



# **Separação e isolamento de ésteres metílicos de ácidos graxos do biodiesel por cromatografia líquida de alta eficiência em escala semipreparativa**

**Daniel Fernandes Coelho**

**Projeto Final de Curso em Engenharia Química**

**Orientadores:**

Cristiane Gimenes de Souza (PRH 20.1-IQ-UFRJ), D.Sc

Débora França de Andrade (DQA-IQ-UFRJ), D.Sc

Luiz Antonio d'Avila (DPO-EQ-UFRJ), D.Sc

Novembro de 2022

# SEPARAÇÃO E ISOLAMENTO DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DO BIODIESEL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM ESCALA

*Daniel Fernandes Coelho*

Projeto final de curso em Engenharia Química submetida ao corpo docente da Escola de Química, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

---

Amaro Gomes Barreto Jr, D.Sc

---

José Luiz Mazzei da Costa, D.Sc

Orientadores:

---

Cristiane Gimenes de Souza, D.Sc

---

Débora França de Andrade, D.Sc

---

Luiz Antonio d'Avila, D.Sc

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Novembro de 2022

Coelho, Daniel F.

Separação e isolamento de ésteres metílicos de ácidos graxos do biodiesel por cromatografia líquida de alta eficiência em escala semipreparativa. /

Daniel Fernandes Coelho, Rio de Janeiro, UFRJ/EQ, 2022

Monografia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2022.

Orientadores: Cristiane Gimenes de Souza e Débora França de Andrade e Luiz Antonio d'Avila.

1.Biodiesel 2.Padrões 3.CLAE-IR 4.Monografia (Graduação-UFRJ/EQ) 5. Cristiane Gimenes de Souza e Débora França de Andrade e Luiz Antonio d'Avila.

I. Separação e isolamento de ésteres metílicos de ácidos graxos do biodiesel por cromatografia líquida de alta eficiência em escala semipreparativa.

**“Não to mandei eu? Esforça-te e tem bom ânimo; não pases, nem te espantes, porque o Senhor, teu Deus, é contigo, por onde quer que andares.”**

**Josué 1:9**

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me abençoado durante toda minha vida, me fortalecendo e me ajudando na busca dos meus objetivos e agradeço Ele por ter me dado a oportunidade de estudar na Universidade e o curso que sempre sonhei.

Aos meus orientadores Luiz Antonio d'Avila cuja mente brilhante ajudou durante o processo de idealização, execução e conclusão deste projeto, a Cristiane Gimenez de Souza e Débora França de Andrade por toda a paciência, sabedoria, direcionamento, ajuda e apoio para a execução desse projeto, sem vocês nada disso seria possível.

A toda minha família e amigos, em especial, meus pais Bianca e Anderson Coelho, meu irmão Mateus Coelho, minha namorada Juliana, minha avó Delma, meus avôs Antônio e João, minha tia avó Vera e meu amigo Thiago Vieira que sempre estiveram ao meu lado me ajudando e me apoiando antes e durante a graduação, nos momentos de alegria e nos momentos de dificuldade. Essa conquista também é de vocês.

Aos companheiros de laboratório e amigos do LABCOM em especial a Renato, Daniel, Renan, Rafael, Lívia, Pamella, Guilherme, Isadora, Karina e Roberta por todas as contribuições a esse trabalho e também por todas as conversas, risadas e ideias que alegravam o dia e tornaram minha caminhada mais leve.

À FUJB pelo incentivo à pesquisa e apoio financeiro.

A todos que participaram de forma direta ou indiretamente deste trabalho.

Resumo do projeto final de curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro Químico.

## **SEPARAÇÃO E ISOLAMENTO DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DO BIODIESEL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM ESCALA SEMIPREPARATIVA**

Daniel Fernandes Coelho

Novembro, 2022

Orientadores: Dra. Cristiane Gimenez de Souza; Dra. Débora França de Andrade; Dr. Luiz Antonio d'Avila.

Tendo em vista o aumento da importância do biodiesel na matriz energética brasileira, a partir de sua inclusão no óleo diesel comercializado no país, torna-se necessário o monitoramento da qualidade deste biocombustível produzido, distribuído e comercializado nos postos de abastecimento a fim de manter a qualidade apresentada em norma. Dessa forma, é notória a importância de análises voltadas para o controle de qualidade do biodiesel. Para tais, utilizam-se padrões das substâncias que compõem esse biocombustível. Todavia, estes padrões possuem elevado custo de aquisição devido à sua alta pureza o que conseqüentemente suscita maior gasto nas análises. Assim, este trabalho propõe empregar a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala semipreparativa, com modo de eluição isocrático, fluxo de 1 mL/min, detector índice de refração, coluna octadecilsilano - C18 (250mm x 4,6 mm, 5 µm), volume de injeção de 10 µL e fases móveis ricas em metanol ou acetonitrila, para a separação e o isolamento, com alta produtividade, dos ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG) como padrões advindos da reação de transesterificação dos óleos de soja, canola, milho e sebo animal. Ademais, empregar-se-á a transposição de escala a fim de que se observe a produtividade em maiores vazões. Foram escolhidas 4 oleaginosas para as análises (soja, canola, milho e sebo animal) visto que as suas respectivas composições em EsMAG são diferenciadas. Além disso, 14 fases móveis foram testadas a partir de estudos de solubilidade. O método proposto mostrou bom desempenho analítico, possibilitando a separação e o isolamento dos EsMAG em todas as fases móveis testadas, de acordo com o tempo de retenção de cada produto de interesse e as resoluções dos picos nos cromatogramas obtidos. A partir dos resultados foi possível concluir que o método proposto possui um grande potencial para a obtenção de padrões de EsMAG, provenientes do biodiesel, apresentando baixo custo.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Reações consecutivas reversíveis para transesterificação dos triacilgliceróis (TAG). Os grupos  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  representam as cadeias hidrocarbônicas do ácido graxo saturado ou insaturado, podendo ser iguais ou diferentes (SANTOS, 2015; ARAUJO, 2017).....2
- Figura 2.** Reação de transesterificação (ARAUJO, 2017). Os grupos  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  representam as cadeias hidrocarbônicas alifáticas saturadas ou insaturadas; podendo ser iguais ou diferentes, e o grupo  $R_4$  representa a cadeia do álcool utilizado.....10
- Figura 3.** Cromatograma da injeção de 100  $\mu$ L de uma mistura dos ácidos linolênico (18:3) e linoleico (18:2); vazão: 5 mL/min; fase móvel: acetonitrila:H<sub>2</sub>O (85:15, v/v), detector: índice de refração (adaptado de SCHOLFIELD, 1975).....13
- Figura 4.** Cromatograma, obtido por CLAE, utilizando 2 colunas C-18 em série; fase móvel: metanol:H<sub>2</sub>O (97:3, v/v); detector: detector evaporativo de espalhamento de luz – ELSD, de diferentes ésteres metílicos de ácidos graxos (C12:0 – ácido láurico; C14:0 – ácido mirístico; C16:0 – ácido palmítico; C18:0 – ácido esteárico; C20:4(n-6) – ácido araquidônico; C20:5(n-3) – ácido 5,8,11,14,17-eicosapentenoico; C16:1 – ácido palmitoleico; C18:1 – ácido oleico; C18:2 – ácido linoleico; C18:2 – ácido linolênico; C20:1 – ácido gadolínico; C22:6(n-3) – ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexenoico) (adaptado de BRAVI; PERRETTI; MONTANARI, 2006).....14
- Figura 5.** Cromatograma, obtido por CLAE, do biodiesel de óleo de soja empregando: (a) detector de índice de refração e (b) detector de ultravioleta (MLn – linolenato de metila; ML – linoleato de metila; MP – palmitato de metila; MO – oleato de metila; MS – estearato de metila) (adaptado de SHANG *et al.*, 2012).....15
- Figura 6.** Cromatograma, obtido por CLAE-UV, do produto de transesterificação do óleo de canola com baixa conversão (30%) (ANDRADE, 2011).....16
- Figura 7.** Isotermas de adsorção da concentração de um componente entre as fases móvel e estacionária: (a) convexa e (b) côncava (reproduzido de COSTA, 2004).....21

<b>Figura 8.</b> Perfis de injeção estudados para a função $f(t_a)$ da expressão genérica (Equação 4) dos modelos de momentos estatísticos: a. pulso imediato (item 3.8.2.1) e b. pulso retangular (item 3.8.2.2) (reproduzido de COSTA, 2004).....	25
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática do método de separação dos EsMAG, MAG, DAG, TAG e Glicerol residual, por EFS, onde o cartucho é constituído da fase estacionária aminopropilsilano, 500 mg, 3 mL, tamanho de partícula 40 $\mu$ m, marca Bond Elut. As fases móveis são constituídas por: <i>n</i> -hexano e clorofórmio:metanol (2:1).....	31
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática do sistema analítico usado na EFS (adaptado de LANÇAS, 2004).....	32
<b>Figura 11.</b> Cromatograma, obtido por CLAE-UV, do produto de transesterificação do óleo de soja, utilizando uma fase móvel composta por metanol e uma solução de <i>i</i> -propanol: <i>n</i> -hexano (5:4, v/v), uma fase estacionária de octadecilsilano de 5 $\mu$ m de diâmetro de partícula e vazão de 1 mL/min (oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3).....	36
<b>Figura 12.</b> Cromatograma, obtido por CLAE-UV, do produto de transesterificação do óleo de canola, utilizando uma fase móvel composta por metanol e uma solução de <i>i</i> -propanol: <i>n</i> -hexano (5:4, v/v), uma fase estacionária de octadecilsilano de 5 $\mu$ m de diâmetro de partícula e vazão de 1 mL/min (oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3).....	37
<b>Figura 13.</b> Cromatograma, obtido por CLAE-UV, do produto de transesterificação do óleo de milho, utilizando uma fase móvel composta por metanol e uma solução de <i>i</i> -propanol: <i>n</i> -hexano (5:4, v/v), uma fase estacionária de octadecilsilano de 5 $\mu$ m de diâmetro de partícula e vazão de 1 mL/min (oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3).....	38

<b>Figura 14.</b> Cromatograma, obtido por CLAE-IR, da fração composta majoritariamente por EsMAG, proveniente do produto de transesterificação do óleo de soja, utilizando uma fase móvel composta por acetonitrila pura, uma fase estacionária de octadecilsilano de 5 µm de diâmetro de partícula e vazão de 1 mL/min (C16:0 – palmitato de metila; C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).....	40
<b>Figura 15.</b> Cromatograma, obtido por CLAE-IR, da fração composta majoritariamente por EsMAG proveniente do produto de transesterificação do óleo de canola, utilizando uma fase móvel composta por acetonitrila pura, uma fase estacionária de octadecilsilano de 5 µm de diâmetro de partícula e vazão de 1 mL/min (C16:0 – palmitato de metila; C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).....	41
<b>Figura 16.</b> Cromatograma, obtido por CLAE-IR, da fração composta majoritariamente por EsMAG, proveniente do produto de transesterificação do óleo de milho, utilizando uma fase móvel composta por acetonitrila pura, uma fase estacionária de octadecilsilano de 5 µm de diâmetro de partícula e vazão de 1 mL/min (C16:0 – palmitato de metila; C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).....	42
<b>Figura 17.</b> Cromatograma, obtido por CLAE-IR, da fração composta majoritariamente por EsMAG, proveniente do produto de transesterificação do sebo animal, utilizando uma fase móvel composta por acetonitrila pura, uma fase estacionária de octadecilsilano de 5 µm de diâmetro de partícula e vazão de 1 mL/min (C16:0 – palmitato de metila; C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).....	43
<b>Figura 18.</b> Cromatogramas, obtidos por CLAE-IR, da fração composta majoritariamente por EsMAG (estearato de metila - C18:0, oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3), proveniente do produto de transesterificação do óleo de soja, variando fases móveis constituídas de acetonitrila (ACN) e água.....	45

**Figura 19.** Cromatogramas, obtidos por CLAE-IR, da fração composta majoritariamente por EsMAG (estearato de metila - C18:0, oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3), proveniente do produto de transesterificação do óleo de soja, variando fases móveis constituídas de metanol e água.....46

**Figura 20.** Cromatograma simulado a partir das condições de diâmetro da coluna: 0,46 cm; vazão: 1 mL/min; diâmetro de partícula: 5 µm e volume de injeção: 0,01 mL, utilizando o modelo de Van Deemter e colaboradores, para condição de acetonitrila pura como fase móvel (C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).....48

**Figura 21.** Cromatograma simulado a partir das condições extrapoladas de diâmetro da coluna: 2,12 cm; vazão: 21 mL/min; diâmetro de partícula: 12 µm e volume de injeção: 12 mL, utilizando o modelo de Sternberg, para condição de acetonitrila pura como fase móvel (C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).....48

**Figura 22.** Cromatograma simulado a partir das condições de diâmetro da coluna: 0,46 cm; vazão: 1 mL/min; diâmetro de partícula: 5 µm e volume de injeção: 0,01 mL, utilizando o modelo de Van Deemter e colaboradores, para condição de 7% volumétrica de H<sub>2</sub>O em acetonitrila como fase móvel (C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila)....49

**Figura 23.** Cromatograma simulado a partir das condições extrapoladas de diâmetro da coluna: 2,12 cm; vazão: 21 mL/min; diâmetro de partícula: 12 µm e volume de injeção: 36 mL, utilizando o modelo de Sternberg, para condição de 7% volumétrica de H<sub>2</sub>O em acetonitrila como fase móvel (C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).....49

**Figura 24.** Cromatograma simulado a partir das condições de diâmetro da coluna: 0,46 cm; vazão: 1 mL/min; diâmetro de partícula: 5 µm e volume de injeção: 0,01 mL, utilizando o modelo de Van Deemter e colaboradores, para condição de 5% volumétrica de H<sub>2</sub>O em metanol como fase móvel (C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).....50

<b>Figura 25.</b> Cromatograma simulado a partir das condições extrapoladas de diâmetro da coluna: 2,12 cm; vazão: 21 mL/min; diâmetro de partícula: 12 µm e volume de injeção: 40 mL, utilizando o modelo de Sternberg, para condição de 5% volumétrica de H <sub>2</sub> O em metanol como fase móvel (C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).....	50
<b>Figura 26.</b> Curva de produtividade das condições transpostas utilizando fases móveis constituídas de diferentes composições de acetonitrila e água.....	52
<b>Figura 27.</b> Curva de produtividade das condições transpostas utilizando fases móveis contituídas de diferentes composições de metanol e água.....	53
<b>Figura 28.</b> Cromatograma, obtido por CLAE-IR, da fração constituída majoritariamente por EsMAG, proveniente do produto de transesterificação do óleo de soja, utilizando acetonitrila:H <sub>2</sub> O (93:7) (v/v) como fase móvel (C16:0 – palmitato de metila; C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).....	54

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição química, em ácidos graxos (% mássica), de alguns óleos vegetais (Adaptado de ANDRADE, 2011).....	6
<b>Tabela 2.</b> Fórmula molecular de alguns ácidos graxos componentes do biodiesel (LEITE <i>et al.</i> , 2013).....	8
<b>Tabela 3.</b> Componentes identificáveis no produto de transesterificação pelo método da CLAE-FRNA (adaptado de ANDRADE, MAZZEI e D'AVILA, 2011).....	30
<b>Tabela 4.</b> Composições (% mássica) dos EsMAG dos produtos de transesterificação dos óleos de soja, milho, canola e sebo animal (adaptado de ANDRADE, 2011).....	39
<b>Tabela 5.</b> Condições transpostas variando fases móveis contínuas de acetonitrila e água.....	51
<b>Tabela 6.</b> Condições transpostas variando fases móveis contínuas de acetonitrila e água.....	52

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1:</b> Cálculo da porosidade total da coluna cromatográfica.....	19
<b>Equação 2:</b> Cálculo do tempo de volume morto.....	19
<b>Equação 3:</b> Equação que relaciona a concentração de soluto interagido com o volume de fase estacionária ( $C_S$ ) e a concentração do mesmo soluto na fase móvel ( $C_M$ ) (ETTRE, 1993).....	22
<b>Equação 4:</b> Cálculo da constante de distribuição linear (ETTRE, 1993).....	22
<b>Equação 5:</b> Cálculo do fator de retenção das substâncias (ETTRE, 1993).....	22
<b>Equação 6:</b> Cálculo da razão de fase (ETTRE, 1993).....	22
<b>Equação 7:</b> Cálculo do fator de transposição direta (MAZZEI; D'AVILA, 2003).....	23
<b>Equação 8:</b> Perfil de concentração na saída da coluna (STERNBERG, 1966).....	25
<b>Equação 9:</b> Função matemática da distribuição de probabilidade que representa os perfis simétricos dos componentes da amostra na fase móvel ao fim da coluna (VAN DEEMTER; ZUIDERWEG; KLINKENBERG, 1956).....	26
<b>Equação 10:</b> Cálculo da variância do pico do cromatograma.....	26
<b>Equação 11:</b> Cálculo do número de pratos da coluna.....	26
<b>Equação 12:</b> Equação que relaciona o comprimento da coluna e altura do prato teórico da coluna para determinado componente.....	26
<b>Equação 13:</b> Equação que representa o perfil dos picos (STERNBERG, 1966).....	26
<b>Equação 14:</b> Equação que representa aproximações racionais ou polinomiais para função erro (ABRAMOWITZ; STEGUN, 1965).....	26
<b>Equação 15:</b> Equação da variável transformada para função erro.....	26
<b>Equação 16:</b> Equação da produtividade.....	34

## LISTA DE SIGLAS

ANP	Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis
B100	Biodiesel puro
C18	Grupo octadecilsilano
CG	Cromatografia Gasosa
$C_m$	Concentração do soluto na fase móvel
$C_s$	Concentração de soluto interagido com o volume de fase estacionária
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
DAG	Diacilgliceróis
DOU	Diário Oficial da União
$d_p$	Diâmetro de partícula da fase estacionária
EFS	Extração em Fase Sólida
ELSD	Detector Evaporativo de Espalhamento de Luz
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EsMAG	Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos
FRNA	Fase Reversa Não Aquosa
GPC	<i>Gel Permeation Chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IR	Índice de Refração
LABCOM	Laboratório de Combustíveis e Derivados de Petróleo da EQ/UFRJ
MeE	Estearato de metila
MeL	Linoleato de metila
MeLn	Linolenato de metila
MeO	Oleato de metila
MeP	Palmitato de metila
MTBE	Éter metil- <i>terc</i> -butílico
NC	Número de Carbonos
NCE	Número de Carbono Equivalente
NLD	Número de Ligações Duplas
TAG	Triacilgliceróis
THF	Tetraidrofurano
$t_a$	Tempo em que o centro de massa do pico sai da coluna

$t_{inj}$	Tempo de injeção
$t_M$	Tempo de volume morto
$t_R$	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
$w_b$	Largura da base do pico
$w_h$	Largura a meia altura

## SUMÁRIO

1.	Introdução.....	1
2.	Objetivos.....	4
2.1	Objetivo geral .....	4
2.2	Objetivos específicos.....	4
3.	Revisão bibliográfica .....	5
3.1	As oleaginosas .....	5
3.2	A produção de ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG) pela reação de transesterificação.....	9
3.3	O emprego da extração em fase sólida (EFS) para a separação dos EsMAG	11
3.4	A análise e separação de EsMAG por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	12
3.5	A cromatografia líquida de alta eficiência .....	18
3.5.1	A porosidade .....	19
3.5.2	O tempo morto .....	19
3.5.3	O tempo de retenção.....	19
3.5.4	As programações de composição da fase móvel .....	20
3.6	O equilíbrio de distribuição em cromatografia líquida.....	21
3.7	A transposição de escala no desenvolvimento de processo por CLAE .....	22
3.7.1	A transposição direta.....	23
3.7.2	A transposição por modelos de momentos estatísticos .....	24
3.7.2.1	A resolução de Van Deemter.....	25
3.7.2.2	A resolução de Sternberg.....	26
4.	Material e Métodos .....	27
4.1	A reação de transesterificação para produção de EsMAG .....	27
4.2	A análise das reações de transesterificação por CLAE .....	28
4.3	O emprego da etapa de extração em fase sólida para separação dos EsMAG presentes no produto de transesterificação .....	31
4.4	O estudo de diferentes constituições de fase móvel para a separação dos EsMAG do produto de transesterificação por CLAE .....	33
4.5	O estudo da produtividade de diferentes composições da fase móvel utilizando modelos matemáticos para a simulação do <i>scale up</i> a fim de produzir os padrões de EsMAG.....	33
4.6	A separação dos EsMAG do produto de transesterificação por CLAE-IR .....	34
5.	Resultados e Discussões .....	35
5.1	A reação de transesterificação para produção de EsMAG .....	35
5.2	A análise das reações de transesterificação por CLAE .....	35

5.3	O emprego da etapa de extração em fase sólida para separação dos EsMAG presentes no produto de transesterificação .....	39
5.4	O estudo de diferentes constituições de fase móvel para separação dos EsMAG do produto de transesterificação por CLAE .....	44
5.5	O estudo da produtividade de diferentes composições da fase móvel utilizando modelos matemáticos para a simulação do scale up a fim de produzir os padrões de EsMAG.....	47
5.6	A separação dos EsMAG do produto de transesterificação por CLAE-IR.....	54
6.	Conclusões.....	55
7.	Perspectivas.....	55
8.	Referências bibliográficas.....	56

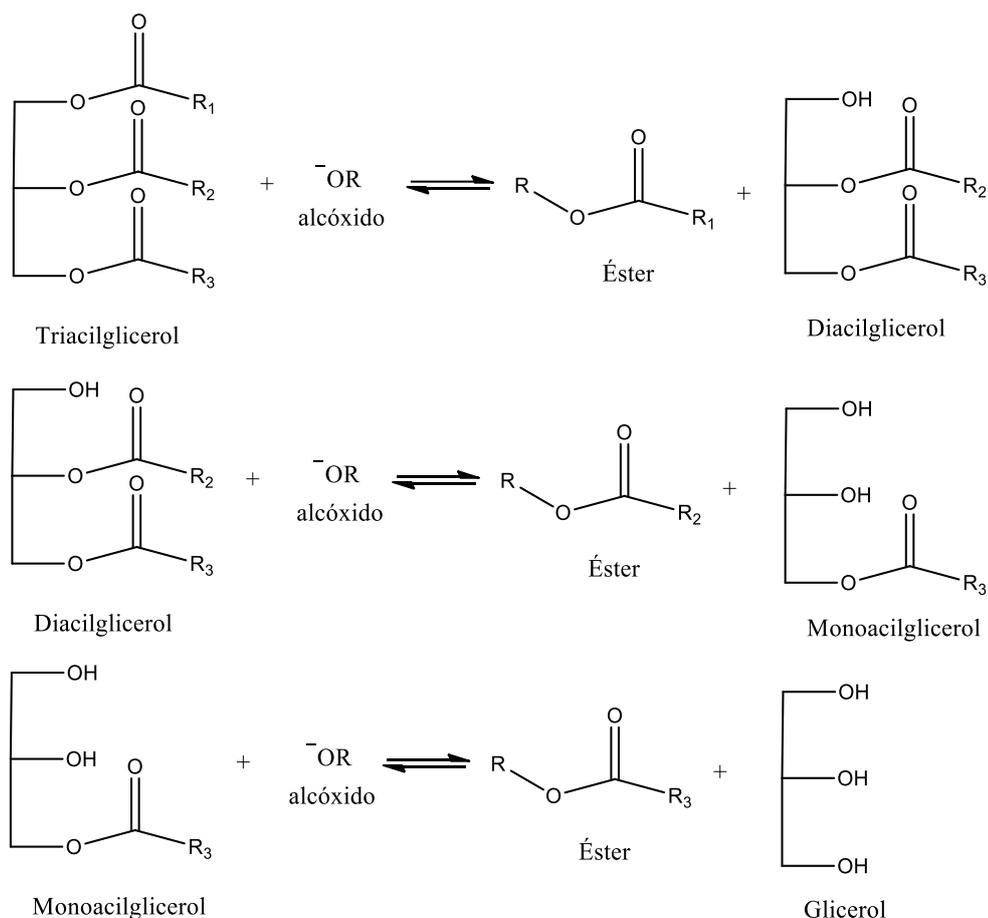
## 1. Introdução

O biodiesel é um biocombustível obtido pela transformação de óleos vegetais, e sebos ou gorduras animais (EMBRAPA, 2008), principalmente, por meio da reação de transesterificação sendo um substituto do diesel de petróleo. Em 2005, foi inserido na matriz energética brasileira, por meio da Lei nº 11.097. Junto à implementação desse biocombustível, foi estabelecido o aumento da sua concentração mínima no óleo diesel comercializado. A Lei nº 13.263/2016 determinou o aumento do percentual volumétrico obrigatório de biodiesel no óleo diesel para 8% volumétrica em 2017, 9% volumétrica em 2018 e 10% volumétrica em 2019. Contudo, a Resolução nº 23 do Conselho Nacional de Pesquisa Energética (CNPE), publicada em 9 de novembro de 2017, antecipou esse processo. Esta resolução determinou que, em 2018, a especificação seria 10% volumétrica de biodiesel no óleo diesel e a resolução nº 621/2019 da ANP determinou que o percentual seria de 11% volumétrica. Porém, devido à situação de pandemia de COVID-19, o teor estabelecido em 2018 se estende até 2022. Embora, de acordo com o calendário original, em 2022, o teor de biodiesel em óleo diesel combustível deveria ser de 13% volumétrica.

Com a finalidade de estabelecer um padrão de qualidade, a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) determina, por meio da Resolução ANP nº 45/2014, as especificações do biodiesel a ser comercializado e por meio da Resolução ANP nº 30/2016 as especificações do óleo diesel a ser comercializado (ANP, 2017).

Diante do constante aumento do teor de biodiesel no óleo diesel e, também, sua perspectiva de crescimento de demanda, torna-se necessário o monitoramento da qualidade deste biocombustível produzido, distribuído e comercializado nos postos de abastecimento a fim de manter o padrão determinado.

Na **Figura 1** é apresentada a reação de transesterificação, por meio da qual o biodiesel é, majoritariamente, produzido no Brasil (SUAREZ, 2016; MEHER; SAGAR; NAIK, 2006).



**Figura 1.** Reações consecutivas reversíveis para transesterificação dos triacilgliceróis (TAG). Os grupos  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$  representam as cadeias hidrocarbônicas do ácido graxo saturado ou insaturado, podendo ser iguais ou diferentes (SANTOS, 2015; ARAUJO, 2017).

A partir da **Figura 1**, observa-se que a transesterificação ocorre por meio de reações sucessivas, tendo como intermediários monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG), além da glicerina como coproduto, com a possibilidade, também, da presença de TAG não reagido. Dessa forma, é notória a importância de análises voltadas para o controle de qualidade do biodiesel. Para tais, utilizam-se padrões das substâncias que compõem esse biocombustível. Todavia, esses produtos possuem elevado custo de aquisição devido à sua alta pureza, o que conseqüentemente suscita maior gasto nas análises. Como por exemplo, 5 g de linolenato de metila da empresa Sigma Aldrich, com alta pureza, custa R\$ 6.396,00. Neste contexto, a obtenção de padrões de EsMAG a partir do biodiesel visa a diminuição de custos na aquisição desses padrões que, geralmente, têm alto valor devido a sua elevada pureza. Sendo assim, a

fim de que seja possível o controle de qualidade do biodiesel e seus componentes, é de extrema relevância que as substâncias que compõem esse biocombustível sejam comparadas com padrões confiáveis e de pureza elevada. Neste contexto, o presente trabalho propõe empregar a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala semipreparativa, para a separação e o isolamento, com alta produtividade, dos ésteres metílicos de ácidos graxos como padrões advindos da reação de transesterificação dos óleos de soja, canola, milho e sebo animal, após separação por extração em fase sólida (EFS). Ademais, empregar-se-á a transposição de escala a fim de que se observe a produtividade em maiores volumes de injeção e vazões.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar condições de separação e isolamento de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes no biodiesel, por cromatografia líquida de alta eficiência, em escala semipreparativa, obtidos a partir da reação de transesterificação dos óleos de soja, milho, canola e sebo animal, após a etapa de separação por extração em fase sólida (EFS).

### 2.2 Objetivos Específicos

Dentre os objetivos específicos do presente projeto, podemos destacar:

1. Obter os produtos de transesterificação de diferentes óleos vegetais (soja, canola e milho) e do sebo animal, para geração de matrizes com diferentes constituições em ésteres metílicos de ácidos graxos;
2. Estudar diferentes composições de fase móvel a fim de obter a melhor condição para a separação dos ésteres metílicos de ácidos graxos, por cromatografia líquida de alta eficiência;
3. Estudar a produtividade de diferentes composições de fase móvel, utilizando modelos matemáticos, para a simulação do *scale-up* para a produção dos padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos;
4. Selecionar a composição de fase móvel que apresente maior produtividade para a obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos: palmitato de metila, C16:0 (MeP); estearato de metila, C18:0 (MeE); oleato de metila, C18:1 (MeO); linoleato de metila, C18:2 (MeL) e linolenato de metila, C18:3 (MeLn).

### 3. Revisão bibliográfica

#### 3.1 As oleaginosas

Tantos os óleos vegetais quanto o sebo bovino e gorduras animais são compostos orgânicos contituídos, majoritariamente, por triacilgliceróis (TAG) de cadeia hidrocarbônica longa. Os TAG presentes nos óleos de origem vegetal são predominantemente formados por ácidos graxos insaturados enquanto o sebo bovino e gordura de origem animal apresentam TAG formados por ácidos graxos predominantemente saturados. A **Tabela 1** mostra a composição química, em ácidos graxos (% mássica), de alguns óleos vegetais e do sebo animal. É possível observar que alguns óleos vegetais são compostos por TAG majoritariamente formados por ácidos graxos saturados e os demais são compostos por TAG majoritariamente formados por ácidos graxos insaturados.

**Tabela 1.** Composição química, em ácidos graxos (% mássica), de alguns óleos vegetais (Adaptado de ANDRADE, 2011).

Óleo Vegetal	C<14	C14:0	C 16:0	C 18:0	C 20:0	C 22:0	C 24:0	C 16:1	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:1	C22:1	C24:1
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
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	-	-
Sebo animal	<4	1,0 – 6,0	20,0 – 37,0	25,0 - 40,0	<1,0	<0,1	-	1,0 – 9,0	31,0 – 50,0	1,0 – 5,0	-	<0,1	-	-

*C14:0 – ácido mirístico; C16:0 – ácido palmítico; C18:0 – ácido esteárico; C20:0 – ácido eicosanóico; C22:0 – ácido beenico; C24:0 - ácido lignocérico; C16:1 – ácido palmitoleico; C18:1 – ácido oleico; C18:2 – ácido linoleico; C18:3 – ácido linolênico; C20:1 – ácido gondóico; C22:1 – ácido erúcico; C24:1 - ácido nervônico*

Os triacilgliceróis são lipídeos e podem se apresentar em mais de um estado físico, dependendo de sua composição e da temperatura à qual estão sujeitos. À temperatura ambiente, por exemplo, o sebo bovino é sólido e o óleo de soja é líquido.

Os lipídios definem um conjunto de substâncias químicas que, ao contrário das outras classes de compostos orgânicos, não são caracterizadas por algum grupo funcional comum, mas sim pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e insolubilidade em água (SOUZA *et al.*, 2007). Além disso, os lipídios são compostos ou derivados de ácidos graxos que têm o potencial de, em uma reação com uma base, formar biodiesel ou sabão.

Há grande diversidade de tipos de óleos vegetais que se diferem em relação às composições de ácidos graxos. A **Tabela 2** mostra o nome do ácido graxo, o nome sistemático, e a relação entre o número de carbonos (NC) e o número de ligações duplas (NLD) e a fórmula molecular de alguns ácidos graxos que estão presentes nos óleos vegetais.

**Tabela 2.** Fórmula molecular de alguns ácidos graxos componentes do biodiesel (LEITE *et al.*, 2013).

Ácido Graxo	Nome sistemático	NC:NLD	Fórmula molecular
Láurico	Ácido Dodecanóico	12:0	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>
Mirístico	Ácido Tetradecanóico	14:0	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
Palmítico	Ácido Hexadecanóico	16:0	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Estearico	Ácido Octadecanóico	18:0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
Aracnídico	Ácido Eicosanóico	20:0	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>
Beénico	Ácido Docosanóico	22:0	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>
Lignocérico	Ácido Tetracosanóico	24:0	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>
Palmitoleico	Ácido <i>cis</i> -9-Hexadecenóico	16:1	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
Oleico	Ácido <i>cis</i> -9-Octadecenóico	18:1	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
Linoleico	Ácido <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-Octadecadienóico	18:2	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
Linolênico	Ácido <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15-Octadecatrienóico	18:3	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
Gondóico	Ácido <i>cis</i> -11-Eicosenóico	20:1	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>
Erúxico	Ácido <i>cis</i> -13-Docosenóico	22:1	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>
Nervônico	Ácido <i>cis</i> -15-Tetracosenóico	24:1	C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>

NC: Número de Carbonos

NLD: Número de ligações duplas

No século XIX, iniciou-se a utilização de óleos vegetais como combustíveis quando Rudolf Diesel inventou os motores a óleo diesel. Na época, os óleos vegetais foram substituídos pelo petróleo e/ou carvão pulverizado, a fim de ter-se motores mais compactos e melhor combustão. Por esse motivo, toda a evolução dos motores utilizou, como base, derivados do petróleo como combustível, e portanto, os motores a diesel utilizados hoje em dia não suportam a utilização de óleo vegetal puro como combustível (MOTA *et al.*, 2009).

Voltou-se a considerar a possibilidade de utilizar os óleos vegetais como combustíveis com o aumento do preço dos derivados do petróleo, juntamente ao aumento de uma consciência sustentável. Alguns testes bem sucedidos foram utilizando óleo vegetal como combustível com algumas modificações no motor a diesel, porém, não houve um estudo a longo prazo, à época, para estudar a continuidade do funcionamento dessas operações. Os testes indicavam que o motor era capaz de continuar funcionando adicionando 10%, em volume de óleo vegetal ao óleo diesel (NARAYAN, 2002; PRAMANIK, 2003).

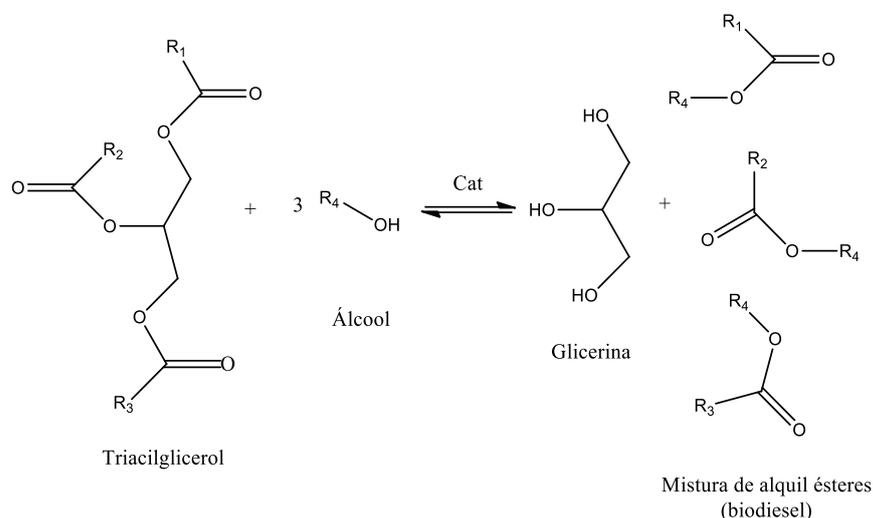
Sabe-se atualmente que o uso do óleo vegetal puro ou sua mistura com o óleo diesel é prejudicial para o motor a diesel. Essa incompatibilidade ocorre devido a alta viscosidade do óleo, que pode obstruir os bicos injetores no motor, a sua composição ácida, o teor alto de ácidos graxos livres, a possível polimerização durante o processo de combustão ou durante o armazenamento, depósitos de carbono, espessamento do óleo lubrificante devido a contaminação com óleo vegetal, tornando o sistema de lubrificação ineficiente, dentre outros problemas (YUSUF *et al.*, 2011; CORGOZINHO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2016).

Para minimizar os efeitos da alta viscosidade do óleo vegetal, empregou-se a transesterificação desse óleo. A reação de transesterificação do óleo vegetal forma uma mistura de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, chamado de biodiesel. Hoje, o biodiesel está inserido na matriz energética brasileira não como substituto completo do óleo diesel, mas como um aditivo ao óleo diesel, que não afeta de forma negativa o desempenho do motor a diesel, como uma mistura com o óleo vegetal puro poderia, eventualmente, fazer (BROUCK, 2012).

### **3.2 A produção de ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG) pela reação de transesterificação**

A reação de transesterificação utilizada para a obtenção do biodiesel ocorre por meio da transformação de triacilgliceróis, na presença de um catalisador ácido ou básico e de um álcool de cadeia curta, em ésteres de ácidos graxos, tendo como coproduto o glicerol ou glicerina (DEMIRBAS, 2007). A utilização de catalisadores básicos é mais comum, sendo o KOH e o NaOH os mais usuais, visto que os

catalisadores ácidos compartilham de uma cinética lenta e problemas de corrosão. Já no caso de um catalisador básico a limitação é a possibilidade de saponificação (SUAREZ *et al.*, 2015). A reação de transesterificação para produção de biodiesel é mostrada na **Figura 2**.



**Figura 2.** Reação de transesterificação (ARAUJO, 2017). Os grupos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> representam as cadeias hidrocarbônicas alifáticas saturadas ou insaturadas; podendo ser iguais ou diferentes, e o grupo R<sub>4</sub> representa a cadeia do álcool utilizado.

A reação de transesterificação ilustrada na **Figura 2**, ocorre em três etapas como representado na **Figura 1**.

Na primeira etapa, o triacilglicerol (TAG) reage com a primeira molécula de álcool (na presença do catalisador) dando origem a uma molécula de éster de ácido graxo (biodiesel) e uma de diacilglicerol (DAG). Na segunda etapa, o diacilglicerol igualmente reage com a segunda molécula de álcool (na presença do catalisador) dando origem a uma segunda molécula de éster de ácido graxo (biodiesel) e uma molécula de monoacilglicerol (MAG). Na última etapa, o monoacilglicerol também reage com outra molécula de álcool dando origem a uma terceira molécula de éster de ácido graxo (biodiesel) e uma molécula de glicerol, que é o coproduto da reação (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2016).

A transesterificação é uma reação reversível. No caso da reação ilustrada na **Figura 2** isso é desprezível já que o coproduto (glicerina) não é solúvel no produto de interesse (biodiesel). Para evitar esse processo e o deslocamento do equilíbrio da

reação no sentido a favorecer a formação do biodiesel, utiliza-se excesso de álcool na reação de transesterificação para produção de ésteres de ácidos graxos (SCHWAB; BAGBY; FREEDMAN, 1987).

### **3.3 O emprego da extração em fase sólida (EFS) para a separação dos EsMAG**

A EFS é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, todavia emprega-se uma pequena coluna aberta, denominada cartucho, que contém a fase estacionária (LANÇAS, 2004).

Trabalhos descritos na literatura mostram que a EFS pode ser usada como uma técnica pré-cromatográfica e pré-espectroscópica no tratamento de amostras para posterior análise em espectroscopia na região do UV, em CG e em CLAE (RUIZ-GUTIÉRREZ, PÉREZ-CAMINO, 2000).

A aplicação da EFS para a separação e o isolamento de compostos lipídicos neutros e polares vem 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).

Em 2011, Andrade *et al.* desenvolveram um método para a separação entre EsMAG e glicerina combinada (MAG, DAG e TAG) presentes no biodiesel (B100), produzido a partir de óleos de diferentes oleaginosas, por EFS, utilizando cartuchos de aminopropilsilano. Neste trabalho, as frações obtidas por EFS, foram caracterizadas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa não aquosa (CLAE-FRNA) com detector UV a 205 nm. Os EsMAG foram eluídos utilizando *n*-hexano como solvente e a glicerina combinada foi eluída utilizando uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v/v). A EFS obteve alta recuperação e permitiu a separação do biodiesel de seus principais contaminantes. Para essa separação dos EsMAG, o *n*-hexano foi empregado em um fluxo constante, visto que esses ésteres possuem mais interação com a fase móvel do que a sólida. Dessa forma, os TAG, DAG, MAG e o glicerol residual, continuam ligados à fase sólida enquanto o analito de interesse é

isolado da amostra (ANDRADE, 2011). A recuperação dos TAG, DAG, MAG e glicerol residual resulta da aplicação de clorofórmio:metanol (2:1) como fase móvel, ou seja, a composição restante do biodiesel que permanecia em interação com a fase sólida passa a ter maior interação com a fase móvel, desorvendo-se do material componente do cartucho da extração.

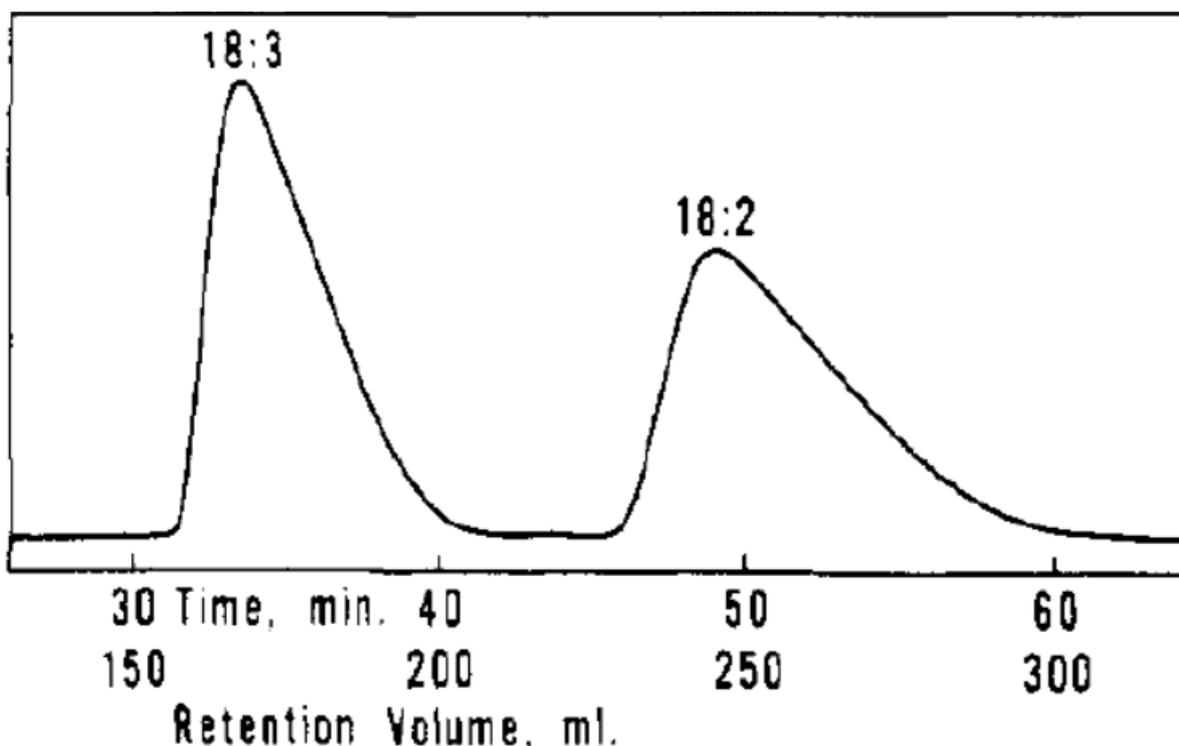
Em 2019, Muniz *et al.* desenvolveram um método para a separação entre os EsMAG e os acilgliceróis (MAG, DAG e TAG) presentes no biodiesel. A separação foi realizada empregando a etapa de extração em fase sólida e a quantificação dos gliceróis empregando a espectrofotometria, mediante uso de um kit enzimático comercial. Empregou-se um cartucho constituído de fase estacionária de aminopropilsilano. Os EsMAG foram eluidos utilizando *n*-hexano como solvente e a glicerina combinada foi eluída utilizando uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1) (v/v).

Outrossim, além de isolar os EsMAG das outras frações do biodiesel, é possível separar o glicerol livre tanto dos ésteres quanto da mistura de MAG, DAG e TAG. Esse método utilizou igualmente um cartucho de aminopropilsilano como fase estacionária, entretanto utilizou-se 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM para eluição do glicerol livre e uma mistura de 6 mL de éter de petróleo, 17 mL de 25% éter etílico em éter de petróleo e 20 mL de éter etílico para eluição dos EsMAG, MAG, DAG e TAG (COZENDEY *et al.*, 2021).

### **3.4 A análise e separação de EsMAG por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

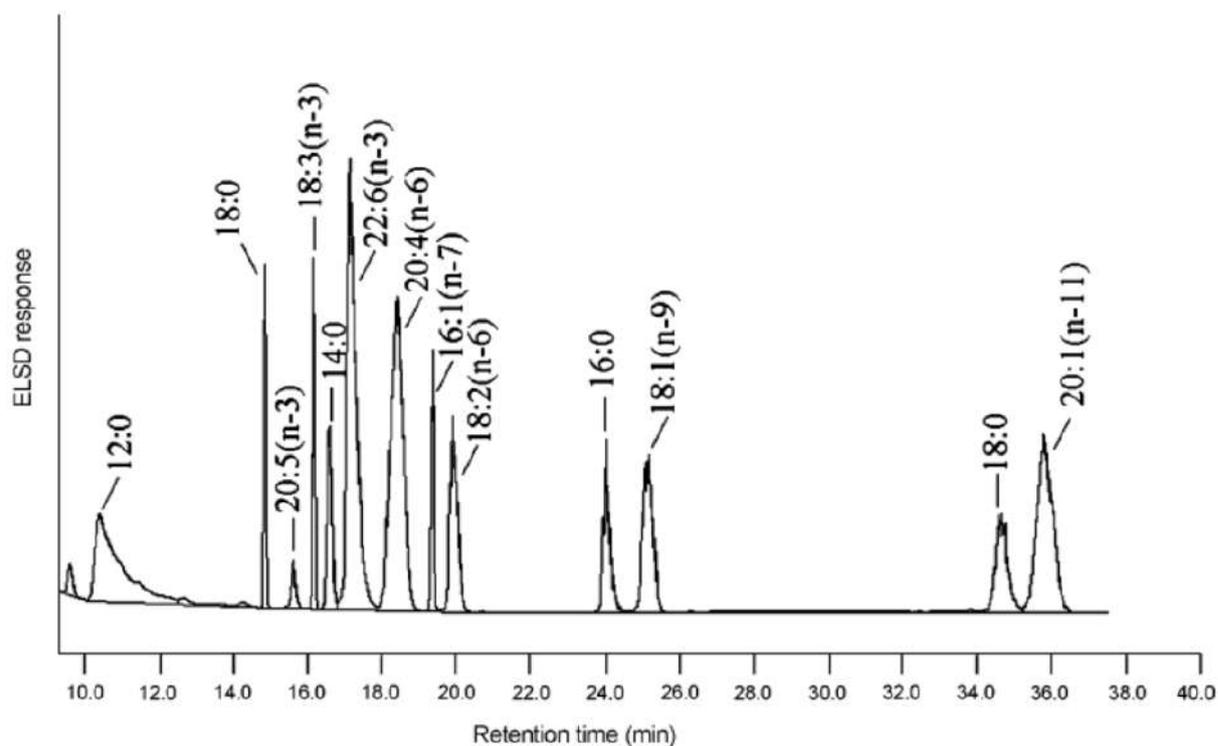
As análises por CLAE são realizadas, geralmente, em colunas que possuem a fase estacionária compactada em coluna de aço inoxidável, com diâmetro interno variando entre 0,45 e 2,2 cm e com comprimento variando entre 10 e 30 cm, dependendo do objetivo da separação. Os detectores mais comuns são o detector de absorção no ultravioleta (UV), de fluorescência, de índice de refração e eletroquímicos (HOLCAPEK *et al.*, 1999; ARAUJO, 2017). A CLAE requer apenas que a amostra a ser analisada seja solúvel em sua fase móvel para que a análise seja possível, o que a torna uma técnica ideal para a separação de espécies iônicas, produtos biológicos e todo tipo de espécies termicamente sensíveis ou instáveis (CARDOSO, 2012).

A partir da revisão bibliográfica realizada ao longo do projeto, foi possível identificar, de acordo com Scholfield, em 1975, uma boa separação entre os EsMAG de interesse do trabalho utilizando-se uma mistura de acetonitrila:H<sub>2</sub>O (85:15, v/v) como fase móvel na CLAE e modo de eluição isocrático, conforme pode ser observado na **Figura 3**.



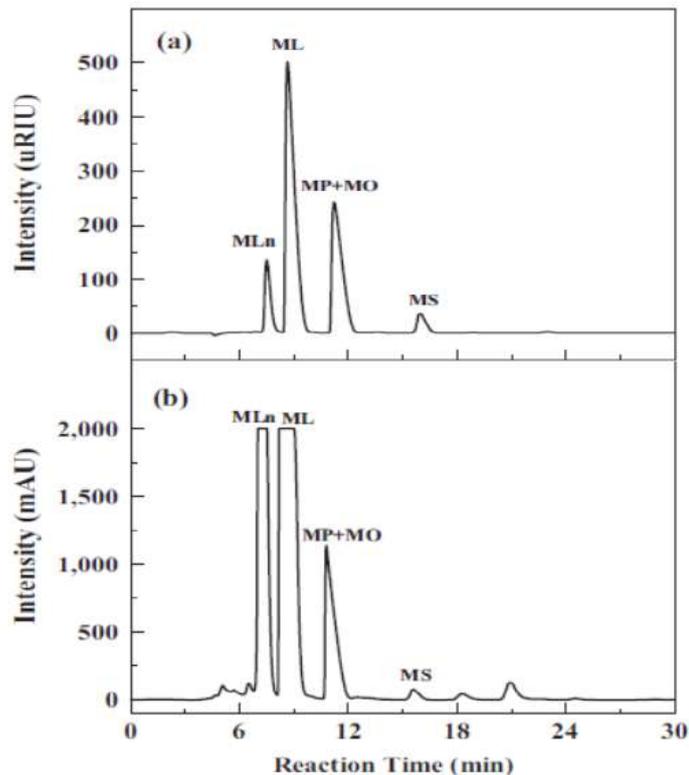
**Figura 3.** Cromatograma da injeção de 100 µL de uma mistura dos ácidos linolênico (18:3) e linoleico (18:2); vazão: 5 mL/min; fase móvel: acetonitrila:H<sub>2</sub>O (85:15, v/v), detector: índice de refração (adaptado de SCHOLFIELD, 1975).

Além disso, Bravi, Perretti e Montanari, em 2006, utilizou uma mistura de metanol:H<sub>2</sub>O (97:3, v/v), como fase móvel na CLAE, a qual apresentou igualmente boa separação entre os diferentes EsMAG estudados, incluindo os de interesse do presente trabalho (estearato, oleato, linoleato e linolenato de metila), embora nota-se um erro em relação ao estearato de metila, o qual aparece duas vezes no mesmo cromatograma, porém sabe-se que é o último dos EsMAG de interesse a ser eluído da coluna, conforme mostra a **Figura 4**.



**Figura 4.** Cromatograma, obtido por CLAE, utilizando 2 colunas C-18 em série; fase móvel: metanol:H<sub>2</sub>O (97:3, v/v); detector: detector evaporativo de espalhamento de luz – ELSD, de diferentes ésteres metílicos de ácidos graxos (C12:0 – ácido láurico; C14:0 – ácido mirístico; C16:0 – ácido palmítico; C18:0 – ácido esteárico; C20:4(n-6) – ácido araquidônico; C20:5(n-3) – ácido 5,8,11,14,17-eicosapentenoico; C16:1 – ácido palmitoleico; C18:1 – ácido oleico; C18:2 – ácido linoleico; C18:2 – ácido linolênico; C20:1 – ácido gadolínico; C22:6(n-3) – ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexenoico) (adaptado de BRAVI; PERRETTI; MONTANARI, 2006).

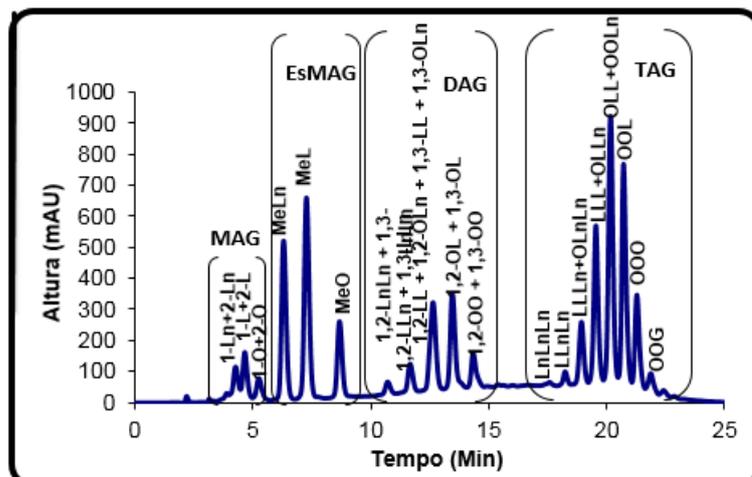
Shang *et al.*, em 2012, demonstrou que a acetonitrila possui um grande potencial para a separação de diferentes EsMAG (C18:0 – Estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila) em uma corrida cromatográfica, conforme pode ser observado pela **Figura 5**.



**Figura 5.** Cromatograma, obtido por CLAE, do biodiesel de óleo de soja empregando: (a) detector de índice de refração e (b) detector de ultravioleta (MLn – linolenato de metila; ML – linoleato de metila; MP – palmitato de metila; MO – oleato de metila; MS – estearato de metila) (adaptado de SHANG *et al.*, 2012).

Andrade *et al.*, em 2011, desenvolveram um método alternativo para a análise e caracterização, por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa não aquosa (CLAE-FRNA), dos constituintes do biodiesel (MAG, DAG, TAG e EsMAG). Utilizou-se, nesse estudo, como fase estacionária, a sílica funcionalizada com grupoamento octadecilsilano (C18), a fase móvel foi composta por um gradiente entre metanol e uma mistura de iso-propanol/*n*-hexano (5:4, v/v) e o detector UV, a 205 nm (ANDRADE, 2011; ANDRADE, MAZZEI, D'AVILA, 2011).

A **Figura 6** apresenta um cromatograma típico, por CLAE-UV, de um produto da reação de transesterificação do óleo de canola com baixa conversão (ANDRADE, 2011).



**Figura 6.** Cromatograma, obtido por CLAE-UV, do produto de transesterificação do óleo de canola com baixa conversão (30%) (ANDRADE, 2011).

Na **Figura 6** é possível identificar a nítida separação entre os principais componentes do biodiesel (MAG, EsMAG, DAG e TAG), mostrando ser esse um método promissor para o acompanhamento da reação de transesterificação do óleo vegetal em biodiesel (ANDRADE, 2011).

Tendo em vista o promissor estudo de Andrade *et al.*, entende-se que a separação e o isolamento dos EsMAG mediante utilização da CLAE também seja possível. Neste contexto, acredita-se que os diferentes EsMAG presentes nas amostras de biodiesel poderão ser separados individualmente.

É importante ressaltar que em escala industrial, entende-se que é necessária a transposição de escala do que foi estabelecido na CLAE em escala semipreparativa, ou seja, aumento de vazão e de volume injetado, da concentração do analito e da coluna cromatográfica, principalmente. Dessa forma, obtém-se maior volume de cada EsMAG do biodiesel isoladamente, o que permite a utilização desses compostos separados e puros, como padrões.

Desenvolvida em 2014, a dissertação de mestrado de Blatt possibilitou empregar a cromatografia líquida em coluna e a cromatografia em camada delgada (CCD) para a separação e o isolamento dos principais contaminantes presentes no biodiesel (MAG, DAG e TAG) a fim de avaliar seu uso como padrões. Com essa finalidade utilizou-se uma coluna de vidro contendo 20 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro de

fase octadecilsilano enquanto a fase móvel foi composta por metanol e 2-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v).

Santos, em 2015, desenvolveu um método para a identificação e a quantificação dos principais constituintes do biodiesel por CLAE-IR visto que o detector de índice de refração possui uma capacidade de resposta proporcional à concentração dos compostos de interesse. Esta metodologia baseou-se na utilização de CLAE-IR, com coluna de fase estacionária de octadecilsilano e a mistura 85% volumétrica de metanol e 15% volumétrica de *i*-propanol/*n*-hexano (6:3) foi a fase móvel escolhida.

Em 2018, Carvalho, em sua dissertação de mestrado, desenvolveu uma metodologia que possibilitou a obtenção de frações ricas e/ou componentes individuais de MAG e DAG a partir da reação de glicerólise, a fim de obter padrões em escala laboratorial. Para isso foi utilizada uma coluna de vidro contendo 20 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro de fase octadecilsilano e a fase móvel foi composta por metanol e *i*-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v).

Desenvolvida em 2018, a metodologia de Souza *et al.* possibilitou a quantificação de EsMAG em amostras de biodiesel utilizando a CLAE com detecção por UV. Este método se baseou, nas condições experimentais propostas por Andrade *et al.*, em 2011, possibilitando, no entanto, a identificação e a quantificação dos ésteres majoritários (oleato, linoleato e linolenato de metila) nas amostras estudadas.

Em 2019, Matos e colaboradores desenvolveram um método para a quantificação do teor de biodiesel em misturas com o óleo diesel capaz de identificar e quantificar eventuais adulterações utilizando óleos vegetais. Para esse fim, utilizou-se a CLAE, com detecção por índice de refração, uma coluna de sílica e fase móvel constituída de uma mistura de 90% volumétrica *n*-hexano e 10% volumétrica de MTBE (éter metil-terc-butílico).

Em 2021, Costa e colaboradores desenvolveram uma metodologia para a determinação do teor de EsMAG, TAG, DAG e MAG presentes no biodiesel utilizando a CPG (cromatografia de permeação em gel, no inglês *Gel Permeation Chromatography* - GPC). Neste estudo empregou-se tolueno com 0,5% volumétrica de THF (tetraidrofurano) como fase móvel, 40°C de temperatura no forno do equipamento, vazão de 1,0 mL/min e tempo de corrida de 15 minutos. A metodologia desenvolvida foi validada

mediante a determinação da linearidade, do limite de detecção, do limite de quantificação, da precisão (desvio padrão relativo) e da exatidão (recuperação). Vale ressaltar que a metodologia em questão foi empregada apenas em amostras padrão, necessitando, portanto, ser testada em amostras comerciais de biodiesel.

### **3.5 A cromatografia líquida de alta eficiência**

A cromatografia consiste na separação de componentes de uma mistura quando presente em uma fase móvel fluida em uma fase estacionária (coluna cromatográfica). A separação é direcionada pela diferença de velocidade de cada componente na fase fluida, decorrente de forças físicas e interações químicas entre os componentes e as duas fases. A cromatografia apresenta algumas classificações, baseando-se na fase estacionária, tipo de fase móvel e mecanismo efetivo de separação (COLLINS, 2007).

A CLAE, no inglês HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), é muito usada a fim de isolar e separar componentes de misturas, quando se requer altas produtividade, rendimento e pureza. A separação dos componentes na cromatografia se baseia nas diferentes interações físicas e químicas desses com as fases móveis e estacionária (COLLINS *et al.*, 2007).

Embora os métodos de referência para análise de biodiesel sejam por cromatografia gasosa (CG), a CLAE apresenta vantagens em comparação aos métodos de CG; uma delas diz respeito ao menor tempo de preparo da amostra, visto que não há necessidade de derivatização da mesma. Outro ponto positivo é que na CLAE a pouca volatilidade da amostra não é um limitante (AQUINO NETO, NUNES, 2003). Outra vantagem da CLAE sobre a CG é a baixa temperatura do processo durante a análise, o que reduz o risco de isomerização das ligações duplas das cadeias carbônicas (CZAUDERNA; KOWALCZYK, 2001; LI *et al.*, 2009).

Faz-se necessária a revisão de determinados conceitos, que se seguem, relacionados a separação cromatográfica (SEIDEL-MORGENSTERN *et al.*, 2012) para a melhor compreensão dos termos utilizados ao longo deste trabalho.

### 3.5.1 A porosidade

A porosidade é a fração de volumes vazios em um determinado sólido. Em relação a uma fase estacionária, que preenche uma coluna cromatográfica, podem ser mencionados três tipos de porosidade: das partículas, do leito e total.

A porosidade das partículas ( $\epsilon_p$ ) é calculada como a fração entre o volume de vazios no interior de uma partícula e o volume da partícula inteira.

A porosidade do leito ( $\epsilon_l$ ) se refere ao volume existente entre as partículas em relação ao volume de coluna.

A porosidade total ( $\epsilon$ ), ou porosidade da coluna quando for o caso, é calculada a partir das porosidades das partículas e do leito, conforme **Equação 1**.

$$\epsilon = \epsilon_l + (1 - \epsilon_l)\epsilon_p \quad (1)$$

### 3.5.2 O tempo de volume morto

O tempo de volume morto ( $t_M$ ) é definido como o tempo necessário para que haja o deslocamento entre a entrada e a saída, em uma coluna, de uma substância não retida. Dessa forma, ele é definido pela **Equação 2**, em que L é o comprimento da coluna e v é a velocidade superficial da fase móvel, que é calculada pela razão entre a vazão volumétrica e a área da seção transversal da coluna.

$$t_M = \frac{L}{v \times \epsilon} \quad (2)$$

### 3.5.3 O tempo de retenção

O tempo de retenção ( $t_R$ ) é definido como o tempo necessário para um determinado componente se deslocar pelo sistema cromatográfico entre o ponto de injeção e o ponto de detecção, considerando que seu movimento, impulsionado pela fase móvel, é retardado por sua interação seletiva entre as fases estacionária e móvel.

O tempo de retenção é determinado pelo tempo em que a intensidade do sinal seja máxima em condições lineares de cromatografia, tais como em escala analítica.

#### **3.5.4 As programações de composição da fase móvel**

Existem três formas de programação de composição da fase móvel: isocrática, gradiente e por etapas.

A programação isocrática consiste em alimentar o sistema cromatográfico com uma composição constante de fase móvel (único ou mistura) ao longo de todo o processo de separação dos componentes da mistura injetada. Essa é a programação preferida em escala preparativa, visto que é possível reciclar o solvente utilizado, o que é dificultado na programação gradiente, além de, se depender de uma única bomba, em certos casos, diminuindo investimento inicial e de manutenção. Ademais, é o mais indicado para separar substâncias de estrutura similar (THERMO FISHER, 2018).

A programação por gradiente consiste na variação da composição do eluente ao longo do processo cromatográfico, o que permite um tempo total menos extenso, implicando em frações mais concentradas à saída da coluna, e uma separação adequada de componentes da mistura com propriedades muito diferentes de interação com a fase estacionária em menos tempo e com menor uso de solvente para eluição (RATHORE; VELAYUDHAN, 2003).

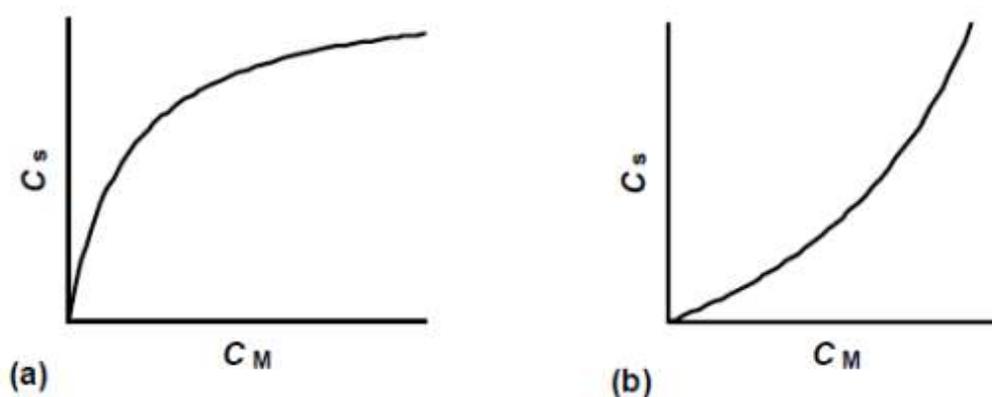
A programação por etapas inicia-se como a isocrática, mas variando a composição da fase móvel em pulsos imediatos, preferencialmente aplicada na separação de proteínas de diferentes pontos isoelétricos e pka. Tanto programação por etapas quanto em gradiente exigem equipamentos mais sofisticados de bombeamento/programação para controlar a variação de composição de fase móvel ao longo do tempo de eluição.

### 3.6 O equilíbrio de distribuição em cromatografia líquida

As teorias de equilíbrio assumem uma distribuição de uma substância entre a fase móvel e a fase estacionária. Essas teorias predizem de forma efetiva a retenção ao máximo de concentração das substâncias a qualquer volume de injeção, mas não prediz a variação da concentração da substância ao longo da coluna (SEIDEL-MORGENSTERN *et al.*, 2012).

As equações mais estudadas em cromatografia líquida em fase normal são as de Langmuir, quadrática, de Freundlich e de Levan-Vermeulen. Essas isotermas de distribuição podem ser classificadas como convexas ou côncavas (**Figura 7**) e se aproximam ao comportamento linear a baixas concentrações (SEIDEL-MORGENSTERN *et al.*, 2012).

Para a distribuição em fase reversa, que envolve preferencialmente fenômenos de partição, estudos têm demonstrado que as isotermas são lineares e que a expressão de Langmuir promove um bom ajuste aos dados observados com o aumento da concentração como mostrado abaixo (POPPE, 1993).



**Figura 7.** Isotermas de adsorção da concentração de um componente entre as fases móvel e estacionária: (a) convexa e (b) côncava (reproduzido de COSTA, 2004).

O comportamento linear, em concentrações muito baixas (diluição infinita), e expresso pela **Equação 3**, leva em consideração que a razão entre a concentração de soluto interagido com o volume de fase estacionária ( $C_s$ ) e a concentração do mesmo soluto na fase móvel ( $C_M$ ) é uma constante de equilíbrio (SEIDEL-

MORGENSTERN *et al.*, 2012). Tal constante de proporcionalidade (K ou  $K_{eq}$ ) é também chamada de coeficiente de partição ou de distribuição na fase reversa (ETTRE *et al.*, 1993).

$$K \cdot C_M = C_S \quad (3)$$

No processo cromatográfico, caso a retenção seja regida por esse comportamento linear, ele é classificado como cromatografia linear. Para esta classificação, as alterações na concentração não afetam a altura de prato teórico e a retenção da substância. A constante de distribuição linear ( $K_c$ ) está relacionada à razão de fase ( $\beta$ ) e ao fator de retenção das substâncias (k), segundo as **Equações 4, 5 e 6** (ETTRE, 1993):

$$K_c = \frac{k}{\beta} \quad (4)$$

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad (5)$$

$$\beta = \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \quad (6)$$

### 3.7 A transposição de escala no desenvolvimento de processo por CLAE

A separação cromatográfica em escala preparativa envolve custo elevado, principalmente em relação à fase móvel e à fase estacionária (coluna). Dessa forma, as condições ótimas, no que se refere à seletividade e à produtividade, são estabelecidas previamente, em escala analítica, por meio de um estudo de condições de resolução e quantidade de amostra, para que, depois, seja executada a transposição de escala. Na escala analítica, estima-se, de maneira mais fácil, os parâmetros importantes e são selecionadas as composições das fases e a temperatura, que, preferencialmente são invariáveis na transposição de escala (GU, 1995; GUIOCHON, 2002).

O processo é otimizado com diferentes objetivos, dependendo da escala final pretendida, bancada ou industrial. Em escala de bancada, produção de pequenas quantidades em poucos ciclos, essa otimização tem como objetivo a pureza das

substâncias isoladas e a produtividade. Já na escala industrial, a otimização econômica pode ser alcançada, mesmo com picos mal resolvidos (GU, 1995; GUIOCHON, 2002).

### 3.7.1 A transposição direta

A transposição direta (ou “linear”, ou “matemática direta”) é comum a trabalhos de separação semipreparativa, e recomendada pelos fabricantes de colunas cromatográficas para CLAE. Esse tipo de transposição tem como principal vantagem o fato de ser simples, por se basear em apenas um fator de cálculo a partir de um cromatograma (MAZZEI; D’AVILA, 2003).

Na transposição direta de escala, primeiramente são ajustadas a seletividade e a resolução, em temperatura (T) fixa, nas condições iniciais em escala analítica. Após, um fator de transposição é calculado (**Equação 7**) a partir da relação entre os comprimentos (L) e as áreas seccionais ( $A_c$ ) da coluna preparativa (p) e analítica (a), de modo a manter os tempos de retenção após a transposição. É importante ressaltar que, na Equação 7, não é considerado que os diâmetros de partícula de ambas colunas possuam grandes diferenças entre si.

$$\mathbf{Fator\ de\ Transposi\c{c}\~ao\ Direta = \frac{L_{(p)} \cdot A_{c(p)}}{L_{(a)} \cdot A_{c(a)}}} \quad (7)$$

Nesta transposição, variáveis operacionais, como vazão de fase móvel (F) e volume de injeção ( $V_{inj}$ ), podem ser ajustadas nas condições preparativas a partir desse fator. Além disso, também é possível de se calcular o volume morto, o consumo de fase móvel e a produtividade; sendo este o planejamento mais simples e rápido de transposição (GU, 1995; MAZZEI; D’AVILA, 2003). Esse tipo de transposição é empregado pelos fabricantes de colunas cromatográficas para demonstrar a repetibilidade da composição e do recheio da fase estacionária entre as colunas analíticas, semi-preparativas e preparativas. A retenção, a intensidade relativa e a largura dos sinais cromatográficos em larga escala tornam-se idênticos aos dos ensaios em pequena escala (COSTA, 2004; MAZZEI; D’AVILA, 2003). Apesar desse fato, essa similaridade do perfil cromatográfico entre as duas escalas é obtida apenas quando se executa a transposição das áreas seccionais e se preserva a

proporcionalidade do fator. Porém, quando deseja-se melhorar a separação após a transposição, alterando o volume de injeção ( $V_{inj}$ ), concentração de injeção ( $C_{inj}$ ), ou comprimento de coluna (L) se recorre usualmente ao empirismo para otimizar a separação (COSTA, 2004).

### 3.7.2 A transposição por modelos de momentos estatísticos

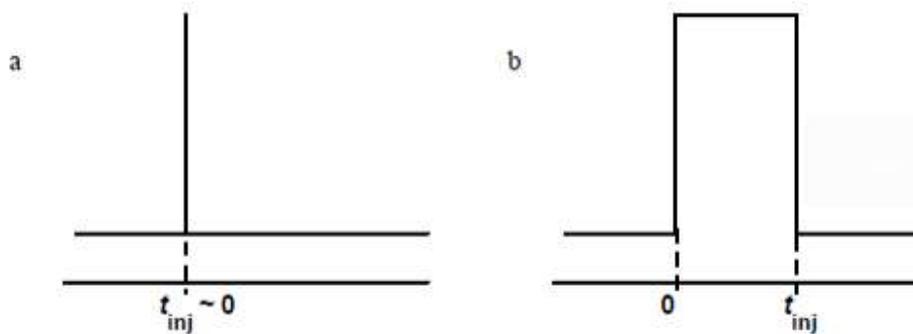
O desenvolvimento de processos cromatográficos também pode ter como um objetivo otimizar as condições cromatográficas por meio de aplicação de modelos matemáticos sobre os fenômenos que o incorporam, que podem ajudar nos procedimentos de transposição de escala em CLAE e nas simulações de perfis cromatográficos (GUIOCHON, 2002).

Os modelos cromatográficos são diferenciados principalmente pelos parâmetros e fenômenos que são considerados e, também, pela dificuldade de sua resolução matemática, que utiliza desde expressões algébricas até métodos iterativos, integração numérica ou sistemas de equações diferenciais (COSTA, 2004). Os modelos de momentos estatísticos são baseados na hipótese de que cada elemento (concentração de substância) do perfil de entrada (injeção) é disperso, numa distribuição gaussiana, ao se propagar na coluna (VAN DEEMTER; ZUIDERWEG; KLINKENBERG, 1956). Pelo balanço global de massa de cada componente, o momento de ordem zero da distribuição gaussiana é representado pela área total do perfil de concentração de saída que corresponde à área de concentração de entrada (relacionada à massa injetada). O momento de primeira ordem corresponde ao tempo/volume de retenção ( $t_R$  ou  $V_R$ ) do centro de massa do material injetado. Já o momento de segunda ordem ( $\sigma^2$ ) - variância do perfil no fim da coluna - corresponde ao espalhamento do perfil de massa, durante a propagação ao longo da coluna, que é causado pelos efeitos dispersivos, como de difusão, de distribuição nos espaços vazios (de volumes aleatórios) e de transferência de massa inerente ao sistema particulado (KALTENBRUNNER; JUNGBAUER; YAMAMOTO, 1997; STERNBERG, 1966; VAN DEEMTER; ZUIDERWEG; KLINKENBERG, 1956). Esses modelos de momentos estatísticos representam perfis para quando a cromatografia é regida pela isoterma de distribuição linear (cromatografia linear), ou seja, para baixa concentração

total de amostra, sendo o perfil de concentração na saída da coluna ( $C_M$ ) calculado pela **Equação 8**, baseada na distribuição gaussiana (STERNBERG, 1966).

$$C_M(t) = \frac{(C_{inj} \cdot V_{inj})}{F \cdot (2\pi \cdot \sigma^2)^{1/2}} \cdot \int_{t_{a,min}}^{t_{a,max}} f(t_a) \cdot e^{-\frac{(t-t_a)^2}{2\sigma^2}} dt_a \quad (8)$$

Sendo  $F$  a vazão de fase móvel,  $V_{inj}$  o volume de injeção,  $C_{inj}$  a concentração na injeção e  $\sigma^2$  a variância do pico. Onde o perfil de injeção (entrada) ao longo do tempo é descrito, matematicamente, pela função  $f(t_a)$ , e  $t_a$  representa o tempo em que o centro de massa do pico sai da coluna, com contribuição do tempo de retenção, do tempo de injeção ( $t_{inj}$ ) e do perfil de entrada. A integral resultante da **Equação 8** tem sido resolvida pelo método de transformada de Laplace para diferentes perfis de injeção (**Figura 8**), como descrito a seguir:



**Figura 8.** Perfis de injeção estudados para a função  $f(t_a)$  da expressão genérica (**Equação 4**) dos modelos de momentos estatísticos: a. pulso imediato (item 3.8.2.1) e b. pulso retangular (item 3.8.2.2) (reproduzido de COSTA, 2004).

Embora haja potenciais vantagens da aplicação dos modelos nas separações por CLAE de qualquer mistura multi-componente de baixo peso molecular, tais metodologias não vêm sendo utilizadas para o fim de isolamento de acilgliceróis, dessa forma tem-se recorrido ao empirismo para otimizar a separação.

### 3.7.2.1 A resolução de Van Deemter e colaboradores

A resolução algébrica para pulso imediato (**Figura 5**) de perfil de injeção ( $f(t_a)$ ) de tempo aproximado a zero de Van Deemter, Zuideweg e Klinkenberg (1956) é

considerado o modelo mais simples de momento estatístico, em que a sua função matemática da distribuição de probabilidade (**Equação 9**) representa os perfis simétricos dos componentes da amostra na fase móvel ao fim da coluna:

$$C_M(t) = \frac{(C_{inj} \cdot V_{inj})}{F \cdot (2\pi \cdot \sigma^2)^{1/2}} \cdot e^{-\frac{(t-t_R)^2}{2 \cdot \sigma^2}} \quad (9)$$

A variância do pico ( $\sigma^2$ ) pode ser estimada a partir da largura a meia altura ( $w_h$ ) quando possível de ser determinada, ou, com menos precisão a partir da largura da base do pico ( $w_b$ ), por meio das **Equações 10, 11 e 12**.

$$\sigma^2 = (8 \cdot \ln 2)^{-1} \cdot (w_h)^2 = \left(\frac{w_b}{4}\right)^2 \quad (10)$$

$$N = \frac{(t_R)^2}{\sigma^2} \quad (11)$$

$$h = \frac{L}{(N \cdot d_p)} \quad (12)$$

Onde N é o número de pratos da coluna,  $d_p$  o diâmetro de partícula da fase estacionária e h a altura reduzida do prato teórico da fase para determinado componente.

### 3.7.2.2 A resolução de Sternberg

Sternberg, em 1966, por transformada de Laplace, resolveu a equação genérica (**Equação 8**) para outros perfis teóricos de injeção, chegando à equação algébrica para pulso retangular (**Figura 5**) para qualquer tempo de injeção. A equação que representa o perfil dos picos (**Equação 13**), apresenta a função erro (erf), que representa uma integral com resolução numérica por aproximações racionais ou polinomiais, de acordo com as **Equações 14 e 15**:

$$C_M(t) = \frac{1}{2} \cdot \frac{C_{inj} \cdot V_{inj}}{F} \cdot \left\{ erf \left[ \frac{(t-t_R)}{\sqrt{2 \cdot \sigma^2}} \right] - erf \left[ \frac{(t-t_R-t_{inj})}{\sqrt{2 \cdot \sigma^2}} \right] \right\} \quad (13)$$

$$erf(x) = 1 - (a_1 \cdot u + a_2 \cdot u^2 + a_3 \cdot u^3 + a_4 \cdot u^4 + a_5 \cdot u^5) \cdot e^{-x^2} \quad (14)$$

$$u = [1 + (p \cdot x)]^{-1} \quad (15)$$

Sendo os valores dos coeficientes:  $p = 0,3275911$ ;  $a_1 = 0,254829592$ ;  $a_2 = -0,284496736$ ;  $a_3 = 1,421413741$ ;  $a_4 = -1,453152027$  e  $a_5 = 1,061405429$  (ABRAMOWITZ; STEGUN, 1965).

Dessa forma, é possível realizar a transposição de escala por modelos matemáticos no isolamento e aquisição de frações enriquecidas dos EsMAG de interesse por CLAE.

#### **4. Material e Métodos**

Com a finalidade de obter-se o objetivo do presente trabalho, foi necessário preparar amostras de biodiesel de soja, canola, milho e sebo animal, isolar os ésteres metílicos de ácidos graxos dessas amostras e realizar estudos de solubilidade do analito com possíveis fases móveis para assim analisá-las pelo método proposto cromatografia líquida de alta eficiência em escala semipreparativa, utilizando o detector de índice de refração.

##### **4.1 A reação de transesterificação para produção de EsMAG**

Os EsMAG utilizados nas análises do presente trabalho foram provenientes das amostras de biodiesel produzidas. Essas amostras foram produzidas seguindo o procedimento descrito por Miranda e Moura, em 2016. Isto é, utilizou-se KOH como catalisador básico e o metanol como álcool na reação de transesterificação. Assim, dissolveu-se 1,0 g de hidróxido de potássio (Vetec, grau PA) em 35 mL de metanol (Vetec, grau PA), em um bécher, com auxílio da agitação até a dissolução completa da base. Após, adicionou-se 100 mL do óleo vegetal comercial, comprado no mercado (óleo de soja da marca Soya, óleo de canola e de milho da marca Liza), em um balão de fundo redondo de 250 mL, com posterior adição de um agitador magnético. No caso da utilização de sebo bovino, aqueceu-se o sebo adquirido de gordura bovina até que este virasse um óleo e este foi usado como reagente igualmente aos óleos vegetais comerciais. Posteriormente, o balão foi aquecido em banho-maria até a temperatura de 45°C, quando adicionou-se a solução de metóxido de potássio previamente preparada. Em seguida, a mistura reacional foi mantida em 45°C, sob

forte agitação com refluxo durante uma hora. A mistura reacional foi transferida para um funil de separação e deixada em repouso por 24 horas, quando observou-se a formação de duas fases: a superior, ou seja, menos densa, contendo biodiesel e a mais densa, contendo glicerol, sabões e excesso de base e álcool. Esta fase inferior foi recolhida em uma proveta de 100 mL. Após, foi necessário lavar o biodiesel com a adição de uma sequência de substâncias a fim de retirar qualquer resquício de catalisador básico presente. Em primeiro lugar, foi adicionado ao funil de decantação contendo o biocombustível 25 mL de solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) 10% volumétrica e deixou-se 15 minutos em repouso. Como houve novamente a formação de duas fases, a fase aquosa mais densa foi removida e o procedimento de lavagem com ácido clorídrico foi repetido com o mesmo volume. Em seguida, empregou-se na lavagem uma solução saturada de NaCl, o qual um volume de 20 mL foi adicionado ao funil contendo o biodiesel, igualmente à utilização do HCl, duas fases se formam, sendo a mais densa que dispõe da solução saturada de NaCl, e após 15 minutos de repouso foi removida. Esse processo foi realizado novamente com o mesmo volume. Por fim, 20 mL de água destilada foi inserida ao biodiesel para lavagem e ambas as fases formadas foram deixadas em repouso pelos mesmos 15 minutos, antes da fase aquosa ser removida. A ausência do catalisador básico foi confirmada medindo-se o pH da água de lavagem que foi neutro. Ademais, para a secagem do biodiesel, a solução obtida foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 10g de Na<sub>2</sub>CO<sub>4</sub> anidro (agente dessecante) e aguardou 15 minutos em repouso. Posteriormente, a mistura foi filtrada e a fração de biodiesel obtida foi transferida para uma proveta a fim de ter seu volume medido.

O procedimento descrito acima foi repetido para cada oleaginosa (soja, milho e canola, assim como para o sebo animal) e todas apresentaram aspecto límpido com colocação amarela.

## **4.2 A análise das reações de transesterificação por CLAE**

As análises por CLAE foram analisadas por meio do método desenvolvido por Andrade *et al.*, em 2011, e foram realizadas em um equipamento da ThermoScientific (Massachusetts, EUA), modelo Ultimate 3000, composto por uma bomba quaternária

(DionexUltimate 3000). Além disso, foi utilizada uma coluna Thermo Scientific Acclaim™ de 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, com fase estacionária octadecilsilano de 5 µm de tamanho de partícula, com 120 Å de diâmetro de poro. Empregou-se uma pré-coluna Thermo Scientific Acclaim™ de 10 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, com fase estacionária octadecilsilano de 5 µm de diâmetro de partícula, com 120 Å de diâmetro de poro. A fase móvel foi composta por metanol (A) e uma solução de *i*-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v) (B). As fases foram sonicadas por 30 minutos antes do uso. As análises foram realizadas a temperatura de 40 °C (temperatura do forno) com vazão de 1 mL/min e detecção UV a 205 nm. Um injetor automático modelo WPS-3000 SL com alça de amostragem de 100 µL foi utilizado. Foi empregado um gradiente binário com duas rampas lineares: 0% a 50% de B de 0 a 15 minutos, seguido de 50% a 100% de B até 25 minutos de corrida seguidas por eluição isocrática com 100% de B por mais 5 minutos. Dessa forma, o tempo de análise total foi de 40 minutos. O volume de injeção das amostras foi de 10 µL. Cada amostra foi injetada em triplicata, e os cromatogramas foram analisados, integrados e exportados para Excel 2013 (Microsoft, Estados Unidos) pelo programa de aquisição *Chromeleon*.

Por meio da **Tabela 3**, é possível identificar os componentes presentes no produto de transesterificação identificáveis pelo método da CLAE-FRNA (ANDRADE; MAZZEI; D'AVILA, 2011), assim como a notação e o código de identificação nos cromatogramas, além do número de carbonos equivalentes (NCE) e número de ligações duplas (NLD).

**Tabela 3.** Componentes identificáveis no produto de transesterificação pelo método da CLAE-FRNA (adaptado de ANDRADE, MAZZEI e D'AVILA, 2011).

<b>Classes</b>	<b>Nome</b>	<b>Notação</b>	<b>Código (NCE)[NLD]</b>
MAG	Monolinolenina	Ln	A (12) [3]
	Monolinoleína	L	B (14) [2]
	Monooleína	O	C (16) [1]
EsMAG	Linolenato de metila	MeLn	D [3]
	Linoleato de metila	MeL	E [2]
	Oleato de metila	MeO	F [1]
DAG	Dilinenina	LnLn	G (24) [6]
	Linoleoil-linoleoil-glicerol	LLn	H (26) [5]
	Dilinoeína +Oleoil-linoleoil-glicerol	LL + OLn	I (28) [4]
	Oleoil-linoleoil-glicerol	OL	J (30) [3]
	Dioleína	OO	L (32) [2]
TAG	Trilinenina	LnLnLn	M (36) [9]
	Dilinoil-linoleoil-glicerol	LLnLn	N (38) [8]
	Dilinoil-linoleoil-glicerol+ Dilinoil-oleoil-glicerol	LLLn+OLnLn	O (40) [7]
	Trilinoeína+ oleoil-linoleoil-linoleoil-glicerol	LLL+OLLn	P (42) [6]
	Dilinoil-oleoil-glicerol+ Dioleil-linoleoil-glicerol	OLL+OOLn	Q (44) [5]
	Dioleil-linoleoil-glicerol	OOL	R (46) [4]
	Trioeína	OOO	S (48) [3]
Dioleil-gadoleoil-glicerol	OOG	T (50) [3]	

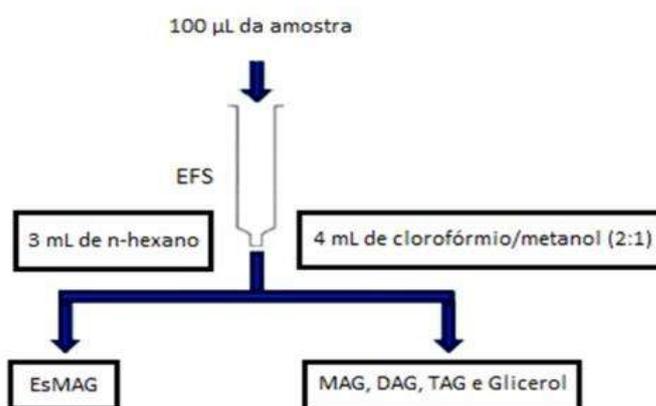
*A nomenclatura e notação são utilizadas sem identificação dos isômeros de posição sn-1 e sn-2 dos MAG e dos isômeros sn-1,2 e sn-1,3 dos DAG e dos isômeros de posição dos TAG, quando estes existem.*

A presença ou ausência destes componentes, bem como sua concentração, variam de acordo com a oleaginosa usada na produção do biodiesel e do grau de conversão da reação de transesterificação.

#### 4.3 Emprego da etapa de extração em fase sólida para separação dos EsMAG presentes no produto de transesterificação

Para que fosse possível a separação dos EsMAG presentes no biodiesel, utilizou-se clorofórmio (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil), metanol (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) e *n*-hexano (TEDIA, São Paulo, Brasil).

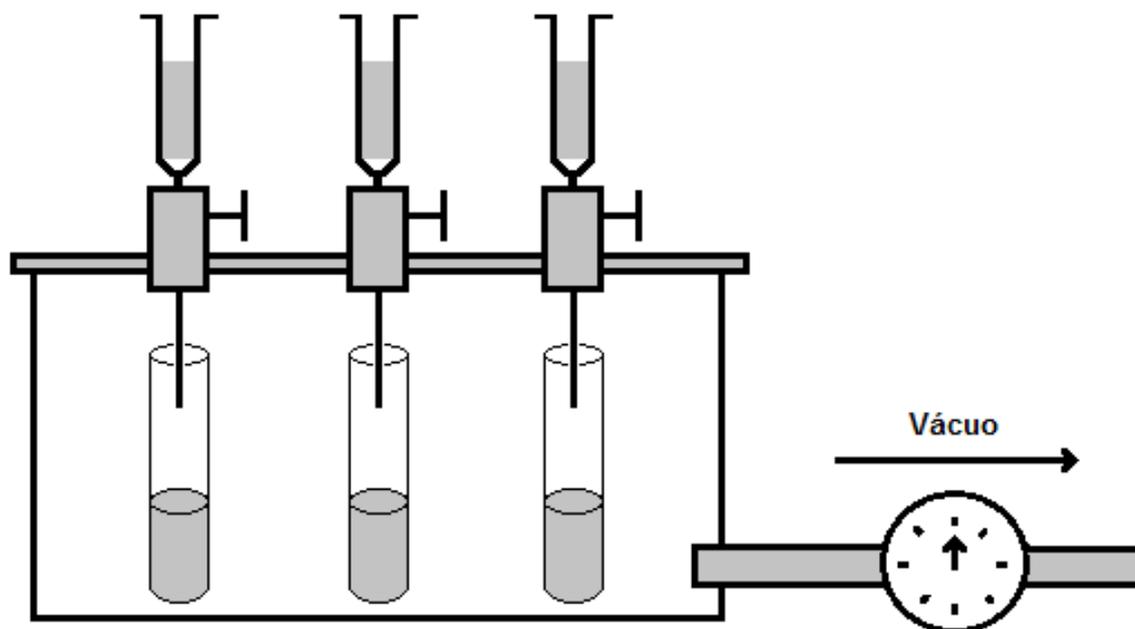
O isolamento dos EsMAG e dos contaminantes do biodiesel (MAG, DAG, TAG e glicerol) em duas frações foi realizado em uma etapa de EFS como apresentado na **Figura 9**.



**Figura 9.** Representação esquemática do método de separação dos EsMAG, MAG, DAG, TAG e Glicerol residual, por EFS, onde o cartucho é constituído da fase estacionária aminopropilsilano, 500 mg, 3 mL, tamanho de partícula 40 µm, marca Bond Elut. As fases móveis são constituídas por: *n*-hexano e clorofórmio:metanol (2:1).

Para que fosse possível a realização das extrações foi utilizado um equipamento de extração em fase sólida com aplicação de vácuo (*manifold*), conforme representação esquemática mostrada na **Figura 10**. Os cartuchos foram acoplados ao *manifold* e submetidos a vácuo, empregando uma vazão de aproximadamente

1 mL/min, para a eluição das fases móveis. Cada fração obtida foi coletada em um tubo de ensaio.



**Figura 10.** Representação esquemática do sistema analítico usado na EFS (adaptado de LANÇAS, 2004).

Os cartuchos utilizados em todo processo de EFS foram condicionados com quatro porções de 1 mL de *n*-hexano. Além disso, os processos de evaporação das frações e alíquotas foram executados sob fluxo lento de nitrogênio na capela do laboratório e as transferências volumétricas da amostra, resíduos e eluentes foram realizadas utilizando pipetadores automáticos de volume variável (100-1000  $\mu$ L ou 10-100  $\mu$ L) da marca BRAND (Wertheim, Alemanha).

O cartucho foi acoplado ao sistema de EFS (*manifold*) e condicionado com quatro porções de 1 mL de *n*-hexano, totalizando-se 4 mL. Uma alíquota de 100  $\mu$ L da amostra (produto de transesterificação), constituída de EsMAG, MAG, DAG, TAG e glicerol residual, foi adicionado no cartucho. Dessa forma, a fração 1 composta majoritariamente por EsMAG foi eluída com 3 mL de solução de *n*-hexano. A fração 2, composta majoritariamente pelos TAG, DAG, MAG e glicerol residual retidos no cartucho, foi eluída com 4 mL de clorofórmio:metanol (2:1). Ambas as frações obtidas foram evaporadas até *secura*, sob fluxo lento de nitrogênio e os resíduos diluídos em 1,2 mL de *n*-hexano cada um.

#### **4.4 O estudo de diferentes constituições de fase móvel para a separação dos EsMAG do produto de transesterificação por CLAE**

A partir dos trabalhos de SCHOLFIELD, 1975; BRAVI *et al.*, 2006 e SHANG *et al.*, 2012, concluiu-se que a adição de água na fase móvel interfere na separação dos diferentes EsMAG. Desta forma, tendo em vista que o EsMAG, que é um composto pouco polar, precisa ser solúvel na fase móvel, o que é o princípio mais importante da CLAE, foi necessário realizar um estudo de solubilidade a fim de ter o conhecimento da maior quantidade de água possível a ser adicionada na fase móvel que permitisse a solubilização do produto de transesterificação (composto majoritariamente por EsMAG). Isto posto, foram escolhidos o metanol devido ao menor custo e os relatos da literatura e a acetonitrila visto que foi observada seu resultado em trabalhos descritos na literatura como a maior composição da fase móvel junto à água.

O estudo da seleção da fase móvel mais adequada para ser empregada na análise do produto de transesterificação (constituído majoritariamente por EsMAG) por CLAE foi feito por meio do teste de 14 composições diferentes de fase móvel (acetonitrila:H<sub>2</sub>O (93:7) (v/v), acetonitrila:H<sub>2</sub>O (94:6) (v/v), acetonitrila:H<sub>2</sub>O (95:5) (v/v), acetonitrila:H<sub>2</sub>O (96:4) (v/v), acetonitrila:H<sub>2</sub>O (97:3) (v/v), acetonitrila:H<sub>2</sub>O (98:2) (v/v), acetonitrila:H<sub>2</sub>O (99:1) (v/v), acetonitrila pura, metanol:H<sub>2</sub>O (95:5) (v/v), metanol:H<sub>2</sub>O (96:4) (v/v), metanol:H<sub>2</sub>O (97:3) (v/v), metanol:H<sub>2</sub>O (98:2) (v/v), metanol:H<sub>2</sub>O (99:1) (v/v) e metanol puro). Neste estudo, o produto de transesterificação (constituído majoritariamente por EsMAG) foi analisado por CLAE-IR (ver item 4.6, página 34) empregando diferentes composições de fase móvel, mediante uso dos solventes metanol e acetonitrila em diferentes proporções com água.

#### **4.5 O estudo da produtividade de diferentes composições da fase móvel utilizando modelos matemáticos para a simulação do *scale up* a fim de produzir os padrões de EsMAG**

A fim de que o estudo da produtividade usando modelos matemáticos para a simulação do *scale up* fosse realizado, o software Microsoft Excel® – 2016 foi utilizado para a elaboração de uma planilha eletrônica automatizada, de acordo com Costa, em 2004. Nesta planilha foi possível simular os perfis cromatográficos nas escalas

analisadas (analítica) e pretendidas (semipreparativa) a partir dos dados cromatográficos em escala analítica, como vazão, tempo de retenção, dimensões da coluna e largura a meia altura de cada pico.

Dessa forma, após os produtos de transesterificação (constituídos majoritariamente por EsMAG) serem analisados seguindo a metodologia descrita no item 4.6 (página 34), as simulações de *scale up* foram realizadas para diferentes colunas: a) Kinetex de 15 cm de comprimento por 1 cm de diâmetro interno, com fase octadecilsilano (C-18) de 5 µm de tamanho de partícula (escala analítica) e b) Supelcosil de 25 cm de comprimento por 2,12 cm de diâmetro interno, com fase octadecilsilano (C-18) de 12 µm de tamanho de partícula (condição extrapolada).

As simulações de *scale up* foram realizadas primeiramente pela metodologia de transposição direta (ver item 3.7.1, página 23) e após a obtenção dos cromatogramas em escala analítica foi simulado a sobrecarga de volume pelos modelos de Van Deemter (ver item 3.7.2.1, página 25) e de Sternberg (ver item 3.7.2.2, página 26). Assim, os resultados dos cromatogramas simulados e dos cromatogramas experimentais foram comparados.

Além disso, a produtividade é definida como o volume de EsMAG produzido por hora. Dessa forma, ela é definida pela **Equação 16**, onde a razão entre o volume de injeção e o tempo total de corrida, multiplicada pelo fator de conversão de minuto para hora e pelo fator de diluição, visto que o analito é injetado sendo diluído em uma proporção de 3:97 para com a fase móvel.

$$\text{Produtividade (mL/h)} = \frac{\text{volume de injeção (mL)}}{\text{tempo total de corrida (min)}} * \frac{60 \text{ min}}{1 \text{ hora}} * 0,03 \text{ mL/mL} \quad (16)$$

#### 4.6 A separação dos EsMAG do produto de transesterificação por CLAE-IR

A metodologia foi desenvolvida, por CLAE-IR, para a separação de diferentes EsMAG presentes em produtos de transesterificação. As amostras foram analisadas em um equipamento Ultimate 3000 (Thermo Scientific), com uma coluna Thermo Scientific Acclaim™ de 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, com fase estacionária octadecilsilano (C-18) de 5 µm de tamanho de partícula, com

120 Å de diâmetro de poro, fluxo de 1 mL/min, a temperatura do forno foi mantida em 40°C, o modo de eluição foi isocrático e o detector utilizado foi o índice de refração. Ademais, o tempo de análise total foi de 40 minutos e o volume de injeção das amostras foi de 10 µL, sendo cada amostra injetada em triplicata.

Após a conclusão da análise, os cromatogramas foram analisados, integrados e exportados para Excel 2013 (Microsoft, Estados Unidos) pelo programa de aquisição *Chromeleon* disponibilizado no equipamento.

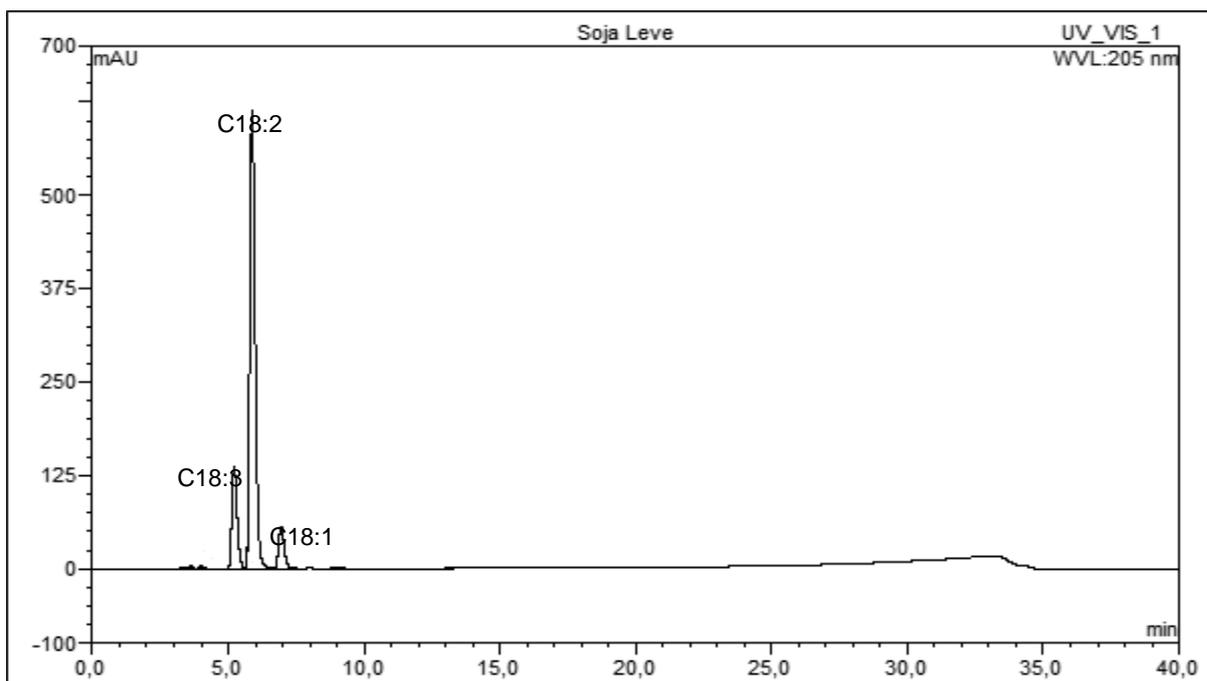
## **5. Resultados e Discussão**

### **5.1 A reação de transesterificação para produção de EsMAG**

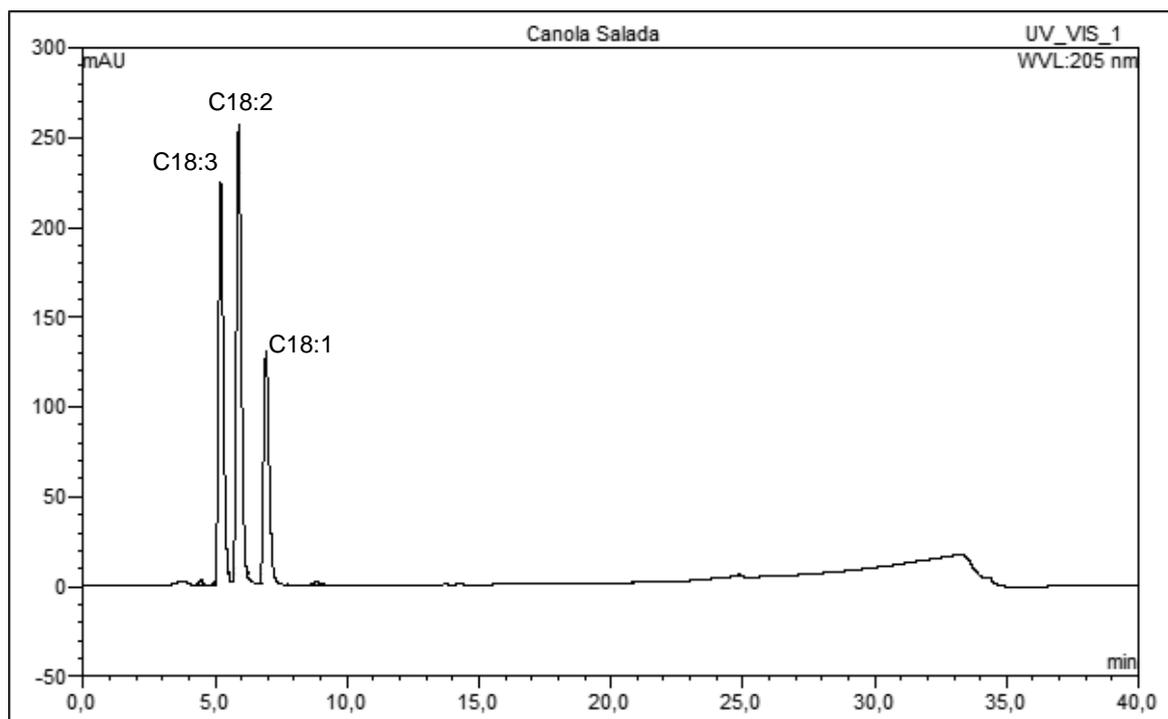
O procedimento de produção de biodiesel foi realizado utilizando os óleos de soja, canola e milho como fonte de triacilgliceróis. Dessa forma, diferentes volumes do biocombustível foram obtidos visto que os processos de lavagem e neutralização impactam de maneira diferente em cada produção.

### **5.2 A análise das reações de transesterificação por CLAE**

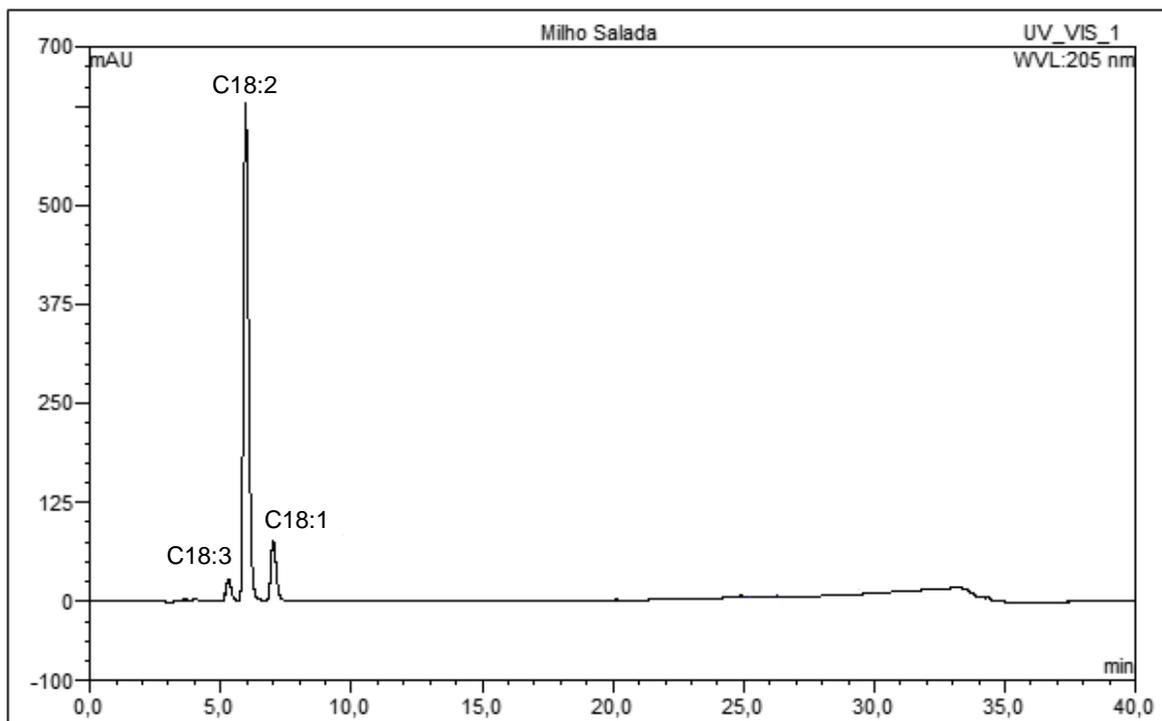
Uma alíquota de cada um dos produtos da reação de transesterificação advindos dos óleos de soja, canola e milho foi analisada por CLAE de acordo com o procedimento de ANDRADE, MAZZEI e D'AVILA, 2011. Os cromatogramas obtidos são mostrados nas **Figuras 11 a 13** respectivamente para os produtos dos óleos de soja, canola e milho:



**Figura 11.** Cromatograma, obtido por CLAE-UV, do produto de transesterificação do óleo de soja, utilizando uma fase móvel composta por metanol e uma solução de *i*-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v), uma fase estacionária de octadecilsilano de 5 µm de diâmetro de partícula e vazão de 1 mL/min (oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3).



**Figura 12.** Cromatograma, obtido por CLAE-UV, do produto de transesterificação do óleo de canola, utilizando uma fase móvel composta por metanol e uma solução de *i*-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v), uma fase estacionária de octadecilsilano de 5 µm de diâmetro de partícula e vazão de 1 mL/min (oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3).



**Figura 13.** Cromatograma, obtido por CLAE-UV, do produto de transesterificação do óleo de milho, utilizando uma fase móvel composta por metanol e uma solução de *i*-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v), uma fase estacionária de octadecilsilano de 5 µm de diâmetro de partícula e vazão de 1 mL/min (oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3).

A partir dos resultados apresentados nas **Figuras 11 a 13**, é possível observar a diferença de área dos picos que é a consequência da concentração de um determinado composto no analito e, assim, proporcional ao tamanho. Embora haja separação dos picos, logo, buscou-se uma alternativa para aumentar a resolução dos analitos.

Os resultados apresentados nas **Figuras 11 a 13** evidenciam que a composição dos EsMAG nos produtos de transesterificação obtidos varia de acordo com a oleaginosa utilizada como fonte de triacilgliceróis. A **Tabela 5** apresenta as composições típicas dos EsMAG dos produtos de transesterificação dos óleos de soja, milho, canola e sebo animal (adaptado de ANDRADE, 2011).

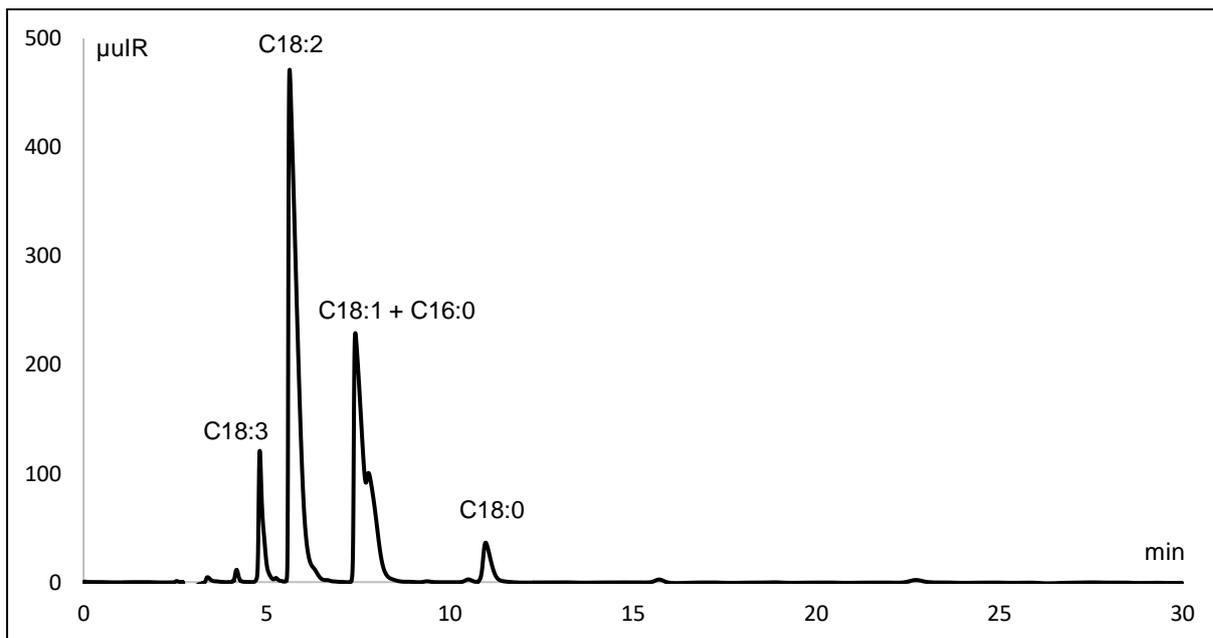
**Tabela 4.** Composições (% mássica) dos EsMAG dos produtos de transesterificação dos óleos de soja, milho, canola e sebo animal (adaptado de ANDRADE, 2011).

Ácido graxo	Composição (g% mássica)			
	SEBO	SOJA	CANOLA	MILHO
C18:0	25,0 – 40,0	3,0 - 5,4	1,1 - 2,5	≤ 3,3
C18:1	31,0 – 50,0	17,7 - 28,5	52,0 - 67,0	20,0 - 42,2
C18:2	1,0 – 5,0	49,8 - 57,1	16,0 - 25,0	39,4 - 65,6
C18:3	–	5,5 - 9,5	6,0 – 14,0	0,5 - 1,5

*C18:0 - ácido esteárico; C18:1 - ácido oleico; C18:2 - ácido linoleico; C18:3 - ácido linolênico*

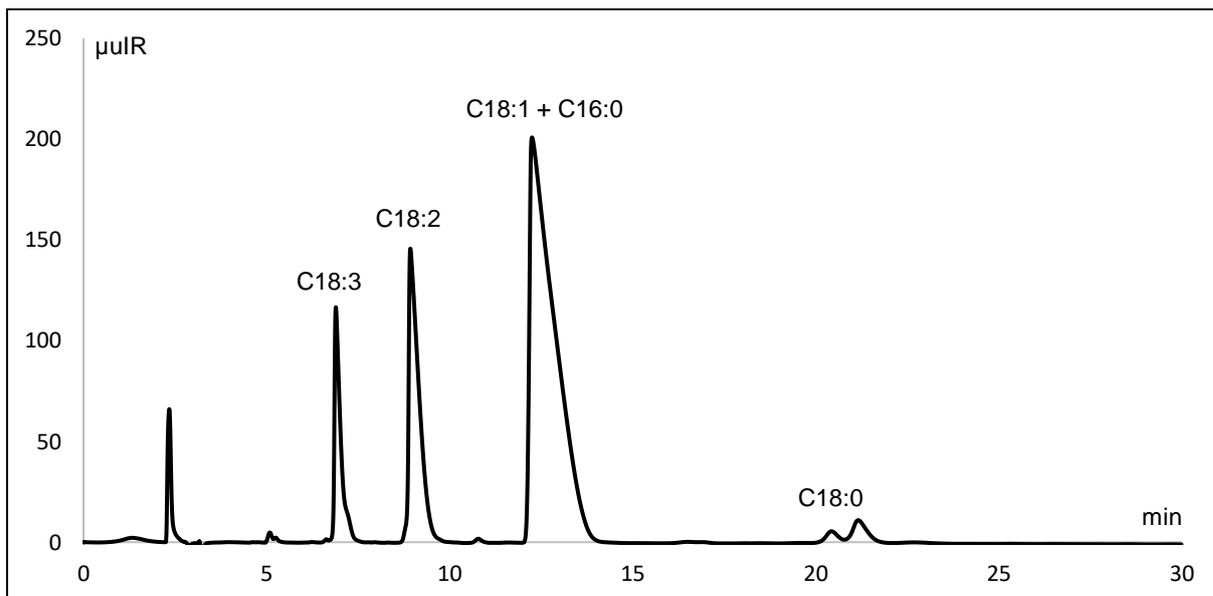
### 5.3 Emprego da etapa de extração em fase sólida para a separação dos EsMAG presentes no produto de transesterificação

A etapa de extração em fase sólida foi empregada com o objetivo de isolar os EsMAG presentes no produto de transesterificação dos óleos de soja, canola, milho, e sebo animal, dos outros componentes presentes (TAG, DAG, MAG e glicerol residual). Os cromatogramas das frações compostas majoritariamente por EsMAG, provenientes da etapa de EFS de cada um dos produtos de transesterificação podem ser vistos nas **Figuras 14, 15, 16 e 17**.



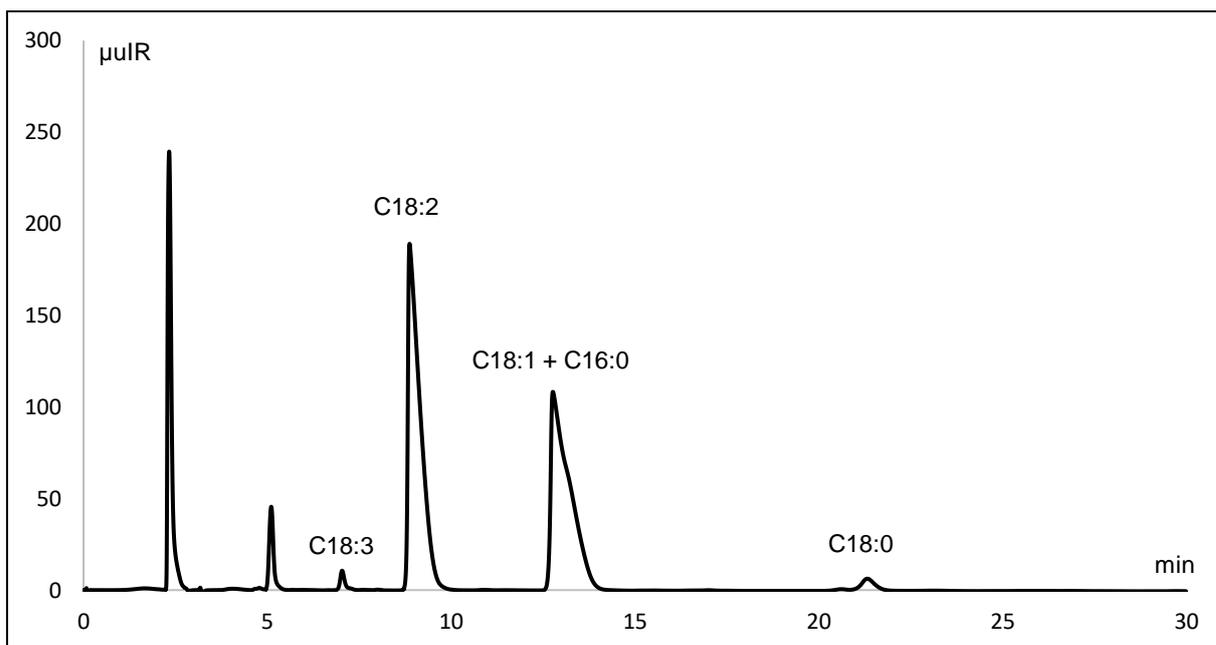
**Figura 14.** Cromatograma, obtido por CLAE-IR, da fração composta majoritariamente por EsMAG, proveniente do produto de transesterificação do óleo de soja, utilizando uma fase móvel composta por acetonitrila pura, uma fase estacionária de octadecilsilano de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula e vazão de 1 mL/min (C16:0 – palmitato de metila; C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).

Como pode ser observado no cromatograma apresentado na **Figura 14**, a fração composta majoritariamente por EsMAG, proveniente do produto de transesterificação do óleo de soja apresenta um comportamento no qual o linoleato de metila (C18:2) possui maior intensidade, visto que esse é o éster predominante no óleo de soja, visto que, como é utilizado o índice de refração como detector, pode-se determinar a composição de cada componente por normalização de área.



**Figura 15.** Cromatograma, obtido por CLAE-IR, da fração composta majoritariamente por EsMAG proveniente do produto de transesterificação do óleo de canola, utilizando uma fase móvel composta por acetonitrila pura, uma fase estacionária de octadecilsilano de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula e vazão de 1 mL/min (C16:0 – palmitato de metila; C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).

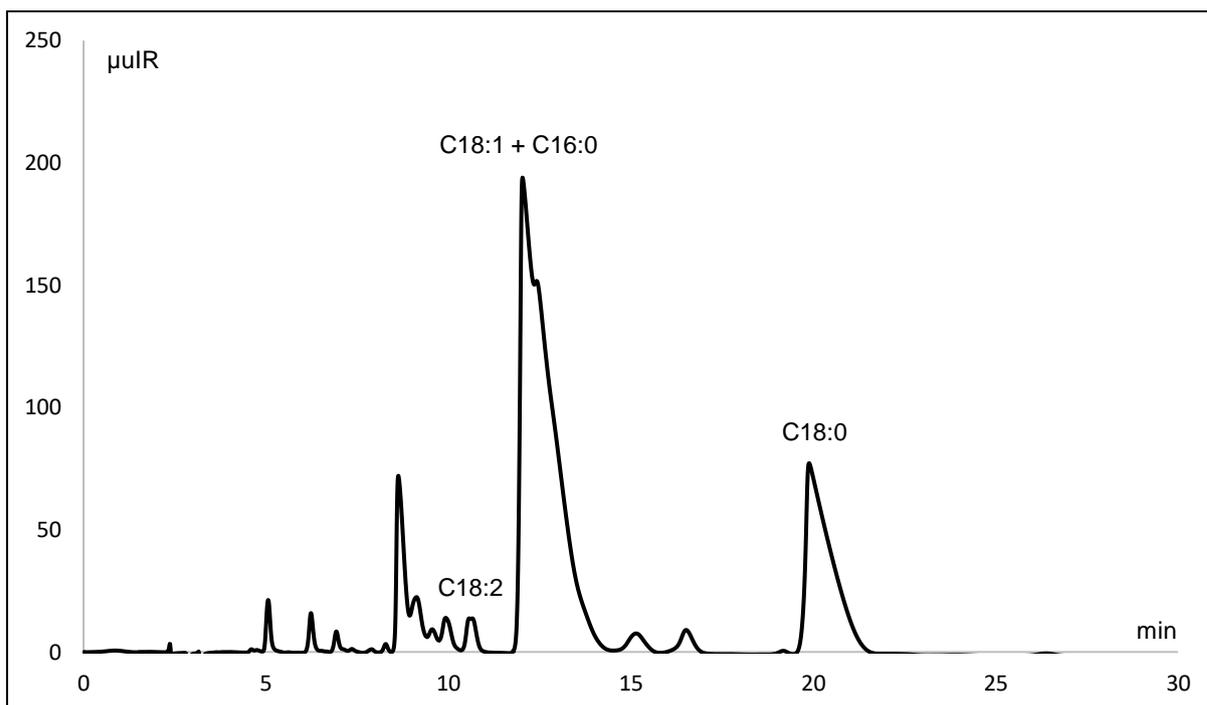
Por meio do cromatograma apresentado na **Figura 15**, observa-se que a fração composta majoritariamente por EsMAG, proveniente do produto de transesterificação óleo de canola apresenta predominância de oleato de metila (C18:1).



**Figura 16.** Cromatograma, obtido por CLAE-IR, da fração composta majoritariamente por EsMAG, proveniente do produto de transesterificação do óleo de milho, utilizando uma fase móvel composta por acetonitrila pura, uma fase estacionária de octadecilsilano de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula e vazão de 1 mL/min (C16:0 – palmitato de metila; C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).

A **Figura 16** apresenta um cromatograma da fração composta majoritariamente por EsMAG, provenientes do produto de transesterificação do óleo de milho, o qual dispõe de um comportamento diferente dos apresentados anteriormente. Como o óleo de milho possui o oleato de metila (C18:1) e o linoleato de metila (C18:2) como composição majoritária, o cromatograma apresenta grandes intensidades desses picos. Além disso, nota-se que há um pico com altura consideravelmente grande presente nos traços do óleo de canola. Este pico é referente a outro éster presente neste óleo.

A fração composta majoritariamente por EsMAG, proveniente do produto de transesterificação do sebo animal é apresentada no cromatograma da **Figura 17**.



**Figura 17.** Cromatograma, obtido por CLAE-IR, da fração composta majoritariamente por EsMAG, proveniente do produto de transesterificação do sebo animal, utilizando uma fase móvel composta por acetonitrila pura, uma fase estacionária de octadecilsilano de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula e vazão de 1 mL/min (C16:0 – palmitato de metila; C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).

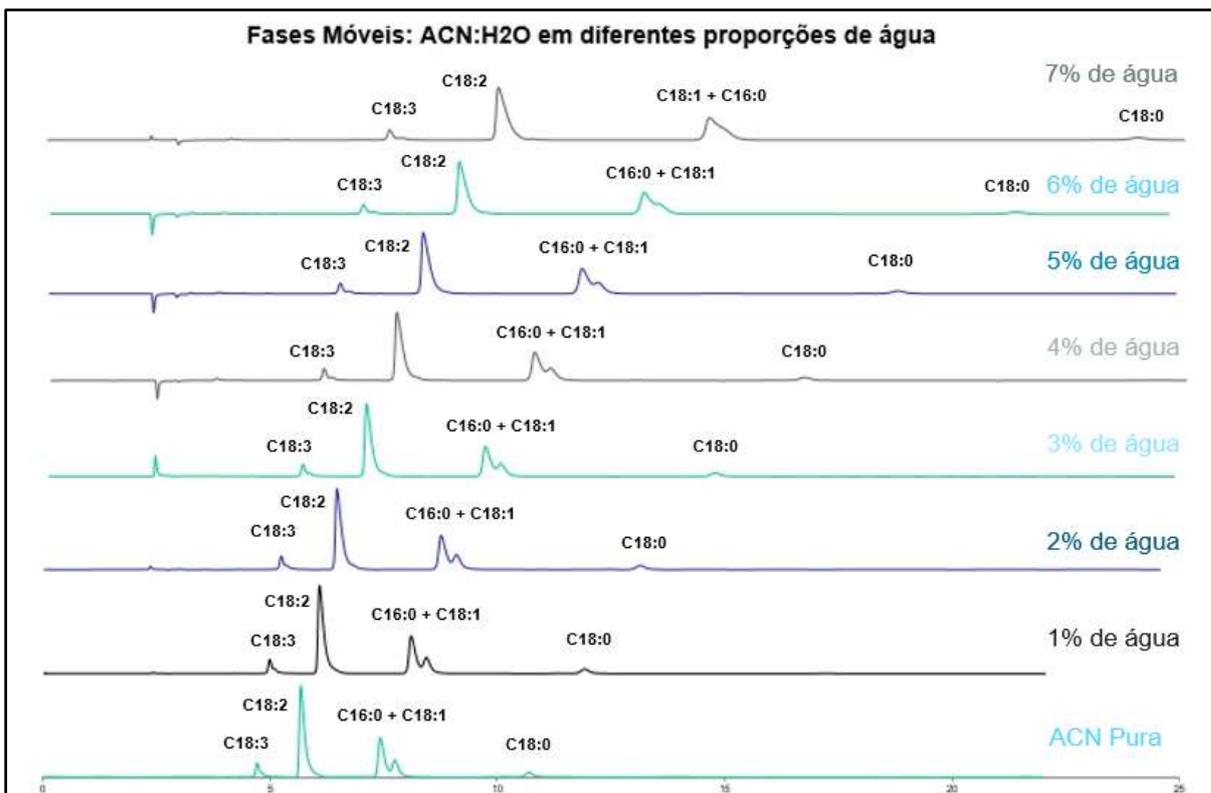
A partir da **Figura 17**, é possível observar que este produto de transesterificação é composto predominantemente pelo estearato de metila (C18:0) e pelo oleato de metila (C18:1). Além disso, é importante salientar que o sebo bovino não é composto pelo linolenato de metila (C18:3) (ver Tabela 1), portanto, não há o pico desse éster no cromatograma.

Dessa forma, foi possível confirmar a hipótese proveniente das pesquisas e estudos realizados anteriormente acerca das diferentes composições dos produtos de transesterificação dos óleos de soja, canola, milho e sebo animal. Com isso, a análise das fases móveis e o estudo de produtividade foram facilitadas visto que o óleo de soja se mostrou como uma ótima fonte de EsMAG: oleato de metila (C18:1), linoleato de metila (C18:2) e linolenato de metila (C18:3) enquanto o sebo animal uma ótima fonte de estearato de metila (C18:0).

#### **5.4 O estudo de diferentes constituições de fase móvel para separação dos EsMAG do produto de transesterificação por CLAE**

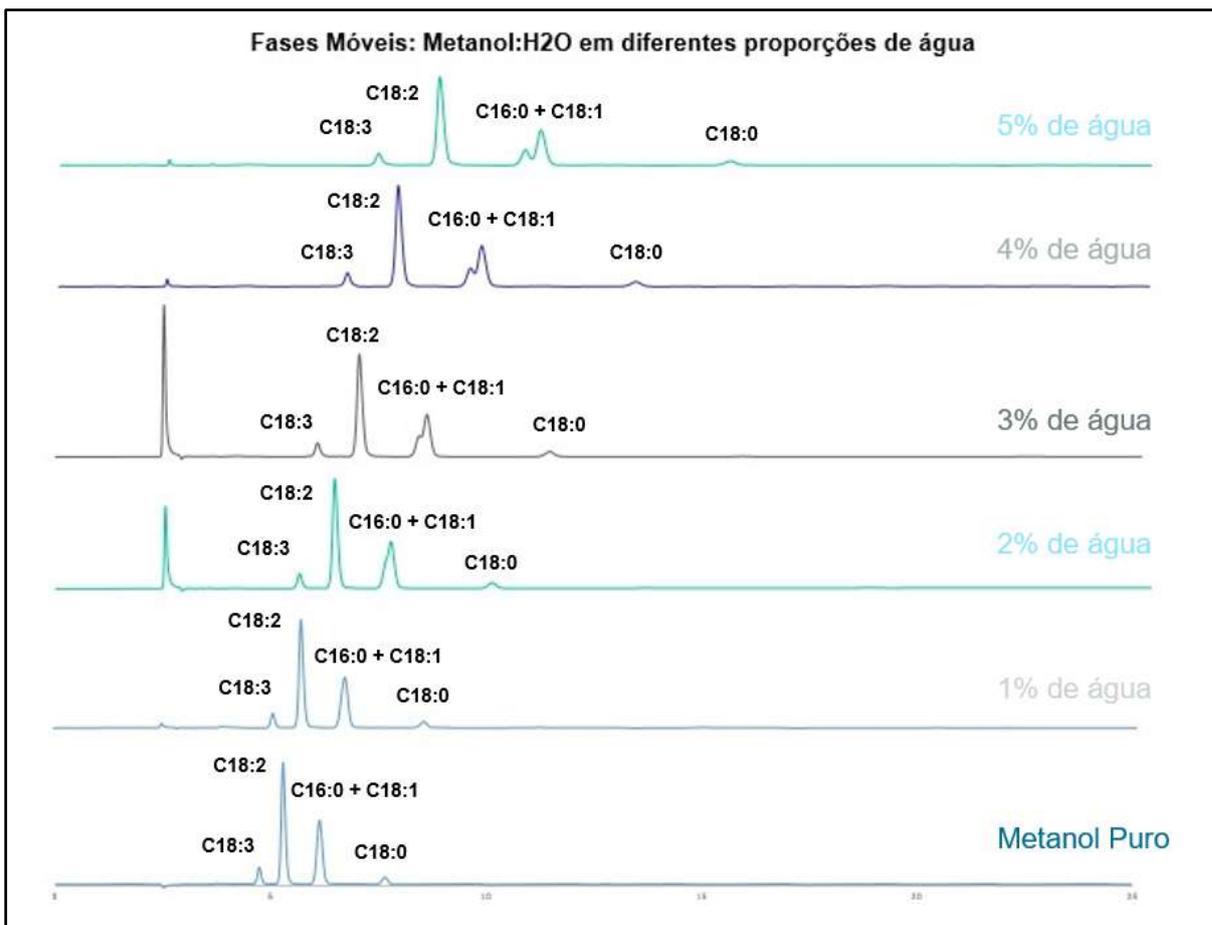
O estudo de diferentes constituições de fase móvel para a separação dos EsMAG do produto de transesterificação por CLAE-IR foi realizado, conforme descrito no item 4.4 (ver página 33) com a finalidade de otimizar o isolamento dos produtos de interesse (estearato de metila - C18:0, oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3). Assim, ao obter os resultados cromatográficos, seria possível identificar a melhor fase móvel tendo como critérios a resolução dos picos, o custo e o tempo de corrida.

Dessa forma, após realizar as análises utilizando a fração constituída majoritariamente por EsMAG do produto de transesterificação do óleo de soja, foram obtidos os cromatogramas sobrepostos apresentados nas **Figura 18 e 19**:



**Figura 18.** Cromatogramas, obtidos por CLAE-IR, da fração composta majoritariamente por EsMAG (estearato de metila - C18:0, oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3), proveniente do produto de transesterificação do óleo de soja, variando fases móveis constituídas de acetonitrila (ACN) e água.

A **Figura 18** apresenta os cromatogramas sobrepostos da análise da composta majoritariamente por EsMAG, proveniente do produto de transesterificação do óleo de soja, variando fases móveis constituídas de acetonitrila e água. A partir dos resultados apresentados na **Figura 18**, observa-se que quanto mais água há na fase móvel, maiores são os tempos de retenção e conseqüentemente o tempo de separação dos EsMAG estudados (estearato de metila - C18:0, oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3). Todavia, ao utilizar acetonitrila pura, nota-se a maior resolução dos picos e uma boa separação dos diferentes EsMAG. Ademais, nota-se que há coeluição do estearato de metila e outro EsMAG que não está presente no escopo deste trabalho, pelo cromatograma utilizando a fase móvel acetonitrila:H<sub>2</sub>O (93:7, v/v).



**Figura 19.** Cromatogramas, obtidos por CLAE-IR, da fração composta majoritariamente por EsMAG (estearato de metila - C18:0, oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3), proveniente do produto de transesterificação do óleo de soja, variando fases móveis constituídas de metanol e água.

Em contrapartida, na **Figura 19** um comportamento diferente da análise da fração composta majoritariamente por EsMAG, provenientes do produto de transesterificação do óleo de soja é apresentado, visto que foram utilizadas fases móveis constituídas de metanol e água. A partir dos resultados apresentados na **Figura 19**, observa-se que quanto mais água há na fase móvel, maiores são o tempo de retenção e conseqüentemente o tempo de separação dos EsMAG estudados (estearato de metila - C18:0, oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3). Entretanto, ao utilizar metanol puro, como fase móvel, observa-se a menor resolução dos picos.

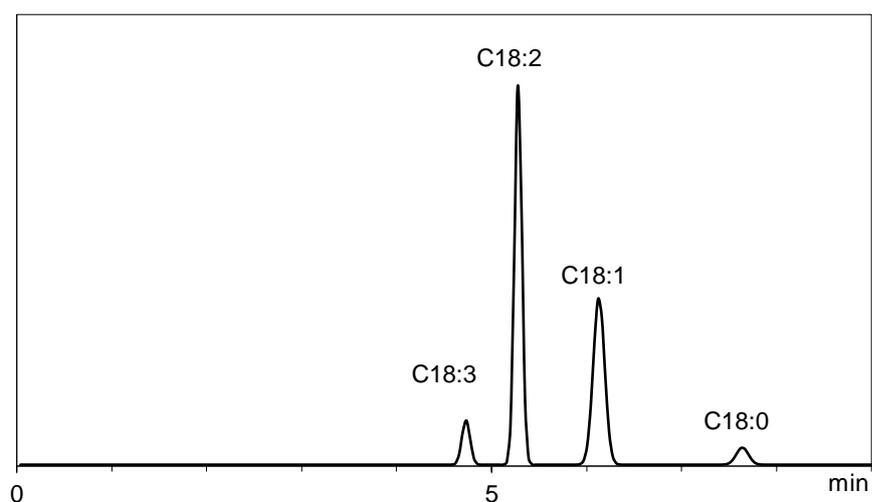
A partir dos cromatogramas apresentados nas **Figuras 18 e 19**, observa-se que há coeluição do oleato de metila (C18:1) com o palmitato de metila (C16:0). Isto posto, torna-se necessário estabelecer uma estratégia na qual não ocorra coeluição entre ésteres de interesse, de forma a separar e isolar os diferentes EsMAG com uma boa resolução cromatográfica. Ademais, constatou-se que ao utilizar uma mistura de acetonitrila e água, a composição máxima de água, em % volumétrica, possível a fim de haver a solubilidade do analito foi de 7%, enquanto ao usar uma mistura de metanol e a água, a composição máxima de água, foi de 5% volumétrica. A partir dos cromatogramas apresentados nas **Figuras 18 e 19** observa-se que as fases móveis que apresentam a melhor separação entre os diferentes EsMAG presentes nas amostras e a melhor resolução dos picos, são acetonitrila:H<sub>2</sub>O (93:7) e metanol:H<sub>2</sub>O (95:5).

Além disso, para minimizar o problema da coeluição do oleato de metila (C18:1) com o palmitato de metila (C16:0), a melhor estratégia é utilizar a fonte de Triacilgliceróis mais conveniente de acordo com a sua composição, levando em consideração o EsMAG majoritário.

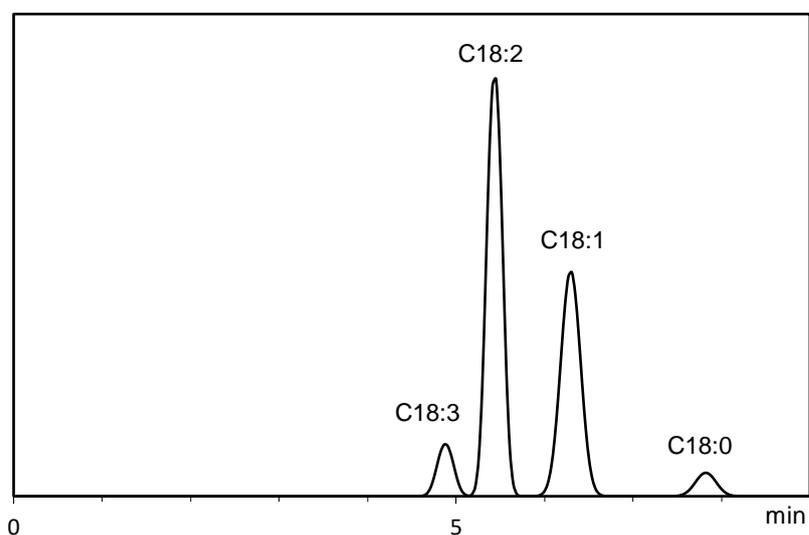
### **5.5 O estudo da produtividade de diferentes composições da fase móvel utilizando modelos matemáticos para a simulação do *scale up* a fim de produzir os padrões de EsMAG**

Além de realizar estudos visando a melhor resolução para a separação dos diferentes EsMAG, para fins econômicos, entendeu-se que o estudo e o levantamento da produtividade de cada uma dessas fases móveis em análise era igualmente relevante para o presente trabalho. Dessa forma, a relação da metodologia de análise descrita anteriormente às possíveis fases móveis em estudo e aos modelos matemáticos para simulação do *scale up*, possibilitou uma investigação mais detalhada a fim de desenvolver o melhor método em termos econômicos e analíticos.

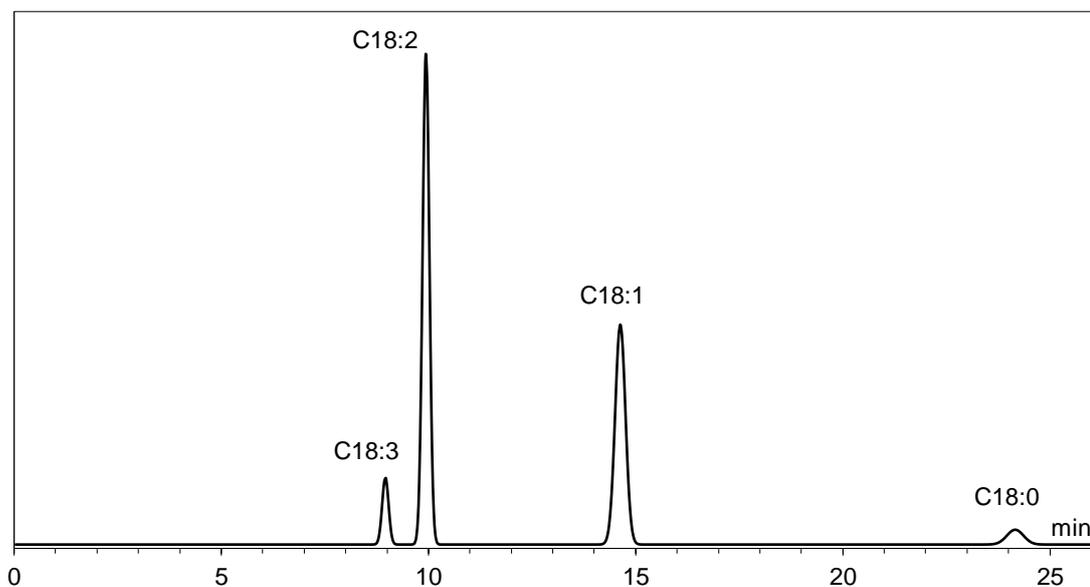
Em vista disso, as **Figuras 20 a 25** são apresentadas para a comparação entre os cromatogramas obtidos experimentalmente e os encontrados por meio da simulação, empregando os modelos de Van Deemter e de Sternberg.



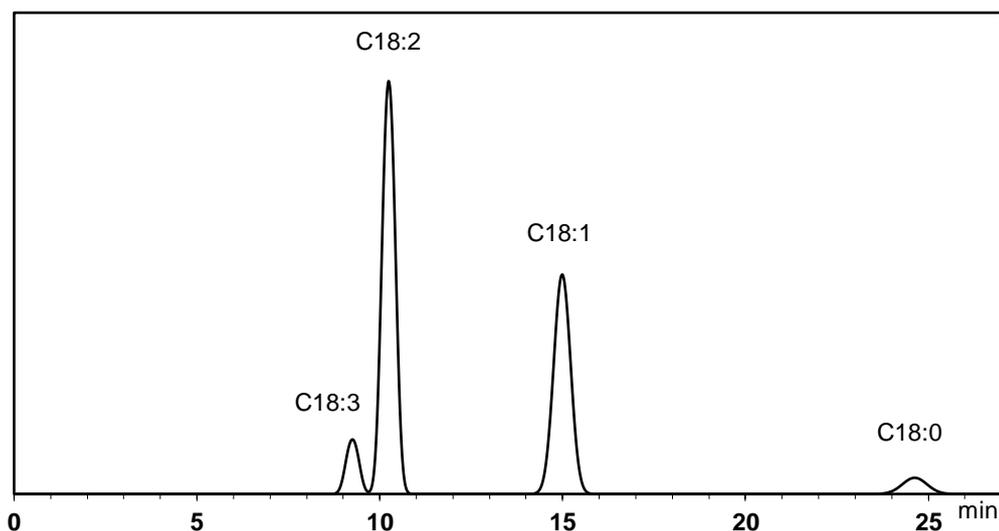
**Figura 20.** Cromatograma simulado a partir das condições de diâmetro da coluna: 0,46 cm; vazão: 1 mL/min; diâmetro de partícula: 5  $\mu$ m e volume de injeção: 0,01 mL, utilizando o modelo de Van Deemter e colaboradores, para condição de acetonitrila pura como fase móvel (C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).



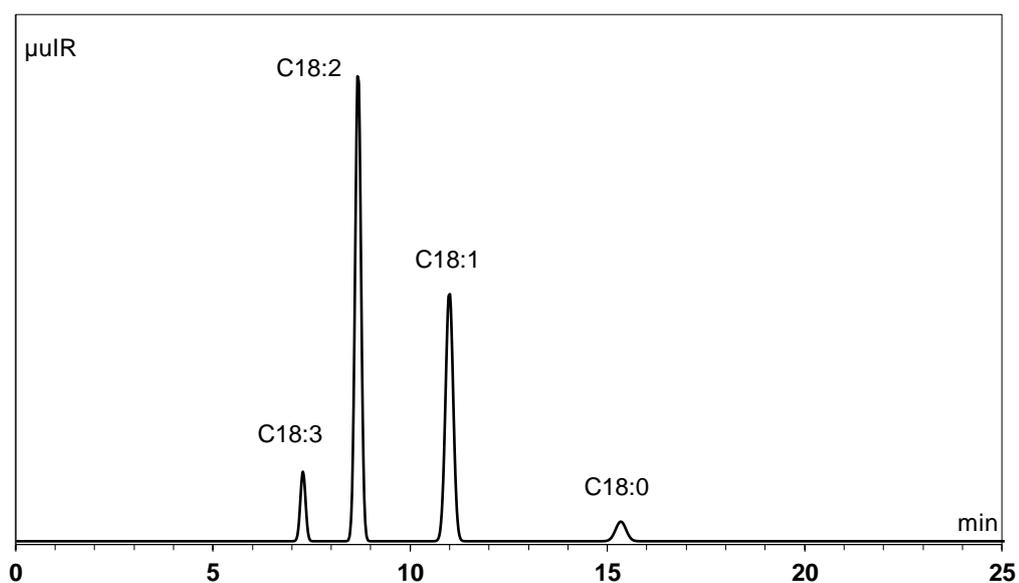
**Figura 21.** Cromatograma simulado a partir das condições extrapoladas de diâmetro da coluna: 2,12 cm; vazão: 21 mL/min; diâmetro de partícula: 12  $\mu$ m e volume de injeção: 12 mL, utilizando o modelo de Sternberg, para condição de acetonitrila pura como fase móvel (C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).



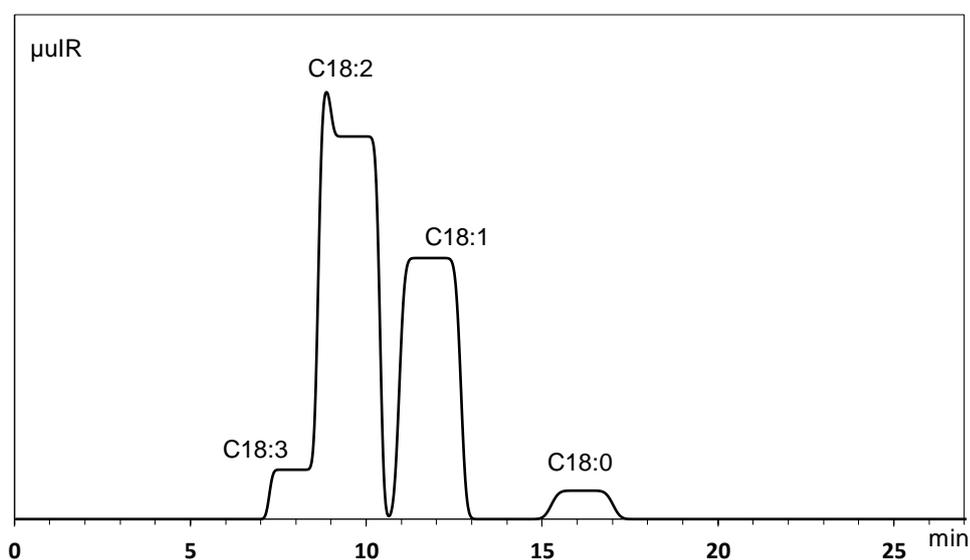
**Figura 22.** Cromatograma simulado a partir das condições de diâmetro da coluna: 0,46 cm; vazão: 1 mL/min; diâmetro de partícula: 5  $\mu$ m e volume de injeção: 0,01 mL, utilizando o modelo de Van Deemter e colaboradores, para condição de 7% volumétrica de H<sub>2</sub>O em acetonitrila como fase móvel (C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).



**Figura 23.** Cromatograma simulado a partir das condições extrapoladas de diâmetro da coluna: 2,12 cm; vazão: 21 mL/min; diâmetro de partícula: 12  $\mu$ m e volume de injeção: 36 mL, utilizando o modelo de Sternberg, para condição de 7% volumétrica de H<sub>2</sub>O em acetonitrila como fase móvel (C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).



**Figura 24.** Cromatograma simulado a partir das condições de diâmetro da coluna: 0,46 cm; vazão: 1 mL/min; diâmetro de partícula: 5  $\mu\text{m}$  e volume de injeção: 0,01 mL, utilizando o modelo de Van Deemter e colaboradores, para condição de 5% volumétrica de  $\text{H}_2\text{O}$  em metanol como fase móvel (C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).



**Figura 25.** Cromatograma simulado a partir das condições extrapoladas de diâmetro da coluna: 2,12 cm; vazão: 21 mL/min; diâmetro de partícula: 12  $\mu\text{m}$  e volume de injeção: 40 mL, utilizando o modelo de Sternberg, para condição de 5% volumétrica de  $\text{H}_2\text{O}$  em metanol como fase móvel (C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).

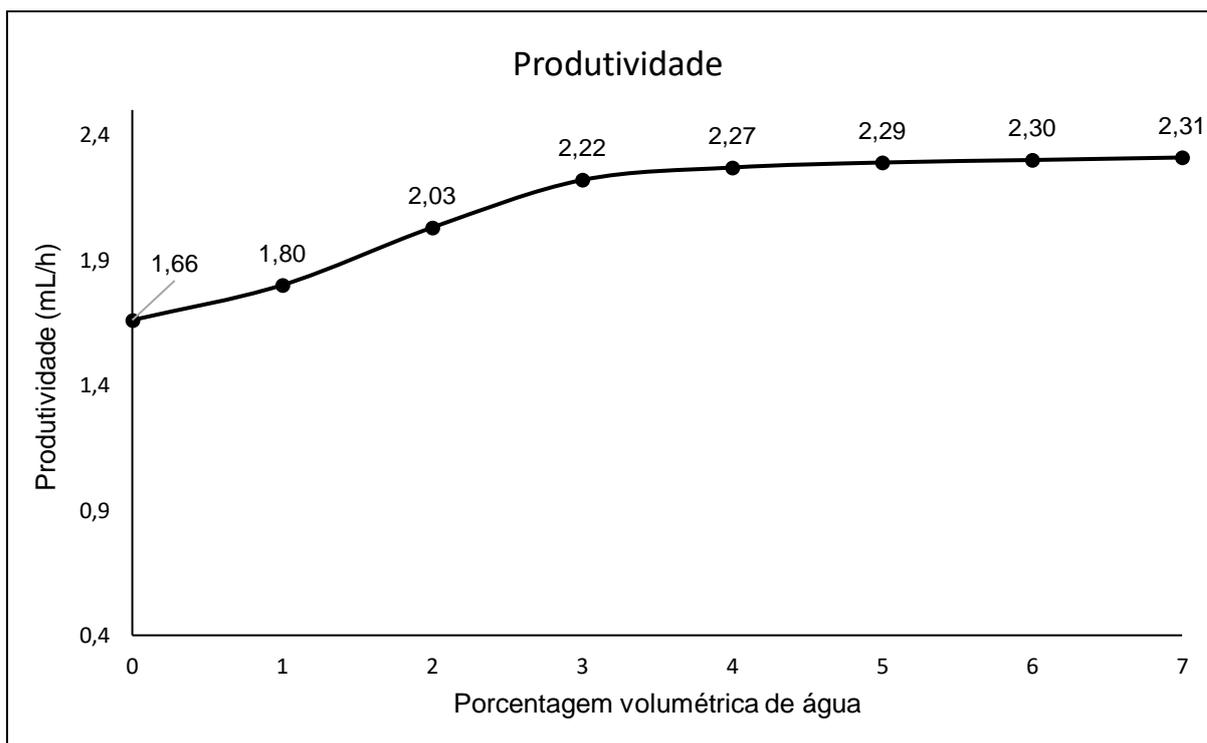
Ao comparar os cromatogramas simulados empregando o modelo de Van Deemter e colaboradores (**Figuras 20, 22 e 24**), nota-se que há grande semelhança nas simulações, quando utilizada para condição de 7% volumétrica de H<sub>2</sub>O em acetonitrila como fase móvel levando-se em conta o tempo de retenção dos EsMAG. Em contrapartida, ao analisar os cromatogramas simulados para condições de diâmetro da coluna, vazão e volume de injeção extrapoladas, utilizando o modelo de Sternberg e uma fase móvel composta por 5% volumétrica de H<sub>2</sub>O em metanol, observa-se uma condição de sobrecarga na coluna cromatográfica, na **Figura 25**, o que indica o excesso de analito na injeção. Entretanto, ao analisar o cromatograma simulado para condições extrapoladas e uma fase móvel composta por 7% volumétrica de H<sub>2</sub>O em acetonitrila, na **Figura 23**, nota-se que nessas condições a coluna começa a se sobrecarregar, diferentemente utilizando a fase móvel composta majoritariamente por metanol. Desta forma, é possível realizar o estudo de produtividade variando as fases móveis já mencionadas anteriormente.

A **Tabela 5** apresenta as condições de análise de cada uma das fases móveis estudadas, empregando diferentes composições de acetonitrila e água.

**Tabela 5.** Condições transpostas variando fases móveis contituídas de acetonitrila e água.

% volumétrica de H <sub>2</sub> O em acetonitrila	Volume de injeção (mL)	Tempo total de corrida (min)	Produtividade (mL/h)
0	12,0	13	1,66
1	14,0	14	1,80
2	18,0	16	2,03
3	21,0	17	2,22
4	24,0	19	2,27
5	28,0	22	2,29
6	32,0	25	2,30
7	36,0	28	2,31

A **Figura 26** apresenta a curva de produtividade das análises para fases móveis constituídas de diferentes composições de acetonitrila e água.

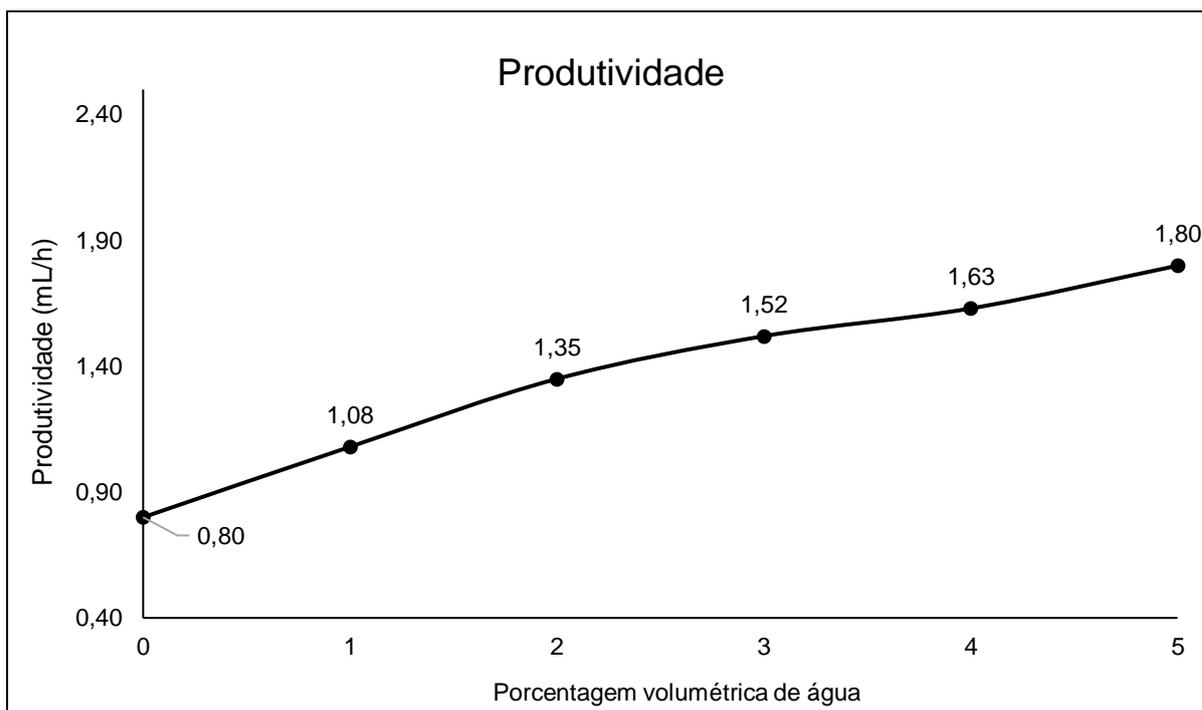


**Figura 26.** Curva de produtividade das condições transpostas utilizando fases móveis constituídas de diferentes composições de acetonitrila e água.

Igualmente, a **Tabela 6** apresenta as condições de análise de cada uma das fases móveis estudadas, empregando diferentes composições de metanol e água.

**Tabela 6.** Condições transpostas variando fases móveis constituídas de metanol e água.

% volumétrica de H <sub>2</sub> O em metanol	Volume de injeção (mL)	Tempo total de corrida (min)	Produtividade (mL/h)
0	4,0	9	0,80
1	6,0	10	1,08
2	9,0	12	1,35
3	11,0	13	1,52
4	14,5	16	1,63
5	18,0	18	1,80



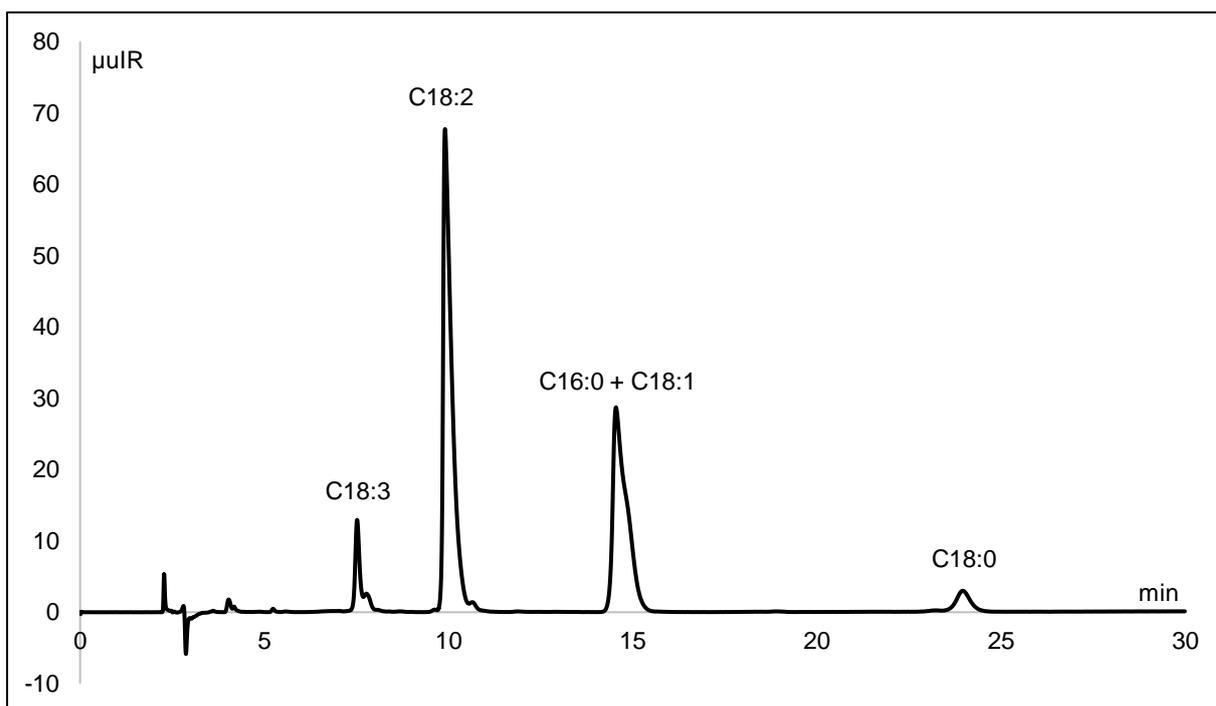
**Figura 27.** Curva de produtividade das condições transpostas utilizando fases móveis contínuas de diferentes composições de metanol e água.

A partir das curvas de produtividade apresentadas nas **Figuras 26 e 27**, observa-se que as fase móveis metanol:H<sub>2</sub>O (95:5) (v/v) e acetonitrila:H<sub>2</sub>O (93:7) (v/v) são boas escolhas para análise visto que possuem as mais altas produtividade entre as fases móveis contínuas majoritariamente por metanol e acetonitrila, respectivamente, 1,80 mL/h e 2,31 mL/h, além de cumprirem os requisitos de isolamento e resolução dos picos já citados.

Deste modo, como as produtividades das fases móveis acetonitrila pura e metanol:H<sub>2</sub>O (95:5) (v/v) são próximas e a separação dos picos na fase móvel acetonitrila:H<sub>2</sub>O (93:7) (v/v) é boa, ao levar em consideração a produtividade e a transposição de escalas, entende-se que haveria 3 fases móveis com potencial para atingir os objetivos do presente trabalho. Sendo assim, para realizar a separação e o isolamento dos diferentes EsMAG por CLAE-IR, foi escolhida a fase móvel acetonitrila:H<sub>2</sub>O (93:7) (v/v), levando em consideração a separação dos diferentes EsMAG, a resolução dos picos e a produtividade.

## 5.6 A separação dos EsMAG por CLAE

A **Figura 28** apresenta o cromatograma, obtido por CLAE-IR da fração conituida majoritariamente por EsMAG, proveniente do produto de transesterificação do óleo de soja utilizando acetonitrila:H<sub>2</sub>O (93:7) (v/v) como fase móvel.



**Figura 28.** Cromatograma, obtido por CLAE-IR, da fração constituída majoritariamente por EsMAG, proveniente do produto de transesterificação do óleo de soja, utilizando acetonitrila:H<sub>2</sub>O (93:7) (v/v) como fase móvel (C16:0 – palmitato de metila; C18:0 – estearato de metila; C18:1 – oleato de metila; C18:2 – linoleato de metila; C18:3 – linolenato de metila).

A partir do cromatograma apresentado na **Figura 28**, pode-se concluir que utilizando a mistura acetonitrila:H<sub>2</sub>O (93:7) (v/v) como fase móvel é possível separar e isolar os EsMAG de interesse (estearato de metila - C18:0, oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3) com alta produtividade. É importante ressaltar que a metodologia desenvolvida permitiu a separação e o isolamento dos diferentes EsMAG, provenientes de produtos de transesterificação, por CLAE-IR em escala semipreparativa.

## 6. Conclusão

O método proposto neste trabalho, baseado na CLAE-IR, foi capaz de separar e isolar os EsMAG que compõem o produto de transesterificação do óleo de soja, canola e milho e do sebo animal (estearato de metila - C18:0, oleato de metila - C18:1, linoleato de metila - C18:2 e linolenato de metila - C18:3). Desta forma, o método desenvolvido possui potencial para ser empregado no isolamento de cada um dos EsMAG, para a obtenção de padrões aplicáveis no controle da qualidade do biodiesel diminuindo custos assim a caracterização química do biodiesel por métodos analíticos.

A implementação do método proposto para obtenção de padrões pelos laboratórios de controle de qualidade para seu próprio abastecimento é viável e vantajoso, uma vez que apresentou eficiência de recuperação superior a 80% em todas as classes de componentes.

Por fim, a análise, por CLAE-FRMA, das frações obtidas por CLAE-IR após a realização da EFS do produto de transesterificação do óleo de soja, canola e milho e do sebo animal, mostrou que a separação e o isolamento dos EsMAG do biodiesel foram eficientes.

## 7. Perspectivas

1. Utilizar duas colunas Thermo Scientific Acclaim<sup>TM</sup> de 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, com fase estacionária octadecilsilano de 5 µm de tamanho de partícula, com 120 Å de diâmetro de poro em série para estudo da coeluição.
2. Estudar a viabilidade da separação e isolamento do Palmitato de metila.
3. Analisar as condições de sobrecarga para todas as fases móveis estudadas.
4. Utilizar a fonte de triacilgliceróis mais conveniente de acordo com a sua composição, levando em consideração o EsMAG majoritário.

## 8. Referências Bibliográficas

ABRAMOWITZ, M.; STEGUN, I.A. **Handbook of mathematical functions**. New York: Dover Publications, p. 299, 1965.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. **Boletim de Qualidade**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Consultado em 02 de setembro de 2022.

ANDRADE, D.F.; MAZZEI, J.L.; D'AVILA, L.A. **Separation of Acylglycerols from Biodiesel by High Performance Liquid Chromatography and Solid-Phase Extraction**. Revista Virtual de Química, v. 3, p. 452-466, 2011.

ANDRADE, D. F. **Caracterização de biodiesel através da separação dos constituintes por cromatografia líquida**. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

AQUINO NETO, F. R.; SOUZA NUNES, D.S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Editora Interciência, Rio de Janeiro, 1ª ed., 2003.

ARAUJO, M. **Desenvolvimento de método alternativo para determinação de ésteres totais em biodiesel por CLAE-UV**. Dissertação (Mestrado), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2017.

BLATT, G.G. **Utilização da cromatografia em coluna e da Cromatografia líquida de alta eficiência na separação, isolamento e identificação das principais classes constituintes do biodiesel**. 115 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

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

BRAVI, E.; PERRETTI, G.; MONTANARI, L. **Fatty acids by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detector.** Journal of Chromatography A, v. 1134, p. 210-214, 2006.

BROUCK, D.M.D. **Determinação da adulteração de biodiesel, por óleos vegetais, através da cromatografia líquida de alta eficiência.** Monografia - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

CARDOSO, T.C. **Separação e isolamento de acilgliceróis do biodiesel por extração em fase sólida (EFS) e caracterização por cromatografia.** Projeto Final de curso, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2012.

CARVALHO, R.C. **Obtenção de frações enriquecidas e/ou componentes individuais de monoacilgliceróis e diacilgliceróis a fim de obter padrões em escala laboratorial pela reação de glicerólise.** 90 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

CHANDRASEKARAN, V.; ARTHANARISAMY, M.; NACHIAPPAN, P.; DHANAKOTTI, S.; MOORTHY, B. **The role of nano additives of biodiesel and diesel blended transportation fuels.** Transportation Research part D, v. 46, p. 145-156, 2016.

COLLINS, C. H. **Princípios básicos de cromatografia.** In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.(orgs.) Fundamentos de Cromatografia, Editora Unicamp, 2007.

CORGOZINHO, C.N.C.; PASA, V.M.D.; BARBEIRA, P.J.S. **Determination of residual oil in diesel oil by spectrofluorimetric and chemometric analysis.** Talanta, v. 76, p. 479-484, 2008.

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

COSTA, R.P.M.; SOUZA, C.G.; SANTOS, R.C.; ANDRADE, D.F.; D'AVILA, L.A. **Simultaneous Analysis of Mono-, Di-, Triacylglycerols, and Fatty Acid Methyl Esters in Biodiesel by Size-Exclusion Chromatography**. European Journal of Lipid Science and Technology, v. 123, n. 12, p. 2100069, 2021.

COZENDEY, D.A.; MUNIZ, R.O.; SANTOS, R.C.; SOUZA, C.G.; ANDRADE, D.F.; D'AVILA, L.A. **Quantitative analysis of free glycerol in biodiesel using solid-phase extraction and high performance liquid chromatography**, Microchemical Journal, v. 168, p. 106347, 2021.

CZAUADERNA, 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. **Importance of biodiesel as transportation fuel**. Energy Policy, v. 35 p. 4661-4670, 2007.

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

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

EMBRAPA. **Oleaginosas e seus Óleos: Vantagens e Desvantagens para Produção de Biodiesel**. ISSN 0103-0205, p. 15, 2008.

ETTRE, L.S.; WELTER, C.; KOLB, B. **Determination of gas-liquid partition coefficients by automatic equilibrium headspace-gas chromatography utilizing the phase ratio variation method**. Chromatographia, v. 35, n. 1, p. 73-84, 1993.

GU, T. **Mathematical modeling and scale up of liquid chromatography**. Berlin: Springer-Verlag Telos, p. 123, 1995.

GUIOCHON, G. **Preparative liquid chromatography**. Journal of Chromatography A, n. 1-2, v. 965, p. 129-161, 2002.

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.

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' Society, v. 69, p. 772-776, 1992.

KALTENBRUNNER, O.; JUNGBAUER, A.; YAMAMOTO, S. **Prediction of the preparative chromatography performance with a very small column**. Journal of Chromatography A, v. 760, n. 1, p. 41-53, 1997.

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.

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. Ed. RiMa. São Carlos, 2004.

LEITE, D.S.S; FERNANDES, T.E.S. **Desenvolvimento de Método para Separação e Identificação de Biodiesel e/ou Óleos Vegetais em BX**, Trabalho de conclusão de curso - Escola de Química, Universidade federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

LI, M.; PHAM, P.J., WANG, T., PITTMAN J.R., C.U., LI, T. **Solid phase extraction and enrichment of essential fatty acid methyl esters from soy-derived biodiesel by novel p-complexing sorbents**. Bioresource Technology, v. 100, p. 6385-6390, 2009.

MATOS, T.S.; SANTOS, R.C.; SOUZA, C.G.; CARVALHO, R.C.; ANDRADE, D.F.; D'AVILA, L.A. **Determination of the Biodiesel Content on Biodiesel/Diesel Blends and Their Adulteration with Vegetable Oil by High-Performance Liquid Chromatography**. Energy & Fuels, v. 33, n. 11, p. 11310-11317, 2019.

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.

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.

MIRANDA, J.L.; MOURA, L.C. **BOA - Biodiesel: Obtenção e Análise de qualidade**. Publit Soluções Editoriais, 7ª edição, 2016.

MOTA, C.J.A.; SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L.C. **Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel**. Química Nova, v. 32 p. 639-648, 2009.

MUNIZ, R.O.; MARTINS, S.B.; HONORIO, G.G.; CUNHA, J.N.; ANDRADE, D.F.; PRADELLE, R.N.C.; TURKOVICS, F.; NETO, R.S.; D'AVILA, L.A.; D'ELIA, E. **Total glycerol analysis in biodiesel samples using solid phase extraction coupled with enzymatic-spectrophotometric determination**. Analytical Methods, v. 11, n. 6, p. 767-773, 2019.

NARAYAN, C.M. **Vegetable oil as engine fuels-prospect and retrospect proceedings on recent trends in automotive fuels**. Proceedings on recent trends in automotive fuels, p. 22-26. Nagpur, India, 2002.

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.

POPPE, H. **Distribution isotherms in reversed-phase systems.** Journal of Chromatography A, v. 656, n. 1-2, p. 19-36, 1993.

PRAMANIK, K. **Properties and use of Jatropha curcas oil and diesel fuel blends in compression ignition engine.** Renew Energy, v. 28, p 239–248, 2003.

RATHORE, A.; VELAYUDHAN, A. **Guidelines for.** BioPharm International, p. 35, 2003.

RUIZ-GUTIÉRREZ, V.; PÉREZ-CAMINO, M.C. **Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds.** Journal Of Chromatography A, v. 885, p. 321-341, 2000.

SANTOS, B.L. **Análise simultânea dos ésteres e acilgliceróis do biodiesel por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (CLAE-IR).** Dissertação - Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

SCHOLFIELD, C.R. **High Performance Liquid Chromatography of Fatty Methyl Esters: Preparative Separations.** Analytical Chemistry, v. 47, nº. 8, p. 1417-1420, 1975.

SCHWAB, A.W.; BAGBY, M.O.; FREEDMAN, B. **Preparation and Properties of Diesel Fuels from Vegetable Oils.** Fuel, v. 66, p. 1372-1378, 1987.

SEIDEL-MORGENSTERN, A.; SCHIMIDT-TRAUB, H.; MICHEL, M.; EPPING, A. **Preparative Chromatography.** John Wiley & Sons, p. 321, 2012.

SHANG, N.C.; LIU, R.Z.; CHEN, Y.H.; CHANG, C.Y.; LIN, R.H. **Characterization of fatty acid methyl esters in biodiesel using high-performance liquid chromatography.** Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, v. 43, p. 354-359, 2012.

SILVA, M.A.A.; BORGES, A.T.D.; ANTONIOSI, N.R.F. **Desenvolvimento de ensaio para análise qualitativa de biodiesel em misturas diesel-biodiesel para aplicação em postos revendedores de combustível.** Química Nova, v. 39, p. 100-103, 2016.

SOUZA, C.G.; ARAUJO, M.T.; SANTOS, R.C.; ANDRADE, D.F.; SILVA, B.V.; D'AVILA, L.A. **Analysis and quantitation of fatty acid methyl esters in biodiesel by high-performance liquid chromatography.** Energy & Fuels, v. 32, n. 11, p. 11547-11554, 2018.

STERNBERG, J.C. **Extracolumn contributions to chromatographic band broadening.** In: GIDDINGS, J.C.; KELLER, R.A. (ed.). Advances in Chromatography. New York: Marcel Dekker, p. 205-270, 1966.

SUAREZ, P.A.Z.; MENEGHETTI, S.M.P. **Parâmetros físicos químicos para processos de produção de biodiesel.** Brasília, RBTB, 2015.

SUAREZ, P.A.Z. **Produção e uso de biodiesel: definições e aspectos tecnológicos.** In: MIRANDA, J. L., MOURA, L. C. (Orgs). Biodiesel: Obtenção e análise de Qualidade, Publit Soluções Editoriais, 2016.

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.

YUSUF, N.N.A.N.; KAMARUDIN, S.K.; YAAKUB, Z. **Energy Conversion and Management.** Volume, v. 52, p. 2741-2751, 2011.