230. Shapaval, V.; Walczak, B.; Gognies, S.; Møretrø, T.; Suso, H.P.; Skaar, I.; Åsli, A.W.; Belarbi, A.; Kohler, A. FTIR spectroscopic characterization of differently cultivated food related yeasts. *Analyst*. **2013**, 138, 4129–4138.
231. Awasthi, S.; Srivastava, N.; Singh, T.; Tiwary, D.; Mishra, P. K. Biodegradation of thermally treated low density polyethylene by fungus *Rhizopus oryzae* NS 5. *3 Biotech*. **2017**, 7, 73. doi:10.1007/s13205-017-0699-4
232. Bhat, M. M.; Kumar, D.; Narain, K.; Shukla, R.N.; Yunus, M. Mycoremediation of Hydrocarbon Contaminated Soil-Ftir Based Analysis. *World Appl Sci J*. **2011**, 15, 1547-1552.
233. de Souza, M. P.; Hoeltz, M.; Muller, M. V. G.; Gressler, P. D.; Bjerck, T. R.; Schneider, R. de C. de S; Corbellini, V. A. Screening of fungal strains with potentiality to hydrolyze microalgal biomass by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). *Acta Scientiarum. Technology*. **2019**, 41, e39693.
234. Shapaval, V.; Afseth, N.; Vogt, G.; Kohler, A. Fourier transform infrared spectroscopy for the prediction of fatty acid profiles in *Mucor* fungi grown in media with different carbon sources. *Microb. Cell Factories*. **2014**, 13, 86. doi:10.1186/1475-2859-13-86
235. Koehler, A.; Corbellini, V.A.; Heidrich, D.; Scroferneker, M.L. Prediction of itraconazole minimum inhibitory concentration for *Fonsecaea pedrosoi* using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and chemometrics. *Plos One*, **2020**, 15, e0243231. doi.org/10.1371/ journal.pone.0243231

236. Bücken, F.; Barbosa, C. S.; Quadros, P. D.; Bueno, M. K.; Fiori, P.; Huang, C. te, Frazzon , A. P. G.; Ferrao, M. F.; Camargo, F. A. de O.; Bento, F. M. Fuel biodegradation and molecular characterization of microbial biofilms in stored diesel/biodiesel blend B10 and the effect of biocide. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. **2014**, 95, 346–355. doi:10.1016/j.ibiod.2014.05.030.
237. Zimmer, A.; Cazarolli, J.; Teixeira, R. M.; Viscardi, S. L. C.; Cavalcanti, E. S. H.; Gerbase, A. E.; Ferrão, M.F.; Piatnicki, C.M.S.; Bento, F. M. Monitoring of efficacy of antimicrobial products during 60days storage simulation of diesel (B0), biodiesel (B100) and blends (B7 and B10). *Fuel*. **2013**, 112, 153–162. doi:10.1016/j.fuel.2013.04.062

## 7. Anexos

### Anexo A

#### Protocolo Ensaio miniaturizado pelo método de Lowry modificado.

Reagente A: 21,2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2% w/v)

4g NaOH (1N)

Água q.s.p. 1L

Reagente B: 0,5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,5% solução final)

1g tartarato de sódio e potássio (1% solução final)

Reagente C: Diluir o Folin fenol 2N em igual quantidade de água

Reagente D: Misture um volume do reagente B em 50 volumes do reagente A

Os reagentes devem ser preparados imediatamente antes do uso.

#### Procedimento:

1. Adicionar 40  $\mu\text{L}$  de amostra e/ou padrão nos poços de uma placa apropriada;
2. Utilizando um pipetador multicanal, adicionar 200  $\mu\text{L}$  do reagente D, e agitar a placa por 30s;
3. Deixar a placa incubar a temperatura ambiente por exatos 10 min;
4. Utilizando o pipetador multicanal, adicionar rapidamente 20  $\mu\text{L}$  do reagente C e agitar por 30s;
5. Cobrir a placa e deixar incubar por 30 min a temperatura ambiente;
6. Agitar a placa novamente e determinar a absorbância para cada poço em leitor de microplaca a 750 nm.
7. Traçar uma curva padrão representando graficamente os valores médios para cada padrão versus sua concentração de proteínas em microgramas por mililitro.
8. Determinar a concentração de proteína total de cada amostra pela interpolação na curva padrão.