



# **PROGRAMA EQ-ANP**

# Processamento, Gestão e Meio Ambiente na

Indústria do Petróleo e Gás Natural



# Caracterização de Biodiesel através da Separação dos Constituintes por Cromatografia Líquida

Débora França de Andrade

# Tese de Doutorado

Orientadores

Prof. Luiz Antonio d'Avila, Dr.

Prof. José Luiz Mazzei da Costa, Dr.

Agosto de 2011

# CARACTERIZAÇÃO DE BIODIESEL ATRAVÉS DA SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

## Débora França de Andrade

Tese submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Aprovado por:

Luiz Antonio d'Avila, Dr. (EQ/UFRJ) (orientador – presidente da banca)

José Luiz Mazzei da Costa, Dr. (IBRAG/UERJ) (orientador)

Cláudio José de Araújo Mota, Dr. (EQ/UFRJ)

João Francisco Cajaiba da Silva, Dr. (IQ/UFRJ)

Ligia Maria Marino Valente, Dra. (IQ/UFRJ)

Sérgio Machado Corrêa, Dr. (UERJ)

Rio de Janeiro, RJ - Brasil Agosto de 2011

### FICHA CATALOGRÁFICA

Andrade, Débora França

Caracterização de biodiesel através da separação dos constituintes por cromatografia líquida/ Débora França de Andrade. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2011.

xxi, 144 p.; il.

(Tese) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2011. Orientadores: Luiz Antonio d'Avila e José Luiz Mazzei da Costa.

1. Biodiesel. 2. Óleos vegetais. 3. Cromatografia líquida. 4. Extração em fase sólida. 5. RMN <sup>1</sup>H. (Doutorado – UFRJ/EQ). 6. Luiz Antonio d'Avila e José Luiz Mazzei da Costa. I. Título.

Dedicatória

Aos meus pais, Juzélia França de Andrade e Alaôr Pereira de Andrade (*in memorian*), que não só me deram a vida, como também orientaram meus passos.

#### AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Luiz Antonio d'Avila e José Luiz Mazzei da Costa, pela paciência, disponibilidade, dedicação, discussões, sugestões e idéias, e, principalmente, pelo exemplo de ética profissional.

As minhas eternas amigas, Daniella Rodrigues Fernandes e Michelle Jakeline Cunha Rezende, por estarem sempre presentes ao meu lado, nas minhas quedas, fraquezas, alegrias, tristezas, desilusões, lutas, vitórias e derrotas. Obrigada pela AMIZADE SINCERA!

Aos meus colegas que ingressaram na universidade comigo, os quais jamais vou esquecer: Alessandra Neves, Aline Toci, Anderson Canuto, Elânio Aguiar, Leandro Noronha, Marta Melo, Núbia Floriano e Jaqueline Matos.

As minhas ex-orientadoras, Eliane D'Elia e Jussara Lopes de Miranda pelos ensinamentos durante o projeto de curso e o mestrado.

Aos meus colegas do Instituto Nacional de Tecnologia: Ana Luiza da Fonseca Carvalho, Cristiano Porto Ribeiro, Fabiana M. Teixeira Mendes, Javier Pimentel, Jefferson Lee, Michelle Reis, Manoela Ruchiga, Natalia Quinete, Patrícia Maia, Ricardo Teixeira, Vânia Chaves e Wilson Nunes de Almeida Guerra; Em especial a Lúcia Helena Menezes dos Santos, Maria Alice Cerullo e Viridiana Santana Ferreira-Leitão pelos conselhos e exemplo de dedicação, doação, ética e dignidade pessoal.

Aos colegas do LABCOM: Bruno Lima dos Santos, Estevam Pandini Neto, Graça, Lílian Junqueira e Robson Tosta; Em especial a Amanda Pereira Franco pela disponibilidade em me ajudar nos momentos em que precisei.

Ao Antônio da Petrobras por permitir a utilização do laboratório para evaporar as amostras de extração em fase sólida.

Aos colegas de laboratório Cristiane Gimenes, Leonardo Pereira e Louhan Sodré. Em especial a Jéssica pela ajuda nas análises de extração em fase sólida.

A todos os funcionários da Escola de Química (EQ) – UFRJ, em especial a Ana Maria Carreiro, Mário Luiz, Roselee Lima e Marlene da Graça.

Aos professores da EQ-UFRJ, em especial a Érika Christina Nunes, Peter Rudolf Seidl, Magali Cammarota, Lídia Yokoyama e Suely Freitas pelos ensinamentos durante as disciplinas cursadas.

A secretária do PRH-13 ANP, Alzirene Rodrigues Ferreira, pela preciosa ajuda ao longo da tese. Obrigada pela confiança nos momentos difíceis!!!!

A Cristiane Mesquita e ao Laboratório Greentec da EQ-UFRJ pelo fornecimento do óleo de pinhão-manso empregado nesta tese.

Ao professor Carlos Roland Kaiser do Instituto de Química (IQ) da UFRJ pela valiosa ajuda nas interpretações dos espectros de RMN e ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do IQ-UFRJ pelas análises de RMN.

Aos professores Eduardo Mach, Fernando Pellegrini Pessoa, Carlos Augusto Guimarães Perlingeiro, pelo apoio junto ao PRH-13 ANP. Obrigada pela compreensão e confiança nos momentos difíceis!!!!

A FAPERJ e CNPq pelo incentivo a pesquisa e apoio financeiro.

Ao apoio financeiro da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP – e da Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP – por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo e Gás – PRH-ANP/MCT, em particular ao **PRH 13**, da Escola de Química - Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural.

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências, com ênfase na área de Petróleo e Gás Natural.

#### CARACTERIZAÇÃO DE BIODIESEL ATRAVÉS DA SEPARAÇÃO DOS CONSTITUINTES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Débora França de Andrade Agosto, 2011

Orientadores: Prof. Luiz Antonio d'Avila, Dr. Prof. José Luiz Mazzei da Costa, Dr.

Os contaminantes no biodiesel podem levar a problemas em motores de combustão. Mono, di e triacilgliceróis (MAG, DAG e TAG), destacam-se como contaminantes do biodiesel puro (B100) produzido da transesterificação dos óleos vegetais. Esses componentes originam da conversão parcial aos ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG). Devido à diversidade de fontes oleaginosas para a produção do biodiesel brasileiro, é imprescindível o monitoramento dos contaminantes, além dos EsMAG, de modo a garantir sua gualidade. No presente trabalho foi desenvolvido um método alternativo de análise e caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa não aquosa (CLAE-FRNA) dos constituintes do B100 originados de óleos vegetais, a diferentes graus de conversão. Foi proposta a determinação da conversão por CLAE-FRNA. A extração em fase sólida (EFS), utilizando cartuchos de aminopropilsilano, foi desenvolvida para o enriquecimento e separação dos acilgliceróis. A recuperação e a composição em cada fração da EFS foram determinadas por CLAE-FRNA. Foram planejados materiais de referência, contendo intensidades relativas estratégicas de EsMAG, TAG, DAG e MAG, a partir de uma série de métodos matemáticos e simulação cromatográfica. Os óleos de soja, milho, girassol, algodão e canola foram transesterificados com metanol em refluxo a diferentes condições (37 produtos de transesterificação). A CLAE-FRNA mostrou-se capaz de separar os EsMAG e os acilgliceróis. A determinação da conversão, por CLAE-FRNA, mostrou-se significativamente (P > 0.05) concordante com os valores determinados por RMN<sup>1</sup>H, tornando-se aplicável no monitoramento do processo de produção do biodiesel, independentemente da conversão e da fonte oleaginosa. Na EFS, os EsMAG eluem seletivamente com n-hexano (100% recuperação), enquanto uma fração enriquecida (3-6 vezes) com os acilgliceróis elue com clorofórmio/metanol 2:1. Assim, a EFS pode oferecer alta sensibilidade analítica para a caracterização química do B100.

Abstract of the Thesis presented to Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - EQ/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science with emphasis on Petroleum and Natural Gas.

#### CHARACTERIZATION OF BIODIESEL THROUGH LIQUID CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF ITS CONSTITUENTS

Débora França de Andrade Agosto, 2011

Supervisors: Prof. Luiz Antonio d'Avila, Dr. Prof. José Luiz Mazzei da Costa, Dr.

The contaminants on biodiesel can lead to problems in combustion engines. Mono, di and triacylglycerols (MAG, DAG and TAG), stand out as contaminants of pure biodiesel (B100), which are produced from the transesterification of vegetable oils. These components originate from partial conversion to fatty acid methyl esters (FAME). Due to the diversity of oil sources for biodiesel production in Brazil, it is essencial to monitoring of contaminants, as well as FAMEs, to ensure its quality. In the present work an alternative method through high performance liquid chromatography using a non-aqueous reversed phase (HPLC-NARP) was developed to analyze B100 constituents produced from vegetable oils at different conversions. Determination of the conversion by HPLC-NARP was proposed. Solid phase extraction (SPE) using aminopropylsilane cartridges was developed for the enrichment and separation of the acylglycerols. Recovery and composition in each fraction were determined by the HPLC-NARP. Reference materials, containing relative intensities strategic of FAME, TAG, DAG and MAG, were designed from a series of mathematical methods and simulation chromatography. Soybean, corn, sunflower, cotton and canola oils were transesterified with methanol under reflux at different conditions (37 transesterification products). The HPLC-NARP was able of separating the FAME and acylglycerols. The determination of the conversion by HPLC-NARP was significantly (P > 0.05) consistent with the values determined by <sup>1</sup>H NMR for all products, making it applicable in monitoring the biodiesel production process, regardless of conversion and source. In SPE, FAME selectively eluted with hexane (100% recovery), while an fraction (3-6 times) enriched with acylglycerols eluted with chloroform/methanol 2:1. Thus, SPE can provide high analytical sensitivity for the chemical characterization of the B100.

# ÍNDICE

Capítulo 1	Introdução	2								
Capítulo 2	Revisão Bibliográfica									
2.1	O Biodiesel									
2.1.1	As especificações do biodiesel									
2.1.2	A composição das matérias-primas									
2.2	Métodos empregados na análise de biodiesel e no	15								
	monitoramento da reação de transesterificação									
2.2.1	Cromatografia líquida de alta eficiência	16								
2.2.2	CLAE-CG	24								
2.2.3	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio	25								
2.3	Separação das classes químicas por extração em fase sólida	27								
Capítulo 3	Justificativa	32								
Capítulo 4	Objetivo	36								
4.1	Objetivo Geral	36								
4.2	Objetivos Específicos	36								
Capítulo 5	Material e Métodos									
5.1	Reações de transesterificação	39								
5.1.1	Óleos vegetais e reagentes									
5.1.2	Estimativa da massa molecular média dos óleos vegetais									
5.1.3	Reações de transesterificação									
5.2	Análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio									
5.2.1	Reagentes	41								
5.2.2	Análise por RMN <sup>1</sup> H	41								
5.2.3	Estimativa da massa molecular média dos óleos vegetais por	42								
	RMN <sup>1</sup> H									
5.2.4	Estimativa do índice de iodo dos óleos vegetais por RMN <sup>1</sup> H	43								
5.2.5	Estimativa da incerteza na medida de integração por RMN <sup>1</sup> H	44								
5.2.6	Determinação da conversão por RMN <sup>1</sup> H	44								
5.2.7	Estimativa do teor de insaturados por RMN <sup>1</sup> H	46								
5.2.8	Estimativa do grau de insaturação por RMN <sup>1</sup> H	46								
5.3	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência	48								
5.3.1	Reagentes 4									

5.3.2	Método de CLAE	48						
5.3.3	Conversão dos resultados cromatográficos 4							
5.3.4	Determinação do tempo de retenção relativo	49						
5.3.5	Determinação da área corrigida 5							
5.3.6	Determinação da conversão por CLAE 52							
5.4	Extração em fase sólida	53						
5.4.1	Reagentes 5							
5.4.2	Obtenção de materiais de referência contendo EsMAG, MAG, 5							
	DAG e TAG							
5.4.3	Separação e isolamento dos acilgliceróis por EFS	54						
5.4.4	Determinação da recuperação	55						
5.4.5	Determinação da composição	55						
5.5	Tratamento estatístico dos dados	56						
Capítulo 6	Resultados e Discussão	58						
6.1	Produção de amostras de biodiesel (B100) de diferentes	58						
	origens e graus de conversão							
6.2	Caracterização dos óleos vegetais por RMN <sup>1</sup> H	59						
6.2.1	Estimativa da massa molecular dos óleos vegetais por RMN <sup>1</sup> H	63						
6.2.2	Estimativa do índice de iodo dos óleos vegetais por RMN <sup>1</sup> H	65						
6.2.3	Determinação da conversão por RMN <sup>1</sup> H 6							
6.2.4	Estimativa do teor de insaturados por RMN <sup>1</sup> H 7							
6.2.5	Estimativa do grau de insaturação por RMN <sup>1</sup> H	77						
6.3	Análise dos óleos vegetais por CLAE	79						
6.4	Análise dos produtos de transesterificação por CLAE	82						
6.5	Determinação da conversão por CLAE	96						
6.6	Obtenção de materiais de referência contendo EsMAG, MAG,	99						
	DAG e TAG							
6.7	Separação e isolamento dos acilgliceróis por EFS	105						
Capítulo 7	Conclusões	110						
Capítulo 8	Perspectivas Futuras	113						
Referências B	ibliográficas	115						
Apêndices		142						
Apêndice A	Artigo intitulado "Assessment of different measurement	142						
	methods using <sup>1</sup> H NMR data for the analysis of the							
	transesterification of vegetable oils", publicado na revista							

"Journal of the American Oil Chemist's Society (JAOCS)".

- Apêndice B Trabalho intitulado "Aplicabilidade da cromatografia de alta 143 eficiência no monitoramento da conversão de óleos vegetais para a produção de biodiesel, publicado no 5° Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, no período de 18 a 22 de outubro de 2009, em Fortaleza, Ceará.
- Apêndice C Manuscrito intitulado "Separação dos acilgliceróis do 144 biodiesel por cromatografia líquida de alta eficiência e extração em fase sólida", submetido à Revista Virtual de Química.

### ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Reações consecutivas reversíveis para transesterificação dos 6 TAG (FREEDMAN, BUTTERFIELD, PRYDE, 1986). Os grupos R<sup>'</sup>, R<sup>''</sup> e R<sup>'''</sup> representam as cadeias hidrocarbônicas alifáticas saturadas ou insaturadas; podendo ser iguais ou diferentes, e o grupo R representa a cadeia do álcool utilizado.
- Figura 2 Deslocamentos químicos dos hidrogênios dos TAG (a exemplo do 27 oleoil-linoleoil-linolenoil-glicerol) e EsMAG (R representando cadeias alifáticas).
- **Figura 3** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) dos óleos de milho (a), 60 girassol (b), canola (c), algodão (d) e pinhão-manso (e).
- **Figura 4** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do óleo de mamona. 62
- Figura 5 Gráfico de C<sub>G</sub> versus C<sub>G</sub>/C<sub>K</sub>, incluindo as incertezas propostas no 73 presente trabalho, para os produtos dos óleos de: (a) soja (círculos) e milho (triângulos); (b) algodão (triângulos) e pinhão-manso (quadrados) e (c) girassol (círculos) e canola (triângulos).

х

- **Figura 6** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) dos produtos de 74 transesterificação do óleo de milho em diferentes graus de conversão: a. 38%; b. 46%; c. 91% e d. 94%.
- Figura 7 Cromatogramas dos óleos de soja (a), milho (b), girassol (c), 80 canola (d), algodão (e) e pinhão-manso (f).
- Figura 8 Cromatograma do produto de transesterificação do óleo de canola 83 com baixa conversão (C<sub>G</sub>=30%), em 5 min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:3.
- Figura 9 Cromatogramas dos produtos de transesterificação dos óleos de 90 soja (a), milho (b), girassol (c), canola (d), algodão (e) e pinhãomanso (f), com 15 min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:9.
- Figura 10 Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de 91 soja, com 5 (a), 15 (b) e 30 (c) min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:3 e com 5 (d), 10 (e), 15 (f), 30 (g) e 90 (h) min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:9.
- Figura 11 Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de 92 milho, com 5 (a), 15 (b) e 30 (c) min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:3 e com 5 (d), 10 (e), 15 (f), 30 (g) e 90 (h) min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:9.
- Figura 12 Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de 93 canola, com 5 (a), 15 (b) e 30 (c) min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:3 e com 5 (d), 10 (e), 15 (f), 30 (g) e 90 (h) min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:9.
- Figura 13 Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de 94 pinhão-manso, com 5 min de reação (a) e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:3 e com 30 min de reação (b) e razão molar

óleo vegetal:metanol de 1:9.

- Figura 14 Cromatogramas ampliados dos produtos de transesterificação 95 com alta conversão a partir dos óleos de soja (a,  $C_G = 92\%$ ) e de canola (b,  $C_G = 95\%$ ) em 90 min com razão molar óleo vegetal: metanol de 1:9.
- Figura 15 Cromatograma simulado (a) e experimental (b) do material de 100 referência do biodiesel próximo ao limite da especificação, contendo de 82±2% de EsMAG; 5±1% de MAG; 6±1% de DAG e 7±1% de TAG.
- Figura 16 Cromatograma simulado (a) e experimental (b) do material de 101 referência dos EsMAG. MeO, MeL e MeLn com intensidades na razão 2:4:1.
- Figura 17 Cromatograma simulado (a) e experimental (b) do material de 101 referência dos MAG.
- **Figura 18** Cromatograma simulado (a) e experimental (b) do material de 102 referência dos DAG. Intensidades na razão 1:4:21:18:2.
- **Figura 19** Cromatograma simulado (a) e experimental (b) do material de 103 referência dos TAG. Intensidades na razão 6:32:72:68:36:10:3:1.
- **Figura 20** Cromatograma simulado (a) e experimental (b) do material de 104 referência da matriz padrão submetida à EFS.
- **Figura 21** Cromatograma: (a) fração 1, obtida na eluição com *n*-hexano e (b) 105 fração 2, obtida na eluição com clorofórmio:metanol (2:1).

### ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 Condições reacionais empregadas nas reações de 59 transesterificação dos óleos vegetais.

#### ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1 Limites de quantidade (% massa) de MAG, DAG, TAG, EsAG e 9 glicerina livre e total no B100 por especificações americana, européia e brasileira.
- Tabela 2Nomenclatura, fórmula estrutural condensada e MM de alguns AG12constituintes predominantes de TAG em óleos e gorduras naturais<br/>(adaptado de SRIVASTAVA, PRASAD, 2000; SAAD, 2005).
- Tabela 3Composição química, em ácidos graxos (% massa), de alguns14óleos vegetais.
- Tabela 4Condições operacionais descritas na literatura para a análise de17biodiesel e/ou da glicerina combinada por CLAE.
- Tabela 5Caracterização da integração (área) dos sinais assinalados no43espectro de RMN <sup>1</sup>H (KNOTHE, 2000; GELBARD *et al.*, 1995).
- Tabela 6Notação eNLDdoscomponentesidentificadosnos51cromatogramas obtidos por CLAE.
- Tabela 7 Integrações dos sinais dos espectros de RMN <sup>1</sup>H dos óleos 61 vegetais empregados nas reações de transesterificação (relativamente ao sinal de A<sub>CH2</sub>).
- Tabela 8Massas moleculares médias de óleos vegetais calculadas a partir64dos dados de composição da literatura e estimadas por RMN <sup>1</sup>H.

- Tabela 9Resultados do índice de iodo dos óleos vegetais, estimados por66RMN <sup>1</sup>H e relatados na literatura.
- Tabela 10 Resultados da conversão (%), calculado pelas equações de 69 Gelbard (C<sub>G</sub>) e Knothe (C<sub>K</sub>), e do grau de insaturação definido por Morgenstern (GI<sub>M</sub>) e definido no presente trabalho (G<sub>I</sub>), com as respectivas incertezas propostas, dos produtos de transesterificação.
- Tabela 11Resultados do teor de insaturados dos óleos vegetais, estimados76por RMN <sup>1</sup>H e relatados na literatura.
- Tabela 12Resultados das áreas relativas (%) dos picos dos TAG e DAG, 81nos óleos vegetais estudados.
- Tabela 13 Notação, tempo de retenção (t<sub>R</sub>), tempo de retenção relativo (t<sub>RR</sub>), 85 número de carbono equivalente (NCE) e número total de carbono (NC) dos componentes identificados, por CLAE-FRNA, nos produtos de transesterificação e nos óleos correspondentes.
- **Tabela 14**Resultados de conversão obtidos por CLAE ( $C_{CLAE}$ ) e RMN <sup>1</sup>H, 97segundo as equações de Gelbard ( $C_G$ ) e Knothe ( $C_K$ ).
- Tabela 15 Composição e recuperação dos EsMAG e dos acilgliceróis 106 (MAG, DAG e TAG) do biodiesel nas frações eluídas com diferentes quantidades de *n*-hexano, na EFS em fase aminopropilsilano.
- Tabela 16Composição e recuperação dos EsMAG e dos acilgliceróis108(MAG, DAG e TAG) do biodiesel, nas frações eluídas na EFSem fase aminopropilsilano.

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

- Equação 1 Estimativa da massa molecular média (MM<sub>média</sub>) dos óleos 40 vegetais empregados nas reações de transesterificação (GUARIEIRO, 2006).
- Equação 2 Estimativa da massa molecular média dos óleos vegetais 42 empregados nas reações de transesterificação por RMN <sup>1</sup>H (MM<sub>RMN H</sub>) (JOSEPH-NATHAN, 1982 *apud* REDA, 2004).
- **Equação 3** Número total de prótons (NTP) (REDA, 2004). 42
- Equação 4Número de prótons olefínicos (NPO) (REDA, 2004).42
- Equação 5 Estimativa do índice de iodo dos óleos vegetais empregados nas 43 reações de transesterificação por RMN <sup>1</sup>H (I.I.<sub>RMN H</sub>) (JOSEPH-NATHAN, 1982).
- Equação 6 Incerteza da função nula.
- **Equação 7** Conversão dos triacilgliceróis em ésteres metílicos segundo 44 GELBARD *et al.* (1995).
- **Equação 8** Conversão dos triacilgliceróis em ésteres metílicos segundo 45 KNOTHE (2000).
- **Equação 9** Incerteza na determinação da conversão dos triacilgliceróis em 45 ésteres metílicos segundo GELBARD *et al.* (1995).
- **Equação 10** Incerteza na determinação da conversão dos triacilgliceróis em 45 ésteres metílicos segundo KNOTHE (2000).
- **Equação 11** Estimativa do teor molar percentual de derivados dos ácidos 46 insaturados totais por RMN <sup>1</sup>H.

44

- **Equação 12** Estimativa da incerteza do teor molar percentual de derivados 46 dos ácidos insaturados totais por RMN <sup>1</sup>H.
- **Equação 13** Estimativa do grau de insaturação, por RMN <sup>1</sup>H, segundo 47 MORGENSTERN *et al.* (2006).
- **Equação 14** Estimativa do grau de insaturação, por RMN <sup>1</sup>H, segundo 47 expressão proposta neste trabalho.
- **Equação 15** Estimativa da incerteza da expressão do grau de insaturação, 47 por RMN <sup>1</sup>H, segundo MORGENSTERN *et al.* (2006).
- **Equação 16** Estimativa da incerteza da expressão do grau de insaturação, 47 por RMN <sup>1</sup>H, segundo expressão proposta neste trabalho.
- **Equação 17** Tempo de retenção relativo de cada componente identificado no 49 cromatograma obtido por CLAE.
- **Equação 18** Cálculo da área corrigida de cada componente identificado no 52 cromatograma obtido por CLAE.
- **Equação 19** Conversão dos triacilgliceróis em ésteres metílicos por CLAE. 52
- **Equação 20** Cálculo da recuperação de cada classe de componentes 55 presentes nas frações obtidas pelo processo de EFS.
- **Equação 21** Cálculo da pureza de cada classe de componentes presentes 55 nas frações obtidas pelo processo de EFS.

## LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

Α	Área obtida diretamente de cada componente identificado no
	cromatograma obtido por CLAE
A <sub>Controle</sub>	Área corrigida de cada classe de componentes, obtida por CLAE, sem
	passagem pelo processo de EFS
A <sub>C</sub>	Área corrigida de cada componente identificado no cromatograma obtido
	por CLAE
A <sub>C Classe</sub>	Área corrigida de cada classe de componentes, obtida por CLAE, após
	passagem pelo processo de EFS
A <sub>C DAG</sub>	Área corrigida dos DAG
A <sub>C ESMAG</sub>	Área corrigida dos EsMAG
A <sub>C MAG</sub>	Área corrigida dos MAG
A <sub>C TAG</sub>	Área corrigida dos TAG
A <sub>Total Classe</sub>	Área total corrigida de todas as classes de componentes (MAG, EsMAG,
	DAG e/ou TAG)
A <sub>CA</sub>	Área dos hidrogênios olefínicos da cadeia alifática e metínico do grupo
	glicerol
A <sub>AG</sub>	Área dos hidrogênios metilênicos do grupo glicerol e metilênicos em
	posição $lpha$ - ao grupo olefínico do ácido ricinoléico
A <sub>EM</sub>	Área dos hidrogênios da metoxila dos ésteres metílicos e metínico em
	posição β- ao grupo olefínico do ácido ricinoléico
A <sub>DAM</sub>	Área dos hidrogênios dialilmetilênicos
A <sub>CH2</sub>	Área dos hidrogênios metilênicos em posição $lpha$ - à carbonila
A <sub>MA</sub>	Área dos hidrogênios metilênicos em posição α- ao grupo olefínico
A <sub>MB</sub>	Área dos hidrogênios metilênicos em posição β- à carbonila e ao grupo
	olefínico
A <sub>MC</sub>	Área dos hidrogênios metilênicos em posição $\alpha$ - ao grupo carbinol do
	ácido ricinoléico
A <sub>M</sub>	Área dos demais hidrogênios metilênicos
A <sub>MT</sub>	Área dos hidrogênios metílicos terminais
ACN	Acetonitrila
АСТ	Acetona

AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
ALC	Ácido linoléico conjugado
ANOVA	Análise de variância
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
ASTM	American Society for Testing and Materials
B2	2% de biodiesel ao óleo diesel
B5	5% de biodiesel ao óleo diesel
B10	10% de biodiesel ao óleo diesel
B20	20% de biodiesel ao óleo diesel
B50	50% de biodiesel ao óleo diesel
B75	75% de biodiesel ao óleo diesel
B100	Biodiesel puro
Bn	n% de biodiesel ao óleo diesel
BSTFA	N,O – bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
C <sub>G</sub>	Conversão dos triacilgliceróis em ésteres metílicos segundo GELBARD et
	<i>al.</i> (1995)
Cκ	Conversão dos triacilgliceróis em ésteres metílicos segundo KNOTHE
	(2000)
ΔC <sub>G</sub>	Incerteza na determinação da conversão dos triacilgliceróis em ésteres
	metílicos segundo GELBARD <i>et al.</i> (1995)
ΔC <sub>K</sub>	Incerteza na determinação da conversão dos triacilgliceróis em ésteres
	metílicos segundo KNOTHE (2000)
C18	Grupo octadecilsilano
CCF	Cromatografia em camada fina
C <sub>CLAE</sub>	Conversão dos triacilgliceróis em ésteres metílicos por CLAE
C <sub>Classe</sub>	Composição relativa percentual de cada classe de componentes (MAG,
	EsMAG, DAG e/ou TAG)
	Clorofórmio deuterado
CG	Cromatografia em fase gasosa
CGAR	Cromatografia em fase gasosa de alta resolução
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPG	Cromatografia por permeação em gel

DAG	Diacilgliceróis
DEEL	Detector evaporativo de espalhamento de luz
d.i.	Diâmetro interno
d.p.	Diâmetro da partícula
DIC	Detector por ionização de chama
DPA	Detecção pulso-amperométrica
DRD	Detector por refratometria diferencial
DRX	Difração de raio X
EFS	Extração em fase sólida
EM	Espectrometria de massas
EM-IE	Espectrometria de massas por ionização "electrospray"
EM-IQPA	Espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica
EsAG	Ésteres de ácidos graxos
EsBAG	Ésteres 1-butílicos de ácidos graxos
EsEAG	Ésteres etílicos de ácidos graxos
EsMAG	Ésteres metílicos de ácidos graxos
EsPAG	Ésteres 2-propílicos de ácidos graxos
EUA	Estados Unidos da América
f	Relação simples e hipotética
Δf	Erro da relação simples e hipotética
FR	Fase reversa
FRNA	Fase reversa não aquosa
GL	Glicerina
Gı	Grau de insaturação dos óleos vegetais e de seus produtos de
	transesterificação estimado por RMN <sup>1</sup> H
ΔGI	Incerteza do grau de insaturação dos óleos vegetais e de seus produtos
	de transesterificação estimado por RMN <sup>1</sup> H
I.I.	Índice de iodo
I.I. <sub>RMN H</sub>	Índice de iodo estimado por RMN <sup>1</sup> H
IQPA	Ionização química à pressão atmosférica
IV	Infravermelho
ΔΙ	Estimativa da incerteza na medida de integração
L	Tamanho da coluna
1-L	1-Monolinoleína
2-L	2-Monolinoleína

1,2-LL	1,2-Dilinoleína
1,3-LL	1,3-Dilinoleína
1-Ln	1-Monolinolenina
2-Ln	2-Monolinolenina
1,2-LnLn	1,2-Dilinolenina
1,3-LnLn	1,3-Dilinolenina
1,2-LLn	1,2-Linoleoil-linolenoil-glicerol
1,3-LLn	1,3-Linoleoil-linolenoil-glicerol
LnLnLn	Trilinolenina
LLnLn	Dilinolenoil-linoleoil-glicerol
LLLn	Dilinoleoil-linolenoil-glicerol
LLL	Trilinoleína
MAG	Monoacilgliceróis
MeL	Éster metílico do ácido linoleico
MeLn	Éster metílico do ácido linolênico
МеО	Éster metílico do ácido oleico
МеОН	Metanol
ММ	Massa molecular
MMglicerina	Massa molecular da glicerina
MM <sub>ac.graxo</sub>	Massa molecular do ácido graxo
MM <sub>média</sub>	Massa molecular média
MM <sub>RMN H</sub>	Massa molecular estimada por RMN <sup>1</sup> H
MSTFA	N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
МТВЕ	Metil-t-butil éter
<i>n</i> -Hex	<i>n</i> -Hexano
NC	Número de carbono total
NCE	Número de carbono equivalente
NLD	Número de ligações duplas
NPO	Número de prótons olefínicos
NTP	Número total de prótons
1-0	1-Monooleína
2-0	2-Monooleína
1,2-00	1,2-Dioleína
1,3-00	1,3-Dioleína
1,2-OL	1,2-Oleoil-linoleoil-glicerol

1,3-OL	1,3-Oleoil-linoleoil-glicerol
1,2-OLn	1,2-Oleoil-linolenoil-glicerol
1,3-OLn	1,3-Oleoil-linolenoil-glicerol
OLnLn	Dilinolenoil-oleoil-glicerol
OLLn	Oleoil-linoleoil-linolenoil-glicerol
OLL	Dilinoleoil-oleoil-glicerol
OOLn	Dioleoil-linolenoil-glicerol
OOL	Dioleoil-linoleoil-glicerol
000	Trioleína
OOG	Dioleoil-gadoleoil-glicerol
ODS	Mesmo que C18 - Grupo octadecilsilano
ppm	Partes por milhão
2-PrOH	2-propanol
PTFE	Politetrafluoretileno
Qı	Teor molar percentual de derivados dos ácidos insaturados totais
	estimado por RMN <sup>1</sup> H
ΔQI	Incerteza do teor molar percentual de derivados dos ácidos insaturados
	totais estimado por RMN <sup>1</sup> H
R <sub>Classe</sub>	Recuperação de cada classe de componentes presentes nas frações
	obtidas pelo processo de EFS
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TAG	Triacilgliceróis
THF	Tetrahidrofurano
t <sub>P</sub>	Tempo de retenção do componente padrão, em min., em cada grupo (1-
	L/2-L para MAG; MeL para EsMAG; 1,2-OL/1,3-OL/1,2-OO/1,3-OO para
	DAG e LLL/OLL <sub>n</sub> para TAG)
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção, em min., de cada componente
t <sub>RR</sub>	Tempo de retenção relativo
UV	Ultravioleta

# Capítulo 1. Introdução

# Capítulo 1. Introdução

Os contaminantes no biodiesel podem levar a problemas operacionais severos quando utilizados em motores de combustão, incluindo a formação de depósitos no motor e o entupimento do filtro (MITTELBACH *et al.*, 1983; PLANK, LORBEER, 1995; HOLCAPEK *et al.*, 1999). Tais contaminantes podem ser remanescentes da fonte oleaginosa não transesterificada (triacilgliceróis, TAG) e ácidos graxos livres (AGL), de álcool e de catalisador. Outros contaminantes são a glicerina livre (glicerina residual e não separada do processo), assim como os intermediários da reação, monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) (FOGLIA *et al.*, 2004; KNOTHE *et al.*, 2006). Portanto, as especificações de regulamentação (ASTM D6751, 2002; EN 14214, 2003 e ANP, 2008) limitam a quantidade permitida de contaminantes no biodiesel.

Dentre os parâmetros descritos nas especificações do biodiesel, alguns se referem à extensão com que a reação de transesterificação foi processada, tais como os teores de glicerina livre, combinada (MAG, DAG e TAG) e total (livre + combinada) (KNOTHE *et al.,* 2006). No Brasil, o teor máximo de glicerina livre é de 0,02% e o de glicerina total não deve ultrapassar 0,25% em massa (ANP, 2008).

Devido à diversidade de fontes e opções de processo para a produção do biodiesel brasileiro (possibilidade do emprego de diferentes alcoóis e tipos de óleos), surge um problema de grandes proporções: o controle de qualidade do mesmo, seguindo especificações ainda a serem estabelecidas de maneira definitiva. Novos métodos deverão ser desenvolvidos, caso contrário, problemas poderão surgir durante o consumo do biodiesel, podendo gerar insatisfação do consumidor e depreciando consequentemente a imagem pública positiva do biodiesel (GUARIEIRO, 2006). A determinação da qualidade química do biodiesel é, portanto, um aspecto de grande importância para o sucesso de sua

#### Andrade, D. F.

comercialização. A manutenção da oferta de um combustível de alta qualidade, que apresente um mínimo de problemas operacionais, é um pré-requisito para a aceitação do biodiesel no mercado (KNOTHE *et al.*, 2006).

Neste contexto, o desenvolvimento de métodos capazes de separar o biodiesel da glicerina combinada (MAG, DAG e TAG) é de importância para o controle de qualidade. A cromatografia em fase gasosa (CG) é o método mais utilizado (PINTO *et al.*, 2005). No entanto, uma vantagem atribuída a uma outra técnica, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é que procedimentos de derivatização demorados e dispendiosos não são geralmente necessários. Entretanto, a aplicação da CLAE à análise de biodiesel não é tão comum. Desta forma, o principal objetivo desta tese é o desenvolvimento e aplicação de técnicas de cromatografia líquida (CL) na análise de biodiesel para a determinação de TAG residual e dos ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG), MAG e DAG, produzidos durante o processo de produção do biodiesel.

Dentre as técnicas de CL, a extração em fase sólida (EFS) permite não só a extração eficiente dos analitos, mas possibilita sua concentração e/ou pré-purificação. O emprego da EFS na análise de diferentes classes lipídicas vem sendo descrito (KALUZNY *et al.*, 1985; PINKART, DEVEREUX, CHAPMAN, 1998; BODENNEC *et al.*, 2000; PÉREZ-PALACIOS, RUIZ, ANTEQUERA, 2007). Entretanto, a revisão bibliográfica realizada ao longo deste trabalho não demonstrou a aplicação da EFS na separação da glicerina combinada do biodiesel.

Sendo assim, com base nos desafios e nas motivações aqui apresentadas, a proposta central desta tese foi o desenvolvimento de métodos alternativos de separação de constituintes de biodiesel, através das técnicas de EFS e CLAE, visando à obtenção de frações enriquecidas em classes de constituintes, que simplifiquem sua caracterização por métodos analíticos.

#### Andrade, D. F.

3

# Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

# Capítulo 2. Revisão Bibliográfica

#### 2.1 O biodiesel

A utilização de biodiesel como combustível aparece como alternativa para substituição ao óleo diesel em motores de ignição por compressão (ENCINAR *et al.,* 1999; CANAKCI, VAN GERPEN, 2001), sendo o seu uso testado já em fins do século XIX, produzindo resultados satisfatórios no próprio motor diesel (NASCIMENTO, COSTA NETO, MAZZUCO, 2001; KNOTHE, 2002). Esta possibilidade de emprego de combustíveis de origem agrícola em motores do ciclo diesel é bastante atrativa tendo em vista o aspecto ambiental, por ser uma fonte renovável de energia (NASCIMENTO, COSTA NETO, MAZZUCO, 2001; DORADO *et al.,* 2002).

O biodiesel é normalmente obtido através de um processo de transesterificação, no qual ocorre a transformação de TAG em ésteres de ácidos graxos (EsAG) e glicerina, na presença de um catalisador (ácido, básico ou enzimático) (FREEDMAN, BUTTERFIELD, PRYDE, 1986). Catalisadores alcalinos (hidróxidos de sódio e de potássio; ou alcóxidos correspondentes) proporcionam processos mais rápidos que catalisadores ácidos (FREEDMAN, PRYDE, 1982; FREEDMAN, PRYDE, MOUNTS, 1984; CANAKCI, VAN GERPEN, 1999).

A reação de transesterificação ocorre através de uma sequência de três reações consecutivas reversíveis produzindo EsAG de uma das cadeias graxas em cada reação (figura 1). Os TAG são convertidos a DAG, estes por sua vez são convertidos a MAG e finalmente a glicerina. Neste processo são necessários três moles de álcool para reagir com um mol de TAG em cada etapa (FREEDMAN, BUTTERFIELD, PRYDE, 1986). Como a reação de transesterificação é reversível, é comum a utilização de um excesso de álcool *Andrade, D. F.* 

de modo a deslocar o equilíbrio no sentido da produção de EsAG e glicerina (SCHWAB, BAGBY, FREEDMAN, 1987). O mecanismo e a cinética da reação de transesterificação vêm sendo descritos com detalhes em alguns trabalhos da literatura (MA, HANNA, 1999; MEHER, SAGAR, NAIK, 2006; ENCINAR, GONZÁLEZ, RODRÍGUEZ-REINARES, 2007).

Triglicerídeo + ROH  $\stackrel{\text{catalisador}}{\longrightarrow}$  Diglicerídeo + R'COOR Diglicerídeo + ROH  $\stackrel{\text{catalisador}}{\longleftarrow}$  Monoglicerídeo + R''COOR Monoglicerídeo + ROH  $\stackrel{\text{catalisador}}{\longleftarrow}$  Glicerina + R'''COOR

**Figura 1.** Reações consecutivas reversíveis para transesterificação dos TAG (FREEDMAN, BUTTERFIELD, PRYDE, 1986). Os grupos R<sup>'</sup>, R<sup>"</sup> e R<sup>""</sup> representam as cadeias hidrocarbônicas alifáticas saturadas ou insaturadas; podendo ser iguais ou diferentes, e o grupo R representa a cadeia do álcool utilizado.

Em 2004, foi lançado no Brasil o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel. A lei n<sup>0</sup> 11.097/2005, dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Nesta, definem-se B2, B5, B10, B20, B50 e B75 respectivamente, como a mistura de 2%, 5%, 10%, 20%, 50% e 75% de biodiesel ao óleo diesel.

Dentre os alcoóis que podem ser usados no processo de transesterificação, podemos destacar o metanol, o etanol, o propanol, o butanol e o pentanol (MA, HANNA, 1999). O metanol e o etanol são os mais frequentemente usados devido aos seus baixos custos e às suas características físico-químicas (alta polaridade e pequena cadeia). O metanol é o álcool predominantemente utilizado em todo o mundo para a produção de EsAG para uso como biodiesel. Vários trabalhos relacionados à transesterificação como processo para a produção de biodiesel já foram publicados na literatura (DEMIRBAS, 2003; BONDIOLI, 2004; HOYDONCKX *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2005; MEHER, SAGAR, NAIK, 2006; MURUGESAN *et al.*,2009). O processo de transesterificação pode ser influenciado por vários fatores, tais como: a razão molar de álcool para óleo, a presença de umidade e de AGL presentes no óleo, a concentração e o tipo de catalisador, o tipo de álcool, o tempo de reação, a temperatura, a intensidade de agitação, o grau de refino do óleo vegetal e a pureza dos reagentes (principalmente no que se refere ao conteúdo de água) (FREEDMAN, PRYDE, MOUNTS, 1984).

Até o momento, as principais fontes de matéria-prima para a obtenção de EsAG são os óleos vegetais (SCHUCHARDT, SERCHELI, VARGAS, 1998). Outras fontes não naturais também vêm sendo estudadas na produção de biodiesel, como por exemplo, o óleo de fritura, a gordura do esgoto municipal e os resíduos de gordura animal (LOTERO *et al.*, 2005). Embora estas fontes possuam menor custo, razoável disponibilidade, e sua destinação para produção de biodiesel seja uma forma de reciclagem mais conveniente do que a usual, elas possuem alta concentração de AGL, alcançando níveis de até 15% p/p (LOTERO *et al.*, 2005).

No Brasil, a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), em sua resolução n<sup>0</sup> 7/2008 (ANP, 2008), define o biodiesel como sendo um combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais e gorduras animais. Nesta resolução não há limitação do processo de produção, podendo ser transesterificação metílica ou etílica e/ou esterificação.

#### Andrade, D. F.

#### 2.1.1 As especificações do biodiesel

A especificação de um combustível é um aspecto fundamental para sua adequada introdução no mercado. Deve compatibilizar e harmonizar interesses muitas vezes conflitantes, entre produtores do combustível, fabricantes de motores e de sistemas associados e órgãos ambientais.

O processo de obtenção do biodiesel se torna uma prática com muitas variáveis, uma vez que existe uma grande variedade de técnicas de produção e uma grande diversidade de oleaginosas com potencial para produzir o óleo vegetal. A complexidade destas variáveis acarreta em óleos com diferentes características, de modo que a determinação de parâmetros e normas que definam padrões de qualidade para o biodiesel obtido torna-se fundamental. Uma alta pureza do biodiesel é imprescindível, pois os contaminantes presentes no produto final podem levar a problemas operacionais severos quando utilizados em motores, incluindo a formação de depósitos no motor e entupimento do filtro (MITTELBACH et al., 1983; PLANK, LORBEER, 1995; HOLCAPEK et al., 1999). Tais contaminantes podem ser os TAG e os AGL remanescentes do óleo vegetal não transesterificado, álcool e catalisador. Outros contaminantes que permanecem no biodiesel depois da reação de transesterificação são a glicerina livre e os intermediários de reação, MAG e DAG (FOGLIA et al., 2004; KNOTHE et al., 2006). Além disso, durante a estocagem do biodiesel, alguns problemas como a absorção de umidade e oxidação podem ocorrer, aumentando as possibilidades de impurezas presentes no combustível (KNOTHE, 2006b). Altos teores de glicerina livre podem causar problemas na estocagem do biodiesel, assim como podem causar depósitos no pistão, nas válvulas e nos bicos injetores dos motores dos automóveis (KNOTHE et al., 2006).

Dentre os vários parâmetros presentes nas especificações americana (ASTM D6751, 2002), européia (EN 14214, 2003) e brasileira (ANP, 2008) do biodiesel, alguns tratam da extensão com que a reação de transesterificação foi completada ao limitar a quantidade de contaminantes permitida (KNOTHE *et al.*, 2006) **(tabela 1)**. Estes parâmetros correspondem à determinação de glicerina livre, combinada (MAG, DAG e TAG) e total (livre + combinada). No Brasil, o teor máximo de glicerina livre é de 0,02% e de glicerina total não deve ultrapassar 0,25% em massa (ANP, 2008).

**Tabela 1.** Limites de quantidade (% massa) de MAG, DAG, TAG, EsAG e glicerina livre e total no B100 por especificações americana, européia e brasileira.

Parâmetros	ASTM D 6751	EN 14214	Resolução N⁰			
	(2002)	(2003)	7 ANP (2008)			
MAG	-	≤ 0,80	anotar			
DAG	-	≤ 0,20	anotar			
TAG	-	≤ 0,20	anotar			
GL Livre	≤ 0,02	≤ 0,02	≤ 0,02			
GL Total	≤ 0,24	≤ 0,25	≤ 0,25			
Ésteres	-	≥ 96,5	≥ 96,5			

MAG- Monoacilgliceróis; DAG- Diacilgliceróis; TAG-Triacilgliceróis; GL-Glicerina.

A especificação européia (EN 14214, 2003) recomenda o uso de metanol para produção de biodiesel, entretanto as especificações brasileira (ANP, 2008) e americana (ASTM D6751, 2002) não restringem o uso de álcool etílico. O ponto principal é que a mistura de biodiesel com diesel atenda a especificação do diesel, principalmente quanto às exigências do sistema de injeção do motor, do sistema de filtragem e de exaustão. No Brasil, o órgão responsável por estabelecer padrões de comercialização, distribuição, qualidade e fiscalização de combustíveis é a ANP. Em sua resolução n<sup>0</sup> 7/2008 (ANP, 2008) ficou estabelecida a especificação do B100 a ser comercializado pelos diversos agentes econômicos em todo o território nacional. A especificação brasileira é similar à americana (ASTM D6751, 2002) e a européia (EN 14214, 2003), entretanto, apresenta algumas flexibilidades de modo a atender às características de matérias-primas nacionais (GUARIEIRO, 2006).

Ao atender as especificações, o B100 pode ser utilizado na maioria dos motores modernos, sem neles exigir qualquer modificação, nem oferecer qualquer comprometimento da durabilidade e da confiabilidade do motor. Mesmo quando utilizado em mistura com diesel de petróleo, o B100 deve atender às especificações, independentemente dos teores empregados (KNOTHE *et al.,* 2006).

Muitas são as motivações para especificar o biodiesel, tais como: a busca de sucedâneos para o óleo diesel, as pesquisas já em andamento, a proteção do consumidor e do meio ambiente. Entre as principais justificativas para a adição de biodiesel ao óleo diesel pode-se destacar: a redução da emissão de materiais particulados, o aumento da lubricidade com teores reduzidos de enxofre e o aumento do número de cetano, permitindo uma combustão mais eficiente (LIMA, 2004).

#### 2.1.2 A composição das matérias-primas

Os óleos e gorduras de origem vegetal ou animal são materiais hidrofóbicos, formados predominantemente por TAG. Os ácidos graxos (AG) que formam os TAG dos óleos e das gorduras naturais são predominantemente monocarboxílicos e possuem número par de átomos de carbono em uma cadeia linear, em decorrência da bioprodução a partir de uma unidade de acetato (via acetil-coenzima A). Os AG apresentam cadeias longas saturadas ou insaturadas, tendo, predominantemente, 12 a 26 átomos de carbono.

Como cada AG apresenta propriedades químicas distintas, o teor de cada AG é, provavelmente, o parâmetro de maior influência sobre as propriedades dos óleos vegetais e das gorduras animais de onde se originam (SRIVASTAVA, PRASAD, 2000). Os AG insaturados podem conter de uma a quatro ligações duplas na sua estrutura hidrocarbônica, sendo, portanto, mais reativos e suscetíveis à termoxidação (GIESE, 1996). Os TAG com AG insaturados expressam menor ponto de fusão, sendo então líquidos à temperatura ambiente, e constituem os óleos. Quando as cadeias são constituídas preferencialmente de AG saturados, possuem pouca reatividade química. Os TAG com AG saturados estão sob a forma sólida à temperatura ambiente e, portanto, são chamados de gorduras (GIESE, 1996; MORETTO, FETT, 1998; FARIA, LELES, IONASHIRO, 2002). A maioria dos AG de óleos comestíveis possui cadeia hidrocarbônica de 16 a 18 átomos de carbono, embora o óleo de côco apresente um alto grau de ácido láurico, com 12 átomos de carbono na sua composição (ZALIHA *et al.*, 2003).

Na **tabela 2** são apresentadas a nomenclatura, a fórmula estrutural condensada e a massa molecular (MM) de alguns AG. A **tabela 3** apresenta a composição química (% massa), em AG, de alguns óleos vegetais, baseado em dados da literatura.

Os óleos e gorduras também apresentam pequenas quantidades de componentes não-glicerídeos (menos de 5% nos óleos vegetais brutos e menos de 2% nos refinados) (MORETTO, FEET, 1998). Alguns exemplos destes componentes são os fosfatídeos (lecitinas, cefalinas, fosfatidil inositol), esteróis (estigmasterol), ceras (palmitato de cetila), hidrocarbonetos insolúveis (esqualeno), carotenóides, clorofila, tocoferóis (vitamina E), lactonas e metilcetonas (FARIA, LELES, IONASHIRO, 2002).

#### Andrade, D. F.

11

 Tabela 2.
 Nomenclatura, fórmula estrutural condensada e MM de alguns AG constituintes predominantes de TAG em óleos e gorduras

 naturais (adaptado de SRIVASTAVA, PRASAD, 2000; SAAD, 2005).

Ácido graxo	o Nomenclatura N		Fórmula Estrutural	MM
			Condensada	
Láurico	Ácido Dodecanóico	12:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH	200
Lauroleico	Ácido c-5-Dodecenóico	12:1 (Δ <sup>5</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	198
Lindérico	Ácido c-4-Dodecenóico	12:1 (Δ <sup>4</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	198
Mirístico	Ácido Tetradecanóico	14:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COOH	228
Miristoleico	Ácido c-9-Tetradecenóico	14:1 (Δ <sup>9</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	226
Tsuzuico	Ácido c-4-Tetradecenóico	14:1 (Δ <sup>4</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	226
Palmítico	Ácido Hexadecanóico	16:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH	256
Palmitoleico	Ácido c-9-Hexadecenóico	16:1 (Δ <sup>9</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	254
Esteárico	Ácido Octadecanóico	18:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH	284
Petroselínico	Ácido c-6-Octadecenóico	18:1 (Δ <sup>6</sup> )	$CH_3(CH_2)_{10}CH=CH(CH_2)_4COOH$	282
Oleico	Ácido c-9-Octadecenóico	18:1 (Δ <sup>9</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	282
Eládico	Ácido t-9-Octadecenóico	18:1 (Δ <sup>9</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	282

 Tabela 2.
 Nomenclatura, fórmula estrutural condensada e MM de alguns AG constituintes predominantes de TAG em óleos e gorduras

 naturais (adaptado de SRIVASTAVA, PRASAD, 2000; SAAD, 2005) (Cont.).

Ácido graxo	Nomenclatura	NC:NLD	Fórmula Estrutural Condensada	MM
Vaccênico	Ácido c-11-Octadecenóico	18:1 (Δ <sup>11</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	282
Linoleico	Ácido c-9, c-12-Octadecadienóico	18:2 (Δ <sup>9,12</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH=CHCH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	280
Linolênico	Ácido c-9, c-12, c-15-Octadecatrienóico	18:3 (Δ <sup>9,12,15</sup> )	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH	278
Ricinoleico	Ácido 12-Hidroxi-9-Octadecenóico	12 OH 18:1 (Δ <sup>9</sup> )	$CH_3(CH_2)_5CH(OH)CH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$	298
Araquídico	Ácido Eicosanóico	20:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> COOH	312
Gadoleico	Ácido c-9-Eicosenóico	20:1 (Δ <sup>9</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH	310
Gadóico	Ácido c-11-Eicosenóico	20:1 (Δ <sup>11</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	310
Araquidônico	Ácido <i>c</i> -5, <i>c</i> -8, <i>c</i> -11, <i>c</i> -14-	20:4 (Δ <sup>5,8,11,14</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	304
	Eicosatetraenóico			
Behênico	Ácido Docosanóico	22:0	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	340
Cetoleico	Ácido c-11-Docosenóico	22:1 (Δ <sup>11</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH	338
Erúcico	Ácido c-13-Docosenóico	22:1 (Δ <sup>13</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> COOH	338
Lignocérico	Ácido Tetracosanóico	24:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>22</sub> COOH	369
Nervônico	Ácido c-15-Tetracosenóico	24:1 (Δ <sup>15</sup> )	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> COOH	367
Cerótico	Ácido Hexacosanóico	26:0	$CH_3(CH_2)_{24}COOH$	397

NC- Número de carbono total; NLD-Número de ligações duplas; ( $\Delta^n$ )-Posição da ligação dupla.

SATURADOS							INSATURADOS								
Óleo Vegetal	C <14	C 14:0	C 16:0	C 18:0	C 20:0	C 22:0	C 24:0	C 16:1 (Δ <sup>9</sup> )	C 18:1 (Δ <sup>9</sup> )	C 18:2 (Δ <sup>9,12</sup> )	C 18:3 (Δ <sup>9,12,15</sup> )	C 18:1 (Δ <sup>9</sup> ) 12 OH	C 20:1 (Δ <sup>9</sup> )	C 22:1 (Δ <sup>13</sup> )	C 24:1 (Δ <sup>15</sup> )
Algodão	< 0,1	< 2,0	17,0 – 31,0	0,9 - 4,0	< 0,7	< 0,5	< 0,5	< 2,0	13,0 - 44,0	33,0 - 59,0	< 2,1	-	< 0,5	< 0,5	-
Canola	< 0,1	< 0,2	1,5 – 6,5	0,5 – 3,1	< 3,0	< 2,0	< 2,0	< 3,0	8,0 - 70,0	9,0 - 30,0	5,0 - 13,0	-	0,1 – 15,0	< 2,0	< 3,0
Girassol	< 0,4	< 0,5	3,0 - 10,0	1,0 – 10,0	< 1,5	< 1,3	< 0,5	< 1,0	13,0 – 40,0	48,0 - 75,0	< 0,3	-	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Milho	< 0,3	< 2,0	6,0 - 14,0	0,5 – 5,0	< 1,0	< 0,5	< 0,5	< 0,5	24,0 - 49,0	6,0 - 62,0	< 2,0	-	< 0,5	-	-
Soja	< 0,1	< 0,5	6,0 - 14,0	1,4 – 5,5	< 1,0	< 0,7	< 0,4	< 0,5	18,0 – 30,0	44,0 - 64,0	4,0 - 11,0	-	< 1,0	-	-
Palma	< 0,4	0,5 – 2,0	35,0 - 47,0	3,5 – 6,5	< 1,0	-	-	< 0,6	36,0 - 47,0	6,5 – 15,0	< 0,5	-	-	-	-
Mamona	-	-	0,1 – 2,0	0,9 – 3,1	-	2,1	-	< 3,0	2,8 - 6,0	1,2 – 5,0	< 0,5	84,0 - 91,0	-	-	-
Linhaça	-	-	4,0 - 7,0	2,0 - 4,0	-	-	-	< 0,3	13,0 – 40,0	17,5 – 40,0	25,0 - 60,7	-	-	-	-
Dendê	46,9	14,1	8,8 - 44,0	1,3 – 5,0	-	-	-	-	18,5 – 44,0	0,7 - 10	-	-	-	-	-
Colza	-	-	2,0-4,0	0,8 – 2,0	0,5 – 1,0	0,5 – 2,0	< 0,5	-	52,0 - 66,0	17,0 – 25,0	8,0 - 11,0	-	-	-	-

Tabela 3. Composição química, em ácidos graxos (% massa), de alguns óleos vegetais.

Baseado em dados de ANVISA, 1999; MA, HANNA, 1999; SRIVASTAVA, PRASAD, 2000; COSTA NETO et al., 2000; DEMIRBAS, 2003; DMYTRYSHYN et al., 2004; PINTO et al., 2005; GUARIEIRO, 2006 e CONCEIÇÃO et al., 2007.
## 2.2 Métodos empregados na análise de biodiesel e no monitoramento da reação de transesterificação

Várias técnicas cromatográficas têm sido aplicadas para a análise de biodiesel e/ou acompanhamento da reação de transesterificação, incluindo cromatografia em camada fina (CCF) (SHAH *et al.*, 2004; STAVARACHE *et al.*, 2005), CG (STAVARACHE *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2008), CLAE (CUNHA, OLIVEIRA, 2006; KALO *et al.*, 2006; STAVARACHE *et al.*, 2007; TÜRKAN, KALAY, 2006), cromatografia de permeação em gel (MADRAS *et al.*, 2004; DMYTRYSHYN *et al.*, 2004), cromatografia de exclusão por tamanho (ZAGONEL *et al.*, 2004; ARZAMENDI *et al.*, 2006), cromatografia supercrítica (SANDRA *et al.*, 2002), e eletrocromatografia capilar.

Várias técnicas espectroscópicas também vêm sendo descritas para a análise de biodiesel: a RMN <sup>1</sup>H (GELBARD *et al.*, 1995; NETO *et al.*, 2004; GHESTI *et al.*, 2007; MORGENSTERN *et al.*, 2006; KNOTHE, 2000; JIN *et al.*, 2007; KNOTHE, 2006), a ressonância magnética nuclear de carbono (RMN <sup>13</sup>C) (DIMMIG *et al.*, 1999), a espectroscopia de infravermelho próximo (KNOTHE, 1999; KNOTHE, 2000; KNOTHE *et al.*, 2006) e por transformada de Fourier (ZAGONEL *et al.*, 2004; TREVISAN *et al.*, 2008) e a espectroscopia Raman (GHESTI *et al.*, 2007). O método mais adequado pode depender das necessidades do usuário. A análise de custo, qualidade e duração, incluindo o possível pré-tratamento da amostra, são aspectos muito importantes para se fazer a seleção final (MEHER *et al.*, 2006). Revisões apontam que os métodos cromatográficos são os mais utilizados na análise de biodiesel (PINTO *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2008; MURUGESAN *et al.*, 2009; ENWEREMADU, MBARAWA, 2009). Abordaremos a seguir a aplicação dos métodos de CLAE, CLAE-CG e RMN <sup>1</sup>H, na análise de biodiesel.

#### 2.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Nas análises por CLAE, procedimentos demorados e dispendiosos de derivatização no preparo da amostra não são usualmente necessários. Na CLAE, a baixa temperatura durante a análise permite a quantificação de componentes de baixa volatilidade (NETO, NUNES, 2003) e reduz o risco de isomerização das ligações duplas das cadeias carbônicas (CZAUDERNA, KOWALCZYK, 2001; LI *et. al.*, 2001).

A **tabela 4** apresenta algumas condições operacionais descritas na literatura para a análise de biodiesel e/ou da glicerina combinada (MAG, DAG e TAG) por CLAE.

Semporé e Bézard, em 1992, aplicaram a CLAE em fase reversa (CLAE-FR) para a separação de misturas complexas de MAG. Diferentes proporções entre acetonitrila e água foram moduladas e os MAG foram analisados sem derivatização. Os MAG foram separados de acordo com o tamanho da cadeia e o grau de insaturação (G<sub>1</sub>). As áreas dos picos foram representativas das quantidades de MAG detectados (SEMPORÉ, BÉZARD, 1992). Em 1996, Marcato e Cecchin também empregaram a CLAE-FR, com detector evaporativo de espalhamento de luz (DEEL), para a análise simultânea de AGL, MAG, DAG, TAG e glicerina. Todas as classes de compostos analisadas foram separadas em uma simples corrida de 25 min. O método demonstrou ser altamente sensível e seletivo, sendo capaz de separar também os isômeros de posição (MARCATO, CECCHIN, 1996).

Fase Estacionária	L (mm)	d.i. (mm)	d.p. (µm)	Vazão (mL/min)	Fase móvel	Gradiente de eluição	Temp. Coluna (⁰C)	Detector	Classes Separadas	Referência
LiChrospher 100 CH-18	250	4,0	4	1,0 ou 1,2	ACN:H <sub>2</sub> O (80:20, 85:15, 90:10 ou 95:5)	Isocrática	20	DRD	MAG	SEMPORE, BEZARD, 1992
LiChrospher 100 FR-8	250	4,0	5	1,3	H <sub>2</sub> O: ácido acético (99,9:0,1) (A) ACN (B) Cloreto de metileno (C)	16% A + 84% B (0 min) 100% B (4 min) 70% B + 30% C (12 min) 70% B + 30% C (18 min) 16% A + 84% B (19 min) 16% A + 84% B (25 min)	40	DEEL (27ºC)	GL, AGL, MAG, DAG, TAG (30)	MARCATO, CECCHIN, 1996
Cianopropil	250	4,6	-	1,0	<i>n</i> -Hex + 0,4% de ácido acético (A) MTBE+ 0,4% de ácido acético (B)	100% A (0 min) 100% A (5min) 20% A (15min) 20% A (17min) 100% A (17,1min) 100% A (27min)	-	DEEL	TAG,DAG, MAG, EsMAG, AGL	FOGLIA, JONES, 1997
UltraSphere ODS	250	4,6	5	1,0	MeOH (A) 2-PrOH (B)	100% A (0 min) 100% B (40 min)	-	UV (205 nm) e DEEL	TAG, DAG (45)	LIN, WOODRUFF, MCKEON, 1997
					MeOH (A) 2-PrOH (B)	100% A (0 min) 50% A (40 min)			TAG, DAG (11)	
Spherisorb ODS (2 em série)	250	4,6	5	0,7	ACT:ACN (50:50)	isocrática	35	DRD	EsMAG, MAG, DAG, TAG	NOUREDDINI, ZHU,1997

**Tabela 4.** Condições operacionais descritas na literatura para a análise de biodiesel e/ou da glicerina combinada por CLAE.

Fase Estacionária	L (mm)	d.i. (mm)	d.p. (µm)	Vazão (mL/min)	Fase móvel	Gradiente de eluição	Temp. Coluna (⁰C)	Detector	Classes Separadas	Referência
Separon SGX ODS	150	3,0	7	1,0	MeOH (A) 2-PrOH:n-Hex (5:4) (B)	0 % B (0 min.) 50% B (15 min.)	40	UV (205 nm),	TAG (8), EsMAG (4)	HOLCAPEK et al., 1999
					H <sub>2</sub> O (A) ACN (B) 2-PrOH:n-Hex (5:4) (C)	30% A + 70% B (0min.) 100% B (10 min.) 50% B + 50% C (20 min.) 50% B + 50% C (25 min.)		DEEL, EM-IQPA	TAG (8), DAG (10), MAG (6), EsMAG (4), AGL (3)	
STR ODS-II	250	4,6	-	1,0	MeOH	isocrática	40	DRD	TAG, EsMAG	KUSDIANA, SAKA, 2001
ODS	150	3,0	7	-	ACN:H2O (80:20) (A), ACN (B), n-Hex:2-PrOH (40:50) (C)	100% A (0 a 2 min.) 100% B (2 a 12 min.) 50% B + 50% C (12 a 22 min.) 50% B + 50% C (22 a 29 min.) 100% B (29 a 30 min.) 100% B (30 a 32 min.) 100% A (32 a 33 min.)	-	UV (205 nm)	TAG, DAG, MAG, EsMAG	KOMERS <i>et</i> <i>al.</i> , 2001
Separon SGX ODS	150	3,0	7	1,0	MeOH (A) 2-PrOH: <i>n</i> -Hex (5:4) (B)	0% B (0 min) 50% B (15 min)	40	EM	TAG (8), EsMAG (4)	HOLCAPEK et al., 2001
NovaPack ODS, (2 em série)					ACN:H <sub>2</sub> O (7:3) (A) ACN (B) 2-PrOH:ACN (6:4) (C)	100% A (0 min) 100% B (20 min) 100% B (21 a 36min) 100% C (37 a 132 min)			TAG (17), DAG (11), MAG (5), EsMAG (4)	

Tabela 4. Condições operacionais descritas na literatura para a análise de biodiesel e/ou da glicerina combinada por CLAE (Cont.).

Fase Estacionária	L (mm)	d.i. (mm)	d.p. (µm)	Vazão (mL/min)	Fase móvel	Gradiente de eluição	Temp. Coluna (⁰C)	Detector	Classes Separadas	Referência
NovaPack ODS, (2 em série)	150	3,9	7	1,0	ACN:H2O (7:3) (A) ACN (B) 2-PrOH:ACN (6:4) (C)	100% A (0 min) 100% B (20min) 100% B (21 a 36min) 100% C (37 a 132 min) 100% A (135min)	40	UV (205 nm)	TAG (20), DAG (11), MAG (6), EsMAG (4)	HOLCAPEK et al., 2003
LiChroCART FR-ODS	250	4,0	-	1,0	MeOH (A) 2-PrOH: <i>n</i> -Hex (5:4) (B)	100% A (0 min) 50% A + 50% B (30 min)	-	UV (205 nm)	TAG, DAG, MAG, EsMAG	CHEN, WU, 2003
Kromasil 100 ODS	250	4,6	5	1,0	ACT (A) ACN (B)	30% B (0 min) 25% B (20 min) 20% B (35 min) 20% B (36 a 55 min) 30% B (56 a 58 min)	ambiente	DEEL (40 <sup>°</sup> C)	TAG (6)	CUNHA, OLIVEIRA, 2006
Cadenza CD- ODS	250	3,0	4	0,5	ACT:ACN (70:30)	isocrática	-	DRD	EsMAG, MAG, DAG, TAG, GL	STAVARACHE <i>et al.,</i> 2007
FR-ODS	250	4,6	5	1,3	ACN:MeOH (4:1) (A) 2-PrOH: <i>n</i> -Hex (5:8) (B)	100% A (0 a 2,22 min) 34% A + 66% B (25,5 a 30 min)	30	UV (210 nm)	TAG (8), DAG (6), MAG (6), FsMAG (2)	DI NICOLA et al.,2008

Tabela 4. Condições operacionais descritas na literatura para a análise de biodiesel e/ou da glicerina combinada por CLAE (Cont.).

L- tamanho da coluna; d.i.- diâmetro interno; d.p.- diâmetro da partícula; ODS- Octadecilsilano; ACN- acetonitrila; DRD- Detector por refratometria diferencial; MAG-Monoacligliceróis; FR- Fase reversa; DEEL- Detector evaporativo de espalhamento de luz; GL- glicerina; AGL- ácidos graxos livres; DAG- Diacilgliceróis; TAG – Triacilgliceróis; n-Hex-n- hexano; DIC- Detector por ionização de chama; MTBE- Metil-t-butil éter; EsMAG – Ésteres metílicos de ácidos graxos; MeOH- metanol; 2-PrOH- 2-propanol; UV-Ultravioleta; ACT- acetona; EM-IE- Espectrometria de massas por ionização "electrospray"; EM-IQPA- Espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica; ALC- ácido linoléico conjugado.

A CLAE-FR foi empregada por Holcapek et al. (1999) para a separação de TAG, DAG, MAG e EsMAG dos ácidos oleico, linoleico e linolênico, assim como os AGL, em 25 min, usando um gradiente linear constituído de água, acetonitrila e uma mistura de 2propanol: n-hexano (5:4). Já em 2001, Holcapek, Jandera e Fischer empregaram a CLAE-FR, com duas colunas NovaPak com fase octadecilsilano (ODS) em série, para a separação de TAG, DAG, MAG e EsMAG com o mesmo número de carbono equivalente (NCE). Os autores revisaram o método da CLAE com detector por espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica (EM-IQPA) quanto à sua aplicabilidade para a análise de acilgliceróis e de EsMAG. Foram empregados diferentes métodos de detecção: detector de absorção no ultravioleta (UV) a 205 nm, o DEEL e o detector por EM-IQPA, no modo de íons-positivos. A sensibilidade e a linearidade dos vários detectores (UV a 205 nm, DEEL e por EM) foram comparadas. Todos os componentes individuais da amostra foram identificados usando o detector por EM-IQPA. A determinação de TAG com diferentes NCE foi possível usando o detector de absorção no UV a 205 nm, o DEEL e o detector por EM-IQPA. Este estudo demonstrou que a sensibilidade do DEEL e do detector por EM-IQPA diminuiu em decorrência do aumento do NLD nos EsMAG, enquanto que a detecção UV não permitiu a quantificação de AG saturados (HOLCAPEK et al., 2001).

Komers *et al.*(2001) aplicaram a CLAE-FR para a quantificação de MAG, DAG, TAG e EsMAG presentes na metanólise do óleo de colza (KOMERS *et al.,* 2001). Em 2003, Holcapek *et al.* empregaram a CLAE-FR para a separação de TAG, DAG, MAG e EsMAG com o mesmo NCE, fornecendo informações detalhadas sobre a composição de acilgliceróis na amostra analisada. A separação de alguns TAG com NCE semelhantes foi possível, conforme observado na separação dos pares de: dilinoleoil-oleoil-glicerol (OLL) e dioleoil-linoleoil-glicerol (OOLn) de NCE 44, trilinoleína (LLL) e oleoil-linoleoil-linolenoilglicerol (OLLn) de NCE 42, dilinoleoil-linolenoil-glicerol (LLLn) e dilinolenoil-oleoil-glicerol (OLnLn) de NCE 40. A separação de TAG com os mesmos NCE também foi possível para o grupo da trioleína (OOO), dioleoil-gadoleoil-glicerol (OOG), dioleil-palmitil-glicerol (OOP), oleil-dipalmitil-glicerol (OPP) e tripalmitina (PPP) de NCE 48 (HOLCAPEK *et al.*, 2003).

A CLAE-FR torna possível a análise direta (sem derivatização) de todos os componentes graxos do biodiesel (EsMAG, TAG, DAG e MAG). O detector por espectrofotometria UV é o mais utilizado em CLAE. Entretanto, como os acilgliceróis e os EsMAG não absorvem em comprimentos de onda maiores que 220 nm, a detecção UV somente é possível em comprimentos de onda muito baixos, sendo necessário o uso de solventes transparentes na região de 200 a 220 nm e com alto grau de pureza (HOLCAPEK *et al.*,1999; HOLCAPEK *et al.*, 2001; HÉRON, TCHAPLA, 1999). Por outro lado, a detecção UV a 205-210 nm pode fornecer curvas de calibração lineares e com sensibilidade elevada (GEERAERT, DESCHEPPER, 1983).

A CLAE-FRNA vem sendo largamente usada para a separação de amostras complexas de TAG naturais. Esta técnica tem utilizado os modos de eluição isocrático (STOLYHWO *et al.*, 1985; HÉRON, TCHAPLA, 1994; HÉRON, LESELLIER, TCHAPLA,1995) e gradiente (BYRDWELL, EMKEN, 1995; NEFF, BYRDWELL, 1995; LIN, WOODRUFF, MCKEON, 1997).

A CLAE-FRNA com acetonitrila-diclorometano (68:32, v/v) permitiu a distinção entre os TAG com semelhantes MM e diferentes NCE como, por exemplo, trilinoleína (LLL) versus oleoil-linoleoil-linolenoil-glicerol (OLL<sub>n</sub>) (HÉRON, LESELLIER, TCHAPLA,1995). Em 1997, a CLAE-FRNA foi empregada para a análise de classes lipídicas neutras (TAG e DAG sintéticos) (LIN, WOODRUFF, MCKEON, 1997). Neste mesmo ano, Noureddini e

Zhu, também empregaram a CLAE-FRNA, com detector por refratometria diferencial (DRD), para o estudo da cinética de transesterificação do óleo de soja com metanol (NOUREDDINE, ZHU, 1997).

Holcapek *et al.* (1999) utilizaram a CLAE-FRNA para o monitoramento da conversão de TAG do óleo de colza em EsMAG e para a determinação quantitativa de TAG com diferentes NCE. O NCE é definido como o número de carbono total (NC) em todas as cadeias acil do acilglicerol menos duas vezes o número de ligações duplas (NLD), NCE= NC -  $2 \times$  NLD. Os resultados mostraram que os TAG com os mesmos valores de NCE coeluem com coluna Separon SGX ODS.

Kusdiana e Saka, em 2001, aplicaram a CLAE-FRNA para estudar a cinética de transesterificação do óleo de colza com metanol supercrítico. Os picos foram identificados através da comparação entre o tempo de retenção ( $t_R$ ) da amostra e da substância padrão, conforme descrito no estudo de Saka e Dadan (2001).

Em 2003, Cheng e Wu aplicaram o método da CLAE-FRNA, adaptado de Holcapek *et al.* (1999), para a determinação do teor de EsMAG, em misturas reacionais obtidas pela metanólise do óleo de soja. A utilização de metanol e 2-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v), como fase móvel foi descrita nos trabalhos de Holcapek *et al.* (1999 e 2001) apenas para a separação de TAG e EsMAG. No entanto, a adaptação realizada permitiu a separação de EsMAG, MAG, DAG e TAG (CHENG, WU, 2003).

Cunha e Oliveira (2006) aplicaram a CLAE-FRNA com DEEL para a análise de óleos vegetais de diferentes origens (algodão, milho, amendoim, soja, avelã, noz, gergelim e oliva). Neste estudo quinze picos foram separados e identificados (CUNHA, OLIVEIRA, 2006). Em 2008, Di Nicola *et al.* descreveram o desenvolvimento e a otimização de um método para a análise de EsMAG e de glicerina combinada por CLAE-FRNA, usando um gradiente binário com detecção UV.

Vários detectores vêm sendo empregados para a análise de biodiesel por CLAE: Ultravioleta (UV) (LIN, WOODRUFF, MCKEON, 1997; ADLOF, LIST, 2004; TÜRKAN, KALAY, 2006), por índice de refração (GEERAERT, DESCHEPPER, 1983; SEMPORE, BEZARD, 1986; FLOR et al., 1993; ARZAMENDI et al., 2006), DEEL (HÉRON, TCHAPLA, 1994; HÉRON et al., 1995; MARCATO, CECCHIN, 1996; FOGLIA, JONES, 1997), "moving wire" (AIZETMÜLLER, 1997; HOLCAPEK et al., 1999), por densidade (TRATHNIGG, MITTELBACH, 1990; AIZETMÜLLER, 1997), por ionização de chama (FLOR et al., 1993; ADLOF, 1996) e por espectrometria de massas (EM) (BYRDWELL, EMKEN, 1995; NEFF, BYRDWELL, 1995; HOLCAPEK et al., 2003; MADL, MITTELBACH, 2005; KALO et al., 2006).

A CLAE pode ser acoplada com sucesso a EM, seja por IQPA (EM-IQPA) (LAAKSO, VOUTILAINEN, 1996) ou por ionização "Electrospray" (EM-IE) (SCHUYL *et al.,* 1998). A IQPA é a técnica de ionização mais frequentemente usada para a análise de TAG por CLAE-EM (NEFF, BYRDWELL, 1998; BYRDWELL, 2001; NEFF, BYRDWELL, LIST, 2001; HOLCAPEK *et al.,* 2001; NEFF *et al.,* 2002). O detector por EM fornece importantes informações sobre a estrutura do analito (BYRDWELL, EMKEN, 1995; NEFF, BYRDWELL, 1995) e proporciona a identificação dos acilgliceróis individuais sem a necessidade de padrões de referência autênticos.

O DEEL é um detector universal que apresenta uma vantagem significativa quando comparado ao detector UV. O DEEL é largamente empregado na análise de compostos que absorvem pouco na região UV (HÉRON, TCHAPLA, 1994; HÉRON *et al.,* 1995; FOGLIA, JONES, 1997), tais como, hidrocarbonetos saturados, glicídeos, esteróides,

surfactantes ou MAG, DAG e TAG (HÉRON, TCHAPLA, 1999). No entanto, usando condições convencionais por CLAE, a desvantagem de usar o DEEL, para uma análise quantitativa, vem da relação não linear observada entre a área do pico e a da massa de amostra injetada. Ou seja, a resposta do DEEL fornece curvas de resposta sigmoidal, sendo apenas uma pequena parcela linear (HERSLÖF, KINDMARK, 1985; HÉRON, TCHAPLA, 1999).

Cada técnica de detecção apresenta vantagens e desvantagens. A não quantificação de compostos saturados é considerada a principal desvantagem da detecção UV (HOLCAPEK *et al.*, 1999). Por outro lado, dependendo do solvente, a detecção UV é compatível com eluição por gradiente, contrastando à detecção por índice de refração que só é compatível com eluição isocrática.

#### 2.2.2 CLAE-CG

Em 1995, Bosque et al. empregaram a combinação da CLAE e da CG para a identificação e guantificação de EsMAG de óleo de colza incorporados ao diesel. Lechner et al., em 1997, empregaram a CLAE-CG para a determinação de MAG, DAG e TAG em EsMAG. Os grupos hidroxílicos livres dos MAG, DAG e TAG foram acetilados e separados CLAE UV em fase normal, com detecção а 220nm. Usando nhexano:diclorometano:acetonitrila, na razão 79,97:20,00:0,03 v/v/v, como fase móvel e uma vazão de 200 µL/min, os EsMAG, esteróis livres e esteróis esterificados foram eluídos através da coluna de sílica gel, enguanto os MAG, DAG e TAG ficaram retidos. Após eluição dos EsMAG, os acilgliceróis foram eluídos e analisados por CG, usando detector por ionização de chama (DIC), em uma coluna de 10 m de comprimento e 0,32 mm de

24

diâmetro interno, com filme de 5%-difenil-dimetilpolisiloxano. O tempo de corrida cromatográfica foi de 52 min (LECHNER *et al.*, 1997).

A CLAE-CG também foi aplicada para a análise de esteróis no biodiesel (PLANK, LORBEER, 1994; PLANK, LORBEER, 1994a). Plank e Lorbeer, em 1994, empregaram um sistema CLAE-CG em linha para a análise de esteróis em produtos de transesterificação dos óleos de colza, soja, girassol, girassol rico em ácido oléico, e óleos de frituras. Os esteróis foram silanizados com *N*-metil-*N*-trimetil-silil-trifluoroacetamida (MSTFA) antes da análise. Os EsMAG foram separados dos esteróis, por CLAE, com *n*-hexano:cloreto de metileno:acetonitrila, na razão de 79,9:20,0:0,1 v/v/v (PLANK, LORBEER, 1994a). A CG-DIC foi realizada em uma coluna de 12 m de comprimento, com filme de 5% fenilmetilpolisiloxano. A concentração total de esteróis livres foi de 0,20-0,35% (m/m) para as cinco amostras, enquanto que os ésteres de esterol foram detectados na faixa de 0,15-0,73% (m/m). O método hifenado foi recomendado pelas informações adicionais que proporcionaram menor tempo de análise e boa reprodutibilidade sobre a amostra (PLANK, LORBEER, 1994a).

#### 2.2.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

A RMN tornou-se o principal instrumento de avaliação de óleos (AZEREDO *et al.,* 2003) e vem sendo aplicada para a determinação do índice de iodo (I.I.) (REDA, 2004; MIYAKE, YOKOMIZO, MATSUZAKI, 1998), da composição de AG (MIYAKE, YOKOMIZO, MATSUZAKI, 1998), da composição de AG (MIYAKE, YOKOMIZO, MATSUZAKI, 1998), do G<sub>1</sub> de AG em óleos e EsMAG (MORGENSTERN *et al.,*2006), assim como na análise de óleos vegetais (SACCO *et al.,* 2000; GUILLÉN, RUIZ, 2003b) e na determinação quantitativa da insaturação e da MM

média em gorduras naturais (JOHNSON, SHOOLERY, 1962). A aplicação da RMN <sup>1</sup>H também vem sendo descrita na literatura para a determinação de AG insaturados (KNOTHE, KENAR, 2004) e para a avaliação da oxidação do biodiesel (KNOTHE, 2006).

A RMN <sup>1</sup>H é uma técnica espectroscópica amplamente utilizada em estudos de monitoramento da reação de transesterificação de óleos/gorduras e na verificação da pureza do biodiesel (GELBARD *et al.*, 1995; KNOTHE, 2000; COSTA NETO *et al.*, 2004; GHESTI *et al.*, 2007).

Gelbard *et al.* (1995) empregaram a espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H para a determinação do rendimento da reação de transesterificação de TAG em EsMAG. Para monitorar o rendimento da reação foram utilizados os valores das integrações dos hidrogênios da metoxila dos EsMAG e dos hidrogênios metilênicos em posição  $\alpha$ - à carbonila.

Em 2000, Knothe propôs uma nova expressão para a determinação da conversão de óleos vegetais em biodiesel. Os sinais de 4,1-4,4, 3,7 e 2,3 ppm são utilizados para determinação do rendimento da reação de transesterificação (KNOTHE, 2000; KNOTHE, 2001; KNOTHE *et al.*, 2006).

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios dos TAG (a exemplo do oleoillinoleoil-linolenoil-glicerol) e dos EsMAG encontram-se apresentados na **figura 2**.



**Figura 2.** Deslocamentos químicos dos hidrogênios dos TAG (a exemplo do oleoil-linoleoillinolenoil-glicerol) e EsMAG (R representando cadeias alifáticas).

#### 2.3 Separação das classes químicas por extração em fase sólida

A EFS é uma técnica muito aplicada para o tratamento de amostras, visto que permite não só a extração eficiente dos analitos, mas possibilita sua concentração e/ou pré-purificação. O emprego da EFS na análise de diferentes classes lipídicas vem sendo descrito em vários trabalhos da literatura (KALUZNY *et al.*, 1985; KIM, SALEM, 1990; BODENNEC *et al.*, 2000; GIACOMETTI, MILOSEVIC, MILIN, 2002; AKESSON-NILSON, 2003; PÉREZ-PALACIOS, RUIZ, ANTEQUERA, 2007).

A aplicação da EFS para a separação e isolamento de compostos lipídicos neutros e polares vêm sendo descrita na literatura usando cartuchos de fase sílica (NASH, FRANKEL, 1986; NEFF, ZEITOUN, WEISLEDER,1992) e de fase aminopropilsilano (KALUZNY *et al.*, 1985; HOPIA *et al.*,1992; EBELER, SHIBAMOTO, 1994; EBELER, EBELER, 1996; BODENNEC *et al.*, 2000). Estes cartuchos também vêm sendo empregados para a separação de ésteres etílicos de AG (BERNHARDT *et al.*, 1996), para a recuperação de algumas classes fosfolipídicas (CAESAR *et al.*, 1988; KIM, SALEM, 1990; SUZUKI *et al.*, 1997; HEMMING, HAWTHORNE, 1999), para a separação de éster colesteril, TAG, AG não esterificados e frações fosfolipídicas (HOVING *et al.*, 1998; AGREN, JILKUNEN, PENTTILA,1992) e para a determinação de AG presentes em diferentes classes lipídicas (GIACOMETTI, MILOSEVIC, MILIN, 2002).

Em 1985, Kaluzny et al. descreveram um método rápido para a separação de classes lipídicas usando a técnica da EFS. Empregou-se um sistema de eluição com fase estacionária aminopropilsilano (500 mg, 3 mL, Bond Elut). Foram empregados três cartuchos previamente lavados com n-hexano. O extrato lipídico, contendo TAG, DAG, MAG, éster colesteril, colesterol, AGL e fosfolipídeos, foi dissolvido em clorofórmio e aplicado no cartucho 1. Os lipídeos neutros (TAG, DAG, MAG, éster colesteril e colesterol) foram eluídos com clorofórmio: i-propanol (2:1, v/v). Os AGL e os fosfolipídeos que ficaram foram eluídos com 2% de ácido acético em éter dietílico e metanol, respectivamente. A fração contendo os lipídeos neutros foi seca sob nitrogênio, redissolvida em n-hexano e então reaplicada no cartucho 2. Os ésteres de colesterol foram eluídos com n-hexano e os TAG, DAG, MAG e colesterol ficaram retidos no cartucho 2. Este cartucho foi então conectado ao cartucho 3 e a mistura de n-hexano com 1% éter dietílico e 10% cloreto de metileno foi empregada para a eluição dos TAG. Nesta condição também foi eluído 10% de colesterol. Desta forma ao final desta etapa ficaram retidos no cartucho 2, aproximadamente 90% de colesterol, DAG e MAG e no cartucho 3 apenas 10% de colesterol. O colesterol retido no cartucho 3 (10%) e no cartucho 2 (90%) foram eluídos com 5% de acetato de etila em n-hexano. Após eluição do colesterol ficaram retidos no cartucho 2 apenas os DAG e MAG, estes por sua vez foram eluídos com 15% de acetato

de etila em *n*-hexano e clorofórmio:metanol (2:1, v/v), respectivamente. Os resultados de recuperação apresentados neste estudo demonstram a eficiência da EFS na separação e isolamento das classes lipídicas. Os lipídeos polares como os AGL ou fosfolipídeos, ou aqueles que apresentam um grupo polar (como os MAG, DAG e colesterol), são provavelmente os que interagem mais fortemente com o grupamento da fase estacionária na EFS, através de ligações hidrogênio. Desta forma, a separação mais difícil de ser realizada foi entre colesterol e DAG, ambos tendo um grupo hidroxila livre (KALUZNY *et al.,* 1985).

Hamilton e Comai, em 1988, descreveram um método rápido para a separação de lipídeos neutros, AGL e classes de lipídeos polares. Combinações dos solventes *n*-hexano e metil *t*-butil éter foram empregados para eluição progressiva dos ésteres de colesterol e os TAG. A recuperação foi superior a 96%.

Em 1996, Márquez-Ruiz *et al.* desenvolveram um método simples e rápido para a determinação de compostos polares em óleos e gorduras, usando a monoestearina como padrão interno. Os compostos polares foram separados dos não-polares através da EFS com cartucho de sílica. Os compostos não polares foram eluídos com uma mistura de éter de petróleo:éter dietílico (90:10, v/v), enquanto os compostos polares e o padrão interno foram eluídos com éter dietílico. As frações foram dissolvidas em tetrahidrofurano (THF) para análise por CCF e por cromatografia de exclusão por tamanho de alta eficiência.

Perez-Camino, Moreda e Cert, em 1996, descreveram um método para a determinação de isômeros dos DAG em óleos vegetais por EFS seguida pela análise por CG. Este método é fácil, rápido e reprodutível, permitindo a quantificação e separação de DAG de acordo com o NC, a estrutura isomérica (1,2 e 1,3) e o G<sub>I</sub>. O efeito da insaturação

na retenção dos DAG depende do número e da localização das ligações duplas na molécula.

Em 1998, Pinkart, Devereux e Chapman desenvolveram um método rápido para a separação de classes lipídicas comumente encontradas em microorganismos. Este método é baseado no uso de cartuchos de EFS com fase estacionária aminopropilsilano, para separação de diferentes classes lipídicas (polihidroxialcanoatos, fosfolipídeos, esteróis, TAG, DAG, MAG e ésteres estéril). A recuperação de todas as classes lipídicas, com exceção dos polihidroxialcanoatos e esteróis, foi de 91 a 99%.

Em 2003, Akesson-Nilsson aplicou o método modificado de Kaluzny *et al.* (1985) para a separação e o isolamento de EsMAG clorados e não clorados em cultura de células e em lipídeos presentes em peixes. A recuperação destas classes de substâncias foi quantificada, respectivamente por CG-EM e CG-DRX (difração de raios X) (AKESSON-NILSON, 2003). Os EsMAG saturados (C18:0 e C16:0), mono-insaturados (C18:1) e di-insaturados (C18:2) foram eluídos com *n*-hexano preferencialmente nas frações 3, 4 e 5, enquanto os EsMAG tri-insaturados (C18:3) foram eluídos preferencialmente nas frações 5, 6 e 7. A fração 7 foi eluída com uma mistura de solventes (*n*-hexano:éter dietílico:diclorometano, 89:1:10, v/v/v).

Apesar da separação não muito eficiente entre os ésteres saturados, mono-, di- e tri-insaturados, os resultados de recuperação apresentados neste estudo demonstram a aplicabilidade desta técnica para a separação de classes componentes em biodiesel. As demais classes de acilgliceróis podem ser obtidas, separadamente, pela combinação de outros eluentes, como no método de Kaluzny, o qual foi desenvolvido para lipídeos.

## Capítulo 3. Justificativa

### Capítulo 3. Justificativa

A determinação da qualidade química do biodiesel é um aspecto de grande importância para o sucesso de sua comercialização. Desta forma, a oferta de um combustível de alta qualidade é um pré-requisito para a aceitação do biodiesel no mercado (KNOTHE et al., 2006). Sendo assim, novos métodos de análise deverão ser desenvolvidos, caso contrário, problemas poderão surgir durante o consumo do biodiesel, podendo gerar insatisfação do consumidor e depreciando, consequentemente, a imagem pública positiva do biodiesel (GUARIEIRO, 2006). Os métodos analíticos mais empregados para a análise de biodiesel e/ou acompanhamento da reação de transesterificação são a CG e a CLAE (PINTO et al., 2005). Apesar da aplicação da CLAE para a análise de biodiesel ter aumentado na última década, a CG ainda é a técnica mais utilizada, devido à sua alta precisão para a quantificação de componentes minoritários (PINTO et al., 2005, SHANTA, NAPOLITANO, 1992). As principais vantagens da CLAE sobre a CG são as baixas temperaturas durante a análise, o que reduz o risco de isomerização de duplas ligações e a não necessidade de reagentes de derivatização, o que reduz o tempo de análise (PINTO et al., 2005; KNOTHE, 2001; CZAUDERNA, KOWALCZYK, 2001; LI et al., 2001). A CLAE torna possível a análise direta dos componentes principais do biodiesel sem derivatização.

Diferentes tipos de óleos vegetais vem sendo empregados, tais como o óleo de soja nos Estados Unidos da América (EUA), de colza e de girassol na Europa, de palma no Sudeste Asiático e de côco nas Filipinas (MURUGESAN *et al.*, 2009). A CLAE vem sendo aplicada para a análise de TAG de diferentes óleos vegetais e gorduras: soja, milho (HOLCAPEK *et al.*, 2003; CUNHA, OLIVEIRA, 2006), girassol (CHRISTIE, 1988; STOLYHWO *et al.*, 1985; HOLCAPEK *et al.*, 2003; CUNHA, OLIVEIRA, 2006), colza (HOLCAPEK *et al.*, 2003; KALO *et al.*, 2006), linhaça (CHRISTIE, 1988; STOLYHWO *et al.*, 1985; HOLCAPEK *et al.*, 2003), palma e amêndoa (HOLCAPEK *et al.*, 2003), mamona (LIN *et al.*, 1997), cártamo (CHRISTIE, 1988), sebo (MADL, MITTELBACH, 2005) e amendoim (CUNHA, OLIVEIRA, 2006; SEMPORE, BEZARD, 1986).

Os métodos de CLAE em fase reversa não aquosa (CLAE-FRNA) aplicados no monitoramento da reação de transesterificação de óleos vegetais foram empregados apenas para colza (KUSDIANA, SAKA, 2001; KOMERS *et al.*, 2001; HOLCAPEK *et al.*, 2001), soja (NOUREDDINI, ZHU, 1997), milho, canola, palma, semente de uva (STAVARACHE *et al.*, 2007) e girassol (TÜRKAN, KALAY, 2006). Entretanto, a análise dos produtos de transesterificação dos óleos de algodão e pinhão-manso, por CLAE-FRNA, realizada nesta tese, ainda não foi descrita na literatura.

De modo a confirmar os resultados obtidos através do método proposto (CLAE), fez-se necessário a comparação com a Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H), técnica que vem sendo empregada com sucesso para o acompanhamento da produção e da qualidade de reações de alcoólise (GELBARD *et al.*,1995; KNOTHE, 2000; NETO *et al.*, 2004; GHESTI *et al.*, 2007; MORGENSTERN *et al.*, 2006; JIN *et al.*, 2007; KNOTHE, 2006; TREVISAN *et al.*, 2008). Desta forma, a conversão de todos os produtos de transesterificação obtidos nesta tese foram calculadas, por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H), segundo as equações de GELBARD *et al.* (1995) e KNOTHE (2000). Além da aplicação na determinação da MM, do teor molar percentual de derivados dos ácidos insaturados totais (Q<sub>1</sub>), do grau de instauração (G<sub>1</sub>), do índice de iodo (I.I.) e no monitoramento das conversões nas reações de alcoólises de TAG, também foram propostas novas expressões, por RMN <sup>1</sup>H, para a determinação do Q<sub>1</sub> e do G<sub>1</sub>, de suas respectivas expressões de incertezas, assim como na proposição de expressões

33

para a determinação da incerteza da conversão segundo as expressões de Gelbard *et al.* (1995) e Knothe (2000).

A EFS é uma ferramenta interessante que vem sendo empregada para a separação de classes lipídicas em matrizes complexas (KALUZNY *et al.*, 1985; PINKART, DEVEREUX, CHAPMAN, 1998; BODENNEC *et al.*, 2000; PÉREZ-PALACIOS, RUIZ, ANTEQUERA, 2007). Entretanto, a EFS ainda não foi empregada na separação da glicerina combinada (MAG, DAG e TAG) do biodiesel (EsMAG). Sendo assim, a proposta central desta tese foi o desenvolvimento de métodos alternativos de separação do biodiesel da glicerina combinada, através das técnicas de EFS e CLAE, visando à obtenção de frações enriquecidas em classes de constituintes, que simplifiquem sua caracterização por métodos analíticos.

# Capítulo 4. Objetivo

### Capítulo 4. Objetivo

#### 4.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de métodos alternativos de separação de constituintes de biodiesel (MAG, DAG, TAG e EsMAG), através das técnicas de EFS e CLAE, visando à obtenção de frações enriquecidas em classes de contaminantes (MAG, DAG e TAG), que simplifiquem sua caracterização por métodos analíticos.

#### 4.2 Objetivos Específicos

 Produzir amostras de biodiesel (B100) de diferentes origens e graus de conversão, e portanto, de diferentes composições de cada classe de componentes (EsMAG, MAG, DAG e TAG), para serem usadas como matéria-prima no desenvolvimento dos métodos.

2) Caracterização, por RMN <sup>1</sup>H, dos óleos vegetais usados nas reações de transesterificação e das amostras de B100 sintetizadas. As amostras foram caracterizadas através da determinação da MM, do Q<sub>1</sub>, do G<sub>1</sub>, do I.I. e da conversão.

3) Implementar a caracterização, por RMN <sup>1</sup>H, através da proposição de novas expressões para a determinação do Q<sub>I</sub> e do G<sub>I</sub>, de suas respectivas expressões de incertezas, assim como a proposição de expressões para a determinação da incerteza da conversão segundo as equações de Gelbard *et al.* (1995) e Knothe (2000).

4) Desenvolvimento de um método por CLAE para análise de EsMAG e glicerina combinada (MAG, DAG e TAG) nas matrizes de B100 sintetizadas, assim como para a determinação da conversão de óleos vegetais em EsMAG.

5) Estudar a potencialidade do método proposto, por CLAE, na avaliação dos óleos vegetais usados nas reações de transesterificação e nas amostras de B100 sintetizadas.

 Confirmar os resultados obtidos pelo método proposto (CLAE), através da comparação com a RMN <sup>1</sup>H.

7) Desenvolvimento de método por EFS, para separar o biodiesel (EsMAG) da glicerina combinada (MAG, DAG e TAG), avaliando a recuperação e a eficiência de separação, visando à obtenção de frações enriquecidas nas principais classes de impurezas.

## Capítulo 5. Material e Métodos

### Capítulo 5. Material e Métodos

#### 5.1 Reações de transesterificação

#### 5.1.1 Óleos vegetais e reagentes

Neste trabalho foram empregados sete tipos diferentes de óleos vegetais. Os óleos de soja, milho, girassol e de canola foram comerciais refinados da marca Liza (Cargill, São Paulo). O óleo de algodão empregado foi comercial refinado da marca Salada (Bunge Alimentos, São Paulo). O óleo bruto de pinhão-manso foi cedido pelo Laboratório Greentec da Escola de Química da UFRJ. O óleo de mamona foi da marca Pró-Química (Canoas, Rio Grande do Sul). Todos os óleos vegetais foram utilizados sem qualquer procedimento prévio de purificação e/ou tratamento.

Os reagentes empregados nas reações de transesterificação foram: carbonato de potássio, cloreto de sódio e sulfato de sódio anidro, obtidos da MERCK (Darmstadt, Alemanha) e metanol anidro e *n*-hexano, obtidos da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil). Estes reagentes possuíam grau de pureza P.A. e foram utilizados sem purificação prévia. Além destes reagentes, a água destilada também foi utilizada.

#### 5.1.2 Estimativa da massa molecular média dos óleos vegetais

A estimativa da massa molecular média (MM<sub>média</sub>) dos óleos vegetais empregados nas reações de transesterificação foi calculada a partir da provável composição de AG combinados, conforme os dados da literatura (MA, HANNA, 1999; SRIVASTAVA, PRASAD,

2000; DEMIRBAS, 2003; PINTO *et al.*, 2005) **(tabela 9)**, segundo a **equação 1** (GUARIEIRO, 2006).

 $MM_{média} = MM_{glicerina} - (3 \times 17) + \underbrace{3 \sum (MM_{ac.graxo} - 1) \times \%_{ac.graxo}}_{100}$ Equação 1

Onde: MM<sub>glicerina</sub> é a massa molecular da glicerina e MM<sub>ac.graxo</sub> é a massa molecular de cada ácido graxo combinado presente em cada óleo.

#### 5.1.3 Reações de transesterificação

As reações de transesterificação foram realizadas com metanol anidro, sob as mesmas condições experimentais, variando apenas o tempo de reação e a razão molar óleo:metanol. Em um balão de fundo redondo, acoplado a um condensador de refluxo e contendo 50 mL do óleo vegetal previamente pesado, foram adicionados o catalisador (carbonato de potássio, 3% mol) e o álcool (metanol) na razão molar de 1:3 ou 1:9 de óleo vegetal:metanol. As quantidades de reagentes utilizados nas reações de transesterificação foram calculadas a partir da estimativa da MM média dos óleos vegetais, conforme a **equação 1**. O meio reacional foi mantido sob aquecimento e agitação magnética. A reação foi mantida sob agitação e refluxo por um período de 5, 10, 15, 30 ou 90 min, e posteriormente resfriada até temperatura ambiente. O excesso de metanol foi removido por evaporação à pressão reduzida. A fase glicerínica foi separada por decantação em funil de separação e desprezada, carreando consigo o excesso do álcool e do catalisador. A camada superior, contendo o produto desejado, foi extraída com 100 mL de *n*-hexano para evitar a formação de emulsão. Em seguida, a fase hexânica foi tratada com água destilada (3 x 50 mL) para remover qualquer catalisador residual e outros contaminantes. O excesso

de solvente foi retirado por evaporação sob pressão reduzida. Os traços de água foram removidos com adição de cerca de 2 g de sulfato de sódio anidro, durante aproximadamente 2 horas. O produto de transesterificação obtido foi filtrado em algodão, armazenado em frasco âmbar e estocado em freezer (aproximadamente -10<sup>0</sup>C) até análise.

#### 5.2 Análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio

#### 5.2.1 Reagentes

Os reagentes empregados na análise por RMN <sup>1</sup>H foram: clorofórmio deuterado (CDCI<sub>3</sub>) e tetrametilsilano, obtidos da CambriDAGe Isotope Laboratories-CIL (EUA).

#### 5.2.2 Análise por RMN <sup>1</sup>H

As amostras foram analisadas por RMN <sup>1</sup>H em espectrômetro BRUKER DPX200 (200,13 MHz/<sup>1</sup>H e 50,29 MHz/<sup>13</sup>C, a 4,6975 Tesla), equipado com sonda dual (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), na concentração de 14-30 mg/mL em CDCl<sub>3</sub>. Nos experimentos 1D (<sup>1</sup>H) foram utilizadas: larguras espectrais SW = 20 ppm, período de relaxação de 1,0s (D1), pulso de 90<sup>o</sup>/3 de 3,0µs com -3,0dB de atenuação de potência, 16 scans, a 25<sup>o</sup>C. Os valores dos deslocamentos químicos foram expressos por ( $\delta$ ), em partes por milhão (ppm) da freqüência aplicada. As áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica. O deslocamento químico de um átomo ou grupo de átomos de <sup>1</sup>H na amostra foi medido em relação ao sinal de tetrametilsilano (referência).

#### 5.2.3 Estimativa da massa molecular média dos óleos vegetais por RMN <sup>1</sup>H

A MM média, estimada por RMN <sup>1</sup>H (MM<sub>RMN H</sub>), dos óleos vegetais estudados foi calculada pela **equação 2** (REDA, 2004).

$$MM_{RMN H} = 119,7 + (7,036 \times NTP) + (5,983 \times NPO)$$
Equação 2

Onde: o número total de prótons (NTP) e o número de prótons olefínicos (NPO) foram definidos por REDA (2004) e encontram-se descritos nas **equações 3 e 4**, respectivamente.

 $NTP = (A_{CA} + A_{AG} + A_{EM} + A_{DAM} + A_{CH2} + A_{MA} + A_{MB} + A_{M} + A_{MT}) / (A_{AG} / 4)$  Equação 3

NPO= 
$$\begin{array}{c} \hline A_{CA}-(A_{AG}/4) \\ \hline \\ (A_{AG}/4) \end{array}$$
 Equação 4

A integração (área) dos sinais  $A_{CA}$ ,  $A_{AG}$ ,  $A_{EM}$ ,  $A_{DAM}$ ,  $A_{CH2}$ ,  $A_{MA}$ ,  $A_{MB}$ ,  $A_M$  e  $A_{MT}$  encontram-se definidos na **tabela 5**.

**Tabela 5**. Caracterização da integração (área) dos sinais assinalados no espectro de RMN <sup>1</sup>H (KNOTHE, 2000; GELBARD *et al.*, 1995).

Abreviaturas*	δ <b>(ppm)</b>	Hidrogênios assinalados
A <sub>CA</sub>	5,3	olefínicos da cadeia alifática e metínico do grupo glicerol
A <sub>AG</sub>	4,1 - 4,4	metilênicos do grupo glicerol e metilênicos em posição $\alpha$ -
		ao grupo olefínico do ácido ricinoléico
A <sub>EM</sub>	3,7	da metoxila dos ésteres metílicos e metínico em posição
		β- ao grupo olefínico do ácido ricinoléico
A <sub>DAM</sub>	2,8	dialilmetilênicos
A <sub>CH2</sub>	2,3	metilênicos em posição $\alpha$ - à carbonila
A <sub>MA</sub>	2,1	metilênicos em posição $\alpha$ - ao grupo olefínico
A <sub>MB</sub>	1,6	metilênicos em posição $\beta$ - à carbonila e ao grupo olefínico
A <sub>MC</sub>	1,5	metilênicos em posição $\alpha$ - ao grupo carbinol do ácido
		ricinoléico
A <sub>M</sub>	1,3	demais hidrogênios metilênicos
A <sub>MT</sub>	0,9	metílicos terminais

\*Abreviaturas referentes às integrações de cada sinal, usados no presente trabalho.

#### 5.2.4 Estimativa do índice de iodo dos óleos vegetais por RMN <sup>1</sup>H

O índice de iodo (I.I.) dos óleos vegetais estudados foi estimado, por RMN <sup>1</sup>H,

(I.I.<sub>RMN H</sub>), através da **equação 5** (REDA, 2004).

I.I.<sub>RMN H</sub>= (126,91 x 100 x NPO) / MM<sub>RMN H</sub>

Equação 5

#### 5.2.5 Estimativa da incerteza na medida de integração por RMN <sup>1</sup>H

A incerteza em uma medição é calculada pela diferença entre a medida e o valor verdadeiro (CIENFUEGOS, 2005). Para a medida de integração dos sinais em RMN <sup>1</sup>H, o valor verdadeiro é desconhecido. No entanto, duas relações teóricas idênticas entre si podem ser deduzidas, baseadas em sinais característicos do espectro de AG e derivados:  $[A_{CA} - (A_{AG} / 4)] e [A_{DAM} + (A_{MA} / 2)]$ . Assim, uma relação simples e hipotética (f) pode ser definida pela diferença entre estas duas relações, que representam a estimativa do grau de insaturação determinado por MORGENSTERN *et al.* (2006), através da **equação 13** (G<sub>IM</sub>) e da equação proposta no presente trabalho (**equação 14**, G<sub>I</sub>). A incerteza desta relação é apresentada na **equação 6**.

$$\Delta f = \left\{ \Delta A_{CA} + (\Delta A_{AG} / 4) + \Delta A_{DAM} + (\Delta A_{MA} / 2) \right\}$$
 Equação 6

A partir da **equação 6**, e admitindo-se  $\Delta A_{CA} = \Delta A_{AG} = \Delta A_{DAM} = \Delta A_{MA} = \Delta I$ , é possível demonstrar que a estimativa da incerteza da medida de integração ( $\Delta I$ ) é aproximadamente 2/3 x  $\Delta f$ .

#### 5.2.6 Determinação da conversão por RMN <sup>1</sup>H

A conversão (%), por RMN <sup>1</sup>H, foi determinada através da **equação 7** (GELBARD *et al.,* 1995) (C<sub>G</sub>) e da **equação 8** (KNOTHE, 2000) (C<sub>K</sub>).

$$C_{G} = 100 \text{ x} \underbrace{2A_{EM}}_{3A_{CH2}}$$
Equação 7

$$C_{K} = 100 \text{ x} \left( \begin{array}{c} 5 \text{ x} A_{EM} \\ \hline 5 \text{ x} A_{EM} + 9 \text{ x} A_{AG} \end{array} \right)$$
Equação 8

A integração (área) dos sinais A<sub>AG</sub>, A<sub>EM</sub> e A<sub>CH2</sub> foram definidos na tabela 5 (seção 5.2.3).

A incerteza na determinação da conversão  $C_G$  ( $\Delta C_G$ ) pode ser estimada pela equação proposta no presente trabalho (**equação 9)**:

$$\Delta C_{G} = \frac{100 \times 2}{3} \times \left( \begin{array}{c} A_{EM} \times \Delta I + A_{CH2} \times \Delta I \\ (A_{CH2})^{2} \end{array} \right)$$
Equação 9

A incerteza na determinação da conversão  $C_{\kappa}$  ( $\Delta C_{\kappa}$ ) pode ser estimada pela equação proposta no presente trabalho (**equação 10)**:

$$\Delta C_{K} = 100 \times 5 \times \left( \frac{5 \times A_{EM} \times \Delta I + 9 \times \Delta I}{(5 \times A_{EM} + 9 \times A_{AG})^{2}} \right)$$
Equação 10

A integração (área) dos sinais A<sub>AG</sub>, A<sub>EM</sub> e A<sub>CH2</sub> foram definidos na tabela 5 (seção 5.2.3).

#### 5.2.7 Estimativa do teor de insaturados por RMN <sup>1</sup>H

A estimativa do teor molar percentual de derivados dos ácidos insaturados totais (Q<sub>I</sub>) foi determinada, por RMN <sup>1</sup>H, através da equação proposta neste trabalho (**equação 11)**.

$$Q_{I} = 100 \times \left(\frac{A_{MA}}{2 \times A_{CH2}}\right)$$
 Equação 11

A incerteza dessa medida ( $\Delta Q_I$ ) pode ser estimada pela equação proposta no presente trabalho (equação 12):

$$\Delta Q_{I} = \underline{100}_{2} \times \left( \underbrace{\frac{A_{MA} \times \Delta I + A_{CH2} \times \Delta I}{(A_{CH2})^{2}}}_{(A_{CH2})^{2}} \right)$$
Equação 12

A integração (área) dos sinais A<sub>MA</sub> e A<sub>CH2</sub> foram definidos na tabela 5 (seção 5.2.3).

#### 5.2.8. Estimativa do grau de insaturação por RMN <sup>1</sup>H

A estimativa do grau de insaturação foi determinada, por RMN <sup>1</sup>H, segundo MORGENSTERN *et al.* (2006), através da **equação 13** ( $G_{IM}$ ). Além desta equação, uma nova expressão (**equação 14**,  $G_I$ ) para a determinação do grau de insaturação, foi proposta neste trabalho.

$$G_{IM} = \left(\frac{A_{CA} - (A_{AG}/4)}{A_{CH2}}\right)$$

$$G_{I} = \left(\frac{A_{DAM} + (A_{MA}/2)}{A_{CH2}}\right)$$
Equação 14

A integração (área) dos sinais A<sub>CA</sub>, A<sub>AG</sub>, A<sub>CH2</sub>, A<sub>DAM</sub> e A<sub>MA</sub> foram definidos na **tabela 5 (seção 5.2.3)**.

A incerteza ( $\Delta G_{IM}$ ) da **equação 13**, pode ser estimada pela equação proposta no presente trabalho **(equação 15)**:

$$\Delta G_{IM} = \left( \frac{(1 + G_{IM})^{1/2}}{A_{CH2}} \right) \times \Delta I$$
 Equação 15

A incerteza ( $\Delta G_I$ ) da **equação 14**, pode ser estimada pela equação proposta no presente trabalho **(equação 16)**:

$$\Delta G_{I} = \left( \underbrace{(5/4 + G_{I}^{2})^{1/2}}_{A_{CH2}} \right) \times \Delta I$$
Equação 16

A integração (área) dos sinais  $A_{CA}$ ,  $A_{AG}$  e  $A_{CH2}$  foram definidos na tabela 5 (seção 5.2.3).

#### 5.3. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

#### 5.3.1. Reagentes

Os reagentes utilizados na fase móvel foram: *i*-propanol, *n*-hexano e metanol grau cromatográfico, obtidos da TEDIA (São Paulo, Brasil).

#### 5.3.2. Método de CLAE

As análises por CLAE foram realizadas em coluna Varian Microsorb-MV (Lake Forest, California, EUA) de 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, com fase octadecilsilano de 5 µm de tamanho de partícula com 100 Å de diâmetro de poro. Uma pré-coluna de 2 cm de comprimento, com fase octadecilsilano (Supelco, Bellefonte, EUA), foi adaptada entre o injetor e a coluna de separação. A fase móvel foi composta de metanol (A) e uma mistura de *i*-propanol/*n*-hexano (5:4, v/v) (B). As fases foram filtradas em membrana politetrafluoretileno (PTFE) da Millipore (Bedford, EUA) com 0,5 µm de poro e sonicadas por 20 min antes do uso. As análises foram realizadas à temperatura ambiente com vazão de 1 mL/min e detecção UV a 205 nm. Foi empregado um equipamento da Varian (Walnut Creck, California, EUA), modelo Polaris, composto de duas bombas, um detector por varredura de espectro ao ultravioleta modelo 325 Varian e um injetor Rheodyne 7725i com alça de amostragem (ingl., "loop") de 20 µL. Um gradiente binário com duas rampas lineares foi empregado: 0% a 50% B de 0 a 15 min, seguido de 50% a 100% B até 25 min de corrida, e então por eluição isocrática com 100% B por mais 5 min. O tempo de corrida total foi de 30 min. Todas as amostras foram previamente filtradas em filtro tipo membrana PTFE da Millipore (Bedford, EUA) com 0,45 µm de poro

antes da injeção. As amostras foram aplicadas à temperatura ambiente em injetor Rheodyne (20 µL), após diluição na proporção de 3% (p/v) em *i*-propanol/*n*-hexano (5:4, v/v). Cada amostra (10 µL) foi analisada em triplicata. Os cromatogramas foram analisados e integrados pelo programa de aquisição do Sistema Galaxie, versão 1.9.3.2 (Varian, Califórnia, EUA).

#### 5.3.3. Conversão dos resultados cromatográficos

Os dados brutos dos cromatogramas (tempo de corrida versus intensidade do sinal) foram convertidos para Excel, empregando o programa do Sistema Galaxie, versão 1.9.3.2 (Varian, Califórnia, EUA).

#### 5.3.4. Determinação do tempo de retenção relativo

O tempo de retenção relativo ( $t_{RR}$ ) é definido como o tempo de retenção calculado em relação ao pico principal (ou de referência). O  $t_{RR}$  de cada componente identificado no cromatograma obtido por CLAE foi determinado através da média de 20 determinações, segundo a **equação 17**.

$$t_{RR} = \begin{pmatrix} t_{R} \\ \hline t_{P} \end{pmatrix}$$
 Equação 17

Onde:

 $t_R$  e  $t_P$  referem-se, respectivamente, aos tempos de retenção, em min, de cada componente e do pico de referência em cada grupo (isômeros sn-2 e sn-1 da monolinoleína para MAG; éster metílico do ácido linoléico para EsMAG; isômeros sn-1,2 e sn-1,3 da oleoil-linoleoilglicerol para DAG e o par trilinoleína/oleoil-linoleoil-linolenoil-glicerol para TAG).

A notação e o número de ligações duplas (NLD) dos componentes identificados por CLAE, encontram-se listados na **tabela 6**.
**Tabela 6.** Notação e NLD dos componentes identificados nos cromatogramas obtidos porCLAE.

Grupos	Nome	Notação	NLD
MAG	Monolinolenina	Ln	3
	Monolinoleína <sup>*</sup>	L	2
	Monooleína	0	1
EsMAG	Éster metílico do ácido linolênico	MeLn	3
	Éster metílico do ácido linoléico*	MeL	2
	Éster metílico do ácido oléico	MeO	1
DAG	Dilinolenina	LnLn	6
	Linoleoil-linolenoil-glicerol	LLn	5
	Dilinoleína	LL	4
	Oleoil-linolenoil-glicerol	OLn	4
	Oleoil-linoleoil-glicerol*	OL	3
	Dioleína	00	2
TAG	Trilinolenina	LnLnLn	9
	Dilinolenoil-linoleoil-glicerol	LLnLn	8
	Dilinoleoil-linolenoil-glicerol	LLLn	7
	Dilinolenoil-oleoil-glicerol	OLnLn	7
	Trilinoleína*	LLL	6
	Oleoil-linoleoil-linolenoil-glicerol*	OLLn	6
	Dilinoleoil-oleoil-glicerol	OLL	5
	Dioleoil-linolenoil-glicerol	OOLn	5
	Dioleoil-linoleoil-glicerol	OOL	4
	Trioleína	000	3
	Dioleoil-gadoleoil-glicerol	OOG	3

NLD: número de ligações duplas; MAG: Monoacilgliceróis; EsMAG: Ésteres metílicos de ácidos graxos; DAG: Diacilgliceróis e TAG: Triacilgliceróis.\*Componentes dos sinais aplicados como referências de tempo de retenção em cada classe correspondente.

#### 5.3.5. Determinação da área corrigida

A área corrigida (A<sub>c</sub>) de cada componente identificado no cromatograma obtido por CLAE, foi determinada através da **equação 18**, proposta no presente trabalho.

Onde:

 $A_{C}$  e A referem-se, respectivamente, as áreas, em mAU x min, corrigida e obtida diretamente de cada componente.

As áreas corrigidas de cada classe de componentes (EsMAG, MAG, DAG e TAG) foram obtidas através da soma da A<sub>C</sub> dentro de cada classe.

#### 5.3.6. Determinação da conversão por CLAE

A conversão por CLAE (C<sub>CLAE</sub>) foi determinada através da **equação 19**, proposta no presente trabalho.

$$C_{CLAE} = 100 \times \left( \frac{A_{C EsMAG}}{A_{C EsMAG} + A_{C MAG} + (2 \times A_{C DAG}) + (3 \times A_{C TAG})} \right)$$

#### Equação 19

Onde: A<sub>ESMAG</sub>, A<sub>MAG</sub>, A<sub>DAG</sub> e A<sub>TAG</sub> são as áreas corrigidas (obtidas pela **equação 18**), respectivamente, dos EsMAG, MAG, DAG e TAG.

#### 5.4. Extração em fase sólida

#### 5.4.1. Reagentes

Os reagentes empregados na EFS foram: *n*-hexano e metanol, grau cromatográfico, adquiridos da TEDIA (São Paulo, Brasil) e clorofórmio, grau de pureza P.A., adquirido da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil).

#### 5.4.2. Obtenção de materiais de referência contendo EsMAG, MAG, DAG e TAG

Materiais de referência individuais de MAG, DAG, TAG e de EsMAG foram preparados pela combinação dos óleos vegetais e de seus produtos de transesterificação. Os referidos materiais (padrões) foram planejados de modo a apresentarem todos os componentes identificados e em uma razão inteira entre as áreas de integração de cada componente da referida classe. A produção dos materiais de referência empregados nesta tese foi planejada partindo:

(1) dos resultados da análise por CLAE dos óleos vegetais e dos seus produtos de transesterificação obtidos com diferentes óleos vegetais e graus de conversão;

 (2) da aplicação do método de quadrados mínimos para planejar ajustes da composição dos padrões de intenção; e

(3) da simulação dos cromatogramas dos padrões planejados, usando o modelo matemático de momentos estatísticos de VAN DEEMTER *et al.* (1956), representativo de separação cromatográfica (MAZZEI, D`AVILA, 2003).

Do mesmo modo, materiais de referência do biodiesel no limite da especificação e das matrizes padrão submetidas à EFS, com teores similares de MAG, DAG, TAG e EsMAG, foram preparados a partir de composições planejadas.

#### 5.4.3. Separação e isolamento dos acilgliceróis por EFS

A separação dos acilgliceróis (MAG, DAG e TAG) do biodiesel, por EFS, foi realizada através de uma modificação no método de Kaluzny et al. (1985), o qual foi desenvolvido para separação de classes lipídicas. A revisão bibliográfica realizada ao longo desta tese mostrou que este método não foi descrito na literatura para a separação de classes lipídicas do biodiesel, conforme apresentado no presente trabalho. Os cartuchos contendo fase aminopropilsilano (500 mg, 3 mL, Bond Elut) foram condicionados com duas porções de 2 mL de n-hexano. O material de referência foi diluído em n-hexano nas concentrações de 1,5, 2, 3 e/ou 5% (v/v) antes da aplicação nos cartuchos de EFS. Passou-se o material de referência, 200 e/ou 400 µL, sob vácuo, com vazão de aproximadamente 1 mL/min. Em seguida efetuou-se a eluição dos EsMAG com 8, 10 e/ou 12 mL de n-hexano (fração 1). Os compostos retidos no cartucho após eluição com nhexano, foram eluídos com 4 mL de clorofórmio:metanol (2:1, v/v) (fração 2). As frações foram secas sob fluxo lento de nitrogênio e o resíduo foi ressuspenso em 100 µL de ipropanol:n-hexano (5:4,v/v). Uma alíquota de 10 µL foi analisada, em triplicata, por CLAE. Foram reservadas alíquotas dos materiais de referência (200 e/ou 400 µL), para análise direta por CLAE, sem passagem pelo processo de EFS, as quais foram secas, diluídas e analisadas identicamente. Os resultados destes materiais de referência foram usados como controle para a avaliação da recuperação das diferentes classes de compostos presentes durante o processo de produção do biodiesel. Tanto os materiais de referência submetidos ao processo de EFS quanto às frações obtidas, foram analisados em triplicata.

#### 5.4.4. Determinação da recuperação

A recuperação de cada classe (R<sub>Classe</sub>) de componentes (MAG, EsMAG, DAG e/ou TAG) presentes nas frações obtidas pelo processo de EFS foi determinada através da equação 20.

$$R_{Classe} = 100 \times \left( \begin{array}{c} A_{C \ Classe} \\ A_{C \ ontrole} \end{array} \right)$$

Equação 20

Onde:

A<sub>C Classe</sub> e A<sub>Controle</sub> referem-se, respectivamente, as áreas corrigidas de cada classe de componentes, obtida por CLAE, após e sem passagem pelo processo de EFS (**ver seção 5.3.5**).

#### 5.4.5. Determinação da composição

A composição relativa percentual de cada classe (C<sub>Classe</sub>) de componentes (MAG, EsMAG, DAG e/ou TAG) presente nas frações obtidas pelo processo de EFS foi determinada através da **equação 21**.



Equação 21

Onde:

A<sub>C Classe</sub> e A<sub>Total Classe</sub> referem-se, respectivamente, as áreas corrigidas, em mAU x min, de cada classe e de todas as classes de componentes, obtidas por CLAE, após passagem pelo processo de EFS.

#### 5.5. Tratamento estatístico dos dados

Todos os dados obtidos, em replicatas, nesta tese foram submetidos ao teste de Dixon (MILLER, MILLER, 1993) com a finalidade de verificar valores suspeitos e aberrantes, ou seja, valores entre réplicas que diferem estatisticamente da média.

Ao comparamos amostras independentes (quando os dados são coletados de tal maneira, que as observações não são relacionadas uma às outras), aplicamos, primeiramente, o teste-F para verificação da igualdade das variâncias das amostras. Quando as variâncias dos métodos foram consideradas equivalentes, aplicou-se o test-t pareado: duas amostras presumindo variâncias equivalentes. No entanto, quando as variâncias dos métodos foram consideradas diferentes, usou-se o test-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes, usou-se o test-t: duas amostras presumindo variâncias diferentes. Os testes F e t foram determinados através do Microsoft Office Excel 2007.

Ao comparamos amostras dependentes (comumente chamadas de pareadas), já que uma mesma amostra foi analisada por dois métodos diferentes, aplicamos, diretamente o teste-t: duas amostras em par para médias.

A análise de variância (ANOVA) fator único e/ou duplo foi realizada através do Microsoft Office Excel 2007, e foi aplicada para a determinação de diferenças significativas nas médias de diferentes grupos. Quando diferenças significativas foram encontradas através da ANOVA, o teste de Tukey (VIEIRA, 1980) foi aplicado para a identificação dos grupos diferentes. Entretanto, no tratamento dos dados desta tese, a aplicação do teste de Tukey não foi necessária.

# Capítulo 6. Resultados e Discussão

### Capítulo 6. Resultados e Discussão

## 6.1. Produção de amostras de biodiesel (B100) de diferentes origens e graus de conversão

Para o desenvolvimento do método proposto, fez-se necessária a obtenção de amostras de biodiesel (B100) contendo diferentes teores de MAG, DAG, TAG e EsMAG. Desta forma, as amostras de B100 foram sintetizadas conforme as condições apresentadas no **quadro 1**.

Dentre os parâmetros reacionais que influenciam na conversão da reação de transesterificação, apenas a razão molar óleo vegetal:metanol e o tempo de reação foram variados. As condições reacionais que empregaram uma razão molar de 1:3 de óleo vegetal:metanol foram usadas de modo a obter propositalmente baixos teores de EsMAG, e conseqüentemente quantidades significativas de MAG, DAG e TAG, como será observado nos resultados apresentados neste trabalho.

**Quadro 1.** Condições reacionais empregadas nas reações de transesterificação dos óleos vegetais.

Óleo Vegetal	Razão molar	Tempo (min)
	óleo:metanol	
Soja	1:3	5, 15 e 30
	1:9	5, 10, 15, 30 e 90
Milho	1:3	5, 15 e 30
	1:9	5, 10, 15, 30 e 90
Girassol	1:3	5, 15 e 30
	1:9	5, 10, 15, 30 e 90
Canola	1:3	5, 15 e 30
	1:9	5, 10, 15, 30 e 90
Algodão	1:3	5
	1:9	10, 15
Pinhão-Manso	1:3	5
	1:9	30

#### 6.2. Caracterização dos óleos vegetais por RMN <sup>1</sup>H

Todos os óleos vegetais estudados neste trabalho foram analisados por RMN <sup>1</sup>H, de modo a caracterizar as fontes oleaginosas empregadas nas reações de transesterificação. A RMN <sup>1</sup>H foi o método escolhido para a confirmação dos resultados obtidos pelo método proposto (CLAE), uma vez que é uma importante ferramenta no estudo de óleos vegetais e fornece informações importantes sobre estas substâncias. Neste trabalho, a RMN <sup>1</sup>H foi empregada para a determinação da MM, I.I, Q<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> dos óleos vegetais empregados.





**Figura 3.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) dos óleos de milho (a), girassol (b), canola (c), algodão (d) e pinhão-manso (e).

A partir destes espectros de RMN <sup>1</sup>H observaram-se oito sinais distintos, característicos para os hidrogênios em óleos vegetais conforme a **tabela 5 (seção 5.2.3)**. Não foram encontradas diferenças perceptíveis entre os espectros destes óleos vegetais, mostrando então espectros com perfis semelhantes.

Os valores das integrações relativas de cada sinal observado nos espectros analisados foram obtidos e encontram-se apresentados na **tabela 7**.

**Tabela 7.** Integrações dos sinais dos espectros de RMN <sup>1</sup>H dos óleos vegetais empregados nas reações de transesterificação (relativamente ao sinal de  $A_{CH2}$ ).

Óleo Vegetal				δ <b>(pp</b> ι	n)				
	5,3 (A <sub>CA</sub> )	4,1-4,4 (A <sub>AG</sub> )	2,8 (A <sub>DAM</sub> )	2,3 (А <sub>СН2</sub> )	2,1 (А <sub>МА</sub> )	1,6 (А <sub>мв</sub> )	1,3 (А <sub>М</sub> )	0,9 (А <sub>мт</sub> )	
Soja	1,64	0,69	0,69	1,00	1,71	1,52	8,39	1,64	
Milho	1,45	0,67	0,46	1,00	1,68	1,27	9,00	1,77	
Girassol	1,52	0,65	0,52	1,00	1,78	1,31	8,60	1,57	
Canola	1,37	0,64	0,34	1,00	1,82	1,29	9,60	1,59	
Algodão	1,33	0,64	0,51	1,00	1,42	1,28	8,70	1,55	
Pinhão-	1,34	0,66	0,41	1,00	1,59	1,21	9,27	1,59	
Manso									

A caracterização dos sinais assinalados no espectro de RMN <sup>1</sup>H dos óleos vegetais encontra-se descrita na **tabela 5, seção 5.2.3**.

A partir dos dados apresentados na **tabela 7**, foram observadas diferenças nas intensidades dos sinais apresentados nos espectros dos óleos vegetais estudados. Observou-se uma intensidade do sinal referente aos hidrogênios dialilmetilênicos, em 2,8 ppm, relativamente maior no óleo de soja em comparação aos outros óleos. Acredita-se que isto se deve ao fato do óleo de soja apresentar maiores teores dos ácidos linoléico (2 hidrogênios dialilmetilênicos) e linolênico (4 hidrogênios dialilmetilênicos), quando comparado aos outros óleos. Diferenças menores na intensidade dos sinais em 2,1 e 1,6 ppm também dependem da composição destes ácidos, mas todos os outros ácidos graxos combinados, como palmitoléico, oléico, gadoléico, erúcico e nervônico, também contribuem para a intensidade desses sinais. Também foi observada uma intensidade do sinal referente aos hidrogênios olefínicos da cadeia alifática e metínico do grupo glicerol, em 5,3 ppm, relativamente maior no óleo de soja em comparações aos demais óleos vegetais, sugerindo então um maior teor de ácidos graxos insaturados neste óleo.

Além dos óleos vegetais descritos anteriormente, o óleo de mamona também foi analisado, e seu espectro encontra-se apresentado na **figura 4**.



Figura 4. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do óleo de mamona.

O espectro do óleo de mamona (figura 4) apresenta diferenças significativas em comparação aos espectros dos outros óleos vegetais estudados (figura 3). A ausência do sinal referente aos hidrogênios dialilmetilênicos (2,8 ppm) é devido à ausência dos ácidos linoléico e linolênico na composição do óleo de mamona. Outra diferença notável é a presença do sinal em 3,7 ppm, o qual é característico dos hidrogênios metínicos que estão

localizados na posição β- ao grupo olefínico do ácido ricinoléico (SILVERSTEIN *et al.,* 1991). No entanto, este deslocamento químico também é característico dos grupos metoxila em ésteres metílicos.

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios do ácido ricinoléico, principal constituinte do óleo de mamona, são apresentados na **figura 4**, por apresentarem deslocamentos diferenciados dos demais AG (**figura 2, seção 2.2.3**). O deslocamento químico proposto em 2,2 ppm pode ser atribuído à contribuição dos hidrogênios olefínicos da cadeia alifática em 5,3 ppm e dos hidrogênios metínicos em posição  $\beta$ - ao grupo olefínico do ácido ricinoléico em 3,7 ppm, e os outros deslocamentos são típicos das cadeias de AG.

#### 6.2.1. Estimativa da massa molecular dos óleos vegetais por RMN <sup>1</sup>H

Os resultados da estimativa da MM dos óleos vegetais, determinados por RMN <sup>1</sup>H, no presente trabalho, encontram-se descritos na **tabela 8**. Nesta tabela também são apresentados os valores da MM média dos óleos vegetais, calculados a partir dos dados de composição de AG relatados na literatura (MA, HANNA, 1999; SRIVASTAVA, PRASAD, 2000; DEMIRBAS, 2003; PINTO *et al.*, 2005). Estes valores foram calculados segundo a **equação 1 (seção 5.1.2)**.

A estimativa da MM dos óleos vegetais, por RMN <sup>1</sup>H, já foi descrita na literatura para os óleos de soja, milho, girassol e canola (REDA, 2004). Entretanto, a determinação deste parâmetro nos óleos de algodão e pinhão-manso ainda não foi apresentada na literatura.

**Tabela 8.** Massas moleculares médias de óleos vegetais calculadas a partir dos dados de composição da literatura e estimadas por RMN <sup>1</sup>H.

Óleo	Massa Molecular (g/mol)								
Vegetal									
	MA, HANNA, 1999	SRIVASTAVA, PRASAD, 2000	DEMIRBAS, 2003	PINTO <i>et al.</i> , 2005	RMN <sup>1</sup> H (este trabalho)				
Soja	865 (99%)	862 (99%)	869 (100%)	846 (97%)	876				
Milho	-	-	-	877 (100%)	898				
Girassol	-	875 (100%)	875 (100%)	874 (100%)	909				
Canola	-	863 (98%)	871 (99%)	719 (98%)	935				
Algodão	-	859 (100%)	-	-	885				
Pinhão- Manso	-	866 (100%)	-	-	895				

Os dados entre parênteses referem-se à composição (%) dos ácidos majoritários conforme cada referência. Teste-F: *F*<sub>calculado</sub>=0,09 e *F*<sub>crítico unicaudal</sub>=0,20. Teste-t: *t*<sub>calculado</sub>=3,75 e *t*<sub>crítico unicaudal</sub>=1,81.

Os resultados apresentados na **tabela 8** mostram que as estimativas das MM médias dos óleos vegetais, determinados por RMN <sup>1</sup>H, no presente trabalho, apresentaram valores relativamente maiores que os calculados segundo a **equação 1 (seção 5.1.2)**, a partir dos dados de composição relatados na literatura (MA & HANNA, 1999; SRIVASTAVA & PRASAD, 2000; DEMIRBAS, 2003; PINTO *et al.*, 2005).

Para avaliar se os resultados de MM obtidos, por RMN <sup>1</sup>H, no presente trabalho, são considerados equivalentes aos calculados a partir dos dados da literatura, os resultados foram avaliados estatisticamente pelo test-t pareado (duas amostras presumindo variâncias equivalentes).

Embora a **tabela 8** apresente os valores de MM calculados através dos dados descritos em trabalhos da literatura (MA & HANNA, 1999; SRIVASTAVA & PRASAD, 2000; DEMIRBAS, 2003; PINTO *et al.*, 2005), o tratamentamento estatístico foi realizado somente com os dados relatados por Srivastava & Prasad (2000). Isto porque esta referência apresentou um número maior de óleos vegetais para a comparação. Sendo assim, a aplicação do test-t pareado demonstrou que os valores de MM calculados através dos dados relatados por Srivastava & Prasad (2000) e obtidos no presente trabalho, por RMN <sup>1</sup>H, foram considerados diferentes (P < 0,05). Não foram encontradas justificativas para as diferenças observadas.

#### 6.2.2. Estimativa do índice de iodo dos óleos vegetais por RMN <sup>1</sup>H

O I.I. é um parâmetro de grande importância para os óleos vegetais e para o biodiesel. Em 2001, McCormick *et al.* estudaram a correlação entre o I.I., a densidade, o número de cetano e as emissões de NO<sub>x</sub> e de material particulado para o biodiesel. Os resultados indicaram que quanto maior o I.I. do biodiesel, maior será a densidade e menor será o número de cetano do mesmo. Este estudo também mostrou que com o aumento do I.I., aumentam as emissões de NO<sub>x</sub>. No entanto, as emissões de material particulado não são alteradas pela variação do número de iodo do biodiesel.

A estimativa do I.I. dos óleos vegetais por RMN <sup>1</sup>H já foi descrita na literatura para os óleos de soja, milho, girassol e canola (REDA, 2004). Entretanto, a determinação deste parâmetro nos óleos de algodão e pinhão-manso ainda não foi apresentada na literatura. A **tabela 9** apresenta a estimativa do I.I. dos óleos vegetais por RMN, assim como alguns valores de I.I. relatados na literatura.

**Tabela 9.** Resultados do índice de iodo dos óleos vegetais, estimados por RMN <sup>1</sup>H e relatados na literatura.

Óleo Vegetal	Índice de lodo									
R	EDA, 2004	SILVA, 2005	RMN <sup>1</sup> H							
Soja	136 (RMN)	126 ± 2 (Wijs)	124							
	124 (Wijs)									
	120 – 141 <sup>a</sup>									
Milho	119 (RMN)	111 ± 3 (Wijs)	109							
	109 (Wijs)									
Girassol	140 (RMN)	-	118							
	114 (Wijs)									
Canola	114 (RMN)	-	102							
	111 (Wijs)									
Algodão	99 - 119 <sup>a</sup>	-	104							
Pinhão-Manso	111-118 <sup>a</sup>	-	101							

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Valores de Referência: Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes – AOCS (AOCS, 1998). Teste-F método RMN: *F*<sub>calculado</sub>=1,68 e *F*<sub>crítico unicaudal</sub>=9,28. Teste-t método RMN: *t*<sub>calculado</sub>=1,83 e *t*<sub>crítico unicaudal</sub>=1,94. Teste-F método Wijs: *F*<sub>calculado</sub>=0,50 e *F*<sub>crítico unicaudal</sub>=0,11. Teste-t método Wijs: *t*<sub>calculado</sub>=0,25 e *F*<sub>crítico unicaudal</sub>=2,01.

Os resultados apresentados na **tabela 9** demonstram que as estimativas dos valores de I.I. dos óleos vegetais por RMN <sup>1</sup>H, encontraram-se em concordância com os dados apresentados na literatura, com exceção para o óleo de pinhão-manso. Foi observada a seguinte ordem decrescente de I.I. entre os óleos vegetais analisados: soja > girassol > milho > algodão > pinhão-manso ≈ canola. A partir desses resultados, pode-se sugerir que os óleos de canola e pinhão-manso tenderiam a ser mais resistentes à oxidação por possuir um I.I. menor que os demais óleos, satisfazendo dessa forma uma importante característica requerida para ser usado como um biocombustível.

Para avaliar se os resultados de I.I. obtidos, por RMN <sup>1</sup>H, no presente trabalho, são considerados equivalentes aos descritos pelos métodos de Wijs e RMN <sup>1</sup>H, relatados na literatura por Reda (2004), os resultados foram avaliados estatisticamente pelo test-t.

Embora a **tabela 9** apresente os valores de I.I. descritos no trabalho de Silva (2005), o tratamento estatístico foi realizado somente com os dados relatados por Reda (2004). Isto porque esta referência apresentou um número maior de óleos vegetais para a comparação. Desta forma, a aplicação do test-t demonstrou que os resultados obtidos pelos métodos de Wijs e RMN <sup>1</sup>H, relatados por Reda (2004), foram considerados estatisticamente equivalentes (P > 0,05) aos obtidos no presente trabalho, por RMN <sup>1</sup>H.

#### 6.2.3. Determinação da conversão por RMN<sup>1</sup>H

Os resultados da conversão por RMN <sup>1</sup>H, segundo GELBARD *et al.* (1995) ( $C_G$ ) e KNOTHE (2000) ( $C_K$ ), assim como suas respectivas estimativas das incertezas, encontram-se apresentados na **tabela 10**.

A partir dos resultados de conversão apresentados na **tabela 10**, observou-se uma maior conversão usando uma razão molar óleo vegetal:metanol de 1:9. Estes resultados já eram esperados, uma vez que para uma boa conversão é comum a utilização de razão molar óleo vegetal:álcool superior à estequiométrica, que é de 1:3. Os dados apresentados também demonstram que a conversão de TAG em ésteres geralmente aumenta com o tempo reacional.

Os resultados apresentados na **tabela 10** também demonstram uma relação  $C_G/C_K$  próxima de 1, mostrando portanto uma relação linear entre os resultados da conversão obtidos pelas expressões de GELBARD *et al.* (1995) e KNOTHE *et al.* (2000).

Os resultados de conversão obtidos, por RMN <sup>1</sup>H, segundo as expressões de Gelbard *et al.*, 1995 e Knothe, 2000 **(tabela 10)** foram comparados estatisticamente usando o teste-t: duas amostras em par para médias. Como o valor crítico unicaudal do |t| foi 1,68 e o valor calculado do |t| foi 0,75, verificamos que os valores de conversão, obtidos pelas expressões de GELBARD *et al.* (1995) e KNOTHE *et al.* (2000), não apresentam diferenças significativas (*P* > 0,05).

Fonte do	Tempo de			Razão	molar 1:3					Razão	molar 1:9		
produto	reação (min) <sup>1</sup>	C <sub>G</sub>	C <sub>K</sub>	C <sub>G</sub> / C <sub>K</sub>	G <sub>IM</sub> <sup>1</sup>	G <sub>I</sub> <sup>1</sup>	$\Delta \mathbf{I}^1$	C <sub>G</sub>	C <sub>K</sub>	C <sub>G</sub> / C <sub>K</sub>	G <sub>IM</sub>	GI	ΔΙ
Soja	-	-	-	-	(1,47±0,08)	(1,54±0,09)	(0,05)	-	-	-	-	-	-
	5	$29\pm 6$	$32\pm5$	$0,91 \pm 0,24$	$1,\!35\pm0,\!14$	$1,\!48\pm0,\!15$	0,08	$81\pm 6$	$82\pm 6$	$0,\!99\pm0,\!10$	$1,\!38\pm0,\!09$	$1,\!47\pm0,\!10$	0,06
	10	-	-	-	-	-	-	$81\pm4$	$81 \pm 4$	$1,\!00\pm0,\!07$	$1,\!41\pm0,\!07$	$1,\!47\pm0,\!07$	0,04
	15	$13 \pm 3$	$15\pm3$	$0,\!87\pm0,\!26$	$1,\!39\pm0,\!07$	$1,\!46\pm0,\!08$	0,04	$83 \pm 4$	$84 \pm 4$	$0,\!98 \pm 0,\!07$	$1,\!40\pm0,\!07$	$1,\!46\pm0,\!07$	0,04
	30	$40\pm 6$	$40\pm5$	$1,\!00\pm0,\!18$	$1,\!37\pm0,\!12$	$1,\!48\pm0,\!14$	0,07	$86\pm8$	$83\pm7$	$1,\!04\pm0,\!13$	$1,\!35\pm0,\!12$	$1,\!46\pm0,\!13$	0,07
	90	-	-	-	-	-	-	$92\pm5$	$91\pm5$	$1,02 \pm 0,08$	$1,\!34\pm0,\!07$	$1,\!41 \pm 0,\!08$	0,04
Milho	-	-	-	-	(1,28±0,02)	(1,30± 0,02)	(0,01)	-	-	-	-	-	-
	5	$38\pm5$	$40 \pm 4$	$0,96 \pm 0,17$	$1,15\pm0,10$	$1,25 \pm 0,11$	0,07	$81\pm5$	$80\pm4$	$1,\!01\pm0,\!08$	$1,\!20\pm0,\!07$	$1,\!27\pm0,\!08$	0,04
	10	-	-	-	-	-	-	$85\pm5$	$87 \pm 4$	$0,\!99 \pm 0,\!07$	$1,23 \pm 0,07$	$1,\!30\pm0,\!07$	0,04
	15	$40\pm 6$	$39\pm5$	$1,\!02\pm0,\!21$	$1,\!17\pm0,\!13$	$1,30 \pm 0,14$	0,08	$85\pm5$	$87\pm5$	$0,\!98 \pm 0,\!08$	$1,\!20\pm0,\!07$	$1,\!27\pm0,\!08$	0,05
	30	$46\pm 6$	$44 \pm 5$	$1,\!04\pm0,\!18$	$1,\!20\pm0,\!12$	$1,32 \pm 0,13$	0,08	$91\pm7$	$88\pm7$	$1,\!03\pm0,\!11$	$1,20\pm0,10$	$1,\!29\pm0,\!11$	0,06
	90	-	-	-	-	-	-	$94\pm 5$	$94\pm5$	$1,\!00\pm0,\!07$	$1,\!20\pm0,\!07$	$1,\!26\pm0,\!07$	0,04

**Tabela 10.** Resultados da conversão (%), calculado pelas equações de Gelbard ( $C_G$ ) e Knothe ( $C_K$ ), e do grau de insaturação definido por Morgenstern ( $G_{IM}$ ) e definido no presente trabalho ( $G_I$ ), com as respectivas incertezas propostas, dos produtos de transesterificação.

Fonte do	Tempo de			Razão	molar 1:3					Razão	molar 1:9		
produto	reação (min) <sup>1</sup>	C <sub>G</sub>	C <sub>K</sub>	C <sub>G</sub> / C <sub>K</sub>	G <sub>IM</sub> <sup>1</sup>	G <sub>I</sub> <sup>1</sup>	$\Delta \mathbf{I}^1$	C <sub>G</sub>	C <sub>K</sub>	C <sub>G</sub> / C <sub>K</sub>	G <sub>IM</sub>	GI	ΔΙ
Girassol	-	-	-	-	(1,36 ± 0,05)	(1,41 ± 0,06)	(0,03)	-		-	-	-	
	5	$10\pm3$	$12\pm3$	$0,\!81\pm0,\!30$	$1,\!27\pm0,\!07$	$1,\!34\pm0,\!07$	0,04	$92 \pm 12$	$75\pm 8$	$1,23 \pm 0,21$	$1,\!22\pm0,\!17$	$1,\!38\pm0,\!20$	0,11
	10	-	-	-	-	-	-	$79\pm4$	$73\pm4$	$1,\!08\pm0,\!08$	$0,\!96\pm0,\!06$	$1,\!03\pm0,\!07$	0,04
	5	$29\pm7$	$30\pm 6$	$0,\!98\pm0,\!30$	$1,\!29\pm0,\!15$	$1,\!43\pm0,\!17$	0,10	$89\pm5$	$94\pm5$	$0,95\pm0,08$	$1,\!32\pm0,\!07$	$1,\!39\pm0,\!08$	0,04
	30	$39\pm7$	$37\pm5$	$1,03 \pm 0,24$	$1,\!30\pm0,\!15$	$1,\!43\pm0,\!16$	0,09	$91\pm7$	$88\pm 6$	$1,\!02\pm0,\!11$	$1,\!29\pm0,\!10$	$1,\!38\pm0,\!11$	0,06
	90	-	-	-	-	-	-	$103\pm9$	$97\pm8$	1,06 ± 0,13	1,36 ± 0,12	$1,\!47\pm0,\!13$	0,07
Canola	-	-	-	-	(1,21 ± 0,04)	$(1,25 \pm 0,04)$	(0,02)	-	-	-	-	-	-
	5	$29\pm 6$	$32\pm 6$	$0,\!91\pm0,\!25$	$1,\!11\pm0,\!13$	$1,\!24\pm0,\!14$	0,09	$93\pm5$	$88\pm4$	$1,\!06\pm0,\!07$	$1,\!14\pm0,\!06$	$1,\!21\pm0,\!07$	0,04
	10	-	-	-	-	-	-	$74 \pm 5$	$75\pm5$	$0,\!99\pm0,\!10$	$1,\!13\pm0,\!08$	$1,\!21\pm0,\!09$	0,06
	15	$49\pm7$	$47\pm 6$	$1,04 \pm 0,20$	$1,\!12\pm0,\!13$	$1,\!25\pm0,\!15$	0,09	$90 \pm 1$	$93 \pm 1$	$0,\!97\pm0,\!01$	$1,\!19\pm0,\!01$	$1,20\pm0,01$	0,01
	30	$55\pm8$	$50\pm 6$	$1,10\pm0,20$	$1,\!15\pm0,\!14$	$1,\!28\pm0,\!15$	0,09	$94\pm7$	$87\pm 6$	$1,\!08\pm0,\!11$	$1,\!12\pm0,\!09$	$1,21 \pm 0,10$	0,06
	90	-	-	-	-	-	-	$97\pm8$	$95\pm8$	$1,\!02\pm0,\!12$	$1,\!17\pm0,\!11$	$1,\!28\pm0,\!12$	0,07

**Tabela 10.** Resultados da conversão (%), calculado pelas equações de Gelbard ( $C_G$ ) e Knothe ( $C_K$ ), e do grau de insaturação definido por Morgenstern ( $G_{IM}$ ) e definido no presente trabalho ( $G_I$ ), com as respectivas incertezas propostas, dos produtos de transesterificação (Cont.).

**Tabela 10.** Resultados da conversão (%), calculado pelas equações de Gelbard ( $C_G$ ) e Knothe ( $C_K$ ), e do grau de insaturação definido por Morgenstern ( $G_{IM}$ ) e definido no presente trabalho ( $G_I$ ), com as respectivas incertezas propostas, dos produtos de transesterificação (Cont.).

Fonte do	Tempo de			Razão	molar 1:3					Razão	molar 1:9		
produto	reação (min) <sup>1</sup>	C <sub>G</sub>	C <sub>K</sub>	C <sub>G</sub> / C <sub>K</sub>	G <sub>IM</sub> <sup>1</sup>	G <sub>I</sub> <sup>1</sup>	$\Delta \mathbf{I}^1$	C <sub>G</sub>	C <sub>K</sub>	C <sub>G</sub> / C <sub>K</sub>	G <sub>IM</sub>	GI	ΔΙ
Algodão	-	-	-	-	$(1,17 \pm 0,05)$	(1,22±0,06)	(0,03)	-	-	-	-	-	-
	5	$9\pm 2$	$11 \pm 2$	$0,\!81\pm0,\!18$	$1,\!15\pm0,\!04$	$1,\!19\pm0,\!04$	0,02	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	$102 \pm 5$	$89\pm4$	$1,\!14\pm0,\!07$	$1,\!13\pm0,\!06$	$1,\!19\pm0,\!07$	0,04
	15	-	-	-	-	-	-	$105\pm 6$	$95\pm3$	$1,\!14\pm0,\!08$	$1,\!15\pm0,\!07$	$1,\!22\pm0,\!08$	0,05
P. Manso	-	-	-	-	$(1,18 \pm 0,03)$	$(1,21 \pm 0,03)$	(0,02)	-	-	-	-	-	-
	5	$20\pm 5$	$22\pm 4$	$0,\!92\pm0,\!29$	$1,\!12\pm0,\!11$	$1,\!23\pm0,\!12$	0,07	-	-	-	-	-	-
	30	-	-	-	-	-	-	$90\pm4$	$93 \pm 4$	$0,\!97\pm0,\!06$	$1,\!14\pm0,\!05$	$1,\!19\pm0,\!05$	0,03

<sup>1</sup> Os resultados entre parenteses se referem aos valores dos oleos vegetais. O símbolo – se refere aos dados ausentes.

Quando os valores da razão  $C_G/C_K$  são correlacionados com o rendimento de cada produto (em relação ao  $C_G$ ) e as incertezas são levadas em consideração (**figura 5**), pode ser visto que apenas três dos 37 produtos não representam o valor esperado de 1, mesmo depois da incerteza ter sido levada em consideração. Constatou-se também que dois produtos do óleo de algodão também apresentaram valores de  $C_G/C_K$  distantes de 1, mesmo considerando os valores de incerteza, o que indica que seus produtos também podem ser exceções quando se trata de utilizar uma ou ambas as equações para determinar seus rendimentos.



**Figura 5.** Gráfico de C<sub>G</sub> versus C<sub>G</sub>/C<sub>K</sub>, incluindo as incertezas propostas no presente trabalho, para os produtos dos óleos de: (a) soja (círculos) e milho (triângulos); (b) algodão (triângulos) e pinhão-manso (quadrados) e (c) girassol (círculos) e canola (triângulos).

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H dos produtos de transesterificação do óleo de milho em diferentes graus de conversão encontram-se apresentados na **figura 6**.



**Figura 6.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz,  $CDCI_3$ ) dos produtos de transesterificação do óleo de milho em diferentes graus de conversão: a. 38%; b. 46%; c. 91% e d. 94%.

A partir dos espectros apresentados na **figura 6** fica evidente o aumento da intensidade do sinal da metoxila dos ésteres metílicos (3,7 ppm), e a diminuição dos sinais dos hidrogênios metilênicos do grupo glicerol (4,1- 4,4 ppm), a medida em que se aumenta *Andrade, D. F.* 

a conversão dos produtos de transesterificação do óleo de milho. Ao compararmos os espectros apresentados na **figura 6**, com o espectro do óleo de milho **(figura 3a)** observamos o surgimento do sinal em 3,7 ppm, característico da metoxila dos ésteres metílicos.

#### 6.2.4. Estimativa do teor de insaturados por RMN <sup>1</sup>H

A estimativa do Q<sub>1</sub> dos óleos vegetais, por RMN <sup>1</sup>H, já foi descrita na literatura para os óleos de soja, milho, canola, andiroba (GARCIA, 2006) e girassol (UNGARO *et al.*, 1992). Entretanto, a determinação deste parâmetro, por RMN <sup>1</sup>H, nos óleos de algodão e pinhão-manso ainda não foi apresentada na literatura. Neste trabalho, foi feita a proposição de uma expressão para a determinação do Q<sub>1</sub> e de sua incerteza.

Em 2006, Garcia mostrou que os teores de ácidos graxos insaturados presentes nos óleos de soja, milho, canola e andiroba, obtidos por RMN <sup>1</sup>H, estão em concordância com os resultados obtidos por CG.

A **tabela 11** apresenta os resultados do Q<sub>1</sub> e de sua incerteza, obtidos por RMN <sup>1</sup>H, através das expressões propostas no presente trabalho. Esta tabela também apresenta alguns valores de Q<sub>1</sub> calculados a partir dos dados de composição de AG relatados na literatura (MA, HANNA, 1999, SRIVASTAVA, PRASAD, 2000, DEMIRBAS, 2003 e PINTO *et al.*, 2005).

**Tabela 11.** Resultados do teor de insaturados dos óleos vegetais, estimados por RMN <sup>1</sup>H erelatados na literatura.

Vegetal		%)			
	MA, HANNA, 1999	SRIVASTAVA, PRASAD, 2000	DEMIRBAS, 2003	PINTO <i>et al</i> ., 2005	RMN <sup>1</sup> H
Soja	85	84	84	84	85±4
Milho	86	-	86	92	84±4
Girassol	91	91	91	90	89±4
Canola	95	94	95	86	91±4
Algodão	71	71	70	70	71±4
Pinhão- Manso	-	80 <sup>ª</sup>	-	-	80±4

<sup>a</sup>Fonte: http://www.pinhaomanso.com.br. Teste-t:  $t_{crítico unicaudal} = 1,86$ ;  $t_{calculado} = 0,30$  para Ma, Hanna, 1999; 0,22 para Demirbas, 2003 e 0,12 para Pinto et al., 2005.

Os resultados apresentados na **tabela 11** demonstram que as estimativas dos valores do Q<sub>1</sub> dos óleos, por RMN <sup>1</sup>H, encontram-se em concordância com os dados apresentados na literatura (MA, HANNA, 1999, SRIVASTAVA, PRASAD, 2000, DEMIRBAS, 2003 e PINTO *et al.*, 2005).

Para avaliar, estatisticamente, se os resultados do Q<sub>I</sub> obtidos, por RMN <sup>1</sup>H, através da expressão proposta no presente trabalho, são considerados equivalentes aos relatados na literatura, por Ma, Hanna (1999), Demirbas (2003) e Pinto *et al.* (2005), os resultados foram avaliados pelo test-t. A aplicação do test-t pareado (duas amostras presumindo variâncias equivalentes), demonstrou que os resultados relatados na literatura (MA,

Óleo

HANNA, 1999; DEMIRBAS, 2003 e PINTO *et al.*, 2005) foram considerados estatisticamente equivalentes (P > 0,05) aos obtidos através da equação proposta neste trabalho, por RMN <sup>1</sup>H. Desta forma, pode-se concluir que as expressões propostas no presente trabalho, para a determinação do Q<sub>1</sub> e de sua respectiva incerteza, por RMN <sup>1</sup>H, são adequadas para tal determinação, independente da fonte oleaginosa e do grau de conversão.

#### 6.2.5. Estimativa do grau de insaturação por RMN <sup>1</sup>H

O G<sub>I</sub> influencia o ponto de fusão, ou seja, quanto maior o G<sub>I</sub>, menor será o ponto de fusão dos óleos vegetais. Isso decorre do fato da insaturação entre átomos de carbono (ligações duplas ou triplas) tornar a cadeia carbônica mais rígida, dificultando então o empacotamento das moléculas entre si, aumentando as distâncias intermoleculares, enfraquecendo as forças de atração e por fim diminuindo o ponto de fusão.

Em 2004, Abreu *et al.* mostraram que óleos vegetais com maior G<sub>I</sub> e/ou com ácidos graxos com cadeias de tamanhos menores apresentavam melhores resultados em transesterificação.

Apesar do  $G_1$  dos óleos vegetais já ter sido descrito na literatura (MORGENSTERN *et al.*, 2006), através da RMN <sup>1</sup>H, neste trabalho foi feita a proposição de uma nova expressão para a determinação do  $G_1$  e de uma expressão para a determinação de sua incerteza. O  $G_1$  dos óleos vegetais e de seus produtos de transesterificação, assim como a incerteza dessa medida encontram-se apresentados na **tabela 10 (seção 6.2.3)**.

Para avaliar se os resultados do G<sub>1</sub> dos óleos vegetais e de seus produtos de transesterificação, obtidos através da expressão proposta no presente trabalho, por RMN

#### Andrade, D. F.

<sup>1</sup>H, são considerados equivalentes aos obtidos pela expressão de Morgenstern *et al.*, 2006, os dados foram avaliados estatisticamente usando o teste-t: duas amostras em par para médias. Os valores de  $t_{calculado}$  e  $t_{crítico unicaudal}$  do  $G_I$  dos óleos vegetais são, respectivamente, 3,15 e 1,94. Já os valores de  $t_{calculado}$  e  $t_{crítico unicaudal}$  do  $G_I$  dos produtos de transesterificação dos óleos vegetais são, respectivamente, 10,50 e 1,68.

Os resultados do G<sub>I</sub> dos óleos vegetais e de seus produtos de transesterificação, obtidos por RMN <sup>1</sup>H, através da expressão proposta no presente trabalho, foram considerados estatisticamente equivalentes (P > 0,05) aos resultados obtidos, por RMN <sup>1</sup>H, através da expressão de Morgenstern *et al.* (2006), considerando os valores das incertezas obtidas através da expressão proposta neste estudo. Sendo assim, pode-se afirmar que as equações propostas no presente trabalho, para a determinação do G<sub>I</sub> e de sua respectiva incerteza, por RMN <sup>1</sup>H, representam adequadamente o G<sub>I</sub> dos óleos vegetais e de seus produtos de transesterificação, independente da fonte oleaginosa e do grau de conversão.

Ao analisarmos os resultados do  $G_1$  (tabela 10, seção 6.2.3) obtidos através da expressão proposta, com os valores de I.I. determinado por RMN <sup>1</sup>H (tabela 9, seção 6.2.2), verificamos uma relação direta entre esses parâmetros. Ou seja, quanto maior o  $G_1$  dos óleos vegetais, maior o seu valor de I.I. Desta forma, como o óleo de soja apresentou maior  $G_1$  (1,54 ± 0,09), consequentemente o seu I.I. (123,69) também foi o maior entre os óleos analisados. Já o óleo de pinhão-manso apresentou os menores valores de  $G_1$  (1,21 ± 0,03) e I.I. (101,52), entre os óleos vegetais estudados. Estudou-se a existência de outras correlações entre os parâmetros estudados, entretanto, não verificamos uma relação direta entre os resultados do  $G_1$  e I.I., com os valores de  $Q_1$  apresentados na tabela 11 (seção

#### **6.2.4)**.

Andrade, D. F.

Os resultados da caracterização dos óleos vegetais (soja, milho, girassol, canola, linhaça, algodão e pinhão-manso) e seus produtos de transesterificação, obtidos através da RMN <sup>1</sup>H, foram consolidados no artigo intitulado "Assessment of different measurement methods using 1H NMR data for the analysis of the transesterification of vegetable oils", publicado na revista "Journal of the American Oil Chemists Society" (**Apêndice A**).

#### 6.3. Análise dos óleos vegetais por CLAE

Os óleos vegetais estudados nesta tese foram analisados por CLAE, e os cromatogramas encontram-se na **figura 7**. Observa-se a presença de pequenas quantidades de DAG ( $t_R$  de 10 a 16 min), além dos TAG ( $t_R$  de 16 a 22 min). A notação dos DAG e TAG identificados por CLAE, encontra-se listada na **tabela 6 (seção 5.3.4)**.

Através da integração de todos os picos encontrados nos cromatogramas ilustrados na **figura 7**, calculou-se a área (%) dos picos dos TAG e DAG de cada óleo vegetal analisado, e os resultados encontram-se descritos na **tabela 12**.

Através da **tabela 12**, verifica-se que o óleo de soja apresenta maior intensidade dos sinais de LLLn+OLnLn (NLD 7) e de LLL+OLLn (NLD 6). Já os óleos de milho, girassol e algodão, apresentam maior intensidade dos sinais de LLL+OLLn (NLD 6). O óleo de pinhão-manso apresenta maior intensidade dos sinais de LLL+OLLn (NLD 6) e OLL+OOLn (NLD 5), enquanto o óleo de canola, dos sinais de OLL+OOLn (NLD 5). Estes resultados apresentam uma relação direta com os valores de I.I dos óleos vegetais, estimados por RMN <sup>1</sup>H (**tabela 9, seção 6.2.2**) e demonstra a aplicabilidade do método de CLAE-FRNA em estimar a estabilidade oxidativa dos óleos vegetais.

A partir da **tabela 12** também foi possível verificar características que permitiram classificar os óleos vegetais em quatro classes de perfis, agrupadas segundo os picos majoritários: I) soja (LLLn+OLnLn e LLL+OLLn); II) girassol, milho e algodão (LLL+OLLn); III) pinhão-manso (LLL+OLLn e OLL+OOLn) e IV) canola (OLL+OOLn).



Figura 7. Cromatogramas dos óleos de soja (a), milho (b), girassol (c), canola (d), algodão

(e) e pinhão-manso (f). *Andrade, D. F.* 

Pico	t <sub>RR</sub> (min) <sup>a</sup>	Classe	е	Óleo			
		I		II			IV
		Soja	Girassol	Milho	Algodão	Pinhão-	Canola
						Manso	
LnLn <sup>b</sup>	0,777±0,009	-	-	0,2	0,7	-	-
LLn <sup>b</sup>	0,837±0,005	-	-	-	6,6	-	-
LL <sup>b</sup> +OLn <sup>b</sup>	0,912±0,004	0,4	1,3	0,9	7,7	1,0	-
OL <sup>b</sup>	1,000±0,000	1,1	1,2	1,2	3,1	1,6	-
OO <sup>b</sup>	1,093±0,005	0,5	-	-	0,8	-	-
LnLnLn	0,885±0,003	3,2	-	0,5	-	-	0,5
LLnLn	0,924±0,001	14,5	1,1	2,9	0,5	0,3	1,7
LLLn+OLnLn <sup>c</sup>	0,961±0,001	<u>31,3</u>	29,6	24,8	23,4	17,4	8,8
LLL+OLLn <sup>c</sup>	1,000±0,000	29,0	<u>35,6</u>	<u>35,6</u>	<u>32,1</u>	<u>37,7</u>	18,3
OLL+OOLn <sup>c</sup>	1,037±0,001	14,2	22,3	24,5	19,3	30,6	<u>31,1</u>
OOL	1,075±0,002	4,0	6,0	6,6	3,8	9,9	24,9
000	1,110±0,005	1,3	2,0	2,2	1,4	1,4	11,6
OOG	1,142±0,008	0,5	1,0	0,7	0,6	-	3,0

Tabela 12. Resultados das áreas relativas (%) dos picos dos TAG e DAG, nos óleos vegetais estudados.

<sup>a</sup>t<sub>RR</sub>: tempo de retenção relativo; <sup>b</sup>Os isômeros de posição sn-1,2 e sn-1,3 dos DAG apresentam o mesmo t<sub>RR</sub>. <sup>c</sup>Os pares de TAG apresentam o mesmo t<sub>RR</sub>; Em negrito: picos majoritários; Em negrito e sublinhado: picos de maior área.

#### 6.4. Análise dos produtos de transesterificação por CLAE

Todos os produtos de transesterificação, obtidos nesta tese, foram analisados por CLAE com detecção UV a 205 nm. A **figura 8** ilustra a separação, pelo método da CLAE, entre os acilgliceróis (MAG, DAG e TAG) e os EsMAG, em produtos de transesterificação de baixa conversão. O método foi desenvolvido a partir de uma simplificação no método de Holcapek *et al.* (1999). O método desenvolvido na presente tese empregou um gradiente binário diferentemente do gradiente ternário usado originalmente. Foi observada uma boa resolução analítica tornando-se uma alternativa para o monitoramento da conversão de diferentes óleos vegetais em biodiesel.

No método original (HOLCAPEK *et al.*, 1999), os AG livres eluem anteriormente aos acilgliceróis, mas com o gradiente binário aplicado no presente trabalho, os AGL seriam provavelmente encontrados na região do cromatograma com a eluição dos MAG. Entretanto, os produtos de transesterificação caracterizados no presente trabalho apresentam quantidades não significantes de AGL, uma vez que carbonato de potássio foi empregado como catalisador nas reações, esperando-se que os sais dos ácidos graxos, eventualmente presentes nos óleos aplicados como matéria-prima, não sejam extraídos na síntese aplicada.



**Figura 8.** Cromatograma do produto de transesterificação do óleo de canola com baixa conversão ( $C_G=30\%$ ), em 5 min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:3.

A ordem de eluição dos acilgliceróis está diretamente relacionada com o NCE **(tabela 13),** como é característico da CLAE-FRNA (HOLCAPEK *et al.*, 1999; HOLCAPEK *et al.*, 2001). Nas condições de análise, não houve separação de componentes de mesmo NCE. Desta forma, os isômeros de posição sn-2 e sn-1 dos MAG (como as 1- e 2- monolinoleninas) e os isômeros sn-1,2 e sn-1,3 dos DAG não foram separados. Além dos isômeros sn-1,2 e sn-1,3, dentre os DAG, a dilinoleína também não foi separada do oleoil-linolenoil-glicerol, por terem o mesmo NCE. De mesmo modo, os pares de TAG: dilinoleoil-linolenoil-glicerol/dilinolenoil-oleoil-glicerol (NCE 40), trilinoleína/oleoil-linoleoil-linolenoil-glicerol (NCE 42) e dilinoleoil-oleoil-glicerol/dioleoil-linolenoil-glicerol (NCE 44) também não foram separados. Na literatura encontram-se métodos, por CLAE-FRNA, que permite a identificação e quantificação dos componentes de mesmo NCE (HOLCAPEK *et al.*, 1999),

com um gradiente ternário. Entretanto, para o monitoramento da qualidade do biodiesel, ou seja, para a determinação de MAG, DAG ou TAG, não é necessário a separação de compostos de mesmo NCE. Sendo assim, o método desenvolvido no presente trabalho apresenta condição satisfatória para a separação dos acilgliceróis (MAG, DAG e TAG) do biodiesel (EsMAG). Este método também permite uma boa resolução entre as classes e entre os diferentes EsMAG, conforme pode ser observado na **figura 8** e **tabela 13**.

Na caracterização por CLAE **(tabela 13)**, a identificação dos componentes só foi possível através do equacionamento proposto para o  $t_{RR}$  (**equação 15, seção 5.3.4**). Verificase que a incerteza sobre a identificação do componente é muito menor ao caracterizá-lo pelo  $t_{RR}$ , uma vez que seus desvios-padrão relativos não foram maiores que 1% (com exceção de 2,72%, para a monolinolenina), muito menores que os dos  $t_R$  (até 5%). Desta forma, a quantificação de todos os componentes presentes nas diferentes classes de compostos do biodiesel (MAG, EsMAG, DAG e TAG) se torna, por conseqüência, mais adequada.

Os resultados obtidos por CLAE foram apresentados no trabalho intitulado "Aplicabilidade da cromatografia de alta eficiência no monitoramento da conversão de óleos vegetais para a produção de biodiesel", publicado nos anais do 5º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás (**Apêndice B**).

**Tabela 13.** Notação, tempo de retenção  $(t_R)$ , tempo de retenção relativo  $(t_{RR})$ , número de carbono equivalente (NCE) e número total de carbono (NC) dos componentes identificados, por CLAE-FRNA, nos produtos de transesterificação e nos óleos correspondentes.

Grupos	Notação	t <sub>R</sub>	t <sub>RR</sub>	NCE (NC)
MAG	Ln	4,04±0,17	0,920±0,025	12 (18)
	L*	4,45±0,15	1,000	14 (18)
	0	5,00±0,18	1,122±0,006	16 (18)
EsMAG	MeLn	5,71±0,22	0,886±0,003	- (18)
	MeL*	6,44±0,26	1,000	
	MeO	7,43±0,33	1,156±0,005	
DAG	LnLn	7,94±0,37	0,777±0,009	24 (36)
	LLn	8,58±0,40	0,837±0,005	26 (36)
	LL/ OLn	9,42±0,45	0,912±0,004	28 (36)
	OL*	10,30±0,43	1,000	30 (36)
	00	11,28±0,41	1,093±0,005	32 (36)
TAG	LnLnLn	16,63±0,29	0,885±0,003	36 (54)
	LLnLn	17,35±0,28	0,924±0,001	38 (54)
	LLLn/OLnLn	18,06±0,27	0,961±0,001	40 (54)
	LLL/ OLLn*	18,77±0,26	1,000	42 (54)
	OLL/ OOLn	19,47±0,25	1,037±0,001	44 (54)
	OOL	20,06±0,15	1,075±0,002	46 (54)
	000	20,77±0,14	1,110±0,005	48 (54)
	OOG	21,37±0,14	1,142±0,008	50 (54)

MAG: Monoacilgliceróis; EsMAG: Ésteres metílicos de ácidos graxos; DAG: Diacilgliceróis e TAG: Triacilgliceróis.\*Componentes dos sinais aplicados como referências de tempo de retenção em cada classe correspondente.

Os óleos vegetais utilizados nesta tese, como matéria-prima nas reações de transesterificação, são constituídos majoritariamente por TAG de AG insaturados, conforme resultados descritos na literatura **(tabela 3)** e obtidos, por RMN <sup>1</sup>H, no presente trabalho **(tabela 11)**. Dentre estes, apenas os acilgliceróis derivados dos AG C18 insaturados (oleico, linoleico e linolenico) foram indicados para caracterizar os picos, devido à expectativa de encontrá-los como majoritários dentre os AG que compõem os óleos originais aplicados na presente tese **(tabela 3)**. Para óleos vegetais constituídos de quantidades significativas de outros AG, principalmente os monoinsaturados (palmitoleico, gadoleico, erúcico e nervônico), podería-se encontrar coeluição com os componentes constituídos pelos AG oleico, linoleico, e linolênico. Por exemplo, as monopalmitoleínas (C16:1) poderiam apresentar o mesmo t<sub>R</sub> das monolinoleínas (C18:2), por possuírem o mesmo NCE (14). De mesmo modo, também poderiam ocorrer coeluições entre os alguns DAG e TAG, acarretando perda de seletividade na separação das classes.

Os óleos vegetais utilizados como matéria-prima, nas reações de transesterificação deste trabalho, também apresentam menores quantidades de TAG de AG saturados (láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behênico e lignocérico) **(tabela 3)**. Dentre estes, os AG palmítico (C 16:0) e esteárico (C 18:0) são predominantes. Estes compostos podem ser detectados por espectrometria de massas (HOLCAPEK *et al.,* 2001) e pelo detector evaporativo de espalhamento de luz (HOLCAPEK *et al.,* 2001), mas se detectaria coeluição com os componentes constituídos pelos AG oleico, linoleico e linolênico. Por exemplo, as monopalmitinas (C16:0) apresentariam o mesmo t<sub>R</sub> das monooleínas (C18:1) **(tabela 13)**, uma vez que possuem o mesmo NCE (16). Desta forma, para se obter uma boa resolução cromatográfica entre as diferentes classes (EsMAG, *ANDRADE, D.F.*
MAG, DAG e TAG), havendo visualização dos compostos saturados, tería-se que estender o tempo de análise. Entretanto, empregando detecção UV a 205nm, uma boa resolução entre as classes dos compostos insaturados já foi alcançada com um baixo tempo de análise (25 min).

Através da razão das intensidades dos picos dos EsMAG, MAG, DAG e TAG, nos cromatogramas dos produtos de transesterificação dos óleos vegetais, foi possível verificar características que permitiram classificar estes produtos, em classes de perfis, agrupadas segundo a razão das intensidades dos picos majoritários (MeO:MeL:MeLn): I) soja (1:6:2); II) girassol e milho (1:4:0); III) pinhão-manso (1:3:0) e IV) canola (1:1:1). Os produtos de transesterificação seguiram praticamente a mesma classificação encontrada para os óleos vegetais, conforme apresentado na **seção 6.3**, com exceção para os produtos de transesterificação do óleo de algodão, que apresentou a razão das intensidades dos picos majoritários (MeO : MeL : MeLn) igual a 1: 8: 0.

A classificação dos produtos de transesterificação dos óleos vegetais em classes de perfis cromatográficos é uma valiosa ferramenta para a previsão da fonte oleaginosa empregada no processo de produção do biodiesel. No Brasil, devido à possibilidade do emprego de diferentes fontes oleaginosas para a produção do biodiesel, esta ferramenta não deve oferecer grande aplicabilidade para o controle de qualidade do mesmo. Entretanto, nos países em que as especificações restringem o tipo de oleaginosa que deve ser utilizada na produção de biodiesel, como a soja nos EUA (ASTM D6751, 2002) e a canola na União Européia (EN 14214, 2003), esta ferramenta seria importante para o controle de qualidade do biodiesel, uma vez que permitiria prever a fonte oleaginosa utilizada na produção do biodiesel.

De um modo geral, podemos afirmar que a razão das intensidades dos picos dos EsMAG, DAG e TAG se mantém praticamente constante nos produtos de transesterificação do mesmo óleo vegetal, obtidos em diferentes condições (tempo de reação e razão molar óleo vegetal:metanol). No entanto, esta razão não se mantém nos MAG. Acredita-se que isto possa estar relacionado ao fato dos MAG estarem sendo extraídos na fração glicerínica, causando, portanto, variação na razão das intensidades dos picos destas classes de componentes e/ou pelo fato do gradiente de fase empregado ter sido iniciado com metanol (FRNA) ao lugar de uma composição com água (FR), em condições que a resolução é melhor.

A distinção da razão das intensidades dos picos dos EsMAG, DAG e TAG entre as diferentes oleaginosas e a manutenção desta razão, em uma mesma oleaginosa, a diferentes condições, é uma ferramenta importante para identificação rápida da fonte oleaginosa empregada para produção do biodiesel. Isto porque podemos comparar o perfil dos traços de TAG presentes no biodiesel com o perfil da fonte oleaginosa suspeita ou com o perfil do produto obtido após uma transesterificação rápida, através da comparação com o perfil das diferentes classes presentes (EsMAG, MAG, DAG e TAG).

Para ilustrar a distinção da razão das intensidades dos picos entre as diferentes oleaginosas, apresentaremos a **figura 9**. Já as **figuras 10-13**, ilustram a manutenção da razão das intensidades dos picos de uma mesma oleaginosa, em diferentes condições.

Os cromatogramas obtidos, por CLAE, de todos os produtos de transesterificação dos óleos vegetais, com 15 min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:9, encontram-se apresentados na **figura 9**.

A partir da **figura 9**, observamos que os cromatogramas apresentam além da classe predominante (EsMAG), as classes minoritárias de material não convertido (TAG) e de intermediários da reação (MAG e DAG). Os cromatogramas ilustrados na **figura 9**, apresentam os valores de conversão por RMN <sup>1</sup>H, segundo a expressão de GELBARD *et al.* (1995).

As **figuras 10-13** mostram os cromatogramas, obtidos por CLAE, dos produtos de transesterificação, com diferentes graus de conversão, dos óleos de cada uma das classes: soja (classe I), milho (II), canola (III) e pinhão-manso (IV); de modo a ilustrar a manutenção da razão das intensidades dos picos em cada uma das classes identificadas.

Verifica-se que os produtos de transesterificação, com conversão parcial, dos óleos de soja (figura 10a-g), milho (figura 11a-g), canola (figura 12a-f) e pinhão-manso (figura 13a-b) apresentam em sua composição, além dos acilgliceróis não convertidos (TAG) e dos intermediários da reação (MAG e DAG), o produto da reação (EsMAG). Já os produtos de transesterificação com conversão total dos óleos de soja (figura 10h), milho (figura 11h) e canola (figuras 12g-h) apresentam em sua composição, majoritariamente, a classe dos EsMAG. Desta forma, verifica-se que o perfil cromatográfico dos produtos de transesterificação apresenta relação direta com os valores de conversão determinados por RMN <sup>1</sup>H, através da expressão de Gelbard e*t al.* (1995). Ou seja, à medida que a conversão aumenta, a intensidade dos sinais das classes de MAG, DAG e TAG diminui, e consequentemente, a intensidade dos sinais da classe de EsMAG aumenta. A CLAE pode ser considerada uma ferramenta útil para a previsão de possíveis adulterações do biodiesel pela adição clandestina de óleo vegetal, uma vez que é capaz de diferenciar facilmente os EsMAG (biodiesel) dos TAG (principal constituinte dos óleos vegetais). *ANDRADE, D.F.* 



**Figura 9.** Cromatogramas dos produtos de transesterificação dos óleos de soja (a), milho (b), girassol (c), canola (d), algodão (e) e pinhão-manso (f), com 15 min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:9.



**Figura 10.** Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de soja, com 5 (a), 15 (b) e 30 (c) min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:3 e com 5 (d), 10 (e), 15 (f), 30 (g) e 90 (h) min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:9.



**Figura 11.** Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de milho, com 5 (a), 15 (b) e 30 (c) min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:3 e com 5 (d), 10 (e), 15 (f), 30 (g) e 90 (h) min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:9.



(g) (h) Figura 12. Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de canola, com 5 (a), 15 (b) e 30 (c) min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:3 e com 5 (d), 10 (e), 15 (f), 30 (g) e 90 (h) min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:9.



**Figura 13.** Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de pinhão-manso, com 5 min de reação (a), empregando uma razão molar óleo vegetal:metanol de 1:3 e com 30 min de reação (b) e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:9.

Os perfis cromatográficos do óleo de soja, e seus produtos de transesterificação (figura 10), apresentaram maior intensidade dos sinais de LLLn+OLnLn e de LLL+OLLn. Os perfis cromatográficos do óleo de milho, e seus produtos, apresentaram a intensidade relativa dos componentes de mesma classe identicamente aos óleos de girassol e algodão e seus respectivos produtos de transesterificação (figura 11), sendo que nestes óleos os sinais de maior intensidade foram de LLL+OLLn. Os produtos de transesterificação dos óleos de canola (figura 12) e pinhão-manso (figura 13) apresentaram perfis cromatográficos diferentes dos demais produtos de transesterificação. Estes resultados tem uma relação direta com as caracterizações de I.I dos óleos de partida (tabela 9, seção 6.2.2) e demonstra a aplicabilidade do método de CLAE-FRNA em estimar a estabilidade oxidativa dos produtos de transesterificação. Além disso, a manutenção desta intensidade relativa, entre os componentes de mesma classe, certifica que a conversão nas condições *ANDRADE, D.F.* 

aplicadas não dependeu da natureza do ácido graxo (AG). Com isso, tanto a composição molar relativa entre as classes EsMAG, MAG, DAG e TAG, quanto a conversão do produto pode ser determinado acompanhando apenas os derivados dos AG mais proeminentes nos óleos, ou seja, os derivados dos ácidos oleico, linoleico e linolenico.

Cromatogramas de produtos de transesterificação de alta conversão (> 92%) são apresentados desatenuados na **figura 14**, mostrando que o método proposto permite a detecção e identificação de pequenas quantidades destes contaminantes. Traços destes componentes são encontrados no cromatograma do produto com 92% de conversão, contendo a composição molar de 3,5% MAG, 0,8% DAG e 0,5% TAG. Porém a identificação de DAG e TAG não se tornou possível no cromatograma do produto com 95% de conversão, contendo 5,5% MAG.



**Figura 14.** Cromatogramas ampliados dos produtos de transesterificação com alta conversão a partir dos óleos de soja (a,  $C_G = 92\%$ ) e de canola (b,  $C_G = 95\%$ ) em 90 min com razão molar óleo vegetal: metanol de 1:9.

A quantificação destas classes de acilgliceróis é importante, uma vez que a presença destes contaminantes em teores acima do estabelecido (ASTM D6751, 2002; EN 14214, 2003; ANP, 2008) caracterizam o biodiesel como fora de especificação. Na **figura 14** observou-se majoritariamente a presença da classe de EsMAG (biodiesel), indicando, portanto o potencial deste método no acompanhamento da qualidade do processo de produção do biodiesel.

#### 6.5. Determinação da conversão por CLAE

Os resultados de conversão obtidos por CLAE, através da equação proposta na presente tese (equação 19, seção 5.3.6), foram comparados com os resultados obtidos, por RMN <sup>1</sup>H, seguindo procedimentos descritos na literatura (GELBARD *et al.*,1995; KNOTHE, 2000). A RMN foi empregada, pois vem sendo utilizada com sucesso para o acompanhamento da produção e da qualidade de reações de alcoólise (GELBARD *et al.*,1995; KNOTHE, 2000; NETO *et al.*, 2004; GHESTI *et al.*, 2007; MORGENSTERN *et al.*, 2006; JIN *et al.*, 2007; KNOTHE, 2006; TREVISAN *et al.*, 2008). Desta forma, os 37 produtos de transesterificação, obtidos de diferentes origens e graus de conversão, e portanto, de diferentes composições de cada classe, foram analisados por CLAE e por RMN <sup>1</sup>H, e os resultados encontram-se apresentados na **tabela 14**.

Óleos	Razão molar	Tempo de reação	C <sub>G</sub>	Cκ	C <sub>CLAE</sub>
originais	oleo:metanol	(min)	(%)	(%)	(%)
Soja	1:3	5	29±3	32±4	25±1
		15	13 <b>±</b> 2	15±4	14±1
		30	40±3	40±3	35±1
	1:9	5	81±4	81±4	78±3
		10	81±4	81±4	78±2
		15	83±4	85±4	83±1
		30	86±5	83±4	81±1
		90	92±5	90±4	97±1
Milho	1:3	5	38±3	40±3	40±2
		15	40±3	39±3	39±1
		30	46±3	44±3	41±1
	1:9	5	81±4	80±4	81±1
		10	86±5	86±4	86±1
		15	85±5	87±4	87±1
		30	91±5	88±4	91±1
		90	94±5	94±4	99±1
Girassol	1:3	5	10±2	12±4	11±1
		15	29±3	30±3	30±1
		30	39±3	38±3	35±1
	1:9	5	92±5	75±3	75±1
		10	80±4	73±3	75±1
		15	89±5	94±5	87±1
		30	91±5	89±4	89±1
		90	103±5	97±4	96±1

**Tabela 14.** Resultados de conversão obtidos por CLAE ( $C_{CLAE}$ ) e RMN <sup>1</sup>H, segundo as equações de Gelbard *et al.* ( $C_G$ ) e Knothe ( $C_K$ ).

Óleos	Razão molar	Tempo de reação	C <sub>G</sub>	Cκ	C <sub>CLAE</sub>
originais	oleo:metanol	(min)	(%)	(%)	(%)
Canola	1:3	5	30±3	32±4	22±2
		15	48±3	47±3	35±4
		30	55±4	50±3	45±2
	1:9	5	93±5	88±4	84±1
		10	74±4	74±3	82±1
		15	90±5	92±4	90±1
		30	94±5	87±4	99±1
		90	97±5	95±4	99±1
Algodão	1:3	5	9±2	12±4	9±1
	1:9	10	102±5	90±4	85±1
		15	105±5	94±5	88±1
Pinhão-Manso	1:3	5	20±3	22±3	18±1
	1:9	30	90±5	90±4	90±1

**Tabela 14.** Resultados de conversão obtidos por CLAE ( $C_{CLAE}$ ) e RMN <sup>1</sup>H, segundo as equações de Gelbard *et al.* ( $C_G$ ) e Knothe ( $C_K$ ) (Cont.).

Teste-t: 1,55 entre  $C_{CLAE} \in C_G$ ; 1,20 entre  $C_{CLAE} \in C_K$ ; e t crítico unicaudal = 1,68

Os resultados de conversão obtidos pelos métodos da CLAE, proposto na presente tese, e da RMN <sup>1</sup>H, segundo Gelbard *et al.*, 1995 e Knothe, 2000 **(tabela 14)**, foram comparados usando o teste-t: duas amostras em par para médias. Este teste demonstrou que os métodos foram considerados estatisticamente equivalentes (P > 0,05). Ou seja, pode-se afirmar que a expressão proposta no presente trabalho, para a determinação da conversão por CLAE, representou adequadamente a conversão dos produtos de transesterificação, independente da fonte oleaginosa e do grau de conversão. Este método se mostrou factível para tal determinação, uma vez que os compostos saturados

não precisam contribuir no cálculo de conversão, já que os perfis de MAG, DAG, TAG e EsMAG, obtidos ao longo da conversão, demonstraram que a conversão nas condições ensaiadas, independe do AG combinado à estrutura destes.

#### 6.6. Obtenção de materiais de referência contendo EsMAG, MAG, DAG e TAG

Os seis materiais de referência obtidos nesta tese foram planejados a partir da composição conhecida de cada produto de transesterificação analisado por CLAE e aplicando o método de quadrados mínimos, de modo a obter cromatogramas com alta intensidade das classes de interesse.

O cromatograma simulado do material de referência do biodiesel próximo ao limite da especificação, encontra-se apresentado na **figura 15a**. Este material de referência foi preparado pela mistura 20:80 (v/v) de dois produtos de transesterificação (com conversão previamente determinada na **tabela 20**), a partir dos óleos de canola (5 min de reação; razão óleo:metanol de 1:3) e soja (90 min de reação; razão óleo:metanol de 1:9). O material de referência final foi analisado por CLAE-FRNA resultando no cromatograma ilustrado na **figura 15b**, e sua composição molar foi determinada como sendo de 82±2% de EsMAG; 5±1% de MAG; 6±1% de DAG e 7±1% de TAG.



**Figura 15.** Cromatograma simulado (a) e experimental (b) do material de referência do biodiesel próximo ao limite da especificação, contendo de 82±2% de EsMAG; 5±1% de MAG; 6±1% de DAG e 7±1% de TAG.

O cromatograma simulado do material de referência constituído basicamente por EsMAG encontra-se apresentado na **figura 16a**. Este material de referência foi preparado pela mistura 20:10:70 (v:v:v) de três produtos de transesterificação (com conversão previamente determinada na **tabela 14**), a partir dos óleos de soja, milho e canola, sintetizados a 90 min de reação na razão óleo:metanol de 1:9. O material de referência final foi analisado por CLAE-FRNA resultando no cromatograma ilustrado na **figura 16b**.



**Figura 16.** Cromatograma simulado (a) e experimental (b) do material de referência dos EsMAG. MeO, MeL e MeLn com intensidades na razão 2:4:1.

O produto de transesterificação do óleo de canola (5 min de reação na razão óleo:metanol de 1:3), foi empregado como material de referência dos MAG. As **figuras 17a** e **b**, representam, respectivamente, os cromatogramas simulado e experimental.



**Figura 17.** Cromatograma simulado (a) e experimental (b) do material de referência dos MAG.

O cromatograma simulado do material de referência constituído basicamente por DAG encontra-se apresentado na **figura 18a**. Este material de referência foi preparado *ANDRADE*, *D.F*.

pela mistura 20:60:20 (v:v:v) de três produtos de transesterificação (com conversão previamente determinada na **tabela 14**), a partir dos óleos de soja, milho e canola, sintetizados a 5 min de reação na razão óleo:metanol de 1:3. O material de referência final foi analisado por CLAE-FRNA resultando no cromatograma ilustrado na **figura 18b**.



**Figura 18.** Cromatograma simulado (a) e experimental (b) do material de referência dos DAG. Intensidades na razão 1:4:21:18:2.

O cromatograma simulado do material de referência constituído basicamente por TAG encontra-se apresentado na **figura 19a**. Este material de referência foi preparado pela mistura 90:10 (v:v) dos óleos de soja e milho. O material de referência final foi analisado por CLAE-FRNA resultando no cromatograma ilustrado na **figura 19b**.



**Figura 19.** Cromatograma simulado (a) e experimental (b) do material de referência dos TAG. Intensidades na razão 6:32:72:68:36:10:3:1.

O cromatograma simulado do material de referência de uma matriz padrão, a qual foi submetida à EFS, encontra-se apresentado na **figura 20a**. Este material de referência foi preparado pela mistura 60:40 (v/v) de dois produtos de transesterificação (com conversão previamente determinada na **tabela 14**), a partir dos óleos de soja e canola, e ambos sintetizados a 5 min de reação na razão óleo:metanol de 1:3. O material de referência final foi analisado por CLAE-FRNA resultando no cromatograma ilustrado na **figura 20b**, e sua composição molar foi determinada como sendo de 21±2% MAG, 18±3% EsMAG, 25±1% DAG e 36±3% TAG.



**Figura 20.** Cromatograma simulado (a) e experimental (b) do material de referência da matriz padrão submetida à EFS, contendo 21±2% MAG, 18±3% EsMAG, 25±1% DAG e 36±3% TAG.

Comparando os cromatogramas simulados (planejados) e experimentais nas **figuras 15 a 20**, verifica-se a aplicação dos modelos de momentos estatísticos, representativos da CLAE, na elaboração de misturas que possam ser aplicadas como material de referência. Tal aplicação não possui sucedâneo para este propósito, embora sua aplicação tenha sido satisfatoriamente demonstrada em processos cromatográficos de isolamento de produtos naturais, como no isolamento por CLAE preparativa de carotenóides, taxanos, ginsenosídeos, vitaminas, esteviosídeo (MAZZEI, D'AVILA, 2003; COSTA, 2004), alcalóides (MAZZEI *et al.*, 2002) e piperamidas (SANTOS, 2010).

#### 6.7. Separação e isolamento dos acilgliceróis por EFS

A separação dos acilgliceróis do biodiesel, por EFS, foi investigada através de uma modificação de um método aplicado unicamente para separação de classes lipídicas (Kaluzny *et al.*, 1985).

A eficiência na separação dos principais contaminantes (MAG, DAG e TAG) do biodiesel (EsMAG) é ilustrada nas **figuras 21a e b**, que apresentam os cromatogramas por CLAE das frações eluídas, respectivamente, com *n*-hexano (fração 1) e com clorofórmio:metanol 2:1 (fração 2), ambas obtidas a partir do material de referência **(figura 20b)**.



**Figura 21.** Cromatograma: (a) fração 1, obtida na eluição com *n*-hexano e (b) fração 2, obtida na eluição com clorofórmio:metanol (2:1).

Pode-se observar que a amostra, antes do processo de EFS (figura 20b), apresenta nitidamente quatro classes distintas de compostos (MAG, DAG, TAG e

EsMAG). No entanto, quando esta amostra foi submetida à EFS, onde foi eluída com *n*-hexano (figura 21a), ficou evidente a presença predominante de EsMAG na fração 1, assim como pequenas quantidades de MAG, DAG e TAG (< 1%). Já na fração 2 (figura 21b), fica evidente a presença de quantidades significativas de MAG, DAG e TAG, além de uma pequena quantidade de EsMAG, que não foram completamente eluídos na fração 1.

O efeito de diferentes volumes de *n*-hexano (8, 10 e 12 mL) nos resultados de recuperação e composição de ambas frações foi avaliado **(tabela 15)**. Excelente recuperação dos EsMAG na primeira fração, e dos acilgliceróis na fração 2, foi observada **(tabela 15)** demonstrando que o aumento do volume do solvente na primeira eluição não afetou a eficiência da separação dos acilgliceróis.

**Tabela 15.** Composição e recuperação dos EsMAG e dos acilgliceróis (MAG, DAG e TAG) do biodiesel nas frações eluídas com diferentes quantidades de *n*-hexano, na EFS em fase aminopropilsilano.

Fração	Classe do MR <sup>a</sup>	Volume <i>n</i> -hexano (mL)		Volume <i>n</i> -hexano (mL)			
	-	8	10	12	8	10	12
	-	Composição (%)			Recuperação (%)		
1 <sup>b</sup>	EsMAG	99 ± 1	99 ± 1	99 ± 1	104±10	113±15	130±35
2 <sup>b</sup>	MAG	18 ± 3	17 ± 2	19 ± 3	85±11	86±13	104±15
	DAG	33 ± 1	34 ± 1	32 ± 1	111±16	125±27	127±29
	TAG	48 ± 2	48 ± 1	49 ± 3	112±13	124±25	135±38

<sup>a</sup> $\overline{MR}$ : material de referência constituído de 18 ± 3% de EsMAG; 21 ± 2% de MAG; 25 ± 1 de DAG e 36 ± 3% de TAG. <sup>b</sup>Não foram detectados acilgliceróis na primeira fração e EsMAG na segunda.

O material de referência do biodiesel próximo ao limite da especificação (figura 15), constituído de 82±2% de EsMAG; 5±1% de MAG; 6±1% de DAG e 7±1% de TAG, foi empregado para avaliar os efeitos de carga, correspondente ao volume (200 e 400  $\mu$ L) e à concentração (2, 3 e 5%) da amostra, sobre o processo de EFS, e a composição e a recuperação das frações obtidas foram determinadas (tabela 16). O volume de 8 mL de *n*-hexano foi mantido para a primeira eluição. Na primeira fração eluída, os resultados mostram uma boa recuperação dos EsMAG, chegando a 100% (partindo de 400  $\mu$ L da amostra a 5% p/v), e sem acilgliceróis em quantidades detectáveis (< 0,6%). Na fração 2, chega-se ao enriquecimento de 3 a 6 vezes na composição de acilgliceróis, demonstrando a eficiência do processo.

Os efeitos dos dois fatores estudados (concentração e volume da amostra), isolada e combinadamente, sobre as variáveis dependentes (composição e recuperação das classes de componentes – **tabela 16**) não foram significativos (P > 0,05) durante o processo de EFS. Assim o método pode ser estabelecido dentro dos valores operacionais adotados mantendo a eficiência de separação e o enriquecimento dos acilgliceróis: 200-400µL de amostra a 2-5% p/v em *n*-hexano, eluindo os EsMAG com 8-12 mL de *n*-hexano e eluindo uma fração enriquecida em acilgliceróis com clorofórmio:metanol 2:1.

Os resultados obtidos por CLAE e EFS foram consolidados no manuscrito intitulado "Separação dos Acilgliceróis do Biodiesel por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Extração em Fase Sólida", submetido à Revista Virtual de Química (**Apêndice C**).

Fração	Classe do	Concentração	Composição Molar (%) Volume (µL)		Recuperação (%)		
	MR <sup>a</sup>	Amostra			Volume (µL)		
		(% p/v)	200	400	200	400	
1 <sup>b</sup>	EsMAG	2	99,6±0,3	99,6±0,2	86,3±15,3	84,7±8,5	
		3	99,6±0,4	99,4±0,4	67,0±22,1	75,3±10,1	
		5	99,5±0,3	99,4±0,2	89,3±26,1	100,3±12,4	
2	MAG	2	18,7±3,1	16,3±5,0	156,5±31,8	75,7±9,1	
		3	18,3±6,4	23,3±2,9	91,0±2,8	90,3±0,6	
		5	24,3±5,9	22,0±2,0	105,0±31,1	108,5±9,2	
	EsMAG	2	43,7±11,0	33,3±15,5	19,3±11,5	8,3±6,1	
		3	41,7±16,9	25,7±6,4	7,00±1,0	7,7±2,9	
		5	24,7±2,1	19,7±4,9	8,0±1,7	8,3±4,0	
	DAG	2	19,0±5,3	19,0±2,6	117,0±25,0	77,7±15,3	
		3	19,3±5,7	21,0±3,5	111,7±23,5	88,0±1,7	
		5	21,3±0,6	22,0±1,0	114,5±20,5	122±55,0	
	TAG	2	18,3±3,5	31,0±7,5	110,3±14,4	83,3±4,0	
		3	20,7±5,1	30,7±0,6	93,3±34,5	84,7±11,5	
		5	29,3±5,0	36,0±3,0	120,5±38,9	130,5±13,4	

**Tabela 16.** Composição e recuperação dos EsMAG e dos acilgliceróis (MAG, DAG eTAG) do biodiesel, nas frações eluídas na EFS em fase aminopropilsilano.

<sup>a</sup>MR: material de referência constituído de 82  $\pm$  2% de EsMAG; 5  $\pm$  1% de MAG; 6  $\pm$  1 de DAG e 7  $\pm$  1% de TAG. <sup>b</sup>Não foram detectados acilgliceróis na primeira fração.

# Capítulo 7. Conclusões

## Capítulo 7. Conclusões

As equações propostas, por RMN <sup>1</sup>H, para a determinação do teor de insaturados, do grau de insaturação e incertezas podem ser aplicadas adequadamente na caracterização dos óleos vegetais e seus produtos de transesterificação, independente da fonte oleaginosa.

O método de CLAE, desenvolvido nesta tese, foi proposto para o monitoramento da conversão de diferentes óleos vegetais (soja, milho, girassol, algodão, pinhão-manso e canola) em ésteres metílicos de ácidos graxos, e a conversão foi comparada com as obtidas por RMN<sup>1</sup>H, segundo duas determinações da literatura (Gelbard et al., 1995 e Knothe, 2000). Os resultados de conversão obtidos por RMN <sup>1</sup>H, considerando as incertezas propostas na presente tese, e CLAE não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (P > 0.05), mostrando assim a aplicabilidade da CLAE no monitoramento do processo de produção do biodiesel. Desta forma, o método desenvolvido no presente trabalho é indicado para o acompanhamento do processo de produção do biodiesel, uma vez que é capaz de acompanhar à extensão com que a reação de transesterificação foi processada. Este método permite além da identificação dos ésteres de ácidos graxos, a identificação dos triacilgliceróis (contaminantes remanescente da fonte oleaginosa não transesterificada) e dos intermediários da reação (mono e diacilgliceróis) em uma simples corrida de 25 min. No entanto, a não identificação de compostos saturados, por detecção UV, é considerada a principal desvantagem do método desenvolvido. As principais vantagens do método proposto (CLAE) em comparação ao

método regulamentado (CG) são as baixas temperaturas durante a análise, o que reduz o risco de isomerização de duplas ligações e a não necessidade de reagentes de derivatização, o que reduz o tempo de análise.

O método proposto também pode ser considerado uma ferramenta útil para a previsão de possíveis adulterações do biodiesel pela adição clandestina de óleo vegetal, uma vez que é capaz de diferenciar facilmente os ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel) dos triacilgliceróis. Este método também pode ser empregado na estimativa da estabilidade oxidativa de óleos vegetais e seus produtos de transesterificação, já que as áreas (%) dos componentes majoritários apresentam relação direta com os valores de índice de iodo, estimados por RMN <sup>1</sup>H, segundo metodologia da literatura (REDA, 2004).

As simulações baseadas em modelos cromatográficos, foi uma ferramenta também eficiente em biodiesel. A metodologia inovadora adotada, envolvendo análise e ajuste através do método de quadrados mínimos, pode ser uma proposta para auxiliar o desenvolvimento de um método de análise quantitativa do biodiesel.

O método de separação dos acilgliceróis (mono, di e triacilgliceróis) do biodiesel (EsMAG), através da técnica de extração em fase sólida, proposta na presente tese, levou à obtenção de frações enriquecidas nas principais classes de impurezas (mono, di e triacilgliceróis), mesmo a partir de amostras contendo traços. Desta forma, este método tem potencial para ser aplicado na caracterização química dos principais contaminantes do biodiesel (mono, di e triacilgliceróis), uma vez que os concentra em uma mesma fração, aumentando assim a sensibilidade e portanto, podendo simplificar sua caracterização por métodos analíticos.

## Capítulo 8. Perspectivas Futuras

### Capítulo 8. Perspectivas Futuras

Os resultados obtidos neste trabalho motivam a realização de novas investigações. A seguir são apresentadas algumas perspectivas.

 Comparação dos resultados obtidos por diferentes amostras, através dos métodos proposto (CLAE) e regulamentado (CG) para a determinação dos principais contaminantes (MAG, DAG e TAG) do biodiesel.

 Desenvolvimento de método para análise de misturas de óleo diesel com biodiesel, por EFS, analisando a eficiência de separação biodiesel/diesel.

3) Planejar e executar isolamento de padrões das classes constituintes do biodiesel (MAG, DAG, TAG e EsMAG) a partir do método de EFS acoplado a CLAE em escalas semipreparativas e preparativas, através de transposições cromatográficas.

4) Validar os métodos da CLAE, proposto na presente tese, para a análise de EsMAG, de glicerina combinada (MAG, DAG e TAG) e na determinação da conversão no biodiesel comercial e da EFS, para separar o biodiesel (EsMAG) da glicerina combinada, visando à obtenção de frações enriquecidas nestas classes.

## Referências Bibliográficas

### **Referências Bibliográficas**

ABREU, F.R.; LIMA, D.G.; HAMÚ, E.H.; WOLF, C.; SUAREZ, P.A.Z. Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, v.209, p. 29-33, 2004.

ADLOF, R.O. Analysis of fatty acid mono- and diacylglycerol positional isomers by silver ion high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, v.741, p.135-138, 1996.

ADLOF, R.; LIST, G. Analysis of triglyceride isomers by silver-ion high-performance liquid chromatography. Effect of column temperature on retention times. Journal of Chromatography A, v.1046, p.109-113, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. Resolução n<sup>0</sup> 7, de 19 de março de 2008. Disponível em http://www.anp.org.br. Consultado em 10 de abril de 2009.

AGREN, J.J, JILKUNEN, A.; PENTTILA, I. **Rapid separation of serum lipids for fatty acid analysis by a single aminopropyl column**. Journal of Lipid Research, v.33, p.1871-1876, 1992.

AITZETMÜLLER, K. High-performance liquid chromatographic analysis of partial glycerides and other technical lipid mixtures. Journal of Chromatography A, v.139, p.61-68, 1997.

AKESSON-NILSSON, G. Isolation of chlorinated fatty acid methyl esters derived from cell-culture medium and from fish lipids by using an aminopropyl solid-phase extraction column. Journal of Chromatography A, v.996, p.173-180, 2003.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D6751: **Standard specification for biodiesel fuel (B100) blend stock for distillate fuels**. West Conshohocken, 2002.

ANVISA. Resolução n<sup>0</sup> 482, de 23 de setembro de 1999, **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais**, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p.82-87, 1999.

AOCS, Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists<sup>2</sup> Society, 5<sup>a</sup> edição, AOCS: Champaign, 1998.

ARZAMENDI, G.; ARGUINARENA, E.; CAMPO, I.; GANDÍA, L.M. Monitoring of biodiesel production: Simultaneous analysis of the transesterification products using size-exclusion chromatography. Chemical Engineering Journal, v.122, p.31-40, 2006.

AZEREDO, R.B.V.; COLNAGO, L.A.; SOUZA, A.A.; ENGELSBERRG, M. Continuous wave free precession practical analytical tool for low – resolution nuclear magnetic resonance measurements. Analytica Chimica Acta, v.478, p.313-320, 2003.

BERNHARDT, T.G, CANNISTRARO, P.A, BIRD, D.A, DOYLE, K.M; LAPOSATA, M. **Purification of fatty acid ethyl esters by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography**. Journal of Chromatography B, v.675, p.189-196, 1996.

BODENNEC, J.; KOUL, O; AGUADO, I.; BRICHON, G.; ZWINGELSTEIN, G.; PORTOUKALIAN, J. **A procedure for fractionation of sphingolipid classes by solidphase extraction on aminopropyl cartridges**. Journal of Lipid Research, v.41, p.1524-1531, 2000.

BONDIOLI, P. The preparation of fatty acid esters by means of catalytic reactions. Topics in Catalysis, v.27, p.77-82, 2004.

BOSQUE, F.; LACOSTE, F.; MORDRET, F. Identification of rapeseed methyl esters incorporated in gas oil by liquid chromatography - gas chromatography coupling. Oleagineux Corps Gras Lipides, v.2, p.311-315, 1995.

BYRDWELL, W.C.; EMKEN, E.A. Analysis of triglycerides using atmospheric-pressure chemical ionization mass-spectrometry. Lipids, v.30, p.173-175, 1995.

BYRDWELL, W.C. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. Lipids, v.36, p.327-346, 2001.

CAESAR, P.A, WILSON, S.J, NORMAND, I.C.S.; POSTLE, A.D. A comparison of the specificity of phosphatidylcholine synthesis by human fetal lung maintained in either organ or organotypicculture. Biochemical Journal, v.253, 451-457, 1988.

CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J. **Biodiesel production via acid catalysis**. Transactions of the ASAE, v.42, p.1203-1210, 1999.

CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. Transactions of the ASAE, v.44, p.1429-1436, 2001.

CHEN, J.W.; WU, W.T. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. Journal of Bioscience and Bioengineering, v.95, p.466-469, 2003.

CHRISTIE, W.W. Separation of molecular species of triacylglycerols by highperformance liquid chromatography with a silver ion column. Journal of Chromatography, v.454, p.273-284, 1988.

CIENFUEGOS, F. **Estatística aplicada ao laboratório**. Editora Interciência; Rio de Janeiro, 1<sup>a</sup>. edição, 2005.

CONCEIÇÃO, M.M.; CANDEIA, R.A.; SILVA, F.C.; BEZZERA, A.F.; FERNANDES Jr, V.J.; SOUZA, A.G. **Thermoanalytical characterization of castor oil biodiesel**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.11, p.964-975, 2007.

COSTA, J.L.M. Transposição em escala por modelos na produção de substâncias naturais por cromatografia líquida de alta eficiência. 227p. Tese de Doutorado - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

COSTA NETO, P.R.; ROSSI, L.F.S.; ZAGONEL, G.F.; RAMOS, L.P. Produção de biocombustíveis alternativos ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. Química Nova, v.23, p.531-537, 2000.

COSTA NETO, P.R.; CARO, M.S.B.; MAZZUCO, L.M.; NASCIMENTO, M.G. **Quantification of soybean oil ethanolysis with** <sup>1</sup>**H NMR**. Journal of the American Oil Chemists Society, v.81, p.1111-1114, 2004.

CUNHA, S.C.; OLIVEIRA, M.B.P.P. **Discrimination of vegetable oils by triacylglycerols** evaluation of profile using HPLC/ELSD. Food Chemistry, v.95, p. 518-524, 2006.

CZAUDERNA, M.; KOWALCZYK, J. Separation of some mono-, di- and tri-unsaturated fatty acids containing 18 carbon atoms by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. Journal of Chromatography B, v.760, p.165-178, 2001.

DEMIRBAS, A. **Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: A survey**. Energy Conversion and Management, v.44, p.2093-2109, 2003.

DEUTSCHES INSTITUR FÜR NORMUNG - DIN 14214: Automotive fuels. Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines. Requirements and test methods. [German], 2003.

DIMMIG, T.; RADIG, W.; KNOLL, C.; DITTMAR, T. **[13]C-NMR-Spektroskopie zur** bestimmung von umsatz und reaktionskinetik der umesterung von triglyceriden zu methylestern. Chemische Technik, v.51, p.326-328, 1999.

DI NICOLA, G.; PACETTI, M.; POLONARA, F.; SANTORI, G.; STRYJEK, R. **Development** and optimization of a method for analyzing biodiesel mixtures with non-aqueous reversed phase liquid chromatography. Journal of Chromatography A, v. 1190, p. 120-126, 2008.

DMYTRYSHYN, S.L.; DALAI, A.K.; CHAUDHARI, S.T.; MISHRA, H.K.; REANEY, M.J. Synthesis and characterization of vegetable oil derived esters: evaluation for their diesel additive properties. Bioresource Technology, v.92, p.55-64, 2004.

DORADO, M.P.; ARNAL, J.M.; GÓMEZ, J.; GIL, A.; LOPEZ, F.J. **The effect of a waste vegetable oil blend with diesel fuel on engine performance**. Transactions of the ASAE, v.45, p.519-523, 2002.

EBELER, S.E; SHIBAMOTO, T. Overview and recent developments in solid-phase extraction for separation of lipid classes. *In* Lipid Chromatographic Analysis. T. Shibamoto, editor. Marcel Dekker, New York. p.1-49, 1994.

EBELER, S.E.; EBELER, J. D. **SPE methodologies for the separation of lipids**. Inform 7, p.1094-1103, 1996.

ENCINAR, J.M.; GONZÁLEZ, J.F.; SABIO, E.; RAMIRO, M.J. **Preparation and properties** of biodiesel from Cynara cardunculus L. oil. Industrial & Engineering Chemistry Research, v.38, p.2927-2931, 1999.

ENCINAR, J.M.; GONZÁLEZ, J.F.; RODRÍGUEZ-REINARES, A. **Ethanolysis of used frying oil, biodiesel preparation and characterization**. Fuel Processing Technology, v. 88, p.513-522, 2007.

ENWEREMADU, C.C.; MBARAWA, M.M. **Technical aspects of production and analysis** of biodiesel from used cooking oil – A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.13, p.2205-2224, 2009.

FARIA, A.A.; LELES, M.I.G.; IONASHIRO, M. Estudo da estabilidade térmica de óleos de gorduras vegetais por TAG/DTAG e DTA. Eclética Química, São Paulo, v. 27, p.111-119, 2002.

FLOR, R.V.; HECKING, L.T.; MARTIN, B.D. **Development of high-performance liquid chromatography criteria for determination of grades of commercial olive oils. Part I. The normal ranges for the triacylglycerols**. Journal of the American Oil Chemists<sup>7</sup> Society, v.70, p.199-203, 1993.

FOGLIA, T.A.; JONES, K.C. Quantitation of neutral lipid mixtures using high performance liquid chromatography with light scattering detection. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v.20, p.1829-1838, 1997.

FOGLIA, T.A.; JONES, K.C.; UN<sup>-</sup>EZ, A.; PHILIPS, J.G.; MITTELBACH, M. **Comparison** of chromatographic methods for the determination of bound glycerol in biodiesel. Chromatographia, v.60, p.305-311, 2004.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E.H. **Fatty esters from vegetable oils for use as a diesel fuel**. ASAE Publ. 4-82, Vegetable Oil Fuels, p.117-122, 1982.
FREEDMAN, B.; PRYDE, E.H.; MOUNTS, T.L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. Journal of the American Oil Chemists Society, v.61, p.1638-1643, 1984.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R.O.; PRYDE, E.H. **Transesterification kinetics of soybean oil**. Journal of the American Oil Chemists<sup>2</sup> Society, v. 63, p. 1375-1380, 1986.

GEERAERT, E.; DES CHEPPER, D. **RP-HPLC of the triglycerides and brominated triglycerides**. Journal of High Resolution Chromatography, v.6, p.123-132, 1983.

GELBARD, G.; BRÈS, O.; VARGAS, R.M.; VIELFAURE, F.; SCHUCHARDT, U. F. <sup>1</sup>H Nuclear magnetic resonance determination of the yield of the transesterification of rapeseed oil with methanol. Journal of the American Oil Chemists<sup>2</sup> Society, v.72, p.1239-1241, 1995.

GHESTI, G.F.; MACEDO, J.L.; RESCK, I.S.; DIAS, J.A.; DIAS, S.C.L. **FT-Raman spectroscopy quantification of biodiesel in a progressive soybean oil transesterification reaction and its correlation with** <sup>1</sup>**H NMR spectroscopy methods**. Energy Fuels, v.21, p.2475-2480, 2007.

GIESE, J. Fats, oils, and fat replacers. Food Technology, v.45, p.77-83, 1996.

GIACOMETTI, J.; MILOŠEVIĆ, A.; MILIN, C. Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid classes after their separation by solid-phase extraction. Journal of Chromatography A, v.976, p.47-54, 2002.

GUARIEIRO, L.L.N. Métodos analíticos para quantificar o teor de biodiesel na mistura biodiesel:diesel utilizando espectroscopia na região do infravermelho. 154 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

GUILLÉN, M.D.; RUIZ, A. <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance as a fast tool for determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures. European Journal of Lipid Science Technology, v.105, p. 502-507, 2003.

GUILLÉN, M.D.; RUIZ, A. Edible oils: discrimination by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.83, p.338-346, 2003b.

HAMILTON, J.G.; COMAI, K. Rapid separation of neutral lipids, free fatty acids and polar lipids using prepacked silica sep-pak columns, Lipids, v. 23, p. 1146-1149, 1988.

HEMMING, F.W.; HAWTHORNE, J.N. **Técnicas básicas. In analisis de lipidos**. Acribia:Barcelona, 1999. HÉRON, S.; TCHAPLA, A. Fingerprints of triacylglycerols from oils and fats by HPLC isocratic elution and evaporative light scattering detection, ELSD. Sedex 45, Sedere, Alfortville, 1994.

HÉRON, S.; LESELLIER, E.; TCHAPLA, A. **Analysis of triacylglycerols of borage oil by RPLC identification by coinjection**. Journal of Liquid Chromatography, v.18, p.599-611, 1995.

HÉRON, S.; TCHAPLA, A. Comparison of the responses of triacylglycerols with an evaporative visible light scattering detector used in conventional, micro and capillary liquid chromatography. Journal of Chromatography A, v.848, p.95-104, 1999.

HERSLOF, B.; KINDMARK, G. **HPLC of triglycerides with gradient elution**. Lipids, v.20, p.783-790, 1985.

HOLCAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER J.; PROKES, B. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. Journal of Chromatography A, v.858, p.13-31, 1999.

HOLCAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER J. Analysis of acylglycerols and methyl esters of fatty acids in vegetable oils and in biodiesel. Critical Reviews in Analytical Chemistry, v.31, p.53-56, 2001.

HOLCAPEK, M.; JANDERA, P.; ZDERADICKA, P.; HRUBÁ, L. Characterization of triacylglycerol and diacylglycerol composition of plant oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A, v.1010, p.195-215, 2003.

HOPIA, A.I.; PIIRONEN, V.I.; KOIVISTOINEN, P.E.; HYVONEN, L.E.T. Analysis of lipid classes by solid-phase extraction and high-performance size-exclusion chromatography, Journal of the American Oil Chemists<sup>2</sup> Society, v.69, p. 772-776, 1992.

HOVING, E.B, JANSEN, G.; VOLMER, M., VAN DOORMAAL, J.J; MUSKIET, F.A.J. **Profiling of plasma cholesterol ester and triglyceride fatty acids as their methyl esters by capillary gas chromatography, preceded by a rapid aminopropyl-silica column chromatographic separation of lipid classes**. Journal of Chromatography, v.434, p. 395-409, 1998.

HOYDONCKX, H.E.; DE VOS, D.E.; CHAVAN, S.A.; JACOBS, P.A. Esterification and transesterification of renewable chemicals. Topics in Catalysis, v.27, p.83-96, 2004.

JIN, F.; KAWASAKI, K.; KISHIDA, H; TOHJI, K. MORIYA, T.; ENOMOTO, H. NMR spectroscopic study on methanolysis reaction of vegetable oil. Fuel, v.86, p.1201-1207, 2007.

JOHNSON, L.F; SHOOLERY, J.N. Determination of unsaturation and average molecular weight of natural fats by nuclear magnetic resonance. Analytical Chemistry, v.34, p.1136-1139, 1962.

KALO, P.J.; OLLILAINEN, V.; ROCHA, J.M.; VALCATA, F.X. Identification of molecular species of simple lipids by normal phase liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry, and application of developed methods. International Journal of Mass Spectrometry, v.254, p.106-121, 2006.

KALUZNY, M.A.; DUNCAN, L.A.; MERRITT, M.V.; EPPS, D.E. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. Journal of Lipid Research, v.26, p.135-140, 1985.

KIM, H.Y; SALEM, JR, N. Separation of lipid classes by solid phase extraction. Journal of Lipid Research, v.31, p.2285-2289, 1990.

KNOTHE, G. Rapid monitoring of transesterification and assessing biodiesel fuel quality by near-infrared spectroscopy using a fiber-optic probe. Journal of the American Oil Chemists' Society, v.76, p.795-800, 1999.

KNOTHE, G. Monitoring a progressing transesterification reaction by fiber-optic near infrared spectroscopy with correlation to <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Journal of the American Oil Chemists<sup>2</sup> Society, v.77, p.489-493, 2000. *ANDRADE, D.F.*  KNOTHE, G. Determining the blend level of mixtures of biodiesel with conventional diesel fuel by fiber-optic near-infrared spectroscopy and 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Journal of the American Oil Chemists<sup>2</sup> Society, v.78, p.1025-1028, 2001.

KNOTHE, G. **Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value**. Journal of the American Oil Chemists Society, v.79, p. 847-854, 2002.

KNOTHE, G.; KENAR, J.A. Determination of the fatty acid profile by 1H-NMR spectroscopy. European Journal of Lipid Science and Technology, v.106, p. 88-96, 2004.

KNOTHE, G.; GERPEN, J.V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual de biodiesel**. Editora Blücher; São Paulo, 1<sup>a</sup> edição, 2006.

KNOTHE, G. Analysis of oxidized biodiesel by <sup>1</sup>H-NMR and effect of contact area with air. European Journal of Lipid Science and Technology, v.108, p.493-500, 2006.

KNOTHE, G. Analyzing biodiesel: standards and other methods. Journal of the American Oil Chemists Society, v.83, p.823-833, 2006b.

KOMERS, K.; STLOUKAL, R.; MACHEK, J.; SKOPAL, F. **Biodiesel from rapeseed oil, methanol and KOH. 3. Analysis of composition of actual reaction mixture**. European Journal of Lipid Science and Technology, v.103, p.363-371, 2001. *ANDRADE, D.F.*  KUSDIANA, D.; SAKA, S. Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel as treated in supercritical methanol. Fuel, v.80, p.693-698, 2001.

LAAKSO, P.; VOUTILAINEN, P. Analysis of triacylglycerols by silver-ion highperformance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Lipids, v.31, p.1311-1322, 1996.

LECHNER, M.; BAUER-PLANK, C.; LORBEER, E. **Determination of acylglycerols in vegetable oil methyl esters by on-line normal phase LC-GC**. Journal of High Resolution Chromatography, v.20, p.581-585, 1997.

LI, Z.; GU, T.; KELDER, B.; KOPCHICK, J.J. Analysis of fatty acids in mouse cell using reversed-phase high-performance liquid chromatography. Chromatographia, v.54, p.463-467, 2001.

LIMA, P.C.R. O Biodiesel e a Inclusão Social. Consultoria Legislativa, 2004.

LIN, J.T.; WOODRUFF, C.L.; MCKEON, T.A. **Non-aqueous reversed-phase high performance liquid chromatography of synthetic triacylglycerols and diacylglycerols**. Journal of Chromatography A, v.782, p.41-48, 1997.

LIU, X.; HE, H.; WANG, Y.; ZHU, S.; PIAO, X. Transesterification of soybean oil to biodiesel using CaO as a solid base catalyst. Fuel, v.87, p.216-221, 2008. *ANDRADE*, *D.F.* 

LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPEZ, D. E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D. A.; GOODWIN JR., J. G. **Synthesis of biodiesel via acid catalysis**. Industrial and Engineering Chemistry Research, v. 44, p. 5353-5363, 2005.

MA, F.; HANNA, M.A. **Biodiesel production: A review**. Bioresource Technology, v.70, p.1-15, 1999.

MADRAS, G.; KOLLURU, C.; KUMAR, R. **Synthesis of biodiesel in supercritical fluids**. Fuel, v.83, p.2029-2033, 2004.

MADL, T.; MITTELBACH, M. Quantification of primary fatty acid amides in commercial tallow and tallow fatty acid methyl esters by HPLC-APCI-MS. The Analyst, v.130, p.565-570, 2005.

MARCATO, B.; CECCHIN, G. Analysis of mixtures containing free fatty acids and mono-, di- and triglycerides by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light-scattering detection. Journal of Chromatography A, v.730, p.83-90, 1996.

MÁRQUEZ-RUIZ, G.; JORGE, N.; MARTÍN-POVILLO, M.; DOBARGANES, M.C. **Rapid**, **quantitative determination of polar compounds in fats and oils by solid-phase extraction and size-exclusion chromatography using monostearin as internal standard**. Journal of Chromatography A, v.749, p.55-60, 1996. *ANDRADE*, *D.F*. MAZZEI, J.L.; ROSARIO, S.L.; DE SOUZA E SILVA, R.; SIANI, A.C.; VALENTE, L.M.M.; D'AVILA, L.A. Scale-up of isolation of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by **HPLC using chromatographic model**. Revista de Fitoterapia, v.2, p.289, 2002.

MAZZEI, J.L.; D'AVILA, L.A. Chromatographic models as tools for scale-up of isolation of natural products by semi-preparative HPLC. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v.26, p.177-193, 2003.

MCCORMICK, R.L.; GRABOSKI, M.S.; ALLEMAN, T.L.; HERRING, A.M. Impact of biodiesel source material and chemical structure on emissions of criteria pollutants from a heavy-duty engine. Environmental Science & Technology, v.35, p.1742-1747, 2001.

MEHER, L.C.; SAGAR, D.V.; NAIK, S.N. **Technical aspects of biodiesel production by transesterification – A review**. Renewable & Sustainable Energy Reviews, v.10, p.248-268, 2006.

MILLER, J.C; MILLER, J.N. **Estatística para química analítica**, 2<sup>a</sup> Edição, Addison-Wesley Wilmington: Delaware, USA, 1993.

MITTELBACH, M.; WOERGETTER, M.; PERNKOPF, J.; JUNEK, H. **Diesel fuel derived** from vegetable oils: Preparation and use of rape oil methyl ester. Energy & Agriculture, v.2, p.369-384, 1983. *ANDRADE*, *D.F*. MIYAKE, N., YOKOMIZO, K., MATSUZAKI, N. **Rapid determination of iodine value by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy**. Journal of the American Oil Chemists<sup>7</sup> Society, v.75, p.15-19, 1998.

MIYAKE, Y., YOKOMIZO, K., MATSUZAKI, N. Determination of unsaturated fatty acid composition by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. Journal of the American Oil Chemists' Society, v.75, p.1091-1094, 1998b.

MONTEIRO, M.R.; AMBROZINA, A.R.P.; LIÃO, L.M.; FERREIRA, A.G. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. Talanta, v.77, p.593-605, 2008.

MORETTO, E; FETT, R. **Definição de óleos e gorduras: Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. Editora Livraria Varella; São Paulo, p.144, 1998.

MORGENSTERN, M.; CLINE, J., MEYER, S.; CATALDO, S. Determination of the kinetics of biodiesel production using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>H NMR). Energy & Fuels, v.20, p.1350-1353, 2006.

MURUGESAN, A.; UMARANI, C.; CHINNUSAMY, T.R.; KRISHNAN, M.; SUBRAMANIAN, R.; NEDUZCHEZHAIN, N. **Production and analysis of bio-diesel from non-edible oils – A review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.13, p.825-834, 2009.

NASCIMENTO, M.G.; COSTA NETO, P.R.; MAZZUCO, L.M. **Biotransformação de óleos e gorduras: Utilização de lipases para obtenção de biocombustíveis**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. v.19, p.28-31, 2001.

NASH, A.M.; FRANKEL, E.N. Limited extraction of soybeans with hexane. Journal American Oil Chemists Society, v. 63, p.244-246, 1986.

NEFF, W.E.; ZEITOUN, M.A.M.; WEISLEDER, D. **Resolution of lipolysis mixtures from soybean oil by a solid-phase extraction procedure**. Journal of Chromatography, v.589, p.353-357, 1992.

NEFF, W.E.; BYRDWELL, W.C. Triacylglycerol analysis by high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry: *Crepis alpina* and *Vernonia galamensis* seed oils. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v.18, p.4165-4181, 1995.

NEFF, W.E.; BYRDWELL, W.C. Characterization of model triacylglycerol (triolein, trilinolein and trilinolenin) autoxidation products via high-performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A, v.818, p.169-186, 1998.

NEFF, W.E.; BYRDWELL, W.C.; LIST, G.R. **Triacylglycerol structures of food fats high in saturated acids by HPLC and mass spectrometry**. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v.24, p.837-854, 2001.

NEFF, W.E.; BYRDWELL, W.C.; STEIDLEY, K.R.; LIST, G.R.; SNOWDER, G. **Triacylglycerol structure of animal tallows, potential food formulation fats, by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry**. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v.25, p.985-998, 2002.

NETO, F.R.A; NUNES, D.S.S. **Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins**. Editora Interciência; Rio de Janeiro, 1<sup>ª</sup> edição, 2003.

NETO, P.R.C.; CARO, M.S.B.; MAZZUCO, L.M.; DA GRAÇA DE NASCIMENTO, M. **Quantification of soybean oil ethanolisis with H<sup>1</sup> NMR**. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 81, p.1111-1114, 2004.

NOUREDDINI, H.; ZHU, D. **Kinetics of transesterification of soybean oil**. Journal of the American Oil Chemists<sup>2</sup> Society, v.74, p.1457-1463, 1997.

PÊREZ-CAMINO, M.C.; MOREDA, W.; CERT, A. Determination of diacylglycerol isomers in vegetable oils by solid-phase extraction followed by gas chromatography on a polar phase. Journal of Chromatography A, v. 721, p.305-314, 1996.

PÉREZ-PALACIOS, T.; RUIZ, J.; ANTEQUERA, T. Improvement of a solid phase extraction method for separation of animal muscle phospholipid classes. Food Chemistry, v.102, p.875-879, 2007.

PINKART, H.C.; DEVEREUX, R.; CHAPMAN, P.J. **Rapid separation of microbial lipids using solid phase extraction columns.** Journal of Microbiological Methods, v.34, p.9-15, 1998.

PINTO, A.C.; GUARIEIRO, L.L.N.; REZENDE, M.J.C.; RIBEIRO, N.M.; TORRES, E.A.; LOPES, W.A.; PEREIRA, P.A.P.; ANDRADE, J.B. **Biodiesel: An overview**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.16, p.1313-1330, 2005.

PLANK, C.; LORBEER, E. Minor components in vegetable oil methyl esters I: Sterols in rapeseed oil methyl ester. Fett Wissenschaft Technologie, v,96, p.379-386, 1994.

PLANK, C.; LORBEER, E. On-line liquid chromatography-gas chromatography for the analysis of free and esterified sterols in vegetable oil methyl esters used as diesel fuel substitutes. Journal of Chromatography A, v,683, p.95-104, 1994a.

PLANK, C.; LORBEER, E. Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. Journal of Chromatography A, v.697, p.461-468, 1995.

REDA, S. Y. Estudo comparativo de óleos vegetais submetidos a estresse térmico.
137 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa,
2004.

SAAD, E.B. Etanólise do óleo de milho empregando catalisadores alcalinos e enzimáticos. 115 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2005.

SACCO, A.; BRESCIA, M.A.; LIUZZI, V.; RENIERO, F.; GUILLOU, C.; GHELLI, S.; VAN DER MEER, P. Characterization of Italian olive oils based on analytical and nuclear magnetic resonance determinations. Journal American Oil Chemists<sup>2</sup> Society, v.77, p.619-625, 2000.

SAKA, S.; DADAN, K. Biodiesel fuel from rapessed oil as prepared in supercritical methanol. Fuel, v.80, p.225-231, 2001.

SANDRA, P.; MEDVEDOVICI, A.; ZHAO, Y.; DAVID, F. Characterization of triglycerides in vegetable oils by silver-ion packed-column supercritical fluid chromatography coupled to mass spectroscopy with atmospheric pressure chemical ionization and coordination ion spray. Journal of Chromatography A, v.974, p.231-241, 2002. SANTOS, P.F.P. Isolamento de amidas de Piper ottonoides Yuncher por cromatografia líquida de alta eficiência aplicando a transposição por modelos. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SCHUYL, P.J.W.; JOODE, T. de; VASCONCELLOS, M.A.; DECHATEAU, G.S.M.J.E. Silver-phase high-performance liquid chromatography-elestrospray mass spectrometry of triacylglycerols. Journal of Chromatography A, v.810, p.53-61, 1998.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R.M. **Transesterification of vegetable oils: A review**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.9, p.199-210, 1998.

SCHWAB, A.W.; BAGBY, M.O.; FREEDMAN, B. Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils. Fuel, v.66, p.1372-1378, 1987.

SEMPORE, G.; BEZARD, J. Qualitative and quantitative analysis of peanut oil triacylglycerols by reversed-phase liquid chromatography. Journal of Chromatography, v.366, p.261-282, 1986.

SEMPORÉ, B.G.; BÉZARD, J.A. Separation of monoacylglycerols by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography, v.596, p.185-195, 1992.

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M.N. **Biodiesel preparation by lipase-catalyzed** transesterification of *Jatropha* oil. Energy & Fuels, v.18, p.154-159, 2004.

SHANTA, N.C.; NAPOLITANO, G.E. **Gas chromatography of fatty acids**. Journal of chromatography B, v.624, p.37-51, 1992.

SILVA, C.L.M. Obtenção de ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol. 64 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Spectrometric identification of** organic compounds, 5rd ed. New York: John Wiley & Sons; 1991.

SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. **Triglycerides-based diesel fuels**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.4, p.111-133, 2000.

STAVARACHE, C.; VINATORU, M.; NISHIMURA, R.; MAEDA, Y. Fatty acids methyl esters from vegetable oil by means of ultrasonic energy. Ultrasonics Sonochemistry, v.12, p.367-373, 2005.

STAVARACHE, C.; VINATORU, M.; MAEDA, Y.; BANDOW, H. Ultrasonically driven continuous process for vegetable oil transesterification. Ultrasonics Sonochemistry, v.14, p. 413-417, 2007. *ANDRADE*, *D.F*.

STOLYHWO, A.; COLIN, H.; GUIOCHON, G. Analysis of triglycerides in oils and fats by liquid chromatography with the laser light scattering detector. Analytical Chemistry, v.57, p.1342-1354, 1985.

SUZUKI, E.; SANO, A.; KURIKI, T.; MIKI, T. Improved separation and determination of phospholipids in animal tissues employing solid phase extraction. Biological & Pharmaceutical Bulletin, v.20, p. 299–303, 1997.

TRATHNIGG, B.; MITTELBACH, M. Analysis of triglyceride methanolysis mixtures using isocratic HPLC with density detection. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v.13, p.95-105, 1990.

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

TÜRKAN, A.; KALAY, S. Monitoring lipase catalyzed methanolyses of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Elucidation of the mechanisms of lipases. Journal of Chromatography A, v.127, p.34-44, 2006.

UNGARO, M. R. G.; TOLEDO, N. M. P.; TEIXEIRA, J. P. F.; SUASSUNA FILHO, J. **Determinação do teor de óleo em sementes de girassol pelos métodos de ressonância magnética nuclear e "soxhlet"**. Fitoquímica e Fisiologia de Plantas, v.51, p.1-5, 1992.

VAN DEEMTER, J.J.; ZUIDERWEG, F.J.; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as cases of nonideality in chromatography. Chemical Engineering Sciences, v.5, p. 271-289, 1956.

VIEIRA, S. Introdução à Bioestatística. 3<sup>a</sup> edição. Editora Campus, Rio de Janeiro, 1980.

ZAGONEL, G.F.; PERALTA-ZAMORA, P.; RAMOS, L.P. Multivariate monitoring of soybean oil ethanolysis by FTIR. Talanta, v.63, p.1021-1025, 2004.

ZALIHA, O; CHONG, C.L.; CHEOW, C.S.; NORIZZAH, A.R.; KELLENS, M.J. **Crystallization properties of palma oil by fry fractionation**. Food Chemistry, v.30, p.30-36, 2003.

# Apêndices

# **Apêndices**

### Apêndice A:

Manuscrito intitulado "Assessment of different measurement methods using <sup>1</sup>H NMR

data for the analysis of the transesterification of vegetable oils", publicado na Journal

of the American Oil Chemist's Society (JAOCS).



#### Assessment of different measurement methods using 1H NMR data for the analysis of the transesterification of vegetable oils

Journal:	Journal of the American Oil Chemists Society
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Andrade, Débora; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química Mazzei, José; Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Departamento de Biofísica e Biometria Kaiser, Carlos; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química d'Avila, Luiz; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química
Keywords:	Biodiesel < Biobased Products, Spectroscopy < Lipid Chemistry / Lipid Analysis, Process control < Processing Technology
	-



142

#### Apêndice B:

Trabalho intitulado "Aplicabilidade da cromatografia de alta eficiência no monitoramento da conversão de óleos vegetais para a produção de biodiesel, publicado nos anais do 5º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, no período de 18 a 22 de outubro de 2009, em Fortaleza, Ceará.

# 5° CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



143

#### Apêndice C:

Manuscrito intitulado "Separação dos acilgliceróis do biodiesel por cromatografia líquida de alta eficiência e extração em fase sólida", submetido à *revista virtual de química*.

# Separação dos Acilgliceróis do Biodiesel por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Extração em Fase Sólida

# Andrade, D.F.<sup>\*</sup>; Mazzei, J.L.; d'Avila, L.A.

*Rev. Virtual Quim.,* **2011,**?(?), ?- ?. Data de publicação da Web: ?? de ???? de 2011

#### http://www.uff.br/rvq

# Resumo

Contaminantes no biodiesel podem levar a problemas em motores de combustão. Mono, di e triacilgliceróis (MAG, DAG e TAG), destacam-se como contaminantes do biodiesel puro (B100) produzido da transesterificação dos óleos vegetais. Esses componentes originam da conversão parcial aos ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG). Devido à diversidade de fontes oleaginosas para a produção do biodiesel brasileiro, é imprescindível o monitoramento dos contaminantes, além de seu principal componente (EsMAG), de modo a garantir sua qualidade como combustível. No presente trabalho foi desenvolvido um método alternativo de análise e caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa não aquosa (CLAE-FRNA) dos constituintes do B100 originados de óleos vegetais, a diferentes graus de conversão. Foi proposta a determinação da conversão por CLAE-FRNA. A extração em fase sólida (EFS), utilizando cartuchos de aminopropilsilano, foi desenvolvida para o enriquecimento e separação dos acilgliceróis presentes no biodiesel. A recuperação e a composição em cada fração da EFS foram determinadas por CLA-FRNA. Para esta separação foi planejado um material de referência, contendo intensidades similares de EsMAG, TAG, DAG e MAG, a partir de uma série de métodos matemáticos e simulação cromatográfica. Óleos de soja, linhaça, milho, girassol, algodão e canola foram transesterificados com metanol em refluxo a diferentes condições, levando a 43 produtos aplicados para as investigações. O método em CLAE-FRNA mostrou-se capaz de separar os EsMAG e os acilgliceróis, quanto à classe, tornando-se uma alternativa para o monitoramento da conversão de diferentes óleos vegetais. A determinação da conversão, por CLAE-FRNA, de todos os produtos mostrou-se significativamente (P > 0,05) concordante com os valores determinados por RMN <sup>1</sup>H, tornando-se aplicável no monitoramento do processo de produção do biodiesel, independentemente da conversão e da fonte oleaginosa. Na EFS, os EsMAG eluem seletivamente com o *n*-hexano (chegando a 100% recuperação), enguanto uma fração enriquecida (3-6 vezes) com os acilgliceróis elue com clorofórmio/metanol 2:1. Assim, a EFS pode oferecer alta sensibilidade analítica para a caracterização química do B100. O conjunto das técnicas de CLAE-FRNA e EFS pode ser um novo ponto de partida para desenvolvimento de métodos alternativos de monitoramento da qualidade de biodiesel e para o isolamento dos acilgliceróis para a produção de materiais de referência.

Keywords: Acylglycerols; Biodiesel; HPLC; SPE