

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Analítica



UNICAMP

**Monitoramento de reações químicas empregando
espectroscopia no infravermelho**

Tese de Doutorado

MSc. Marcello G. Trevisan

Orientador: Prof. Dr. Ronei J. Poppi

Campinas – SP, Brasil
Abril/2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

T729m Trevisan, Marcello Garcia.
Monitoramento de reações químicas empregando
espectroscopia no infravermelho / Marcello Garcia
Trevisan. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.

Orientador: Ronei Jesus Poppi.

Tese - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Quimiometria. 2. Espectroscopia no
infravermelho. 3. Tecnologia analítica de processos.
I. Poppi, Ronei Jesus. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Monitoring of chemical reactions with infrared spectroscopy

Palavras-chaves em inglês: Chemometrics, Infrared spectroscopy, Process analytical technology

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Ronei Jesus Poppi (orientador), Francisco Benedito Teixeira Pessine (IQ-UNICAMP), Fábio Augusto (IQ-UNICAMP), Marco Flôres Ferrão (DQF-UNISC), Marcelo Martins de Sena (UnUCET)

Data de defesa: 24/04/2009

Ainda que eu falasse todas as línguas e dominasse todo o conhecimento do natural e do celeste e ainda que eu tivesse fé suficiente para mover montanhas, sem amor, eu nada seria.

Seria como o sino que soa sem emoção, como um dia de sol sem a alegria, como o efêmero que cresce, vive e desaparece inócuo ao universo.

Adaptado de 1 Coríntios 13 em *O dom supremo*, Paulo Coelho.

O amor, a responsabilidade e a ética altruísta são peças fundamentais àqueles bem aventurados que aspiram possuir e transmitir o conhecimento técnico e a sabedoria dos homens e anjos.

À Jerusa,
pela fonte inesgotável
de carinho, amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Ronei J. Poppi, pela amizade, conhecimento, exemplo e pela longa paciência durante a conclusão deste trabalho;
- A minha família *Garcia*, nos elementos da avó Landa; mama Zilda; Tios Álvaro e Marcello e ao querido tio avô Adão Garcia e aos irmãos Vico e Lelinho;
- A família *Garcia* de minha esposa, as pessoas de '*Seu*' Celso & '*Dona*' Ieda e aos cunhados *Trio JJJ* (Jaison, Jordam e Josmar);
- Aos colegas de laboratório, que permitiram discussões intensas e pertinentes sobre os mais variados assuntos do conhecimento humano, da 'primeira gestação': Cleidiane, Eduardo, Paulo 'Pinto', Paulo Fidêncio e Marcelo 'Caixa d'água'. E aos colegas de segunda e terceira gestação: Fernando, Alessandra, Leoberto 'Chiquinho', Jez, Waldomiro; e mais recentemente Luixxx, Gilmare, Renato, Werickson, Patrícia, Paulo 'pH', Diorgenis 'Genésio', Danilo e Júlio.
- A todos os professores e funcionários do Instituto de Química da Unicamp, especialmente ao Prof. Dr. Pessine, Profa Dra Marcia M.M. Ferreira e Prof. Célio Pasquini, pelo exemplo incondicional de pesquisadores e pela amizade.
- A Camila Garcia '*chiquinha*' pelo apoio, dedicação e participação em algumas etapas desse trabalho;
- A banca examinadora do Exame de Qualificação Geral pela sugestão do tema que originou o trabalho apresentado na Introdução desta Tese;
- A Inês Lunardi e Emerson Lourenço pela ajuda, fornecimento de amostras e participação no desenvolvimento do monitoramento da reação de biotransformação;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento desta Tese de Doutorado;
- Ao Instituto de Química da Unicamp por proporcionar toda a infra-estrutura necessária para a realização deste trabalho.
- Aos colegas e amigos da empresa EMS S/A, principalmente ao chefe, amigo e irmão Malta e aos colegas Tiago e Eduardo e do instituto IIPF: José A. Martins, Débora, Fabiana, Marcos, André Rosa, Patrícia, Gustavo e Renato Lajarin.

- Aos colegas e amigos da equipe de atletismo da Unicamp: César 'bozolino', Tiago 'ET', José 'Zé', Ares, Gisele Chan, Felipe Mujica, Luiz 'luixa'. E aos amigos do grupo de triatlo da Unicamp: Zé, Sergião e João (treinador).

- Enfim, meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

1. Dados pessoais:

Nome: Marcello Garcia Trevisan

Nascimento: 09/09/1977

e-mail: mgtrevisan@gmail.com

2. Formação acadêmica:

2.1. Doutorado em Química (área de concentração em química analítica), Universidade Estadual de Campinas, 2003-2009. Título: *Monitoramento de reações químicas empregando espectroscopia no infravermelho.*

2.2. Mestrado em Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, 2001-2003. Título: *Aplicação de métodos quimiométricos de ordem superior e fluorescência molecular na análise em matrizes biológicas.*

2.3. Graduação: Química Industrial, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 1996-2001.

3. Atuação Profissional:

3.1. Out/2008-atual: Coordenador de P&D – Laboratório de Préformulação, Laboratório farmacêutico EMS S/A, Hortolândia, SP. Carga horária: 42 h/semana.

3.2. Fev/2008 a Set/2008: Pesquisador/Supervisor de Projetos, Laboratório farmacêutico EMS S/A, Hortolândia, SP. Carga horária: 42h/semana.

3.3. Ago/2007 a Fev/2008: Bolsista DTI-II, Instituto Internacional de Pesquisas Farmacêuticas (IIPF), Hortolândia, SP. Carga horária: 42 h/semana.

3.4. Fev/2007 a Dez/2007: Professor celetista – Nível superior. Universidade de Araras (UNIARARAS), Faculdade de Farmácia, Araras, SP.

4. Publicações:

4.1. Lima, K.M.G.; Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; *Non-destructive determination of total nitrogen in plants by diffuse reflectance near infrared spectroscopy.* Química Nova, 31 (2008) 700-703.

4.2. Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; *Direct determination of ephedrine intermediate in a biotransformation reaction using infrared spectroscopy and PLS.* Talanta, 75 (2008) 1021-1027.

4.3. Trevisan, M.G.; Garcia, C.M.; Schuchardt, U.; Poppi, R.J.; *Evolving factor analysis-based method for correction monitoring delay in different batch runs for use with PLS: On-line monitoring of a transesterification reaction by ATR-FTIR.* Talanta, 74 (2008) 971-976.

4.4. Silva, L.C.; Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; Sena, M.M.; *Direct determination of propranolol in urine by spectrofluorimetry with the aid of second order advantage.* Analytica Chimica Acta, 595 (2007) 282-288.

4.5. Do Nascimento, A.P.; Trevisan, M.G.; Kedor-Hackmann, E.R.M; Poppi, R.J.; *Simultaneous determination of dipyrone and papaverine in pharmaceutical formulation using PLS regression and UV spectrophotometry.* Analytical Letters, 40 (2007) 975-986.

4.6. Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; *Process Analytical Chemistry.* Química Nova, 29 (2006)1065-1071.

4.7. Sena, M.M.; Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; *Combining standard addition method and second-order advantage for direct determination of salicylate in undiluted human plasma by spectrofluorimetry*. *Talanta*, 68 (2006) 1707-1712.

4.8. Silva, L.S.; Trevisan, M.G.; Rath, S.; Poppi, R.J.; Reyes, F.G.R.; *Chromatographic determination of riboflavin in the presence of tetracyclines in skimmed and full cream milk using fluorescence detection*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16 (2005) 1174-1178.

4.9. Marco, P.H.; Levi, M.A.B.; Scarminio, I.S.; Poppi, R.J.; Trevisan, M.G.; *Exploratory analysis of simultaneous degradation of anthocyanins in the calyces of flowers of the Hibiscus sabdariffa species by PARAFAC model*. *Analytical Sciences*, 21 (2005) 1523-1527.

4.10. Sena, M.M.; Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; *PARAFAC: A chemometric tool form multi-dimensional data treatment. Application in direct determination of drugs in human plasma by spectrofluorimetry*. *Quimica Nova*, 28 (2005) 910-920.

4.11. Levi, M.A.B.; Scarminio, I.S.; Poppi, R.J.; Trevisan, M.G.; *Three-way chemometric method study and UV-Vis absorbance for the study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the Hibiscus rosa-sinensis species*. *Talanta*, 62 (2004) 299-305.

4.12. Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; *Determination of doxorubicin in human plasma by excitation-emission matrix fluorescence and multi-way analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 493 (2003) 69-81.

4.13. Do Nascimento, P.C.; Bohrer, D.; Trevisan, M.; Marques, M.S.; Guterres, M.V.; *Quality control of dialysis fluids by micellar colorimetry and multivariate calibration*. *Analytical Letters*, 34 (2001) 1967-1978.

4.14. Do Nascimento, P.C.; Bohrer, D.; Ramirez, A.; Trevisan, M.G.; Tramontina, J.; Rohlfes, A.L.B.; *Voltametric determination of volatile free sulfide and alkythiols as contaminants in parenteral amino acid solutions*. *Talanta*, 52 (2000) 1047-1054.

4.15. Bohrer, D.; do Nascimento, P.C.; Guterres, M.; Trevisan, M.; Seibert, E.; *Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of lead, cadmium, copper and zinc in high-salt content samples after simultaneous separation on polyethylene powder impregnated with 1-(2-pyridylazo)-2-naphtho: application to analysis of hemodialysis fluids*. *The Analyst*, 124 (1999) 1345-1350.

5. Trabalhos apresentados em eventos científicos:

5.1. Total de 25 trabalhos apresentados em congressos nacionais e internacionais.

6. Orientação

6.1. Participação como co-orientador, projeto CNPq, 2005-06. Aluno: Bruno Allan da Silva; Título: Determinação direta de fármacos por espectrofluorescência.

7. Participação em projeto de pesquisa:

7.1. Projeto 'Hiper' (FINEP/CNPq/IIPF): desenvolvimento de metodologias para caracterização de fármacos com nanotecnologia incorporada, bolsista CNPq DTI-II (Desenvolvimento Tecnológico Industrial, classe II), 2007;

7.2. (CNPq/Unicamp): Desenvolvimento de metodologias para análise de tetraciclinas em leite bovino empregando espectrofluorescência, 2006;

7.3. (Unicamp): Análise de doxorubicina em sangue humano por espectrofluorimetria, 2003.

RESUMO

Esta tese tem como objetivo desenvolver um conjunto de metodologias que incorporem a utilização da espectroscopia na região do infravermelho médio/próximo com métodos de estatística multivariada (quimiometria) em aplicações com enfoque em Química Analítica de Processos (QAP). Para atingir estes objetivos, este trabalho conta com um capítulo introdutório e três aplicações propriamente ditas. A introdução (capítulo 1) tem como finalidade divulgar a importância da QAP no âmbito acadêmico e industrial, além de estabelecer algumas terminologias que serão discutidas nos capítulos posteriores. A primeira aplicação deste trabalho envolve o monitoramento de uma reação de biotransformação que foi acompanhada por infravermelho médio e por cromatografia gasosa, sem etapas de extração ou pré-concentração, permitindo o desenvolvimento de um modelo multivariado capaz de fazer a previsão da concentração dos componentes analisados ao longo do tempo. A segunda e terceira aplicações se referem ao monitoramento espectroscópico da reação de transesterificação do óleo de soja na região do infravermelho médio e próximo, respectivamente. Neste segundo trabalho, foi utilizado um acessório de reflectância total atenuada para monitorar a transesterificação. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos por RMN ^1H , permitindo a construção de um modelo multivariado que se mostrou robusto para descrever a variação da concentração intra e extra bateladas, por meio de uma correção efetuada pela ‘análise de fatores evolucionários’ (EFA). Na última aplicação, um conjunto maior de bateladas reacionais foi obtido, incorporando-se bateladas consideradas normais e outras com falhas, monitorando-se no infravermelho próximo. Construindo-se o modelo com as bateladas sob-controle, foi possível obter um modelo matemático que permitiu prever a variação da concentração do rendimento intra e extra batelada, além de identificar as falhas ocorridas através da construção de cartas multivariadas de controle. Estes resultados foram avaliados utilizando dois modelos diferentes, propostos pela estatística multivariada para controle de processos.

ABSTRACT

The goal of this thesis is to develop a set of research works with a combination of infrared spectroscopy and multivariate statistical techniques (chemometrics) for applications in the Process Analytical Technology (PAT). To reach the goal, this work has an introductory chapter and three applications. The introduction (Chapter 1) contributed to the scientific divulgation of the importance of PAT in the academic and manufactures fields and also had the definition of some terminologies used in the forward chapters. The first application is about the monitoring of a bioreaction based on biotransformation with yeast by middle infrared spectroscopy and by GC-MS, enabling the development of a multivariate model based on Partial Least Squares (PLS). This application was carried out without extraction steps and pre-concentration processes. The second and the third applications consist of a soy bean oil transesterification reaction monitored by middle and near infrared spectroscopy, respectively. In the second application, an attenuated total reflectance (ATR) accessory was used to perform the reaction monitoring. The reaction was also monitored by ^1H NMR, enabling the construction of a robust multivariate model to describe the variation in the analyte concentration intra and extra reaction batches, throughout a temporal correction by Evolving Factor Analysis (EFA). In the last application, a larger set of batches were obtained with batches under control and another ones with process fails. All the batches were monitored by near infrared spectroscopy with an Acousto-Optic Tunable Filter (AOTF). A multivariate model constructed with batches obtained under control conditions allowed a predictable model for sequential batches and also to detect fails around the batches, using the multivariate control charts. The data were evaluated using two different methods proposed to Multivariate Statistical Process Control (MSPC) and compared each other.

Quadro de abreviaturas e siglas^a

| | |
|----------|--|
| | |
| AOTF | <i>Acousto-Optic Tunable Filter</i> |
| ATR | <i>Attenuated Total Reflectance</i> |
| CCD | <i>Charged Coupled Devices</i> |
| CE | <i>Capillary Electrophoresis</i> |
| CIRCLE | <i>Cylindrical Internal Reflectance Cell for Liquid Evaluation</i> |
| DQO | Demanda Química de Oxigênio |
| DTGS | <i>Deuterated Triglicine Selenide</i> |
| EFA | <i>Evolving Factor Analysis</i> |
| FAEE | <i>Fatty Acid Ethyl Ester</i> |
| FAM | Figuras Analíticas de Mérito |
| FDA | <i>Food and Drugs Administration Agency</i> |
| FIA | <i>Flow Injection Analysis</i> |
| GC-MS | <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| IM | Índice de Maturação da batelada |
| LV | <i>Latent Variable</i> |
| MIMS | <i>Membrane Injections Mass Spectroscopy</i> |
| MIR/MIRS | <i>Middle-Infrared/Spectroscopy</i> |
| MSPC | <i>Multivariate Statistical Process Control</i> |
| NIR/NIRS | <i>Near-Infrared/Spectroscopy</i> |

| | |
|-----------|--|
| NMR | <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> |
| NOC | <i>Normal Operation Conditions</i> |
| PAC | <i>Process Analytical Chemistry</i> |
| PARAFAC | <i>Parallel Factor Analysis</i> |
| PAT | <i>Process Analytical Technology</i> |
| PCA | <i>Principal Component Analysis</i> |
| PLS | <i>Partial Least Squares</i> |
| PLS/PLS-R | <i>Partial Least Square/Regression</i> |
| QAP | Química Analítica de Processos |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> |
| SFC | <i>Supercritical Fluid Chromatography</i> |
| SPME | <i>Solid-Phase Micro Extraction</i> |
| SW-NIR | <i>Short-Wave Near Infrared</i> |
| TDMA | <i>Thermal Membrane Desorption Application</i> |
| UV-Vis | Ultravioleta-Visível |
| VOC | <i>Volatile Organic Compounds</i> |

^a Os termos em inglês estão em itálico.

Lista de tabelas

| | |
|---|------------|
| Tabela 2.1. Valores das áreas dos picos de intensidade referente aos íons totais durante o monitoramento. | 46 |
| Tabela 2.2. Valores normalizados em porcentagem das áreas dos picos de intensidade dos íons totais durante o monitoramento. | 46 |
| Tabela 3.1. Parâmetros cinéticos utilizados para o ajuste dos pontos obtidos por ¹ H RMN. | 73 |
| Tabela 3.2. Valores limites obtidos pelo EFA em diferentes bateladas. | 78 |
| Tabela 3.3. Resultados de previsão dos rendimentos das bateladas obtidos com validação cruzada e validação externa com diferentes métodos de pré-processamento. | 79 |
| Tabela 3.4. Comparação dos resultados obtidos para diferentes estratégias aplicadas na avaliação das reações. | 80 |
| Tabela 4.1. Variância capturada pelos PCs no modelo MPCA nas bateladas NOC. | 100 |
| Tabela 4.2. Variância capturada pelos PCs no modelo MPCA nas bateladas NOC após a eliminação das bateladas 2 a 4. | 103 |
| Tabela 4.3. Variância capturada pelas variáveis latentes no modelo PLS (método 2) nas bateladas NOC após a eliminação das bateladas 2 e 3. | 117 |

Lista de figuras

Figuras do capítulo 1

Figura 1.1. Combinação de vários sensores em um mesmo reato r: **a** – válvula de amostragem, necessária para medições *off-line* e *at-line*; **b** – uma linha de amostragem que conduz a amostra até um sensor *on-line*; **c** - uma sonda interna de parede, caracterizando-se como um sensor *in-line*; **d** - um sensor de parede, representando um modelo *non-invasive*.....**14**

Figura 1.2. Sensores ópticos *in-line* (sondas) aplicados para o monitoramento de processos. Sonda de reflectância (**a**), transmitância (**b**) e transflectância (**c**).....**16**

Figuras do capítulo 2

Figura 2.1. Esquema da reação proposta: 1-fenil-1,2-propanodiona (**A**); (R)-1-hidroxi-1-fenil-2-propanona (**B**); (S)-2-hidroxi-1-fenil-1-propanona (**C**) e (1R, 2S)-1-fenil-1,2-propanodiol (**D**).**31**

Figura 2.2. Cella de fluxo (*flow-through*) construída sob um sistema HATR. Detalhe para a remoção do material mais denso pela saída, com a localização mais inferior que a outra extremidade (entrada)**33**

Figura 2.3. Cromatogramas obtidos por GC-MS e TIC para o 1-fenil-1,2-propanodiona (tempo de retenção 5,90 minutos), (R)-1-hidroxi-1-fenil-2-propanona (6,44 min), (S)-2-hidroxi-1-fenil-1-propanona (6,67 min) e (1R, 2S)-1-fenil-1,2-propanodiol (7,13 min) nos tempos 0 min (A), 30 min (B), 1 h (C), 2 h (D), 3 h (E), 4 h (F), 5 h (G), 6 h (H), 7 h (I) e 8 h (J)**47**

Figura 2.4. Monitoramento MIRS para o sistema (*S.Cerevisiae* e tampão) com o substrato, superfície (A) e gráfico da variação das absorbâncias (B).**48**

Figura 2.5. Ajuste cinético para o substrato (vermelho); intermediário (R)-1 (verde); intermediário (S)-2 (azul) e o produto final (laranja). Análises *off-line* são representadas pelos pontos isolados (■).**49**

| | |
|---|-----------|
| Figura 2.6. Conversão do 1-fenil-1,2-propanadiona (1) (■) para (R)-1-hidroxi-1-fenil-2-propanona (2) (○), (1R,2S)-1-fenil-1,2-propanadiol (3) (▲) e (S)-2-hidroxi-1-fenil-1-propanona (4) (◇)..... | 50 |
| Figura 2.7. Monitoramento por MIRS do sistema (<i>S. cerevisiae</i> e tampão) sem o substrato, superfície (A) e gráfico da variação das absorbâncias (B)..... | 53 |
| Figura 2.8. Gráficos de correlação entre as concentrações de referência GC-MS e aquelas obtidas pelo modelo PLS para o grupo de validação do substrato (A), intermediário (R)-1 (B), intermediário (S)-2 (C) e o produto final (D)..... | 55 |
| Figura 2.9. <i>Loadings</i> para cada modelo PLS-1 para as três principais VL: 1 ^a (-○), 2 ^a (-) e 3 ^a (-▽) obtidos para o substrato (A), intermediário (R)-1 (B), intermediário (S)-2 (C) e o produto final (D)..... | 56 |
| Figuras do capítulo 3 | |
| Figura 3.1. Um sistema CIRCLE típico utilizado para as análises na região do MIR..... | 67 |
| Figura 3.2. Região entre 4,35 a 4,05 ppm dos espectros simulados de RMN- ¹ H dos TG, DG, MG e ésteres etílicos..... | 68 |
| Figura 3.3. Região entre 4,35 e 4,05 ppm dos espectros de RMN- ¹ H obtidos experimentalmente para (a) óleo de soja e (b) ésteres etílicos de óleo de soja..... | 68 |
| Figura 3.4. Desdobramentos dos picos de ressonância segundo a regra do n+1. | 69 |
| Figura 3.5. Área dos desdobramentos do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio etoxílicos dos ésteres etílicos..... | 70 |
| Figura 3.6. Espectro de RMN- ¹ H de uma mistura binária composta de 40 % de ésteres etílicos de soja 60 % de óleo de soja..... | 71 |
| Figura 3.7. Ajuste cinético para as reações de transesterificação obtidas pelas análises de ¹ H RMN..... | 73 |
| Figura 3.8. Erros relativos de previsão (RMSPD) percentual utilizando 3 bateladas para calibração. | 75 |

| | |
|--|------------|
| Figura 3.9. Monitoramento por IR. Espectros durante os 5 ^{os} minutos da reação para a 3 ^a batelada (A) e o mesmo monitoramento após a subtração do primeiro espectro (B)..... | 76 |
| Figura 3.10. Análise de fatores evolucionários realizada em uma batelada de calibração. O valor limite escolhido (linha tracejada) indica a remoção dos tempos menores a 2 minutos de monitoramento. | 79 |
| Figura 3.11. Erros relativos de previsão utilizando três bateladas para calibração após a correção temporal executada por EFA..... | 80 |
| Figuras do capítulo 4 | |
| Figura 4.1. ‘Pilares’ de sustentação do biodiesel, proposta PNPB..... | 88 |
| Figura 4.2. Arranjo tridimensional de dados obtidos por monitoramento multivariado (espectroscópico) de diversas bateladas reacionais ao longo de um determinado período de tempo..... | 91 |
| Figura 4.3. Estrutura do modelo <i>Tucker</i> , empregado para conjuntos de segunda ordem. | 92 |
| Figura. 4.4. Método de pré-processamento baseado no desdobramento das variáveis..... | 94 |
| Figura 4.5. Método de pré-processamento baseado no desdobramento das bateladas..... | 94 |
| Figura 4.6. Monitoramento de uma batelada controle por AOTF-NIR (A) e com a subtração do primeiro espectro (B)..... | 98 |
| Figura 4.7. Correlação entre osm valores de previsão obtidos para bateladas NOC em relação a equação cinética de referência (eq. 3.2) e limites inferiores (Δ) e superiores (∇) obtidos para os valores de calibração. | 100 |
| Figura 4.8. Gráfico dos escores para o conjunto NOC e os limites da distribuição F 95% (- -). | 101 |
| Figura 4.9. Gráfico dos escores do conjunto NOC definido pelos PC1 e PC2, | |

| | |
|--|-----|
| com destaque para a distribuição F de 95%. | 102 |
| Figura 4.10. Gráfico dos escores para o conjunto NOC após a retirada das bateladas 3 e 4, com os limites da distribuição F 95% (- -)..... | 103 |
| Figura 4.11. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para etanol 98%, com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T ² | 105 |
| Figura 4.12. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para etanol 95%, com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T ² | 106 |
| Figura 4.13. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para ausência de catalisador, com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T ² | 107 |
| Figura 4.14. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para concentração do catalisador 20% maior, com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T ² | 108 |
| Figura 4.15. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para concentração do catalisador 20% menor, com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T ² | 109 |
| Figura 4.16. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) obtidas utilizando o método 1, com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T ² | 111 |
| Figura 4.17. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com Falha (▼) para a falha obtida com etanol 98%, com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T ² | 112 |
| Figura 4.18. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para a falha obtida com etanol 95%, com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T ² | 113 |
| Figura 4.19. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para a falha devido a ausência de catalisador na solução etanólica, com | |

Sumário

| | |
|--|-----------|
| 1. Prefácio e objetivos gerais | 3 |
| 2. Capítulo 1 – <i>Introdução geral</i> | 11 |
| 2.1. Introdução geral | 11 |
| 2.2. Sensores | 18 |
| 2.3. Perspectivas | 28 |
| 2.4. Referências | 29 |
| 3. Capítulo 2 – <i>Aplicação 1: Determinação direta de um intermediário da síntese de efedrina em uma reação de biotransformação (...)</i> | 39 |
| 3.1. Introdução | 39 |
| 3.2. Experimental | 42 |
| 3.3. Resultados e discussão | 45 |
| 3.4. Conclusão | 57 |
| 3.5. Referências | 57 |
| 4. Capítulo 3 – <i>Aplicação 2: Desenvolvimento de um método utilizando análise de fatores evolucionários para correção temporal (...)</i> | 63 |
| 4.1. Introdução | 63 |
| 4.2. Experimental | 66 |
| 4.3. Resultados e discussão..... | 72 |
| 4.4. Conclusão | 81 |
| 4.5. Referências | 81 |
| 5. Capítulo 4 – <i>Aplicação 3: Utilização de cartas multivariadas de controle para avaliação de falhas em bateladas: análise on-line e pós-batelada (...)</i> | 87 |
| 5.1. Introdução | 87 |
| 5.2. Experimental | 96 |
| 5.3. Resultados e discussão..... | 97 |

| | |
|--|-----|
| 5.4. Conclusão..... | 130 |
| 5.5. Referências..... | 131 |
| 6. Conclusões gerais e Perspectivas futuras..... | 137 |

Prefácio

Prefácio

Um conjunto de situações, como a busca pela qualidade e reprodutibilidade de produtos, otimização e aumento da produtividade, redução de custos, sustentabilidade e minimização de impactos ambientais, tem motivado continuamente o aperfeiçoamento na tecnologia de processos químicos. Via de regra, o primeiro passo a ser dado em direção ao aperfeiçoamento de um processo químico é buscar maior entendimento dos mecanismos reacionais, termodinâmicos e cinéticos dos sistemas em avaliação. Estas informações podem ser obtidas pela inclusão de sensores analíticos em diversos pontos do processo. No entanto, cada sensor apresenta propriedades particulares, como tempo de resposta, custo, sensibilidade, seletividade, etc., que são determinadas tanto pela técnica na qual o sensor se fundamenta como pela sua arquitetura no reator (*van den Berg, 2002*).

Como bem discutido por Olsson (*Olsson, 1998*), a *Química Analítica de Processos* e as técnicas associadas ao monitoramento de processos não se restringem somente a ferramentas de aplicação industrial, mas apresentam diversos conceitos teóricos que deveriam ser mais abrangentemente elaborados em disciplinas acadêmicas. Na tentativa de permitir uma maior discussão destes dois aspectos, técnicos e acadêmicos, o primeiro capítulo desta tese traz uma introdução sobre alguns conceitos teóricos e instrumentais da utilização de sensores para o monitoramento de reações químicas em processos e em bancada. O capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre os principais conceitos utilizados na QAP, além do ‘estado da arte’ no monitoramento de reações químicas com técnicas espectroscópicas. Este trabalho teve origem no Exame de Qualificação Geral de doutorado, realizado no dia 30 de agosto de 2004, com o título “*Sistemas de aquisição de dados analíticos em linha e seu uso no controle e monitoramento de processos industriais*” e após dois meses de elaboração e aprofundamento, originou um artigo de divulgação científica (*Trevisan, 2006a*), publicado na revista *Química Nova*.

Apesar da grande quantidade de sensores disponíveis para o monitoramento de

reações, como os métodos cromatográficos, espectroscópicos e eletroquímicos apresentados no decorrer deste trabalho (*Trevisan, 2006*), optou-se pela utilização da técnica espectroscópica na região do infravermelho (médio e próximo) como núcleo central deste trabalho. Esta opção foi tomada em consequência da já estabelecida experiência ao longo dos trabalhos desenvolvidos no *Laboratório de quimiometria em química analítica*, coordenado pelo Prof. Dr. Ronei J. Poppi, orientador deste trabalho e pela disposição de um equipamento *Bomem*, modelo MB-100 e duas celas do tipo CIRCLE (*Cylindrical Internal Reflectance Cell for Liquid Evaluation*).

Uma vez estabelecido o sensor a ser utilizado no desenvolvimento dos trabalhos, partiu-se para a escolha das aplicações nas quais o monitoramento de reações seria realizado. Pela dificuldade de se estabelecer parcerias que possibilitassem a implementação de um monitoramento em um processo industrial, optou-se pelo monitoramento de reações em bancada. O primeiro destes trabalhos foi o monitoramento de uma biotransformação a qual o mecanismo e a cinética da reação já eram conhecidos, permitindo maior simplicidade na definição dos parâmetros necessários a elaboração dos modelos estatísticos multivariados. A reação escolhida foi uma biotransformação de um substrato dicetona em um intermediário utilizado na síntese da efedrina, através de uma suspensão de leveduras vivas de fermento de pão (*Saccharomices cerevisiae*). Neste trabalho, foi construída uma cela de fluxo para medidas de líquidos por reflectância total atenuada (*Attenuated Total Reflectance – ATR*) horizontal, que possibilita medidas *on-line* em um reator. Este trabalho foi desenvolvido utilizando as condições encontradas no grupo dos Profs. Drs. Paulo Moran e José Augusto (IQ-Unicamp) e possibilitou o desenvolvimento de um método alternativo, baseado na espectroscopia no infravermelho médio e PLS, para o monitoramento direto do rendimento da síntese (*Trevisan, 2008b*).

Assim como todo desenvolvimento de um novo método analítico precisa ser validado em relação a uma outra técnica analítica e avaliado em relação a determinações intra e extra dias, por exemplo, o mesmo deve ser realizado no desenvolvimento de

modelos destinados ao monitoramento de processos químicos. A estabilidade ou robustez na previsão dos resultados de um modelo destinado ao monitoramento de uma reação deve ser avaliada, utilizando diversas bateladas obtidas em diferentes dias e em condições que simulem a variabilidade natural do processo. Na segunda aplicação deste trabalho, utilizou-se na elaboração dos modelos estatísticos um conjunto de dados obtidos no monitoramento não de uma, mas de quatro bateladas. Os parâmetros que definem o modelo foram obtidos por validação cruzada entre as bateladas, obtendo-se maior robustez do modelo e aumento na capacidade de previsão (menor erro). Neste trabalho (*Trevisan, 2008a*), a reação escolhida como aplicação foi a transesterificação etanólica com catálise alcalina e monitoramento com um acessório CIRCLE na região do infravermelho médio e calibração multivariada. Desenvolvido em conjunto com o *Laboratório Fênix* do IQ-Unicamp, coordenado pelo Prof. Dr. Ulf Schuchardt, o monitoramento das bateladas foi realizado tanto via *on-line* por infravermelho médio como *off-line* pela técnica de $^1\text{H-RMN}$. Devido ao monitoramento ser realizado com duas técnicas distintas e com procedimentos diferentes, foi necessário a correção das matrizes de dados em função do eixo temporal de aquisição dos dados. Para isto, foi utilizado o método EFA (*evolving factor analysis* ou Análise de Fatores Evolucionários), que permitiu a harmonização da matriz de dados obtidos por MIR e do vetor cinético obtido por RMN.

A implementação de um sistema de monitoramento que possibilite a previsão de determinadas propriedades de um processo químico em função do tempo, como por exemplo, o rendimento da reação, é importante no sentido de permitir a otimização e o controle do processo. No entanto, o controle efetivo de um processo químico caracteriza-se por um conjunto de técnicas que vão muito além do monitoramento espectroscópico desse processo. São necessários sistemas computacionais integrados aos dispositivos sensoriais que interpretem variações sutis nas variáveis do processo, em tempo real ou em intervalos muito reduzidos de tempo. Além da identificação de tendências no decorrer do processo, um sistema controlador precisa dispor de

ferramentas que permitam atuar efetivamente no controle do processo, seja através da emissão de um alerta que acione um indivíduo ou equipe especialista e esta tome decisões de ajuste do processo, seja através de um sistema automático de correção de falhas e ajuste do processo a uma condição normal de operação. O desenvolvimento de sistemas controladores em processos químicos é realizado através da automação industrial, ferramenta da Engenharia Mecatrônica, e encontra-se fora do escopo desta Tese. No entanto, a implementação de sistemas controladores é realizada tendo como base um sistema robusto de monitoramento do processo e um modelo estatístico, ainda mais robusto, que permita a identificação de tendências em tempo real ao longo do processo. A terceira e última aplicação desta tese realiza uma contribuição neste sentido, avaliando modelos estatísticos que permitam a identificação de falhas durante o tempo de monitoramento de uma reação de bancada. Neste trabalho, foi realizado o monitoramento da mesma reação de transesterificação etanólica com catálise alcalina apresentada na segunda aplicação, no entanto, o monitoramento foi realizado na região do NIR, com um equipamento AOTF (*Acousto-optic Tunable Filter*), equipamento disponível no *Laboratório de Instrumentação*, coordenado pelo Prof. Dr. Célio Pasquini. Nesta aplicação, mais de 20 bateladas foram realizadas, algumas em condições normais de controle e outras com alterações que simulassem falhas de preparação (variação na concentração do catalisador e hidratação do etanol). Os métodos estatísticos multivariados empregados utilizaram *cartas multivariadas de controle*, com enfoque tanto na tomada de decisões em tempo real (*on-line*) quanto na análise *pós-batelada*.

Objetivos do trabalho

Esta tese de doutorado teve como objetivo central a utilização da espectroscopia no infravermelho como técnica analítica destinada ao monitoramento de reações químicas e biológicas, possibilitando o desenvolvimento de modelos estatístico-

matemáticos com potencial de previsão da variação dos reagentes e produtos (e seus intermediários) no decorrer da reação química. Como objetivos secundários avaliou-se a utilização conjunta de duas estratégias: a não manipulação do processo de amostragem ou extração, com a utilização de sistemas ‘*on-line*’ de análise direta; e o emprego de medidas espectroscópicas no infravermelho, que possibilitam uma frequência de coleta de dados muito alta e especificidade química (resolução temporal e espectral).

Neste trabalho, três aplicações experimentais foram desenvolvidas. A primeira delas teve como enfoque a implementação de monitoramento espectroscópico de uma biotransformação em meio aquoso. A necessidade de comparação dos resultados obtidos conduziu ao monitoramento conjunto com a técnica de GC-MS.

A segunda e terceira parte deste trabalho, embora ambas envolvendo o monitoramento de uma reação de transesterificação de óleo de soja, apresentaram objetivos diferentes. Na primeira, a eficiência da previsão foi avaliada em outras bateladas e na última aplicação, objetivou-se a avaliação da eficiência na detecção de falhas entre as diversas bateladas obtidas.

(Olsson, 1998) Olsson, L.; Schulze, U.; Nielsen, J.; *On-line bioprocess monitoring - an academic discipline or an industrial tool?* TrAC – Trend. Anal. Chem., 17 (1998) 88-95.

(Trevisan, 2006) Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; *Process Analytical Chemistry*. Quim. Nova, 29 (2006)1065-1071.

(Trevisan, 2008a) Trevisan, M.G.; Garcia, C.M.; Schuchardt, U.; Poppi, R.J.; *Evolving factor analysis-based method for correction monitoring delay in different batch runs for use with PLS: On-line monitoring of a transesterification reaction by ATR-FTIR*. Talanta, 74 (2008) 971-976.

(Trevisan, 2008b) Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; *Direct determination of ephedrine intermediate in a biotransformation reaction using infrared spectroscopy and PLS*. Talanta, 75 (2008) 1021-1027.

(van den Berg, 2002) van den Berg, F.W.J.; Hoefsloot, H.C.J.; Smilde, A.K.; *Selection of optimal process analyzers for plant wide monitoring*. Anal. Chem., 74 (2002) 3105-3111.

Capítulo 1.
- Introdução Geral

1.Introdução geral

1.1. *Química Analítica de Processos (QAP)*

Apesar de ser uma das áreas que tem apresentado grande crescimento nos últimos 20 anos, a Química Analítica de Processos (do inglês *Process Analytical Chemistry*-PAC) tem ocupado papel pouco relevante nos programas acadêmicos de graduação e pósgraduação (*Chauvel, 2002*). Um centro pioneiro no desenvolvimento da QAP é o *Center for Process Analytical Chemistry (CPAC)* (www.cpac.washington.edu; *Henry, 2004*), situado na Universidade de Washington – Seattle, que produziu aplicações clássicas na área, como a medida de octanagem em gasolinas, utilizando espectroscopia no infravermelho próximo (*Kelly, 1989*). Inicialmente, Kowalski e colaboradores (*Callis, 1987*) propuseram que a QAP deveria ser considerada como subdisciplina da Química Analítica. No entanto, a tendência atual é considerar a QAP como um ramo da Tecnologia Analítica de Processos (*Process Analytical Technology – PAT*) (*Workman, 2001*), uma área mais ampla, que envolve tanto determinações químicas como físicas (análises reológicas, de superfícies, etc), além de conceitos específicos, como instrumentação, amostragem, transporte de amostra, comunicação com controladores, administração de projetos, quimiometria e engenharia de fluxo (*FDA - Guidance for Industry, 2004*).

Existem grandes diferenças entre a QAP e a Química Analítica Instrumental ministrada nos programas de graduação. Embora as técnicas instrumentais sejam basicamente as mesmas, nas análises tradicionais ou acadêmicas, a precisão é usualmente priorizada, seguida de custo e tempo de medição (*Inczedy, 1990*). Já em processos industriais, o tempo é em geral, o parâmetro de maior importância, estando logo a seguir o custo e a precisão (*Chauvel, 2002; Trevisan, 2006a*).

Nas análises laboratoriais, as amostras são manipuladas sob condições rígidas de controle e podem ser pré-tratadas para promover aumento na seletividade e/ou sensibilidade. Além disso, os instrumentos não ficam expostos a ambientes ou amostras

corrosivas, possibilitando o emprego de técnicas analíticas clássicas. Muitas medidas em laboratórios analíticos são utilizadas apenas para assegurar a qualidade do produto, mas não para controlar o processo. Medidas de controle de qualidade determinam somente a aceitabilidade ou não de um produto, não reduzindo custos na sua elaboração, já que a informação é geralmente obtida após o término do processo.

Sensores de processos, aqui definidos como dispositivos analíticos implementados na linha do processo, devem ser resistentes ao ambiente de plantas químicas, suportando mudanças bruscas de temperatura e umidade, além de serem hábeis para amostrar e analisar materiais sob condições extremas. Operações de amostragem, tratamento de amostra, medição, coleta de dados e processamento devem ser automatizados. O objetivo das análises em processos é eliminar ou reduzir as causas de variabilidade na linha de produção, melhorando a qualidade e reprodutibilidade, aumentando a produtividade e competitividade do produto (*Honigs, 1987*). Embora haja a idéia de que o retorno financeiro proveniente da implementação de sensores automatizados em processos seja devido à redução de medidas laboratoriais e, conseqüentemente, da redução de laboratoristas, este fator constitui pequena fração do ganho proporcionado a médio e longo prazos. A rentabilidade na implementação de sensores em linha ocorre devido ao incremento na otimização e no controle do processo e no ganho com novos padrões de qualidade, como nos certificados seis e sete sigma (www.wikipedia.org). Desta forma, é sempre necessária a permanência de um laboratório analítico para efetuar medidas, calibrações e manutenção periódica dos sensores distribuídos ao longo da linha de produção. O objetivo da PAT é possibilitar a obtenção de informações quantitativas e qualitativas sobre processos químicos, físicos e biológicos.

Estas informações podem ser utilizadas não apenas para monitorar e controlar o processo, mas também para otimizar sua eficiência no uso de energia, tempo e matéria-prima, contribuindo para a sustentabilidade e menor impacto ambiental. No controle de processos são necessárias medições suficientemente rápidas para permitirem ação de ajuste do sistema controlador central, na chamada malha de controle, para o caso de

perturbações ou tendências do ponto de ajuste ou *setpoint* (Shinskey, 1994). Quando o sistema analisador é suficientemente rápido para permitir que o controlador reajuste as variáveis do processo, retornando às condições normais, denominamos estas medições de análises em tempo real, embora exista uma considerável diferença de tempo entre a medição e o processamento pelo controlador (Honigs, 1987). Embora a velocidade de resposta do analisador seja um parâmetro importante, é a velocidade de ação do controlador que determina a robustez de um processo frente a perturbações.

O desenvolvimento de sensores analíticos para análise em processos industriais pode ser considerado como área promissora de pesquisa no meio acadêmico. Porém, poucos trabalhos têm considerado o fator tempo de análise e processamento durante sua elaboração (Workman, 2003). Conseqüentemente, apenas uma pequena fração de muitas propostas de sistemas analisadores apresenta-se realmente útil para monitoramento e controle de processos, além de ser necessário um longo período até a implementação real destes sistemas em processos industriais.

Hassel e Bowman (Hassel, 1998) discutem pontos interessantes na implementação de sistemas analisadores em processos industriais. Apresentando um enfoque espectroscópico, os autores descrevem detalhes práticos para escolha de sistemas analisadores, levando em conta aspectos como tempo, precisão, exatidão e tipo de informação requerida para o analisador. Neste artigo, os principais usos de sistemas analisadores em processos industriais são:

- Controle de processos: o analisador é geralmente utilizado como indicador de tendências, mais preciso, porém menos exato, que outros sensores. Velocidade é o fator principal de escolha, empregando-se analisadores em tempo real;
- Controle de qualidade: a análise é utilizada como parâmetro de qualidade absoluto (exato), em uma faixa de concentração específica, podendo apresentar menor precisão. Métodos certificados são empregados, proporcionando resultados exatos, mas com maior tempo de análise;
- Planta piloto: os sensores empregados em pesquisa e desenvolvimento de processos devem ser flexíveis na determinação de diversos analitos e não para análises específicas,

mostrando-se sensíveis para diversas aplicações;

- Segurança e monitoramento ambiental: regidas por regulamentações, estas análises são utilizadas para monitorar a presença de compostos nocivos, envolvendo principalmente sensores para vapores e fumaças, necessitando de alta exatidão, precisão e confiabilidade.

De acordo com o sistema de medição, os analisadores de processos podem ser classificados em 5 tipos (Callis, 1987): *off-line*, *at-line*, *on-line*, *in-line* e *non-invasive*, podendo ser distribuídos em determinados pontos estratégicos de um processo. A Fig. 1.1 exemplifica a utilização combinada de vários sensores em um mesmo reator.

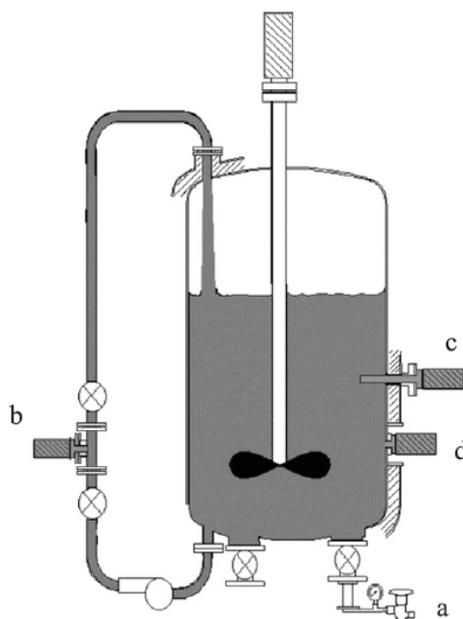


Figura 1.1. Combinação de vários sensores em um mesmo reator: **a** – válvula de amostragem, necessária para medições *off-line* e *at-line*; **b** – uma linha de amostragem que conduz a amostra até um sensor *on-line*; **c** - uma sonda interna de parede, caracterizando-se como um sensor *in-line*; **d** - um sensor de parede, representando um modelo *non-invasive*.

Estes sensores podem ser definidos como:

- Sistemas de análise *off-line* e *at-line*: são analisadores que empregam coleta manual através de válvulas de amostragem (Fig. 1.1a) e transporte também manual até um laboratório central onde ocorrem as medições. Em *off-line*, a amostra é analisada com instrumentos sofisticados e, em geral, automatizados. As vantagens deste sistema incluem a utilização mais ampla dos equipamentos, a disponibilidade de um técnico especialista como consultor, facilidade de desenvolvimento de métodos e de manutenção. Já as desvantagens incluem a demora entre a submissão da amostra e a reportagem dos resultados, o que veio a dar origem aos métodos *at-line*. Na arquitetura *at-line*, o sensor (ou equipamento) é posicionado próximo aos pontos de amostragem da linha de produção. As vantagens incluem maior rapidez na obtenção dos resultados, controle no condicionamento da amostra (apesar do preparo manual) e emprego de instrumentos simples, como baixo custo, manutenção simples e facilidade de uso. Devido ao consumo de tempo, estes analisadores dificilmente são empregados no controle de processos, sendo utilizados para medidas de especificação técnica da matéria-prima (recebimento) e controle de especificações em pontos críticos do processo.

- Sistemas *on-line*: é a partir deste sistema que a QAP começa a se separar da química analítica instrumental ministrada no meio acadêmico (Chauvel, 2002). Neste tipo de analisador, um sistema automatizado é empregado para extrair parte da amostra através de um duto (Figura 1.1b), condicionar a amostra e medi-la, armazenar os dados e processá-los. É possível subdividir esta classe em duas categorias: sistemas intermitentes, onde ocorre a transferência de uma porção do fluxo do processo para um instrumento analisador (p.e., métodos cromatográficos) e sistemas contínuos, em que a amostra passa continuamente através de uma cela de medição retornando ou sendo descartada do processo. Exemplo destes últimos sistemas são celas de fluxo para medidas de reflectância interna em espectroscopia, também conhecidos como dispositivos CIRCLE, um acrônimo para *Cylindrical Internal Reflectance Cell for Liquid Evaluation* (Workman, 1999), que será bastante empregada no restante das aplicações desta tese.

- Sistemas *in-line* ou *in-situ*: neste caso, o sensor analítico encontra-se em contato direto com a linha do processo, interagindo diretamente com a amostra (Figura 1.1c). Este sistema apresenta extrema vantagem de evitar etapas de amostragem, com medidas mais representativas e, devido à ausência de linhas de amostragem, medições em menor tempo. No entanto, a interação direta do processo com o analisador pode ocasionar desgastes e obstrução do sensor. Nestes casos, o sensor deve ser capaz de operar sob condições extremas de pressão e temperatura. Na Fig. 1.2 são mostrados alguns exemplos de sondas espectroscópicas *in-line* empregadas na análise de processos. O sensor **a** representa uma sonda para medidas de reflectância, podendo ser realizada tanto através de uma janela que interfaceia o processo, como através de uma sonda interna, como representado pela Fig. 1.2a. As medidas de transmissão **b** exigem um caminho óptico apropriado, geralmente podendo ser regulável para a análise de diferentes sistemas (Fig. 1.2b). Medidores de transreflectância **c** também podem ser obtidos com sondas de reflexão, onde a radiação interage com a amostra e é em seguida refletida por um espelho, assim retornando ao detector através de outras fibras ópticas, sendo bastante apropriado para melhoria da sensibilidade do sinal analítico.

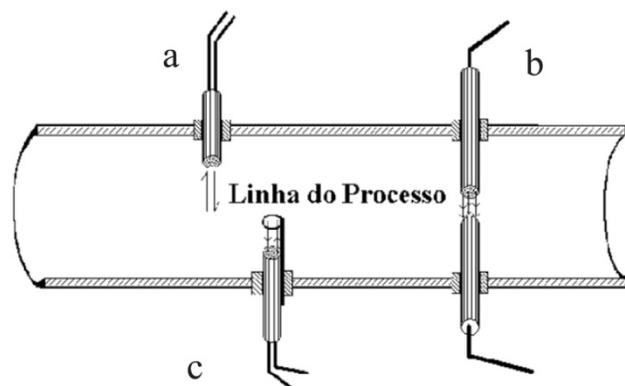


Figura 1.2. Sensores ópticos do tipo *in-line* (sondas) aplicados para o monitoramento de processos. Sonda de reflectância (**a**), transmitância (**b**) e transreflectância (**c**).

- Sistemas *non-invasive*: esta é a classe mais recente de analisadores, que apresentam as vantagens dos sensores *in-line* de não necessitar de etapas de amostragem, com a característica do analisador não entrar em contato direto com o processo (Fig. 1.1d),

pois é protegido por uma interface, por exemplo, uma janela de quartzo.

Embora em termos históricos, tenha ocorrido progresso na utilização destes analisadores, cada sensor apresenta características específicas, sendo possível encontrar em um mesmo processo, vários tipos de analisadores.

1.2. Técnicas de amostragem

Grande parte dos problemas relacionados à implementação de sensores e processos está relacionada com as etapas de amostragem (*Kellner, 1998; Koch, 1999; Bakeev, 2005*), o que tem contribuído para a escolha de sensores *in-line*. Técnicas de amostragem dependem da natureza do processo, da matriz, da informação requerida e do tipo de analisador utilizado. Em analisadores *on-line*, a retirada da amostra ou amostragem, consiste em transferir uma amostra representativa do processo para o analisador. Em sistemas *in-line* e *non-invasive*, apesar da retirada da amostra não ser necessária, pois esta é analisada diretamente e em equilíbrio com o sistema, é necessário um interfaceamento adequado do sensor com o interior do processo. A obtenção de uma amostra representativa do processo é a etapa fundamental para obter medidas eficientes de um processo industrial. Analisadores *on-line* exigem bomba para transferência do fluxo do processo para o analisador. Neste caminho, a amostra deve ser condicionada automaticamente, incluindo etapas como ajuste de pressão e temperatura, filtração, pré-concentração ou diluição, extração, remoção de contaminantes, etc. Além disso, a amostra deve ser transportada ao analisador em um intervalo de tempo mínimo. Basicamente dois sistemas amostradores têm sido empregados: o intermitente (*flow-by*), padrão para Análises em Injeção por Fluxo (*Flow Injection Analysis - FIA*) e para métodos cromatográficos e o sistema contínuo (*flow-through*), bastante empregado para sensores ópticos. A localização dos pontos de amostragem e o comprimento destas linhas são interdependentes para obtenção de dados em tempo real. Embora a amostragem nestes pontos seja automática, é necessário que esses pontos estejam próximos à região onde é realizada a amostragem manual, para se efetuar calibração e validação do sistema de análise. Sensores industriais devem apresentar simplicidade,

com um mínimo de componentes, de forma a apresentar alta estabilidade e baixa manutenção frente à corrosão, lixiviação e abrasão.

Embora sensores *in-line* e *non-invasive* não necessitem de etapas de amostragem, é convencional a instalação destes sensores em fluxos paralelos ao canal central do processo (*by-pass*). Desta forma, melhores condições para análise podem ser estabelecidas, principalmente controlando a pressão e temperatura, além de permitir a troca do sensor para limpeza, reparos ou calibração, sem interromper a linha de produção. Atualmente é possível encontrar grande diversidade de analisadores de processos para as mais variadas aplicações. No entanto, a incompatibilidade das características destes dispositivos dificulta a escolha do sensor apropriado, como por ex., uma análise lenta e bastante precisa por outra menos precisa, mas com maior velocidade. Para isso, van den Berg e colaboradores (*van den Berg, 2002*) propõem o cálculo de um fator M (*Measurability*), que expressa a eficiência no monitoramento de analisadores, podendo ser aplicado a qualquer processo. Para isso, são utilizados seis parâmetros técnicos: a finalidade do sensor, sua precisão, razão de amostragem, incerteza amostral, efeito de memória e frequência analítica e são excluídos aspectos comerciais ou econômicos. Utilizando o filtro Kalman, que inclui todas as variáveis importantes do processo, é possível obter um vetor de estado estimado para prever as variáveis do processo. O filtro Kalman, (*Grewal, 2001; Bakeev, 2005*) descrito por R. E. Kalman em 1960, consiste de um grupo de operações matemáticas que possibilita uma forma computacional de estimar o estado de um processo, minimizando o erro quadrático médio. Deste forma, o fator M é obtido em uma escala de 0 a 1, onde 1 é o estado ideal, representando 100% de reconstrução do processo estimado.

2. Sensores

Sensores são dispositivos capazes de fornecer continuamente informação química ou física de um sistema, convertendo esta informação em sinal elétrico (*Pons, 1992*). Em

princípio, um sensor consiste de três componentes: uma parte receptora sensível à determinada característica do sistema, um transdutor para converter a informação obtida em um sinal elétrico e um amplificador de sinal. Levando em conta o tipo de medida a que se destinam, os sensores existentes podem ser classificados como químicos ou físicos. Sensores físicos medem propriedades de natureza puramente física, como viscosidade, temperatura, índice de refração, etc. Sensores químicos reconhecem constituintes químicos, como a concentração de determinada substância. Sensores de identificação molecular baseados em processos bioquímicos (ou em reações) são convencionalmente chamados de biossensores, e podem ser considerados como um subgrupo dos sensores químicos. Independente do tipo de sensor, vários transdutores estão disponíveis e são baseados nos seguintes mecanismos:

- eletroquímico (voltamétrico, potenciométrico, transistores sensitizados quimicamente, etc);
- elétrico (semicondutores, semicondutores orgânicos, condutividade, dielétricos, etc);
- óptico (transmissão/absorção, reflexão, espalhamento, luminescência, índice de refração, efeito optotérmico, polarização, etc);
- sensíveis à variação de massa (piezoelétrico, superfície de onda acústica, etc);
- magnético (medidas de paramagnetismo);
- efeito térmico (medidas de mudança de temperatura).

2.1. Sensores físicos

Em processos industriais, sensores físicos são tão ou mais importantes que sensores químicos. Parâmetros como temperatura, fluxo, pressão, velocidade de agitação, viscosidade e densidade são largamente empregados nos mais diversos processos. De forma geral, sensores físicos não apresentam problemas relacionados à implementação em processos, apresentando baixos índices de inovação. Pons (*Pons, 1992*) e Considini (*Considini, 1985*) apresentam guias detalhados do emprego e geometria destes sensores.

2.2. Sensores químicos

Muitos tipos de instrumentos analíticos podem ser empregados para a análise em processos, desde os mais convencionais, como pHmetros e fotômetros, até instrumentos mais sofisticados, como Ressonância Magnética Nuclear. Cada sensor apresenta características específicas, juntamente com o sistema de amostragem empregado na obtenção ou coleta da amostra, constituindo um conjunto de parâmetros que define qual o melhor analisador a ser utilizado para a análise em tempo real de um processo industrial.

2.3. Técnicas de separação

A cromatografia gasosa (*Gas Chromatography* - GC) é uma das técnicas analíticas mais empregadas no monitoramento de processos industriais, basicamente devido à sua precisão e amplitude de aplicações (*Annimo, 1992*). Esta técnica baseia-se na adsorção e/ou desorção seletiva de gases em determinados adsorventes sólidos (fase estacionária). Historicamente, o monitoramento de muitos processos por GC era feito com colunas recheadas. No entanto, o desenvolvimento de colunas capilares com maior número de pratos teóricos, associado à programação de escalas de temperatura, tem contribuído para métodos mais rápidos e, conseqüentemente, para mudança destes sistemas. Os detectores mais empregados em GC para processos são de condutividade térmica, de ionização em chama, captura de elétrons e fotometria de chama, sendo que dentre estes, o detector de condutividade térmica é o mais empregado, devido à sua simplicidade (*Hassel, 1998*). Um importante sistema de detecção em GC provém da hifenação com a espectrometria de massas (*Mass Spectrometry* - MS) proporcionando maior resolução de sinal e permitindo medidas em sistemas complexos. A miniaturização destes sistemas é uma das grandes tendências atuais em GC para processos, com baixo custo de implementação e manutenção, associados à alta resolução e precisão analíticas.

Etapas de separação ou pré-concentração, como SPME (*Solid Phase Micro Extraction*) podem ser necessárias para amostragem de líquidos em processos,

utilizando GC. Matz *et al.* (Matz, 1996) propuseram a utilização de TMDA (*Thermal Membrane Desorption Application*) como sistema de amostragem automático para GC-MS, em um processo biotecnológico. A técnica TMDA permite adsorver compostos orgânicos em um polímero e, utilizando um pulso térmico, liberar estes compostos. Desta forma, apresenta vantagens sobre o sistema SPME, proporcionando análise simultânea de gases. Posteriormente, os autores utilizaram o mesmo sistema para análise de compostos orgânicos voláteis (*Volatile Organic Compounds - VOC*), monitorando um processo de fermentação.

A principal vantagem destacada pelos autores foi o emprego de TMDA entre a coluna e o espectrômetro de massas, diminuindo a necessidade de solventes (Matz, 1998). Traços de VOCs também foram analisados *on-line* por GC, em chaminés de incineradores, mas necessitando de etapas de preparação e concentração (Lemieux, 1998). Recentemente, Eiceman e colaboradores (Eiceman, 2004) revisaram a técnica de GC, mostrando os principais desenvolvimentos e aplicações desta técnica na área de monitoramento contínuo. No entanto, as principais aplicações de GC em processos industriais continuam sendo na área petroquímica, monitoramento de fumaças de incineradores e análise ambiental. Outros sistemas de separação como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia com fluido supercrítico (*Supercritical Fluid Chromatography - SFC*) também têm sido utilizados em monitoramento de processos, no entanto, com um número menor de aplicações. Eletroforese capilar (*Capillary Electrophoresis - CE*) apresenta um potencial bastante grande na separação de compostos, devido ao seu elevado número de pratos teóricos. No entanto, seu uso em processos fica restringido pela dificuldade da etapa de introdução da amostra. Por outro lado, o tempo de vida útil não muito elevado das colunas cromatográficas, associado a um elevado custo de manutenção e implementação, a restrição para sistemas líquidos e o tempo de análise são os principais problemas desta técnica (Hassel, 1998).

Uma alternativa ao longo período de medida (em torno de 15 min para sensores *on-line* baseado em GC) está sendo o desenvolvimento da técnica de *comprehensive two-dimensional GC* ou GCxGC, tendo sido revisada por Dimandja (Dimandja, 2004).

GCxGC pode ser considerada como o estado da arte em GC, com muitas aplicações nas áreas de análise de alimentos (*Adahchour, 2003*), ambiental (*Frysiner, 2003*), petroquímica (*Prazen, 2001*), pesticidas (*Zrostlikova, 2003*), óleos essenciais (*Shellie, 2003a; Shellie, 2003b*), drogas (*Kueh, 2003*) e hidrocarbonetos (*Hyotylainen, 2002*). GCxGC é uma técnica que consiste em acoplar seqüencialmente duas colunas cromatográficas, a primeira geralmente com caráter de baixa polaridade e a segunda coluna, de menor dimensão, com caráter mais polar. O objetivo é ortogonalizar o mecanismo de separação (*Ryan, 2003*), como separar os compostos pelo ponto de ebulição na primeira coluna e na segunda, por um mecanismo específico de retenção. Um modulador é introduzido entre as duas colunas, seqüenciando o fluxo da primeira coluna e realizando separações rápidas das frações nesta coluna, geralmente não mais que 2 ou 3 s. Desta forma, separações ortogonais são realizadas, não necessitando da separação total em um único módulo, pois as colunas são complementares. Os dados gerados são apresentados em matrizes de duas dimensões (coluna 1 x coluna 2), possibilitando maior resolução dos picos, principalmente se forem utilizados métodos quimiométricos de segunda ordem (*Sinha, 2004*). No entanto, esta técnica tem poucas aplicações na análise de processos industriais até o presente momento. Uma exceção é a utilização de GCxGC como um analisador rápido *on-line* de nafta (*Prazen, 2001*), sendo 16 vezes mais rápido que o método padrão, que utiliza GC convencional. Para maiores detalhes sobre as características do equipamento utilizado, os autores citam trabalhos realizados anteriormente (*Bruckner, 1998; Fraga, 2000; Fraga, 2001*).

2.4. Técnicas espectroscópicas

As principais técnicas espectroscópicas aplicadas em processos incluem a espectroscopia de absorção, espalhamento, reflexão e emissão nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho, além de espectrometria de massa e técnicas luminescentes. As técnicas espectroscópicas apresentam larga aplicação em processos industriais, tanto em sistemas *on-line*, *in-line*, como em *non-invasive*.

Principal concorrente das técnicas cromatográficas, as técnicas espectroscópicas

apresentam a vantagem de serem mais rápidas, com a obtenção de espectros em poucos segundos. No entanto, processos ou amostras com mais de uma espécie química apresentam uma alta sobreposição espectral, principalmente aquelas que utilizam a região do infravermelho. Para a resolução destes sistemas, é necessária a utilização de métodos de separação matemática, como as técnicas de estatística multivariada (quimiometria).

Técnicas ópticas são capazes de realizar medidas quase instantâneas, empregando detectores com arranjo de diodos ou métodos multiplexados, como Fourier e Hadamard, devido à ausência de monocromadores móveis. Nestes casos, a informação de mais de 10 canais localizados em posições diferentes em uma linha do processo pode ser transmitida simultaneamente por um cabo de fibra óptica. Digital ou analógica, esta transmissão permite o monitoramento destes vários canais com a utilização de apenas um espectrômetro (*Kellner, 1998; Kueppers, 2001*).

A espectroscopia eletrônica (UV-Vis) baseia-se em transições eletrônicas intra-atômicas ou moleculares, responsáveis pela absorção de radiação luminosa na região do ultravioleta (200-400 nm) e no visível (400-800 nm). Embora bastante utilizada por mais de 50 anos, esta técnica ainda continua sendo importante para monitoramento de processos de polimerização, biológicos, petroquímicos e farmacêuticos. O desenvolvimento de detectores de alta resolução e precisão, como CCD (*Charged Coupled Devices*), não apenas propiciou excelente eficiência nas medições, mas também de equipamentos de óptica acessível, que incluem a faixa do infravermelho próximo de ondas curtas (ou *Shortwave Near Infrared SW-NIR*). A região SW-NIR compreende a faixa espectral entre 800 a 1100 nm e tem sido utilizada na análise em tempo real de processos de polimerização (*Smilde, 2002*) e alimentos. A espectroscopia visível é restrita a sistemas com grupos cromóforos conjugados, além de apresentar bandas largas e alta sobreposição, dificultando determinações em sistemas com multicomponentes.

Noui e colaboradores (*Noui, 2002*) descrevem a construção e calibração de um espectrofotômetro UV de alta resolução, apropriado para monitoramento *at-line* de

várias espécies em diferentes tipos de bioprocessos. Utilizando amostras sintéticas de albumina bovina juntamente com ácido ribonucleico (RNA) e amostras reais de *S. cerevisiae*, os autores testaram o equipamento para monitorar a floculação seletiva em processos de purificação do microorganismo. O equipamento desenvolvido foi capaz de obter mais de 16 espectros por segundo, apresentando exatidão e precisão com potencial para ser utilizado em outros processos em que análises multivariadas são exigidas.

Outra interessante aplicação da espectroscopia UV-Vis envolveu o monitoramento *on-line* de um reator enzimático empregado para o descoloramento de tinturas (Kandelbauer, 2004). A poluição de mananciais e rios pelo lançamento de dejetos industriais com altas cargas de compostos orgânicos constitui sério problema de caráter ambiental e social. Apesar de uma grande quantidade de métodos físicos e químicos serem propostos para a redução ou degradação destes compostos em efluentes, métodos baseados em mecanismos biotecnológicos apresentam impactos menores ao meio ambiente (Eriksson, 1991). Empregando lacase imobilizada em fase sólida, em um sistema de fluxo fechado, os autores investigaram a ação desta enzima frente a diferentes tipos de corantes empregados na indústria têxtil. O sistema foi monitorado em diversos pontos através de medidas de reflectância difusa para estudar a adsorção sobre a enzima imobilizada. Também foram realizadas medidas de transmissão de uma sonda imersa, posicionada no reservatório de corante, para monitorar a descoloração. Relacionando os resultados obtidos através de medidas fotométricas univariadas e espectroscopia de massas como métodos de referência, os autores conseguiram efetuar o monitoramento *on-line* das reações em solução e na superfície imobilizadora. Apesar do trabalho desenvolvido utilizar um reator de escala média (< 10 L), o trabalho apresenta potencial de aplicação no tratamento de efluentes provenientes da indústria têxtil.

Também a técnica de espectrofotometria UV-Vis foi utilizada para o monitoramento *in-line* em processos industriais (Langergraber, 2004). Um espectrômetro UV-Vis submerso foi desenvolvido e proposto como um sensor *in-line* multifuncional para monitoramento de águas residuais provenientes da indústria

papeleira, também podendo ser utilizado para monitoramento de águas subterrâneas. Obtendo-se medidas espectrais multivariadas, o dispositivo é utilizado para monitoramento simultâneo de demanda química de oxigênio (DQO), DQO filtrado, sólidos suspensos totais (SST) e nitrato em uma planta de tratamento de águas residuais de uma indústria papeleira. Como o espectrômetro desenvolvido atua como uma sonda, em um processo *in-line*, etapas de amostragem, preparação de amostra e emprego de reagentes não são necessários. Um sistema de auto-limpeza evita o desenvolvimento de filmes orgânicos na superfície óptica, juntamente com um caminho óptico ajustável de 2 a 100 mm, o que permite a análise de águas ultra-puras até efluentes com carga orgânica bastante alta. Utilizando calibração multivariada (*Partial Least Squares – PLS*), os autores propuseram o dispositivo para análise de efluentes da indústria papeleira.

De modo geral, a espectroscopia UV-Vis tem apresentado aplicações importantes no controle de processos. No entanto, é com as técnicas de espectroscopia vibracional (infravermelho próximo, médio e Raman) que vantagens como seletividade espectral, associação de bandas e espectros mais representativos são obtidas.

A espectroscopia no infravermelho próximo (*Near Infrared Spectroscopy – NIRS*) compreende a faixa espectral de 780 a 2500 nm (ou 12800 a 4000 cm^{-1}). Bandas de absorção relativamente específicas permitem seletividade espectral capaz de possibilitar determinações de diversos compostos simultaneamente, com auxílio de métodos quimiométricos. Sondas e fibras ópticas de quartzo podem ser empregadas, permitindo análises multiplexadas em pontos distantes de um processo. Uma das principais vantagens da espectroscopia NIR é o baixo custo do equipamento, em relação à espectroscopia no infravermelho médio, sendo que a maioria destes sensores são utilizados como sistemas *in-line* (*Pasquini, 2003*). Instrumentos utilizando transformada de Fourier ou filtros apresentam vasta aplicabilidade em processos industriais (*Workman, 1999*), devido à alta velocidade das medidas espectrais e reduzida (ou nenhuma) preparação de amostras. Em vista disto, das técnicas espectroscópicas talvez a NIRS seja a que apresente o maior número de aplicações no monitoramento de

processos de alimentos (*Sahni, 2004; Singh, 1996*), farmacêuticos (*Fevotte, 2004*), polímeros (*Othman, 2004*), ambiental (*Hansson, 2003*), combustíveis (*Nordberg, 2000*) e mais recentemente, em bioprocessos (*Garrido-Vidal, 2004; Navratil, 2004; Giavasis, 2003*).

O emprego da espectroscopia NIR para controle de matérias-primas em processos de manufaturamento é tão apropriado que pode ser considerado como ‘a seqüência lógica’ para o monitoramento destes processos, chegando a ser uma técnica recomendada pela própria agência americana FDA (*U.S. Food and Drugs Administration*) (www.fda.gov). Em decorrência desta expansão da espectroscopia NIR como uma técnica alternativa de identificação e quantificação, figuras analíticas de mérito (FAM) têm sido propostas para estabelecer critérios de avaliação em relação aos métodos padrão de análise (*Braga, 2004*).

A região do infravermelho médio (MIR) apresenta maior seletividade devido à região de impressão digital (*fingerprint*). Compreendendo a região de 2500 a 50000 nm (4000 a 200 cm^{-1}), esta técnica também é bastante utilizada em processos, mas em uma escala muito menor em relação ao NIR. Instrumentos com transformadas de Fourier são padrão na área, permitindo além de varreduras rápidas, alta precisão e melhor relação sinal ruído. Em contrapartida ao NIR, os sensores empregando a região MIR utilizam principalmente o sistema ATR (*Attenuated Total Reflectance*), nos modos *non-invasive* (onde a janela transparente é o próprio cristal de ATR) ou *on-line*. Inicialmente, forte sobreposição espectral na região da impressão digital restringiu o uso desta técnica em determinações com muitos componentes. Atualmente, com a utilização de métodos matemáticos de análise multivariada, podem ser desenvolvidas determinações simultâneas em sistemas complexos.

A espectroscopia Raman aplicada em processos tem apresentado um forte desenvolvimento nos últimos anos. Isto ocorre devido à excelente eficiência de fibras ópticas na região do visível e NIR, onde lasers pequenos, portáteis e refrigerados podem ser utilizados para excitação. Também o desenvolvimento de lasers na região do NIR, que provoca menor fluorescência, tem provocado aumento na utilização do

Raman. Detectores de alta resolução, como CCD, permitem aquisição de espectros em segundos. Devido às transições vibracionais fundamentais, os espectros de Raman são bastantes simples e seletivos, o que se mostra como vantagem na análise de processos (Kellner, 1998). Assim como as técnicas de análise no infravermelho médio e próximo, a maioria dos casos em espectroscopia Raman se dá com o emprego de sensores de geometria *in-line*.

Métodos luminescentes também são bastante utilizados em processos e englobam três técnicas, que utilizam os fenômenos de quimiluminescência, fosforescência e fluorescência. A fluorimetria tem sido utilizada para monitoramento de processos industriais, principalmente processos biológicos. Fluorímetros empregando filtros móveis para excitação e emissão permitem aquisição de matrizes de excitação e emissão, em poucos segundos. Em bioprocessos, estes dispositivos podem ser empregados para monitoramento *on-line* ou *non-invasive* (Marose, 1998).

A espectrometria de massa, embora seja utilizada como técnica de identificação, não é largamente usada no monitoramento de processos industriais. A dificuldade de implementação deste sistema é o custo e a etapa de introdução da amostra. Uma possível solução para estes problemas são a crescente miniaturização, reduzindo custos, e sistemas de introdução da amostra por membranas (*Membrane Introduction Mass Spectrometry - MIMS*) (Kotiaho, 1991).

O sistema MIMS surgiu como um método rápido, simples e com alta sensibilidade, permitindo um grande número de aplicações de EM para monitoramento em tempo real de processos. Este sistema tem sido aplicado para análises de compostos orgânicos voláteis ou semi-voláteis (Nogueira, 1999).

2.5. Biossensores

Novos biossensores estão sendo desenvolvidos para possibilitar sistemas de detecção de menor tamanho e maior sensibilidade e seletividade, além de maior rapidez de análise. Outras aplicações envolvem a utilização de métodos fluorimétricos utilizando proteínas com grupos fluorescentes para estudos genéticos e de biologia

molecular (*Workman, 1999*). Apesar destes sensores já apresentarem desenvolvimento significativo na área de análises clínicas, principalmente devido ao baixo custo e à alta seletividade, poucas aplicações para monitoramento de processos têm sido desenvolvidas (*Andreescu, 2004*).

2.6. Técnicas eletroquímicas

Estas técnicas foram as primeiras a serem utilizadas e, por isso, ainda praticamente dominam o cenário da PAC. Dispositivos baseados em análise de pH, condutividade, potenciometria e amperometria têm sido utilizados por muitos anos e certamente continuarão sendo empregados (*Workman, 2003*). No entanto, os sistemas continuam sendo basicamente os mesmos, sem grandes mudanças. Uma análise detalhada destes sensores pode ser encontrada em *Considini (1985)*.

2.7. Química de via úmida

Os sistemas de análise mais importantes baseados em química de via úmida são análise por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis - FIA*), análise de fluxo contínuo e titulação. FIA é uma das técnicas mais antigas de análise de processos, sendo uma poderosa técnica para pré-tratamento de amostras rápido e automático, com separações não cromatográficas e podendo ser associada a uma grande variedade de métodos de detecção (*Workman, 2003*). Em contrapartida, a pouca oferta de propostas comercialmente disponíveis e viáveis mostra-se como fator limitante na implementação de FIA em processos (*Kellner, 1998*).

3. Perspectivas

Este trabalho teve como objetivos apresentar as principais técnicas analíticas utilizadas na Química Analítica de Processos. Uma breve apresentação da PAC no contexto histórico e acadêmico foi feita, seguida por uma explanação sobre os princípios

teóricos de cada técnica. Pontos de relevância para a implementação destas técnicas como sensores em processos foram discutidos, juntamente com as principais vantagens e desvantagens destes dispositivos. Exemplos atuais relevantes para a Química de Processos foram mostrados, com detalhamento de algumas aplicações específicas.

A principal tendência para a implementação de sensores em processos continua sendo a miniaturização, o que permite redução de reagentes e resíduos, além de menor custo de implementação e manutenção, contribuindo para a sustentabilidade. Desenvolvimento de sensores virtuais auto-suficientes, com capacidade para desenvolver calibrações internas e auto-controle, minimizando o impacto da variabilidade da matéria-prima no decorrer do processo também pode ser considerado uma tendência na análise em processos.

4. Referências:

(Adahchour, 2003) Adahchour, M.; van Stee, L.L.P.; Beens, J.; Vreuls, R.J.J.; Batenburg, M.A.; Brinkman, U.A.T.; *Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection for the trace analysis of flavour compounds in food*. J. Chromatogr. A, 1019 (2003) 157-172.

(Andreescu, 2004) Andreescu, S.; Sadik, O.A.; *Trends and challenges in biochemical sensors for clinical and environmental monitoring*. Pure Appl. Chem., 76 (2004) 861-878.

(Animo, 1992) Animo, R.; Villalobos, R.; *Process gas chromatography: fundamentals and applications*. Research Triangle Park: North Carolina, 1992.

(Bakeev, 2005) Bakeev, K.A.; *Process Analytical Technology*. Backwell: USA, 2005.

(Braga, 2004) Braga, J.W.B.; Poppi, R.J.; *Validation of models of multivariate calibration: an application in the determination of polymorphic purity of carbamazepine by near infrared spectroscopy*. Quim. Nova, 27 (2004) 1004-1011.

(Bruckner, 1998) Bruckner, C.A.; Prazen, B.J.; Synovec, R.E.; *Comprehensive two*

dimensional high-speed gas chromatography with chemometric analysis. Anal. Chem., 70 (1998) 2796-2804.

(Callis, 1987) Callis, J.B.; Illman, D.L.; Kowalski, B.R.; *Process analytical chemistry.* Anal. Chem., 59 (1987) A624-&.

(Chavel, 2002) Chauvel, J.P.; Henslee, W.W.; Melton, L.A.; *Teaching process analytical chemistry.* Anal. Chem., 74 (2002) 380A-384A.

(Considini, 1985) Considini, D.M.; *Process Instruments and Controls Handbook.* 3rd ed., McGraw-Hill: New York, 1985.

(Dimandja, 2004) Dimandja, J.M.D.; *GC x GC.* Anal. Chem., 76 (2004) 167A-174A.

(Eiceman, 2004) Eiceman, G.A.; Gardea-Torresdey, J.; Overton, E.; Carney, K.; Dorman, F.; *Gas chromatography.* Anal. Chem., 76 (2004) 3387-3394.

(Eriksson, 1991) Eriksson, K.E.L.; *Biotechnology – 3 approaches to reduce the environmental-impact of the pulp and paper-industry.* Sci. Prog., 75 (1991) 175-189.

(FDA – Guidance for industry) Guidance for industry. *PAT – A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance.* FDA. September 2004.

(Fevotte, 2004) Fevotte, G.; Calas, J.; Puel, F.; Hoff, C.; *Applications of NIR spectroscopy to monitoring and analyzing the solid state during industrial crystallization processes.* Int. J. Pharm., 273 (2004) 159-169.

(Fraga, 2000) Fraga, C.G.; Prazen, B.J.; Synovec, R.E.; *Comprehensive two-dimensional gas chromatography and chemometrics for the high-speed quantitative analysis of aromatic isomers in a jet fuel using the standard addition method and an objective retention time alignment algorithm.* Anal. Chem., 72 (2000) 4154-4162.

(Fraga, 2001) Fraga, C.G.; Bruckner, C.A.; Synovec, R.E.; *Increasing the number of analyzable peaks in comprehensive two dimensional separations through chemometrics.* Anal. Chem., 73 (2001) 675-683.

(Frysiner, 2003) Frysiner, G.S.; Gaines, R.B.; Xu, L.; Reddy, C.M.; *Resolving the unresolved complex mixture in petroleum-contaminated sediments*. Environ. Sci. Technol., 37 (2003) 1653-1662.

(Garrido-Vidal, 2004) Garrido-Vidal, D.; Esteban-Diez, I.; Perez-del-Notario, N.; Gonzalez-Saiz, J.M.; Pizarro, C.; *On-line monitoring of kinetic and sensory parameters in acetic fermentation by near infrared spectroscopy*. J. Near Infrared Spectrosc., 12 (2004) 15-27.

(Giavasis, 2003) Giavasis, I.; Robertson, I.; McNeil, B.; Harvey, L.M.; *Simultaneous and rapid monitoring of biomass and biopolymer production by Sphingomonas paucimobilis using Fourier transform-near infrared spectroscopy*. Biotechnol. Lett., 25 (2003) 975-979.

(Grewal, 2001) Grewal, M.S.; Andrews, A.P.; *Kalman Filtering: Theory and Practice Using MATLAB*. 2nd ed., John Wiley & Sons: USA, 2001.

(Hansson, 2003) Hansson, M.; Nordberg, A.; Mathisen, B.; *On-line NIR monitoring during anaerobic treatment of municipal solid waste*. Water Sci. Technol., 48 (2003) 9-13.

(Hassel, 1998) Hassell, D.C.; Bowman, E.M.; *Process analytical chemistry for spectroscopists*. Appl. Spectrosc., 52 (1998) 18A-29A.

(Henry, 2004) Henry, C.M.; *Celebrating 20 years of service to industry*. Chem. Eng. News, 82 (20) (2004) 40-41.

(Honigs, 1987) Honigs, D.E.; *The importance of time to process analytical chemistry*. Am. Lab., 19 (1987) 48-&.

(Hyotylainen, 2002) Hyotylainen, T.; Kallio, M.; Hartonen, K.; Jussila, M.; Palonen, S.; Riekkola, M.L.; *Modulator design two-dimensional for comprehensive gas chromatography: Quantitative analysis of polyaromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls*. Anal. Chem., 74 (2002) 4441-4446.

(Inczedy, 1990) Inczedy, J.; *Teaching of process analytical chemistry*. Anal. Chim. Acta,

238 (1990) 63-69.

(Kandelbauer, 2004) Kandelbauer, A.; Maute, O.; Kessler, R.W.; Erlacher, A.; Gübitz, G. M.; *Study of dye decolorization in an immobilized laccase enzyme-reactor using online spectroscopy*. *Biotechnol. Bioeng.*, 87 (2004) 552-563.

(Kellner, 1998) Kellner, R.; Mermet, J.M.; Otto, M.; Widmer, H.M.; *Analytical Chemistry*. Wiley-VCH: Weinheim, 1998.

(Kelly, 1989) Kelly, J.J.; Barlow, C.H.; Jinguji, T.M.; Callis, J.B.; *Prediction of gasoline octane numbers from near-infrared spectral features in the range 660-1215 nm*. *Anal. Chem.*, 61 (1989) 313-320.

(Koch, 1999) Koch, K.H.; *Process Analytical Chemistry: Control, Optimization, Quality, Economy*. Springer: Berlin, 1999.

(Kotiaho, 1991) Kotiaho, T.; Lauritsen, F.R.; Choudhury T.K.; Cooks, R.G.; Tsao, G.T.; *Membrane introduction mass-spectrometry*. *Anal. Chem.*, 63 (1991) 875A-&.

(Kueh, 2003) Kueh, A.J.; Marriott, P.J.; Wynne, P.M.; Vine, J.H.; *Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography to drugs analysis in doping control*. *J. Chromatogr. A*, 1000 (2003) 109-124.

(Kueppers, 2003) Kueppers, S.; Haider, M.; *Process analytical chemistry - future trends in industry*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 376 (2003) 313-315.

(Langergraber, 2004) Langergraber, G.; Fleischmann, N.; Hofstaedter, F. Weingartner, A.; *Monitoring of a paper mill wastewater treatment plant using UV/VIS spectroscopy*. *Water Sci. Technol.*, 49 (2004) 9-14.

(Lemieux, 2000) Lemieux, P.M.; Ryan, J.V.; Preston, W.T.; *Analyzing a waste gas stream to determine the concentrations of volatile organic compounds, involves periodically feeding concentrated gas samples to a gas chromatograph for analysis of the gas samples*, US patent number: US6165251-A, 2000.

(Marose, 1998) Marose, S.; Lindemann, C.; Scheper, T.; *Two-dimensional fluorescence spectroscopy: A new tool for on-line bioprocess monitoring*. Biotechnol. Prog., 14 (1998) 63-74.

(Matz, 1996) Matz, G.; Lennemann, F.; *On-line monitoring of biotechnological processes by gas chromatographic mass spectrometric analysis of fermentation suspensions*. J. Chromatog. A, 750 (1996) 141-149.

(Matz, 1998) Matz, G.; Loogk, M.; Lennemann, F.; *On-line gas chromatography mass spectrometry for process monitoring using solvent free sample preparation*. J. Chromatogr. A, 819 (1998) 51-60.

(Navratil, 2004) Navratil, M.; Cimander, C.; Mandenius, C.F.; *On-line multisensor monitoring of yogurt and Filmjolk fermentations on production scale*. J. Agric. Food Chem., 52 (2004) 415-420.

(Nogueira, 1999) Nogueira, R.F.P.; Alberici, R.M.; Mendes, M.A.; Jardim, W.F.; Eberlin, M.N.; *Photocatalytic degradation of phenol and trichloroethylene: On-line and real-time monitoring via membrane introduction mass spectrometry*. Ind. Eng. Chem. Res., 38 (1999) 1754-1758.

(Nordberg, 2000) Nordberg, A.; Hansson, M.; Sundh, I.; Nordkvist, E.; Carlsson, H.; Mathisen, B.; *Monitoring of a biogas process using electronic gas sensors and near-infrared spectroscopy (NIR)*. Water Sci. Technol., 41 (2000) 1-8.

(Noui, 2002) Noui, L.; Hill, J.; Keay, P.J.; Wang, R.Y.; Smith T.; Yeung, K.; Habib, G.; Hoare, M.; *Development of a high resolution UV spectrophotometer for at-line monitoring of bioprocesses*. Chem. Eng. Process., 41 (2002) 107-114.

(Othman, 2004) Othman, N.S.; Fevotte, G.; Peycelon, D.; Egraz, J.B.; Suau, J.M.; *Control of polymer molecular weight using near infrared spectroscopy*. AIChE J., 50 (2004) 654-664.

(Pasquini, 2003) Pasquini, C.; *Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications*. J. Braz. Chem. Soc., 14 (2003) 198-219.

(Pons, 1992) Pons, M.-N.; in *Bioprocess monitoring and control*; Pons, M. -N., ed.; Oxford Univ. Press: Munich, 1992.

(Prazen, 2001) Prazen, B.J.; Johnson, K.J.; Weber, A.; Synovec, R.E.; *Two-dimensional gas chromatography and trilinear partial least squares for the quantitative analysis of aromatic and naphthene content in naphtha*. Anal. Chem., 73 (2001) 5677-5682.

(Ryan, 2003) Ryan, D.; Marriott, P.; *Comprehensive two-dimensional gas chromatography*. Anal. Bioanal. Chem., 376 (2003) 295-297.

(Sahni, 2004) Sahni, N.S.; Isaksson, T.; Naes, T. *In-line near infrared spectroscopy for use in product and process monitoring in the food industry*. J. Near Infrared Spectrosc., 12 (2004) 77-83.

(Shellie, 2003a) Shellie, R.A.; Marriott, P.J.; *Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry analysis of Pelargonium graveolens essential oil using rapid scanning quadrupole mass spectrometry*. Analyst, 128 (2003) 879-883.

(Shellie, 2003b) Shellie, R.; Marriott, P.; *Opportunities for ultra-high resolution analysis of essential oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography: a review*. Flavour Frag. J., 18 (2003) 179-191.

(Shinskey, 1994) Shinskey, F.G.; *Feedback Controllers for the Process Industries*. McGraw-Hill: New York, 1994.

(Singh, 1996) Singh, P.C.; Bhamidipati, S.; Singh, R.K.; Smith, R.S.; Nelson, P.E.; *Evaluation of in-line sensors for prediction of soluble and total solids/moisture in continuous processing of fruit juices*. Food Control, 7 (1996) 141-148.

(Sinha, 2004) Sinha, A.E.; Fraga, C.G.; Prazen, B.J.; Synovec, R.E.; *Trilinear chemometric analysis of two-dimensional comprehensive gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry data*. J. Chromatogr. A, 1027 (2004) 269-277.

(Smilde, 2002) Smilde, A.K.; van den Berg, F.W.J.; Hoefsloot, H.C.J.; *How to choose the right process analyzer*. Anal. Chem., 74 (2002) 368A-373A.

(Trevisan, 2006a) Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; *Process Analytical Chemistry*. Quím. Nova, 29 (2006)1065-1071.

(van den Berg, 2002) van den Berg, F.W. J.; Hoefsloot, H.C.J.; Smilde, A.K.; *Selection of optimal process analyzers for plant wide monitoring*. Anal. Chem., 2002, 74, 3105-3111.

(Workman, 1999) Workman, J.J.; *Review of process and non-invasive near-infrared and infrared spectroscopy: 1993-1999*. Appl. Spectrosc. Reviews, 34 (1999) 1-89.

(Workman, 2001) Workman, J.; Creasy, K.E.; Doherty, S.; Bond, L.; Koch, M.; Ullman, A.; Veltkamp, D. J.; *Process analytical chemistry*. Anal. Chem., 73 (2001) 2705-2718.

(Workman, 2003) Workman, J.; Koch, M.; Veltkamp, D.J.; *Process analytical chemistry*. Anal. Chem., 75 (2003) 2859-2876.

(www.cpac.washington.edu) <http://www.cpac.washington.edu/>, acessada em março 2009.

(www.fda.gov/cder) <http://www.fda.gov/cder/ops/pat.htm>, acessada em março 2009.

(www.wikipedia.org) http://en.wikipedia.org/wiki/Six_sigma, acessada em março de 2009.

(Zrostlikova, 2003) Zrostlikova, J.; Hajslova, J.; Cajka, T.; *Evaluation of two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticide residues in fruit*. J. Chromatogr. A, 1019 (2003) 173-186.

Capítulo 2.

“Determinação direta de um intermediário de síntese da efedrina em uma reação de biotransformação usando espectroscopia no infravermelho médio e PLS.”

1. Introdução

A biotecnologia tem sido utilizada por milênios, especialmente na produção de alimentos fermentados, no entanto, foi somente a partir da produção de penicilina durante a Segunda Grande Guerra, que a atenção da biotecnologia foi dirigida para a produção farmacêutica (Goodman, 1987). Embora a quiralidade seja a característica mais interessante das reações biotecnológicas, com elevada estereoseletividade e excesso enantiomérico (e.e.), outras vantagens podem ser obtidas, como as contribuições para as tecnologias sustentáveis (química verde) (Schoemaker, 2003). Segundo o relatório de comércio e investimentos do Reino Unido (www.uktradeinvest.gov.uk), rotas sintéticas microbiológicas e enzimáticas estão crescendo quando comparadas com rotas sintéticas de substâncias químicas puras: as indústrias de biotecnologia da Europa foram responsáveis por uma renda de \$19,1 bilhões de dólares americanos em 2003, produzindo intermediários complexos e produtos para as indústrias farmacêuticas, agroquímicas e de aromas.

Biotransformação é um processo industrial bem estabelecido e um dos processos mais economicamente significantes para a produção de substâncias farmacêuticas (Macauley-Patrick, 2003). O monitoramento de processos biotecnológicos é um requisito indispensável e muitas técnicas de análise *on-line* tem sido utilizadas para realizar este procedimento (Callis, 1987), especialmente após a iniciativa PAT feita pelo órgão americano FDA (FDA, 2003). Convencionalmente, o monitoramento de bioprocessos é conduzido de forma *off-line*, utilizando técnicas instrumentais como GC-MS e HPLC. Entretanto, são as técnicas de análise *in-line* que são especialmente utilizadas quando remover uma amostra de um reator é um processo problemático, onde, por exemplo, existam reações de toxicidade operacional e/ou a esterilidade é fator crítico, ou ainda, quando a distância do equipamento analisador é uma desvantagem (Bird, 2002) e por último, quando existem reações rápidas ou substratos que se decompõem facilmente.

Como bem exemplificado por Gavrilescu e Chisti (*Gavrilescu, 2005*), muitos produtos tradicionalmente químicos e farmacêuticos agora são produzidos por rotas biológicas. A biocatálise na preparação de produtos farmacêuticos ativos (*Active Pharmaceutical Ingredients - API*) é somente um setor nesse campo (*Gotor, 2002; Rasor, 2001; Zaks, 1997*). A efedrina, por exemplo, substância muito utilizada para aumentar o estado de alerta e reduzir a fadiga, foi um dos primeiros fármacos a ter a rota sintética desenvolvida por etapas biológicas (*Lourenço, 2004*).

As técnicas espectroscópicas possuem a vantagem da velocidade, determinação simultânea multi-analito e a não destrutividade da amostra (*Ulber, 2003; Vaidyanathan, 1999*). Alta seletividade nas técnicas espectroscópicas pode ser obtida com métodos fluorimétricos, entretanto, estas técnicas só são indicadas quando os analitos apresentam naturalmente um grupo fluorescente (*Gourlay, 2002; Hagedorn, 2004*). As técnicas espectroscópicas vibracionais possuem características interessantes, como velocidade, não necessidade de manipulação e não uso de reagentes (*Hassell, 1998*) que apresentam grandes vantagens no monitoramento e controle de processos (*Gurden, 2002*). Embora rica em informação química, a espectroscopia no infravermelho é um método holístico, de modo que a quantificação em bioprocessos é fortemente influenciada pelas variações biológicas do meio de cultura (*Bro, 1998*). Entretanto, quando dados espectrais no infravermelho são analisados por técnicas de calibração multivariada, como quadrados mínimos parciais (*Partial Least Squares - PLS*) (*Martens, 1989*), é conhecido um bem conhecido conjunto de vantagens, como determinações multi-analitos (*Sivakesava, 2001; Blanco, 2004*). A MIRS apresenta alta seletividade em informações químicas, mas também mostra intensa sobreposição espectral, dificultando a identificação dos grupos funcionais, mesmo na região do *fingerprint*. A vantagem da NIRS em relação a MIRS é o baixo custo de instrumentação, especialmente quando usando sondas *in-line*, e sua óptica mais robusta (*McClure, 1994*). Métodos de separação ainda têm sido desenvolvidos e são utilizados para monitorar bioprocessos (*Kulp, 2002; Ehala, 2001; Schugerl, 2001; Liu, 2001*) tanto na academia como em situações industriais.

Neste trabalho, foi monitorado a reação de redução do 1-fenil-1,2-propanodiona em uma suspensão de células inteiras (*'whole-cell suspension'*) de *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de pão), produzindo um intermediário quiral utilizado na síntese de efedrina (Lourenço, 2004), em um sistema *on-line* por MIRS em uma cela de fluxo de ATR e *off-line* por GC-MS. A reação estudada, apresentada na Fig. 2.1, é uma reação em dois passos, onde o substrato 1-fenil-1,2-propanodiona (**A**) é biotransformado em dois intermediários: (R)-1-hidroxi-1-fenil-2-propanona (**B**) e (S)-2-hidroxi-1-fenil-1-propanona (**C**). No próximo passo, a biotransformação produz apenas um produto (1R, 2S)-1-fenil-1,2-propanodiol (**D**). Através dos perfis cinéticos obtidos por GC-MS (concentrações) e MIRS (espectros), foram construídos modelos multivariados baseados em PLS para realizar a previsão das concentrações das quatro espécies envolvidas na reação, rendendo um método alternativo com determinações diretas (sem preparo da amostra) e *on-line*, englobando as vantagens de ser não destrutivo, fechado, sem manipulação da amostra e passível de esterilização.

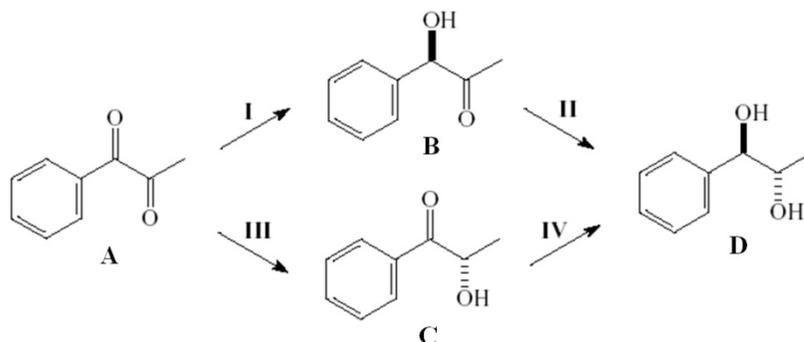


Figura 2.1. Esquema da reação proposta: 1-fenil-1,2-propanodiona (**A**); (R)-1-hidroxi-1-fenil-2-propanona (**B**); (S)-2-hidroxi-1-fenil-1-propanona (**C**) e (1R, 2S)-1-fenil-1,2-propanodiol (**D**).

2. Experimental

2.1. Reagentes e amostras

Foram utilizados neste trabalho amostras comercialmente disponíveis de fermento de pão (*S. cerevisiae*), liofilizadas em pó, (DSM Bakery, Noruega), ácido fosfórico 85% (Synth, Brasil), fosfato monobásico de potássio (Merck, Alemanha), 1-fenil-1,2-propanodiona (Sigma, EUA) e acetato de etila (IQ/Unicamp planta piloto). Foram utilizados reagentes de grau analítico e água desionizada obtida por sistema Milli-Q (Millipore Corp.) para preparar todas as soluções.

2.2. Aparatos e software

Foi construída uma cela de fluxo (Fig. 2.2) tendo com base um sistema ATR horizontal (HATR) com cristal de ZnSe e utilizada para obter todos os dados espectrais. O sistema de fluxo foi montado com tubos de silicone (diâmetro interno de 3 mm) conectados ao reator por uma bomba peristáltica (Ismatec IPC, Suíça) modelo 78001-22, produzindo vazão de 10 mL min⁻¹. O reator foi conectado a um banho térmico (Quimis, Brasil) modelo 215.M2.BS, para manter a temperatura constante em 32 ± 1 °C.

Os espectros foram obtidos em espectrômetro de infravermelho Bomen MB-100 FT-IR. Varreduras seqüenciais do meio reacional foram obtidas utilizando 16 varreduras cumulativas e resolução de 8 cm⁻¹. A faixa espectral foi de 2900 a 780 cm⁻¹.

A análise por GC com detecção seletiva de massas foi realizada em um equipamento Agilent 6890/HP 5973 equipado com coluna HP-5MS Agilent (5%-*Phenyl*)-*methylpolysiloxane* com 0,25 mm ID e 30 m). Hélio com vazão de 1 mL min⁻¹ foi utilizado como gás de arraste. A análise dos dados foi conduzida utilizando o software Matlab 6.5 (The MathWorks, EUA) com PLS toolbox (Eigenvector Technologies, EUA) (*Eigenvector Inc*, 2009) versão 3.5, em um microcomputador AMD Athlon 1.3 GHz com 256 Mb de RAM e com sistema operacional Fedora core 3.

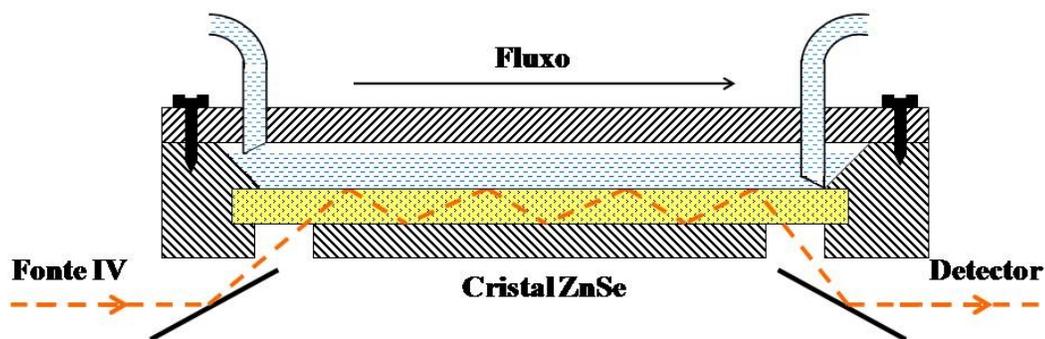


Figura 2.2. Cela de fluxo (*flow-through*) construída sob um sistema HATR. Detalhe para a remoção do material mais denso pela saída, com a localização mais inferior que a outra extremidade (entrada).

2.3. Procedimento

Foi preparado tampão fosfato pH 3,0 com 1,35 mL de ácido fosfórico e 27,2 g de fosfato monobásico de potássio e completando o volume com água desionizada Milli-Q até 1,00 L. A biotransformação foi conduzida em um reator artesanal de 250 mL montado sobre um agitador magnético e controlador de temperatura. A suspensão das células de fermento de pão foi preparada pela dissolução de 8,0 g do fermento seco em 100 mL de tampão fosfato e agitação por 5 minutos à 32°C. Uma solução de 1-fenil-1,2-propanodiona foi preparada dissolvendo 600 mg em 1 mL de etanol e adicionando ao reator.

2.4. Monitoramento e análise dos dados

As concentrações das quatro espécies envolvidas na reação foram obtidas pelo monitoramento *off-line* utilizando GC-MS com detecção da quantidade total de íons (*total ion chromatogram* – TIC). O monitoramento direto também foi estabelecido durante a mesma reação através da MIRS utilizando cela de fluxo HATR com um cristal de ZnSe construída especialmente para este trabalho. No monitoramento por GC, foram coletadas amostras de 1 mL da mistura reacional nos tempos de 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 horas e cada amostra de 1 mL foi extraído imediatamente com 6 mL de acetato de etila por 30 segundos após a sua retirada. Os perfis contínuos de concentração em

relação ao tempo (perfil cinético) foram estimados pelo ajuste de uma equação aos pontos individuais. Quatro diferentes equações cinéticas foram obtidas, descrevendo a variação das quatro espécies (A, B, C e D – Fig. 2.1) ao longo do tempo de reação. As amostras medidas no infravermelho foram analisadas diretamente no meio reacional, sem qualquer etapa de extração ou pré-concentração, ao longo de 3 h, em intervalos de 1 minuto, totalizando 188 espectros. Cada espectro foi composto de 16 espectros co-adicionados por 1 minuto de aquisição. Cada espectro é relativo a média de todas as variações que ocorrem durante este minuto de aquisição, e assim por diante. O branco espectral utilizado durante as medidas foi o espectro da cela vazia.

As equações cinéticas obtidas por GC-MS foram utilizadas para estimar as 4 concentrações através dos 188 tempos que os espectros de infravermelho foram obtidos. Desta forma, foi obtido um grupo de espectros no infravermelho (bloco X) e suas concentrações estimadas (bloco y). Estes dados foram divididos em dois sub-grupos: calibração e validação. Para o grupo de calibração, foram utilizadas as concentrações obtidas em 155 diferentes tempos (amostras) e para o grupo de validação, outros 33 tempos. Cada amostra do grupo de validação foi obtida em intervalos iguais (entre 5 pontos) de cada ponto do grupo de calibração.

Antes do desenvolvimento dos modelos, como pré-processamento, foi corrigida a variação da linha de base utilizando a função *baseline* do PLS toolbox. Foram desenvolvidos modelos PLS-1, isolados para cada substância na reação, totalizando quatro diferentes modelos. Foi escolhido o número ótimo de variáveis latentes pelo menor valor do erro quadrático médio por validação cruzada (*root mean squared error of cross-validation* - RMSECV) obtido pelo grupo de calibração com validação interna (*leave-one-out*) (Brereton, 2000), expresso pela equação 2.1:

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n-1}} \quad (2.1)$$

onde n é o número de amostras e \hat{y}_i e y_i são os valores previstos e de referência para i -ésima amostra, respectivamente. A eficiência dos modelos foi avaliada pelo erro

quadrático médio relativo da diferença de previsão percentual (*root mean squared prediction difference* - RMSPD), como se segue (Millerihli, 1984):

$$RMSPD = 100 * \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{\hat{y}_i - y_i}{y_i} \right)^2} \quad (2.2)$$

3. Resultados e discussão

3.1. Monitoramento da reação

A reação proposta resultou na redução do substrato 1-fenil-1,2-propanodiol usando uma suspensão de células inteiras de fermento de pão em tampão fosfato, e produzindo um intermediário que é utilizado na síntese da efedrina. Foi utilizada cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC-MS) para modelar a reação, obtendo os perfis cinéticos.

As alíquotas foram obtidas nos seguintes tempos: tempo inicial, após 30 min e depois em intervalos de 1 hora, até o período de 8 horas, conforme Fig. 2.3. O pico no tempo próximo a 5,91 minutos é referente ao substrato, os dois picos localizados nos tempos 6,44 e 6,67 são referentes aos intermediários (R)-1 e (S)-2 respectivamente, enquanto o pico no tempo 7,14 minutos faz referência ao produto final da reação.

As análises cromatográficas entre os tempos de 4 e 5 h foram realizadas com diferentes métodos, apresentando escalas diferentes. Para correção deste efeito, o somatório das áreas sob os picos foi considerado como 100%, corrigindo-se proporcionalmente, conforme Tabela 2.1 e 2.2. Os valores utilizados foram as áreas sob os picos cromatográficos dos somatórios das intensidades dos picos de massa (*Total Ion Chromatogram* – TIC).

Tabela 2.1. Valores das áreas (u.a.) sob os picos cromatográficos referente aos íons totais durante o monitoramento.

| Tempo/ espécie | 0 min | 30 min | 1 h | 2h | 3h | 4h | 5h | 6h | 7h | 8h |
|-------------------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|
| substrato | 24059528 | 10396199 | 5543727 | 1320672 | 547337 | 382765 | ND | ND | ND | ND |
| (R)-1 | 0 | 7462341 | 16280800 | 21629604 | 11824756 | 7444781 | 28100115 | 24297949 | 23840076 | 5419115 |
| (S)-2 | 0 | 6200988 | 13806346 | 18905896 | 10250170 | 6500219 | 27167929 | 23594713 | 22931456 | 4624944 |
| produto | 0 | 0 | 1096489 | 7608565 | 9193802 | 9777391 | 34077089 | 55688747 | 81213570 | 23800690 |
| área total | 24059528 | 24059650 | 36727362 | 49464737 | 31816065 | 24105156 | 89345133 | 103581409 | 127985102 | 34052292 |

ND = não detectado.

Tabela 2.2. Valores normalizados em porcentagem das áreas sob os picos cromatográficos durante o monitoramento.

| Tempo/ espécie | 0 min (%) | 30 min (%) | 1 h (%) | 2h (%) | 3h (%) | 4h (%) | 5h (%) | 6h (%) | 7h (%) | 8h (%) |
|-------------------|--------------|---------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| substrato | 100 | 43,21 | 15,09 | 2,67 | 1,72 | 1,59 | ND | ND | ND | ND |
| (R)-1 | 0 | 31,02 | 44,33 | 43,73 | 37,17 | 30,89 | 31,45 | 23,46 | 18,63 | 15,91 |
| (S)-2 | 0 | 25,77 | 37,59 | 38,22 | 32,22 | 26,97 | 30,41 | 22,78 | 17,92 | 13,58 |
| produto | 0 | 0 | 2,99 | 15,38 | 28,9 | 40,56 | 38,14 | 53,76 | 63,46 | 69,90 |

ND = não detectado.

O monitoramento por infravermelho foi conduzido utilizando uma cela artesanal de fluxo com HATR. O espectro de referência (vulgarmente dito branco ou zero espectral) utilizado foi o primeiro espectro obtido um minuto após a adição do substrato na reação, quando o meio se torna homogêneo. A Fig. 2.4A apresenta o espectro no infravermelho obtido durante as 3 horas de monitoramento em um gráfico de formato $x \cdot y \cdot z$ e a Fig. 2.4B a partir dos mesmos dados, mostra as principais variações de absorvância durante o monitoramento em um gráfico 2D.

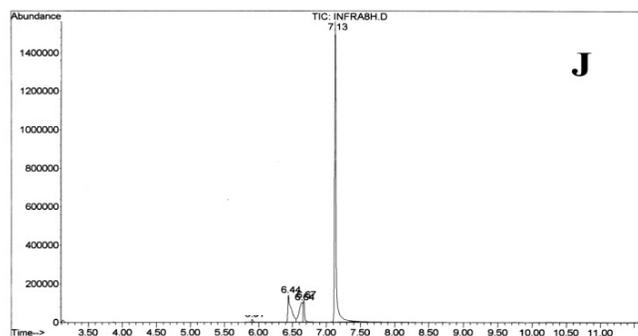
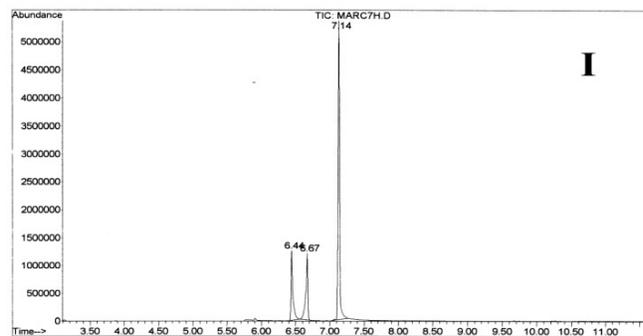
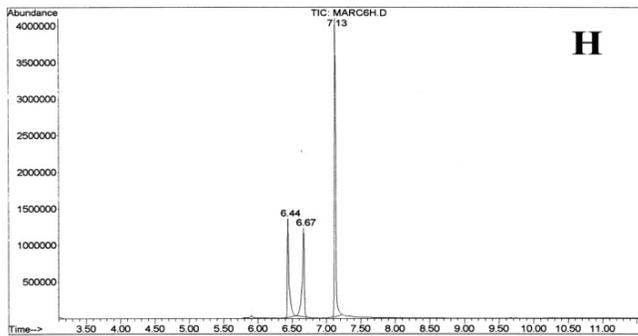
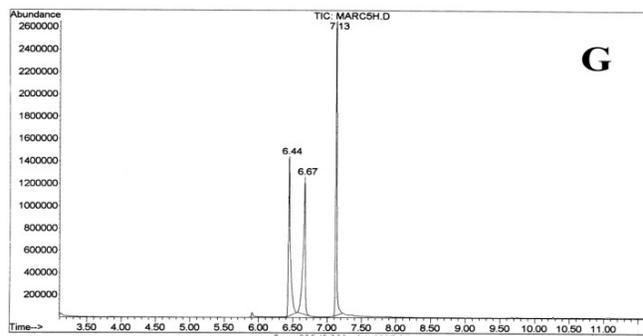
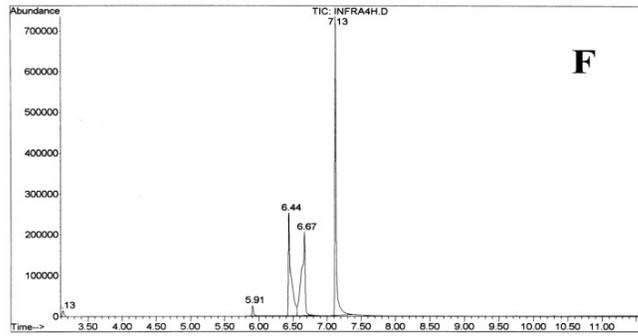
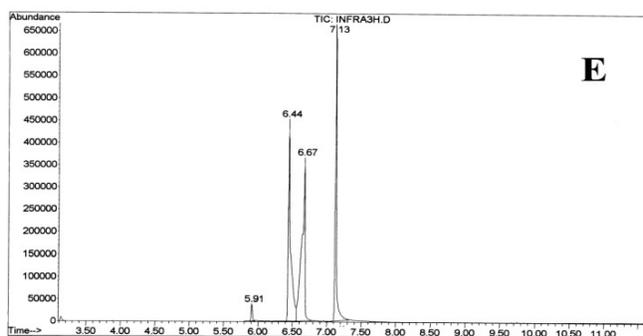
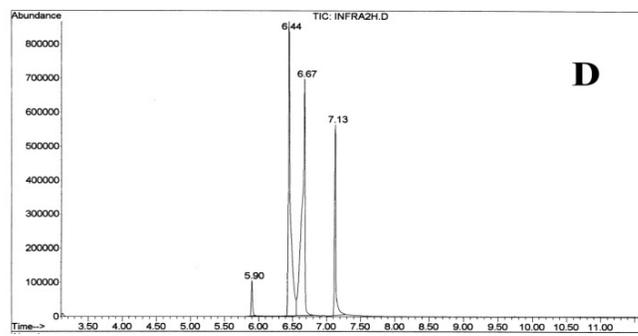
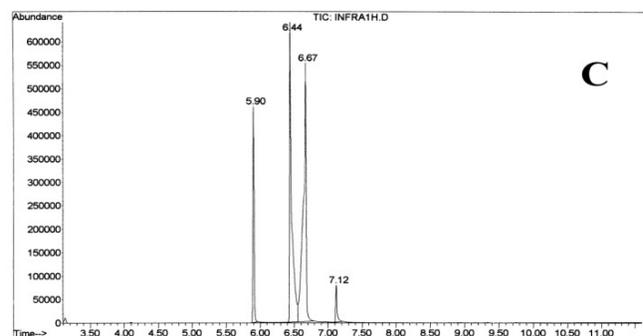
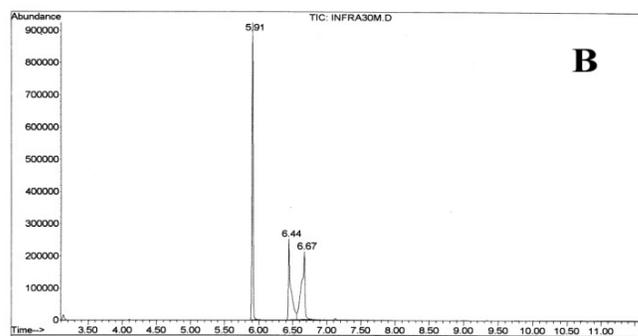
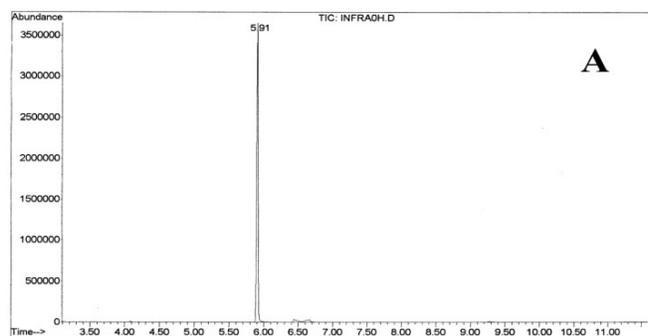


Figura 2.3. (pág. ant.) Cromatogramas obtidos por GC-MS e TIC para o 1-fenil-1,2-propanodiona (tempo de retenção 5,90 minutos), (R)-1-hidroxi-1-fenil-2-propanona (6,44 min), (S)-2-hidroxi-1-fenil-1-propanona (6,67 min) e (1R, 2S)-1-fenil-1,2-propanodiol (7,13 min) nos tempos 0 min (A), 30 min (B), 1 h (C), 2 h (D), 3 h (E), 4 h (F), 5 h (G), 6 h (H), 7 h (I) e 8 h (J).

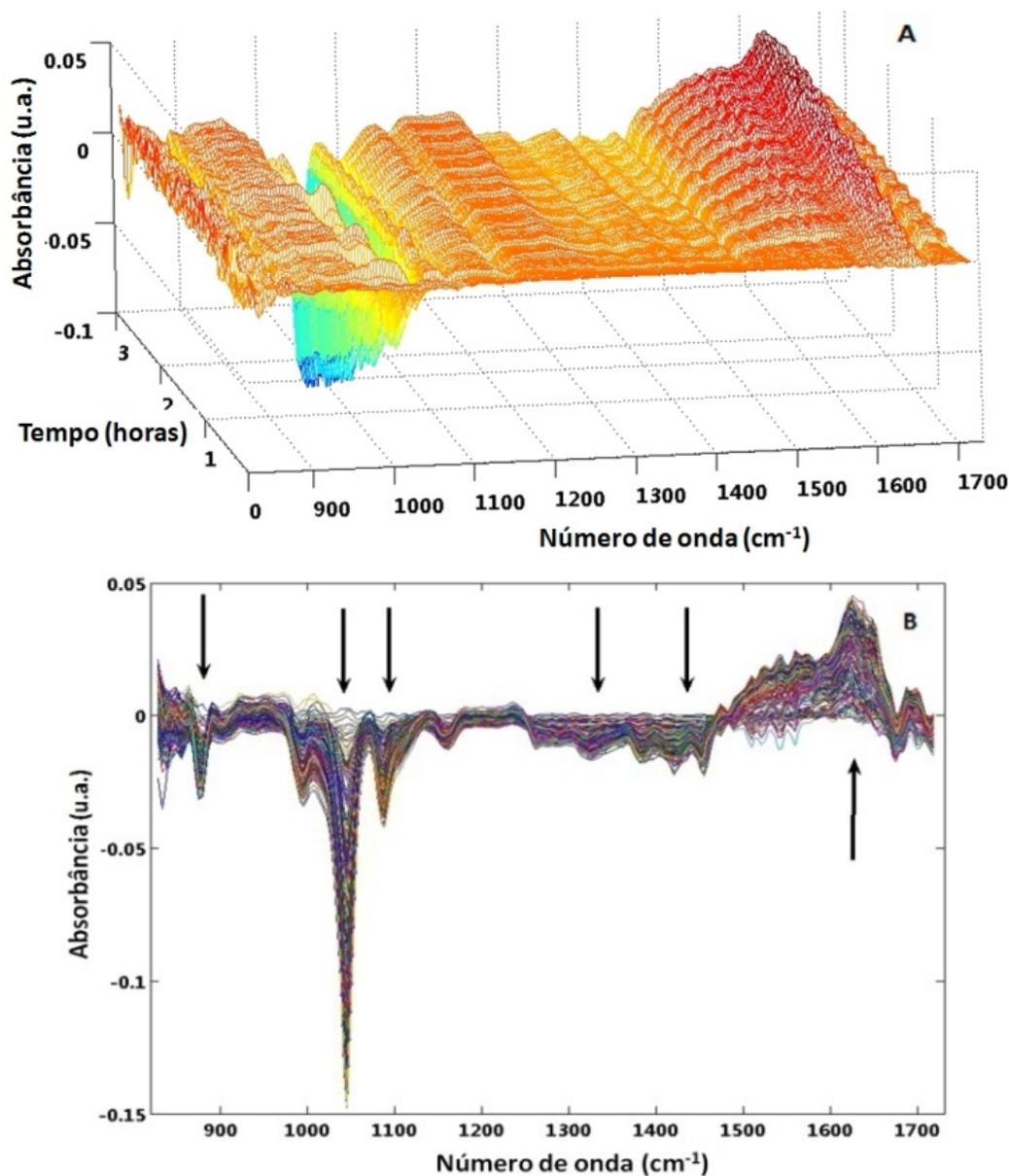


Figura 2.4. Monitoramento MIRS para o sistema (*S. cerevisiae* e tampão) com o substrato, superfície (A) e gráfico da variação das absorvâncias (B).

3.2. Ajuste cinético

Os cinco primeiros tempos (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 horas) de monitoramento foram escolhidos para construir os perfis cinéticos da reação, pois englobam a faixa de tempo onde os intermediários alcançam a maior concentração. A concentração relativa das 4 espécies foi obtida por TIC, e os perfis cinéticos foram obtidos por ajuste de equações não-lineares nos pontos experimentais através do software Origin® versão 5.0. Os perfis cinéticos estimados (188 pontos) e os pontos experimentais são mostrados na Fig. 2.5. Na Fig. 2.6 é possível observar os perfis cinéticos obtidos em ensaios anteriores (Lourenço, 2004), apresentando boa correlação com os obtidos neste experimento (Fig. 2.5).

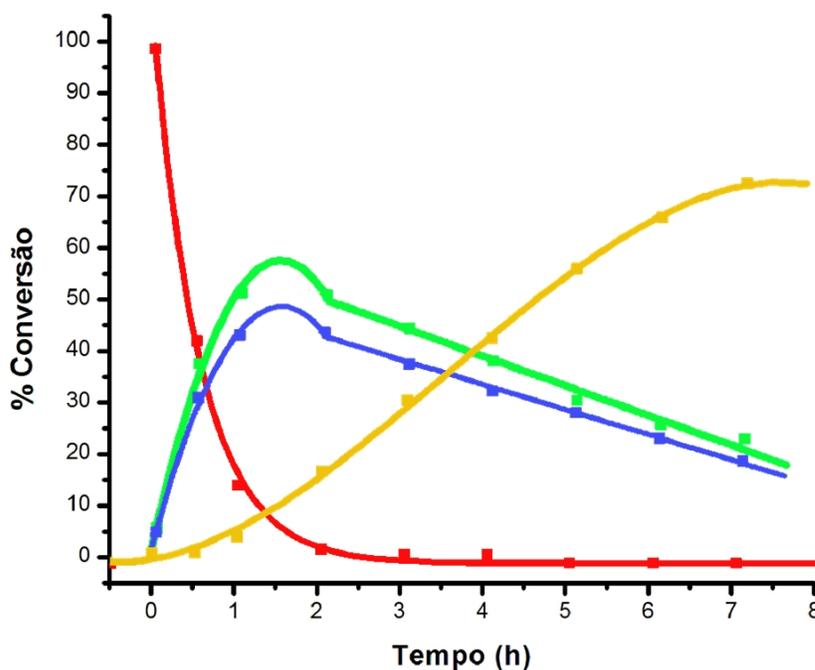


Figura 2.5. Ajuste cinético para o substrato (vermelho); intermediário (R)-1 (verde); intermediário (S)-2 (azul) e o produto final (laranja). Análises *off-line* são representadas pelos pontos isolados (■).

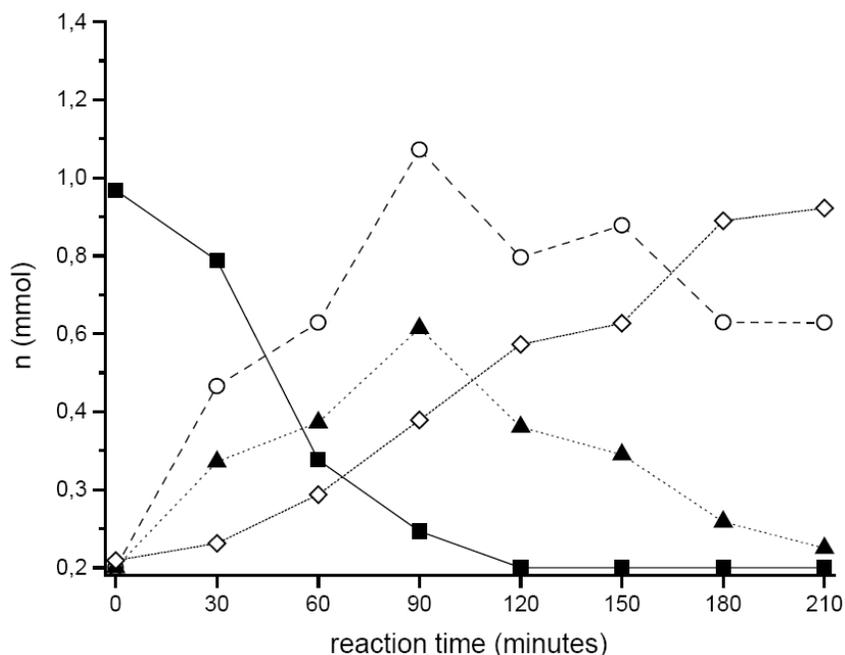


Figura 2.6. Conversão do 1-fenil-1,2-propanodiona (**1**) (■) para (*R*)-1-hidroxi-1-fenil-2-propanona (**2**) (○), (*S*)-2-hidroxi-1-fenil-1-propanona (**3**) (▲) e (1*R*,2*S*)-1-fenil-1,2-propanodiol (**4**) (◇). Fonte: Lourenço, 2004.

As concentrações dos intermediários B e C (ou *R*-1 e *S*-2, respectivamente) em relação ao tempo são governadas por dois mecanismos principais. Entre os tempos zero até 1,5 h, as concentrações de B e C têm origem principalmente na sua produção através do substrato (A). Após o consumo do substrato, a concentração das espécies B e C é descrita por sua conversão à espécie D (produto final). Embora este mecanismo seja uma simplificação a partir de um processo enzimático/celular muito mais complexo, ele resume o mecanismo real da reação (Gardiner, 1969; Levi, 2004). As equações cinéticas obtidas a partir dos passos I/III e II/IV da Fig. 2.1 são descritas abaixo.

Para a espécie A (substrato), o comportamento cinético é descrito pela equação:

$$C_A = k_1 e^{\left(\frac{-t}{k_2}\right)} \quad (2.3)$$

onde k_1 e k_2 são $100,34 \pm 1,19$ e $0,567 \pm 0,015$, respectivamente, e t é a variável tempo. Para o intermediário B, dois comportamentos cinéticos são observados. Seu

crescimento é descrito por dois diferentes processos cinéticos que ocorrem simultaneamente. Embora os processos cinéticos referente aos intermediários ocorram continuamente, para facilitar o ajuste das equações, estes processos foram separados antes e após o consumo total do substrato. Desta forma, a primeira é uma fase rápida, fazendo com que a concentração aumente até 2 h, onde a concentração máxima é obtida. Esta fase pode ser descrita pela equação 2.4:

$$C_{B_1} = k_1 t + k_2 t^2 \quad (2.4)$$

onde os termos k_1 e k_2 são $57,44 \pm 4,37$ e $-19,34 \pm 2,02$, respectivamente. A outra etapa é mais lenta, mostrando comportamento linear:

$$C_{B_2} = k_1 + k_2 t \quad (2.5)$$

onde k_1 e k_2 são $47,18 \pm 0,71$ e $-4,87 \pm 0,15$ respectivamente.

Para o intermediário C, a mesma característica cinética é observada, em dois processos. Para este componente, as equações 2.6 e 2.7 foram ajustadas, sendo a equação 6 para a fase rápida:

$$C_{C_1} = k_1 t + k_2 t^2 \quad (2.6)$$

onde k_1 e k_2 são $68,67 \pm 6,01$ e $-23,64 \pm 6,00$, respectivamente. E para a próxima etapa, o decaimento é representado por:

$$C_{C_2} = k_1 + k_2 t \quad (2.7)$$

onde k_1 e k_2 são $54,29 \pm 1,83$ e $-5,78 \pm 0,38$, respectivamente.

O produto final aumenta lentamente e sua concentração em função do tempo pode ser descrita por um ajuste polinomial de segunda ordem:

$$C_D = k_1 t + k_2 t^2 \quad (2.8)$$

onde k_1 e k_2 são $2,97 \pm 1,58$ e $3,09 \pm 0,55$, respectivamente.

Estas equações foram utilizadas para obter as concentrações estimadas nos 188 tempos para as quatro espécies envolvidas na reação. Todos os parâmetros cinéticos

mostram bom acordo com aqueles previamente obtidos para esta biotransformação (Lourenço, 2004; Lourenço, 2003).

3.3. Variações espectrais no infravermelho

Antes de ser construído o modelo multivariado com os dados dos espectros no infravermelho e os perfis cinéticos, a variabilidade espectral do meio reacional foi avaliada através do monitoramento de uma batelada sem adição do substrato 1-fenil-1,2-propanodiona (somente a suspensão de *S. cerevisiae*, tampão e etanol). O monitoramento foi conduzido usando as mesmas condições que aquelas utilizadas com o substrato, produzindo 188 espectros, como mostra a Fig. 2.7A. Nesta série, o branco (absorbância igual a zero) foi o primeiro espectro após homogeneização do meio reacional. A maior variação na absorbância ocorreu em determinados comprimentos de onda, como mostra a Fig. 2.7B: um aumento na absorbância em 975-1100 cm^{-1} devido ao estiramento C-O (álcool); 1500-1600 cm^{-1} ($-\text{COO}^-$) e 1600-1700 cm^{-1} ($-\text{COOH}$, éster e cetona). Poucas variações são vistas no primeiro minuto de monitoramento, mas após 1,5 a 2 h, as mudanças espectrais aumentam rapidamente, especialmente no número de onda de 1050 cm^{-1} . Estas variações no MIR são relacionadas ao processo enzimático natural da suspensão de fermento de pão em tampão fosfato e o aumento nas intensidades de absorbância pode ser atribuído aos processos de metabolismo oxidativo natural das células. O monitoramento foi conduzido por 8 horas e embora estes resultados não sejam mostrados na Fig. 2.7, nenhuma mudança pode ser observada após a quinta hora, provavelmente devido à inativação das enzimas internas das células, devido ao alto grau de oxidação.

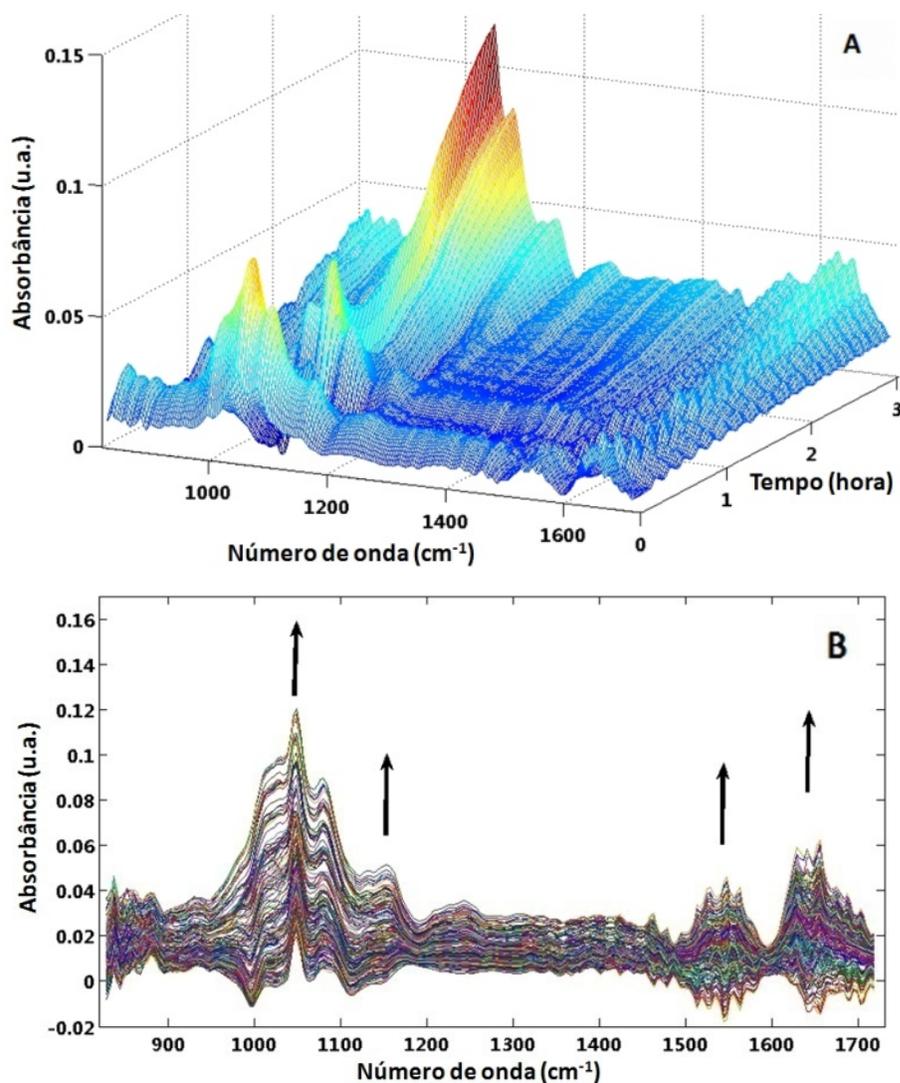


Figura 2.7. Monitoramento por MIRS do sistema (*S. cerevisiae* e tampão) sem o substrato, superfície (A) e gráfico da variação das absorvâncias (B).

O monitoramento obtido da batelada com o substrato é mostrado na Fig. 2.4A e 2.4B, que apresenta algumas similaridades com o branco espectral do monitoramento (Fig. 2.7). No monitoramento desta reação, o branco espectral foi obtido com o primeiro espectro, com o substrato já adicionado no meio reacional. Como consequência, uma forte absorvância negativa pode ser observada, enquanto o substrato é consumido durante a reação, como pode ser visto na Fig. 2.4B. Três bandas principais apresentam forte decréscimo, nos números de onda 1000, 1050 e 1100 cm⁻¹, podendo

ser atribuídas ao estiramento C-O. A absorvância observada na região entre 1300-1450 ($-\text{COOH}$ e $-\text{COO}^-$) e um aumento em 1550-1650 cm^{-1} (éster e CHO), revela oxidação geral dos compostos. Embora possam ser observadas algumas mudanças nas absorvâncias em comprimentos de onda restritos, a construção de um modelo univariado utilizando estes dados para prever a concentração dos compostos durante a reação não foi viável. Devido à complexa variação espectral da suspensão de células de *S. cerevisiae*, para a previsão das concentrações é necessário a construção de um modelo multivariado, como a regressão por PLS.

3.4. Calibração e validação por PLS-1

Os espectros obtidos de MIR (bloco X) junto com as concentrações estimadas para os 4 compostos obtidas por GC-MS (bloco y) foram divididos em dois grupos: 158 pontos para construir o modelo multivariado e 30 para validar o modelo obtido. Inicialmente, os espectros foram pré-processados, removendo a flutuação de linha de base. Vários modelos foram estudados e os melhores resultados foram obtidos usando a seleção dos números de onda entre 820 a 1730 cm^{-1} , totalizando 231 variáveis espectrais (números de onda) e um vetor y de dimensões 1 x 158 amostras que descreve a relação da concentração de um dos 4 componentes em função do tempo de reação. Um modelo multivariado foi construído para cada componente (A, B, C e D). Os modelos individuais foram desenvolvidos usando o menor valor de RMSECV (equação 2.1) para escolher o número ótimo de variáveis latentes. Cada um dos quatro modelos escolhidos utilizou cinco variáveis latentes para prever as variações das concentrações durante o tempo de reação.

A capacidade de previsão dos modelos obtidos foi avaliada através da previsão do grupo de validação. Os espectros do conjunto de validação foram pré-processados da mesma forma que o conjunto de validação e então as concentrações estimadas foram registradas em relação aos dados de referência (perfil cinético obtido por GC-MS). A concentração real contra os valores previstos é mostrada na Fig. 2.8. Muitos valores previstos para a concentração do substrato estão próximos a zero (Fig. 2.8A) devido ao

consumo do substrato durante o decorrer da reação; a concentração do substrato decai assintoticamente e, após 1,5 hora até o final da reação, sua concentração é próxima a zero. As concentrações previstas para os dois intermediários são mostradas na Fig. 2.8B e 2.8C e os valores de previsão são muito similares. As concentrações estimadas para o produto final são mostradas na Fig. 2.8D. Provavelmente a similaridade entre os perfis cinéticos e/ou entre as estruturas químicas dos dois intermediários faça com que seus valores de previsão sejam muito próximos. Como pode ser visto, todos os valores estimados para os 4 componentes estão bem distribuídos em torno da linha de correlação, com resíduos positivos e negativos. Calculando-se os erros relativos médios a partir da equação 2 (RMSPD), foram obtidos erros em torno de 5% em relação àqueles estimados pelo perfil cinético.

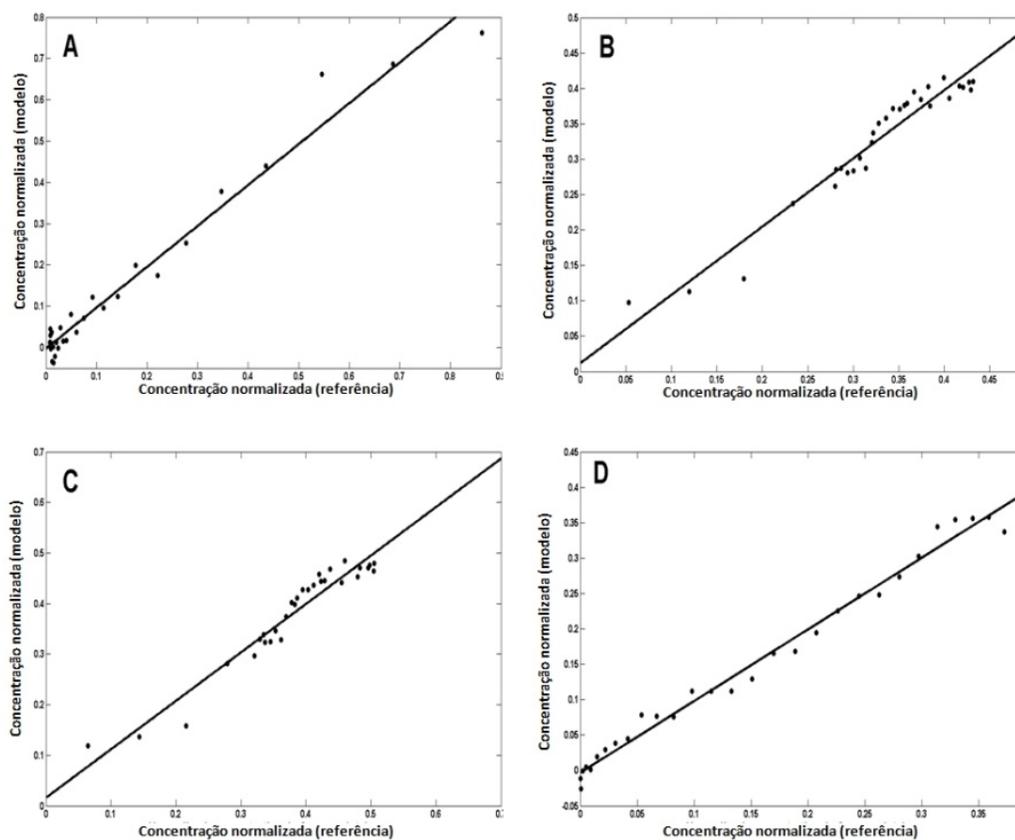


Figura 2.8. Gráficos de correlação entre as concentrações de referência GC-MS e aquelas obtidas pelo modelo PLS para o grupo de validação do substrato (A), intermediário (R)-1 (B), intermediário (S)-2 (C) e o produto final (D).

A análise dos *loadings* da regressão por PLS é uma estratégia conhecida para verificar as similaridades entre os modelos propostos e para estudar as possíveis correlações dos vários modelos construídos com o mesmo bloco X (espectros) e vários parâmetros de calibração, como metodologias de determinação multi-analito ou simultâneas (Martens, 1989).

Neste trabalho, os perfis de *loadings* da regressão de cada um dos 4 modelos PLS desenvolvidos foram avaliados. Embora 5 variáveis latentes (VL) tenham sido utilizadas em cada modelo, apenas as 3 primeiras VL capturam mais que 95% da variância cumulativa para o bloco X e mais que 87% para o bloco y (concentrações). Como pode ser visto na Fig. 2.9, a região de 1000 a 1100 cm^{-1} possui importância significativa em todos os modelos. A Fig. 2.9A mostra os *loadings* para o substrato, de modo que a região de 820 a 1000 cm^{-1} também é importante para este modelo. Os *loadings* na Fig. 2.9B e 2.9C são relativos aos intermediários. O produto final apresenta *loadings* mais significativos na região entre 950 e 1100 cm^{-1} .

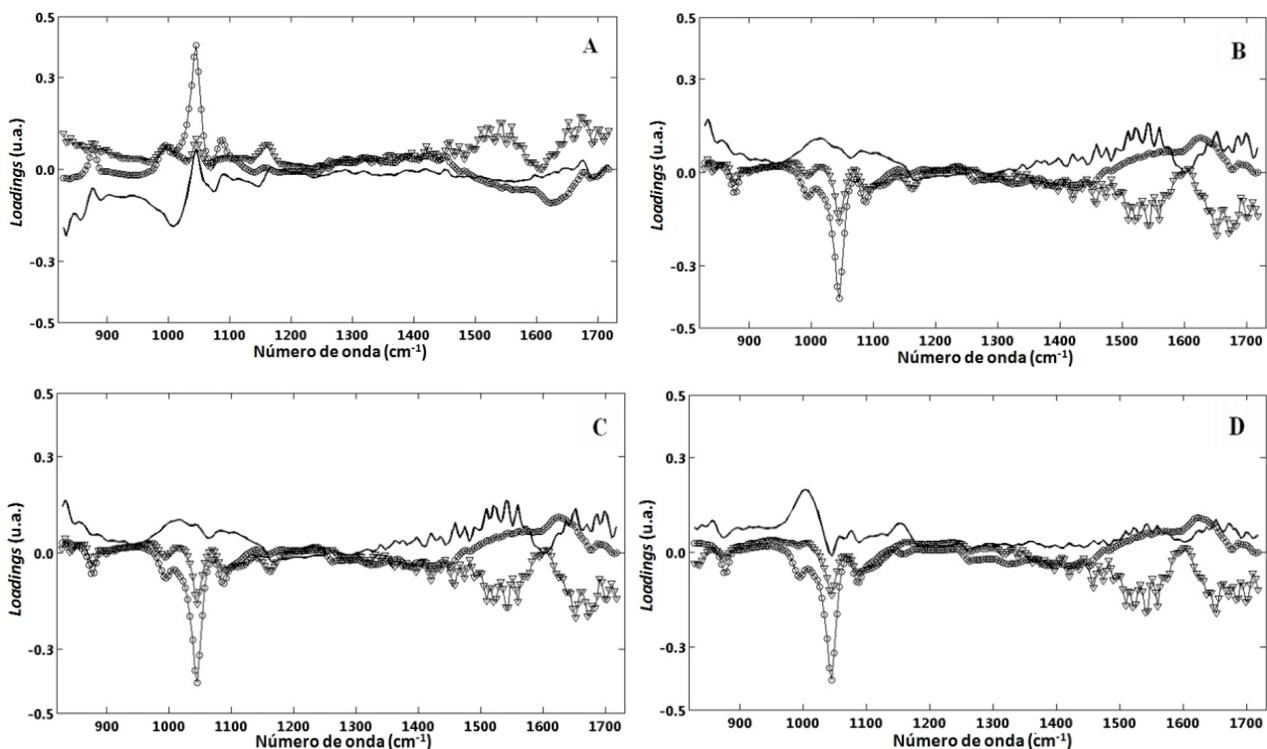


Figura 2.9. *Loadings* para cada modelo PLS-1 para as três principais VL: 1^a (-o), 2^a (-) e 3^a (-∇) obtidos para o substrato (A), intermediário (R)-1 (B), intermediário (S)-2 (C) e o produto final (D).

O espectro de MIR dos dois intermediários medidos diretamente no meio de biotransformação, na presença de alta concentração da suspensão celular de fermento de pão, pode ter causado diminuição na sensibilidade da técnica para cetonas primárias ou secundárias (intermediários B e C). Apesar disto, as previsões dos intermediários apresentaram bons resultados, com erros relativos médios de previsão em torno de 5%. O produto final (Fig. 2.9D) possui uma banda específica na região de 1000 cm^{-1} e algumas outras pequenas diferenças entre os *loadings* dos outros compostos. Estes resultados sugerem que os espectros obtidos de MIR usando a cela de fluxo ATR artesanal foi capaz de determinar os 4 compostos envolvidos na reação de bioconversão, diretamente na suspensão celular utilizando sistema *on-line* contínuo.

4. Conclusões

O método proposto possibilitou a determinação *on-line* por MIR de 4 espécies envolvidas em uma reação de biotransformação, sem passos de extração ou separação cromatográfica. A determinação foi realizada diretamente na suspensão celular de fermento de pão, sendo um método rápido e de baixo custo. A metodologia desenvolvida faz uma contribuição ao desenvolvimento de métodos *on-line* mais eficientes que podem ser utilizados em aplicações industriais ou para a otimização *on-line* de sistema reacionais.

5. Referências

(**Bird, 2002**) Bird, P.A.; Sharp, D.C.A.; Woodley, J.M.; *Near-IR spectroscopic monitoring of analytes during microbially catalysed Baeyer-Villiger bioconversions*. Org. Process Res. Dev., 6 (2002) 569-576.

(**Blanco, 2004**) Blanco, M.; Peinado, A.C.; Mas, J.; *Analytical monitoring of alcoholic fermentation using NIR spectroscopy*. Biotechnol. Bioeng., 88 (2004) 536-542.

(Brereton, 2000) Brereton, R.G.; *Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry*. Analyst, 125 (2000) 2125-2154.

(Bro, 1998) Bro, R.; *Multi-way Analysis in the Food Industry*. Ph.D. Thesis, University of Amsterdam. Netherlands, 1998.

(Callis, 1987) Callis, J.B.; Illman, D.L.; Kowalski, B.R.; *Process analytical chemistry*. Anal. Chem., 1987, 59, A624-&

(Ehala, 2001) Ehala, S.; Vassiljeva, I.; Kuldvee, R.; Vilu, R.; Kaljurand, M.; *On-line coupling of a miniaturized bioreactor with capillary electrophoresis, via a membrane interface, for monitoring the production of organic acids by microorganisms*. Fresenius J. Anal. Chem., 371 (2001) 168-173.

(Eigenvector Inc., 2009) Eigenvector Research, Inc., <http://www.eigenvector.com/>, acessado em março de 2009.

(FDA, 2003) FDA - Draft guide for industry. *PAT—A framework for innovative pharmaceutical manufacturing and quality assurance*. FDA, 2003.

(Gardiner, 1969) Gardiner, W.C.; *Rates and Mechanisms Chemical Reactions*. Benjamin Cummings Publishing Co., 1969.

(Gavrilescu, 2005) Gavrilescu, M.; Chisti, Y.; *Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry*. Biotechnol. Adv., 23 (2005) 471-499.

(Godman, 1987) Goodman, D.; Sorj, B.; Wilkinson, J.; *From farming to biotechnology: a theory of agro-industrial development*. Blackwell, Oxford, 1987.

(Gotor, 2002) Gotor, V.; *Biocatalysis applied to the preparation of pharmaceuticals*. Org. Process Res. Dev., 6 (2002) 420-426.

(Gourlay, 2002) Gourlay, C.; Miege, C.; Garric, J.; Tusseau-Vuillemin, M.H.; Mouchel, J.M.; *The use of spectrofluorimetry for monitoring the bioaccumulation and the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in Daphnia magna*. Polycyclic Aromat. Compd., 22 (2002) 501-516.

(Gurden, 2002) Gurden, S.P.; Westerhuis, J.A.; Smilde, A.K.; *Monitoring of batch processes using spectroscopy*. AIChE J., 48 (2002) 2283-2297.

(Hagedorn, 2004) Hagedorn, A.; Levadoux, W.; Groleau, D.; Tartakovsky, B.; *Evaluation of multiwavelength culture fluorescence for monitoring the aroma compound 4-*

hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF) production. Biotechnol. Prog., 20 (2004) 361-367.

(Hanko, 2000) Hanko, V.P.; Rohrer, J.S.; *Determination of carbohydrates, sugar alcohols, and glycols in cell cultures and fermentation broths using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection.* Anal. Biochem., 283 (2000) 192-199.

(Hassell, 1998) Hassell, D.C.; Bowman, E.M.; *Process analytical chemistry for spectroscopists.* Appl. Spectrosc., 1998, 52, 18A-29A.

(Kulp, 2002) Kulp, M.; Vassiljeva, I.; Vilu, R.; Kaljurand, M.; *Monitoring of the degradation of phenols by Rhodococcus bacteria by using micellar electrokinetic chromatography.* J. Separat. Sci., 25 (2002) 1129-1135.

(Levi, 2004) Levi, M.A.B.; Scarminio, L.S.; Poppi, R.J.; Trevisan, M.G.; *Three-way chemometric method study and UV-Vis absorbance for the study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the Hibiscus rosa-sinensis species.* Talanta, 62 (2004) 299-305.

(Liu, 2001) Liu, Y.C.; Wang, F.S.; Lee, W.C.; *On-line monitoring and controlling system for fermentation processes.* Biochem. Eng. J., 7 (2001) 17-25.

(Lourenço, 2003) Lourenço, E. *Síntese enantiosseletiva de efedrina.* Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Brasil, 2003.

(Lourenço, 2004) Lourenço, E.; Rodrigues, J.A.R.; Moran, P.J.S.; *Preparation of an (-)-ephedrine intermediate through asymmetric reduction of 1-phenyl-1,2-propanedione by anaerobically pre-treated baker's yeast.* J. Mol. Catal. B: Enzyme, 29 (2004) 37-40.

(Macauley, 2003) Macauley-Patrick, S.; Arnold, S.A.; McCarthy, B.; Harvey, L.M.; McNeil, B.; *Attenuated total reflectance Fourier transform mid-infrared spectroscopic quantification of sorbitol and sorbose during a Gluconobacter biotransformation process.* Biotechnol. Lett., 25 (2003) 257-260.

(Martens, 1989) Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate Calibration.* JohnWiley, NewYork, 1989.

(McClure, 1994) McClure, W.F.; *Near-infrared spectroscopy – the giant is running strong.* Anal. Chem., 66 (1994) A43-A53.

(Millerihli, 1984) Millerihli, N.J.; Ohaver, T.C.; Harnly, J.M.; *Calibration and curve fitting for extended range AAS.* Spectrochim. Acta Part B, 39 (1984) 1603-1614.

(Patel, 2002) Patel, R.N.; *Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals*. Enzyme Microb. Technol., 31 (2002) 804-826.

(Rasor, 2001) Rasor, J.P.; Voss, E.; *Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry*. Appl. Catal. A, 221 (2001) 145-158.

(Schoemaker, 2003) Schoemaker, H.E.; Mink, D.; Wubbolts, M.G.; *Dispelling the myths - Biocatalysis in industrial synthesis*. Science, 299 (2003) 1694-1697.

(Shugerl, 2001) Schugerl, K.; *Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years*. J. Biotechnol., 85 (2001) 149-173.

(Sivakesava, 2001) Sivakesava, S.; Irudayaraj, J.; Ali, D.; *Simultaneous determination of multiple components in lactic acid fermentation using FT-MIR, NIR and FT-Raman spectroscopic techniques*. Process Biochem., 37 (2001) 371-378.

(Trevisan, 2006a) Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; *Process analytical chemistry*. Quim. Nova, 29 (2006) 1065-1071.

(Trevisan, 2008) Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; *Direct determination of ephedrine intermediate in a biotransformation reaction using infrared spectroscopy and PLS*. Talanta, 75 (2008) 1021-1027.

(Ulber, 2003) Ulber, R.; Frerichs, J.G.; Beutel, S.; *Optical sensor systems for bioprocess monitoring*. Anal. Bioanal. Chem., 376 (2003) 342-348.

(Vaidyanathan, 1999) Vaidyanathan, S.; Macaloney, G.; Vaughn, J.; McNeil, B.; Harvey, L.M.; *Monitoring of submerged bioprocesses*. Crit. Rev. Anal. Chem., 19 (1999) 277-316.

(www.uktradeinvest.gov.uk) <http://www.uktradeinvest.gov.uk/>, acessada em março 2009.

(Zaks, 1997) Zaks, A.; Dodds, D.R.; *Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals*. Drug Discov. Today, 2 (1997) 513-531.

Capítulo 3.

”Desenvolvimento de um método utilizando análise de fatores evolucionários para correção temporal em diferentes bateladas: aplicação no monitoramento on-line por infravermelho de uma reação de transesterificação.”

1. Introdução

Na tentativa de reduzir o aquecimento global e a dependência econômica sobre os combustíveis fósseis, agências governamentais e científicas tomaram várias iniciativas, buscando fontes de energia alternativas que poluam menos e sejam renováveis. Em contraste à recente iniciativa de biocombustíveis dos EUA (*Biofuel Initiative*) (Herrera, 2006), o Brasil já possui uma rede bem consolidada para produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, com alta produtividade e o menor dos preços no mercado internacional, estabelecida durante a primeira crise petrolífera da década de 1970 (Rosillo-Calle, 1998). Recentemente, o governo brasileiro começou outro programa de biocombustível, normativo, com base na produção de biodiesel, através de aditamentos progressivos de biodiesel ao diesel comercializado (Pinto, 2005; Pimentel, 2006).

Embora muitos óleos vegetais, como os de girassol, algodão, palma, babaçu, linhaça e jatrofa, estejam disponíveis para produção de biodiesel, apenas o óleo de soja possui produção suficiente para permitir a exigência obrigatória mínima de 2% de biodiesel desde 2008, chamado B2. Em contradição com outros países, no Brasil o álcool mais utilizado para transesterificação é o bioetanol, ao invés de metanol, que é obtido basicamente por importação. No entanto, apenas a reação com metanol permite separação bem definida e estável dos subprodutos encontrados no Biodiesel, como a glicerina e os mono e digliceróis.

A transesterificação ou alcólise dos triacilgliceróis de óleos vegetais ou de gorduras animais, na presença de catalisador, comumente bases, como NaOH ou KOH, produz ácidos graxos monoalquil ésteres (biodiesel) e glicerol, como produto secundário. A transesterificação parcial dos produtos (mono e di-acilgliceróis formados durante a transesterificação), triacilgliceróis não reagidos, glicerol não separado, ácidos graxos livres, álcool residual e o catalisador restante podem provocar contaminação nos produtos finais (Knothe, 2001). Desta forma, a determinação da qualidade do biodiesel é questão de grande importância para o êxito da comercialização deste combustível. As

técnicas mais comumente empregadas para controlar a transesterificação e monitorar as reações de biodiesel são a cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Ambas as análises por GC (*Freedman, 1986; Plank, 1995; Cvengros, 1994*) e HPLC (*Holcapek, 1999*) e sua combinação (*Lechner, 1997*) foram relatadas para análise de biodiesel, enquanto a cromatografia por permeação em gel (*Gel Permeation Chromatography - GPC*) (*Arzamendi, 2006*) completa o grupo das técnicas de separação.

No entanto, apesar da sua alta precisão, esses métodos são demorados e não podem ser facilmente utilizados para a avaliação *on-line* de reações rápidas e reversíveis, como a transesterificação. Assim, métodos alternativos de análise rápida, como o índice de refração, do produto final (*Xie, 2006*), estão em constante desenvolvimento para acompanhar as reações de transesterificação.

No entanto, técnicas espectroscópicas de ressonância magnética nuclear (RMN), geralmente ^1H RMN (*Gelbard, 1995; Neto, 2004; Knothe, 2000*) e técnicas vibracionais, como infravermelho próximo e médio (*Knothe, 2000; Zagonel, 2004*) e Raman (*Ghesti, 2006*) também são adequados para o monitoramento das reações de transesterificação e/ou controlar a qualidade do biodiesel. Porém, apenas técnicas vibracionais permitem sondas para o monitoramento *on-line* e em tempo real (*Knothe, 2000; Felizardo, 2007; McGill, 2002*). Técnicas espectroscópicas vibracionais têm algumas características atraentes, como a velocidade, não-amostragem, medições holísticas e não necessidade do uso de reagentes (*Trevisan, 2006a; Hassel, 1998*), apresentando grandes vantagens para o monitoramento e controle de processos (*Gurden, 2002*). A utilização de variáveis espectroscópicas, ricas em informação química, em comparação com variáveis físicas tradicionais, como viscosidade, temperatura, pressão e fluxo, possibilitam a melhoria das informações globais em processos químicos (*Gurden, 2002*), contribuindo para o desenvolvimento de sistemas de controle mais confiáveis e produtos de melhor qualidade. Embora a espectroscopia no infravermelho médio seja rica em informações químicas, a intensa sobreposição espectral requer o emprego de métodos de calibração multivariada, como a de quadrados mínimos parciais (PLS) (*Martens, 1998*) para construção de modelos de calibração.

Neste trabalho, temos como objetivo o desenvolvimento de um método simples e rápido, para o acompanhamento *on-line* da reação de transesterificação alcalina do óleo de soja com etanol, por FT-IR e calibração multivariada. As reações foram monitoradas utilizando uma cela ATR de análise de líquidos ATR CIRCLE (*Cylindrical Internal Reflectance Cell for Liquid Evaluation*), através de amostragem contínua em um semi-microreator e também realizada simultaneamente com ^1H -RMN para determinar o ácido graxo éster etílico (*Fatty Acid Ethyl Ester* - FAEE) durante a reação.

A espectroscopia no infravermelho tem sido utilizada para monitorar a alcóólise do óleo de soja (*Knothe, 2000; Zagonel, 2004*). No presente trabalho, um modelo de calibração foi desenvolvido através do monitoramento *on-line* realizado em várias bateladas (do inglês *batch*) e validado através de uma nova batelada, mostrando pela primeira vez a robustez da FT-IR para o monitoramento da etanólise do óleo de soja (*Zeaiter, 2004*). Um procedimento comum para acompanhar reações *on-line* é a utilização de um 'by-pass' com um sistema contínuo de amostragem do reator (*Hassel, 1998*). Nestes sistemas, a principal desvantagem é a diferença entre os tempos de amostragem entre a retirada direta de amostras no reator (*Garrido, 2007; Vojinovic, 2006*) e o monitoramento automático, produzindo um tempo de retardo entre variáveis medidas e o perfil cinético de referência. Para contornar esta situação, a análise de fatores evolucionários (*Evolving Factor Analysis* - EFA) (*Maeder, 1987*) foi utilizada para identificar as mudanças significativas no conjunto de dados durante o monitoramento por infravermelho, permitindo a correção do tempo em relação à cinética determinada por ^1H -RMN e reduzindo desta forma, os erros de previsão do modelo.

2. Experimental

2.1. Reagentes e soluções

Óleo de soja refinado (Cargill, Brasil), grau comestível, com índice de iodo igual a 131,9 (solução de Wij), contendo 0,04% de ácidos graxos livres (AGL) e teor de água de 0,1% foi utilizado em todas as reações envolvidas neste trabalho. Etanol anidro (Chemco, Brasil) com 0,44% de água foi utilizado sem qualquer outra purificação. Hidróxido de sódio, grau analítico (Vetec, Brasil), foi utilizado como catalisador; CDCl_3 (Acrós, Brasil), ácido acético (Ecibra, Brasil); sulfato de magnésio anidro (Synth, Brasil) também foram utilizados. O método de Karl-Fischer foi utilizado para determinar o teor de água no óleo e no etanol.

2.2. Aparelhos e software

As reações foram realizadas em um balão de vidro de 500 mL, mantido sob agitação constante e à 27 ± 1 °C. As análises de IR foram realizadas em um sistema *on-line* utilizando tubulação de silicone (diâmetro interno de 1 mm) conectado ao reator e uma bomba peristáltica modelo 78001-22 (Ismatec IPC, Suíça), utilizando fluxo de 3 mL min^{-1} . Um sistema micro CIRCLE SpectraTech (Inglaterra), com cristal interno de PbSe foi usado para obter os espectros de IR. O sistema apresenta um ângulo de reflexão de 45° com 7,5 reflexões e com volume interno de 0,5 ml (*Sperline, 1986*). Um típico sistema CIRCLE é representado na Fig. 3.1. Um espectrômetro FTIR Bomem MB-100 (Asea Brown Boveri (ABB) Ltd.) equipado com detector DTGS no ganho máximo, foi empregado para realizar as medições no IR.

Os espectros de ^1H RMN foram obtidos sob condições ambientais, em um GEMINI 2000, operando em 300 MHz e como solvente foi utilizado CDCl_3 (transferência química residual de prótons 7,26 ppm). Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de ^1H foram processados utilizando os softwares ACD/Lab versão 4,0.

A análise de dados foi realizada utilizando o software Matlab 6,5 (The

Mathworks), com “PLS toolbox” (*Eigenvector Inc.*) versão 3,5 em microcomputador AMD Athlon 1,3 GHz com 256 Mb de memória RAM, usando sistema Linux Fedora core 3. O “iPLS toolbox for Matlab” foi obtido gratuitamente na web (www.models.kvl.dk).

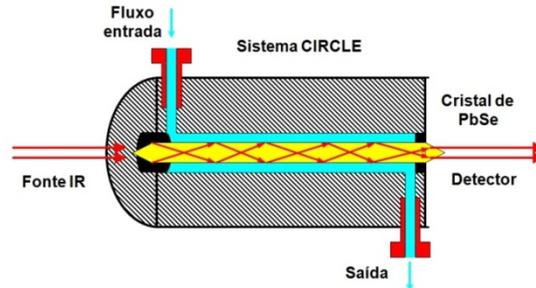


Figura 3.1. Um sistema CIRCLE típico utilizado para as análises na região do MIR.

2.3. Cálculo das conversões nas transesterificações por ^1H -RMN

O método proposto utiliza as integrais dos sinais presentes na região entre 4,05 e 4,35 ppm. Primeiramente, determina-se quais átomos de hidrogênio presentes nos triglicerídeos, nos intermediários (mono- e diglicerídeo) e no ésteres etílicos estão entre 4,05 - 4,35 ppm, região utilizada para o cálculo de conversão da etanolise de óleos vegetais. Na Fig. 3.2 estão os espectros simulados parciais de ^1H -RMN e os números que aparecem nos sinais representam o início e o fim da faixa (em ppm) na qual os sinais dos hidrogênios, em destaque, estão compreendidos.

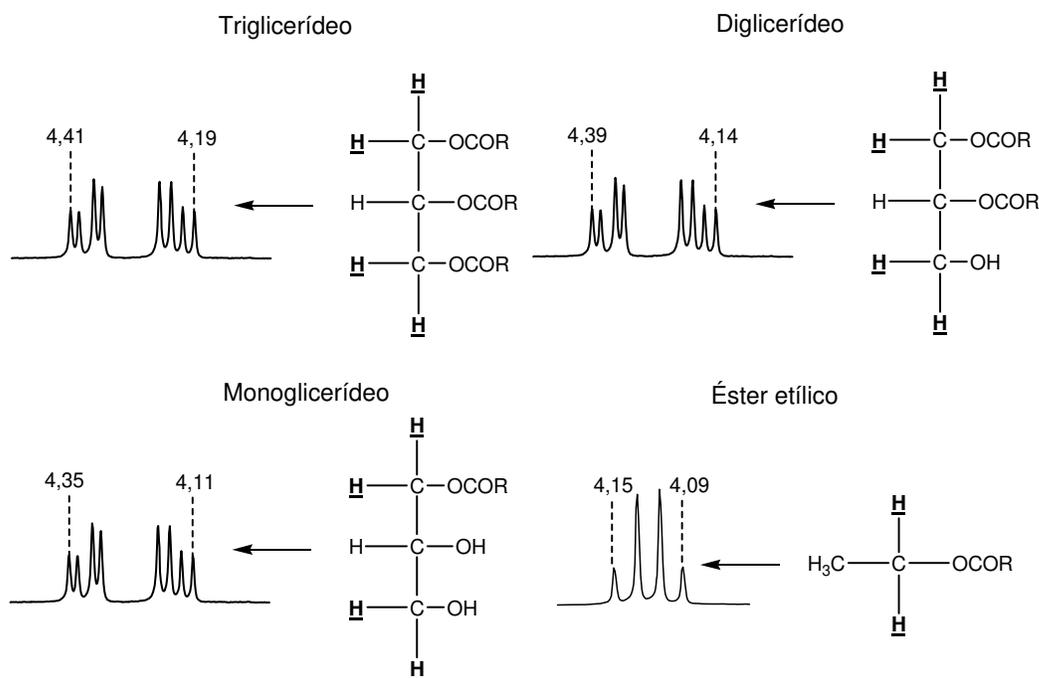


Figura 3.2. Região entre 4,35 a 4,05 ppm dos espectros simulados de $^1\text{H-RMN}$ dos TG, DG, MG e ésteres etílicos.

Como pode ser observado na Fig. 3.2, no quarteto gerado pelos prótons do CH_2 etoxílico o desdobramento em menor deslocamento químico (4,09) é o único pico de ressonância que não apresenta sobreposição com nenhum outro sinal dos mono-, di- ou triglicerídios. No espectro obtido experimentalmente o deslocamento químico desse pico é igual a 4,07 ppm. Na Fig. 3.3 estão mostrados os picos que aparecem entre 4,35 e 4,05 ppm nos espectros de $^1\text{H-RMN}$ do óleo de soja e do éster etílico do óleo de soja.

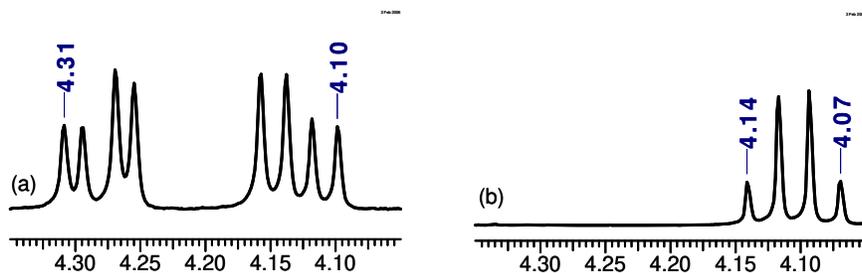


Figura 3.3. Região entre 4,35 e 4,05 ppm dos espectros de $^1\text{H-RMN}$ obtidos experimentalmente para (a) óleo de soja e (b) ésteres etílicos de óleo de soja.

Através do fenômeno denominado desdobramento *spin-spin*, os picos de ressonância sofrem desdobramentos, que podem ser explicados empiricamente pela *regra do $n + 1$* . Segundo esta regra, cada tipo de próton “sente” o número de prótons equivalentes (n) do átomo de carbono vizinho ao átomo de carbono ao qual um dado próton está ligado. Assim, seu pico de ressonância se desdobra em $(n + 1)$ componentes. Esses desdobramentos obedecem ao triângulo de Pascal, conforme indicado na Fig. 3.4.

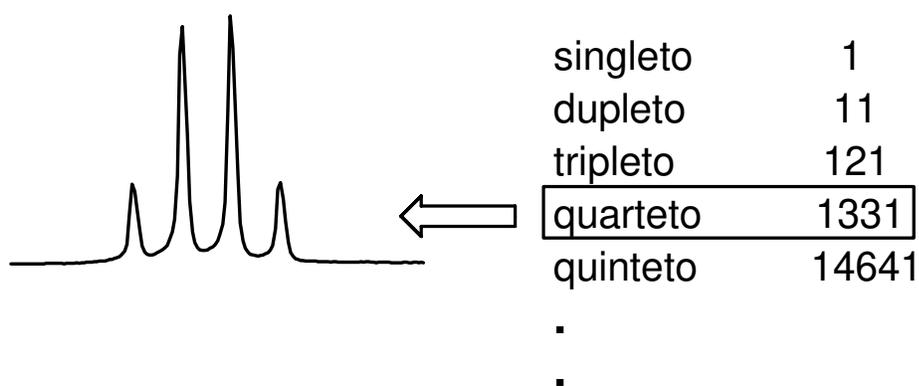


Figura 3.4. Desdobramentos dos picos de ressonância segundo a regra do $n+1$.

O pico de ressonância dos átomos de hidrogênio etoxílicos dos ésteres etílicos é desdobrado em um quarteto, cuja área total é a somatória dos componentes externos do quarteto (menores intensidades), que possuem área igual a $1/8$ da área total mais os componentes internos (maiores intensidades), que têm áreas iguais a $3/8$ da área total do quarteto, como esquematizado na Fig. 3.5.

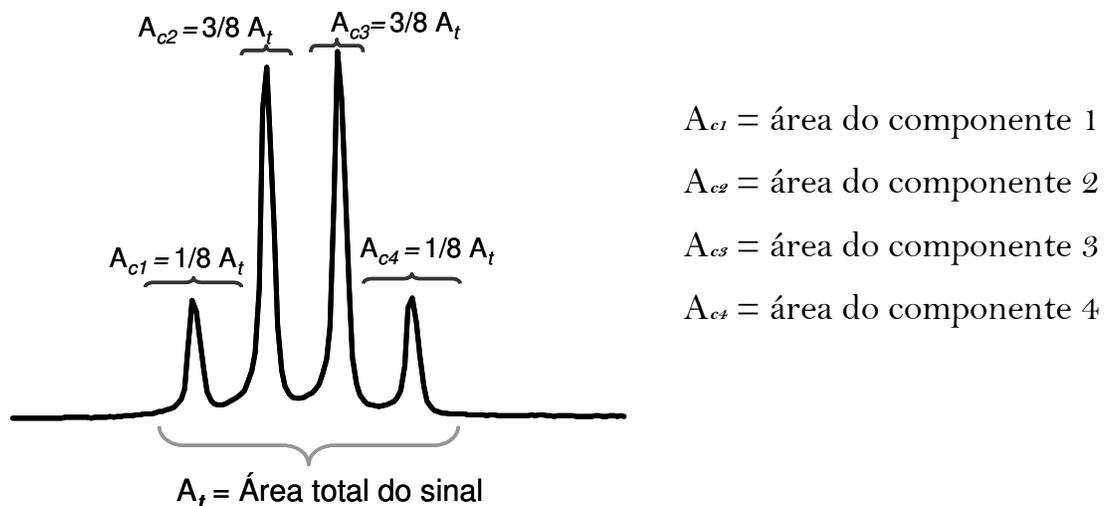


Figura 3.5. Área sob os picos resultantes dos desdobramentos do quarteto gerado pelos átomos de hidrogênio etoxílicos dos ésteres etílicos.

O componente 4 (c_4) do quarteto dos ésteres etílicos (δ na faixa de 4,07 a 4,08 ppm) é o único pico que não sofre sobreposição de nenhum outro pico. Portanto esse componente foi utilizado no cálculo da conversão da etanólise de óleos vegetais, segundo a Equação 3.1

$$\% \text{ EE} = \left[(A_{c4} \times 8) / A_{dd+ee} \right] \times 100 \quad (3.1)$$

onde:

A_{c4} = Área do componente c_4 .

A_{dd+ee} = Área de todos os sinais entre 4,35 e 4,05 ppm.

% EE = Porcentagem de ésteres etílicos de óleos vegetais.

A Fig. 3.6 mostra o espectro de ^1H -RMN obtido de uma mistura de óleo de soja e ésteres etílicos (bd) com concentração de 40 % (m/m) de ésteres etílicos. As linhas vermelhas e os números em vermelho correspondem às integrais dos picos.

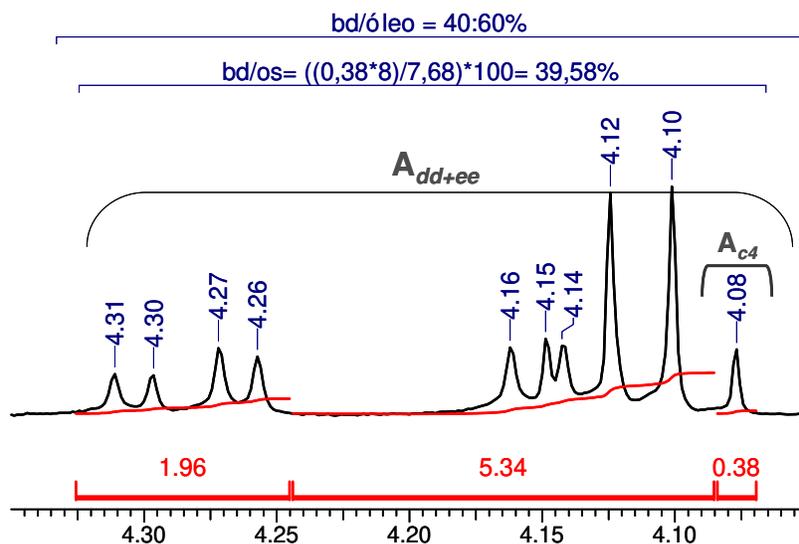


Figura 3.6. Espectro de RMN-¹H de uma mistura binária composta de 40 % de ésteres etílicos de soja e 60 % de óleo de soja.

2.4. Monitoramento e análise de dados

Quatro bateladas foram realizadas seguindo o mesmo procedimento, de acordo com o descrito na parte experimental: 1,00 g de NaOH foi dissolvido em 31,60 g de etanol e acrescentou-se 100,00 g de óleo de soja no balão de reação. A mistura reacional foi vigorosamente agitada e a temperatura mantida a 27 ± 1 °C. Simultaneamente com a adição da solução etanólica de catalisador, a bomba peristáltica e o monitoramento espectral foram acionados. O monitoramento *on-line* por IR foi realizado através da obtenção de espectros da reação continuamente, através do sistema CIRCLE.

A faixa espectral foi de 3707 até 814 cm^{-1} e a média de 8 varreduras e resolução de 8 cm^{-1} foi utilizada para permitir um rápido registro dos espectros. Desta forma, cada espectro (média de 8 varreduras) foi obtido em 15 s e o monitoramento foi realizado durante 12 min. Um espectro do ar (cela vazia e rigorosamente limpa com água/detergente e etanol), obtido antes de cada batelada foi utilizado como branco.

Para cada batelada monitorada, foi obtida uma matriz de dados com as dimensões de 48 amostras por 751 pontos espectrais. Os dados foram exportados pelo software GRAMS/32 e o software Matlab foi utilizado para importar e analisar os dados, através

do PLS-toolbox.

Sete amostras foram recolhidas *off-line* do reator durante 0,3-12,0 min para cada batelada. As amostras (3 ml) foram coletadas do reator utilizando uma pipeta e, em seguida, misturadas em um tubo de ensaio com 0,3 ml de ácido acético glacial. As amostras foram lavadas duas vezes com água desionizada, o etanol residual foi removido da fase líquida através de um rota-evaporador e os resíduos foram submetidos à análise por ^1H RMN para obter os rendimentos de FAEE. Uma curva foi ajustada para cada batelada, obtendo-se o seu perfil cinético. Assim, a partir da equação cinética, a concentração estimada de FAEE em 48 diferentes tempos entre 0,0 e 12,0 min foi obtida. Estes valores (bloco y) juntamente com os espectros no infravermelho (bloco X) foram utilizados para estabelecer um modelo multivariado por PLS.

3. Resultados e discussão

Os rendimentos dos FAEE foram determinados por ^1H RMN e o perfil cinético da reação para cada batelada foi ajustado por equações não-lineares utilizando o software Origen[®] versão 6.0. O perfil cinético obtido a partir dos lotes pode ser visto na Fig. 3.7 e é regido por um crescimento assintótico, mostrado na equação 3.2 abaixo:

$$\text{FAEE}\%(t_{\min}) = A_0 - k_1 t \quad (3.2)$$

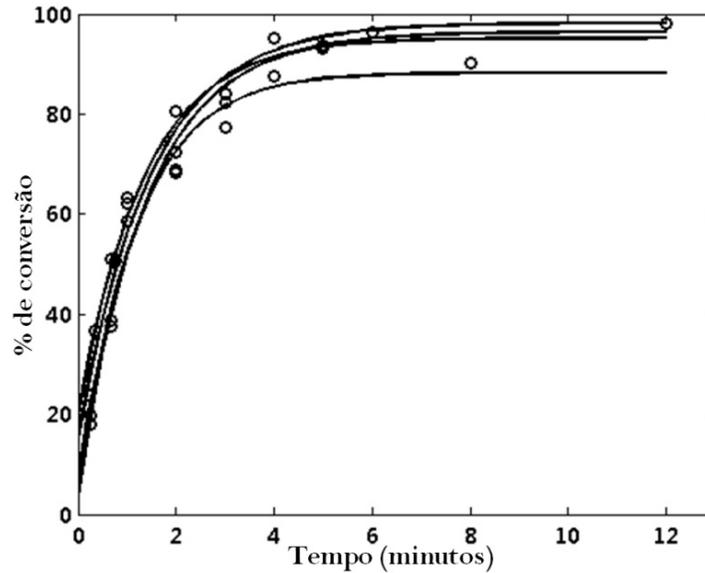


Figura 3.7. Ajuste cinético para as reações de transesterificação obtidas pelas análises de $^1\text{H-RMN}$.

Os parâmetros cinéticos da equação 3.2 foram calculados para todas as bateladas estudadas, e poucas diferenças foram observadas, como mostra a Tabela 1. Estas diferenças foram, provavelmente, devido aos erros aleatórios do procedimento experimental da determinação por $^1\text{H-RMN}$, como sugerido por Schuchardt e co-autores (*Gelbard, 1995*). Desta forma, todas as bateladas foram consideradas como obtidas sob condições normais de operação (*Normal Operation Conditions - NOC*).

Tabela 3.1. Parâmetros cinéticos utilizados para ajuste dos pontos obtidos por $^1\text{H-RMN}$.

| Parâmetros | Batelada 1 | Batelada 2 | Batelada 3 | Batelada 4 |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| A_0 | 97,29 | 95,55 | 95,10 | 96,44 |
| k_1 | 83,72 | 69,53 | 64,88 | 88,87 |
| a | 0,48 | 0,50 | 0,57 | 0,50 |
| R^2 | 0,9791 | 0,9893 | 0,9987 | 0,9643 |

Através da equação cinética obtida, as concentrações estimadas em função do tempo foram obtidas em 48 pontos temporais, entre 0 e 12 min, correspondendo ao

momento exato em que os espectros de IR foram adquiridos. Estes rendimentos estimados de FAEE foram usados para construir um modelo de calibração multivariada com os dados espectrais baseados em regressão por quadrados mínimos parciais. Os erros calculados foram expressos pela relação entre as concentrações estimadas pelo modelo e concentrações reais obtidas por $^1\text{H-RMN}$.

Quatro bateladas foram monitoradas de 0,3 a 12 min, resultando em 751 pontos espectrais para cada intervalo de tempo. Assim, um cubóide de dados foi obtido com dimensões de $4 \times 48 \times 751$ (batelada x tempo x espectro). Duas estratégias foram adotadas utilizando o processo de validação cruzada (*leave-one-out*). Na primeira, utilizou-se 3 bateladas para calibração e uma para validação e na segunda, utilizou-se uma para calibração e as outras três para validação. Em ambos os casos, os erros foram estimados com base no RMSPD (equação 2) para cada batelada.

Vários métodos de pré-processamento foram testados, como derivadas, correção de linha de base, filtro de Savitzky-Golay, centrar na média, autoescalamamento e seleção de variáveis utilizando *interval-PLS* (Norgaard, 2000). A metodologia utilizada para escolher o melhor pré-processamento e o número de variáveis latentes foi o menor valor RMSPD e RMSEP (Millerihli, 1984; do Nascimento, 2007), bem como a ausência de erros sistemáticos.

Na primeira etapa, a estratégia de utilizar apenas uma batelada e prever as outras foi avaliada. Neste processo e nos outros, os dados foram sempre centrados na média e o número de variáveis latentes foi determinado pelo RMSECV. Como pré-processamento foi utilizado a primeira derivada das intensidades dos espectros, pois se observou que este procedimento melhora a precisão do método, reduzindo os erros relativos médios em torno 10%. Todos os modelos construídos com diferentes bateladas utilizaram duas variáveis latentes. Os modelos obtidos foram utilizados para prever as outras bateladas, obtendo-se os erros relativos em relação à concentração estimada por RMN. Os resultados foram expressos como erros relativos médios de 55% para cada batelada.

As demais análises foram realizadas com base em dados de três bateladas de calibração e outra para previsão. Foram construídos modelos da mesma forma que na análise anterior, utilizando derivadas e centralização na média e o número de VL foi determinado da mesma forma. Uma considerável redução em relação aos erros de previsão foi observada, obtendo erros médios em torno de 30%. Este resultado demonstra a necessidade da introdução de várias bateladas no modelo de calibração, incorporando a variabilidade intrínseca das reações. No entanto, valores altos de RMSPD só puderam ser observados no início do monitoramento, como mostrado na Fig. 3.8. As bateladas foram analisadas no sistema ATR de amostragem contínua através de uma bomba peristáltica e em contrapartida, as análises de ^1H -RMN foram realizadas pelo recolhimento manual das amostras, diretamente do reator. Desta forma, observa-se um considerável tempo de atraso entre os resultados de RMN e os obtidos pelo monitoramento por IR, que prejudica a previsão inicial.

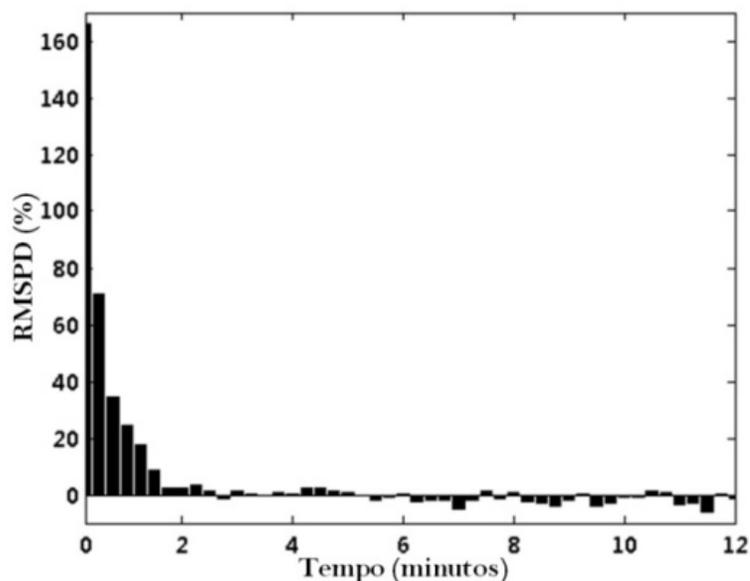


Figura 3.8. Erros relativos de previsão (RMSPD) percentual utilizando 3 bateladas para calibração.

Embora todas as bateladas tenham sido feitas nas mesmas condições, as mudanças espectrais em relação ao tempo são diferentes para cada batelada, devido ao processo de amostragem manual. Por exemplo, variações espectrais significativas, especialmente

para os números de onda de 1050 e 3300 cm^{-1} , só são observadas no terceiro lote para o intervalo 2–3 min, como mostrado na Fig. 3.9A. Subtraindo o primeiro espectro para cada lote, pode ser observados melhor visualização da variação intrínseca dos dados, como mostrado na Fig. 3.9B.

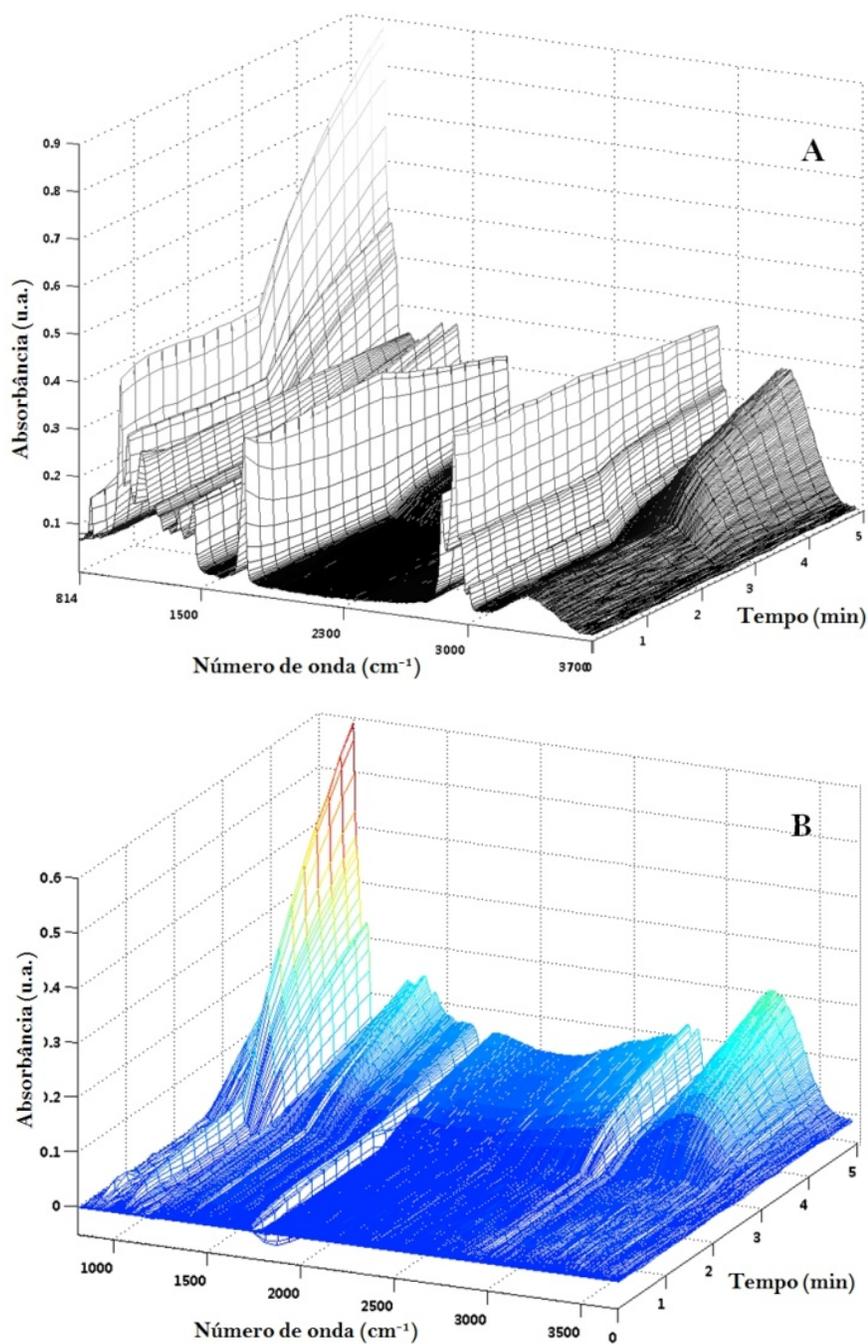


Figura 3.9. Monitoramento por IR. Espectros durante os 5^{os} minutos da reação para a 3^a batelada (A) e o mesmo monitoramento após a subtração do primeiro espectro (B).

Na tentativa de ajustar as respostas do sensor ao perfil cinético modelado obtido por RMN, foi utilizada a análise de fatores evolucionários (EFA) para determinar o início das variações dos espectros obtidos pelo monitoramento e para realizar uma correção nas respostas temporais. EFA (*Setarehdan, 2004; de Braekeleer, 2000*) e outras técnicas quimiométricas (*Garrido, 2007; Martinez, 2000*) também podem ser empregadas para monitorar qualquer mudança brusca no conjunto do sistema reacional, para visualizar a variação dos componentes e para detectar o ponto final da reação.

A análise de fatores evolucionários consiste em seguir os valores singulares da matriz espectral para os 2 primeiros tempos; depois para os 3 primeiros e assim por diante, determinando quantos fatores estão presentes nos dados. No nosso caso, como a metodologia sugere um possível emprego para controle de processos, a EFA foi realizada nos lotes de calibração e um valor limite foi escolhido a partir do logaritmo dos valores singulares, quando a primeira variação significativa do ruído instrumental apareceu. Esta estratégia foi aplicada para remover a parte da matriz de monitoramento que não tenha variação espectral significativa e assim, nenhuma informação química.

Para as bateladas de calibração, o valor limite foi escolhido e seus respectivos tempos de correção foram estabelecidos comparando com as variações espectrais sem o primeiro espectro (Fig. 3.9B). Como a variação significativa das absorbâncias de IR é provavelmente relacionada com o início da reação (2,1 minutos) no interior do sistema CIRCLE, os espectros obtidos antes destes pontos foram removidos das matrizes de dados, em cada batelada. O conjunto de todos os valores de corte limite (ou do inglês *threshold*) obtidos e seus respectivos tempos para cada batelada são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Valores limites obtidos pelo EFA em diferentes bateladas.

| | Batelada 1 | Batelada 2 | Batelada 3 | Batelada 4 |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|
| Valor limite | -1,7 | -1,6 | -2,0 | -1,5 |
| Tempo de corte (min) | 2,1 | 2,8 | 2,0 | 2,5 |

Na Fig. 3.10, são mostrados a variação dos valores singulares com o tempo e o valor limite de uma batelada de calibração (batelada 1). É possível observar maior variação do primeiro 'fator' próximo ao tempo de 2 min. Nesta batelada, o valor de corte selecionado foi de -1,7 com um tempo correspondente de 2,1 min. Após a obtenção de um limite a partir da batelada de calibração, EFA foi realizada novamente sobre o conjunto de validação levando em consideração apenas os tempos acima do valor limite obtido na batelada de calibração. Este processo produz uma correção nos tempos das bateladas, removendo os dados que não apresentam variações espectrais nos primeiros tempos de monitoramento.

No entanto, pode-se obter as mesmas informações com uma análise visual da Fig. 3.9B, mas a EFA permite obter o mesmo resultado com um passo computacional e com robustez e eficiência. Após a obtenção de um valor limite obtido a partir do conjunto de calibração, ele pode ser usado para estimar e corrigir o tempo de corte e do perfil de concentração, respectivamente.

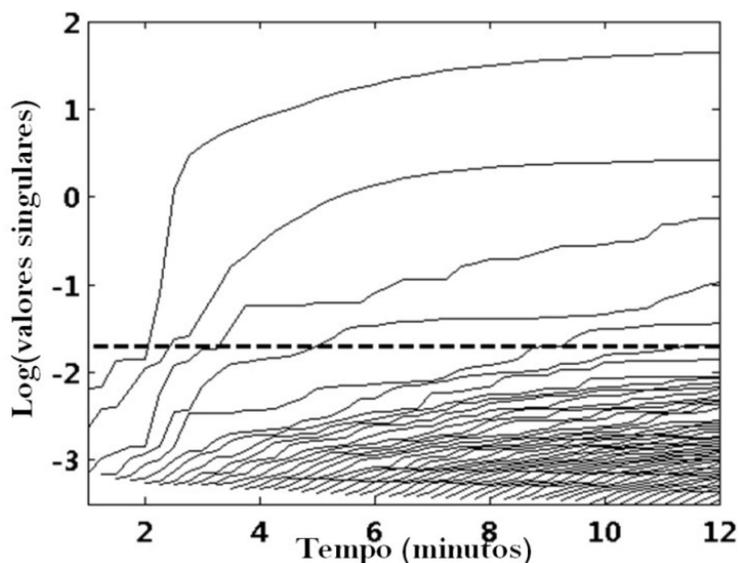


Figura 3.10. Análise de fatores evolucionários realizada em uma batelada de calibração. O valor limite escolhido (linha tracejada) indica a remoção dos tempos menores que 2 minutos de monitoramento.

Tabela 3.3. Resultados de previsão dos rendimentos das bateladas obtidos com validação cruzada e validação externa com diferentes métodos de pré-processamento.

| Parâmetros | Derivada ^a | Correção de linha base ^b | Alisamento por SG ^c | Centrar na média | Autoescalar | iPLS ^d |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|------------------|-------------|-------------------|
| VL ^e | 4 | 4 | 5 | 6 | 4 | 4 |
| RMSEC | 4,6 | 4,5 | 4,4 | 2,7 | 3,4 | 3,3 |
| RMSECV | 5,0 | 4,9 | 4,8 | 3,8 | 3,8 | 3,6 |
| RMSEP | 3,3 | 2,6 | 3,1 | 1,9 | 2,3 | 2,0 |
| RMSPD (%) | 7,08 | 4,93 | 6,92 | 4,53 | 6,67 | 4,74 |

^a Primeira derivada obtida com uma janela de 13 pontos;

^b Obtido utilizando como referência a região entre os números de onda de 1900 a 2400 cm⁻¹;

^c Alisamento de Savitzky-Golay obtido com uma janela de 21 pontos;

^d Obtido utilizando 20 intervalos, centrar na média. Intervalo escolhido de 1693 a 1839 cm⁻¹;

^e Variáveis latentes.

Tabela 3.4. Comparação dos resultados obtidos para diferentes estratégias aplicadas na avaliação das reações^a.

| | Estratégia 1 (PLS) | Estratégia 2 (PLS) | Estratégia 1 (EFA/PLS) | Estratégia 2 (EFA/PLS) |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|
| RMSEP (%) | 55,5 | 26,5 | 5,8 | 3,5 |
| RMSDP max. (%) | 65,9 | 47,4 | 6,8 | 4,7 |
| RMSDP min. (%) | 33,6 | 14,3 | 4,0 | 2,4 |
| RMSDP médio (%) | 55,5 | 26,5 | 5,8 | 3,5 |

^a utilizando duas VL.

Modelos de calibração foram construídos utilizando as duas estratégias descritas anteriormente, uma com uma batelada de calibração e três para validação e outra com três para calibração e só um para validação. Após a correção com EFA, os métodos já avaliados foram utilizados e os resultados obtidos são exibidos na Tabela 3.3. A correção dos tempos obtidos por EFA permite redução considerável dos erros de previsão, como mostra a Tabela 3.4, com erros abaixo de 5%. Os resultados apresentados na Tabela 3.4 mostram também a necessidade de utilizar diversas bateladas de calibração, inserindo grandes quantidades de variação e reduzindo os erros de previsão para as outras bateladas. Os erros foram normalmente distribuídos em todas as bateladas e os valores previstos pelo modelo tem boa correlação com as verdadeiras, (perfil cinético estimados por RMN), como indica a Fig. 3.11.

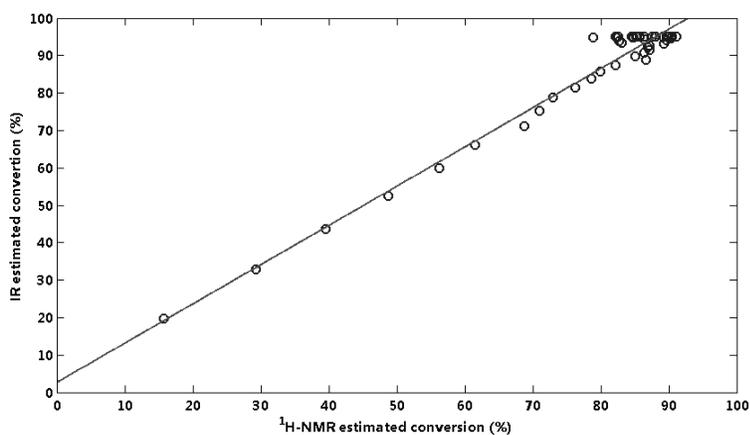


Figura 3.11. Erros relativos de previsão utilizando três bateladas para calibração após a correção temporal executada por EFA.

4. Conclusão

O método proposto proporcionou uma determinação *on-line* por IR do rendimento de FAEE na transesterificação do óleo de soja degomado (óleo após remoção de lecitina, metais e ácidos livres) utilizando etanol, como um método alternativo à análise por $^1\text{H-RMN}$. O método proposto é um método rápido e de baixo custo com potencial para ser utilizado em aplicações industriais, tais como controle e/ou otimização de processos de fabricação ou vigilância da qualidade. A estratégia EFA, utilizada para identificar as mudanças significativas nos dados de monitoramento e para corrigir os tempos entre o sensor infravermelho (sistema CIRCLE) e o reator monitorado *off-line*, foi eficiente para a redução dos erros de previsão e melhorou os resultados gerais.

5. Referências

(Arzamendi, 2006) Arzamendi, G.; Arguinarena, E.; Campo, I.; Gandia, L.M.; *Monitoring of biodiesel production: simultaneous analysis of the transesterification products using size-exclusion chromatography*. Chem. Eng. J., 122 (2006) 31-40.

(Cvengros, 1994) Cvengros, J.; Cvengrosova, Z.; *Quality-control of rapeseed oil methyl-esters by determination of acyl conversin*. J. Am. Oil Chem. Soc., 71 (1994) 1349-1352.

(de Braekeller, 2000) de Braekeleer, K.; de Juan, A.; Sanchez, F.C.; Hailey, P.A.; Sharp, D.C.A.; Dunn, P.; Massart, D.L.; *Determination of the end point of a chemical synthesis process using on-line measured mid-infrared spectra*. Appl. Spectrosc., 54 (2000) 601-607.

(do Nascimento, 2007) do Nascimento, A.P.; Trevisan, M.G.; Kedor-Hackmann, E.R.M.; Poppi, R.J.; *Simultaneous determination of dipyrone and papaverine in pharmaceutical formulation using PLS regression and UV spectrophotometry*. Anal. Lett., 40 (2007) 975-986.

(Felizardo, 2007) Felizardo, P.; Baptista, P.; Uva, M.S.; Menezes, J.C.; Correia, M.J.N.; *Monitoring biodiesel fuel quality by near infrared spectroscopy*. J. Near Infrared Spectrosc., 15 (2007) 97-105.

(Freedman, 1986) Freedman, B.; Kwolek, W.F.; Pryde, E.H.; *Quantitation in the analysis of transesterified soybean oil by capillary gas-chromatography*. J. Am. Oil Chem. Soc., 63 (1986) 1370-1375.

(Garrido, 2007) Garrido, M.; Larrechi, M.S.; Rius, F.X.; *Validation of the concentration profiles obtained from the near infrared/multivariate curve resolution monitoring of reactions of epoxy resins using high performance liquid chromatography as a reference method*. Anal. Chim. Acta, 585 (2007) 277-285.

(Gelbard, 1995) Gelbard, G.; Bres, O.; Vargas, R.M.; Vielfaure, F.; Schuchardt, U.F.; *H-1 nuclear-magnetic-resonance determination of the yield of the transesterification of rapessed oil with methanol*. J. Am. Oil Chem. Soc., 72 (1995) 1239-1241.

(Ghesti, 2006) Ghesti, G.F.; de Macedo, J.L.; Braga, V.S.; de Souza, A.; Parente, V.C.I.; Figueredo, E.S.; Resck, I.S.; Dias, J.A.; Dias, S.C.L.; *Application of Raman spectroscopy to monitor and quantify ethyl esters in soybean oil transesterification*. J. Am. Oil Chem. Soc., 83 (2006) 597-601.

(Gurden, 2002) Gurden, S.P.; Westerhuis, J.A.; Smilde, A.K.; *Monitoring of batch processes using spectroscopy*. AIChE J. 48 (2002) 2283-2297.

(Hassell, 1998) Hassell, D.C.; Bowman, E.M.; *Process analytical chemistry for spectroscopists*. Appl. Spectrosc., 52 (1998) 18A-29A.

(Herrera, 2006) Herrera, S.; *Bonkers about biofuels*. Nat. Biotechnol., 24 (2006) 755-760.

(Holcapek, 1999) Holcapek, M.; Jandera, P.; Fischer, J.; Prokes, B.; *Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods*. J. Chromatogr. A, 858 (1999) 13-31.

(Knothe, 2000) Knothe, G.; *Monitoring a progressing transesterification reaction by fiber-optic near infrared spectroscopy with correlation to H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy*. J. Am. Oil Chem. Soc., 77 (2000) 489-493.

(Knothe, 2001) Knothe, G.; *Analytical methods used in the production and fuel quality assessment of biodiesel*. Trans. ASAE, 44 (2001) 193-200.

(Lechner, 1997) Lechner, M.; BauerPlank, C.; Lorbeer, E.; *Determination of acylglycerols in vegetable oil methyl esters by on-line normal phase LC-GC*. HRC J. High Resolut. Chromatogr., 20 (1997) 581-585.

(Maeder, 1987) Maeder, M.; *Evolving factor-analysis for the resolution of overlapping chromatographic peaks*. Anal. Chem., 59 (1987) 527-530.

(Martens, 1989) Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, New York, 1989.

(Martinez, 2000) Martinez, A.; Riu, J.; Busto, O.; Guasch, J.; Rius, F.X.; *Validation of bias in multianalyte determination methods. Application to RP-HPLC derivatizing methodologies*. Anal. Chim. Acta, 406 (2000) 257-278.

(McGill, 2002) McGill, C.A.; Nordon, A.; Littlejohn, D.; *Comparison of in-line NIR, Raman and UV-visible spectrometries, and at-line NMR spectrometry for the monitoring of an esterification reaction*. Analyst, 127 (2002) 287-292.

(Millerihli, 1984) Millerihli, N.J.; Ohaver, T.C.; Harnly, J.M.; *Calibration and curve fitting for extended range AAS*. Spectrochim. Acta Part B, 39 (1984) 1603-1614.

(Neto, 2004) Neto, P.R.C., Caro, M.S.B., Mazzuco, L.M., Nascimento, M.; *Quantification of soybean oil ethanolysis with H-1 NMR*. J. Am. Oil Chem. Soc., 81 (2004) 1111-1114.

(Norgaard, 2000) Norgaard, L.; Saudland, A.; Wagner, J.; Nielsen, J.P.; Munck, L.; Engelsen, S.B.; *Interval partial least-squares regression (iPLS): A comparative chemometric study with an example from near-infrared spectroscopy*. Appl. Spectrosc., 54 (2000) 413-419.

(Pimentel, 2006) Pimentel, M.F.; Ribeiro, G.; da Cruz, R.S.; Stragevitch, L.; Pacheco, J.G.A.; Teixeira, L.S.G.; *Determination of biodiesel content when blended with mineral diesel fuel using infrared spectroscopy and multivariate calibration*. Microchem. J., 82 (2006) 201-206.

(Pinto, 2005) Pinto, A.C.; Guarieiro, L.L.N.; Rezende, M.J.C.; Ribeiro, N.M.; Torres, E.A.; Lopes, W.A.; Pereira, P.A.D.; de Andrade, J.B.; *Biodiesel: An overview*. J. Braz. Chem. Soc., 16 (2005) 1313-1330.

(Plank, 1995) Plank, C.; Lorbeer, E.; *Simultaneous determination of glycerol, and monodiglycerides, diglycerides and triglycerides in vegetable oil methyl-esters by capillary gas-chromatography*. J. Chromatogr. A, 697 (1995) 461-468.

(Rosillo-Calle, 1998) Rosillo-Calle, F.; Cortez, L.A.B.; *Towards ProAlcool II - A review of the Brazilian bioethanol programme*. Biomass Bioenergy, 14 (1998) 115-124.

(Setarehdan, 2004) Setarehdan, S.K.; *Modified evolving window factor analysis for process monitoring*. J. Chemom., 18 (2004) 414-421.

(Sperline, 1986) Sperline, R.P.; Muralidharan, S.; Freiser, H.; *New quantitative technique for attenuated total reflection (ATR) spectrophotometry – calibration of the CIRCLE ATR device in the infrared.* Appl. Spectrosc., 40 (1986) 1019-1022.

(Trevisan, 2006a) Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; *Process analytical chemistry.* Quim. Nova, 29 (2006) 1065-1071.

(Vojinovic, 2006) Vojinovic, V.; Cabral, J.M.S.; Fonseca, L.P.; *Real-time bioprocess monitoring Part I: In situ sensors.* Sens. Actuators B, 114 (2006) 1083-1091.

(Xie, 2006) Xie, W.L.; Li, H.T.; *Hydroxyl content and refractive index determinations on transesterified soybean oil.* J. Am. Oil Chem. Soc. 83 (2006) 869-872.

(Zagonel 2004) Zagonel, G.F.; Peralta-Zamora, P.; Ramos, L.P.; *Multivariate monitoring of soybean oil ethanolysis by FTIR.* Talanta, 63 (2004) 1021-1025.

(Zeaiter, 2004) Zeaiter, M.; Roger, J.-M.; Bellon-Maurel, V.; Rutledge, D.N.; *Robustness of models developed by multivariate calibration. Part I: The assessment of robustness.* TrAC - Trends Anal. Chem., 23 (2004) 157-170.

Capítulo 4.

“Utilização de cartas multivariadas de controle para avaliação de falhas em bateladas: análise on-line e pós-batelada aplicada em reações de transesterificação com monitoramento por AOTF-NIR”

1. Introdução

Atualmente, especial atenção tem sido dada ao desenvolvimento de fontes renováveis de energia, tanto por necessidades ambientais, como a redução na emissão de carbono, mas principalmente por fatores econômicos, que buscam alternativas a dependência do consumo de petróleo e seu esgotamento.

O Brasil como país possuidor de grande disponibilidade de área cultivável, recursos hídricos e climas favoráveis, apresenta elevado potencial para produção de biocombustíveis originados do cultivo agrário. No entanto, até o presente momento, a produção brasileira de biocombustíveis renováveis praticamente se restringe à produção de etanol através da fermentação do açúcar extraído da planta cana-de-açúcar (*Saccharum spp*).

O início do uso de biocombustíveis remonta ao final do século XIX, quando Rudolph Diesel utilizou álcool e óleo de amendoim como combustível em seus motores. Devido às necessidades da Segunda Grande Guerra, durante os anos de 1930 a 1940, diferentes tipos de óleos vegetais foram utilizados em motores diesel. No entanto, foi somente durante a crise de combustíveis dos anos 70, que perspectivas reais de emprego de biocombustíveis surgiram. Em consequência, neste período a alternativa de utilizar produtos vegetais para produção de combustível, além da cana-de-açúcar, pareceu tão viável que se discutiu muito em diversos eventos nacionais e congressos, e foi então lançado pelo presidente General Ernesto Geisel (1974-1979), o Programa Nacional de Óleos Vegetais - Pro-Óleo. O projeto previa complementação ao Proálcool, substituindo o diesel e reduzindo o impacto dos dois “choques do petróleo” (1973 e 1979) que ocorreram na economia do país, já que o Proálcool substituía apenas a parte leve do petróleo, o que transformou o Brasil no maior exportador de gasolina para o EUA. Contudo, em 1982 o Pro-Óleo foi engavetado, antes mesmo de sua implementação, devido ao elevado investimento inicial. O projeto tinha como proposta a adição de 30% de óleo vegetal no diesel fóssil (www.senado.gov.br).

Em 2003, o governo Brasileiro criou o PNPB (Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel), que previa a adição mínima de 2% de biodiesel ao diesel fóssil a partir de 2008 (B2) e 5% até 2013, proporções bem mais modestas em relação ao programa anterior. O PNPB busca atender 3 importantes diretrizes:

- (1) Implantar um programa sustentável, promovendo inclusão social;
- (2) Garantir preços competitivos, qualidade e suprimento;
- (3) Produzir o biodiesel a partir de diferentes fontes oleaginosas e em regiões diversas.

Conforme Fig. 4.1, extraída do portal oficial do PNPB (<http://www.biodiesel.gov.br/>), o projeto é estruturado em 3 setores: ambiental, econômico e, principalmente, social.

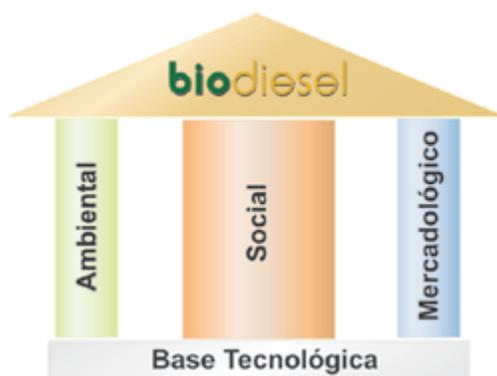


Figura 4.1. ‘Pilares’ de sustentação do biodiesel, proposto pelo PNPB.

Utilizando como base de dados o portal *Web of Science* e a palavra “biodiesel”, é possível observar um crescimento próximo a 50%/ano na quantidade de trabalhos científicos oriundos de grupos de pesquisa nacionais, a partir do lançamento do projeto PNPB em 2003. Grande parte destes artigos envolve procedimentos para obtenção de biocombustíveis a partir de novas fontes de substratos, como palmas e plantas amazônicas (Lima, 2008) e algas (de Moraes, 2008; Rodolfi, 2009) e outras plantas com menor potencial graxo e desconhecida capacidade para a produção de biocombustíveis, como óleo de café (Oliveira, 2008), rabanete (Domingos, 2008) e outras espécies. O

emprego de novos catalisadores inorgânicos (Nakagaki, 2008) e enzimáticos (lípsases) (Costa Rodrigues, 2008) para óleos já conhecidos, como óleo de soja, jatofã e coco também tem sido extensivamente realizado. Embora em menor número, o desenvolvimento de novas metodologias analíticas associadas à produção e ao controle de qualidade de biocombustíveis também apresentou o mesmo crescimento.

Os principais fatores que contribuem à qualidade do biodiesel estão associados a qualidade da matéria-prima (acidez, presença de proteínas (degumado), água e origem do óleo) e no final do processo, ao teor de glicerina e % de conversão (Knothe, 2005). Como todos estes fatores estão associados a compostos orgânicos, podem ser acompanhados através da espectroscopia no infravermelho. Desta forma, esta técnica analítica é a que apresenta o maior potencial para monitoramento pré (matéria-prima), durante e pós-processo de transesterificação industrial, devido ao seu baixo custo de implementação (exclusivo para o infravermelho próximo) e elevadas velocidades de análise e interpretação, principalmente quando associada a modelos fundamentados em estatística multivariada.

1.1. Estatística Multivariada no Controle de Processos

As técnicas estatísticas multivariadas, utilizadas no controle de processos químicos (MSPC – *multivariate statistical process control*), podem ser divididas de diferentes formas, a saber:

a. Quanto às relações matemáticas estabelecidas pelo modelo estatístico:

Neste aspecto, podemos dividir as técnicas MSPC em modelos regressivos, os quais foram vistos nas primeiras aplicações deste trabalho, e modelos exploratórios, onde os objetivos principais são a detecção de anomalias e identificar variabilidade em função do tempo. Nos modelos regressivos, como o PLS, são estabelecidas relações numéricas entre o conjunto de variáveis dependentes (bloco X) e as independentes (bloco y), conferindo propriedades previsíveis ao modelo estatístico. Nos modelos exploratórios, como o PCA, devido à ausência do bloco y, a relação numérica do modelo

é feita somente no bloco X. Esta propriedade dos modelos exploratórios exige empregar um conjunto histórico muito maior de dados, visto que não existem variáveis independentes que possibilitam a validação dos resultados por outra técnica analítica.

b. Quanto ao tempo reacional de processos em bateladas:

Independentemente, se utilizado um modelo estatístico multivariado regressivo ou exploratório, é possível estabelecer paralelamente dois diferentes modelos, levando em conta a forma com que o vetor tempo, relativo ao tempo decorrido ao longo de uma batelada, é utilizado no modelo estatístico. Se o modelo estatístico estabelecido englobar K tempos, sendo K definido pelo conjunto de números compreendidos do início até o final da batelada, originará um modelo denominado ‘pós-batelada’. Este tipo de método é utilizado para avaliações de qualidade do produto final e não pode ser utilizado no monitoramento ou controle de um processo, pois é necessário a finalização da batelada para a inclusão no modelo. Por fim, se forem utilizados tempos locais na construção dos modelos, dará origem aos métodos conhecidos como ‘*on-line*’ ou ‘*em tempo real*’, que permitem o monitoramento (e controle) do processo durante o decorrer da batelada, à cada intervalo de tempo.

Esta classificação é a mais importante, pois está diretamente associada à forma com que os dados são obtidos e como eles serão pré-processados nos diversos métodos estatísticos disponíveis.

Na terminologia ‘*quimiométrica*’, em relação ao formato dos dados, utiliza-se os termos *dados de ordem zero*, *primeira* e *segunda ordem* para designar os conjuntos de variáveis dependentes (bloco X), com dimensões vetoriais, matriciais e tensoriais, respectivamente (Sena, 2005; Bro, 1998). O mesmo princípio pode ser utilizado nos métodos MSPC, de forma que os métodos pós-batelada utilizam um conjunto de dados definido por dimensões tensoriais dadas por $i \times j \times k$ e nos métodos estatísticos *on-line* (com algumas exceções), possui dimensões matriciais, definidas por $j \times k$. Para melhor explicação, consideremos o seguinte exemplo (Marco, 2005):

Uma reação em bancada é monitorada por um espectrofotômetro UV-Vis através de uma cela de fluxo e gera ao final da reação, no tempo K , um conjunto de dados caracterizado por uma matriz de dimensões J (somatório dos comprimentos de onda na região do UV-Vis) x K (somatório do número de espectros, ao longo da reação). No entanto, essa reação é monitorada ao longo de uma faixa de pH, de modo que uma nova dimensão é incluída, gerando um conjunto histórico de dados caracterizado por um cubóide, de dimensões I (pH ou bateladas) x J (espectro) x K (tempo) conforme Fig. 4.2.

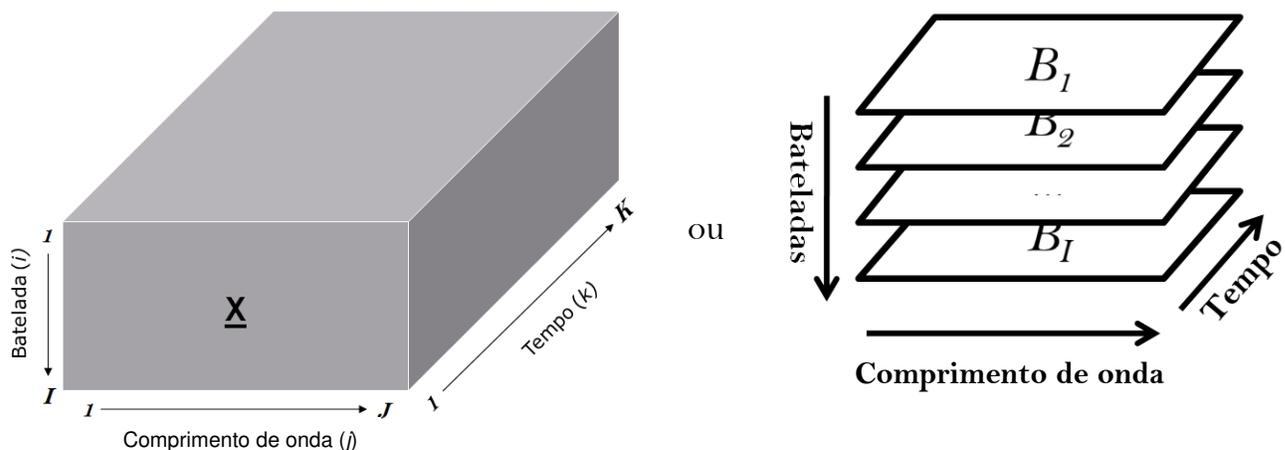


Figura 4.2. Arranjo tridimensional de dados obtidos por monitoramento multivariado (espectroscópico) de diversos valores de pH ao longo de um determinado período de tempo fixo.

Os métodos estatísticos *on-line* são os mais empregados pois utilizando frações do tempo de reação, permitem avaliação do desempenho do processo em tempo real, o que permite a detecção de falhas e tendências durante o decorrer das reações (*Skibsted, 2005; Wold, 1998*) por métodos exploratórios e a previsão indireta de variáveis físico-químicas, como o rendimento ao longo da reação.

No desenvolvimento de métodos de análise de qualidade final da batelada, são empregados modelos *multi-way* ou de segunda ordem (também conhecidos como métodos multidimensionais) (*Bro, 1998*). No entanto, quando utilizada uma técnica espectroscópica que forneça dados de segunda ordem, como a fluorescência molecular de excitação x emissão (*Silva, 2007*), é possível a utilização dos métodos

multidimensionais, como o *PARAFAC*, no monitoramento em tempo real ou *on-line* (Amigo, 2008). Estes modelos, como o método de Tucker (Bro, 1998; Trevisan, 2003), executam a *deconvolução* do tensor de dados em matrizes de *loadings* e *scores*, obedecendo ao diagrama representado na Fig. 4.3.

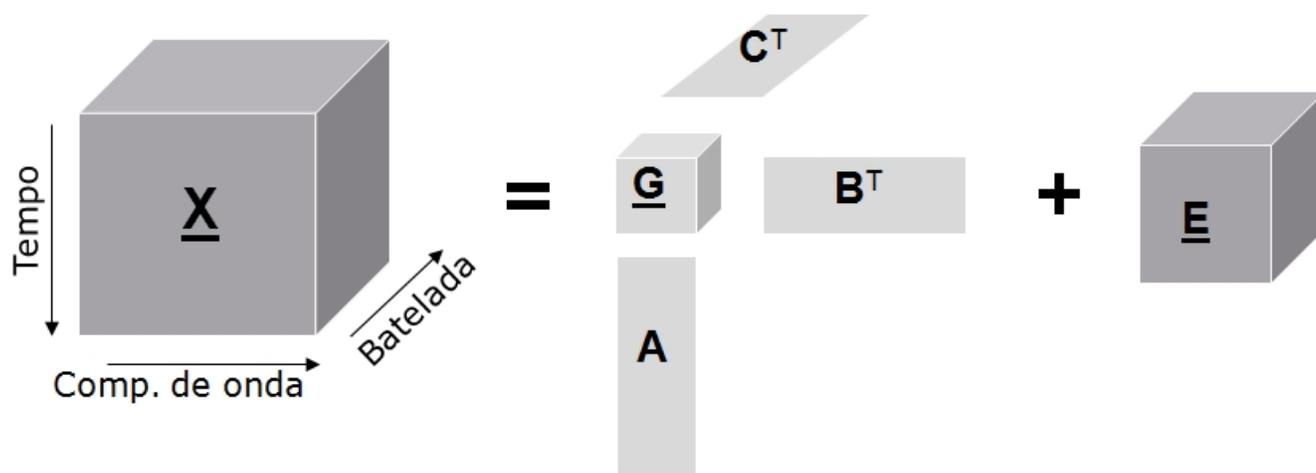


Figura 4.3. Estrutura do modelo *Tucker*, empregado para conjuntos de segunda ordem.

Os métodos estatísticos aplicados à análise *on-line* utilizam, via de regra, uma etapa de desdobramento (ou do inglês *unfolding*). Este desdobramento pode ser realizado de duas formas distintas, chamada de etapas de pré-processamento. A primeira delas ocorre a vetorização das bateladas (*'vec(batelada)'*), transformando a matriz de dados de cada batelada que possui dimensões j (comp. de onda) \times k (tempo) em um vetor de dimensões $1 \times JK$. Com a obtenção de várias bateladas, uma matriz de dados de dimensão $i \times jk$ é obtida (dimensão i). Já na segunda possibilidade, se constrói modelos locais, em cada tempo de análise do monitoramento. Dessa forma, o tensor \underline{X} é fracionado em uma série de i matrizes de dimensões $j \times k$ e cada sub-matriz é processada com o método PCA (*Principal Component Analysis*) (Martens, 1989). No primeiro caso, para o monitoramento em tempo real, no processo de previsão de uma batelada, é necessário preencher os tempos que faltam até o final da batelada com uma

variância média ou valores ausentes, conforme proposto por MacGregor e colaboradores (Nomikos, 1994; Nomikos, 1995). Mas o mesmo procedimento não é necessário nos métodos de modelos locais. O segundo caso, mais simples, proposto por Wold (Wold, 1998), consiste em construir modelos isolados para cada tempo de monitoramento, decompondo desta forma o tensor em K modelos. Cada um destes modelos locais pode ser utilizado em propostas exploratórias ou de regressão. No entanto, estes modelos apresentam correlações ou dependência entre si, dando origem ao segundo método, conhecido como método de vetorização e proposto por MacGregor (Westerhuis, 1999). Outra alternativa também utilizada em processos com variáveis correlacionadas é o emprego de séries temporais (Guterres, 2006).

Na Fig. 4.4 é mostrada a forma de processamento de um tensor de dimensões $I \times J \times K$ em uma matriz de dimensões $IK \times J$, caracterizando o procedimento proposto por Wold. Já a Fig. 4.5, o mesmo tensor é decomposto em uma matriz de dimensões $I \times KJ$, que caracteriza o procedimento proposto por MacGregor.

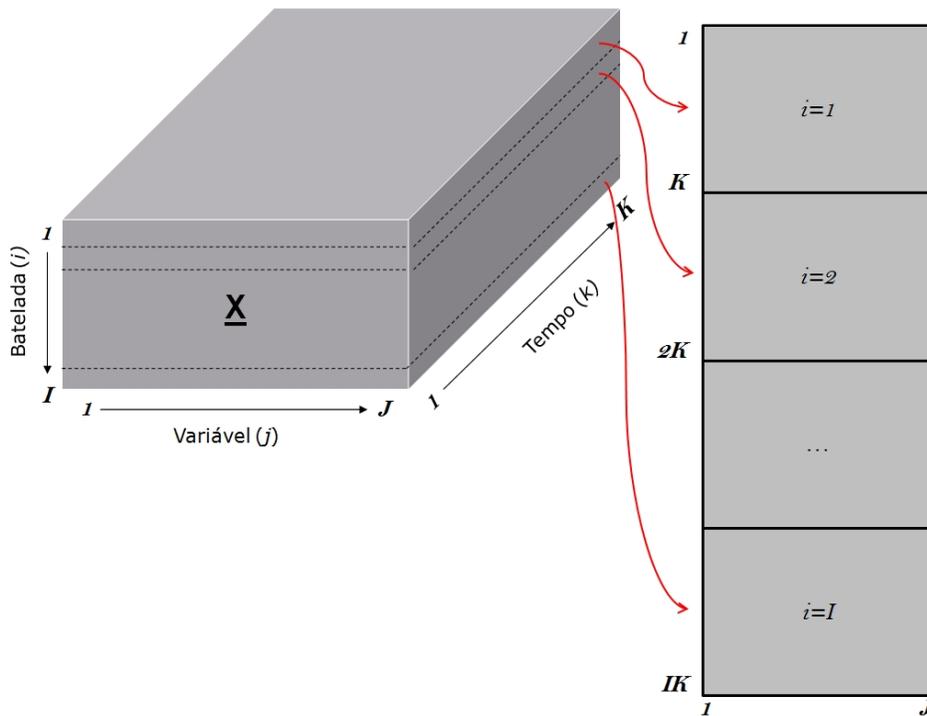


Figura. 4.4. Método de pré-processamento baseado no desdobramento das variáveis.

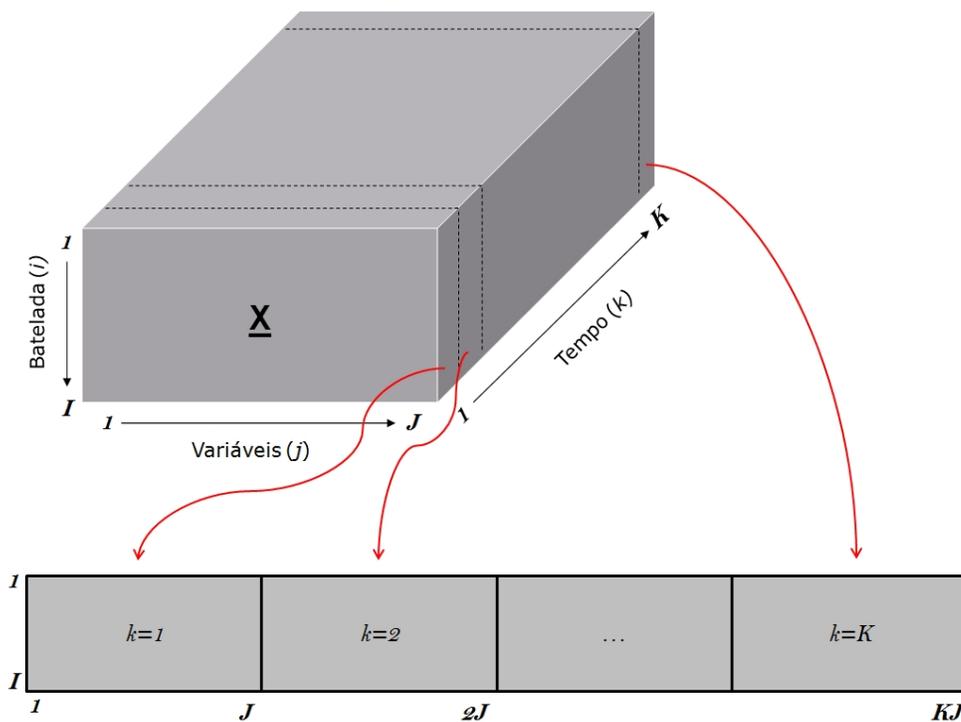


Figura 4.5. Método de pré-processamento baseado no desdobramento das bateladas.

Similarmente às etapas de construção de modelos de regressão multivariados, os métodos estatísticos aplicados ao monitoramento de processos também necessitam de etapas de modelagem (também chamado de etapa de treinamento ou aprendizagem). Nesta etapa é utilizado um conjunto de bateladas (amostras) para construir o modelo estatístico. Este conjunto de bateladas deve ser obtido em situação sob controle e com o processo bem ajustado (NOC – *Normal Operation Conditions*) mas também deve possuir a variabilidade natural das bateladas futuras. Um modelo construído com estas amostras será um modelo robusto, bem comportado nas condições normais de operação e com padrões normais de evolução e assim, capaz de detectar falhas, tendências e *outliers* (amostras anômalas). Com o tempo, devido a desgastes dos equipamentos, troca de matéria-prima, otimização do processo, etc, será necessário o ajuste do modelo, que pode ser feito por transferência de calibração ou mesmo, a construção de um outro, com a obtenção de novo conjunto histórico.

A estatística *Hotelling*, também conhecida como T^2 , é definida como a soma dos *scores* quadráticos e normalizados (*Hotelling, 1947*) e é uma medida da variação de cada amostra em relação ao modelo PCA empregado. Desta forma, a carta de controle T^2 pode ser empregada para identificar dispersões maiores que aquelas observadas na construção do modelo, permitindo a visualização de tendências ao estado fora de controle. Já a estatística Q é uma medida residual de cada amostra, que mede a variação dos dados fora do plano definido pelos componentes principais. A utilização de ambas as cartas, também conhecidas como cartas de *Shewhart*, são complementares e permitem uma rápida identificação de alterações durante ou após o desenvolvimento de bateladas ou processos. Neste trabalho, várias bateladas da reação de transesterificação estudada na segunda etapa deste projeto (Capítulo 3) foram monitoradas na região do infravermelho próximo com um espectrômetro baseado em AOTF (*Acousto-Optic Tunable Filter*). Através das estratégias descritas, três modelos multivariados foram construídos, utilizando-se os parâmetros T^2 e Q para realizar a previsão de falhas, através de cartas multivariadas de controle.

2. Experimental

2.1. Reagentes e soluções

Foram empregados os mesmos reagentes utilizados no item 2.1. do capítulo 3 (pág. 68).

2.2. Aparelhos e software

As reações foram realizadas em um balão de vidro de fundo redondo com capacidade de 50 mL, mantido sob agitação constante através de uma barra magnética de 2 cm e em temperatura de 27 ± 1 °C. As análises de NIR foram realizadas em um sistema *on-line* utilizando tubulação de *tygon* (diâmetro interno de 1 mm) conectado ao reator e a uma bomba peristáltica modelo 78001-22 (Ismatec IPC, Suíça), utilizando vazão de 0,7 mL min⁻¹. Foi utilizada uma cubeta de quartzo de 1 mm de espessura para obter espectros de reflectância da solução circulante, através de um espectrômetro de infravermelho próximo AOTF marca Brimrose (TEAF 1.5-3.0), com cristal de TeO₂.

A análise de dados foi realizada utilizando o software Matlab 6,5 (The Mathworks), com “PLS toolbox” (Eigenvector Technologies) versão 3,5 em um microcomputador AMD Athlon 1,8 GHz com 2 Gb de memória RAM, usando sistema Windows XP.

2.3. Monitoramento e análise de dados

As bateladas monitoradas totalizaram 31 unidades, dividindo-se em bateladas NOC e bateladas com falhas. Realizaram-se 16 bateladas NOC, seguindo o procedimento experimental: 12,5 g de óleo de soja no balão de reação acrescidos de 5 mL de solução etanólica com catalisador (0,81 g de NaOH previamente dissolvido em 25,21 g de etanol). A mistura reacional foi vigorosamente agitada a 27 ± 1 °C e após a adição da solução etanólica, a bomba peristáltica e o monitoramento espectral foram acionados. O monitoramento *on-line* por IR foi realizado através da obtenção de

espectros por aproximadamente 15 minutos e o branco espectral foi obtido com a cubeta vazia. Cada espectro foi obtido a intervalos constantes de 6 segundos com média de 50 varreduras e com resolução de 8 cm^{-1} . As falhas geradas foram:

- a. Utilização de álcool hidratado 98% (3 bateladas);
- b. Utilização de álcool hidratado 95% (3 bateladas);
- c. Ausência de catalisador (3 bateladas);
- d. 20% a mais de catalisador, do que o empregado no NOC (3 bateladas);
- e. 20% a menos de catalisador, do que o empregado no NOC (3 bateladas);

3. Resultados e discussão

3.1. Estudos preliminares

O monitoramento das bateladas foi realizado na região de 1100 a 2400 nm, conforme Figura 4.6A, que mostra uma batelada NOC monitorada. Apesar da variação nas intensidades de reflectância, observou-se entre as diversas bateladas monitoradas, que havia uma diferença no início do tempo de monitoramento. Utilizando a mesma estratégia empregada na segunda aplicação, o primeiro espectro obtido de cada batelada foi subtraído, de modo a observarmos uma variação próxima a zero nos primeiros tempos de monitoramento, conforme Figura 4.6B. No caso desta batelada, pode-se observar que somente após o sexagésimo (60°) espectro obtido, observa-se o início das variações espectrais propriamente ditas.

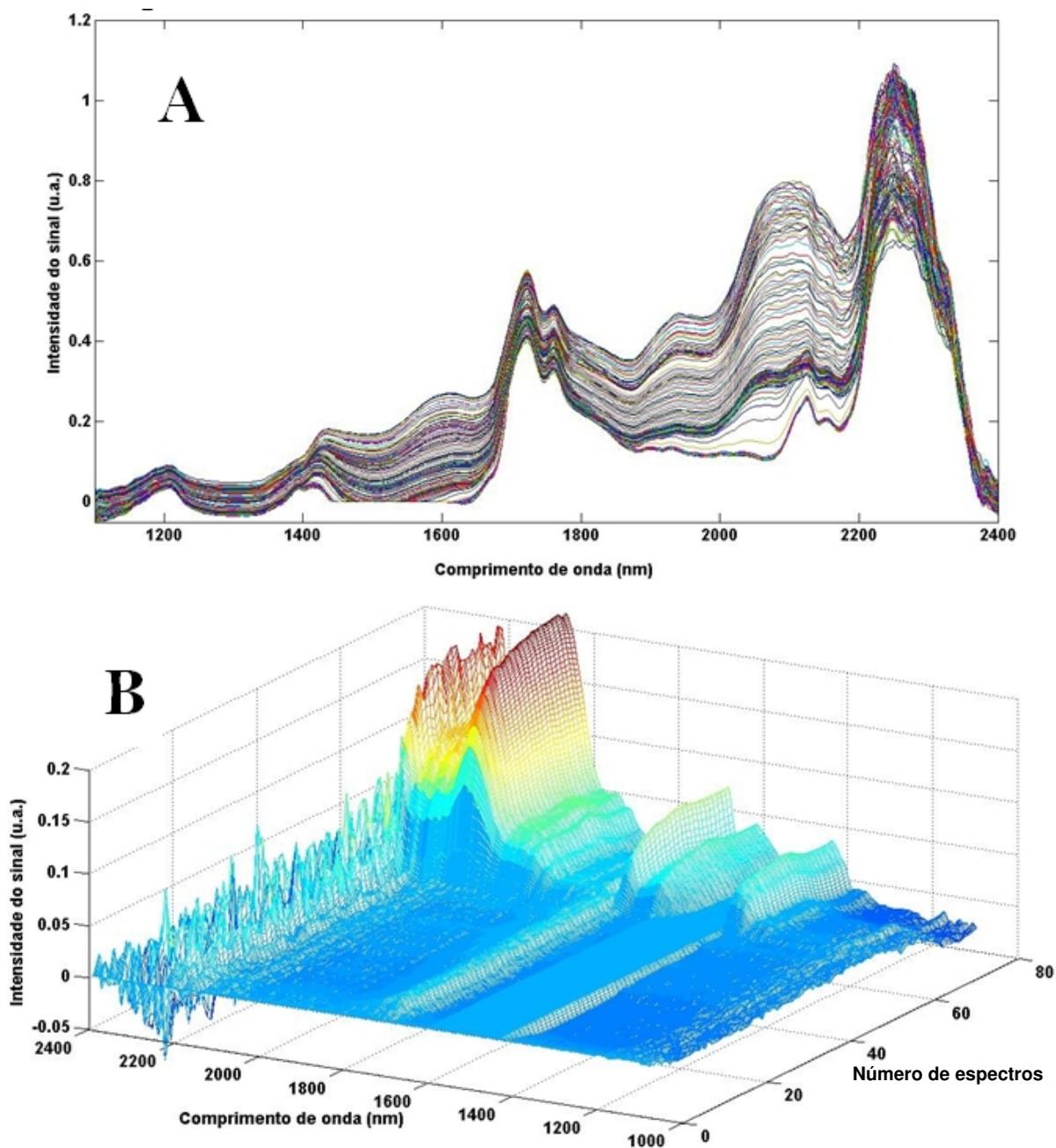


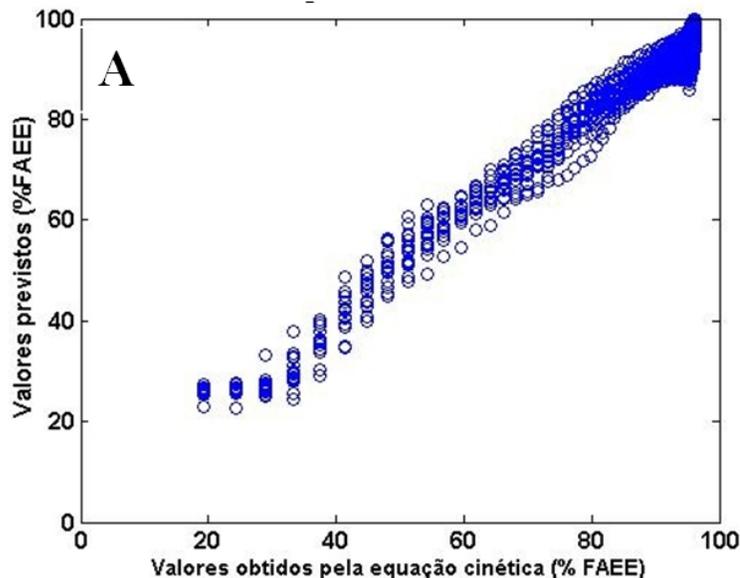
Figura 4.6. Monitoramento de uma batelada controle por AOTF-NIR (A) e com a subtração do primeiro espectro (B).

Esta pequena variação nas intensidades dos tempos iniciais se dá pelo atraso, após o início do fluxo, até a reação atingir a cela de análise. Ou seja, o mesmo problema de retardo entre o início do monitoramento e a reação propriamente dita, devido ao processo manual e não automatizado de inserção da solução etanólica com catalisador.

Também se observa uma região entre os comprimentos de onda de 2200 a 2400 nm com elevado nível de ruído, de modo que esta região foi eliminada das matrizes de dados. Este procedimento gerou redução das dimensões das matrizes de 651 pontos para 560 pontos espectrais.

O ajuste dos tempos de cada batelada foi corrigido utilizando o método EFA, proposto na segunda aplicação, de modo que o tensor NOC caracterizou-se por 16 bateladas x 560 comprimentos de onda x 141 tempos. Modelos de regressão utilizando PLS entre estas 16 bateladas NOC e os perfis cinéticos da reação obtidos no trabalho anterior também foram avaliados, mostrando que após a correção pelo método EFA, ocorre boa previsão do modelo (*Trevisan, 2007*).

Na etapa de validação, utilizou-se validação interna, com procedimento *leave-one-out*, onde uma batelada é descartada do conjunto de calibração e utilizada como previsão, e assim até todas serem empregadas. Na Figura 4.7, o gráfico dos escores de previsão são mostrados, de forma que pode ser observada uma boa correlação entre a previsão obtida pelo modelo PLS e a cinética de referência (Fig. 3.7). Os escores de previsão se situaram dentro dos limites superiores e inferiores definidos como base 3σ (desvio padrão) dos valores dos escores das bateladas NOC, para cada ponto no tempo.



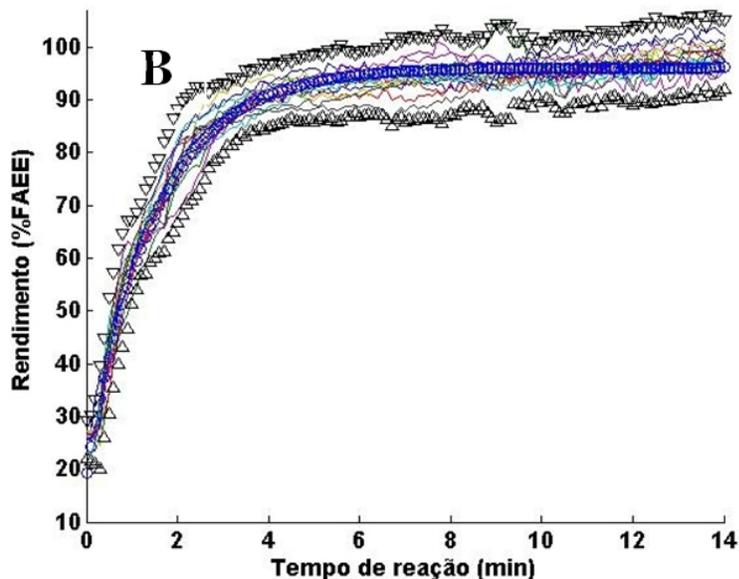


Figura 4.7. Valores de correção de previsão obtidos para bateladas NOC em relação a equação cinética de referência (eq. 3.2) (A) e limites inferiores (Δ) e superiores (∇) obtidos para os valores de calibração (B).

3.2. Análise por MPCA (PCA multidimensional)

O primeiro método empregado para a determinação de falhas foi o *Multi-way PCA* também conhecido como MPCA, que é um dos métodos multidimensionais utilizados para a avaliação de bateladas com dimensões $i \times j \times k$. Nesta avaliação, um modelo utilizando a estrutura do MPCA foi obtido com as amostras NOC, utilizando-se 5 variáveis latentes e descrevendo mais que 99% da variância do bloco \mathbf{X} , conforme Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Variância capturada pelos PCs no modelo MPCA nas bateladas NOC.

| Número de componentes principais | Porcentagem de variância capturada pelo PC (%) | Porcentagem de variância cumulativa (%) |
|----------------------------------|--|---|
| 1 | 84,99 | 84,99 |
| 2 | 9,45 | 94,44 |
| 3 | 2,44 | 96,88 |
| 4 | 1,33 | 98,22 |
| 5 | 1,00 | 99,22 |

Este modelo foi empregado para determinar os limites das cartas T^2 e Q . Conforme Fig. 4.8, são apresentados os valores obtidos de T^2 e Q para as bateladas controle. Observa-se que as bateladas 3 e 4 apresentaram um valor de Q acima do limite de 95% de confiança obtido pela distribuição F estabelecido para as outras bateladas do conjunto NOC.

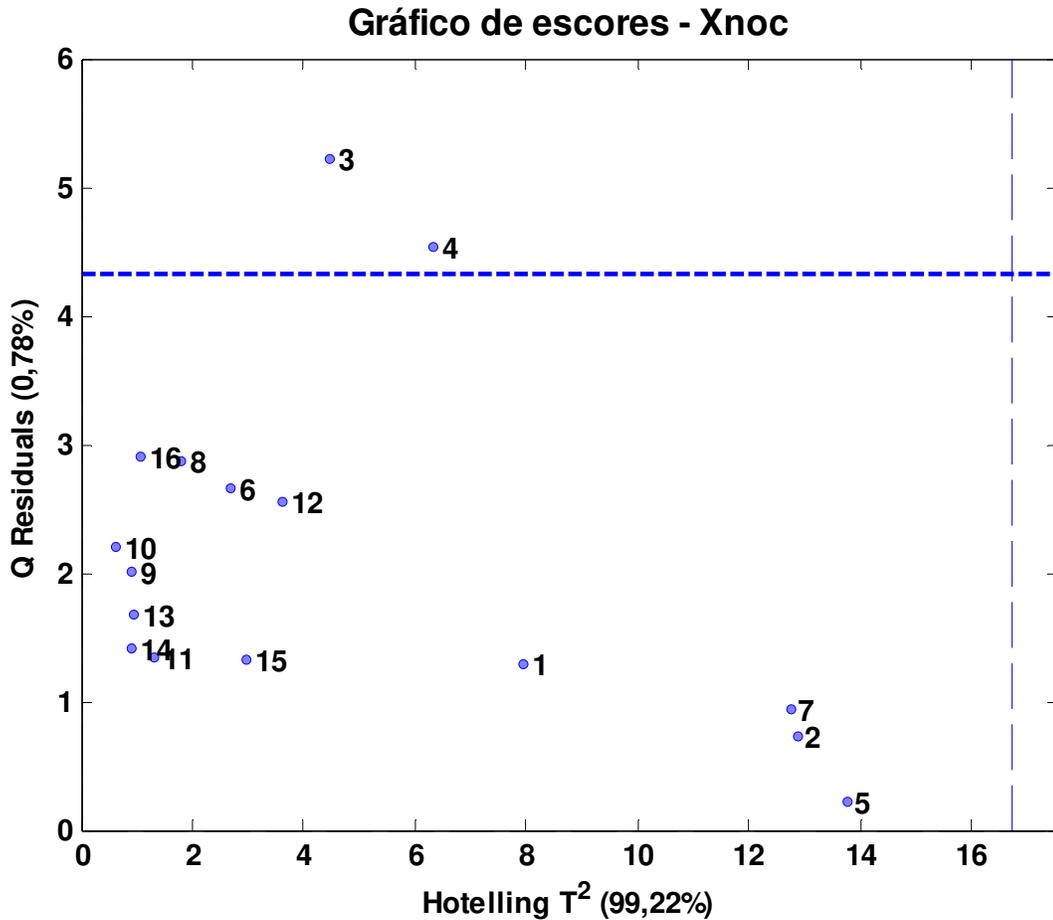


Figura 4.8. Gráfico dos escores para o conjunto NOC e os limites da distribuição F 95% (- -).

Outro gráfico importante na avaliação do conjunto NOC é apresentado na Fig. 4.9, que compreende o espaço amostral definido pelos componentes de maior variância capturada (PC1 x PC2), podendo-se observar que as bateladas 2 e 5 encontram-se fora do círculo definido como 95% da distribuição F, sendo que considerável parte do

autovalor do PC1 é utilizado na projeção destas amostras. A permanência das amostras 2 e 5 no conjunto NOC também implica na necessidade de um número maior de componentes para absorver a variância destas duas bateladas, no entanto, devido ao baixo valor residual Q , estas bateladas foram mantidas no modelo. Desta forma, somente as bateladas que apresentaram alto valor de resíduo (3 e 4) foram removidas, e calculando-se novamente o modelo, obteve-se um incremento na variância explicada pelos PCs, conforme mostrado na Tabela 4.2.

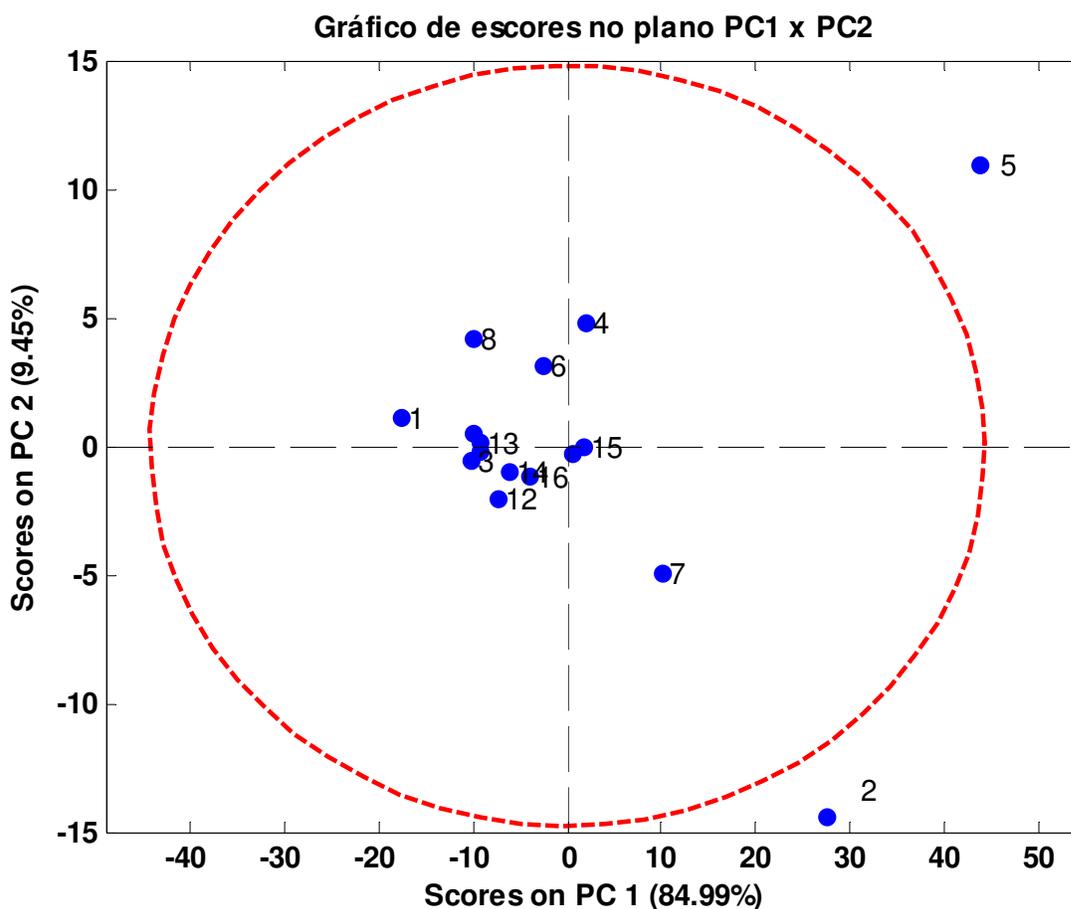


Figura 4.9. Gráfico dos escores do conjunto NOC definido pelos PC1 e PC2, com destaque para a distribuição F de 95%.

Tabela 4.2. Variância capturada pelos PCs no modelo MPCA nas bateladas NOC após a eliminação das bateladas 3 e 4.

| Número de componentes principais | Porcentagem de variância % capturada pelo PC | Porcentagem de variância % cumulativa |
|----------------------------------|--|---------------------------------------|
| 1 | 86,37 | 86,37 |
| 2 | 9,36 | 95,73 |
| 3 | 2,05 | 97,78 |
| 4 | 1,10 | 98,88 |
| 5 | 0,65 | 99,53 |

Após a remoção das bateladas 3 e 4, um novo modelo MPCA foi calculado, obtendo-se o gráfico apresentado na Fig. 4.10, onde todas as bateladas do conjunto NOC podem ser definidas pelo espaço amostral compreendido por 95% da distribuição F dos parâmetros T^2 e Q . A Figura apresenta nova numeração seqüencial.

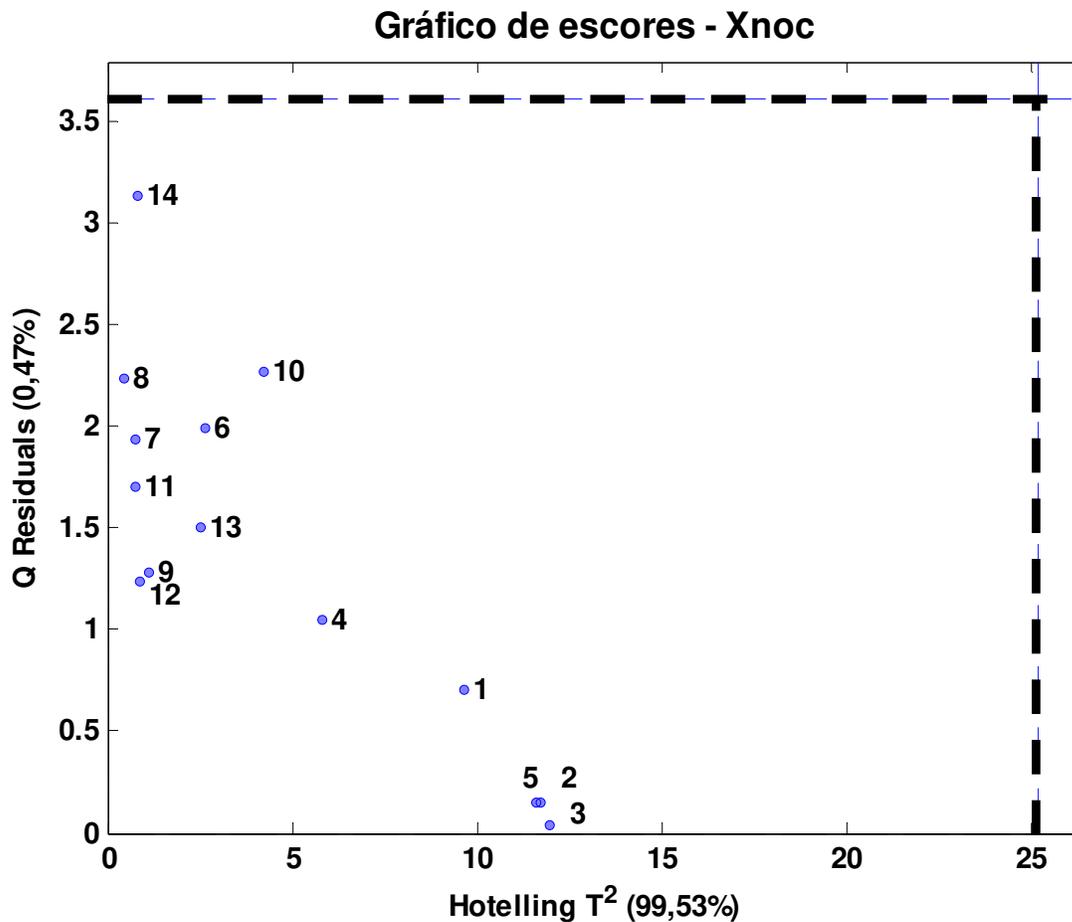


Figura 4.10. Gráfico dos escores para o conjunto NOC após a retirada das bateladas 3 e 4, com os limites da distribuição F 95% (—).

Estabelecidas as condições iniciais de operação do modelo estatístico MPCA a ser empregado no monitoramento das bateladas, partiu-se para a avaliação da capacidade do modelo de identificar as falhas inseridas nas bateladas subsequentes. Na ineficiência do modelo em identificar qualquer uma das cinco falhas, é necessário reajuste nos parâmetros estabelecidos durante a calibração, como seleção de novas amostras ou variáveis, novo número de PCs, maior número de bateladas NOC ou, até mesmo, substituição do sensor analítico.

Conforme descrito na seção experimental, foram cinco as falhas simuladas, de modo que cada ‘falha’ foi obtida em triplicata. A numeração das bateladas seguiu ordem seqüencial, sendo que as bateladas com falha sempre terão a mesma numeração (15, 16 e 17) independente da falha estudada.

a. Utilização de etanol hidratado 98%:

Tendo como fundamento que as reações de transesterificação entre óleos vegetais e alcoóis de cadeia pequena, como metanol e etanol, que empregam como catalisador hidróxido de sódio (NaOH), são sensíveis à presença de água, que compete no rendimento de formação do biodiesel, umas das falhas propostas é a contaminação com álcool hidratado. Nesta primeira falha, foi utilizado como meio etanólico que suporta o catalisador, etanol anidro com adição de 2% (massa/massa) de água Milli-Q. Após a mistura, foi adicionado catalisador na mesma proporção das bateladas NOC, e esta solução foi utilizada na preparação das bateladas 15, 16 e 17. A capacidade de previsão destas falhas pelo modelo é mostrada na Fig. 4.11, de forma que as bateladas obtidas através da falha (▼) se localizaram fora dos limites de 95% tanto para o parâmetro Q como pela carta *Hotelling* (T^2).

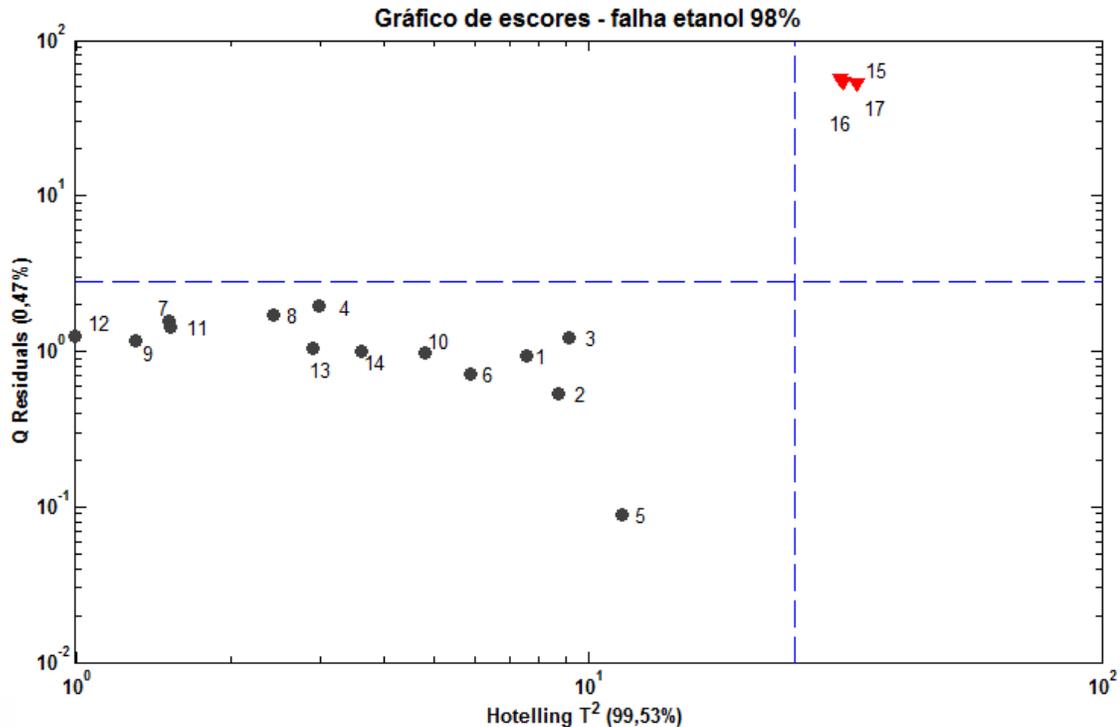


Figura 4.11. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para etanol 98%, com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T².

b. Utilização de etanol hidratado 95%:

De acordo com a Lei Federal n° 9.478, de 06 de agosto de 1997, o etanol com a finalidade de combustível, é comercializado na forma hidratada (95,5 °GL) e anidra (99,9 °GL). Desta forma, uma das falhas propostas neste estudo é a adição de etanol com um maior nível de hidratação, de 5% (m/m). A solução foi preparada da mesma forma que o procedimento anterior e utilizada na obtenção de novo conjunto de bateladas com falhas. Estas bateladas são mostradas na Fig. 4.12, onde observamos novamente que o modelo MPCA proposto foi eficiente na detecção destas variações. Somente a batelada 15 apresentou valor de escore superior ao limite tanto na carta Q quanto T². No entanto, as duas outras bateladas 16 e 17 ficaram dentro dos limites de 95% da carta T² mas fora do limite para a carta de resíduos Q. Desta forma, somente a carta Q seria eficiente para detectar alterações provenientes da utilização de etanol

hidratado 95%.

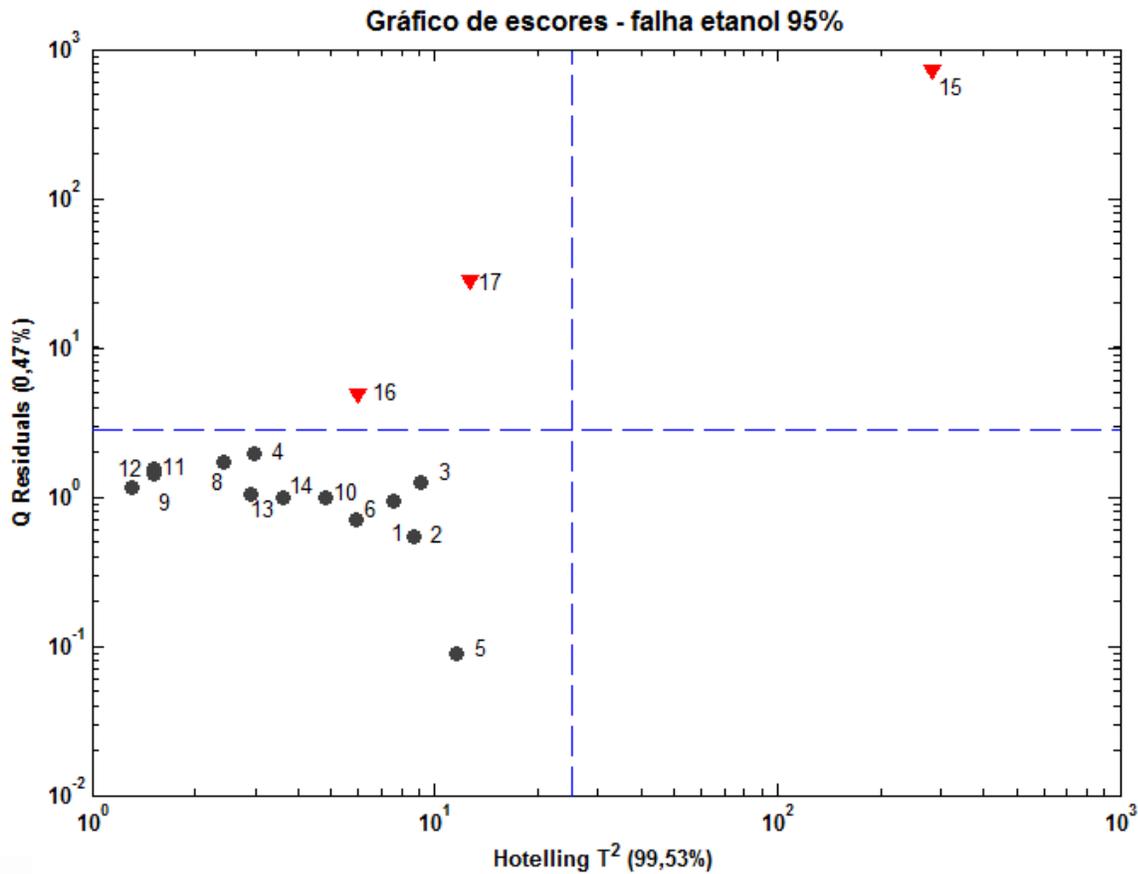


Figura 4.12. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para etanol 95%, com os limites da distribuição F 95% (--) para as cartas Q e T².

c. Ausência de catalisador:

Um dos parâmetros críticos para a boa qualidade e maior rendimento da produção de biodiesel por transesterificação, é a qualidade e quantidade do catalisador adicionado. As falhas subseqüentes (c; d; e) foram elaboradas variando a concentração do catalisador utilizado nas bateladas empregadas no conjunto de falhas. A primeira destas falhas é a ausência total de catalisador, adicionando apenas etanol anidro no meio com óleo de soja. Três bateladas foram obtidas nestas condições, obtendo-se o gráfico de escores mostrado na Fig. 4.13.

É possível observar que as três bateladas se localizaram fora dos limites tanto para

a carta Q quanto para T^2 , mostrando que ambas foram eficientes para identificar falhas causadas pela ausência de catalisador na solução etanólica.

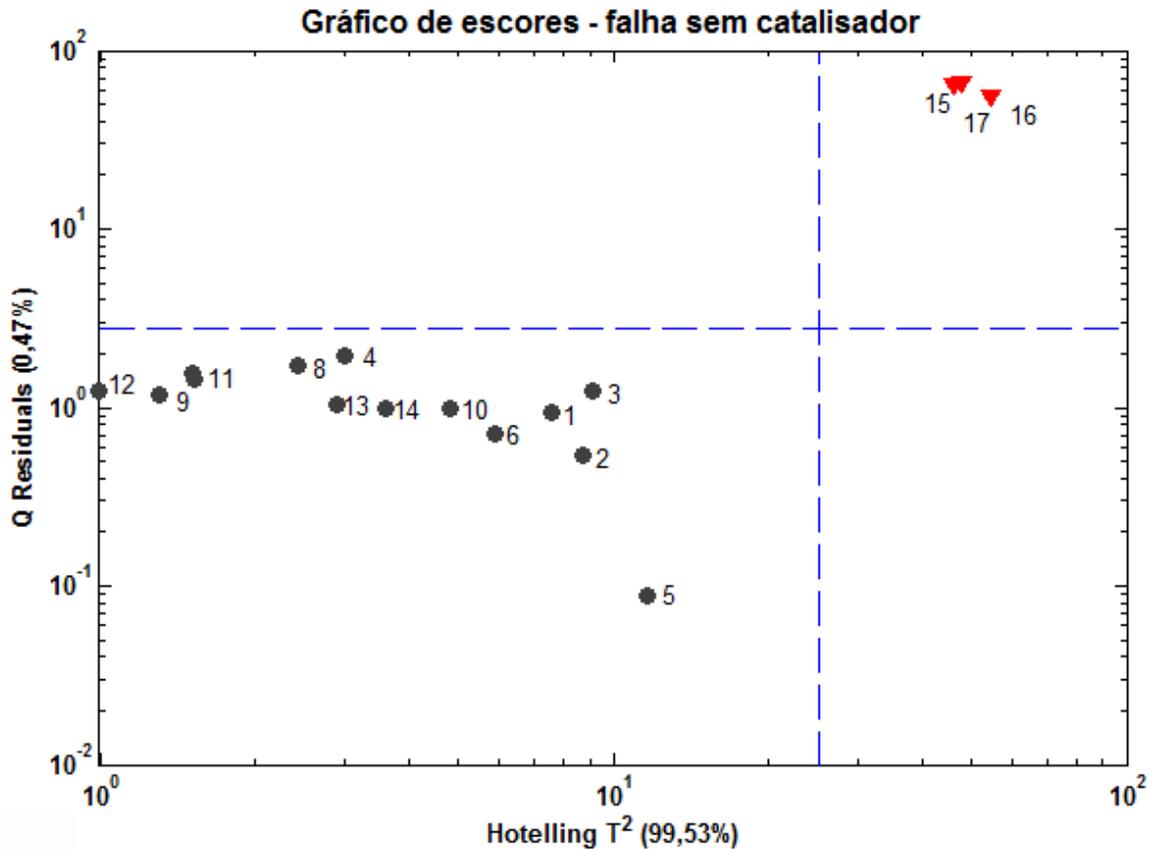


Figura 4.13. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para ausência de catalisador, com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T^2 .

d. Utilização de catalisador na concentração de 20% superior ao nível NOC:

A quarta falha se baseou na utilização de catalisador na concentração de 20% a mais daquela encontrada nas bateladas NOC. Da mesma maneira que as falhas anteriores, três bateladas foram obtidas nestas condições. Conforme pode ser observado na Fig. 4.14, os limites da carta *Hotelling* não foram suficientes para a detecção da falha, de modo que a variação só foi observada através da carta de resíduos, Q .

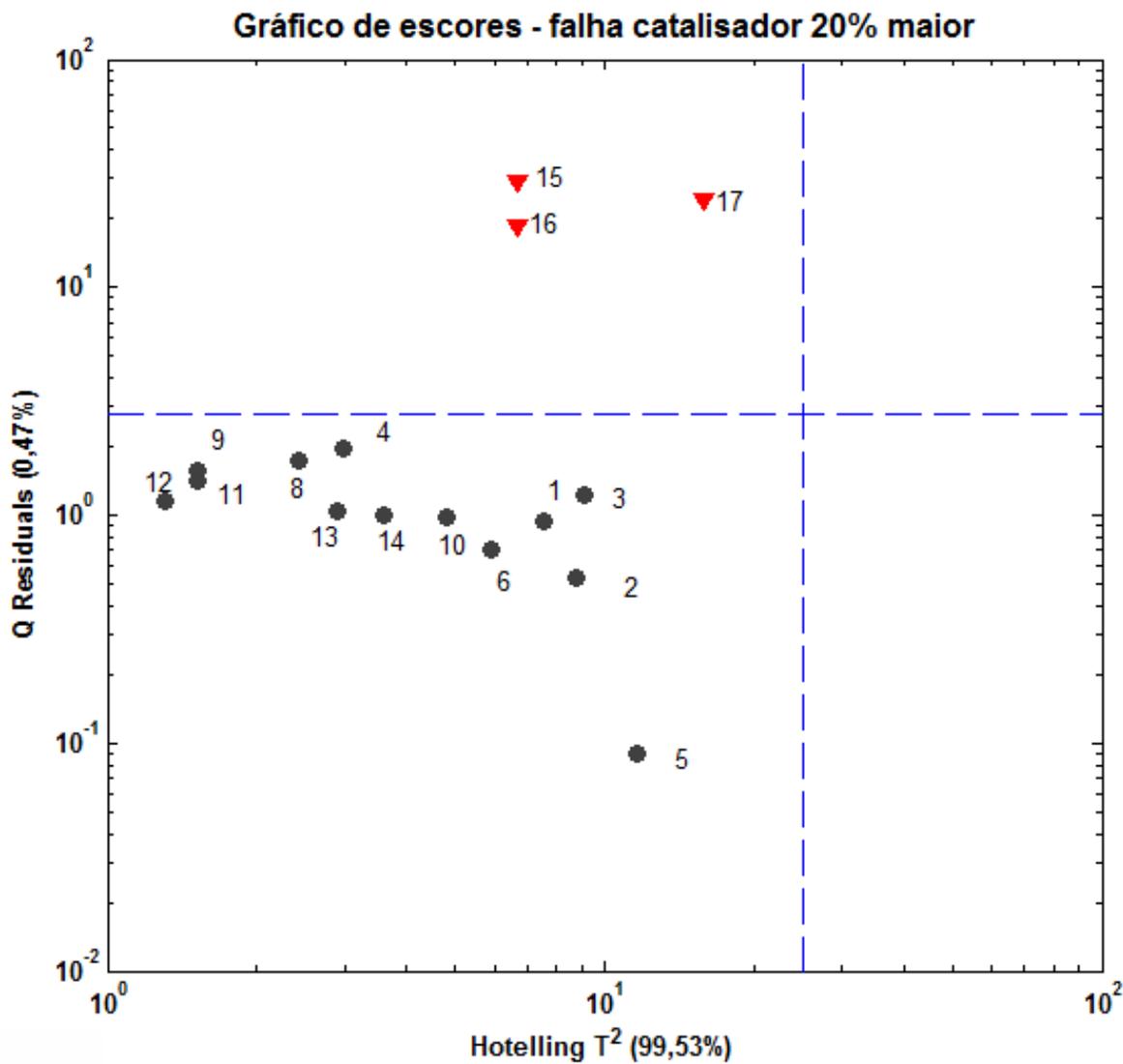


Figura 4.14. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para concentração do catalisador 20% maior, com os limites da distribuição F 95% (--) para as cartas Q e T².

e. Utilização de catalisador na concentração de 20% inferior ao nível NOC:

A quinta e última falha gerada se baseou na utilização de uma concentração do catalisador em um nível 20% menor em relação a concentração utilizada nas bateladas NOC. Assim como a falha anterior, a carta T² não foi suficiente para a detecção das bateladas avaliadas, sendo novamente necessário o emprego da carta de resíduos para a

detecção da falha gerada, conforme pode ser observado no gráfico apresentado na Fig. 4.15.

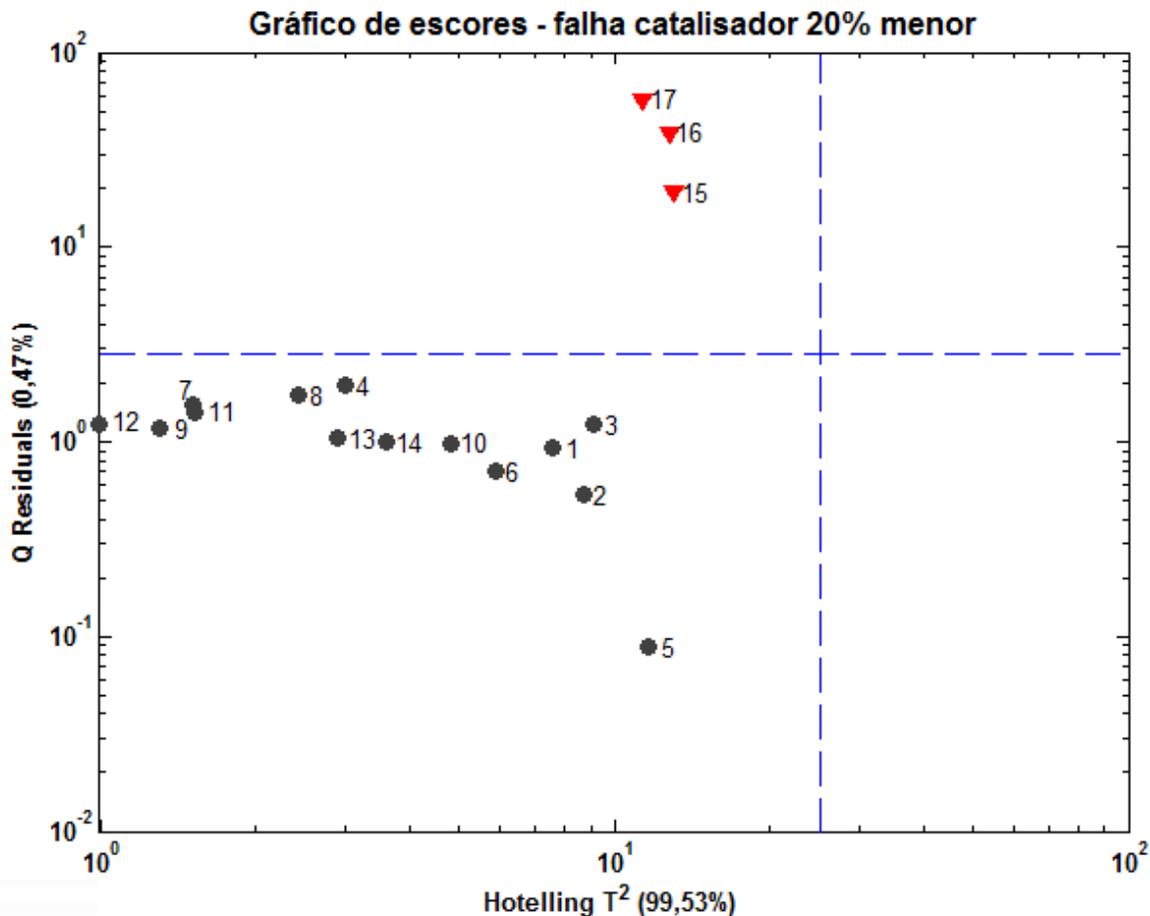


Figura 4.15. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para concentração do catalisador 20% menor, com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T².

3.3. Análise por métodos bidimensionais:

Na construção de modelos bidimensionais a partir de bateladas reacionais, que apresentam estrutura trilinear, é necessária a ‘desconstrução’ de um dos modos e projeção deste em um dos dois modos disponíveis. Como comentado no item 1.1 deste capítulo, existem basicamente dois métodos de pré-processamento de dados trilineares aplicados ao uso com métodos bidimensionais. Em cada um destes métodos, a matriz resultante

depende da forma com que o pré-processamento é conduzido, como qual modo é preservado e qual é projetado. As diferentes formas de pré-processamento apresentam os seus prós e contras e ainda continuam em debate (*Westerhuis, 1999; Kourti, 2003*). Conforme Westerhuis e co-autores (*Westerhuis, 1999*), existem 6 formas de pré-processamento para dados trilineares mas somente 3 delas não são equivalentes e somente dois destes são mais utilizados. Os resultados obtidos por estes dois procedimentos foram avaliados em relação às suas capacidades de detecção de falhas.

3.3.1. Método de pré-processamento 1 (modo batelada):

O método de pré-processamento proposto por Nomikos e McGregor (*Nomikos, 1995*), denominado ‘*batch wise unfolding*’, será denominado método de desdobramento no sentido do modo das bateladas. Este procedimento consiste em manter o modo das bateladas intacto e integrar os dois outros modos (tempo e comprimento de onda) em um modo híbrido, conforme apresentado na Fig. 4.5. Neste procedimento, antes da construção do modelo, a média de cada coluna é subtraída, com objetivo de eliminar desvios de linearidade e facilitar a identificação de desvios da trajetória média. Como todas as variáveis coletadas ao longo da reação apresentam a mesma origem (espectrômetro), não há necessidade de autoescalamamento das variáveis.

O modelo estatístico criado utilizando as condições especificadas pelo pré-processamento 1 foi obtido com a utilização de 5 componentes principais, que descreveram a mesma variância capturada do modelo MPCA com 5 componentes, mostrada na Tabela 4.2. O gráfico dos escores é mostrado na Fig. 4.16, observando-se que todas as bateladas NOC encontram-se dentro dos limites definidos pelo parâmetro F com 95%.

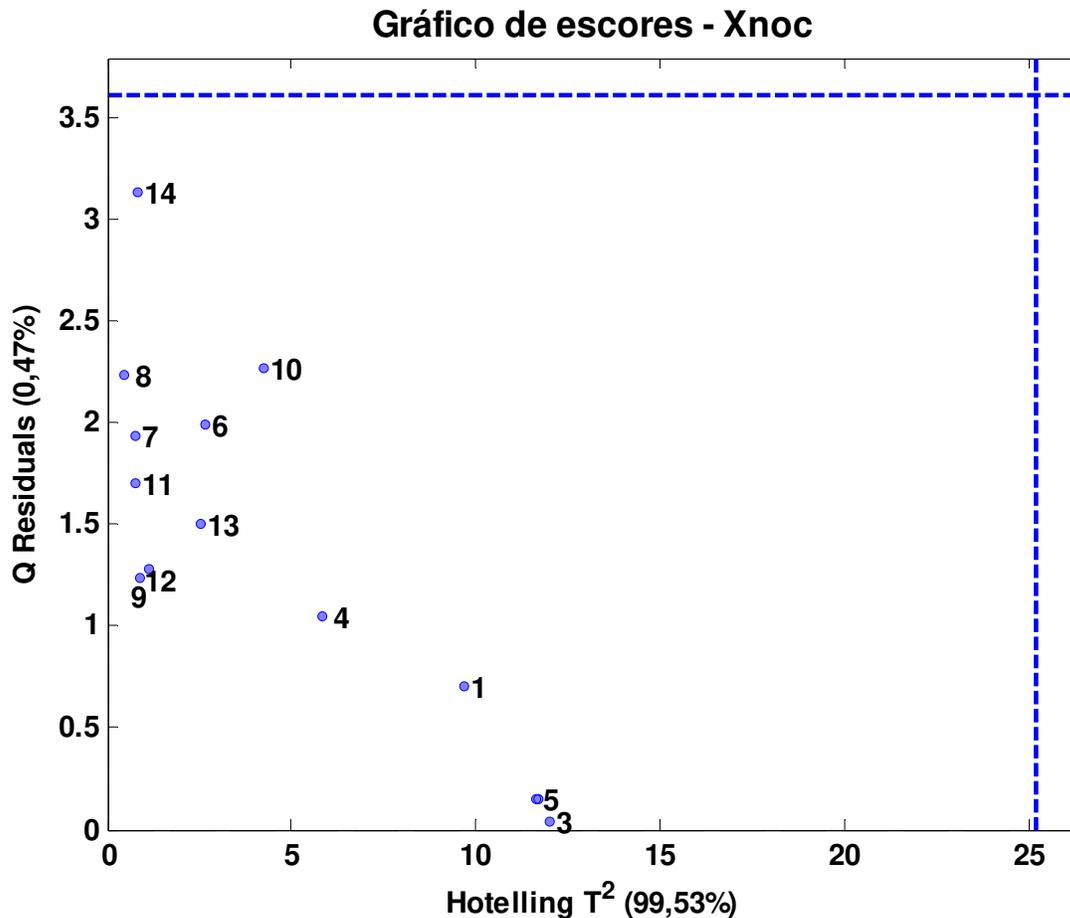


Figura 4.16. Gráfico dos escores das bateladas NOC (•) obtidas utilizando o método 1 de pré-processamento, com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T².

a. Utilização de etanol hidratado 98%:

O mesmo conjunto de dados referente a falha obtida com o emprego de etanol 98% foi utilizado para realizar a previsão com o modelo obtido pelo método 1 descrito anteriormente. Conforme pode ser observado na Fig. 4.17, a carta *Hotelling* T² não foi eficiente na detecção das falhas geradas. Somente a carta de resíduos Q com limite de 95% para a distribuição F foi suficiente para a detecção. Estes resultados são diferentes daqueles conseguidos para as mesmas bateladas através do modelo MPCA, mostrando que o modelo MPCA é mais sensível para este conjunto de falhas.

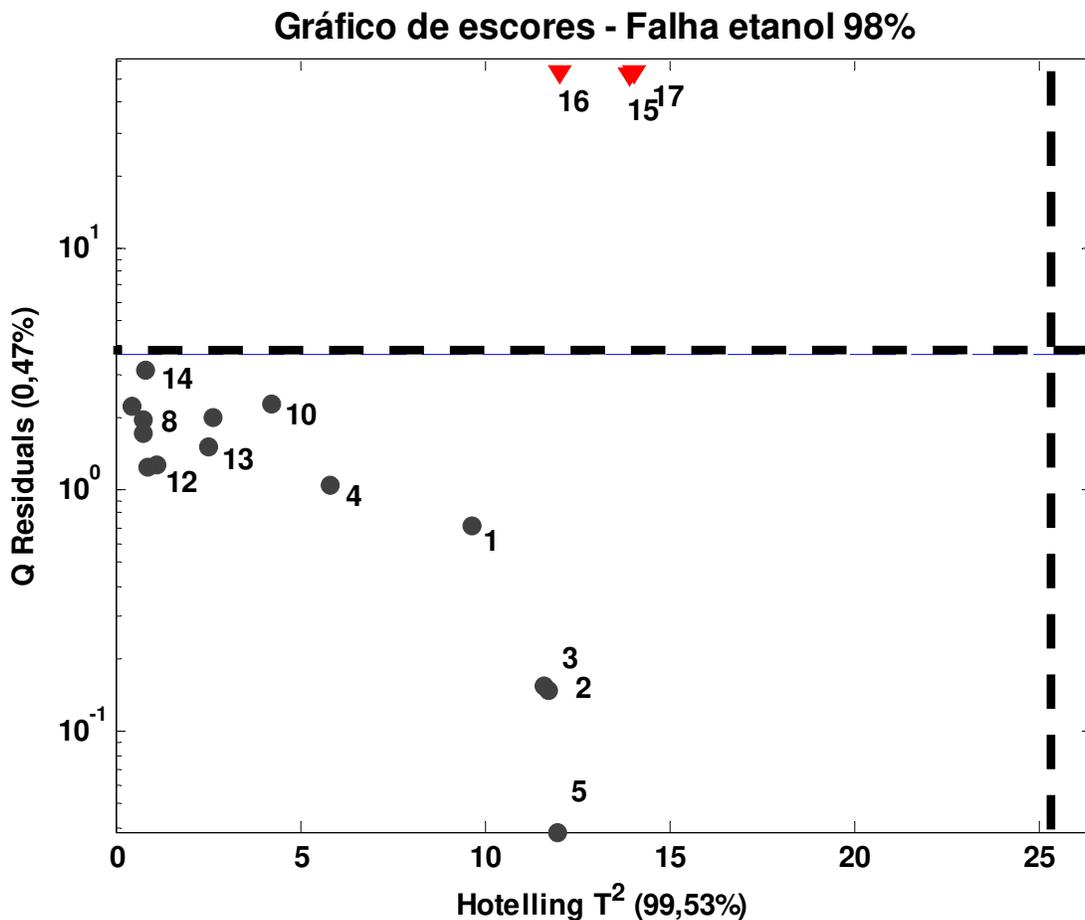


Figura 4.17. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para a falha obtida com etanol 98%, com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T².

b. Utilização de etanol hidratado 95%:

As três bateladas obtidas com etanol hidratado 95% foram projetadas no modelo NOC obtido, resultando no gráfico apresentado na Fig. 4.18, obtendo-se resultados similares àqueles obtidos com o modelo MPCA: somente a carta de resíduos Q foi eficiente para separar todas as bateladas NOC das bateladas de falha, enquanto que somente a batelada 15 (1ª batelada com falha) foi enquadrada como ‘falha’ pelas duas cartas.

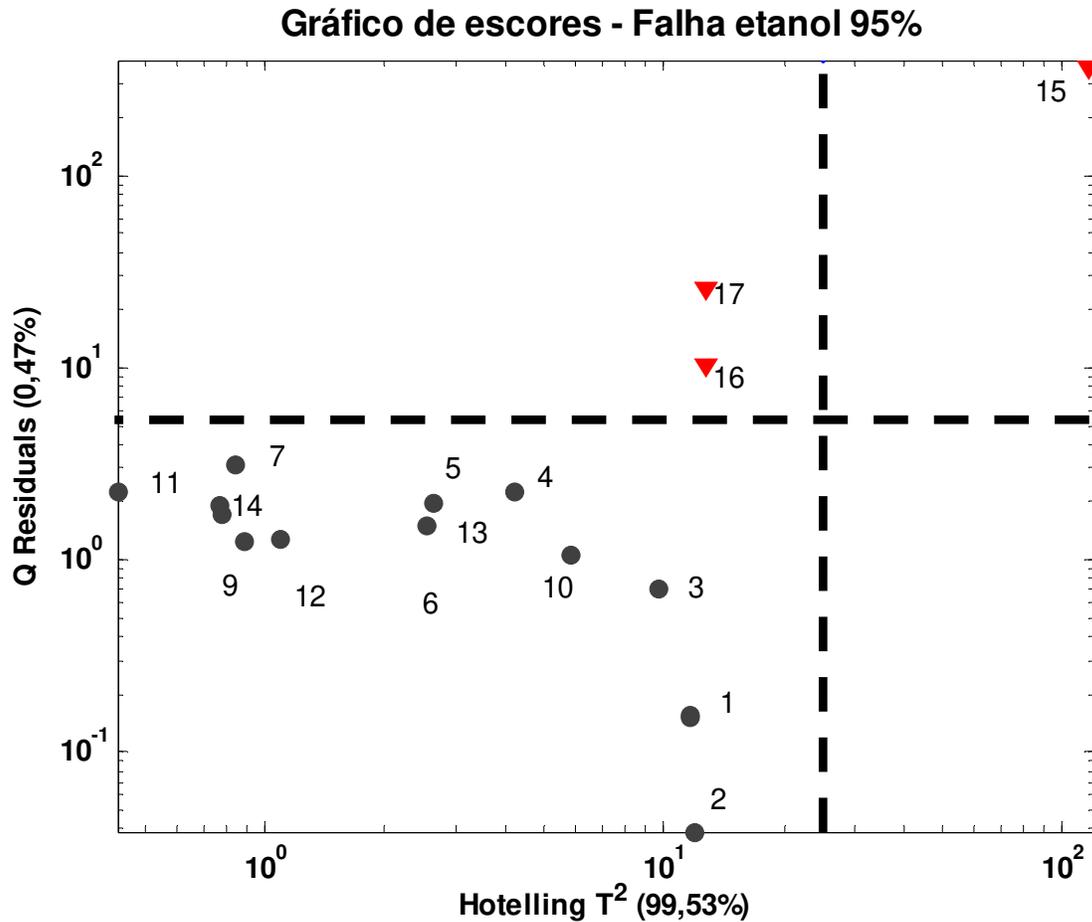


Figura 4.18. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para a falha obtida com etanol 95%, com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T^2 .

c. Ausência de catalisador:

A terceira falha gerada foi a ausência de catalisador, obtendo-se o gráfico apresentado na Fig. 4.19. Novamente, apenas a carta de resíduos foi eficiente na separação de todas as bateladas e a carta *Hotelling* identificou apenas a batelada 16 (2ª batelada) como falha. Novamente, para esta falha gerada, os resultados obtidos com o MPCA são mais eficientes, de modo que todas as bateladas foram reprovadas nos critérios Q e T^2 .

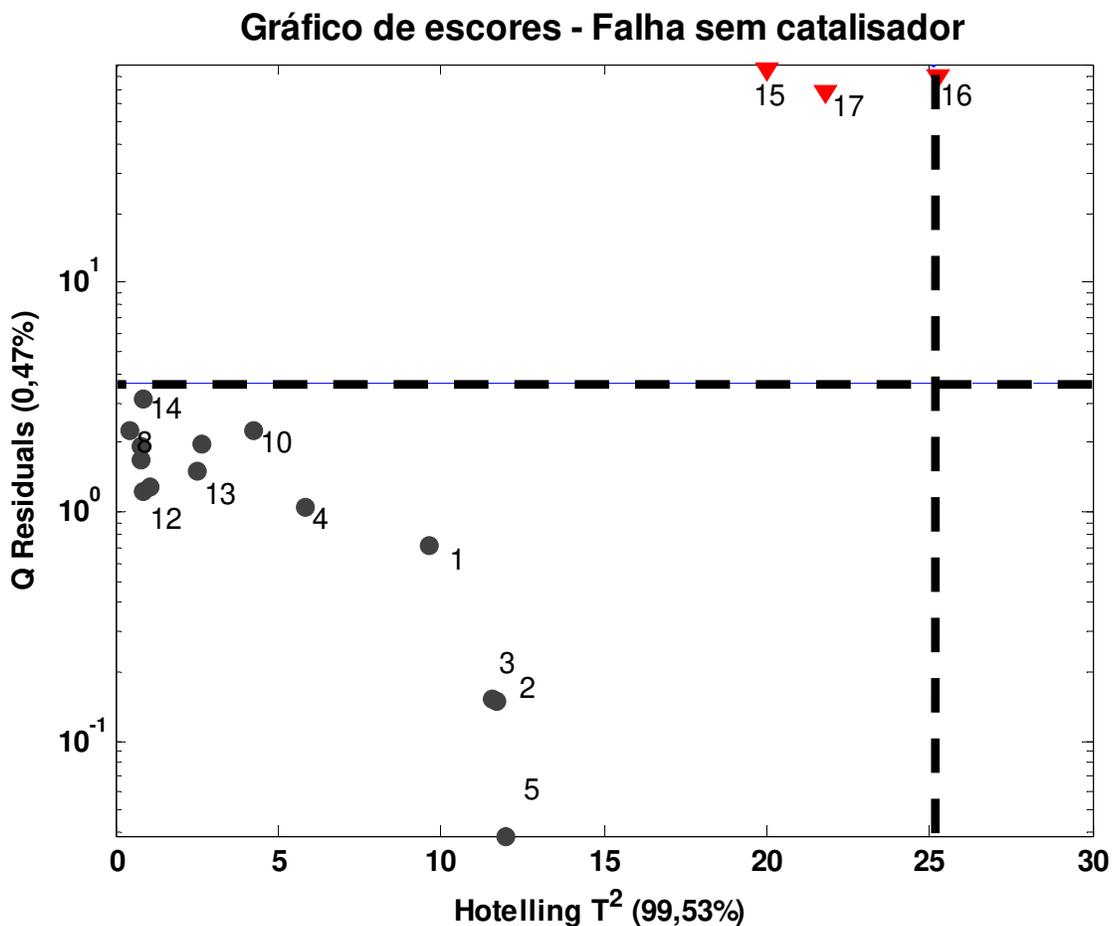


Figura 4.19. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para a falha devido a ausência de catalisador na solução etanólica, com os limites da distribuição F 95% (--) para as cartas Q e T².

d. Utilização de catalisador na concentração de 20% superior ao nível NOC:

A quarta falha gerada e avaliada pelo método 1 nos modelos bidimensionais, apresentou os resultados mostrados na Fig. 4.20, similares àqueles obtidos pelo modelo MPCA, com somente o parâmetro de resíduo separando os dois conjuntos de bateladas.

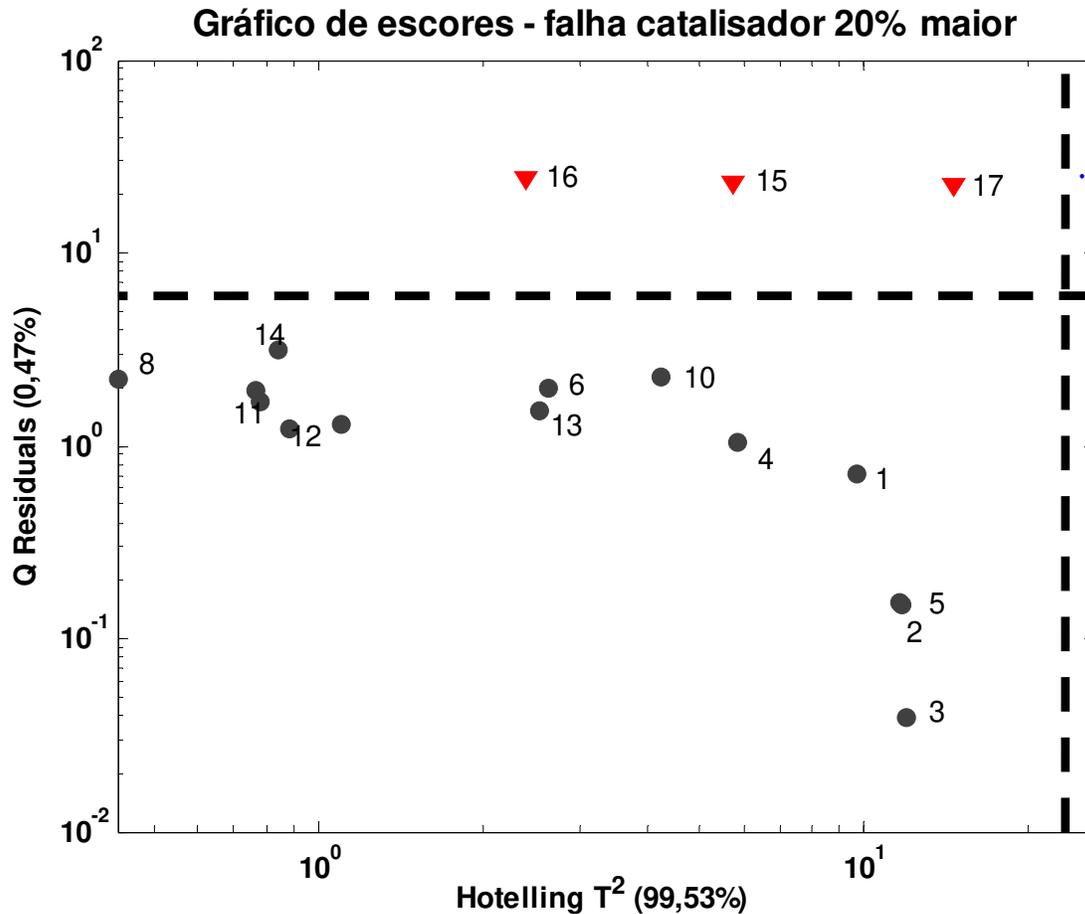


Figura 4.20. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para a falha gerada pelo uso de catalisador na concentração 20% maior a utilizada nas bateladas NOC, com os limites da distribuição F 95% (--) para as cartas Q e T².

e. Utilização de catalisador na concentração de 20% inferior ao nível NOC:

A quinta e última falha avaliada no modelo desenvolvido apresentou os resultados mostrados na Fig. 4.21. Resultados similares também foram obtidos pelo modelo MPCA, com seletividade somente na carta de resíduos.

Percebe-se uma aproximação do conjunto de bateladas com falha do conjunto das bateladas NOC, minimizando-se a diferenciação ao longo do eixo *Hotelling* enquanto que os valores de resíduos se mantêm constantes tanto para a falha com maior e menor concentração de catalisador.

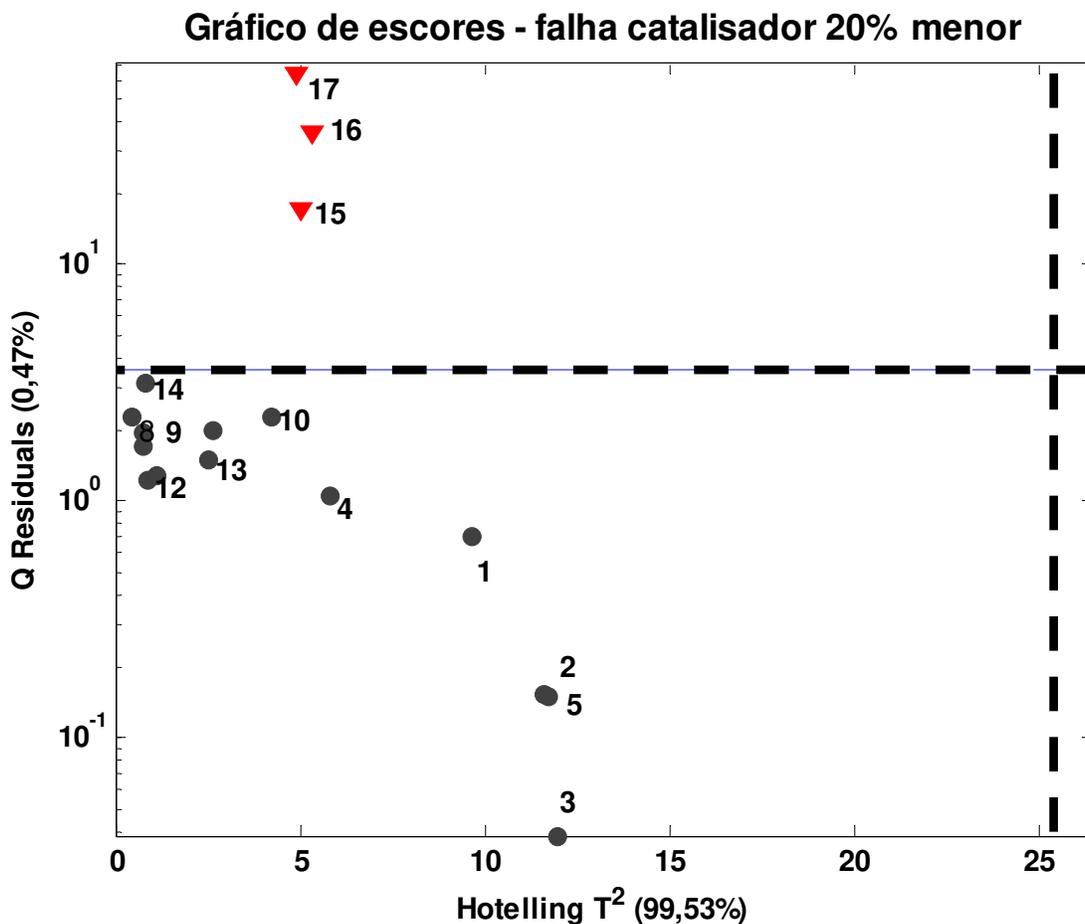


Figura 4.21. Gráfico dos escores das bateladas NOC (●) e das bateladas com falha (▼) para a falha gerada pela concentração 20% maior de catalisador, com os limites da distribuição F 95% (--) para as cartas Q e T².

3.3.2. Método de pré-processamento 2 (modo variáveis espectrais):

No pré-processamento *variable wise unfolding* ou desdobramento no sentido das variáveis, proposto por Wold e colaboradores (Wold, 1998), o tensor de dados trilinear é rearranjado mantendo-se o modo das variáveis rígido e integrando o modo das bateladas e tempo em um único modo, seguindo as etapas mostradas na Fig. 4.4. Para desenvolver o modelo, o tensor NOC de dimensões 14 (bateladas) x 560 (espectro) x 141 (tempo) foi reorganizado em uma matriz de dimensões $IK \times J$: 1974 x 560. Após o redimensionamento da matriz NOC, o método PLS foi executado, tendo como y o índice

de maturação das bateladas, conforme metodologia descrita por Wold (*Wold, 1998*), onde o índice de maturação é designado como um vetor de dimensões 1974×1 , constituído de 14 ciclos, cada ciclo de 141 pontos, definidos pelos elementos reais $[1 \ 2 \ 3 \ \dots \ 141]$. O método de pré-processamento escolhido foi centrar as colunas em torno da média e realizar o autoescalamento em função da variância de cada variável espectral. O modelo foi construído e novamente foi observado que as bateladas 2 e 3 apresentavam variações muito maiores que o restante das bateladas, de modo que o modelo final foi construído com apenas 12 bateladas e oito variáveis latentes, tendo como pré-processamento o autoescalamento.

Tabela 4.3. Variância capturada pelas variáveis latentes no modelo PLS (método 2) nas bateladas NOC após a eliminação das bateladas 2 e 3.

| LVs | bloco X | | bloco y | |
|-----|-------------|--------------|-------------|--------------|
| | % capturada | % cumulativa | % capturada | % cumulativa |
| 1 | 82,38 | 82,38 | 81,61 | 81,61 |
| 2 | 12,72 | 95,09 | 3,55 | 85,16 |
| 3 | 3,30 | 98,39 | 3,95 | 89,11 |
| 4 | 0,36 | 98,75 | 2,49 | 91,60 |
| 5 | 0,32 | 99,07 | 1,21 | 92,82 |
| 6 | 0,23 | 99,30 | 0,76 | 93,58 |
| 7 | 0,05 | 99,35 | 1,73 | 95,31 |
| 8 | 0,06 | 99,41 | 0,68 | 95,98 |

O gráfico de escores do modelo obtido é mostrado na Fig. 4.22, sendo que cada ponto é referente ao escore de uma determinada batelada em um respectivo tempo de monitoramento. Como o total de bateladas utilizadas no desenvolvimento do modelo foi doze e cada batelada possui 141 tempos, o gráfico apresenta um total de 1692 pontos. Através das cartas Q e T^2 para uma distribuição F de 95%, observamos que muitos pontos atravessam os limites das cartas Q e T^2 , mas apenas 4 pontos $[3 \ 1411 \ 1650 \ 1651]$ possuem tanto resíduos (carta Q) e *leverage* (carta T^2) elevados. Também observa-se que nenhuma batelada apresentou 3 pontos consecutivos fora da especificação de controle. Desta forma, o critério adotado na identificação das falhas

realizadas, será a ocorrência de 3 pontos consecutivos nos limites superiores às duas cartas.

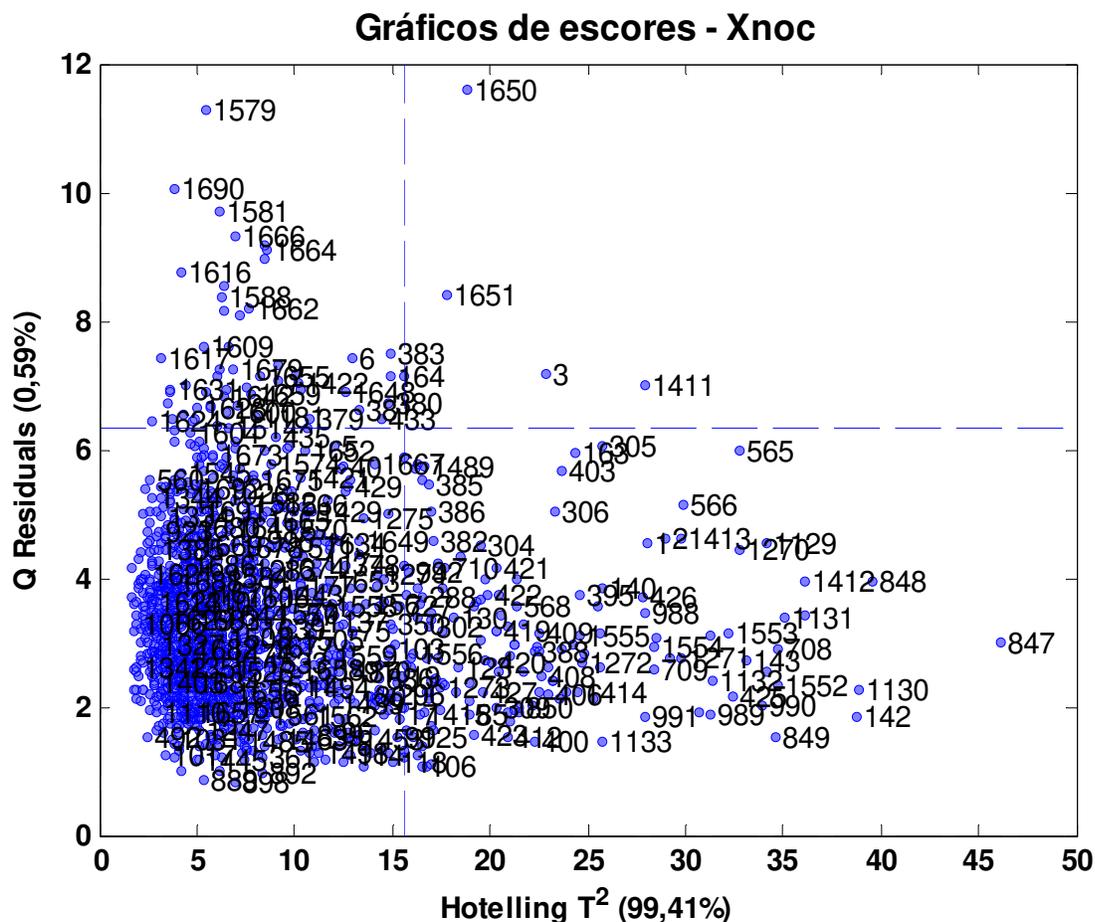


Figura 4.22. Gráfico dos escores das bateladas NOC (•) com os limites da distribuição F 95% (- -) para as cartas Q e T².

Outro detalhe que se observa nos valores de escores do modelo obtido, é a não linearidade dos dados experimentais com o índice de maturação (IM) da batelada. Conforme Fig. 4.23, observa-se que o IM de cada batelada (em verde), é um valor linear em função do tempo, enquanto que a absorvância (e conseqüentemente os escores) (em azul) são não-lineares, apresentando um crescimento exponencial nos primeiros 20 tempos de monitoramento e consecutiva queda, finalizando com crescimento linear. Esta não linearidade dos dados determina o número relativamente elevado de 8

variáveis latentes utilizada neste conjunto de dados.

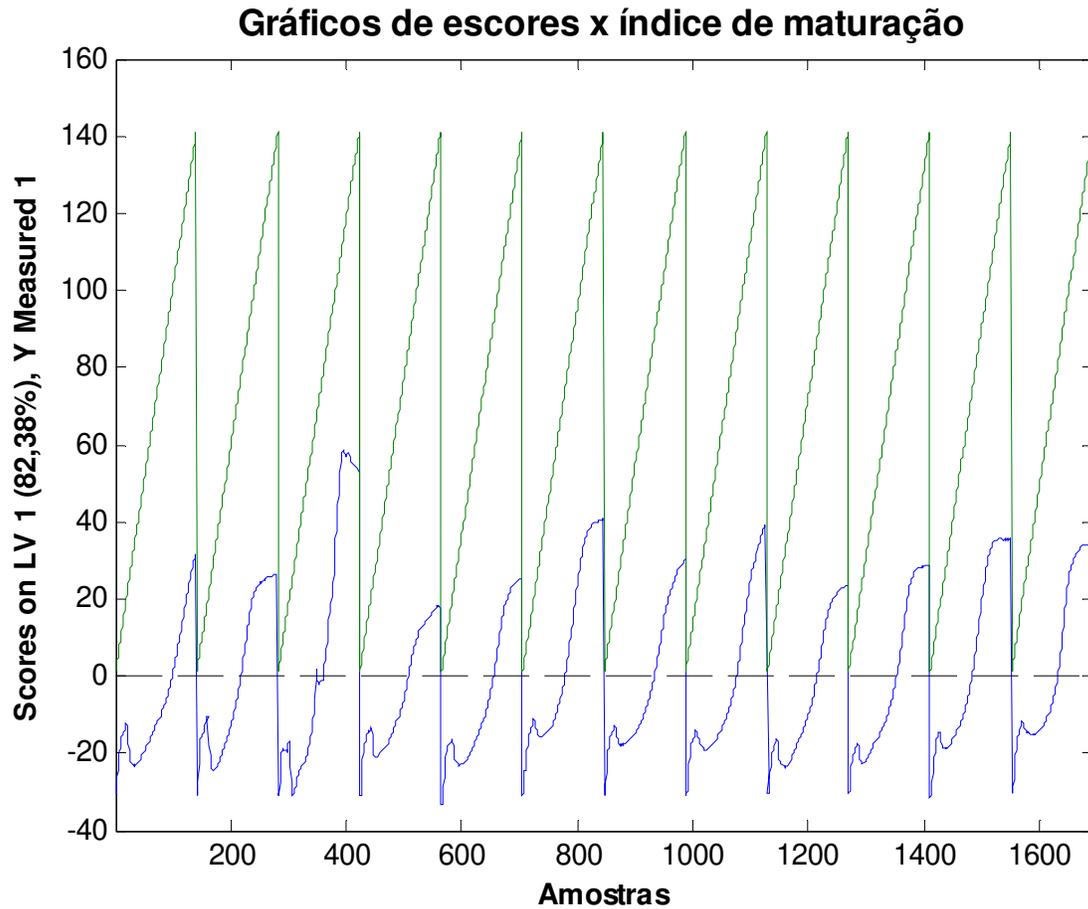


Figura 4.23. Escores dos pontos de amostragem (amostras) (em azul) e o IM de cada batelada (em verde), evidenciando a ausência de linearidade das absorvâncias em função da cinética reacional.

Conforme realizado pelos outros métodos, as falhas elaboradas foram projetadas no modelo construído e observou-se a projeção dos escores para cada tempo de amostragem de cada batelada (141 pontos) em função das cartas Q (resíduos) e T^2 (*leverage* ou carta *Hotelling*). Em função da quantidade de pontos, cada batelada será avaliada independentemente.

a. Utilização de etanol hidratado 98%:

O tensor das bateladas obtido pelo uso de etanol hidratado a 98% foi reorganizado em três bateladas, onde cada batelada foi dimensionada em uma matriz de dimensões 141 x 560 pontos, gerando 141 valores de escores. Cada valor de escore faz referência a um tempo de análise, desta forma, o método a ser utilizado pode ser empregado no uso para controle de processos, pois permite obter informações antes do término de cada batelada. Esta vantagem não é obtida pelos métodos anteriormente empregados.

Conforme pode ser observado na Fig. 4.24, o gráfico de escores é obtido para cada batelada, sendo que cada batelada apresenta os limites das cartas *Hotelling T²* e *Q* para uma distribuição de 95%. Na primeira batelada, a falha só é observada quando o terceiro ponto consecutivo atravessa o limite definido pelas duas cartas. Esta condição é apenas satisfeita no 16º ponto de análise, pois os pontos consecutivos 14, 15 e 16 se localizam acima do limite das duas cartas. Condição semelhante é observada para a 2ª batelada, a qual a falha é observada no 17º ponto. No entanto, na 3ª batelada ocorreu um deslocamento médio nos escores em direção a um menor valor de *leverage* propiciando que a identificação da falha fosse antecipada para o 13º ponto, conforme pode ser observado nos gráficos apresentados na Fig. 4.24.

b. Utilização de etanol hidratado 95%:

De forma similar a falha anterior, as bateladas obtidas com etanol hidratado 95% foram projetadas no modelo NOC obtido, resultando em 3 gráficos de escores. A primeira batelada é apresentada na Fig. 4.25, sendo que o segundo gráfico é referente a um aumento (*zoom*) na região próxima aos limites de controle. Pode-se observar que o terceiro ponto consecutivo é atingido no 15º tempo de monitoramento.

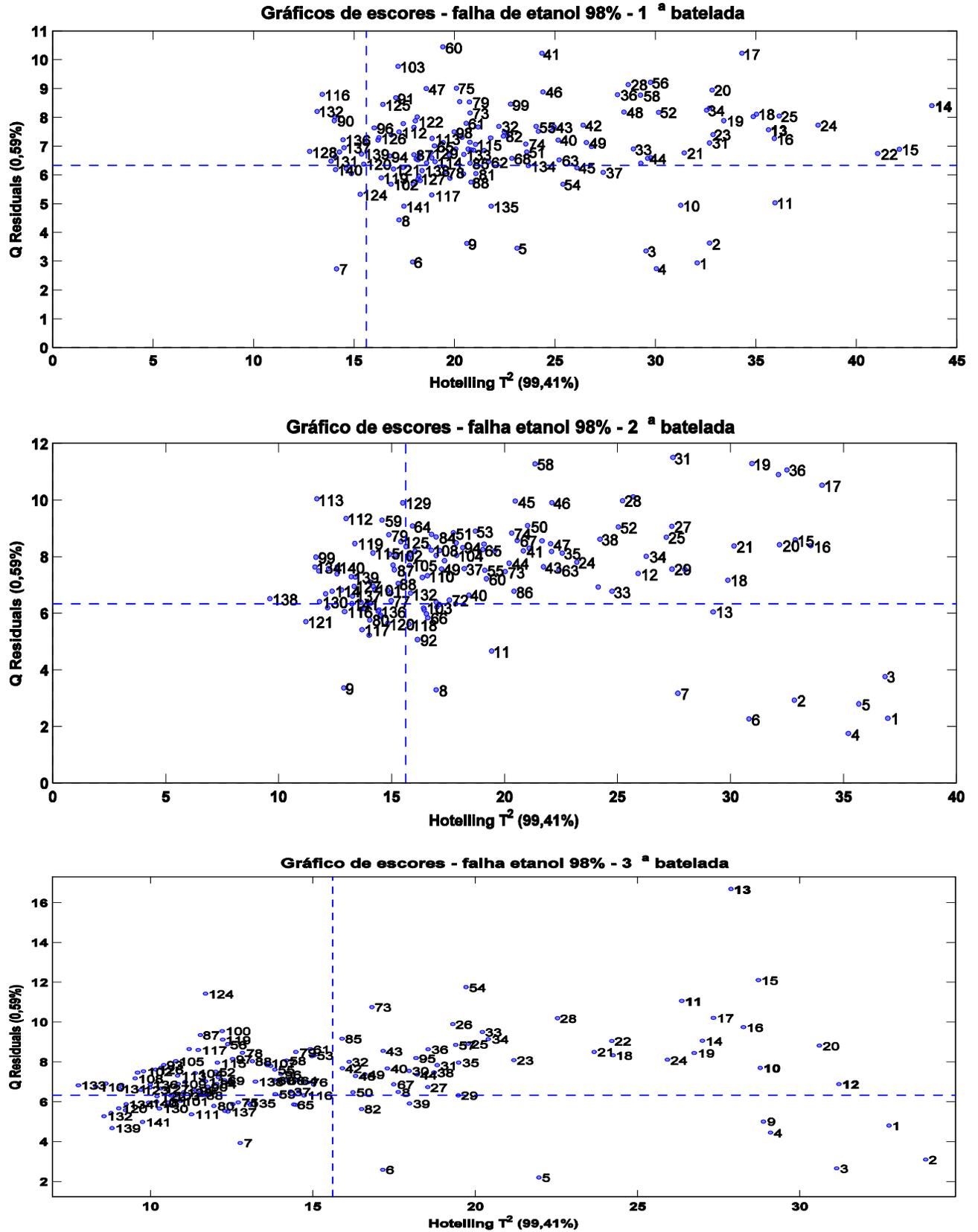


Figura 4.24. Escores das 3 bateladas com falhas obtidas pelo uso de etanol 98%.

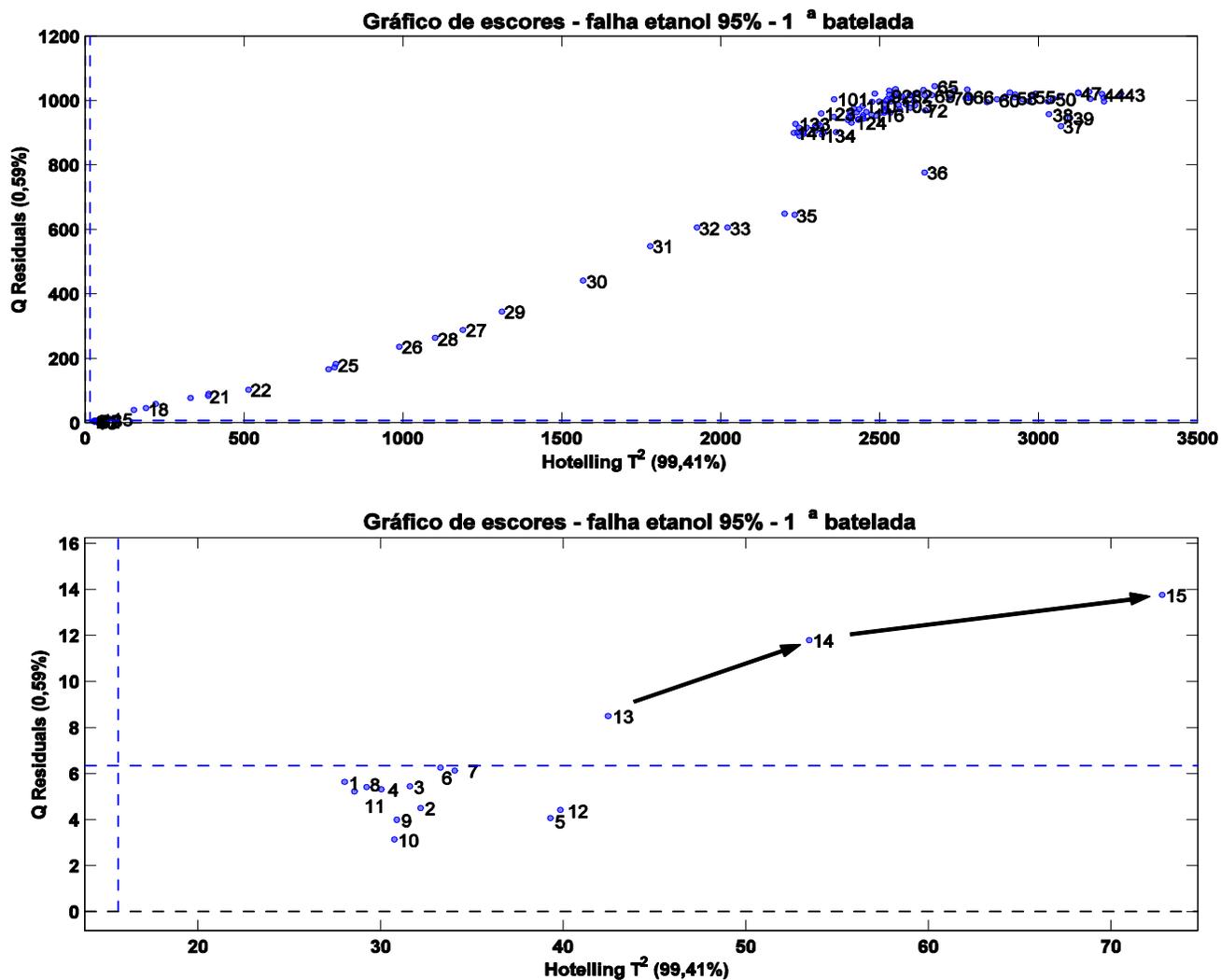


Figura 4.25. Escores para a 1ª batelada referente à falha obtida pelo uso de etanol 95%.

A segunda batelada referente à falha com etanol 95% é mostrada nos gráficos de escores da Fig. 4. 26. Observa-se que os escores se localizam na conjunção entre os limites das cartas Q e T², tornando a identificação das falhas não tão imediata. Conforme gráfico com a região ampliada, observa-se que o terceiro ponto consecutivo fora do limite das duas cartas é atingido somente no 20º ponto de monitoramento.

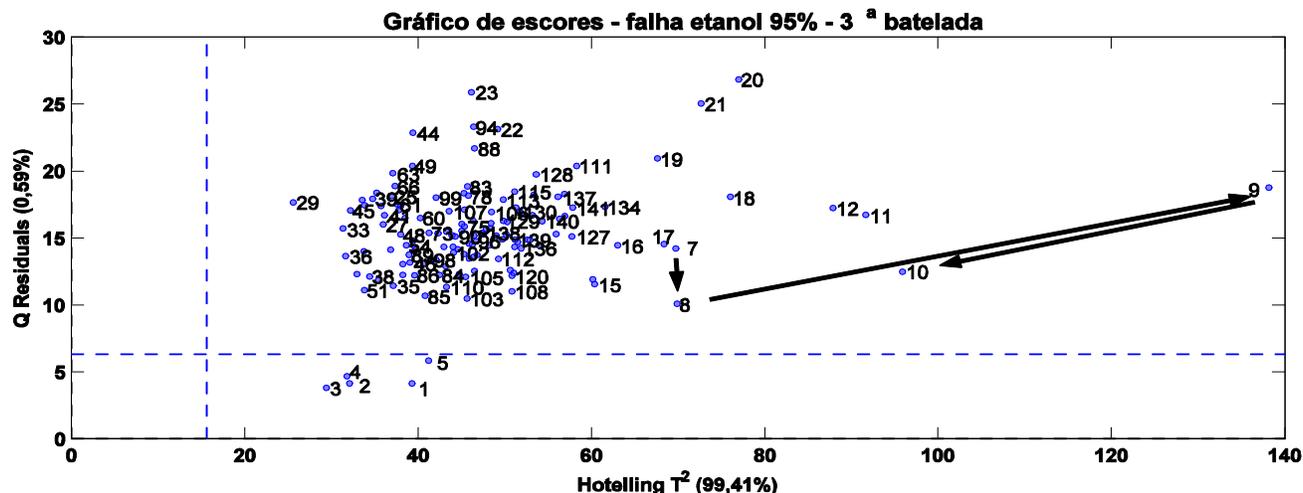


Figura 4.27. Escores para a 3^a batelada referente à falha obtida pelo uso de etanol 95%.

c. Ausência de catalisador:

A ausência de catalisador na solução etanólica foi realizada de acordo com o mesmo procedimento adotado anteriormente e os gráficos de escores obtidos pelas três bateladas podem ser observados na Fig. 4.28. A distribuição dos escores nas 3 bateladas ficou muito semelhante, possivelmente pela boa reprodutibilidade das bateladas, de forma que o ponto de falha pode ser observado no ponto 9 para a 1^a batelada, no ponto 12 na 2^a batelada e no ponto 17 para a 3^a batelada.

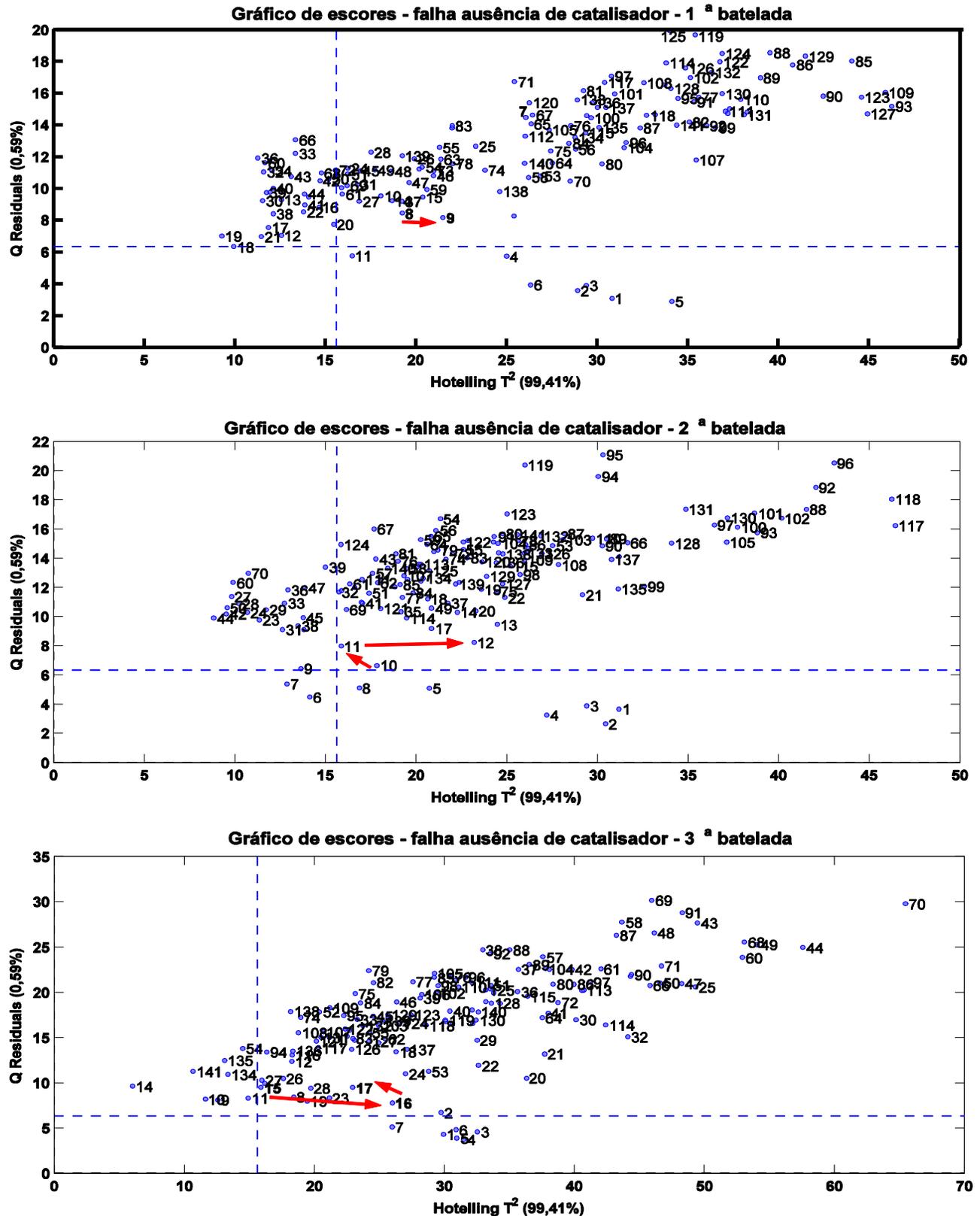


Figura 4.28. Escores das 3 bateladas com falhas obtidas pela ausência de catalisador.

d. Utilização de catalisador na concentração de 20% superior ao nível NOC:

Através da utilização de hidróxido de sódio na concentração 20% superior a utilizada nas bateladas NOC, obteve-se a quarta falha. Projetando-se cada batelada no modelo obtido, pode-se observar que a grande parte dos escores se localizou no quadrante direito superior, possuindo valores altos tanto para resíduos como para o parâmetro *leverage*. Desta forma, para a 1ª batelada, a identificação do ponto de falha foi observada logo nos 5 pontos iniciais, como pode ser observado na Fig. 4.29. Já na 2ª e 3ª bateladas, ocorreu uma maior concentração dos valores de escores, deslocando um pouco o ponto de identificação da falha para os pontos 8 e 9, respectivamente.

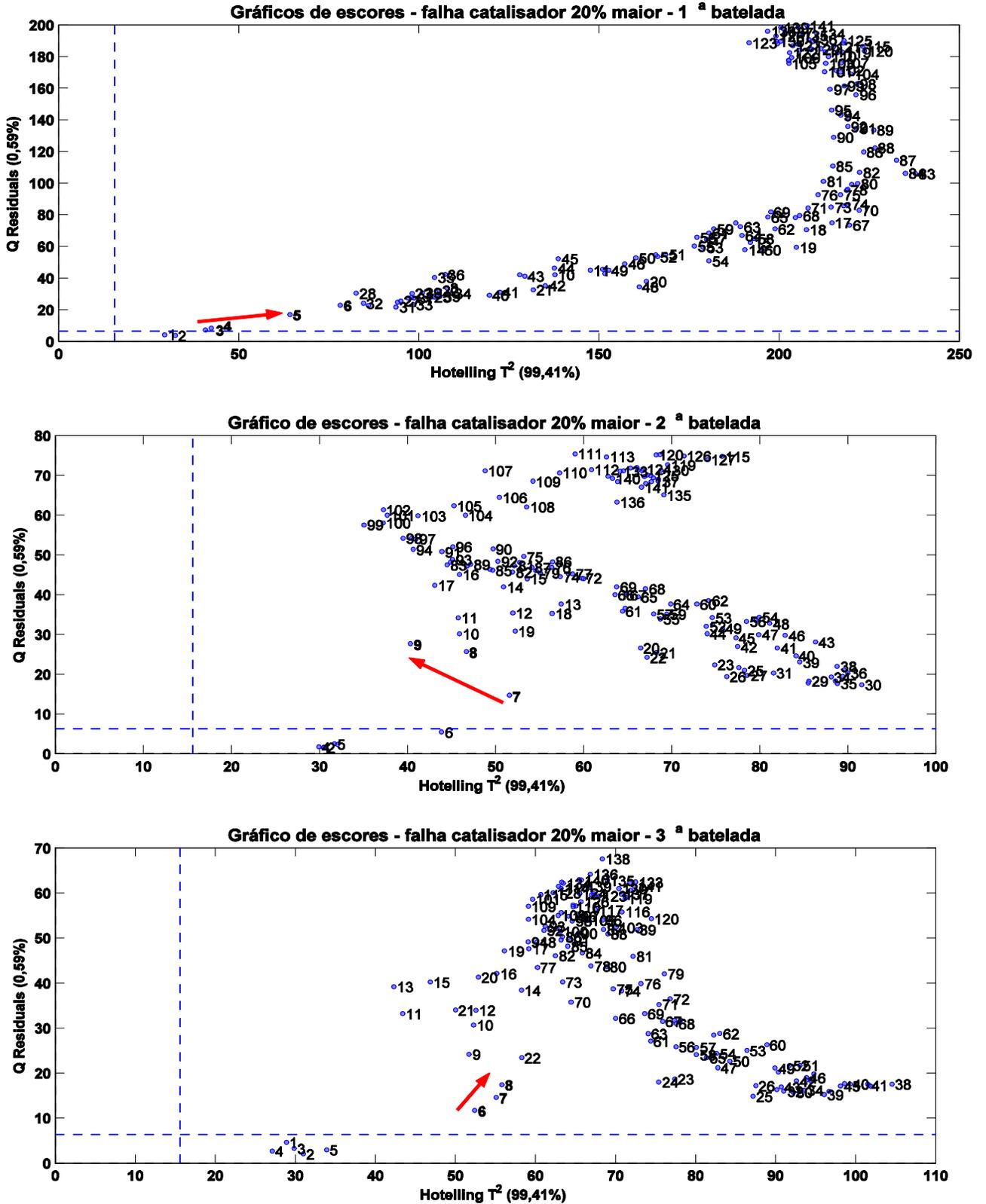


Figura 4.29. Escores das 3 bateladas com falhas pelo uso de 20% mais catalisador.

e. Utilização de catalisador na concentração de 20% inferior ao nível NOC:

A quinta e última falha avaliada no modelo desenvolvido apresentou os resultados mostrados na Fig. 4.30. Observa-se pelos valores absolutos dos eixos x e y (carta *Hotelling* e resíduos), que os escores obtidos pela diminuição da concentração de catalisador apresenta uma falha mais facilmente identificada pelo modelo NOC obtido. Em consequência, observa-se nas 3 bateladas, que logo nos 6 a 8 primeiros pontos de monitoramento a falha é identificada pelo modelo.

De modo geral, a estratégia proposta por Wold e colaboradores, permitiu a identificação das falhas em torno dos 10 primeiros tempos de monitoramento. Também foi possível uma visualização geral dos escores das bateladas ao longo do tempo de monitoramento. Ao longo de diversos monitoramentos, o perfil destes escores também possibilita ainda a identificação de qual das falhas foi gerada, permitindo um método não apenas de monitoramento e controle, mas de identificação e correção de futuros erros.

O método MPCA e a estratégia 1 (proposta por Nomikos e McGregor) não permitiram o monitoramento *on-line* das bateladas, apenas sua análise *off-line*, quando as bateladas já haviam sido terminadas. Desta forma, estes métodos foram eficientes em identificar as falhas geradas, mas por serem intrinsecamente *off-line*, não são adequados ao monitoramento e controle de processos em transesterificação de óleo de soja.

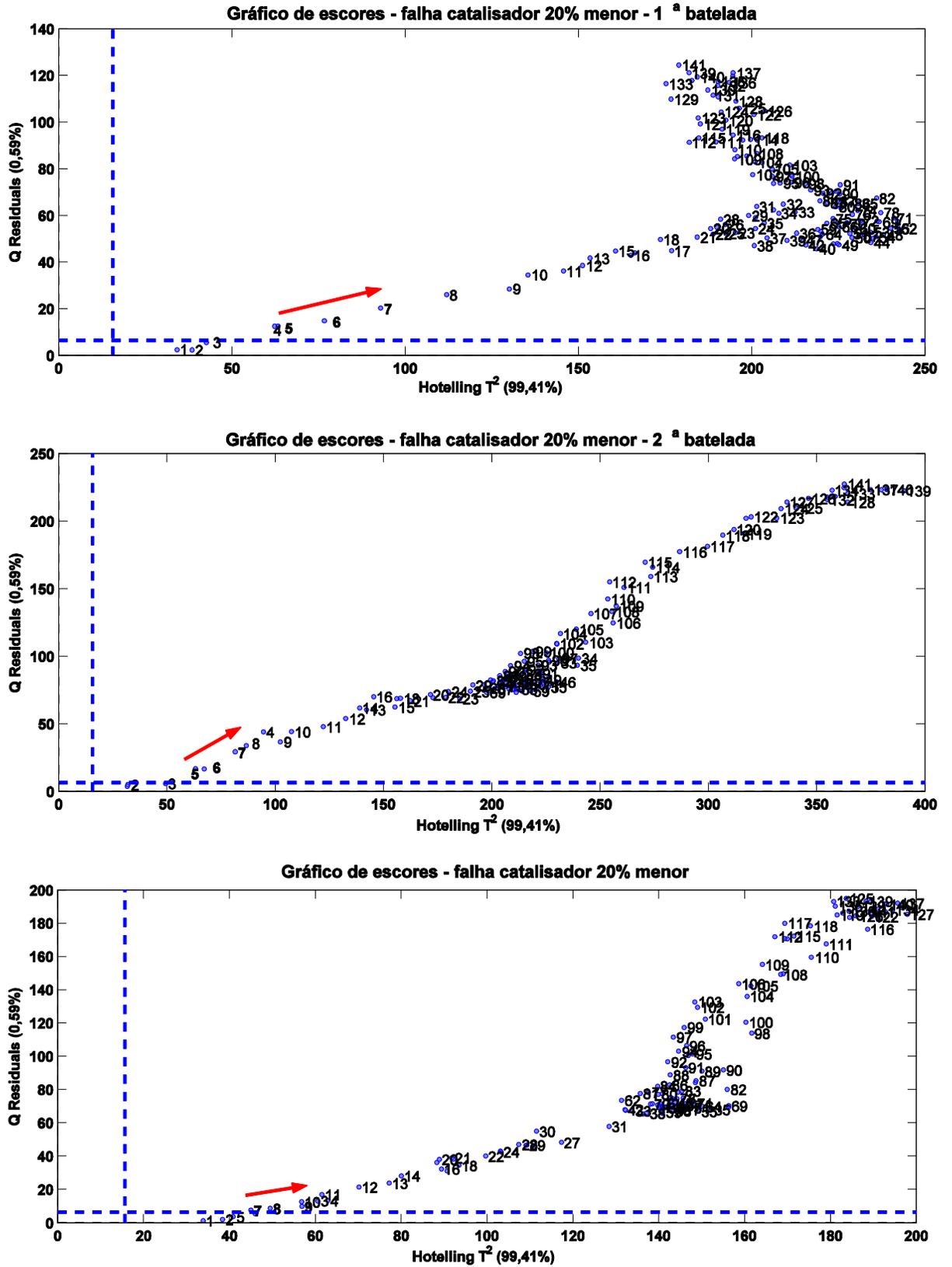


Figura 4.30. Escores das 3 bateladas com falhas obtidas para catalisador 20% inferior.

4. Conclusões

Neste trabalho, três estratégias foram utilizadas para avaliar um conjunto de dados referente à transesterificação de óleo de soja por etanol, tendo como catalisador hidróxido de sódio. Dois dos métodos utilizados envolveram análises do tipo *pos-batch*, onde para ser avaliada pelo modelo, cada batelada necessita atingir o tempo final. Estes dois métodos (MPCA e estratégia 1) se mostraram com resultados muito próximos, sendo que ambos tiveram capacidade para identificar todas as cinco falhas geradas.

A terceira e última estratégia estudada foi o emprego do método 2, proposto inicialmente por Wold e colaboradores. Este método permitiu não apenas a identificação de falha em cada tempo de monitoramento, mas também uma análise do perfil dos escores de cada batelada. Estas importantes características observadas nesta terceira estratégia podem permitir que sistemas controladores identifiquem em tempo hábil falhas em processos químicos de transesterificação, possibilitando assim tomadas de decisão e correção das bateladas.

5. Referências

(**Amigo, 2008**) Amigo, J.M.; Surribas, A.; Coello, J.; Montesinos, J.L.; Maspoch, S.; Valero, F.; *On-line parallel factor analysis. A step forward in the monitoring of bioprocesses in real time*. Chemom. Intell. Lab. Syst., 92 (2008) 44-52.

(**Bro, 1998**) Bro, R.; *Multi-way Analysis in the Food Industry*. Ph.D. Thesis, University of Amsterdam. Netherlands, 1998.

(**Costa Rodrigues, 2009**) Costa Rodrigues, R.; Volpato, G.; Wada, K.; Zachia Ayub, M.A.; *Improved enzyme stability in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil*. Appl. Biochem. Biotech., 152 (2009) 394-404.

(**de Moraes, 2008**) de Moraes, M.G.; Costa, J.A.V.; *Fatty acids profile of microalgae cultivated with carbon dioxide*. Ciencia & Agrotecnol., 32 (2008) 1245-1251.

(**Domingos, 2008**) Domingos, A.K.; Saad, E.B.; Wilhelm, H.M.; Ramos, L.P.; *Optimization of the ethanolysis of *Raphanus sativus* (L. Var.) crude oil applying the response surface methodology*. Bioresour. Technol., 99 (2008) 1837-1845.

(**Guterres, 2006**) Guterres, M.V.; *Análise Multivariada em N-Modos: Metodologias para o Monitoramento de Reações Químicas*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. Brasil, 2006.

(**Hotelling, 1947**) Hotelling, H.H.; *Multivariate quality control illustrated by the air testing of sample bombsights*. Techniques of Statistical Analysis. USA, 1947.

(**Knothe, 2005**) Knothe, G.; van Gerpen, J.; Krahl, J.; *The biodiesel handbook*. AOCS Publishing, USA, 2005.

(**Kourti, 2003**) Kourti, T.; *Multivariate dynamic data modeling for analysis and statistical process control of batch processes, start-ups and grade transitions*. J. Chemom. 17 (2003) 93-109.

(**Lima, 2008**) Lima, J.R.D.; da Silva, R.B.; de Moura, E.M.; de Moura, C.V.R.; *Biodiesel of tucum oil, synthesized by methanolic and ethanolic routes*. Fuel, 87 (2008) 1718-1723.

(**Ma, 1999**) Ma, F.R.; Hanna, M.A.; *Biodiesel production: a review*. Bioresour. Technol., 70 (1999) 1-15.

(**Marco, 2005**) Marco, P.H.; Levi, M.A.B.; Scarminio, I.S.; Poppi, R.J.; Trevisan, M.G.;

Exploratory analysis of simultaneous degradation of anthocyanins in the calyces of flowers of the Hibiscus sabdariffa species by PARAFAC model. Anal. Sci., 21 (2005) 1523-1527.

(Martens, 1989) Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, New York, 1989.

(Nakagaki, 2008) Nakagaki, S.; Bail, A.; dos Santos, V.C.; de Souza, V.H.R.; Vrubel, H.; Nunes, F.S.; Ramos, L.P.; *Use of anhydrous sodium molybdate as an efficient heterogeneous catalyst for soybean oil methanolysis.* Appl. Catal. A-Gen., 351 (2008) 267-274.

(Nomikos, 1994) Nomikos, P.; MacGregor, J.F.; *Monitoring batch process using multiway principal component analysis.* AIChE, 40 (1994) 1361-1375.

(Nomikos, 1995) Nomikos, P.; MacGregor, J.F.; *Multivariate SPC charts for monitoring batch processes.* Technometrics, 37 (1995) 41-59.

(Oliveira, 2008) Oliveira, L.S.; Franca, A.S.; Camargos, R.R.S.; Ferraz, V.P.; *Coffee oil as a potential feedstock for biodiesel production.* Bioresour. Technol., 99 (2008) 3244-3250.

(PLS_toolbox Manual, 2006) Eigenvektor Research Inc. *Operation manual for PLS toolbox, version 4.0.* Seattle, USA, 2006.

(Rodolfi, 2009) Rodolfi, L.; Zittelli, G.C.; Bassi, N.; Padovani, G.; Biondi, N.; Bonini, G.; Tredici, M.R.; *Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor.* Biotechnol. Bioeng., 102 (2009) 100-112.

(Sena, 2005) Sena, M.M.; Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; *PARAFAC: A chemometric tool form multi-dimensional data treatment. Application in direct determination of drugs in human plasma by spectrofluorimetry.* Quim. Nova, 28 (2005) 910-920.

(Silva, 2007) Silva, L.C.; Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; Sena, M.M.; *Direct determination of propranolol in urine by spectrofluorimetry with the aid of second order advantage.* Anal. Chim. Acta, 595 (2007) 282-288.

(Skibsted, 2005) Skibsted, E. T. S.; *PAT and Beyond.* PhD thesis. University of Amsterdam, Amsterdam. 2005.

(Trevisan, 2003) Trevisan, M.G.; *Aplicação de métodos quimiométricos de ordem superior e fluorescência molecular na análise em matrizes biológicas.* Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2003.

(Trevisan, 2007) Trevisan, M.G.; Poppi, R.J.; *On-line monitoring of a transesterification reaction of soybean oil with ethanol by NIRS and PLS*. Poster apresentado no Congresso Internacional de Química Analítica - CIQA. Buenos Aires, Agosto de 2007.

(Westerhuis, 1999) Westerhuis, J.A.; Kourti, T.; MacGregor, J.F.; *Comparing alternative approaches for multivariate statistical analysis of batch process data*. J. Chemom. 13 (1999) 397–413.

(Wold, 1998) Wold, S.; Kettaneh, N.; Friden, H.; Holmberg, A.; *Modelling and diagnostics of batch processes and analogous kinetic experiments*. Chemom. Intell. Lab. Syst., 44 (1998) 331–340.

(www.senado.gov.br) <http://www.senado.gov.br/sf/publicacoes/diarios/pdf/sf/2004/01/26012004/01345.pdf>, acessado em 13 de janeiro de 2009.

*Conclusões finais e
perspectivas futuras*

Conclusões Gerais

Os trabalhos realizados nesta tese contribuíram na utilização das técnicas espectroscópicas para o monitoramento de reações de bancada, através de divulgação científica em congressos e publicação de artigos; e permitindo a aplicação de métodos quimiométricos já estabelecidos em novos sistemas químicos.

O primeiro capítulo permitiu a divulgação científica de termos e conceitos inerentes a *Química Analítica de Processos*, enquanto que os capítulos posteriores desenvolveram aplicações no sentido de permitir a previsão dos componentes da reação e o seu acompanhamento ao longo do tempo. As aplicações desenvolvidas, apresentadas em ordem cronológica, mostraram um aumento na complexidade dos métodos empregados e nas possibilidades do seu uso em monitoramento de processos.

A primeira aplicação possibilitou o monitoramento de uma reação de biotransformação e a previsão da concentração dos quatro componentes de interesse, confirmando o potencial da espectroscopia no infravermelho e dos métodos quimiométricos empregados.

A segunda aplicação deste trabalho utilizou a espectroscopia no MIR e o método PLS para permitir a previsão do rendimento de biodiesel ao longo do decorrer da reação. Nesta aplicação, foi realizada a utilização inédita do método EFA para a correção das diferenças temporais nas 4 bateladas estudadas, permitindo a diminuição nos resíduos do modelo proposto.

A terceira e última aplicação envolveu a avaliação de cartas multivariadas em reações de batelada de formação de biodiesel por espectroscopia NIR. Três estratégias foram empregadas e avaliadas entre si, mostrando as potencialidades no monitoramento de bateladas *pósreação* e *em tempo real*.

De forma geral, os trabalhos realizados possibilitaram a inclusão de uma nova frente de pesquisa no *Laboratório de Quimiometria em Química Analítica* do IQ-UNICAMP, permitindo o desenvolvimento de novos trabalhos científicos e/ou industriais.

Perspectivas Futuras

Muitas reações químicas quando monitoradas por sondas espectroscópicas, não apresentam linearidade entre os valores de absorbância em função do tempo de reação. Desta forma, métodos multivariados com fundamento não-linear, podem ser estudados para a melhora na eficiência da detecção de falhas.

Outros métodos de detecção de autovetores, como o método EFA, podem ser avaliados e comparados entre si para possibilitar uma maior eficiência na identificação do *starpoint*.

Embora as estratégias desenvolvidas na terceira aplicação se mostraram eficientes na detecção de falhas, um importante passo a ser dado na direção da automação, é a integração destes modelos com softwares de aquisição de dados, substituindo a necessidade de leitura e préprocessamento manual dos arquivos espectrais. Além da integração dos sistemas espectroscópicos e dos modelos multivariados, o tempo de tomada de decisão deve ser estudado, avaliando-se se o intervalo de tempo entre a identificação da falha pelo modelo permite um reajuste da batelada para a condição normal NOC estudada.