



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



ESTUDO DA VIABILIDADE TÉCNICA DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DO ÓLEO DE CERA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Raquel Silveira Porto Oliveira
Engenheira de Alimentos

Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em
Tecnologia de Alimentos

Campinas – SP – Brasil

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP**

OL4e Oliveira, Raquel Silveira Porto
Estudo da viabilidade técnica da produção de biodiesel a partir do
óleo de cerca de cana-de-açúcar / Raquel Silveira Porto Oliveira. --
Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Daniel Barrera-Arellano
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Óleo. 2. Cera de cana-de-açúcar. 3. Biodiesel. 4. Catálise
ácida. 5. Esterificação. I. Barrera-Arellano, Daniel. II.
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Study on the technical feasibility of biodiesel production from cane wax oil

Palavras-chave em inglês (Keywords): Oil, Sugar cane wax, Biodiesel, Acid catalysis,
Esterification

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Daniel Barrera-Arellano

Ana Paula Badan Ribeiro

Rosana Maria Alberici Oliveira

Data da defesa: 25/02/2011

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação ou tese defendida em 25/02/2011 por Raquel Silveira Porto Oliveira aprovado pela comissão julgadora em 25/02/2011.

Prof. Dr. Daniel Barrera-Arellano (Orientador)
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

Dra. Ana Paula Badan Ribeiro (Membro)
Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP

Dra. Rosana Maria Alberici Oliveira (Membro)
Instituto de Química - UNICAMP

Prof. Dr. Chiu Chih Ming (Suplente)
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

Dra. Ildenize Barbosa da Silva Cunha (Suplente)
Instituto de Química - UNICAMP



Dedico à anjinha, Ana Camila da Rocha (Camilinha), que me ensinou como a vida é preciosa e mesmo nos momentos mais difíceis pode ser transformada em alegria com apenas um sorriso.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Alfredo e Luiza, pela dedicação de anos para comigo e meus irmãos. Tudo que somos hoje devemos a vocês.

Ao meu querido esposo Cassiano, que sempre me deu apoio e esteve ao meu lado me ouvindo e me aconselhando nas horas mais difíceis. “Te amo, meu Lindo!”

Aos meus sogros Cassiano e Vilani, que sempre me deram carinho e amor como se eu fosse uma filha.

Aos meus irmãos Débora e Samuel, que me apoiaram em todas as grandes decisões de minha vida.

Às minhas cunhadas Maria Teresa e Márcia, a amizade, conselhos e apoio.

Aos meus sobrinhos, Lucas e Ana Lis, por me mostrar que temos um coração de criança adormecido em cada um de nós.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano, pela oportunidade e confiança.

Aos professores membros da banca examinadora, Dra. Ana Paula Badan Ribeiro, Dra. Rosana Maria Alberici Oliveira, Dr. Chiu Chih Ming e Dra. Ildenize Barbosa da Silva Cunha pelas valiosas sugestões e correções apresentadas.

À Rosana Nogueira e Alaíde pela amizade e disposição de ajudar.

Ao Rodrigo Basso e à Katrina, pela ajuda, disponibilidade e acima de tudo pela amizade!

Aos amigos Kelly Gandra, Rita Garcia, Julice Dutra, Júlio Cesar, Leilane Conto, Gabriel Dechamps, Georgia Senh, Oscar pela presença e companheirismo nos momentos bons e ruins desta caminhada.

Aos técnicos, estagiárias e funcionárias do Laboratório de Óleos e Gorduras, Renato, Marcella, Ingrid, Priscila e Tatiane pela disponibilidade em ajudar.

A equipe do Laboratório Thomson e Instituto de Quimica pela ajuda e disposição nas análises.

Aos Professores da FEA, pelos ensinamentos fornecidos.

A Coordenação de Pós-Graduação, Cosme e Marcos, sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos e conterrâneos Aliciane Fontenele e Ruan, pelo apoio e amizade.

Aos queridos colegas e amigos que conheci aqui Simone Silva, Silvana Belém, Patrícia Castro, Noelia, André, Valter, Glazi e Dani.

Aos meus amigos de Fortaleza, turma do Albergue, Tici, Raquelzinha, Lia e Ludmila que, apesar da distância, sempre me mandam palavras de carinho e alegria.

Ao meu orientador de IC, professor e amigo, Prof. Zapata que mesmo longe nunca deixou de me orientar, não só nos estudos como na vida.

Aos amigos, funcionários e professores da Engenharia de Alimentos da UFC pelo apoio e incentivo aos estudos.

Aos meus familiares que mesmo longe sempre mandaram palavras de carinho e apoio.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram e incentivaram para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

ESTUDO DA VIABILIDADE TÉCNICA DA PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DO ÓLEO DE CERA DE CANA-DE-AÇÚCAR

O óleo de cera de cana-de-açúcar constitui 25% da cera bruta. O aproveitamento da fração óleo representa uma necessidade urgente que garanta o destino deste material e sua valorização, pois se trata da fração menos nobre e de menor valor agregado em relação às frações contidas na cera. O programa de biocombustíveis brasileiro requer grandes quantidades de óleos para a produção de biodiesel. A proposta deste trabalho foi estudar a viabilidade em transformar o óleo de cera de cana-de-açúcar em ésteres etílicos (Biodiesel) através de uma catálise ácida. Este estudo envolveu as etapas de caracterização do óleo de cera de cana-de-açúcar, reação de esterificação, otimização da reação de esterificação pelo monitoramento da redução da acidez, tentativa de determinação dos ésteres etílicos e a investigação de outros componentes lipídicos presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar que poderiam ter efeito na eficiência da reação de esterificação. O óleo apresentou como principais ácidos graxos, os ácidos palmítico (31,8%), linolênico (28,7%), linoléico e oléico (21,2%) e triacontanóico (7,8%). Os monoacilgliceróis e os ácidos graxos livres são predominantes neste material, representando juntos 66,6% das classes lipídicas. Após a reação de esterificação, utilizaram-se as técnicas de RMN-¹H, ésteres etílicos totais e famílias de lipídios por CG além de espectroscopia por infravermelho para determinação dos ésteres etílicos totais, porém sem resultados positivos. A técnica de espectrometria de massa (ESI-MS e ESI-FT-MS) revelou a existência de componentes lipídicos oxidados, além de outros não identificados no óleo de cera de cana-de-açúcar. Os resultados indicam que o óleo de cera de cana-de-açúcar é uma amostra complexa, altamente hidrolisada, de insaturação média, mas com baixa estabilidade oxidativa, indicativo, portanto, de uma matéria-prima inadequada para a produção de biodiesel. A determinação de ésteres etílicos totais em óleo de cera de cana-de-açúcar após esterificação pelas três metodologias testadas mostrou-se ineficiente, sendo necessária a revisão das técnicas para contar com um método confiável para esta determinação neste tipo de amostra.

Palavras-chave: Óleo de cera de cana-de-açúcar, biodiesel, catálise ácida, esterificação.

ABSTRACT

STUDY ON THE TECHNICAL FEASIBILITY OF BIODIESEL PRODUCTION FROM SUGAR CANE WAX OIL

Sugar cane wax oil makes up 25% of crude wax. The exploitation of the oil fraction represents an urgent need to ensure a destination for this material and its valorization, for it is the less noble and less valuable fraction contained in the wax. The Brazilian biofuels program requires large amounts of oils for biodiesel production. The purpose of this study was to investigate viability of the transformation of sugar cane wax oil into ethyl esters (Biodiesel) through acid catalysis. This study comprised the stages of characterization of sugar cane wax oil, esterification reaction, esterification reaction optimization by means of reducing the acidity, attempt at ethyl esters characterization and investigation of other lipidic components present in the sugar cane wax oil that could possibly have an effect on the efficiency of the esterification reaction. The oil presented its major fatty acids as palmitic (31.8%), linolenic (28.7%), oleic and linoleic (21.2%) and triacontanoic (7.8%). The monoglycerides and free fatty acids are predominant in this fraction, together representing 66.6% of lipid classes. After the esterification reaction, the following techniques were used: $^1\text{H-NMR}$; ethyl esters and total lipids by GC families; infrared spectroscopy for determination of total ethyl esters in oil after esterification. However, none yielded positive results. Mass spectrometry (ESI-MS and ESI-FT-MS) revealed the existence of presence of oxidated lipid components as well as unknown lipid components. The results indicated that sugar cane wax oil is a complex sample, highly hydrolyzed, of medium unsaturatation and with low oxidative stability, indicating not to be a suitable source material for biodiesel production. The determination of total ethyl esters in sugar cane wax oil after esterification by three tested methods proved itself inefficient, requiring a review of the techniques in order to achieve a reliable method for such determination in this type of sample.

Keywords: sugar cane wax oil, biodiesel, acid catalysis, esterification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Áreas de plantação de cana-de-açúcar e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade no Brasil (UNICA, 2010).....	7
Figura 2 Método de purificação (GANDRA, 2006).....	12
Figura 3 Reações de transesterificação de triacilgliceróis e esterificação direta de ácidos graxos com álcool (MARCHETTI & ERRAZU, 2008).....	22
Figura 4 Cromatograma dos ácidos graxos presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar.....	48
Figura 5 Composição das famílias dos componentes lipídicos presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar por Cromatografia por Exclusão de Tamanho (HPSEC).....	49
Figura 6 Cromatograma de esteróis no óleo de cera de cana-de-açúcar.....	50
Figura 7 Curvas de fusão e cristalização do óleo de cera de cana-de-açúcar....	52
Figura 8a Cinética de redução dos ácidos graxos livres em diferentes tempos nos ensaios (1 a 6) do óleo de cera de cana-de-açúcar durante a reação de esterificação.....	54
Figura 8b Cinética de redução dos ácidos graxos livres em diferentes tempos nos ensaios (7 a 12) do óleo de cera de cana-de-açúcar durante a reação de esterificação.....	55
Figura 9 Valores observados versus previstos para redução dos ácidos graxos na esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	58
Figura 10 Desvio Relativo (%) entre os valores observados e previstos pelo modelo para redução dos ácidos graxos na esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	59

Figura 11 Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a redução dos ácidos graxos na esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	60
Figura 12 Espectro de RMN- ¹ H do óleo de cera de cana-de-açúcar após reação de esterificação.....	61
Figura 13 Cromatograma de esteres etílicos e ácidos graxos no óleo de cera de cana-de-açúcar após reação de esterificação comparado com o óleo original....	62
Figura 14 Cromatograma do óleo de cera de cana-de-açúcar após esterificação comparado com o óleo original pelo método EN 14105.....	63
Figura 15 Espectro de infravermelho do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	64
Figura 16 Espectro de infravermelho do óleo de cera de cana-de-açúcar após reação de esterificação.....	65
Figura 17 Espectro de massas ESI MS (TOF) no modo negativo de óleo de cera de cana-de-açúcar com os principais ácidos graxos identificados pelas massas moleculares.....	67
Figura 18 Espectro de massas obtidos por ESI MS (TOF) no modo positivo de óleo de cera de cana-de-açúcar com a monoacilpalmitina identificada pelo peso molecular.....	69
Figura 19 Cromatograma dos compostos polares presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar por Cromatografia de Exclusão de Tamanho (HPSEC) da fração polar por SPE.....	71
Figura 20 Espectro obtido por ESI FT-ICR-MS em modo positivo para o óleo de cera de cana-de-açúcar.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Produção de cana-de-açúcar do Brasil da safra de 2008/2009 (UNICA, 2010).....	6
Tabela 2 Composição típica de torta de filtro de cana-de-açúcar (DELGADO & ARMAS CASA NOVA, 2001).....	9
Tabela 3 Rendimento das frações obtidas a partir de cera bruta de cana-de-açúcar purificada com etanol (GANDRA, 2006).....	13
Tabela 4 Características do óleo de cera de cana-de-açúcar (GANDRA, 2006).....	15
Tabela 5 Composição percentual de ácidos graxos dos óleos de cera de cana-de-acúcar (GANDRA, 2006).....	16
Tabela 6 Níveis e valores reais do planejamento fatorial.....	40
Tabela 7 Planejamento fatorial, valores codificados e reais de estudo (temperatura e óleo:etanol).....	41
Tabela 8 Características físico-químicas do óleo de cera de cana-de-açúcar	45
Tabela 9 Composição em ácidos graxos do óleo de cera de cana-de-açúcar	47
Tabela10 Perfil das famílias dos componentes lipídicos presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar.....	49
Tabela11 Composição de fitoesteróis totais em óleo de cera de cana-de-açúcar.....	51
Tabela 12. Parâmetros do comportamento térmico (DSC) de cristalização do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	53

Tabela 13. Parâmetros comportamento térmico (DSC) de fusão do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	53
Tabela 14 Valores reais e a resposta de redução de acidez no óleo de cera de cana-de-açúcar após reação de esterificação (5h).....	56
Tabela 15 Coeficientes de regressão para a redução de ácidos graxos livres na esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	57
Tabela 16 ANOVA para a resposta da redução de AGL em 5 horas de reação na esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	58
Tabela 17 Ácidos graxos principais presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar e suas respectivas massas molares.....	68
Tabela 18 Identificação de monoacilgliceróis presentes no óleo da cana-de-açúcar com suas respectivas massas molares, massa molar medida pelo ESI (+) FT-ICR-MS e o erro em ppm dado pelo equipamento.....	73
Tabela 19 Identificação de monoacilgliceróis com hidroperóxidos presentes no óleo da cana-de-açúcar com suas respectivas massas molares, massa molar medida pelo ESI (+) FT-ICR-MS e o erro em ppm dado pelo equipamento.....	73
Tabela 20 Identificação de diacilgliceróis presentes no óleo da cana-de-açúcar com suas respectivas massas molares, massa molar medida pelo ESI (+) FT-ICR-MS e o erro em ppm dado pelo equipamento.....	74
Tabela 21 Identificação de diacilgliceróis com hidroperóxidos presentes no óleo da cana-de-açúcar com suas respectivas massas molares, massa molar medida pelo ESI (+) FT-ICR-MS e o erro em ppm dado pelo equipamento.....	74

ABREVIACÕES E SIGLAS UTILIZADAS

AGL	Acidos Graxos Livres
B5	Mistura de 5% de biodiesel em diesel
B20	Mistura de 20% de biodiesel em diesel
CG	Cromatografia Gasosa
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DG	Diacilgliceróis
FT	Transformada de Fourier
HPSEC	Cromatografia Líquida por Exclusão de Tamanho
IA	ndice de Acidez
ICR	Ressonância Ciclotrônica de íons
II	ndice de Iodo
IP	ndice de Peróxido
IS	ndice de Saponificao
MI	Matéria Insaponificável
MS	Espectrometria de Massa
Q-TOF	Quadrupolo por tempo de vo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	Extrao em Fase Sólida
TG	Triacilgliceróis
TGox	Triacilgliceróis Oxidados
TLC	Cromatografia de Camada Delgada

SUMÁRIO

1 Introdução.....	1
1.1 Objetivos.....	3
2 Revisão Bibliográfica.....	5
2.1 Cana-de-açúcar.....	5
2.2 Cera de cana-de-açúcar.....	9
2.3 Extração da cera de cana-de-açúcar.....	10
2.4 Purificação da cera de cana-de-açúcar.....	10
2.5 Clarificação da cera de cana-de-açúcar.....	13
2.6 Óleo da cera de cana-de-açúcar.....	14
2.7 Oxidação lipídica.....	16
2.8 Espectrometria de massas para caracterização lipídica.....	18
2.9 Biodiesel.....	19
2.9.1 Produção de Biodiesel.....	21
2.9.2 Rota Etílica.....	23
3 Materiais e Métodos e Procedimento Experimental.....	25
3.1 Material.....	25

3.1.1 Matéria Prima.....	25
3.1.2 Reagentes, vidrarias e solventes.....	25
3.2 Métodos Analíticos.....	25
3.2.1 Ácidos Graxos Livres e Índice de Acidez.....	25
3.2.2 Índice de peróxido pelo método ácido acético – clorofórmio.....	26
3.2.3 Índice de saponificação.....	27
3.2.4 Índice de iodo pelo método de ácido acético ciclohexano.....	27
3.2.5 Teor de matéria insaponificável.....	28
3.2.6 Quantificação das famílias dos compostos por cromatografia líquida por exclusão de tamanho (HPSEC).....	29
3.2.7 Extração e identificação dos componentes polares.....	30
3.2.8 Composição em Ácidos Graxos.....	30
3.2.9 Determinação da composição e conteúdo de esteróis mediante cromatografia em fase gasosa com coluna capilar.....	31
3.2.10 Avaliação do comportamento térmico.....	32
3.2.11 Análise elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio.....	33
3.2.12 Espectrometria de massas utilizando ionização por ESI.....	34
3.2.13 Espectrometria de massas utilizando espectrômetro de massas de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier - ESI(+) FT-ICR-MS.....	34

3.2.14 Estabilidade Oxidativa a 110°C.....	35
3.2.15 Análise de espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-1H).....	36
3.2.16 Determinação da glicerina livre e ligada por cromatografia em fase gasosa	36
3.2.17 Determinação de ésteres etílicos totais por cromatografia em fase gasosa.....	37
3.2.18 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....	37
3.3. Procedimento Experimental.....	38
3.3.1 Preparação da amostra.....	38
3.3.2. Caracterização da matéria-prima (óleo da cera de cana-de-açúcar clarificado e evaporado).....	38
3.3.3 Reação de esterificação e transesterificação.....	39
3.3.4 Delineamento Composto Central Rotacional - DCCR (2 ²).....	39
3.3.5 Determinação do teor de ésteres etílicos.....	42
3.3.6 Investigação dos componentes lipídicos existente no óleo de cera de cana-de-açúcar.....	43
3.3.6.1 Qualidade oxidativa no óleo de cera de cana-de-açúcar.....	43
3.4 Análise Estatística.....	43
4 Resultados e Discussão.....	45

4.1 Caracterização da matéria-prima.....	45
4.1.1 Característica físico-química do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	45
4.1.2 Composição em ácidos graxos do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	46
4.1.3 Composição das famílias de compostos do óleo de cera de cana-de-açúcar (HPSEC).....	48
4.1.4 Composição dos fitoesteróis presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar.....	50
4.1.5 Estudo da curva de cristalização e de fusão do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	51
4.2 Cinética de redução dos ácidos graxos do planejamento fatorial do óleo de cana de açúcar após reação de esterificação.....	54
4.3 Matriz do delineamento e resposta de redução dos ácidos graxos livres obtida após 5 horas de reação de esterificação.....	55
4.3.1 Modelo matemático para a redução dos ácidos graxos livres na esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar	56
4.4 Determinação do teor de ésteres etílicos.....	60
4.4.1 Através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-1H) do óleo de cera de cana-de-açúcar após reação de esterificação...	60
4.4.2 Determinação dos ésteres etílicos totais óleo de cera de cana-de-açúcar após reação de esterificação comparado com o óleo original.....	62
4.4.3. Através do método EN 14105 das famílias dos compostos lipídicos do óleo de cera de cana-de-açúcar após a reação de esterificação comparado com o óleo original.....	63

4.4.4. Espectroscopia na região do infravermelho do óleo de cera de cana-de-açúcar original e após reação de esterificação.....	64
4.5 Investigação sobre os componentes lipídicos existentes no óleo de cera de cana-de-açúcar.....	66
4.5.1 Espectrometria de massa do óleo de cera de cana-de-açúcar utilizando ESI-MS (Q-TOF) no modo negativo e positivo.....	66
4.5.2 Análise elementar de Carbono, Nitrogênio e Hidrogênio do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	69
4.5.3 Qualidade oxidativa no óleo de cera de cana-de-açúcar.....	70
4.5.3.1 Índice de peróxido do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	70
4.5.3.2 Estabilidade oxidativa do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	70
4.5.3.3 Extração e identificação dos componentes polares do óleo de cera de cana-de-açúcar.....	70
4.5.3.4 Identificação das espécies de oxidação do óleo de cera de cana-de-açúcar por espectrometria de massas ESI (+) FT-ICR-MS.....	72
5 Conclusões.....	77
7 Referências Bibliográfica.....	79

1 Introdução

O Brasil é um grande produtor de cana-de-açúcar e um potencial fornecedor de ceras obtidas com o subproduto bagacilho da indústria sucroalcooleira. A utilização dos produtos e subprodutos da cana permite um desenvolvimento industrial dentro de um ciclo fechado de aproveitamento integral, que abrange até os resíduos, utilizando-os estes de forma tal que não prejudiquem o meio ambiente e ao mesmo tempo tenham importância econômica para o país.

A cera de cana-de-açúcar, assim como outras ceras vegetais, consiste em uma mistura de ésteres de cera, ácidos graxos livres, álcoois graxos livres e triacilgliceróis (PATURAU, 1989; NUISSIER et al., 2002). A presença destes componentes varia quantitativamente e qualitativamente dependendo de um grande número de fatores como a variedade da cana, tipo de solo, processo de extração, processo de purificação e operação de tratamento final para aplicação industrial.

A cera bruta extraída por solventes orgânicos contém uma grande quantidade de materiais graxos. São estes compostos lipídicos que conferem à cera bruta propriedades indesejáveis, tais como, caráter viscoso, consistência pegajosa e baixo ponto de fusão. Esta cera apresenta cor escura e geralmente odor desagradável (FRUTUOSO, 1989; ICIDCA, 1999). Devido à presença de grandes quantidades de matérias graxas, resinas e algumas impurezas, a cera bruta deve passar por um processo de refino para se obter um produto que possa ter aplicações industriais (FRUTUOSO, 1989; PHUKAN & BORUAH, 1999).

No processo de purificação desenvolvido no Laboratório de Óleos e Gorduras da UNICAMP por Gandra (2006) utilizando etanol se obtém três frações denominadas de “cera purificada”, “cera dura” e “óleo”. O óleo apresentou uma coloração verde escura, sendo os rendimentos do processo de purificação para a cana orgânica (sem queimada antes do corte) e mista (mistura de 30% de cana queimada e 70% de cana não

queimada antes do corte) foram de 57,8 e 63,8 % em cera purificada, 10,4 e 15,8% em cera dura e 25,2 e 25,4% em óleo.

Atualmente, o Brasil consome cerca de 34 milhões de m³/ano de óleo diesel, dos quais quase 30 milhões são destinados ao setor de transporte. Para adicionar 5% de biodiesel a esse combustível (mistura de 5% de biodiesel com 95% de diesel – B5) é necessário produzir em torno de 1,5 milhões de m³/ano de biodiesel. A substituição irá gerar uma economia de divisas bastante razoável para os cofres nacionais. Importa-se cerca de 6 milhões de m³/ano de diesel, a um custo próximo dos US\$ 1,22 bilhões. Em janeiro de 2010 foi adotado esse percentual de 5% (B5) o qual reduziu as necessidades de importação em 25%. Com a previsão de 20% de substituição (mistura de 20% de biodiesel com 80% de diesel – B20), as importações seriam desnecessárias (PACHIONE, 2009; BIODIESELBR, 2010).

Em termos ambientais, a adoção do biodiesel, mesmo que de forma progressiva, resultará em uma redução significativa no padrão de emissões de óxidos de enxofre e gases que contribuem para o efeito estufa. Comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, o biodiesel (100% de biodiesel - B100) pode reduzir em 78% as emissões de gás carbônico, considerando-se a reabsorção pelas plantas. Além disso, o biodiesel reduz em 90% as emissões de fumaça e praticamente elimina as emissões de óxido de enxofre. É importante frisar que o biodiesel pode ser usado em qualquer motor de ciclo diesel, com pouca ou nenhuma necessidade de adaptação (LIMA, 2004).

1.1 Objetivos

1.1.2. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi investigar o potencial do óleo de cera de cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de biodiesel.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Caracterização tecnológica do óleo de cera de cana-de-açúcar;
- Otimização da reação de esterificação do óleo da cera de cana-de-açúcar utilizando catálise ácida.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) pertence à família Gramineae (*Poaceae*), e é considerada originária do sudeste Asiático na grande região central da Nova Guiné e Indonésia (DANIELS & ROACH, 1987). Inicialmente cultivava-se principalmente a espécie *Saccharum officinarum* (L.), entretanto, os cultivares desta espécie passaram a sofrer dificuldades de adaptação ecológica e severos danos provocados por doenças. Híbridos interespecíficos, oriundos dos programas de melhoramento genético, resistentes e melhor adaptados para diversas condições ambientais, permitiram a expansão da cultura pelo mundo (FIGUEIREDO et al., 1995; MATSUOKA et al., 1999).

Inicialmente utilizada quase exclusivamente para a produção de açúcar, nas últimas três décadas a cana se tornou um novo paradigma de energia limpa e renovável. Ela contribui decisivamente para a sustentabilidade do planeta e para a luta contra o aquecimento global, já que hoje é a matéria-prima mais eficiente para a produção de etanol, obtido do caldo da cana, e bioeletricidade, obtida da biomassa formada pelo bagaço (resíduo fibroso gerado após a extração do caldo) e a palha (pontas e folhas) da cana. A produção mundial de cana-de-açúcar totaliza quase 1,5 bilhão de toneladas e está localizada predominantemente na faixa tropical do planeta, nos países em desenvolvimento da América Latina, África e do Sudeste Asiático (UNICA, 2010).

Desde os tempos do Brasil colônia até os dias de hoje, a cultura da cana-de-açúcar tem sido uma fonte de riquezas para a economia brasileira. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e um dos principais exportadores de açúcar, junto com a Austrália, Cuba e Tailândia (FNP CONSULTORIA & AGRO-INFORMATIVO, 2003). Em 2009/2010 a produção de cana-de-açúcar atingiu 686 milhões de toneladas e espera-se uma safra de 700 milhões de toneladas para 2010/2011 (IBGE, 2010)

O Brasil processou aproximadamente 569 milhões de toneladas na safra 2008/2009, cerca de 90% do total na principal região produtora do País, a Centro-Sul, e 10% no Nordeste (Tabela 1).

Tabela 1 Produção de cana-de-açúcar no Brasil da safra de 2008/2009.

Estados/Safra	Toneladas
Acre	-
Rondonia	106.292
Amazonas	303.350
Pará	626.865
Tocantins	55.456
Maranhão	2.280.160
Piauí	900.181
Ceará	122.355
R. G. Norte	3.186.768
Paraíba	5.885.978
Pernambuco	18.949.518
Alagoas	27.309.285
Sergipe	1.831.714
Bahia	2.541.816
Minas Gerais	42.480.968
Espirito Santo	4.373.248
Rio De Janeiro	4.018.840
São Paulo	346.292.969
Paraná	44.829.652
Santa Catarina	0
R. G. Sul	107.184
Mato Grosso	15.283.134
Mato Grosso Do Sul	18.090.388
Goiás	29.486.508
Região Centro-Sul	504.962.891
Região Norte-Nordeste	64.099.738
Brasil	569.062.629

Fonte:UNICA, 2010

A ampliação da produção, do consumo e principalmente do comércio mundial de etanol, especialmente o produzido a partir da cana-de-açúcar, deve gerar renda e beneficiar os produtores rurais dos países mais pobres. O faturamento anual bruto do

setor sucroenergético brasileiro é de cerca de US\$ 23 bilhões, sendo que do total de açúcar produzido, 67% foi exportado, situação inversa à do etanol, que teve apenas 17% do total produzido voltado para a exportação (UNICA, 2010).

A produção de cana-de-açúcar se concentra nas regiões Centro-Sul e Nordeste do Brasil. A Figura 1 representa o mapa da produção sucroenergética onde as áreas em vermelho concentram as plantações e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade, segundo dados oficiais do IBGE, UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas – SP) e do CTC (Centro de Tecnologia Canaveira) (UNICA, 2010).

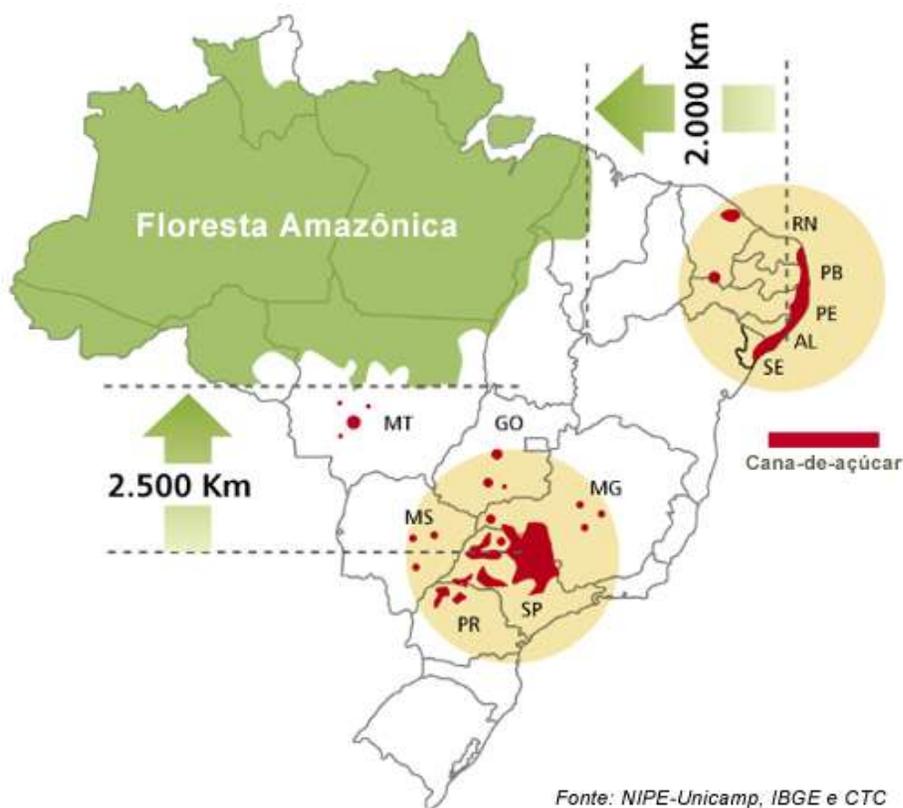


Figura 1 Grandes áreas de plantação de cana-de-açúcar e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade no Brasil (UNICA, 2010)

A cana-de-açúcar é uma matéria-prima de grande flexibilidade. Além da importância nas indústrias de açúcar e álcool, esta gramínea constitui base de produção de matérias-primas como bagaço, torta, melaço e resíduos da colheita (LUTZ

et al., 1998). A utilização dos produtos e subprodutos da cana permite um desenvolvimento industrial dentro de um ciclo fechado de aproveitamento integral, que abrange até os resíduos, utilizando-os de forma tal que não prejudiquem o meio ambiente e ao mesmo tempo tenham importância econômica (GARCIA et al., 2003).

O processamento da cana-de-açúcar para a produção de açúcar e álcool compreende as etapas iniciais de extração e purificação do caldo. Atualmente, os processos básicos de purificação estão baseados no peneiramento do caldo e numa clarificação posterior utilizando-se reagentes químicos e o efeito da alta temperatura. A clarificação tem por objetivo a remoção de impurezas solúveis. Estas permanecem no caldo após as etapas de peneiramento realizadas para a remoção de impurezas grosseiras em suspensão como areia, argila, bagaço, etc. (PULZATTO, 1995). Do processo de clarificação são obtidos caldos claros e límpidos mediante coagulação, floculação e precipitação máxima dos colóides formados, que são eliminados por sedimentação e filtração (COSTA, 2002). O lodo obtido na decantação é filtrado em filtros do tipo tambor rotativo a vácuo ou filtros-prensa. A torta resultante do filtro-prensa geralmente tem maior umidade (cerca de 80%) em comparação com a torta resultante de filtro rotativo (cerca de 65%) (LEME JR. & BORGES, 1965; PATURAU, 1989).

A quantidade e composição das tortas de filtro variam conforme o processo de moagem, métodos de clarificação e filtração empregados, variedade da cana e safra (PATURAU, 1989). A Tabela 2 apresenta os componentes normalmente presentes em tortas de filtro de cana-de-açúcar.

As indústrias açucareiras concordam que para manter a viabilidade do setor, o lucro adicional gerado para a empresa tem que advir da utilização adequada dos subprodutos da cana-de-açúcar (BEEHARRY, 1996). A torta de filtro é geralmente descartada, utilizada como fertilizante ou em ração animal (LEME JR. & BORGES, 1965; PATURAU, 1989; LUTZ et al., 1998; MENCHANG et al., 2004), pode ganhar um destino mais nobre e gerar lucros adicionais para o setor, se for utilizada para a produção de cera, pois estas apresentam propriedades físico-químicas próximas da cera de carnaúba (VIEIRA, 2003).

Tabela 2 Composição típica de torta de filtro de cana-de-açúcar.

Composição	Base seca (%)
Cera, óleo e resinas	10-14
Fibras	15-30
Açúcares	10-14
Proteína	12-16
Cinzas totais	8-12

Fonte: DELGADO & DE ARMAS CASA NOVA, 2001

2.2 Cera de cana-de-açúcar

O termo cera de cana (cera bruta) é normalmente usado como referência a uma mistura de diferentes classes de lipídios da cana-de-açúcar, incluindo ésteres de cera, esteróis e ésteres de esteróis, álcoois e ácidos graxos livres, cetonas, aldeídos, triacilgliceróis e componentes resinosos (; ALVAREZ et al., 1988 PATURAU, 1989). A cera bruta representa uma pequena proporção em peso na planta (cerca de 0,18%) e consiste de duas frações, a fração de cera dura escura e a fração de óleo (AZZAM, 1986; PATURAU, 1989;).

A fração de cera dura escura forma-se em depósitos, principalmente perto dos nós e das bainhas foliares, e tem a função de proteção contra a perda de água por evaporação (PATURAU, 1989; GARCÍA et al., 2003). A matéria graxa encontra-se em quantidades variáveis no interior do colmo e em outras partes da planta, sendo o constituinte essencial do protoplasma celular. Quando a cana é moída, uma parte do material lipídico permanece no bagaço. Porém, cerca de 40% é arrastado como impurezas e permanece em suspensão no caldo, concentrando-se na torta de filtro (ADAMENAS, 1982; PATURAU, 1989).

2.3 Extração de cera de cana-de-açúcar

A primeira tentativa de isolar a cera de cana-de-açúcar da torta de filtro foi reportada em 1841 por Avequin, em New Orleans. Em 1909, um método básico de recuperação de cera de torta de filtro com solvente foi patenteado. Somente em 1916, na África do Sul, a cera de cana-de-açúcar começou a ser produzida industrialmente. Em 1924, a exportação de cera da África do Sul para os Estados Unidos e Inglaterra atingiu cerca de 6.000 toneladas. No entanto, a produção foi encerrada alguns anos depois. Em 1958, três unidades de produção de cera de cana estavam em operação: duas em Cuba e uma na Austrália. A Austrália encerrou as atividades em 1960 devido aos altos custos de produção (ALVAREZ et al., 1988; PATURAU, 1989).

A cera bruta contida na torta de filtro pode ser recuperada através do processo de extração com solvente, que pode ser contínua (por percolação) ou intermitente. O rendimento depende dos procedimentos de extração utilizados (tipo de solvente, tempo e temperatura de extração, relação entre solvente e soluto) e das características da matriz que está sendo extraída (tamanho de partícula e umidade). A composição dos lipídios extraídos varia, de acordo com o tempo de extração. Vários solventes (n-hexano, ciclohexano, tolueno, naftaleno, isopropanol e etanol) foram utilizados para a extração de cera de torta de filtro de cana-de-açúcar (ABDAL-AKHER, 1977, citado por AZZAM, 1984; VIEIRA, 2003).

A extração industrial de cera de cana a partir de tortas de filtro pode ser realizada em unidades de extração de óleo adaptadas, em equipamentos para extração contínua como “Rotocell” (PATURAU, 1989; PHUKAN & BORUAH, 1999). Entretanto, a eficiência da extração de cera é baixa, cerca de 70% (PATURAU, 1989). Segundo Azzam (1984), o método de extração contínua de cera de cana-de-açúcar pode trazer dificuldades mecânicas relacionadas à transferência do material, devido ao alto ponto de fusão da cera.

2.4 Purificação de cera de cana-de-açúcar

A cera bruta extraída pelos solventes orgânicos apresenta grande quantidade de matérias graxas. São estes compostos lipídicos que conferem à cera bruta

propriedades indesejáveis, tais como, caráter viscoso, consistência pegajosa e baixo ponto de fusão. Esta cera apresenta cor escura e geralmente odor desagradável (FRUTUOSO, 1989; ICIDCA, 1999). Devido à presença de grandes quantidades de matérias graxas, resinas e algumas impurezas, a cera bruta deve passar por um processo de refino para se obter um produto adequada às aplicações industriais (ALVAREZ et al., 1988; FRUTUOSO, 1989; PHUKAN & BORUAH, 1999).

Os processos geralmente empregados para refinar a cera bruta consistem em dissolvê-la em um solvente orgânico no qual a fração graxa é solúvel, enquanto que a cera e matéria resinosa são precipitadas. A suspensão formada é filtrada e a parte sólida é misturada com mais solvente e aquecida, a resina é separada da cera em solução e eliminada pelo processo de decantação.

Vários pesquisadores vêm estudando e propondo diferentes solventes para a purificação da cera bruta, tais como, metil-etil-cetona, álcool etílico, metanol e benzeno. O uso de solvente de baixo ponto de ebulição, como metanol e acetona, requer aquecimento da mistura de cera e solvente sob pressão para manter a cera em fase líquida na etapa de separação de resina. Na Austrália estudou-se um processo de refino no qual foi empregada uma mistura de 80% de álcool etílico absoluto e 20% de heptano. A separação de resina foi realizada a pressão atmosférica. Outros processos de refino empregam a destilação a vácuo para eliminar os lipídios de menor massa molecular (ALVAREZ et al, 1988; FRUTUOSO, 1989).

O solvente mais utilizado para o fracionamento de lipídios é o hexano. Este solvente é utilizado na indústria de óleos e gorduras para a extração do óleo de grãos e, por esse motivo, é facilmente aceito pela indústria (THOMAS, 1985). Frações mais específicas podem ser obtidas com o uso de solventes seletivos, como a acetona ou o isopropanol. Após a cristalização, as frações são separadas por filtração e a recuperação do solvente realizada por destilação (DEFFENSE, 1985).

De acordo com Vieira & Barrera-Arellano (2002), a purificação da cera pode ser feita através do resfriamento controlado da temperatura, de 50°C a 0°C, de uma mistura de cera bruta com solvente orgânico, em conjunto com a separação da fração precipitada de cera por centrifugação ou filtração. A purificação ainda pode ser feita diretamente sobre a micela resultante da extração, de forma que diferentes frações de

cera precipitada podem ser obtidas através do controle da temperatura durante o resfriamento, e em seguida, a cera precipitada é lavada com solventes e separada por filtração e/ou centrifugação, obtendo-se a cera purificada.

Um processo de purificação aplicado à cera bruta de cana-de-açúcar extraída em escala piloto foi desenvolvido no Laboratório de Óleos e Gorduras UNICAMP (GANDRA, 2006) pelo método álcool a frio é apresentado na Figura 2.

Através do método de purificação com etanol são obtidas frações cujos rendimentos encontram-se na Tabela 3 (GANDRA, 2006).

A UNICAMP é co-proprietária, junto com as empresas, Usina São Francisco S.A. (Sertãozinho, SP) e MEGH – Ceras e Emulsões (São Paulo) de 4 patentes referentes à produção e purificação de cera de cana-de-açúcar (VIEIRA et al., 2002; ROZÁRIO et al., 2007a,b; BARRERA-ARELANO et al., 2007).

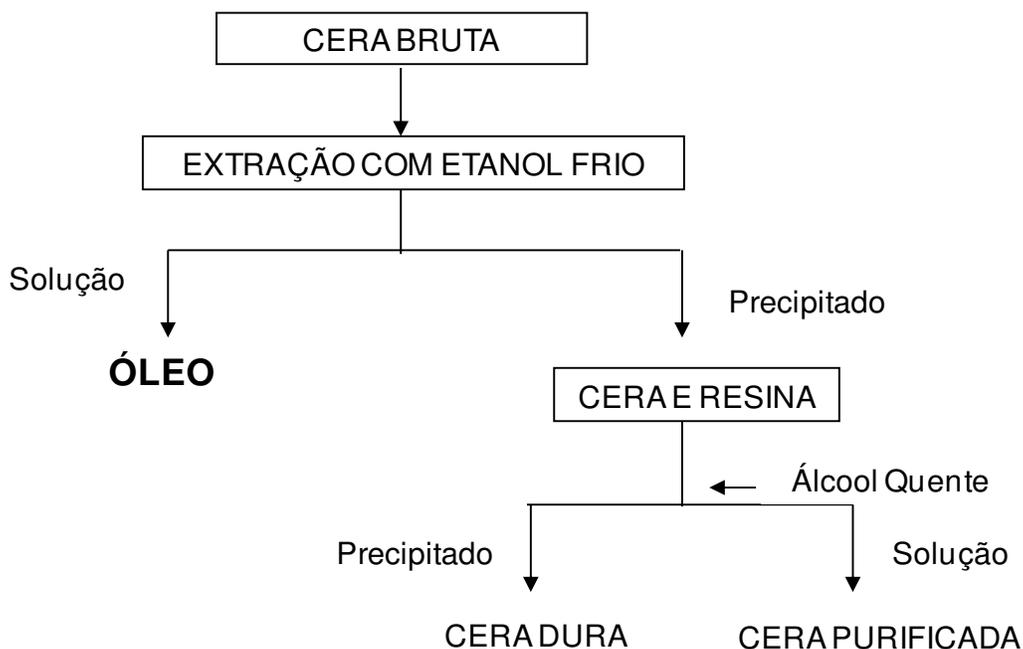


Figura 2 Método de purificação com etanol (GANDRA, 2006)

Tabela 3 Rendimento das frações obtidas a partir de cera bruta de cana-de-açúcar purificadas com etanol.

Frações	Orgânica	Mista
Cera Purificada	57,8% ($\pm 1,1$)	63,8% ($\pm 1,2$)
Cera Dura	15,8% ($\pm 0,6$)	10,4% ($\pm 0,5$)
Óleo	25,4% ($\pm 0,7$)	25,2% ($\pm 0,8$)

Cana Orgânica: sistema orgânico, não queimada antes do corte

Cana Mista: 30% de cana queimada antes do corte + 70% de cana orgânica

Fonte: GANDRA, 2006

2.5 Clarificação da cera de cana-de-açúcar

A cera de cana-de-açúcar possui como característica uma cor escura e um odor forte. Devido a estes fatores tornando-se uma matéria-prima de difícil aplicação em seu estado natural, sendo assim necessária uma etapa de clarificação. Tratamentos com adsorventes como terras e métodos químicos têm sido testados, porém, a clorofila, presente em grande quantidade na cera, não é facilmente separada (WARTH, 1947; PATURAU, 1989).

Atualmente, muitos processos comerciais utilizam métodos químicos ou filtros adsorventes especiais para a clarificação das ceras, como carvão ativo, terras Fuller's ou diatomáceas. Azzam (1986) fez um estudo com varios a agentes clarificantes e verificou que as ceras de cana podem, após um processo de clarificação, passar de uma coloração verde escura a uma coloração amarelo-pálida. O autor testou processos de clarificação de cera de cana-de-açúcar utilizando ácido crômico, ácido nítrico, cloreto de sódio, cloreto de potássio e obteve melhores resultado com o ácido crômico. Berthold (1993, apud KRELL, 1996), empregou ácido oxálico ou peróxido de hidrogênio dissolvidos em água para a clarificação da cera.

Barrera-Arellano e colaboradores (2007) fizeram um estudo de clarificação da cera de cana-de-açúcar utilizando peróxido de hidrogênio. As ceras clarificadas obtidas apresentaram redução, em relação à cera bruta, de 5 para 2 unidades de cor Gardner e de 70,23 (mg/kg) para zero, no teor de clorofila.

2.6 Óleo de cera de cana-de-açúcar

O óleo da cana de açúcar pode ser obtido pelo fracionamento da cera bruta com acetona (ou outro solvente apropriado). Consiste em uma mistura complexa de glicerídeos, esteróis e outros ésteres, ácidos e álcoois graxos livres, hidrocarbonetos e compostos de fósforo e nitrogênio (PATURAU, 1989).

O óleo de cana-de-açúcar representa uma fonte para obtenção de fitoesteróis, contendo cerca de 20% destes compostos (20% de estigmasterol e 80% de sitosterol) (PATURAU, 1989).

Os fitoesteróis são álcoois de origem vegetal que se encontram presentes no óleo da torta, livres ou esterificados. A mistura de fitoesteróis é composta por stigmasterol, β -sitosterol e campesterol (32, 42 e 45%, respectivamente). A concentração da mistura de fitoesteróis no óleo de torta varia entre 4 e 8%, dependendo das condições empregados no processo de refinação. Os fitoesteróis, oriundos do óleo da torta, podem ter um amplo uso na indústria farmacêutica, para obtenção de hormônios esteroidais tais como: progesterona, pregnelonona, testosterona e seus derivados (ICIDCA, 1999).

Conforme o estudo de Gandra (2006), o óleo obtido pela purificação da cera bruta com etanol apresenta as características físico-químicas mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 Características do óleo de cera de cana-de-açúcar

Determinações	Orgânica	Mista
Índice de Acidez (mg KOH.g ⁻¹)	58,6 ^a	55,8 ^b
Índice de Saponificação (mg KOH.g ⁻¹)	178,8 ^a	174,4 ^b
Índice de Iodo – Wijs (mg I.100g ⁻¹)	64,4 ^a	68,3 ^b
Viscosidade (cP), 25°C	364,5 ^a	371,4 ^b

Cana Orgânica: sistema orgânico, não queimada antes do corte

Cana Mista: 30% de cana queimada antes do corte + 70% de cana orgânica

Fonte: GANDRA, 2006

Na tabela 5, observa-se que os óleos de cana-de-açúcar são compostos basicamente por cinco ácidos graxos principais: palmítico (C16:0), linolênico (C18:3), linoléico e oléico (C18:2 + C18:1) e triacontanóico (C30:0), os quais representam aproximadamente 90%. A presença do ácido triacontanóico na composição dos óleos é atribuída a uma pequena quantidade de cera remanescente da purificação. O óleo de cana orgânica apresentou em sua composição 53,7% de ácidos graxos saturados e 46,3% de ácidos graxos insaturados, enquanto o óleo de cana mista apresentou 51,8% e 48,2%, respectivamente. Conforme a Tabela 5, observa-se que a composição do óleo de cana mista e orgânica difere estatisticamente ($p < 0,05$) na proporção relativa dos ácidos mirístico (C14:0), linolênico (C18:3), linoléico e oléico (C18:2 + C18:1) e eicosenóico (C20:1) (GANDRA, 2006).

Tabela 5 Composição percentual de ácidos graxos dos óleos de cera de cana-de-açúcar.

Ácido Graxo	%	
	Óleo de cana orgânica	Óleo de cana mista
14:0	1,1 ^a	0,9 ^b
16:0	33,1 ^a	33,7 ^a
18:3	23,6 ^a	24,4 ^b
18:1 + 18:2	20,6 ^a	22,4 ^b
18:0	4,8 ^a	4,8 ^a
20:1	2,1 ^a	1,4 ^b
20:0	1,1 ^a	1,1 ^a
22:0	0,6 ^a	0,6 ^a
24:0	0,7 ^a	0,6 ^a
30:0	12,3 ^a	10,1 ^a

Cana Orgânica: sistema orgânico, não queimada antes do corte

Cana Mista: 30% de cana queimada antes do corte + 70% de cana orgânica

Fonte: GANDRA, 2006

2.7. Oxidação lipídica

A oxidação de lipídios é um problema sério em muitos setores da indústria, por causar efeitos negativo nos atributos sensoriais e na qualidade físico-química dos óleos. A rancidez oxidativa de lipídios é bastante complexa e envolve um grande número de reações interligadas com a formação de inúmeros compostos intermediários. A velocidade de autooxidação extremamente afetada composição em ácidos graxos, grau de insaturação, presença e atividade de pro e antioxidantes, pressão parcial de oxigênio, natureza da superfície exposta ao oxigênio e condições de estocagem (temperatura, exposição à luz, teor de umidade, etc) dos alimentos contendo óleo ou gordura em sua composição (ALLEN & HAMILTON, 1983; BELITZ & GROSCH, 1999; BOZAN et al., 2008).

A deterioração oxidativa de óleos comestíveis envolve o autooxidação acompanhado pelas reações oxidativas e não-oxidativas. Os produtos da oxidação dos óleos, que incluem hidroperóxidos, decompõem-se para produzir uma variedade dos compostos temporários que resultam no off-flavor nos óleos (SENANAYAKE & SHAHIDI, 2002).

A complexidade das reações envolvidas na oxidação lipídica e da ampla quantidade de compostos produzidos causa grandes dificuldades em avaliar as alterações. Os ácidos graxos insaturados são facilmente oxidados, em virtude da presença de duplas ligações nas cadeias de carbono de sua estrutura química e que podem sofrer oxidação, degradação e polimerização por um mecanismo de radicais livres. Destas transformações resultam aldeídos, cetonas, ácidos, alcoóis, hidrocarbonetos, etc., responsáveis pelas características organolépticas e físico-químicas associadas a este tipo de rancificação. O processo de oxidação lipídica é a principal causa da perda de qualidade do alimento, afetando seu sabor, aroma, cor e textura, além de resultar na produção de compostos tóxicos e em sério decréscimo de seu valor nutritivo (RACANICCI et al., 2004).

A rancificação oxidativa não ocorre normalmente com ácidos graxos saturados porque, neste caso, a formação do radical livre é energeticamente desfavorável. Somente sob condições drásticas de temperatura, dificilmente encontradas nas práticas normais da tecnologia de alimentos, a formação do radical livre por ruptura homolítica da ligação C-H de uma cadeia carbônica saturada poderia ocorrer, já que esta ruptura exigiria aproximadamente 100 kcal/mol. Entretanto, a presença de duplas ligações na cadeia carbônica do ácido graxo, necessita de baixa energia para ruptura homolítica das ligações C-H na posição alílica, aproximadamente 60 kcal/mol (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

2.8 Espectrometria de massas para caracterização lipídica

A espectrometria de massas (MS) tornou-se uma poderosa técnica na análise de analíticos e bioanalíticos. Este enorme êxito e abrangência resultaram principalmente da capacidade inigualável de MS para detectar, contar e caracterizar os átomos e as moléculas de diversos tipos, composição e tamanhos (HOFFMANN & STROOBANT, 2007).

A MS constitui uma técnica comumente utilizada para identificar a fórmula molecular de inúmeros compostos da relação massa/carga (m/z) de cada espécie analisada. O espectômetro de massas analisa apenas moléculas carregadas (ionizadas) (WATSON & PARKMAN, 2007) que é gerado por um sistema de ionização ou fonte de íons (HAM, 2008).

A fonte de ionização por *electrospray* (ESI) é uma das mais usadas atualmente. Neste tipo de ionização, íons são gerados à pressão atmosférica. Esta fonte transfere para a fase gasosa moléculas polares de pequenas até grandes massas, que freqüentemente são termicamente instáveis. Como ESI consiste em um método brando de ionização, as moléculas de até 600 Daltons são observadas principalmente na sua forma mono-carregada, sem fragmentação, permitindo a visualização de íons individuais mesmo em misturas complexas. Íons multi-carregados podem ser observados em casos de moléculas maiores.

A espectrometria de massas também forneceu uma poderosa técnica para caracterização de óleos vegetais. Métodos de ionização suave, como a espectrometria de massas com ionização (ESI-MS), foram mostrados para fornecer informações estruturais sobre as biomoléculas em misturas complexas sem métodos de pré-separação. A infusão direta ESI-MS, por exemplo, tem sido utilizada para análise de óleos vegetais, após a diluição da amostra com clorofórmio ou diclorometano, e fornece perfis TG e AGL, entretanto, com substanciais efeitos residuais (GOODACRE et al., 2002; WU et al., 2004).

A ESI-MS também tem sido utilizada para detectar adulteração de óleos vegetais após extração seletiva com solventes metanol-água (1:1). Estes extratos diluídos são enriquecidos em constituintes mais polares e ácidos, principalmente AGL e fenóis, e foram diretamente submetidos à ESI (-)-MS, com efeitos residuais muito reduzidos (CATHARINO et al., 2005).

A MS também tem conseguido determinar perfis de óleos vegetais sem fragmentação dos íons de triacilgliceróis (TG), portanto, diacilgliceróis (DG) e monoacilgliceróis (MG) podem ser analisados simultaneamente (ALBERICI et al., 2010, SIMAS et al., 2010).

Um método fácil e confiável foi estudado por Simas e colaboradores (2010), onde utilizou espectômetro de massas com ionização por sonic-spray ambiente (EASI) e verificaram os perfis de TG e AGL de vários óleos vegetais de forma rápida e prática.

Além disso, a MS tem sido utilizada para determinar o nível de oxidação de óleos e proposta para análise de biodiesel (ALBERICI et al., 2010, SIMAS et al., 2010).

2.9 Biodiesel

Biodiesel pode ser definido como o derivado mono-álquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais (tais como dendê, babaçu, soja, palma, mamona, cana-de-açúcar, entre outras) ou gordura animal, cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores (LIMA, 2004).

No Brasil, há diversas experiências sobre o uso de biodiesel, oriundo de óleos novos e reutilizados, puros ou misturados ao diesel. Entretanto, apenas em 1998 o órgão regulamentador do setor, a Agência Nacional de Petróleo (ANP), publicou a Resolução n 180, sobre a necessidade de realização de testes pré-aprovados para a homologação de combustíveis não especificados (SALES et al, 2006).

Na década de 70 foi implementado o Programa Nacional do Alcool – PROALCOOL para abastecer com etanol, de forma extensiva, veículos movidos normalmente à gasolina. Esse programa apresentou um saldo positivo, pois as metas, apesar de muito ambiciosas, foram atingidas e superadas, demonstrando a potencialidade brasileira em produção de biomassa para gerar energia. Em 1983, o Governo Federal, motivado pela alta nos preços de petróleo, lançou o Programa de Óleos Vegetais – OVEG, no qual foi testada a utilização de biodiesel e misturas combustíveis em veículos que percorreram mais de 1 milhão de quilômetros. (LIMA, 2004).

O Programa Brasileiro de Biocombustíveis (Probi biodiesel) nasceu em 2002 com metas ambiciosas. O projeto estimava que dentro de um prazo aproximado de três anos o país já estivesse utilizando uma mistura chamada B5, composto por 5% de biodiesel e 95% de diesel comum, para abastecer picapes, ônibus, caminhões e demais veículos hoje movidos apenas pelo óleo diesel convencional. No futuro, a idéia é que o B5 dê lugar ao B20 (20% de biodiesel + 80% de diesel comum) (PACHIONE, 2009).

Em 23 de Outubro de 2009, o presidente do Brasil, Luiz Inácio Lula da Silva, participou do anúncio da adição de 5% de biodiesel ao diesel consumido no Brasil. O chamado B5, que estava previsto em lei para começar a vigorar em 2013, tornou-se obrigatório a partir de janeiro de 2010 em todo o País. Esta lei aumentou a produção de biodiesel para 4,7 bilhões de litros em 2010, fortalecendo a posição do Brasil na liderança mundial de energias renováveis em escala comercial. Segundo o Ministério de Minas e Energia (MME), a nova mistura também ajudou o País a reduzir a importação de diesel (BIODIESELBR, 2009, ANP, 2011).

Entre as fontes de energia ecologicamente corretas pode-se destacar o biodiesel, pois além de diminuir a emissão de gases do efeito estufa, reduz a emissão de outros contaminantes, pode gerar emprego e renda em comunidades socialmente desfavorecidas, contribui para a segurança energética do país no longo prazo e reduz a importação de óleo diesel feita pelo Brasil. O biodiesel está praticamente isento de

compostos de enxofre, assim como de compostos aromáticos, e contém cerca de 11% de oxigênio em peso. Estas características indicam que as emissões de gases contaminantes e produtos cancerígenos serão menores com a utilização do biodiesel (BIODIESELBR, 2009).

2.9.1 Produção de Biodiesel

A síntese de biodiesel normalmente ocorre a partir de uma reação de transesterificação de um óleo vegetal com um álcool de cadeia curta (como metanol ou etanol) usando um catalisador (ácido, básico ou enzimático) produzindo uma mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos e glicerol (NOUREDDINI et al, 1998; CANAKCI & VAN GERPEN, 2001; MONYEM & VAN GERPEN, 2001; ENCINAR et al., 2002; CHOMSIRI, 2009).

O processo global de síntese de biodiesel é uma sequência de três reações consecutivas e reversíveis nas quais diacilgliceróis e monoacilgliceróis são formados e denominados como intermediários. A estequiometria da reação requer um mol de triacilglicerol para três de álcool. No entanto excesso de álcool é utilizado para aumentar a conversão em ésteres monoalquílicos de ácidos graxos (MEHER et al., 2006).

Investigações e otimizações dos parâmetros da reação de transesterificação (tipos de catalisadores, concentração do catalisador, fração molar do álcool e óleo, temperatura da reação e tempo de reação) estão sendo bastante estudados (MEHER et al., 2006; MARCHETTI et al., 2007).

Normalmente, o biodiesel é produzido usando catalisadores básicos, pois a reação é mais rápida do que empregando catalisadores ácidos. Além disso, a catálise básica é menos corrosiva que a catálise ácida. Os catalisadores básicos mais comuns para esta finalidade são o NaOH, KOH, NaOCH₃, Na₂CO₃ e K₂SO₃ (PINTO et al, 2005).

A desvantagem da preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos empregando catalisadores básicos é a formação de sabões oriunda da saponificação

dos ácidos graxos livres presentes em óleos com alta acidez. O sabão dificulta e as vezes impedem a separação da fração glicerina com ésteres metílicos de ácidos graxos. Sendo assim, catalisadores ácidos são mais indicados neste tipo de material (SCHUCHARDT et al., 1998; MEHER, et al., 2006; MARCHETTI, 2007; OZBAY et al, 2008).

A transesterificação ácida pode ser catalisada por ácidos como HCl, H₂SO₄, BF₃, H₃PO₄, e ácidos sulfônicos orgânicos. Quando o catalisador ácido é utilizado para catalisar a reação, a esterificação direta dos ácidos graxos livres ocorre simultaneamente com a reação de transesterificação. A reação de esterificação é a reação de ácidos graxos com alcoóis para produzir ésteres de alcoóis e água como produtos. Quando óleos ácidos são usados para a produção de biodiesel, a esterificação direta dos ácidos graxos ocorre simultaneamente com a transesterificação. A reação de esterificação direta é importante no aumento da produção de biodiesel. As duas equações das reações de transesterificação e esterificação estão presentes na Figura 3 (MARCHETTI & ERRAZU, 2008).

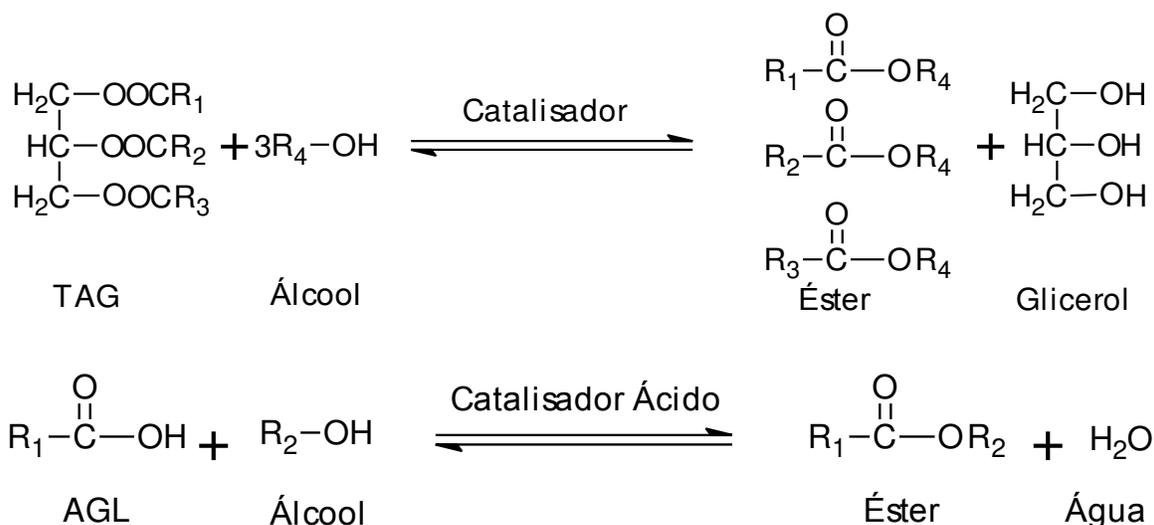


Figura 3 Reações de transesterificação de triacilgliceróis e esterificação direta de ácidos graxos com álcool (MARCHETTI & ERRAZU, 2008).

A reação de transesterificação usando catalisador ácido é muito lenta, requerendo tempos mais longos que a catalise básica. Também requer temperaturas, pressões extremas e uma alta razão molar álcool/óleo para a completa reação (PINTO et al., 2005; MARCHETTI, 2007). Normalmente, a reação de catalise ácida é aplicada em óleos contendo alto teor de ácidos graxos livres para formar produtos de ésteres de alcoóis (MEHER, et al., 2006).

Marchetti & Errazu (2008) estudaram a esterificação dos AGLs em óleo de girassol utilizando ácido sulfúrico como catalisador (1 a 5%), etanol anidro (razão etanol/óleo: 4:1-10:1) e temperatura (35 a 55°C). Verificaram que utilizando 2% de catalisador e 6:1 razão etanol/óleo a 55°C, conseguiam uma conversão final da acidez de 96%.

2.9.2 Rota etílica

O metanol e o etanol são os alcoóis primários mais produzidos em escala industrial e seus usos nas reações de transesterificação têm sido freqüentes (GERPEN et al., 2004).

O biodiesel utilizado em vários países da Europa, nos Estados Unidos e no Brasil é uma mistura de ésteres produzidos pela rota metílica. O metanol geralmente é obtido de fontes fósseis não renováveis, mas também pode ser obtido por destilação seca da madeira; esta rota metílica já é totalmente dominada, porém, apresenta como desvantagem da extrema toxicidade do metanol, podendo causar cegueira e morte (LIMA, 2004; GARCIA, 2006).

A transesterificação utilizando etanol é bem mais trabalhosa, pois o uso deste álcool, ainda que anidro, implica em problemas na separação da glicerina do meio reacional. Entretanto, o uso do etanol é vantajoso, pois o Brasil, ainda, é o maior produtor mundial de etanol sintetizado a partir da cana-de-açúcar (LIMA, 2004). Além de ser proveniente de fonte renovável, a utilização do etanol resultará em maiores ganhos no mercado de carbono. Quanto às dificuldades na separação de fases em reações que empregam etanol na síntese do biodiesel, as mesmas podem ser contornadas por ajustes nas condições reacionais. De acordo com Marchetti & Errazu

(2008), quando o etanol é empregado na reação de esterificação, o produto do combustível final pode ser considerado 100% natural e renovável.

Na literatura são reportadas várias razões molares de etanol/óleo e as mais citadas variam entre 6:1 a 30:1 (MA & HANNA, 1999).

3 Materiais e Métodos e Procedimento Experimental

3.1 Material

3.1.1 Matéria Prima

O óleo de cera de cana-de-açúcar foi gentilmente cedido pela Usina São Francisco – Sertãozinho, SP. Esta fração foi obtida pelo processo de purificação com etanol anidro a frio da cera bruta clarificada da cana-de-açúcar (ROZÁRIO et al.,2007).

3.1.2 Reagentes, vidrarias e solventes

Foi utilizada vidraria de uso rotineiro em laboratórios de pesquisa. Todos os reagentes e solventes utilizados nas análises químicas apresentaram especificações de qualidade e pureza requeridas pelas metodologias empregadas.

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Ácidos Graxos Livres e Índice de Acidez: AOCS (2004) - Método Oficial Ca 5a-40

Aproximadamente 7,00 g de amostra e 75 mL de álcool etílico 95% aquecido e previamente neutralizado foram transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL. A mistura foi titulada com solução padronizada de NaOH 0,25 N, utilizando fenolftaleína 1% (em álcool) como indicador. O índice de acidez, expresso em mg de KOH necessários para neutralizar 1 g de amostra, foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$IA(\text{mgKOH.g}^{-1}) = \frac{V_x N_x 25,6}{m}$$

sendo:

V = volume gasto com a titulação da amostra (mL)

N = normalidade da solução

m = massa da amostra (g)

O percentual de ácidos graxos livres foi calculado em termo do ácido palmítico.

A determinação foi realizada em triplicada.

3.2.2 Índice de peróxido pelo método ácido acético – clorofórmio AOCS (2004) - Método Oficial Cd 8-53

Pesou-se aproximadamente 5 g da amostra e adicionou-se 30 mL da solução de ácido acético – clorofórmio 3:2. Adicionou-se 0,5 mL da solução saturada de KI, agitou-se vigorosamente durante 1 minuto e adicionou-se 30 mL de água para interromper a reação. Adicionou-se o indicador de amido e titulou-se a amostra com a solução de tiosulfato de sódio 0,01 N.

Para calcular o valor de peróxido utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{IP (miliequivalente/kg de amostra)} = \frac{(S - B) \times N \times 1000}{m}$$

Onde:

B = volume do titulante em mL do branco

S = volume do titulante em mL da amostra

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

m = massa da amostra em g

3.2.3 Índice de saponificação: AOCS (2004) - Método Oficial Cd 3-25

Pesou-se aproximadamente 1,0 g de amostra em balão de 250 mL e adicionou-se 25 mL de solução de KOH etanólica 0,7 N. A solução foi mantida sob refluxo por 8 horas e, após resfriamento, titulada com solução padronizada de HCl 0,5 N, utilizando fenolftaleína 1% (em álcool) como indicador.

Preparou-se um branco sob as mesmas condições, sem a amostra. O índice de saponificação em mg KOH /g foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$IS \text{ (mg KOH.g}^{-1}\text{)} = \frac{(B - V) \times N}{m} \times 56,1$$

sendo:

B = volume gasto na titulação do branco (mL)

V = volume gasto na titulação da amostra (mL)

N = normalidade da solução de HCl

m = massa da amostra (g)

A determinação foi realizada em triplicada.

3.2.4 Índice de iodo pelo método de ácido acético ciclohexano: AOCS (2004) - Método Oficial Cd 1d-92

Aproximadamente 0,5 g da amostra foram dissolvidas em 15 mL de ciclohexano e ácido acético (1:1) e adicionou-se 25 mL de solução de cloro-iodo segundo Wijs. O frasco foi tampado e mantido no escuro por 1 hora. Foram adicionados 20 mL de solução de KI 10% e 100 mL de água destilada. A amostra foi titulada com solução padronizada de tiosulfato de sódio 0,1 N, utilizando solução de amido 1% como

indicador. Preparou-se um branco sob condições idênticas, sem a amostra de análise. O índice de iodo, expresso em mg de iodo absorvido por 100 mg de amostra, foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$II \text{ (mg I.100 mg}^{-1}\text{)} = \frac{(B - S) \times N \times 12,69}{m}$$

sendo:

B = volume gasto na titulação do branco (mL)

V = volume gasto na titulação da amostra (mL)

N = normalidade da solução

m = massa da amostra (g)

A determinação foi realizada em triplicada.

3.2.5 Teor de matéria insaponificável AOCS (2004) - Método Oficial Ca 6b-40

Cerca de 2,0 g da amostra foram dissolvidos em 25 mL de álcool etílico 95% e adicionou-se 1,5 mL de solução de KOH 50%. A mistura foi mantida em refluxo por 30 minutos, posteriormente, transferida para um funil de separação de capacidade de 250 mL, adicionando-se 50 mL de solução salina 5% e 50 mL de éter etílico. A fase etérea foi separada e, antes de ser transferida para um segundo funil, foi filtrada para a retirada de insolúveis concentrados na interface. Ao final de 5 extrações, as fases etéreas foram lavadas 3 vezes com porções de 20 mL de solução salina e, em seguida, mais 3 vezes com porções de 20 mL de solução de KOH 0,5 M, intercaladas com porções de água destilada. Após a terceira lavagem com KOH, a fração etérea foi lavada com água até teste negativo com fenolftaleína e transferida para um balão tarado. O solvente foi evaporado da fração. O material foi seco em estufa a 105°C, até peso constante (A) e o resíduo foi dissolvido em 2 mL de éter etílico e 10 mL de álcool etílico 95% previamente neutralizado e titulado com NaOH 0,02 M, para correção dos

ácidos graxos livres (B). Foi feito o mesmo procedimento com um branco (sem amostra) (C). A matéria insaponificável foi calculada utilizando-se a fórmula:

$$MI (\%) = \frac{A - (B + C)}{m} \times 100$$

sendo:

A = massa do resíduo (g)

B = massa dos ácidos graxos (g)

C = massa do teste branco (g)

m = massa da amostra (g)

A análise foi realizada em triplicada.

3.2.6 Quantificação das famílias de compostos por cromatografia líquida por exclusão de tamanho (HPSEC).

As amostras foram diluídas na proporção de 1:100 em tetrahydrofurano e analisadas (20 µL) em cromatógrafo líquido equipado com injetor Rheodyne 7725i e bomba Waters 510 (Waters Associates, Milford, Mass., USA), com duas colunas Ultrastyrigel (100 Å and 500 Å) (Waters Associates, Milford, Mass., USA), 25 cm x 0.77 cm I.D., empacotadas com copolímero de estireno-divinilbenzeno (~10 mm), conectadas em série, e com um detector de índice de refração (Hewlett Packard, Califórnia, EUA). A fase móvel foi tetrahydrofurano (grau HPLC) (1 mL/ min) (MÁRQUEZ-RUIZ et al., 1996).

As famílias de compostos foram identificadas por comparações dos tempos de eluição com padrões de: Triacilgliceróis (TG), Diacilgliceróis (DG) e Monoacilgliceróis (MG) e ácidos graxos livres (AGL). Estes últimos compostos aparecem juntos no mesmo tempo de eluição.

A análise foi realizada em duplicada.

3.2.7 Extração e identificação dos componentes polares – Método Oficial IUPAC 2507.

A determinação quantitativa de compostos polares foi realizada através da cromatografia de adsorção em coluna, segundo o método oficial da IUPAC 2.507 (IUPAC, 1992), utilizando a mistura éter de petróleo: éter etílico (90:10) como solvente de eluição da fração não polar (MÁRQUEZ-RUIZ et al., 1996).

Pesou-se 50 mg do óleo o qual foi dissolvido em 2 mL de tetrahidrofurano e submetido à separação em coluna Sep-Pak® (1g) contendo sílica de, previamente condicionada com 10 mL da mistura de éter de petróleo: éter etílico (90:10), utilizando para a eluição da fração não polar 15 mL da mesma mistura de solventes. Para a eluição da fração polar, foram utilizados 15 mL de éter etílico e mais 8 mL de metanol, garantindo que todo o material polar fosse retirado. Esta última fração foi evaporada à secura em um balão pêra previamente tarado, em evaporador rotativo a vácuo à temperatura inferior a 60 °C e para garantir a evaporação total do solvente, secou-se em nitrogênio. O balão foi pesado e obteve-se o percentual de polares na amostra. Em seguida as amostras foram dissolvidas em solvente tetrahidrofurano (proporção de 1:100) e analisadas por cromatografia líquida por exclusão de tamanho (HPSEC).

A condição cromatográfica utilizada foi a mesma descrita no item 3.2.6.

3.2.8 Composição em Ácidos Graxos - AOCS (2004) - Método Oficial Ce 62, Cromatografia gasosa dos ésteres metílicos.

A determinação da composição em ácidos graxos foi realizada por cromatografia em fase gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos. As amostras foram preparadas na forma de metil ésteres de ácidos graxos, de acordo com a metodologia proposta por Hartmann & Lago (1973).

Utilizou-se cromatógrafo gasoso (CGC Agilent 6850 Series - GC System), equipado com detector de ionização de chama (FID) e injetor “split”. Os componentes foram separados em coluna capilar de sílica fundida LM-5 (L & M, polidifenildimetilsiloxano: comprimento, 30 m; diâmetro interno, 0,25 mm; espessura de filme de 0,30 μm). Amostras de 1,0 μL foram injetadas (taxa de “split” 1:50). As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas constantes a 320° C. Hélio foi utilizado como gás de arraste, com uma vazão de 1,1 mL.min⁻¹. A programação de temperatura na coluna foi de 180° C por 5 minutos, 180 a 300° C (4° C.min⁻¹) e 300° C por 35 minutos, totalizando 70 minutos de corrida. A identificação dos componentes foi realizada com base nos valores de tempo de retenção obtidos a partir de amostra de composição conhecida (óleo de mostarda), injetada nas mesmas condições. Os valores de tempo de retenção foram utilizados para a construção de curvas de número de carbono equivalente, que auxiliaram na identificação dos componentes das amostras. A integração por normalização de áreas foi realizada pelo software Agilent GC Chemstation Plus. As determinações cromatográficas foram realizadas em triplicata.

3.2.9 Determinação da composição e conteúdo de esteróis mediante cromatografia em fase gasosa com coluna capilar - Diário Oficial de las Comunidades Europeas - Anexo V (L248/15) 1991.

Neste trabalho, utilizou-se o método acima com adaptações realizadas por Becker, 2004.

Foram pesados 0,5 g do óleo em um balão de fundo redondo. Adicionou-se 0,5 mL do padrão interno α -colestanol 2%. As amostras foram saponificadas em uma solução etanólica de hidróxido de potássio 2N a temperatura de ebulição em refluxo por 30 minutos e adicionou-se 50 mL de água. A matéria insaponificável foi extraída com 4 lavagens de éter etílico. A separação da fração dos fitoesteróis da matéria insaponificável foi extraída mediante cromatografia de camada delgada por placas de

sílica. A banda dos fitoesteróis foi separada e recuperada da sílica com 10 mL de clorofórmio, lavando 3 vezes com 10 mL de éter etílico. Evaporou completamente o solvente e dissolveu os fitoesteróis extraídos com 1 mL de hexano para análise cromatográfica.

Utilizou-se um cromatógrafo gasoso (CGC Agilent 6850 Series - GC System), equipado com detector de ionização de chama (FID) e injetor *split*. Os componentes foram separados em coluna capilar de sílica ZB 5 (Zebron, 5% fenil 95% metilpolisiloxano, 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,3 µm de espessura de filme); com a temperaturas do injetor, forno e detector de 280°C, 300°C e 300°C, respectivamente. Hélio foi utilizado como gás de arraste, com uma vazão de 1,1 mL.min⁻¹. A pressão na coluna foi de 25,86 psi com uma velocidade média de 35 cm/s. Amostras de 1,0 µL foram injetadas (taxa de *split* 1:50). Tempo de corrida total foi de 30 minutos.

A identificação dos picos foi realizada com base nos valores de tempo de retenção obtidos a partir do padrão contendo colesterol, dihidrocolesterol, campestral, estigmasterol e β-sitosterol, injetado nas mesmas condições. Os valores de tempo de retenção foram utilizados para a indentificação dos componentes dos fitoesteróis das amostras. A integração por normalização das áreas foi realizada pelo software Agilent GC Chemstation Plus. As determinações cromatográficas foram realizadas em duplicata.

O uso de solução de padrão interno (Dihidrocolesterol) desde o início da preparação da fração insaponificável constitui-se em uma medida que garante a correção das perdas decorrentes das várias etapas da metodologia, o que possibilita também a quantificação dos componentes esterólicos.

3.2.10 Avaliação do comportamento térmico – AOCS (2004) - Método Oficial Cj 1-94.

Obteve-se os termogramas de fusão e cristalização do óleo através da calorimetria diferencial de varredura (DSC – *Differential Scanning Calorimetry*),

conforme o método AOCS Cj 1-94. O equipamento utilizado foi um calorímetro DSC 7 da Perkin Elmer acoplado ao Thermal Analysis Controller Cooler TAC 7/DX. O sistema de manuseio de dados utilizado foi o Software Pyris Series Thermal Analysis System. As determinações foram conduzidas com aproximadamente 10 mg de amostra em cápsulas herméticas de alumínio de 30 μ L. A amostra foi submetida ao seguinte programa de temperatura para a curvas de cristalização e fusão, respectivamente: 10 min (80 °C), 80 °C a -40 °C (10 °C/min); 30 min a -40 °C; -40 °C a 80 °C (5 °C/min). Os termogramas foram obtidos com base na massa de cada amostra.

Através do software do equipamento, foram determinadas a temperatura de pico - T_{pico} (° C), a temperatura final de fusão ou cristalização - T_{endset} (° C) e a entalpia de transição de fases - ΔH ($\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$). A temperatura de início de fusão ou cristalização - T_{onset} (° C) foi determinada no ponto onde a curva começa a desviar da linha de base. Os resultados apresentados são a média de duas determinações para cada amostra.

3.2.11 Análise elementar de Carbono, Nitrogênio e Hidrogênio - ASTM 5291 (2001).

Este método é aplicável a óleos vegetais brutos, além de óleos lubrificantes e combustíveis.

Foi utilizado um analisador elementar de Carbono, Hidrogenio e Nitrogenio Perkin Elmer, modelo 2400, para a determinação dos percentuais de carbono, nitrogênio e hidrogênio da amostra.

A análise foi realizada em duplicada.

3.2.12 Espectrometria de massas utilizando ionização por ESI.

Para o modo positivo, 10 μ L da amostra de óleo foi transferido para um eppendorfe e diluída com 1 mL de metanol, agitou-se e retirou uma alíquota de 10 μ L e diluiu-se novamente com 1 mL de metanol contendo 0.1 % de ácido fórmico.

No modo negativo, apenas diluiu-se as soluções em acetonitrila.

As soluções resultantes foram diretamente injetadas no Q-TOF (Micromass) por uma Bomba (Havard Apparatus) com o fluxo de 10 μ L/min.

Os espectros de massa por ionização *electrospray* (ESI-MS) foram realizados no modo negativo (identifica os AGLs) e positivo (identifica os TGs, DGs, MGs e ésteres etílicos), obtidos em um espectrômetro no massa Q-TOF que é dotado de um analisador de massa quadrupolo com tempo de vôo (Q-TOF).

As condições de ESI-MS foram as seguintes:

Temperatura da fonte: 100°C

Temperatura de Dissolvatação: 100°C

Voltagem do capilar: \pm 3kV

Voltagem do cone: 30V

3.2.13 Espectrometria de massas utilizando espectrômetro de massas de ressonância ciclôtrônica de íons com transformada de Fourier - ESI (+) FT-ICR MS.

Dissolveu-se 2 mg da amostra em 1 mL de metanol e em seguida, transferiu-se 0,5 mL desta solução para um vial de 1 mL e diluindo-se com 0,5 mL de metanol contendo 0,1 % (v/v) de ácido fórmico. Utilizou-se inserção direta com bomba de seringa interna do equipamento para adquirir os espectros de massas.

Foi utilizada ionização por *electrospray* com espectrometria de massas de ressonância ciclôtrônica de íons com transformada de Fourier (ESI FT-ICR MS)

Para a fonte ESI utilizou-se voltagem do *spray* de 2,5 a 3,5 kV, voltagem do capilar de 35V, *tube lens* de 10V e *Sheath gas flow rate* de 8 L/min. Para as análises de MS no ion trap linear utilizou-se fragmentação na fonte de 30 a 80V.

Os espectros de massas foram adquiridos de *m/z* 200 a 1000 e tempo máximo de injeção no ion trap linear entre 0,1 a 10 ms. Para as análises no ICR utilizou-se a mesma fragmentação na fonte e a mesma faixa de aquisição do ion trap linear, tempo máximo de injeção no ICR de 10 a 100 ms.

Cada espectro de FT-ICR MS representa a somatória de 100 μ scan. A população de íons na cela de ICR foi controlada de modo a obter os valores ESI(+) de $8,00 \times 10^5$ íons com *max inject time* de de 4 ms. O tempo total de aquisição de um espectro foi 12 minutos.

Foi utilizado o software Xcalibur 2.0 (*ThermoScientific*) para o tratamento de dados.

3.2.14 Estabilidade Oxidativa a 110°C – AOCS (2004) Cd 12b-92

O equipamento utilizado foi Oxidative Stability Instrument (OSI) - Omnim Archer – Daniels Midland Company.

Pesou-se 5 g da amostra em tubo de reação do equipamento e preparou-se o tubo de medição de condutividade com 50 mL de água deionizada atachado com o eletrodo. Conectou-se a mangueira do ar no de tubo de medição de condutividade e ajustou-se as pipetas Pasteur de vidro contendo aeração a 5 mm do fundo, tanto no tubo de reação quanto no tubo de medição. As amostras ficaram a 110 °C receberam um fluxo de ar de 9,0 L/h. A condutividade elétrica da água é medida pelo eletrodo e passada para o computador e o gráfico é criado. O ponto de inflexão do gráfico é chamado de tempo de indução onde é fornecido em horas.

3.2.15 Análise de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H)

A amostra foi colocada em tubo e dissolvida em clorofórmio deuterado. O espectro de RMN foi registrado em espectrofotômetro Bruker Avance DPX (250 MHz), operando a temperatura ambiente. Para os núcleos de Hidrogênio-1 foram utilizados os seguintes parâmetros de aquisição: tempo de relaxação: 1 s, tempo de aquisição: 3,64 s e foram acumuladas 32 repetições (GARCIA, 2006).

3.2.16 Determinação da glicerina livre e ligada por cromatografia em fase gasosa conforme a norma EN 14105/ASTM D6584 9 (2001)

Este método determina a quantidade de glicerol (derivatizado), mono e diacilgliceróis (derivatizado), triacilgliceróis e ésteres metílicos na amostra. O glicerol derivatizado é o primeiro material a eluir, seguido seqüencialmente por ésteres de etila e os monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis derivatizados.

Pesou-se 50 mg da amostra do óleo de cana esterificado e da amostra do óleo de cera de cana-de-açúcar e diluiu com 1 mL de dicloro em vials.

Para a identificação dos mono- di- e triacilgliceróis, utilizou-se um cromatógrafo em fase gasosa (Shimadzu GC-2010), equipado com detector de ionização de chama (FID) e injetor *split*. Os componentes foram separados em coluna capilar de sílica fundida HT5-SGE (SGE, 5% Phenyl Polycarborane-Siloxane: comprimento, 25 m; diâmetro interno, 0,32 mm; espessura de filme de 0,10 µm). Amostras de 1,0 µL foram injetadas. As temperaturas programadas do injetor foram de 60 ° C por 1 minuto, 60 a 380° C (20° C.min⁻¹) e 380° C por 27 minutos, totalizando 44 minutos. A temperatura do detector foi mantida constante a 380° C. Hélio foi utilizado como gás de arraste, com uma vazão de 3,0 mL.min⁻¹. A programação de temperatura na coluna foi de 180° C por 5 minutos, 180 a 300° C (4° C.min⁻¹) e 300° C por 35 minutos, totalizando 70 minutos de corrida. A identificação dos picos foi realizada com base nos valores de tempo de retenção obtidos a partir do padrão contendo glicerina, butanotriol ISTD1,

monopalmitina, monolinoleína, monoleína, monoestearina, tricaprina ISTD2, diacilgliceróis e triacilgliceróis injetada nas mesmas condições.

3.2.17 Determinação dos esteres etílicos totais por cromatografia em fase gasosa (EN 14103)

Para a separação, identificação e quantificação de ésteres, utilizou-se um cromatógrafo em fase gasosa (Shimadzu GC-2010), equipado com detector de ionização de chama (FID) e injetor *split*. Os componentes foram separados em coluna capilar de sílica fundida Stabilwax (modelo 0623 com 5% polietileno glicol, comprimento: 30 m; diâmetro interno: 0,25 mm; espessura de filme de 0,25 μm). As amostras de biodiesel e de óleo de cera de cana-de-açúcar foram injetadas no volume de 0,2 μL . A temperatura do injetor foi mantida constante a 250°C. A temperatura do detector foi mantida constante a 280°C. Hélio foi utilizado como gás de arraste, com uma vazão de 3,0 mL.min⁻¹. A programação de temperatura na coluna foi de 100°C por 5 minutos, 100 a 220°C (5°C.min⁻¹) e 220°C por 27 minutos, totalizando 56 minutos de corrida. A identificação dos picos foi realizada com base nos valores de tempo de retenção obtidos a partir do mix de padrões de ésteres metílicos (C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C24:0) injetada nas mesmas condições. Os valores de tempo de retenção foram utilizados para a construção de curvas de número de carbono equivalente, que auxiliaram na identificação dos componentes das amostras. (SCHOBER et al., 2006)

3.2.18 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).

Este tipo de análise permite identificar os grupos funcionais presentes em compostos orgânicos.

A amostra para análise espectroscópica na região do infravermelho foi preparada utilizando pastilhas de KBr. Os espectros foram registrados no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} .

Os espectros de transmitância das amostras foram obtidos em um espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier da marca Perkin-Elmer, modelo FT-IR1605 (SILVERSTEIN et al.,1979).

3.3 Procedimento Experimental

3.3.1 Preparação da amostra

A amostra de óleo da cera de cana-de-açúcar foi evaporada em rotaevaporador para a retirada de etanol e de água e foi armazenada em recipiente de plástico de 4 litros a temperatura ambiente e protegida da luz, até sua utilização.

3.3.2 Caracterização da matéria-prima (óleo da cera de cana-de-açúcar clarificado)

A matéria-prima foi caracterizada quanto aos seguintes parâmetros:

- Índice de acidez,
- Índice de saponificação,
- Índice de iodo,
- Teor de matéria insaponificável,
- Composição em ácidos graxos,
- Composição das famílias de compostos,
- Composição e teor de esteróis,
- Comportamento térmico

3.3.3 Reação de esterificação e transesterificação

As reações para esterificação e transesterificação foram realizadas empregando-se álcool etílico anidro em excesso, ácido sulfúrico concentrado como catalisador e aquecimento (MARCHETTI & ERRAZU.,2008).

As amostras foram colocadas em tubos hermeticamente fechados de 70 mL, onde foram colocados 10 g de óleo e as quantidades selecionadas de etanol anidro, na temperatura do processo e 2% de ácido sulfúrico como catalisador.

O monitoramento da cinética da reação foi realizada por retiradas de amostras nos tempos 15, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos de reação e determinação da redução de ácidos livres. Os produtos de reação foram colocados em funil de separação e para interromper a reação, mediante a inativação do catalisador, os produtos foram lavados com água quente separando o catalisador e o álcool da fase oleosa até a água de lavagem atingir a neutralidade. A fase oleosa foi seca utilizando-se sulfato de sódio.

Para a redução de ácidos graxos livres utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Redução dos ácidos graxos livres (\%)} = \frac{\text{AGL}_{\text{inicial}}(\%) - \text{AGL}_{\text{Final}}(\%)}{\text{AGL}_{\text{inicial}}(\%)} \times 100$$

3.3.4 Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR (2²).

As variáveis independentes escolhidas para o delineamento foram a temperatura e a razão molar óleo:etanol. O catalisador foi mantido constante a 2%.

A faixa para estudo da razão molar de óleo:etanol foi 1:16 e 1:40. A faixa inicial foi assim escolhida devido ao óleo ser extraído pelo processo de purificação da cera de cana-de-açúcar nesta proporção de óleo:etanol. Segundo Freedman e

colaboradores(1986) que estudaram catalise ácida em óleo de soja e concluíram que uma razão de 1:30 de óleo:butanol é necessária para uma boa conversão.

A faixa de temperatura usada para o estudo foi de 80 a 100°C. Wust (2004) recomendou temperaturas inferiores 100°C para catalise ácida, obtendo uma boa conversão em ésteres etílicos a 83°C.

O percentual de catalisador foi mantido constante e igual a 2%, pois, segundo a otimização de Marchetti & Errazu (2008), esta condição é ideal para uma conversão de 96% em catalise ácida com óleo de girassol acidificado com ácido oléico.

Foi realizado um DCCR (2^2) sendo as variáveis independentes: temperatura de reação (X_1) e a relação molar etanol/óleo (X_2). No total foram 12 ensaios incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 4 repetições dos pontos centrais.

Os níveis utilizados e os ensaios experimentais deste planejamento estão representadas nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6 Níveis e valores reais do planejamento fatorial.

Nível	-1,41	-1	0	1	1,41
Temperatura °C (X_1)	80	83	90	97	100
Óleo:Etanol (X_2)	1:16,7	1:19,7	1:28,1	1:36,6	1:40

Tabela 7 Planejamento fatorial, valores codificados e reais de estudo (temperatura e óleo:etanol).

Ensaio	Codificado		Real	
	Temperatura °C (X ₁)	Óleo:Etanol (X ₂)	Temperatura °C (X ₁)	Óleo:Etanol (X ₂)
1	-1	-1	83	1:19,7
2	+1	-1	97	1:19,7
3	-1	+1	83	1:36,6
4	+1	+1	97	1:36,6
5	-1,41	0	80	1:28,1
6	+1,41	0	100	1:28,1
7	0	-1,41	90	1:16,3
8	0	+1,41	90	1:40
9	0	0	90	1:28,1
10	0	0	90	1:28,1
11	0	0	90	1:28,1
12	0	0	90	1:28,1

As variáveis de resposta do delineamento escolhidas foram a redução dos ácidos graxos livres e o teor de ésteres etílicos formados. Este seria equivalente da redução de ácidos graxos.

Para a análise de teor de ésteres totais buscou-se métodos analíticos amplamente utilizados pela literatura (GARCIA, 2006; KNOTHE et al., 2006; MONTEIRO et al., 2008).

3.3.5 Determinação do teor de ésteres etílicos.

Para a determinação de ésteres etílicos totais, escolheu-se o melhor ensaio do planejamento obtido pelo critério da redução de ácidos graxos livres, no qual foram empregadas as 3 metodologias a seguir:

- a) Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H)

Segundo Garcia (2006) que estudou a transesterificação em óleos vegetais, o método de RMN-¹H, além de identificar e quantificar a formação dos ésteres consegue identificar e quantificar subprodutos da reação (monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis), com a vantagem de não ser necessário o processo de derivatização dos mesmos.

- b) Determinação de ésteres etílicos totais e determinação da glicerina livre e ligada por cromatografia de fase gasosa

O conteúdo de ésteres etílicos pode ser determinado pela norma europeia para biodiesel EN 14103 através de GC-FID (SCHÖBER et al., 2006) e para identificar e quantificar os componentes graxos oleoso, pela norma EN 14105/ASTM D6584 (MONTEIRO et al., 2008).

- c) Espectroscopia na região do infravermelho

Knothe e colaboradores (2006) descreveram os métodos analíticos utilizados em biodiesel (ésteres etílicos e metílicos), onde além de citar o método de RMN-¹H, indica para a determinação do rendimento da reação a espectroscopia na região de infravermelho.

As determinações de glicerina livre e ligada, determinação dos ésteres etílicos totais e espectroscopia na região do infravermelho, foram aplicados na amostra original de óleo de cera de cana-de-açúcar (sem reação) para efeito de comparação.

3.3.6 Investigação dos componentes lipídicos existentes no óleo de cera de cana-de-açúcar

Para visualizar as espécies presentes neste óleo, foi realizada uma espectrometria de massas por ESI-MS (Q-TOF) tanto para o modo negativo, especial para ácidos graxos livres, quanto para o modo positivo para compostos como monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis e ésteres de ácidos graxos.

3.3.6.1 Qualidade oxidativa no óleo de cera de cana-de-açúcar.

Para a verificação da caracterização oxidativa desse óleo foram realizadas as seguintes determinações:

- Índice de peróxido;
- Estabilidade Oxidativa;
- Extração e identificação dos componentes polares
- Espectrometria de massas por ESI(+) FT-ICR MS para identificação dos compostos de oxidação por massa de alta precisão.

3.4 Análise Estatística

A análise estatística, para estudo da otimização da reação de transesterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar, foi realizada utilizando-se o software “STATISTICA” 7.0, analisando os resultados pela Metodologia de Superfície de Resposta. O limite de confiança utilizado foi de 95 % ($p < 0,05$) (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

4 Resultados e discussão

4.1 Caracterização da matéria prima

4.1.1 Características físico-químicas do óleo de cera de cana-de-açúcar

O óleo fornecido pela indústria estava dissolvido em etanol utilizado na última etapa do processo de purificação da cera bruta clarificada. A amostra continha 55,8% de óleo, 34,7% de etanol e 9,5% de água.

Na Tabela 8 encontram-se alguma das características físico-química do óleo de cera de cana-de-açúcar.

Tabela 8 Características físico-químicas do óleo de cera de cana-de-açúcar.

Determinação	Resultado e desvio padrão
Índice de Acidez (mg KOH.g ⁻¹)	50,8 ± 0,5
Índice de Saponificação (mg KOH.g ⁻¹)	185,3 ± 1,1
Índice de Iodo (mgI.100g ⁻¹)	72,1 ± 0,6
Viscosidade (cP), 25° C	55,5 ± 1,5
Matéria Insaponificável (%)	22,2 ± 0,3

O óleo de cera de cana-de-açúcar apresentou um valor de acidez (50,8 KOH.g⁻¹) próximo ao encontrado por Gandra (2006), de 55,9 mg KOH.g⁻¹, porém ,superior a faixa reportada por Paturau (1989), entre 24 e 46 mg KOH.g⁻¹. O índice de iodo encontrado

(71,1 mg I.100g⁻¹) foi superior ao reportado por Gandra (2006), igual a 64,4 mg I.100g⁻¹, mas na faixa relatada por Paturau (1989), entre 49 e 85 mg I.100g⁻¹.

Em relação aos índices de saponificação relatados de 174,2 a 179,1 mg KOH.g⁻¹ (Gandra, 2006) e 144 a 156 mg KOH. g⁻¹ (PATURAU,1989), neste trabalho obteve-se valor de 185,3 mg KOH. g⁻¹.

O teor de matéria insaponificável no valor de 22,2 % encontra-se no limite inferior da faixa relatada por Paturau (1989), entre 23 e 59%. Sem dúvida estas diferenças nas características entre os óleos, relatados por Gandra (2006) e Paturau (1989), devem-se aos métodos diferentes utilizados na extração, purificação e na própria origem da cana-de-açúcar.

4.1.2 Composição em ácidos graxos do óleo de cera de cana-de-açúcar

A Tabela 9 apresenta a composição em ácidos graxos do óleo de cera de cana-de-açúcar. Observa-se que os ácidos graxos predominantes são os ácidos palmítico (31,8 %), linolênico (28,7 %), linoléico e oléico (21,2%) e triacontanóico (7,8 %), perfazendo 89,5% dos ácidos graxos presentes. O ácido triacontanóico (C30:0) presente deve-se a uma pequena quantidade de cera remanescente no óleo depois da purificação com etanol.

Os teores de ácidos graxos saturados e insaturados de 48,7% e 51,3%, respectivamente, representam um óleo mais insaturado que o obtido por Gandra (2006) que, utilizando o mesmo método de purificação, porém, em escala laboratorial, reportou 46,3% de insaturados. Isto explica o pequeno aumento no valor de índice de iodo encontrado neste presente trabalho.

Tabela 9 Composição em ácidos graxos do óleo de cera de cana-de-açúcar.

Ácido Graxo		% e desvio padrão	Massa Molar
Láurico	C12:0	2,4 ± 0,1	200
Mirístico	C14:0	1,3 ± 0,0	228
Palmítico	C16:0	31,8 ± 1,6	256
Linolênico	C18:3	28,7 ± 1,3	276
Linoléico e Oléico	C18:2 e C18:1	21,2 ± 0,9	280 e 278
Esteárico	C18:0	3,6 ± 0,4	282
Araquídico	C20:1	1,4 ± 0,1	310
Araquidônico	C20:0	1,8 ± 0,1	312
Triacontanóico	C30:0	7,8 ± 0,5	452

A Figura 4 mostra-se um exemplo de cromatograma da composição em ácidos graxos obtido do óleo de cera de cana-de-açúcar.

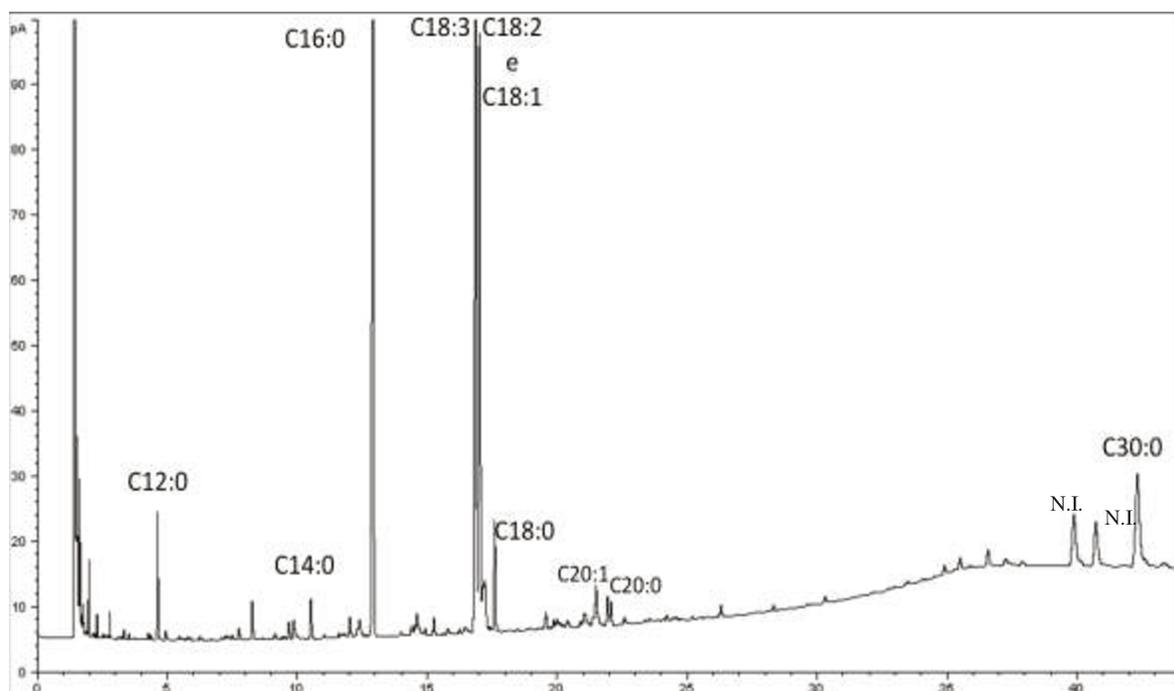


Figura 4 Cromatograma dos ácidos graxos presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar (N.I.: ácido graxo não identificado).

4.1.3. Composição das famílias de compostos do óleo de cera de cana-de-açúcar (HPSEC)

A Figura 5 apresenta-se o cromatograma das famílias de compostos presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar, obtidos por HPSEC.

O óleo de cera de cana-de-açúcar apresentou mais de 66% de monoacilgliceróis e ácidos graxos livres (Tabela 10).

O percentual individual de monoacilgliceróis pode ser obtido através da diferença do valor do percentual de monoacilgliceróis e de ácidos graxos livres encontrados pelo HPSEC (66,6%) e do teor de ácidos graxos livres (25,5%) determinado na análise físico-química, obtendo um valor igual a 41,1% para monoacilgliceróis.

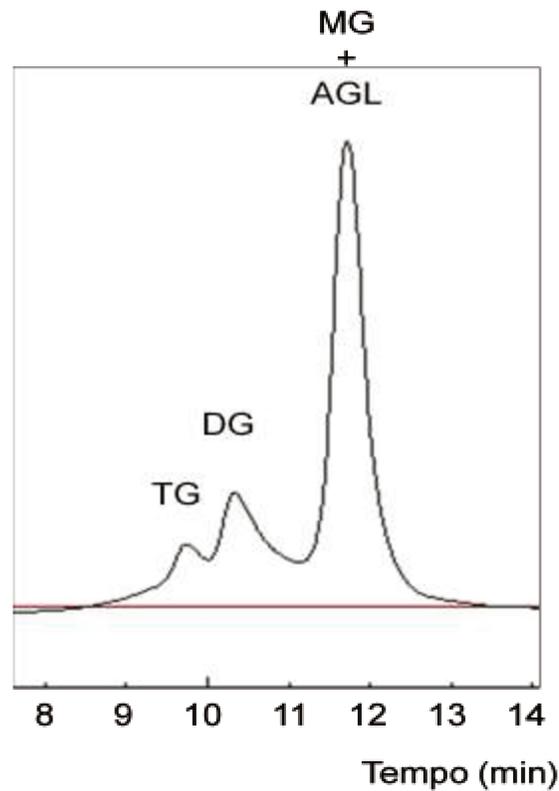


Figura 5 Composição das famílias dos componentes lipídicos presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar por Cromatografia por Exclusão de Tamanho(HPSEC).

Tabela10 Perfil das famílias dos componentes lipídicos presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar.

Classe Lipídica	%
Triacilgliceróis (TG)	9,8
Diacilgliceróis (DG)	23,6
Monoacilgliceróis e ácidos graxos livres (MG + AGL)	66,6

4.1.4 Composição dos fitoesteróis presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar

A Figura 6 apresenta o cromatograma do perfil de esteróis (livres e esterificados) presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar.

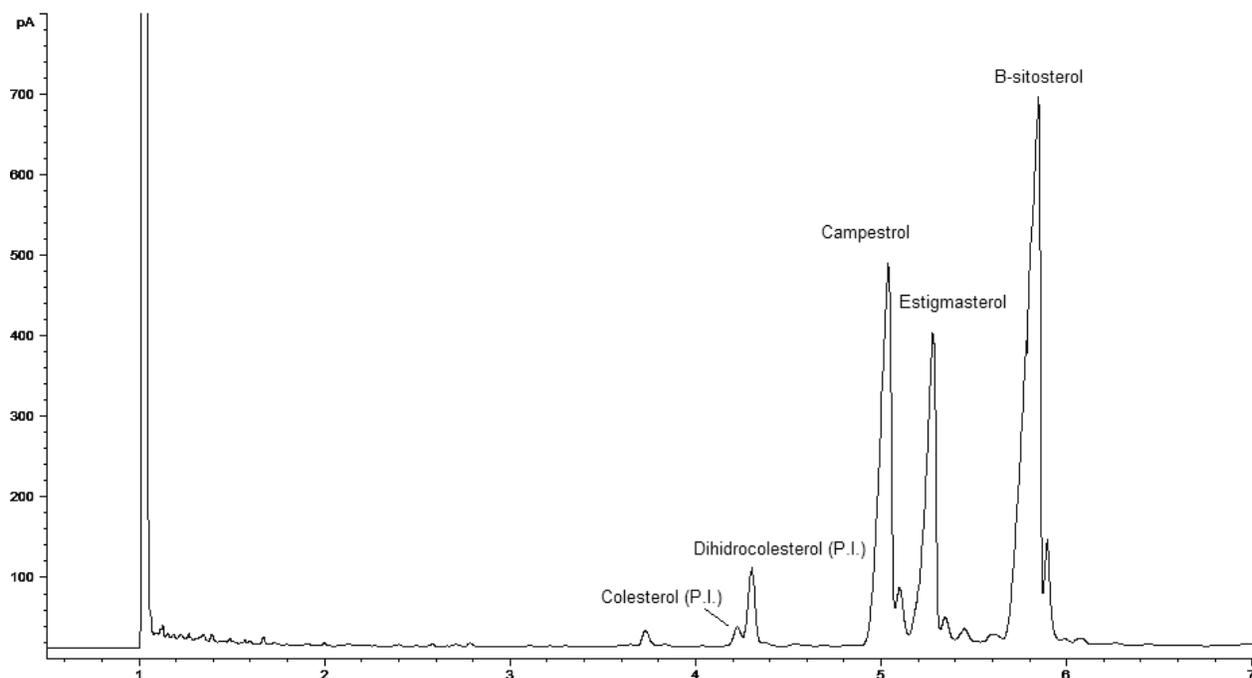


Figura 6 Cromatograma de esteróis no óleo de cera de cana de açúcar

O resultado da análise de composição dos esteróis (obtidos após isolamento da fração de esteróis por TLC preparativa) por cromatografia em fase gasosa é apresentado na Tabela 11. O óleo de cera de cana-de-açúcar apresentou $56,10 \text{ mg.g}^{-1}$ de esteróis totais, sendo o β -sitosterol (44,86%) componente presente em maior quantidade (Tabela 11).

Tabela11 Composição de fitoesteróis totais em óleo de cera de cana-de-açúcar.

Fitoesteróis	%
Campesterol	24,2
Stigmasterol	18,8
β -Sitosterol	44,9
Outros	12,1
Esteróis totais (mg.g ⁻¹)	56,1

De acordo com ICIDCA (1999), os esteróis do óleo de cana de açúcar são stigmaterol, β -sitosterol e campesterol (32, 42 e 45%, respectivamente) e a concentração de fitoesteróis no óleo de cana-de-açúcar varia entre 4 a 8%. No presente estudo, os teores de fitoesteróis do óleo de cera de cana-de-açúcar corresponderam a 5,61%.

Considerando as características físico-químicas e os dados de composição do óleo de cera de cana-de-açúcar, pode-se concluir que se trata de uma matéria prima com alto grau de insaturação, de alta acidez e com glicerídios parciais (DG, MG e AGL) em grande quantidade, todos eles resultantes de uma alteração hidrolítica muito severa.

4.1.5 Estudo da curva de cristalização e de fusão do óleo de cera de cana-de-açúcar

Na Figura 7 mostra-se a curva de fusão e cristalização do óleo de cera de cana-de-açúcar.

As transições de primeira ordem são geradas através dos eventos térmicos que apresentam variação de entalpia que podem ser endotérmica ou exotérmica e dão origem à formação dos picos (CANEVAROLO JR., 2004). No caso, a fusão lipídica é um evento térmico endotérmico e a cristalização, exotérmico.

Na Tabela 12 apresentam-se os parâmetros do comportamento térmico de cristalização do óleo de cera de cana-de-açúcar. Observou-se uma temperatura máxima de cristalização (T_{pico}) de $28,8^{\circ}\text{C}$ e entalpia de cristalização de $7,6 \text{ J.g}^{-1}$ para o primeiro pico e $35,6 \text{ J.g}^{-1}$ para o segundo pico. Com relação à temperatura de início de cristalização onset ($^{\circ}\text{C}$), esta foi de $31,2^{\circ}\text{C}$.

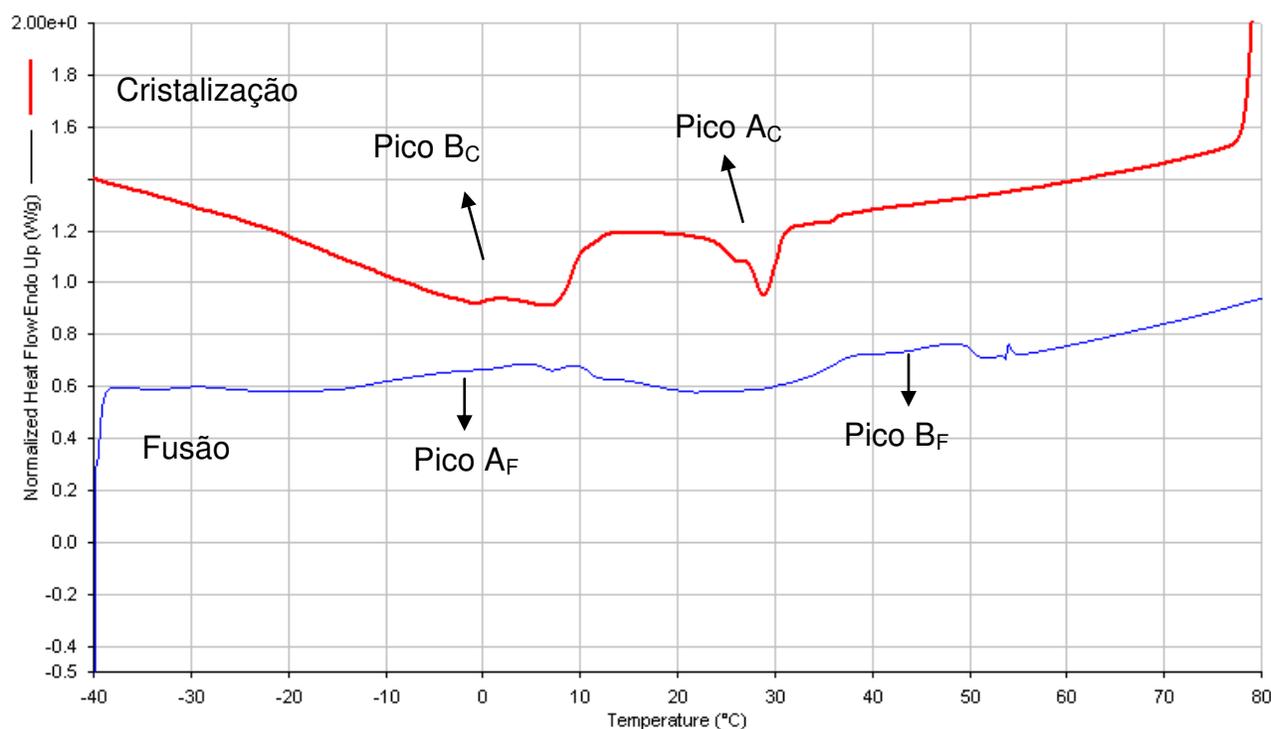


Figura 7 Curvas de fusão e cristalização do óleo de cera de cana-de-açúcar (Pico A_C e Pico B_C = picos de cristalização; Pico A_F e Pico B_F = picos de fusão).

Tabela 12. Parâmetros do comportamento térmico (DSC) de cristalização do óleo de cera de cana-de-açúcar.

Picos	Temperatura onset (°C)	Temperatura de pico (°C)	Temperatura endset (°C)	ΔH Entalpia de cristalização (J/g)
A	31,2	28,8	26,3	7,6
B	13,6	6,3	-21,8	35,6

A Tabela 13 contém os parâmetros do comportamento térmico de fusão do óleo de cera de cana-de-açúcar. A temperatura máxima de fusão (T_{pico}) foi de 38,4°C. Os resultados obtidos foram inferiores aos encontrados por Gandra (2006) em seu estudo com óleo de cera de cana-de-açúcar orgânica e mista, onde obteve-se temperaturas máximas de fusão de 23,1 e 25,1°C, respectivamente, do óleos para cada tipo de cana.

Tabela 13. Parâmetros do comportamento térmico (DSC) de fusão do óleo de cera de cana-de-açúcar.

Picos	Temperatura onset (°C)	Temperatura de pico (°C)	Temperatura endset (°C)	ΔH Entalpia de fusão (J/g)
A	-14,2	4,3	18,2	20,5
B	33,0	38,4	53,8	53,4

A entalpia de fusão encontrada no óleo de cera de cana-de-açúcar foi de 20,5 J.g⁻¹ para o primeiro pico e 53,4 J.g⁻¹ para o segundo. Com relação à temperatura de início de fusão – onset (°C) – esta foi de -14,2°C. Resultado foi diferente do valor encontrado por Gandra (2006) para o óleo de cera de cana-de-açúcar orgânica (-8,9°C). Provavelmente esta redução de temperatura onset tenha sido causada pelos maiores teores de ácidos graxos insaturados verificados no presente estudo.

4.2 Cinética de redução dos ácidos graxos do planejamento fatorial do óleo de cera de cana-de-açúcar após a reação de esterificação

As Figuras 8a e 8b mostram a cinética de redução dos ácidos graxos durante a reação de esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar, conforme os ensaios do planejamento fatorial realizado.

A cinética de redução dos ácidos graxos livres mostra que a reação é uma endotérmica típica, ou seja, com o aumento da temperatura proporciona uma maior taxa de redução.

Este resultado está de acordo com Trubiano e colaboradores (2007) que trabalharam com ácido oléico e etanol para produzir etilato utilizando uma enzima como catalizador. Também corrobora os resultados obtidos por Marchetti & Errazu (2008) utilizaram um sistema modelo de ácido oléico na presença de triacilgliceróis com ácido sulfúrico como catalisador e etanol como álcool de esterificação.

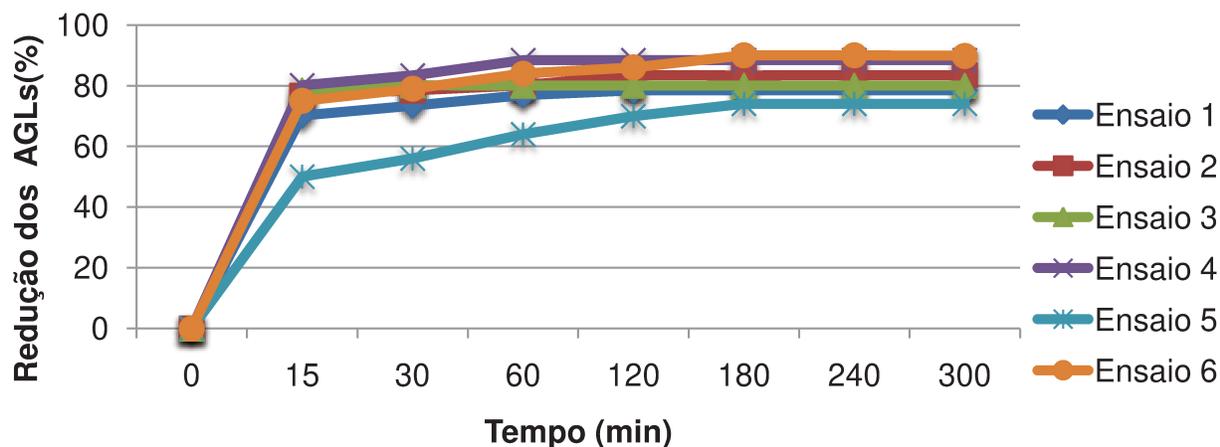


Figura 8a Cinética de redução dos ácidos graxos livres em diferentes tempos nos ensaios (1 a 6) do óleo de cera de cana-de-açúcar durante a reação de esterificação.

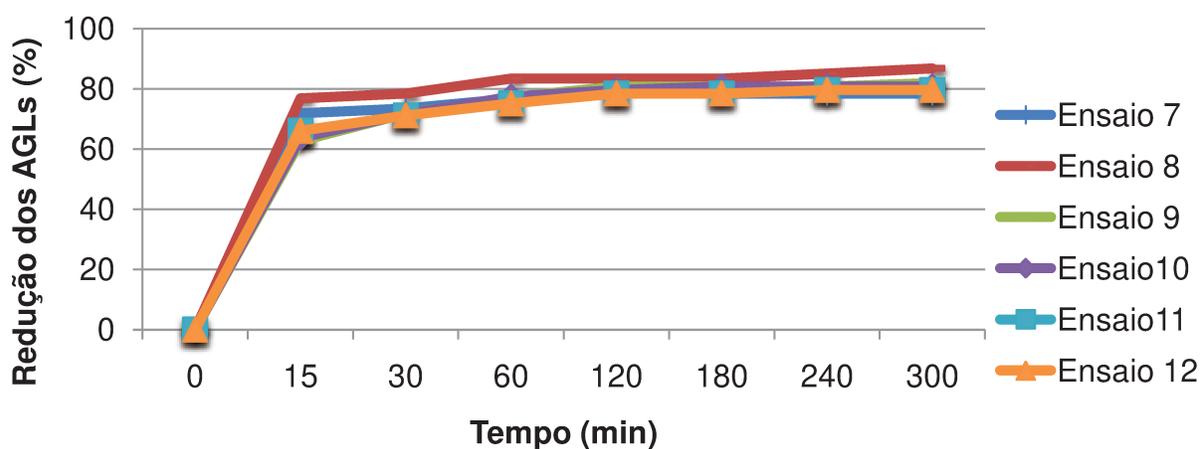


Figura 8b Cinética de redução dos ácidos graxos livres em diferentes tempos nos ensaios (7 a 12) do óleo de cera de cana-de-açúcar durante a reação de esterificação.

4.3 Matriz do delineamento e resposta de redução dos ácidos graxos livres obtida após 5 horas da reação de esterificação

Na Tabela 14 encontram-se os valores reais e a resposta de redução de ácidos graxos livres na reação de esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar. A redução dos AGL variou entre 74 e 90%.

Tabela 14 Valores reais e a resposta de redução de acidez no biodiesel do óleo de cera de cana-de-açúcar após reação de esterificação (5h).

Ensaio	Temperatura °C (X₁)	Óleo:Etanol (X₂)	Redução de AGL (%)
1	83	1:19,7	78
2	97	1:19,7	83
3	83	1:36,6	80
4	97	1:36,6	88
5	80	1:28,1	74
6	100	1:28,1	90
7	90	1:16,3	78
8	90	1:40	87
9	90	1:28,1	82
10	90	1:28,1	81
11	90	1:28,1	80
12	90	1:28,1	80

4.3.1 Modelo matemático para a redução dos ácidos graxos livres na esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar.

Através dos resultados obtidos da Tabela 14, foi possível determinar os coeficientes da regressão para a redução de ácidos graxos na esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar. Estes são apresentados na Tabela 15 e correspondem a um tempo de reação constante de 5 horas.

Para um nível de significância de 95%, foi observado como estatisticamente não significativas os termos quadráticos das variáveis temperatura e razão molar e suas interações lineares. Entretanto, se estes termos forem incorporados aos resíduos, o coeficiente de correlação de $R^2=0,88$ passa a $R^2= 0,92$, portanto para estas resposta será estudado o modelo completo. O modelo codificado para a redução dos ácidos graxos livres, mantendo todos os termos na faixa estudada é apresentado a seguir:

$$\text{Redução dos ácidos graxos (\%)} = 80,8 + 4,5 * \text{Temperatura} + 0,73 * \text{Temperatura}^2 + 2,5 * \text{Razão molar} + 0,8 * \text{Razão molar}^2 + 0,8 * \text{Temperatura} * \text{Razão molar}$$

Tabela 15 Coeficientes de regressão para a redução de ácidos graxos livres na esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar.

Fator	Coef. de Regressão	Erro Padrão	t(7)	P	Lim. Conf. 95%	Lim. Conf. 95%
Média	80.75	0.88	91.71	0.0000	78.60	82.90
X ₁ (L)	4.46	0.62	7.15	0.0004	2.93	5.98
X ₁ (Q)	0.63	0.70	0.90	0.4047	-1.08	2.34
X ₂ (L)	2.47	0.62	3.96	0.0075	0.94	3.99
X ₂ (Q)	0.88	0.70	1.26	0.2558	-0.83	2.59
X ₁ X ₂ (L)	0.75	0.88	0.85	0.4270	-1.40	2.90

Valores em negrito= estatisticamente significativo.

Na tabela 16 é apresentado o calculo da Análise de Variância (ANOVA) para o modelo de redução de ácidos graxos na esterificação, contendo todos os termos.

Como o F_{calc} (Tabela 16) para a regressão (167,80) é altamente significativo, com a porcentagem de variação (R^2) explicada pelo modelo foi excelente, cerca de 92%, pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

Tabela 16 ANOVA para a resposta da redução de AGL em 5 horas de reação na esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	*F _{tab}
Regressão	215.64	5	43.13	167.80	4.39
Resíduos	18.61	6	3.10		
Falta de ajuste	15.86	3	5.29	5.77	9.28
Erro puro	2.75	3	0.92		
Total	234.25	11			

*F_{tab} 5% : obtido pela tabela de pontos de porcentagem de distribuição (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

A relação entre os valores preditos pelo modelo e os valores observados experimentalmente é apresentado na Figura 9.

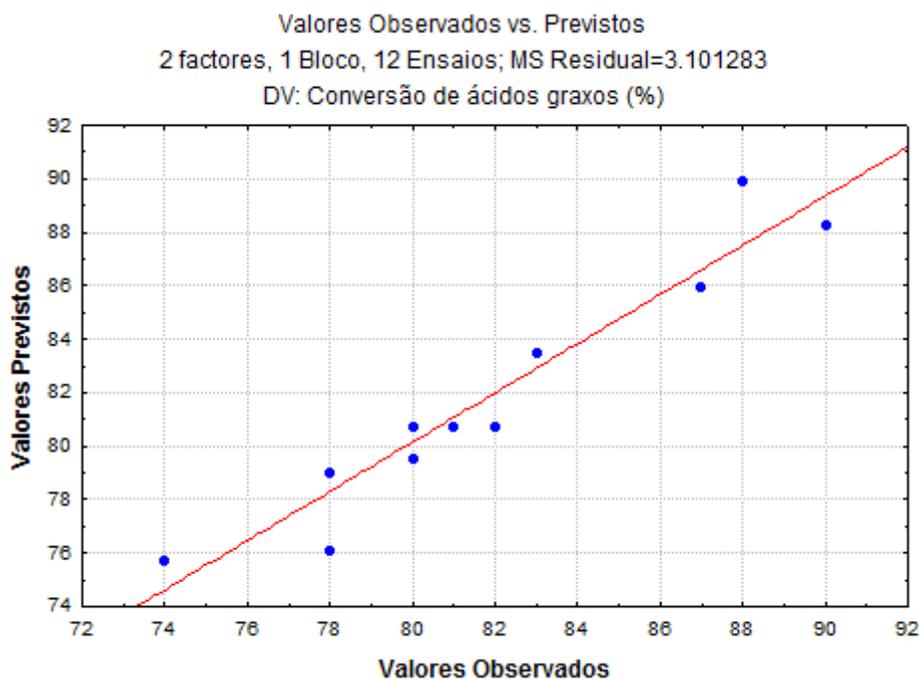


Figura 9 Valores observados versus previstos para redução dos ácidos graxos na esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar.

Os desvios relativos entre os valores preditos pelo modelo e os valores observados experimentalmente são apresentados na Figura 10.

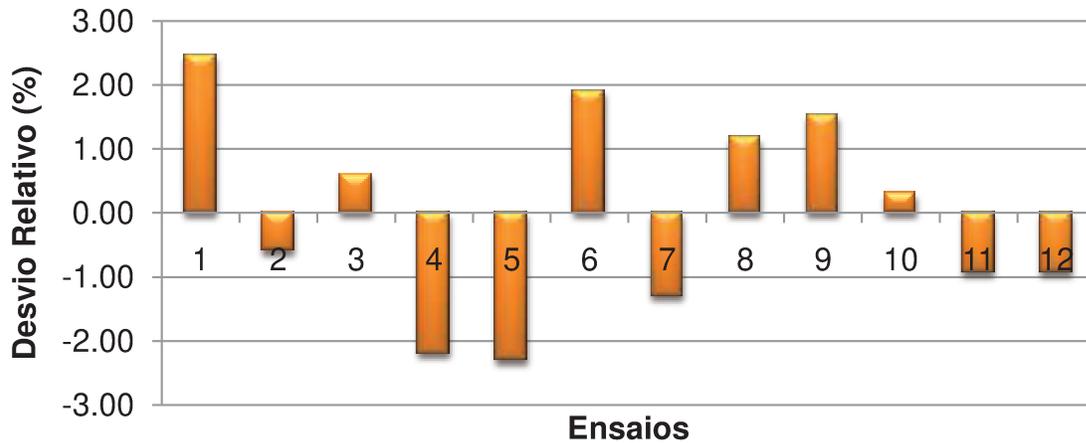


Figura 10 Desvio Relativo (%) entre os valores observados e previstos pelo modelo para redução dos ácidos graxos na esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar.

O Desvio Relativo é obtido pela seguinte equação:

$$\text{Desvio Relativo (\%)} = \left(\frac{\text{Valor}_{\text{observado}} - \text{Valor}_{\text{previsto}}}{\text{Valor}_{\text{observado}}} \right) \times 100$$

Os desvios apresentados entre os valores previstos pelo modelo e os observados na Figura 10 estiveram abaixo de 5% com média foi de 1,35%. Este percentual justifica a previsibilidade do modelo obtido.

A Figura 11 mostra a superfície de resposta e a curva de contorno obtidas para a variável dependente redução de ácidos graxos (%). Observa-se que tanto o aumento da temperatura (X_1) quanto da razão molar óleo:etanol (X_2) causaram um aumento na redução de AGL, dentro da faixa estudada, com um efeito mais pronunciado no aumento da temperatura.

Não foi possível observar uma inflexão na curva de resposta (Figura 11), portanto as maiores conversões dos ácidos graxos são obtidos em temperatura acima de 100°C e razão molar de óleo:etanol acima de 40.

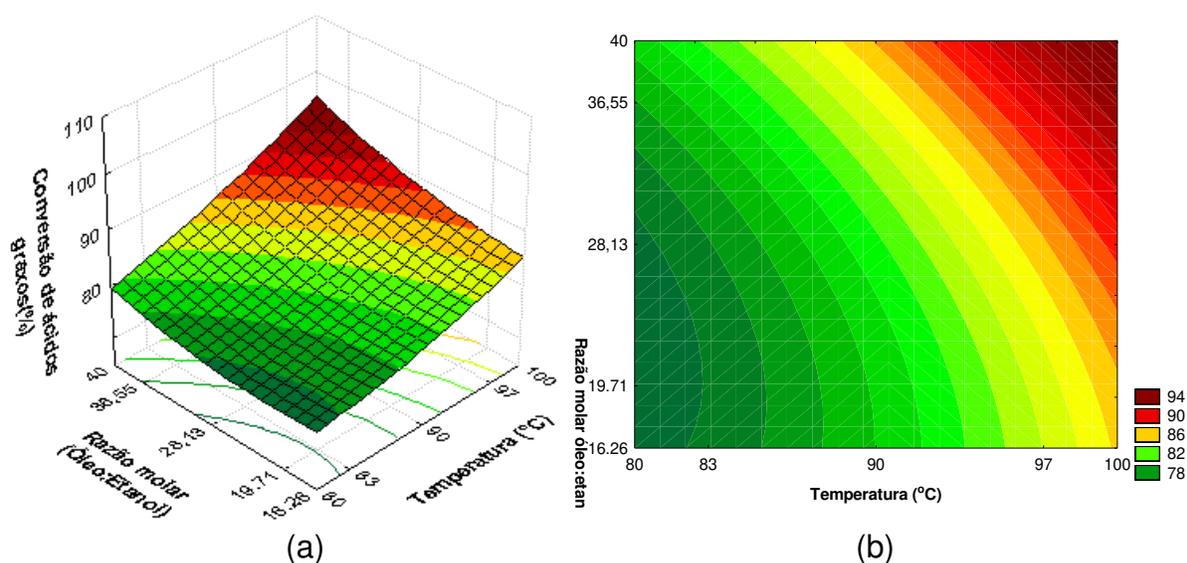


Figura 11 Curva de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a redução dos ácidos graxos.

O resultado do planejamento mostra apenas a redução dos ácidos graxos livres, os quais equivalem apenas a 25% da amostra, não equivale à conversão total da amostra. Necessita-se, portanto, da determinação da conversão da matéria saponificável em ésteres etílicos para avaliar a eficiência da reação de esterificação do óleo de cera de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico como catalisador e só assim realizar o planejamento experimental da segunda resposta (formação de ésteres etílicos).

4.4 Determinação do teor de ésteres etílicos

4.4.1 Através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN- ^1H) do óleo de cera de cana-de-açúcar após reação de esterificação.

A Figura 12 mostra o espectro integrado de RMN de ^1H do óleo de cera de cana-de-açúcar após esterificação.

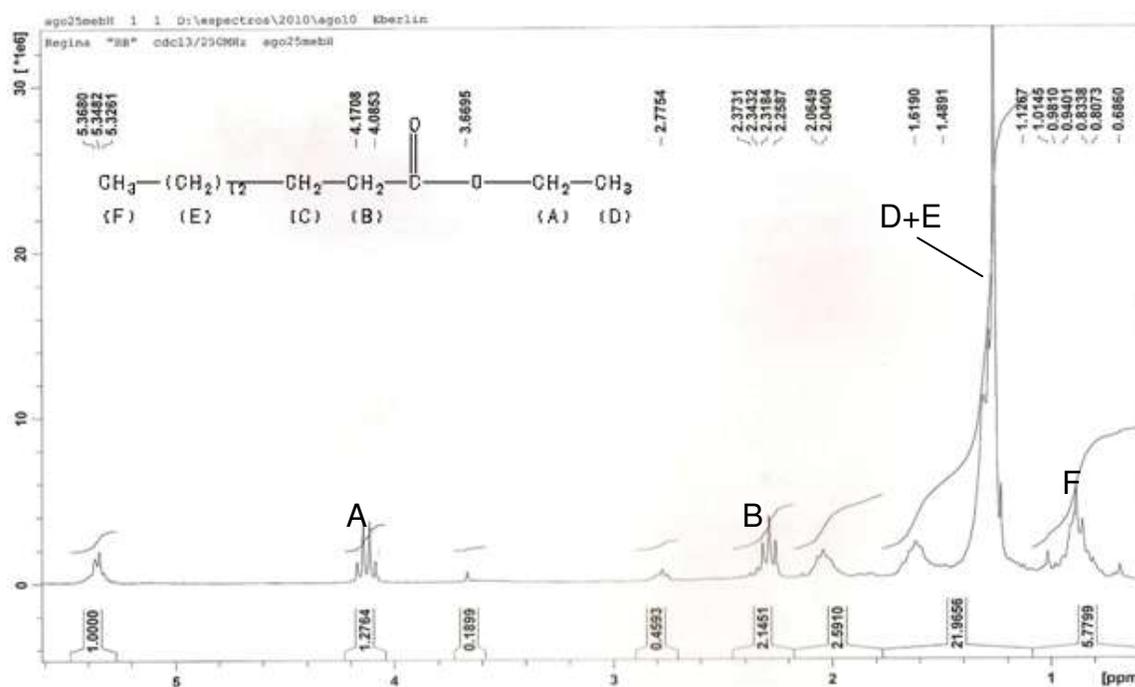


Figura 12 Espectro de RMN-¹H do óleo de cera de cana-de-açúcar após reação de estereificação.

A técnica de RMN é amplamente usada para verificar a conversão de triacilgliceróis em ésteres, porém para uma matéria-prima complexa como o óleo de cera de cana-de-açúcar que possui outros componentes lipídicos, não se apresentou como uma boa técnica de verificação da conversão, pois apareceram muitas outras inúmeras espécies não identificadas. No espectro apresentado também verificou-se que muitas espécies não atingiram a linha base, causando, assim, uma sobreposição das mesmas.

A metodologia de RMN-¹H não mostrou-se eficiente para a determinação da conversão em uma amostra complexa como o óleo de cera de cana-de-açúcar.

4.4.2 Determinação dos ésteres etílico totais do óleo de cana de açúcar após reação de esterificação comparado ao óleo de cera de cana de açúcar original.

A Figura 13 mostra a identificação dos ésteres etílicos do óleo de cera de cana-de-açúcar após esterificação comparado ao óleo de cana-de-açúcar original.

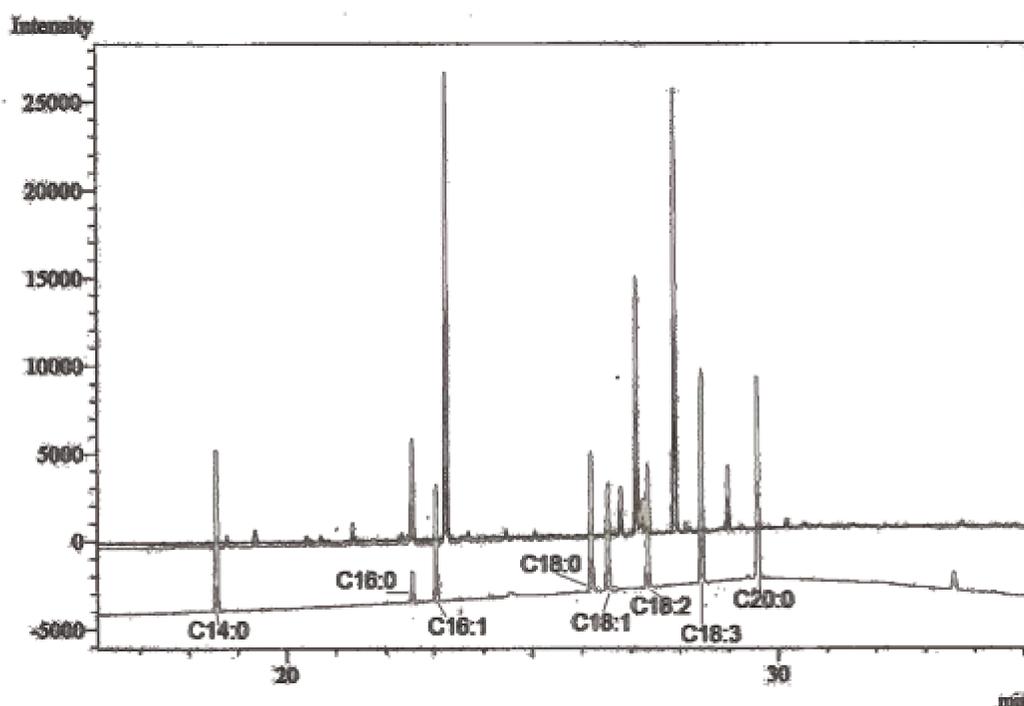


Figura 13 Cromatograma de esteres etílicos e ácidos graxos no óleo de cera de cana-de-açúcar após a reação de esterificação comparado com o óleo original. Linha verde: padrão de esteres metílicos; linha vermelha: óleo de cera de cana-de-açúcar original; linha preta: óleo de cera de cana-de-açúcar após reação de esterificação.

O cromatograma apresenta apenas os possíveis ácidos graxos livres presentes nas amostras (deslocados a direita dos respectivos esteres metílicos). Observa-se uma diminuição da intensidade dos picos dos ácidos graxos após a esterificação do óleo. Há uma correlação com os resultados obtidos no planejamento, mostrando que realmente houve uma redução dos ácidos graxos livres. Não foi verificado a presença de novos compostos após a reação, indicando que a metodologia pode ser inadequada para a amostra em questão, ou que não houve formação de esteres etílicos.

4.4.3 Através do método EN 14105 das famílias de compostos lipídicos do óleo de cera de cana-de-açúcar após esterificação comparando com óleo de cera de cana-de-açúcar original.

O cromatograma do óleo de cera de cana-de-açúcar após esterificação comparando com o óleo original, obtido pelo método EN 14105, é apresentado na Figura 14.

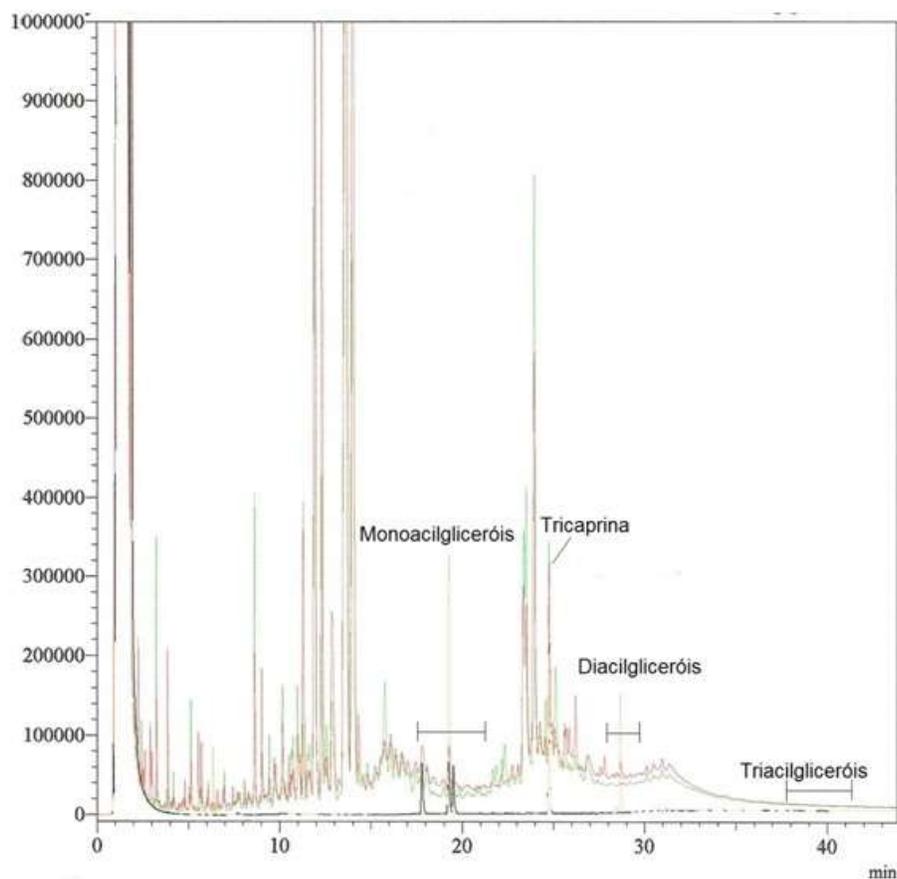


Figura 14 Cromatograma do óleo de cera de cana-de-açúcar após esterificação comparado com o óleo original, obtido pelo método EN 14105. Linha preta: padrão de monoacilgliceróis e triacilgliceróis; linha laranja: padrão de monoacilgliceróis, diacilgliceróis e tricaprina; linha vermelha: óleo de cera de cana-de-açúcar original; linha verde: óleo de cera de cana-de-açúcar após reação de esterificação.

No cromatograma se observa que nas faixas conhecidas dos padrões derivatizados praticamente não aparecem espécies. Isto mostra que a metodologia

usada não é adequada para uma amostra complexa como o óleo de cera de cana-de-açúcar.

4.4.4. Espectroscopia na região do infravermelho do óleo de cera de cana-de-açúcar original e após a reação de esterificação.

O espectro de infravermelho apresentado na Figura 15 mostra uma região de absorção de 3409 cm^{-1} que é provavelmente a região do δ -OH correspondente do glicerol com ligação de hidrogênio intermolecular, onde as bandas aparecem em frequências entre $3.550\text{-}3.200\text{ cm}^{-1}$. As bandas que aparecem em 2926 e 2854 cm^{-1} são características de absorção do C-C sp^3 e -CH_2 , respectivamente, oriundas de carboxilas. As regiões de absorção de 1738 e 1715 cm^{-1} são referente ao estiramento C=O da carbonila dos ésteres com o glicerol e a deformação axial de C=O de carboxilato dímero (SILVERSTEIN et al., 1979).

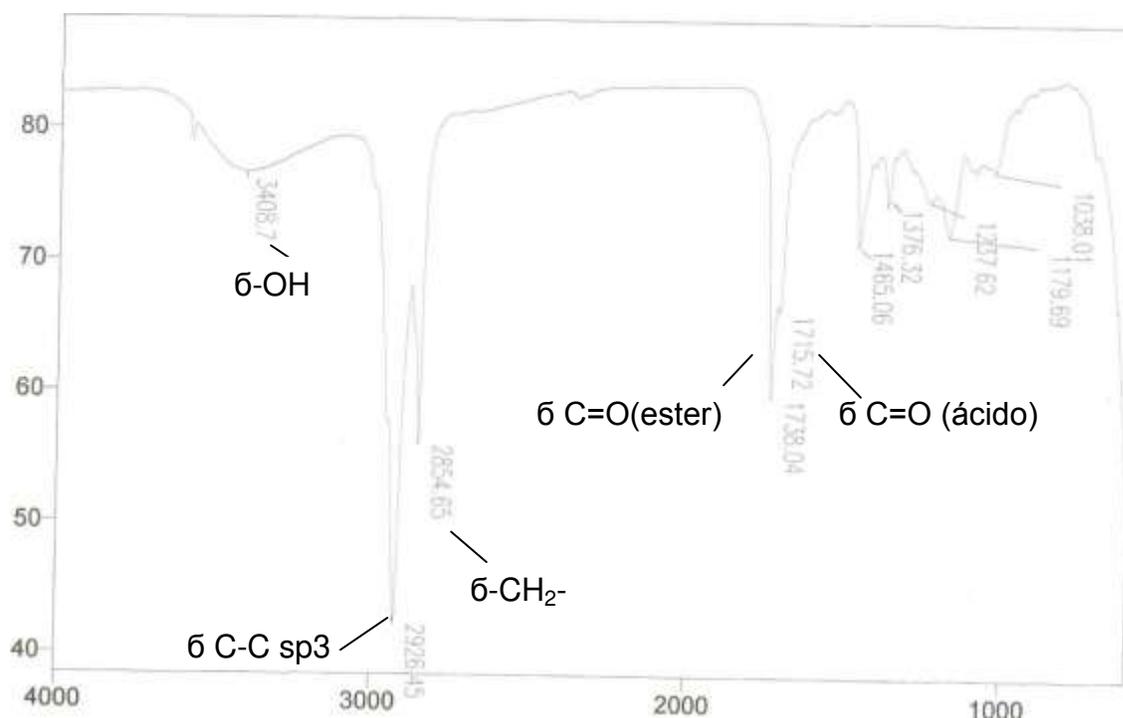


Figura 15 Espectro de infravermelho do óleo de cera de cana-de-açúcar

Comparando as Figuras 15 e 16, verifica-se que a banda de ácidos graxos da amostra de óleo de cera de cana-de-açúcar após reação de esterificação é inexistente mais, mostrando que durante a reação realmente houve uma diminuição da acidez constatada em análises anteriores. Muito embora a técnica de infravermelho indique a redução da acidez, devido a limitações da própria técnica esta não aporta maiores informações sobre a eficiência de reação ou o teor de ésteres etílicos formados.

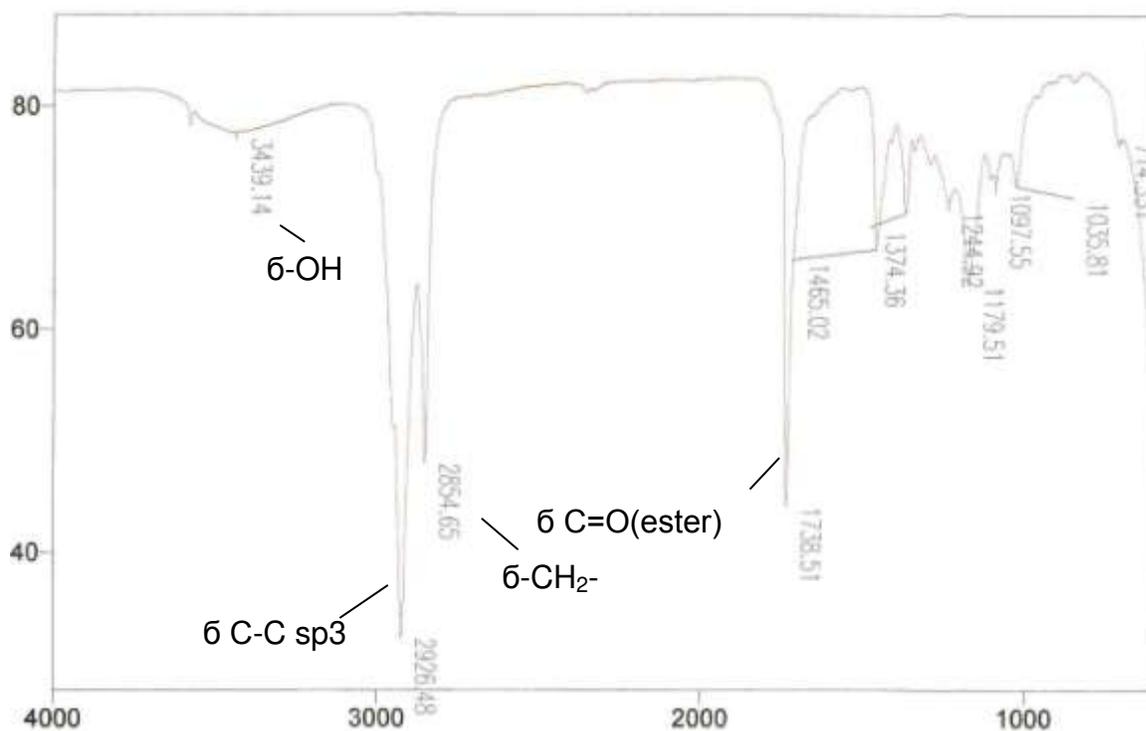


Figura 16 Espectro de infravermelho do óleo de cera de cana-de-açúcar após reação de esterificação.

Assim como as análises anteriores, não se encontrou um método adequado para avaliar o real rendimento da conversão em ésteres etílicos.

Até a conclusão desta pesquisa (Dezembro de 2010), não foram encontrados trabalhos semelhantes a este na literatura, sobre a obtenção e caracterização de

ésteres etílicos a partir do óleo da cera de cana-de-açúcar ou em amostras de alta acidez.

A maioria dos trabalhos nesta área utilizam modelos da esterificação etílica por catalise ácida em óleos com alto teor de triacilgliceróis e apenas acidificados com ácidos graxos livres (MARCHETTI & ERRAZU, 2008).

Muito embora tenha sido observado que durante a reação de esterificação houve uma redução significativa de acidez, não foi comprovada, mediante as técnicas utilizadas neste trabalho, a formação de ésteres etílicos nas condições de reação utilizadas.

4.5 Investigação sobre os componentes lipídicos existentes no óleo de cera de cana-de-açúcar

4.5.1 Espectrometria de massa do óleo de cera de cana-de-açúcar utilizando ESI-MS (Q-TOF) no modo negativo e positivo

Na Figura 17 mostra-se o espectro de massas obtido no modo negativo das espécies de ácidos graxos livres presentes na amostra e a identificação das principais espécies.

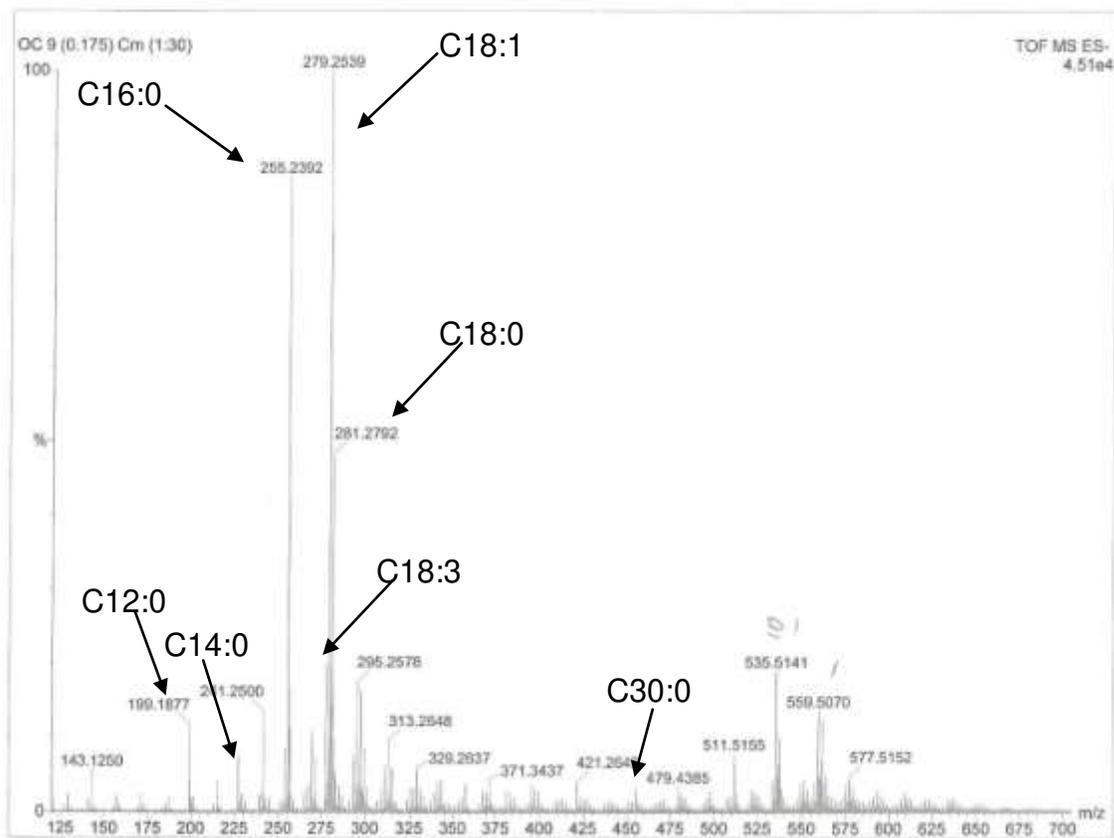


Figura 17 Espectro ESI MS (Q-TOF) no modo negativo de óleo de cera de cana-de-açúcar com os principais ácidos graxos identificados pelas massas moleculares.

A Tabela 17 mostra os principais ácidos graxos com suas massas molares presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar.

Estes resultados correspondem com a composição em ácidos graxos determinado por CG (Tabela 9).

Tabela 17 Ácidos graxos principais presentes no óleo da cana-de-açúcar e suas respectivas massas molares

Ácido Graxo	Massa Molar do ácido	$m/z [M - H]^-$
Láurico	C12:0	200
Mirístico	C14:0	228
Palmítico	C16:0	256
Esteárico	C18:0	284
Oléico	C18:1	282
Linolênico	C18:3	278
Triacontanóico	C30:0	452

A Figura 18 mostra o espectro de massas no modo positivo das várias espécies, como monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis, presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar.

Foi identificado o monoglicerídio de palmitina (MM: 330) com $m/z [M - H]^+$ de 331,99. Muitos outros íons de espécies com massas diferentes das esperadas (monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis) foram visualizados pelo espectro no modo positivo presença de íons, porém não foi possível a identificação dos mesmos.

Massas pares são características de produtos que contêm compostos nitrogenados, oxigenados ou sulfurados (SIMAS, 2010). No caso do óleo de cera de cana-de-açúcar provavelmente trata-se de compostos oxigenados, produtos de oxidação dos ácidos graxos insaturados e que são formados durante o tratamento de clarificação com peróxido de hidrogênio, ao qual é submetido o material na etapa de produção, assim como oxidação durante o armazenamento a temperatura ambiente.

Simas (2010) observou em óleo de soja, após oxidação acelerada, o aparecimento de triacilgliceróis oxidados (hidroperóxidos).

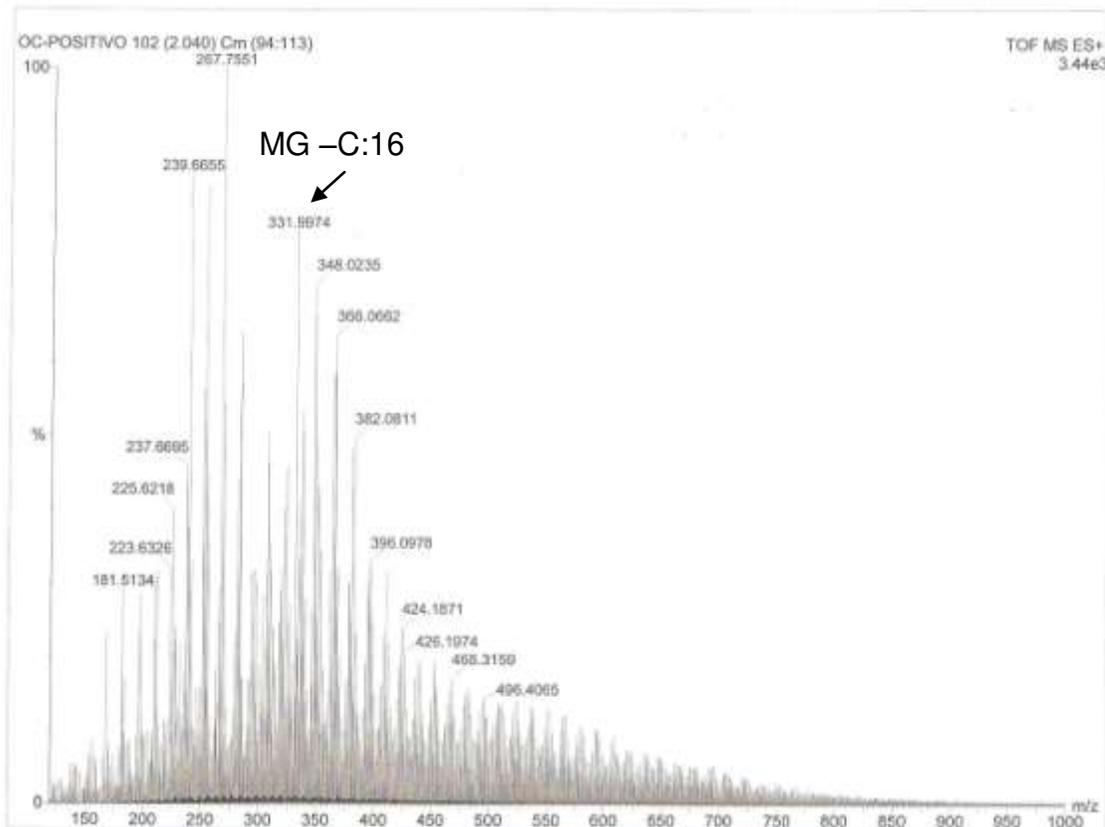


Figura 18 Espectro obtido por ESI MS (Q-TOF) em modo positivo de óleo de cera de cana-de-açúcar com a monoacilpalmitina identificada pelo peso molecular.

4.5.2 Análise elementar de Carbono, Nitrogênio e Hidrogênio do óleo de cera de cana-de-açúcar

A amostra de óleo de cera de cana-de-açúcar apresentou em média 51,5% de carbono, 8,4% de hidrogênio e 0,1% de nitrogênio. Por diferença, aproximadamente 40% dos elementos deve corresponder ao oxigênio.

4.5.3 Qualidade oxidativa no óleo de cera de cana-de-açúcar

4.5.3.1 Índice de peróxido do óleo de cera de cana-de-açúcar

Durante esta análise, houve grande dificuldade na determinação do ponto de viragem devido o óleo ser muito escuro.

O índice de peróxido do óleo de cera de cana-de-açúcar foi de $8,7 \text{ meq.Kg}^{-1} (\pm 0,12)$. Apesar do resultado de peróxido ser considerado baixo, não indica que o óleo tenha uma alta qualidade oxidativa. Esta análise mede apenas os compostos primários de oxidação remanescentes. Este índice apresenta uma redução devido a decomposição dos peróxidos em compostos secundários, que devem ser determinados por outros índices.

4.5.3.2 Estabilidade oxidativa do óleo de cera de cana-de-açúcar

O óleo de cera de cana-de-açúcar sofreu um tratamento com peróxido de hidrogênio para clarificar a cera bruta e os prováveis antioxidantes que estavam presentes neste óleo, sofreram oxidação.

O valor da estabilidade oxidativa (OSI) da amostra de óleo de cera de cana-de-açúcar foi de 0,26 h, à 110 °C, indicando uma estabilidade muito reduzida.

4.5.3.3 Extração e identificação dos componentes polares do óleo de cera de cana-de-açúcar

A Figura 10 mostra o cromatograma da fração polar separada em fase sólida e analisada por HPSEC.

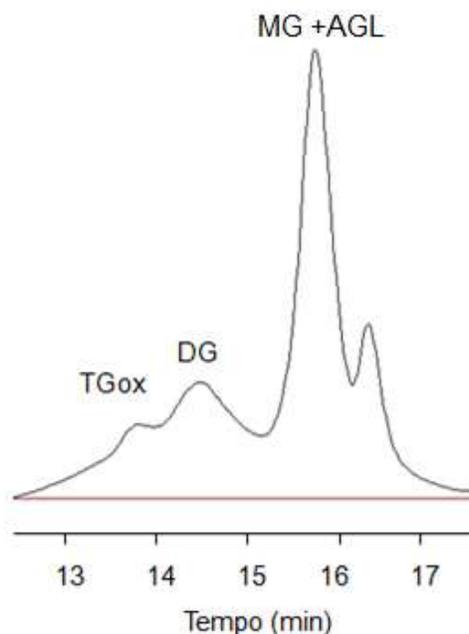


Figura 19 Cromatograma dos compostos polares presentes no óleo de cera de cana-de-açúcar por Cromatografia de Alta Eficiência (HPSEC) da fração polar obtida por SPE

A fração polar do óleo de cana de açúcar correspondeu a 21,23% ($\pm 0,29$) de toda a matéria-prima.

Esta fração polar apresentou 12,33% de monômeros de triacilgliceróis oxidados, 23,50% de diacilgliceróis e 64,17% de monoacilgliceróis e ácidos graxos livres e polar de insaponificável.

Os resultados são proporcionais aos resultados do HPSEC da amostra inteira de óleo de cera de cana-de-açúcar e mostram que este óleo contém compostos secundários da oxidação.

4.5.3.4 Identificação das espécies de oxidação por espectrometria de massas por ESI (+) FT-ICR-MS

A Figura 20 mostra o espectro de massas obtido por ESI (+) FT-ICR-MS para o óleo de cera de cana-de-açúcar.

A espectrometria de massas de altíssima precisão e resolução no modo positivo, fornece a fórmula molecular dos compostos presentes na amostra de óleo, geralmente com erro menor que 1 ppm, embora erros de até 100 ppm sejam aceitáveis.

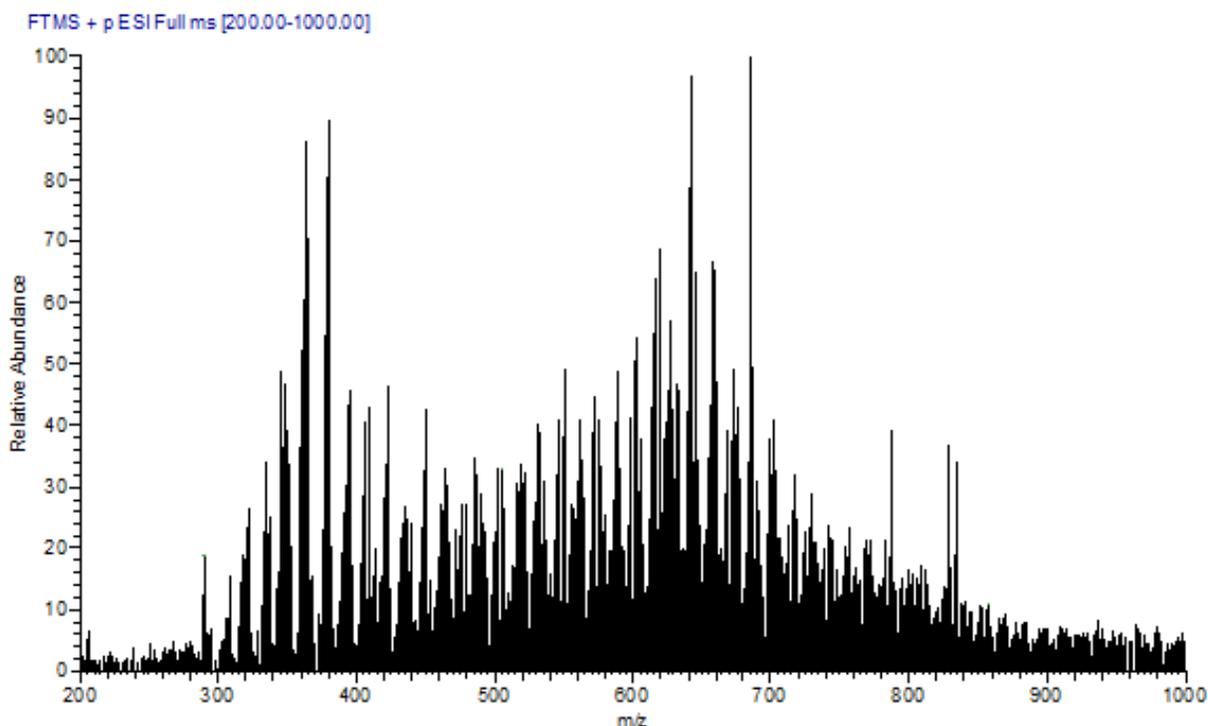


Figura 20 Espectro obtido por ESI FT-ICR-MS em modo positivo para o óleo de cera de cana-de-açúcar.

As Tabelas 18, 19, 20, 21 mostra a identificação das espécies de íons contendo monoacilgliceróis sodiados, monoacilgliceróis com hidroperóxidos sodiados, diacilgliceróis sodiados, diacilgliceróis com hidroperóxidos sodiados, respectivamente,

indicando realmente a presença de compostos de oxidação no óleo de cera de cana-de-açúcar.

Tabela 18 Identificação de monoacilgliceróis presentes no óleo da cana-de-açúcar com suas respectivas massas molares, massa molar medida pelo ESI (+) FT-ICR-MS e o erro em ppm dado pelo equipamento.

símbolo	Fórmula	[MG+Na]⁺	MM medida	erro ppm
C14:0	C ₁₇ H ₃₄ O ₄ Na	325	325,22954	80
C16:0	C ₁₉ H ₃₈ O ₄ Na	353	353,20103	90
C18:0	C ₂₁ H ₄₀ O ₄ Na	379	379,11333	88
C18:1	C ₂₁ H ₃₈ O ₄ Na	377	377,20445	90
C18:2	C ₂₁ H ₃₆ O ₄ Na	375	375,11165	77
C18:3	C ₂₁ H ₃₄ O ₄ Na	373	373,44167	43
C20:0	C ₂₃ H ₄₆ O ₄ Na	409	409,55445	50
C20:1	C ₂₃ H ₄₄ O ₄ Na	407	407,10224	33
C30:0	C ₃₃ H ₆₆ O ₄ Na	549	549,66789	50

Tabela 19 Identificação de monoacilgliceróis com hidroperóxidos presentes no óleo da cana-de-açúcar com suas respectivas massas molares, massa molar medida pelo ESI (+) FT-ICR-MS e o erro em ppm dado pelo equipamento.

símbolo	fórmula	[MG+OOH+Na]⁺	MM medida	erro ppm
C18:1	C ₂₁ H ₃₈ O ₆ Na	409	409,29234	88
C18:2	C ₂₁ H ₃₆ O ₆ Na	407	407,27671	89
C18:3	C ₂₁ H ₃₄ O ₆ Na	405	405,26106	89
C20:1	C ₂₃ H ₄₄ O ₆ Na	439	439,26653	83

Tabela 20 Identificação de diacilgliceróis presentes no óleo da cana-de-açúcar com suas respectivas massas molares, massa molar medida pelo ESI (+) FT-ICR-MS e o erro em ppm dado pelo equipamento.

símbolo	represent	fórmula	[DG Na]⁺	MM medida	erro ppm
C16+C18	OS	C ₃₇ H ₇₀ O ₅ Na	617	617,47507	59
C16+C18:1	PO	C ₃₇ H ₆₈ O ₅ Na	615	615,45937	49
C16+C18:2	PL	C ₃₇ H ₆₆ O ₅ Na	613	613,44379	55
C16+C18:3	PLn	C ₃₇ H ₆₄ O ₅ Na	611	611,42818	59
C18+C18	SS	C ₃₉ H ₇₂ O ₅ Na	643	643,49071	51
C18+C18:1	SO	C ₃₉ H ₇₀ O ₅ Na	641	641,47506	52
C18+C18:2	SL	C ₃₉ H ₆₈ O ₅ Na	639	639,45938	57
C18+C18:3	SLn	C ₃₉ H ₆₆ O ₅ Na	637	637,44374	60
C18:1+C18:1	OO	C ₃₉ H ₆₈ O ₅ Na	639	639,45938	57
C18:1+C18:2	LO	C ₃₉ H ₆₆ O ₅ Na	637	637,44374	60
C18:1+C18:3	OLn	C ₃₉ H ₆₄ O ₅ Na	635	635,48578	27
C18:2+C18:2	LL	C ₃₉ H ₆₄ O ₅ Na	635	635,48578	27
C18:2+C18:3	LLn	C ₃₉ H ₆₂ O ₅ Na	633	633,46995	30
C18:3+C18:3	LnLn	C ₃₉ H ₆₀ O ₅ Na	631	631,45433	33

Tabela 21 Identificação de diacilgliceróis com hidroperóxidos presentes no óleo da cana-de-açúcar com suas respectivas massas molares, massa molar medida pelo ESI (+) FT-ICR-MS e o erro em ppm dado pelo equipamento

símbolo	represent	Fórmula	[DG+OOH+Na]⁺	MM medida	erro ppm
C16+C18:1	PO	C ₃₇ H ₆₈ O ₇ Na	647	647,44917	56
C16+C18:2	PL	C ₃₇ H ₆₆ O ₇ Na	645	645,50636	55
C16+C18:3	PLn	C ₃₇ H ₆₄ O ₇ Na	643	643,49071	54
C18+C18:1	SO	C ₃₉ H ₇₀ O ₇ Na	673	673,46490	54
C18+C18:2	SL	C ₃₉ H ₆₈ O ₇ Na	671	671,44921	54
C18+C18:3	SLn	C ₃₉ H ₆₆ O ₇ Na	669	669,50640	53
C18:1+C18:1	OO	C ₃₉ H ₆₈ O ₇ Na	671	671,44921	54
C18:1+C18:2	LO	C ₃₉ H ₆₆ O ₇ Na	669	669,50640	53
C18:1+C18:3	OLn	C ₃₉ H ₆₄ O ₇ Na	667	667,49070	50
C18:2+C18:2	LL	C ₃₉ H ₆₄ O ₇ Na	667	667,49070	50
C18:2+C18:3	LLn	C ₃₉ H ₆₂ O ₇ Na	665	665,47515	58
C18:3+C18:3	LnLn	C ₃₉ H ₆₀ O ₇ Na	663	663,40781	23

Até o fim da pesquisa (dezembro de 2010), os outros íons não conseguiram identificação pela massa molecular.

Sendo esta uma matéria-prima bastante complexa e de difícil caracterização, são necessários de mais estudos adicionais e outras metodologias para avaliar e quantificar os outros componentes presentes na matéria-prima.

5 Conclusões

- O óleo de cera de cana-de-açúcar clarificada é uma mistura muito complexa e de baixa estabilidade oxidativa. É essencial realizar estudos de outros métodos para caracterizar os demais componentes presentes nesta matéria-prima.
- Os resultados obtidos neste trabalho indicam preliminarmente que o óleo de cera de cana-de-açúcar clarificada não é uma matéria-prima adequada para a produção de biodiesel,
- A determinação de ésteres etílicos totais em óleo de cera de cana por três métodos recomendados mostrou-se ineficiente, sendo necessária a revisão das técnicas para encontrar um método confiável para esta determinação neste tipo de amostra.

6 Referências Bibliográficas

ABDAL-AKHER, M. **Chem. Mikrobiolo. Tech. Lebesm.** v.5, n.42, 1977.

ADAMENAS, J. O negócio é fazer cera. **Química e Derivados.** p. 24-29, 1982.

ALBERICI, R. M.; SIMAS, R. C.; SANVIDO, G B.; ROMÃO, W.; LALLI, P. M.; BENASSI, M.; CUNHA, I B. S.; EBERLIN, M. N. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world”. *Anal Bioanal Chem* 398, p.265–294, 2010.

ALLEN, J. C.; HAMILTON, R.J. **Rancity in foods.** Applied Science Publishers LTD: England. 1983, 199p

ALVAREZ, A.; TÍO, M.V., GARCÍA, A. Cera de cachaza. Desarrollo actual y perspectivas. In: **Subproductos y derivados de la agroindustria azucarera.** México, Geplacea, 1988. p. 315-327.

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – Disponível em: <http://www.anp.gov.br/biocombustiveis/biodiesel.asp>. Acesso em: Janeiro de 2011.

AOCS – AMERICAN OIL CHEMISTS’ SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices.** 5th. ed. Champaign: AOCS Press. 2004.

ASTM- American Society for Testing and Materials . ASTM 5291, Standard Test Methods for Instrumental Determination of Carbon, Hydrogen, and Nitrogen in Petroleum Products and Lubricants, 2001.

ASTM- American Society for Testing and Materials. ASTM 6584. Test method for determination of free and total glycerine in b 100 biodiesel methyl esters by gas chromatography. 2001

- AZZAM, A. M. Separation and analysis of wax from Egyptian sugar cane filter press cake. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.86, n.6, p.247-250, 1984.
- AZZAM, A. M. Further investigations on cane wax refining and bleaching. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.88, n.5, p.191-194, 1986.
- BARRERA-ARELLANO, D.; BOTEGA. D. C. Z. ; TEXEIRA G.M.; DITTMER R. M.; BALBO J. M.; GHIRALDINI J. A. **Processo de clarificação de cera de cana-de-açúcar**. Patente Brasileira PI0702141-0, 2007. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- BECKER, D. F. S. **Quantificação de fitosteróis em azeite de oliva (Olea europaea) por cromatografia em fase gasosa**. 2004.128p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- BEEHARRY, R.P. Extend sugarcane biomass utilization for exportable electricity production in Mauritius. **Biomass and Bioenergy**, v. 11, n.6, p. 441-449,1996.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. 2. ed. Berlin: Springer, cap. 3, p. 152-235, 1999.
- BERTHOLD, R. **Beeswax crafting**. Wicwass Press, Cheshire, Conn., U.S.A., 1993, 128p.
- BIODIESELBR – Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/r1-combustivel-5-biodiesel-estreada-janeiro-04-12-10.htm>. Acesso em: outubro de 2010.
- BOBBIO, P. A; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2ed. São Paulo: Livraria Varela, 1992. 151p.

- BOZAN, B.; TEMELLI, F. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. **Bioresource Technology**, 99, pp. 6354-6359, 2008.
- CANEVAROLO, JR., S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. Artliber Editora Ltda. São Paulo, Brasil, 1a ed. p.229-235, 2004.
- CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**. 44(6), p.1429–1436, 2001.
- CATHARINO, R. R.; HADAD, R.; CABRINI, L.G.; CUNHA I. B. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N. Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: classification, adulteration and aging. **Analytical Chemistry**. 77, p.7429–7433, 2005.
- CHOMSIRI, W. **Study of preparation of fatty acid methyl esters from vegetable oils by tranesterification reaction using gas chromatography**. 2009. Tese (Mestre em Ciencia aplicada em Química Analítica e Inorgânica) – Faculty of graduate studies Mahidol University, Mahidol, Tailândia, 2009.
- COSTA, M.R.J. **Ultrafiltração do caldo filtrado de lodo decantado da usina açucareira**. 2002. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- CRAPISTE, G. H.; BREVEDAN, M. I. V.; CARELLI, A. A. Oxidation of sunflower oil during storage . **Journal of the American Oil Chemists' Society**.v.77, 14-37, 1999.
- DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. (Ed.) **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, p.7-84, 1987.

- DEFFENSE, E. Fractionation of palm oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.62, n.2, p.376-385, 1985.
- DELGADO, A.V., DE ARMAS CASANOVA, C. Sugar processing and by-products of the sugar industry **Agricultural Support Systems Div.** FAO Agricultural Services Bulletin (FAO), no. 144 / FAO, Rome (Italy)., 2001, 132 p.
- DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS - **Anexo V: Determinación de la composición y del contenido de esteroides mediante cromatografía de gases con columna capilar.** (L248/15). 1991.
- ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; RODRÍGUEZ, J. J.; TEJEDOR, A. Biodiesel Fuels from Vegetable Oils: Transesterification of *Cynara cardunculus* L. Oils with Ethanol. **Energy Fuels**, 16 (2), p 443-450, 2002.
- FIGUEIREDO, P.; LANDELL, M.G.A.; CAMPANA, M.P. **Cana de açúcar** (compact disc) 6. ed. Campinas: IAC, 1995. (IAC. Boletim 200)
- FNP CONSULTORIA & AGRO-INFORMATIVO. **AGRIANUAL 2003:** Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo, 2003. 496p.
- FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R. O.; PRYDE, E. H. Transesterification kinetics of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.63, p.1375-1379, 1986.
- FRUTUOSO, E. S. **Extração, refinação e estudo das propriedades termodinâmicas de cera de cana de açúcar.** 1989. Tese (Mestre em Ciências) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- GANDRA, K. M. **Obtenção e caracterização de cera de cana de açúcar e suas frações.** 2006. 148p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

GARCÍA, A.; GARCÍA, M. A.; RIBAS, M.; BROWN, A. Recuperación de cera de cutícula de caña de azúcar mediante separación mecánica y extracción con solventes. **Grasas y Aceites**, v.54, n.2, p.169-174, 2003.

GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleo vegetais**. 2006. 120p. Dissertação (Mestre em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

GERPEN, V.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. Biodiesel production technology. **National Renewable Energy Laboratory**, Golden, Colorado, 2004.

GOODACRE, R.; VAIDYANATHAN, S.; BIANCHI, G. & KELL, DB. Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry for the characterisation of olive oils. **Analyst** 127, p.1457–1462, 2002.

HARTMAN L.; LAGO R. C. A Rapid preparation of fatty methyl acid esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, 22, p.475-6 ,1973.

HAM, B.M. **Even elétron mass spectrometry with biomolecule applications**. Hoboken: Jonh Wiley & Sons. 2008

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: Principles and applications**, 3rd ed. Wiley, London, 2007.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Disponível na internet:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201010comentarios.pdf>. Acesso em: Outubro de 2010.

ICIDCA (Instituto Cubano de Pesquisa dos Derivados de Cana de Açúcar). **Manual dos derivados de cana de açúcar**. Brasília: ABIPTI, p.399-404. 1999.

IUPAC Standard Method 2.508: Determination of polymerized triglycerides in oils and fats by high performance liquid chromatography. In: **Standard Methods for the**

- Analysis of Oils, Fats and Derivatives**, 7th ed. (ed. International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell, Oxford) 1992.
- KNOTHE, G.; GESPEN, J. V.; KRAHL, J.. **Manual de biodiesel**. São Paulo: Edgar Blucher, 2006.
- KRELL, R. **Value-added products from beekeeping**. FAO Agricultural Services Bulletin, n. 124, 1996. Disponível em:<<http://fao.org/docrep/w0076E/w0076E00.htm>>. Acesso em: 03 dez 2010.
- LEME, Jr., BORGES, J.M. **Açúcar de cana**. Viçosa, Imprensa Universitária, 1965. 328p.
- LIMA,P.C.R. **O biodiesel e a inclusão Social**. Estudo Técnico da. Consultoria Legislativa da Câmara dos Deputados Federais, Brasília, 2004. 33p.
- LUTZ, H.; ESUOSO, K.; KUTUBUDDIN, M.; BAYER, E. Low temperature conversion of Sugar-Cane by-products. **Biomass and Bioenergy**, v.15, n.2, p.155-162, 1998.
- MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review¹. **Bioresource Technology**, 70 (1), p.1-15, 1999.
- MARCHETTI, J. M.; MIGUEL,V.U.; ERRAZU, A.F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 11(6), 2007. p.1300-1311.
- MARCHETTI, J. M.; ERRAZU, A.F. Esterification of free fatty acids using sulfuric acid as catalyst in the presence of triglycerides. **Biomass and Bioenergy**, 32(9), 2008. p.892-895.
- MÁRQUEZ-RUIZ, G.; JORGE, N.; MARTÍN-POLVILLO, M.; DOBARGANES, M.C. Rapid, quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monoestearine as internal standard. **Journal of Chromatography A**. 749, p.55-60, 1996.

- MATSUOKA, S.; LAVORENT, N.A.; MENEZES, L.L.; SAILIBE, A.C.; GHELLER, A.C.A.; ARIZONO, H. Novas variedades de cana de açúcar para a região oeste do estado de São Paulo. IN: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 7., Londrina, 1999. **Anais**. Piracicaba: STAB, 1999. p.34-39.
- MEHER, L. C.; VIDYA, S.D.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. **Renew Sust Energ Rev**, 10(3), 2006. p. 248-268
- MECHANG, S.; WEAVER, R.W.; PANICHSACPATANA, S. Co-composting of filter cake and bagasse; by-products from a sugar mill. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 437-432. 2004.
- MONTEIRO, M.R.; AMBROZIN, A.R.P.; LIÃO, L.M.; FERREIRA, A.G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. **Talanta** 77, 593-605. 2008.
- MONYEM, A.; VAN GERPEN, J. H. The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. **Biomass and Bioenergy**. v. 20 (4), p.317-325, 2001.
- NOUREDDINI, H.; HARKEY, D.; MEDIKONDURU, V. A. A continuous process for the conversion of vegetable oils into methyl esters of fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Volume 75, Number 12, 1775-1783, 1998.
- NUISSIER, G.; BOURGEOIS, P.; GRIGNON-DUBOIS, M.; PARDON, P.; LESCURE, M. H. Composition of sugarcane waxes in rum factory wastes. **Phytochemistry**, v.61, p.721-726, 2002.
- OZBAY, N.; OKTAR, N.; TAPAN, N. A. Esterification of free fatty acids in waste cooking oils (WCO): role of ion exchange resins. **Fuel**, 2008.
- PACHIONE, R. Biodiesel alimenta motor da economia. **Revista Química e Derivados**. Disponível na internet: <http://www.quimica.com.br/revista/qd414/biodiesel2.htm>. Acesso em: setembro de 2009.

- PARENTE, J. S. Biodiesel: Uma aventura Tecnológica num país engraçado. Ceará **Tecbio**, 2003. 68p.
- PATURAU, J. M. **By-products of the Cane Sugar Industry**. New York: Elsevier Publishing Company, 1989. 274p.
- PHUKAN, A. C., BORUAH, R. K. Extraction and evaluation of microcrystalline wax from press mud waste of the sugar industry. **Separation and Purification Technology**, v.17, p.189-194, 1999.
- PINTO, A. C. ; LOPES, W. A. ; GUARIEIRO, L. L. N. ; REZENDE, M. J. C. ; RIBEIRO, N. M. ; TORRES, E. A. ; PEREIRA, P. A. DE P. ; ANDRADE, J. B. DE . Biodiesel: An Overview; **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1313-1330, 2005.
- PULZATTO, M.E. **Ação do fósforo e enxofre na clarificação por sulfodefecação do caldo de cana de açúcar**. 1995. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.
- RACANICCI, A. M. C.; MENTEN, J. F. M.; REGITANO-DARCE, M. A. B.; GAIOTTO, J. B.; LONGO, F. A.; PEDROSO, A. A.& SORBARA, J. O. B. Oxidação lipídica do óleo de vísceras de aves para redução de seu conteúdo de energia metabolizável para frangos de corte na fase de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 919-923, 2004.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Casa do Pão editora, 1ª. Ed., Campinas, 2005.
- ROZÁRIO C.H.R.; BARRERA-ARELLANO, D.; TEXEIRA G.M.; DITTMER R. M; BALBO J. M.; GHIRALDINI J. A.; GHIRALDINI J. A. **Processo de fracionamento, purificação e refino de cera de cana de açúcar, óleo de cana de açúcar obtido**

através do processo de fracionamento, purificação e refino de cera de cana-de-açúcar e cera de cana de açúcar obtida através do processo de fracionamento, purificação e refino de cera de cana de açúcar. Patente Brasileira PI0702140-2, 2007a. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ROZÁRIO C.H.R.; BARRERA-ARELLANO, D.; TEXEIRA G.M.; DITTMER R. M; BALBO J. M.; GHIRALDINI J. A.; GHIRALDINI J. A. **Processo simplificado de obtenção de policosanol a partir de cera de cana de açúcar.** Patente Brasileira PI07021137-2, 2007b. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SALES, J. C.; SOMBRA, A. S. B.; FURTADO FILHO, A. F. G.; ALMEIDA, J. S. A importância do biodiesel para o meio ambiente. Anais do I Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, Natal, 2006.

SCHOBBER, S.; SEIDL, I. & MITTELBAACH, M. Ester content evaluation in biodiesel from animal fats and lauric oils, **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.108, p. 309–314, 2006.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**., vol.9, n.3, pp. 199-210,1998.

SENANAYAKE, S.P.J.N. & SHAHIDI, F. Oxidation stability of structured lipids produced from borage (*Borago officinalis* L.) and evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oils in the docosahexaenoic acid. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.. 79, p. 1003–1013, 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, Wiley, New York, 3th ed.,1979.

SIMAS, R. C.; CATHARINO, R. R.; CUNHA, I. B. S.; CABRAL, E. C.; BARRERA-ARELLANO, D.; EBERLIN, M. N.; ALBERICI, R. M. Instantaneous characterization

- of vegetable oils via TAG and FFA profiles by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v.135, p. 738–744, 2010
- TAMAKI, H.; MAN, S. L.; OHTA, Y.; KATSUYAMA, N.; CHINEN, I. Inhibition of osteoporosis in rats fed with sugar cane wax. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**v.67, n.2, p.423-425, 2003.
- THOMAS III, A. E. Fractionation and winterization: processes and products. In: APPLEWHITE, T. H. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products - Vol. 3**. New York: John Wiley & Sons, 1985. Chap. 1, p. 1-39.
- TRUBIANO, G.; BORIO, D.; ERRAZU, A. Influence of the operating conditions and the external mass transfer limitations on the synthesis of fatty acid esters using a *Candida antarctica* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, 40(5). 2003. p. 716-722.
- UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Cana-de-açúcar - Qual a dimensão da cana-de-açúcar no Brasil e no mundo?** Disponível em: <<http://www.unica.com.br/FAQ/>>. Acesso em: 09 nov 2010.
- VIEIRA, T. M. F. S. **Obtenção de cera de cana-de-açúcar a partir de subproduto da indústria sucro-alcooleira: extração, purificação e caracterização**. 2003. 139p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- VIEIRA, T. M. F. S.; BARRERA-ARELLANO, D. **Processo de obtenção de cera de torta de filtração de cana-de-açúcar**. Patente Brasileira PI0205153-2, 2002. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- WATSON, J. T., PARKMAN, O.D. Introduction to mass spectrometry: instrumentation. Application and strategies for data interpretation. **West Sussex: John Wiley & Sons**. 2007. 862p.
- WARTH, A. H. **Chemistry and Technology of Waxes**. New York, Reinhold, 1947.

WU, Z.; RODGERS, R. P.; MARSHALL, A. G. Characterization of vegetable oils: detailed compositional fingerprints derived from electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52 (17), p 5322–5328,2004.

WUST, E. **Estudo da viabilidade técnico-científica da produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos**. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, 2004.