



Separação e Isolamento das Principais Classes Constituintes do Biodiesel por Extração em Fase Sólida e Caracterização por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

FLAVIO PEIXOTO BARBOSA LINS JUNIOR

Monografia em Engenharia Química

Orientadores:

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

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

Agosto de 2014

Separação e Isolamento das Principais Classes Constituintes do Biodiesel por Extração em Fase Sólida e Caracterização por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Flavio Peixoto Barbosa Lins Junior

Monografia em Engenharia Química submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

Elizabeth Roditi Lachter, D. Sc. – DQO/IQ/UFRJ

Amaro Gomes Barreto Junior, D. Sc. – DEQ/EQ/UFRJ

Amanda Pereira Franco dos Santos, M. Sc. – LABCOM/EQ/UFRJ

Orientado por:

Luiz Antonio d'Ávila, D. Sc. – DPO/EQ/UFRJ

Débora França de Andrade, D. Sc. – DQA/IQ/UFRJ

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Agosto, 2014

LINS JUNIOR, Flavio Peixoto Barbosa.

Separação e isolamento das principais classes constituintes do biodiesel por extração em fase sólida e caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência . Flavio Peixoto Barbosa Lins Junior. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2014. xvii,88p.; il. Monografia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2014.

Orientadores: Luiz Antonio d'Ávila e Débora França de Andrade.

1. Biodiesel 2. EFS 3. CLAE 4. Monografia (Graduação- UFRJ/EQ). 5. Luiz Antonio d'Ávila e Débora França de Andrade. I. Separação e Isolamento das Principais Classes Constituintes do Biodiesel por Extração em Fase Sólida e Caracterização por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Dedicatória

Dedico este projeto final de curso aos meus pais, Francisca Pontes Broca Lins e Flavio Peixoto Barbosa Lins, a minha tia, madrinha e segunda mãe Valéria Peixoto Barbosa Lins, a minha avó Jandyra Peixoto Barbosa Lins por todo o amor e orientação que me deram. Em especial dedico este projeto ao meu avô Dinaceu Barbosa Lins (*in memoriam*) que mesmo não estando presente, fisicamente, continua sendo meu exemplo de ser humano.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao professor Luiz Antonio d'Ávila por me ter recebido como aluno de projeto final e a professora Débora França de Andrade por toda a dedicação e assistência que me prestou como minha orientadora.

Ao professor João Francisco Cajaíba da Silva, pela oportunidade de estágio, por ter me apresentado ao professor d'Ávila e por todo respeito e orientação profissional que recebi durante o tempo do estágio.

À todos os colegas de LABCOM pela paciência, orientação e apoio durante a operação dos equipamentos.

Quero agradecer também aos meus pais, Francisca Pontes Broca Lins e Flavio Peixoto Barbosa Lins, por terem me proporcionado a educação necessária para que eu pudesse alcançar o que alcancei hoje, terem me fornecido apoio, amor, e todos os recursos necessários à minha graduação.

À minha avó Jandyra Peixoto Barbosa Lins e minha madrinha Valéria Peixoto Barbosa Lins, por toda a felicidade que me proporcionaram desde a minha infância até hoje, pelos valores e princípios que me forneceram, por sempre terem me dado o melhor que puderam seja material, emocional ou espiritual. Jamais seria quem sou sem elas.

Gostaria de agradecer especialmente a minha namorada, melhor amiga, companheira e alma-gêmea Ísis Lopes de Oliveira, por ter sido durante essa graduação aquilo que as vezes me faltou: minha memória, minha motivação, minha responsabilidade, minha organização. Agradeço pelo carinho, pelo amor e por todo apoio que me deu nestes cinco anos de namoro, meu caminho teria sido muito mais difícil sem ela.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

SEPARAÇÃO E ISOLAMENTO DAS PRINCIPAIS CLASSES CONSTITUINTES DO BIODIESEL POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Flavio Peixoto Barbosa Lins Junior

Agosto, 2014

Orientadores: D. Sc. Débora França de Andrade
D. Sc. Luiz Antonio d'Avila.

A reação de transesterificação de óleos vegetais para a produção do biodiesel acontece em três etapas. Nesta reação, existe a formação de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) que são intermediários da reação. Além destes intermediários, os triacilgliceróis (TAG) não reagidos, oriundos do óleo vegetal, também podem estar presentes no produto final. Os MAG, DAG e TAG constituem os principais contaminantes do biodiesel, e sua presença altera as propriedades do combustível, podendo causar problemas operacionais quando utilizados em motores de combustão.

Com o aumento da importância do biodiesel na matriz energética brasileira, o controle da qualidade química do mesmo, principalmente em relação aos teores de MAG, DAG e TAG, se torna fundamental para fornecer um produto de qualidade ao mercado. Sendo assim, novas técnicas de análise menos dispendiosas e mais rápidas devem ser desenvolvidas.

Neste projeto, a técnica da extração em fase sólida (EFS), utilizando cartuchos constituídos com fase aminopropilsilano e sílica, foi desenvolvida para a separação e o isolamento das principais classes constituintes (MAG, DAG, TAG e ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG)) de um produto de transesterificação de baixa conversão. Este produto foi produzido a partir do óleo de soja e do metanol (razão molar 1:3). O produto de transesterificação bem como as frações enriquecidas em cada uma das quatro classes (MAG, DAG, TAG e EsMAG), obtidas por EFS, foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa não aquosa (CLAE-FRNA).

Foi possível nas condições empregadas, separar cada classe constituinte em frações individuais empregando três EFS consecutivas com diferentes fases móveis. Os componentes mais polares (MAG e DAG) apresentaram fatores de recuperação da ordem de 80%, enquanto os menos polares (TAG e EsMAG) apresentaram fatores de recuperação da ordem de 90%.

ABSTRACT

SEPARATION AND ISOLATION OF BIODIESEL MAIN COMPONENT CLASSES IN SOLID PHASE EXTRACTION AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY CHARACTERIZATION

Flavio Peixoto Barbosa Lins Junior

Agosto, 2014

Advisors: D. Sc. Débora França de Andrade
D. Sc. Luiz Antonio d'Avila.

The transesterification of vegetable oils for biodiesel production happens in three stages. In this reaction, there is the formation of monoacylglycerols (MAG) and diacylglycerols (DAG) which are the reaction intermediates. Beyond these intermediates, unreacted triacylglycerols (TAG), derived from vegetable oil, can also be present in the final product. MAG, DAG and TAG are the main contaminants of biodiesel, and its presence alters the properties of the fuel, may causing operational problems when used in combustion engines.

With the increasing importance of biodiesel into the Brazilian energy matrix, the chemical quality control of it, especially in relation to MAG, DAG and TAG levels, becomes critical to provide a quality product to the market. Hence, new less expensive and faster analysis techniques should be developed.

In this project, the solid phase extraction (SPE) technique using aminopropylsilane and silica phase cartridges, was developed for the separation and isolation of the main constituent classes (MAG, DAG, TAG and fatty acids methyl esters (FAMES)) of a low conversion transesterification product. This product was obtained from soybean oil and methanol (molar ratio 1:3). The transesterification product and the fractions enriched in each of the four classes (MAG, DAG, TAG and FAMES) obtained by EFS were analyzed by non-aqueous reverse phase high performance liquid chromatography (NARP-HPLC).

Was possible, under the employed conditions, separate each constituent class in individual fractions using three consecutive SPE with different mobile phases. The more polar components (MAG and DAG) showed recovery factors of around 80%, while the less polar (TAG and FAMES) showed recovery factors of around 90%.

Índice de Figuras

- Figura 1:** Reação de transesterificação geral e global de um triacilglicerol. O grupo R representa a cadeia do álcool. Os grupos R', R'' e R''' representam as cadeias hidrocarbônicas alifáticas saturadas ou insaturadas; podendo ser iguais ou diferentes (adaptado de CARDOSO, 2012). **9**
- Figura 2:** Reações consecutivas reversíveis para a transesterificação dos triacilgliceróis. Os grupos R, R' e R'' representam as cadeias hidrocarbônicas alifáticas saturadas ou insaturadas; podendo ser iguais ou diferentes (Adaptado de MEHER, VIDYA SAGAR, NAIK, 2006). **11**
- Figura 3:** Cromatograma típico, obtido por CLAE-FRNA, de um produto de transesterificação de baixa conversão (ANDRADE, MAZZEI, d'AVILA, 2011). **27**
- Figura 4:** Representação esquemática do método de separação dos EsMAG, MAG, DAG e TAG, por EFS. Onde os cartuchos (1) e (3) são constituídos da fase estacionária sílica, 500mg, 3 mL, tamanho de partícula 230-400 mesh, marca SILICYCLE ULTRA PURE e o cartucho (2) da fase estacionária aminopropilsilano, 500 mg, 3 mL, tamanho de partícula 40 µm, marca Bond Elut. As fases móveis são constituídas por: solução A- 15% (v/v) éter dietílico em éter de petróleo, solução B- éter dietílico, solução C- *n*-hexano, solução D- clorofórmio:metanol (2:1) e solução E- 45% (v/v) éter dietílico em éter de petróleo. **41**
- Figura 5:** Representação esquemática do sistema analítico usado na EFS (adaptado de LANÇAS, 2004). **42**
- Figura 6:** Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, do produto de transesterificação do óleo de soja de baixa conversão (primeiro controle). **48**
- Figura 7:** Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, do produto de transesterificação do óleo de soja de baixa conversão – aproximação na região dos MAG. **49**
- Figura 8:** Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, da fração 1, contendo EsMAG e TAG, obtida na primeira EFS através da eluição com solução 15% (v/v) de éter dietílico em éter de petróleo. **51**

Figura 9: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, da fração 2, Contendo MAG e DAG, obtida na primeira EFS através da eluição com éter dietílico.	53
Figura 10: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, da segunda amostra controle, contendo EsMAG e TAG (Fração 1 da 1ª Extração).	56
Figura 11: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, da fração 3, contendo EsMAG, obtida na segunda EFS, através da eluição com <i>n</i> -hexano.	57
Figura 12: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, da fração 4, contendo TAG, obtida na segunda EFS através da eluição com solução clorofórmio:metanol (2:1).	58
Figura 13: Cromatograma obtido, por CLAE-FRNA, da terceira amostra controle, constituída de MAG e DAG (Fração 2 da 1ª extração).	61
Figura 14: Cromatograma obtido, por CLAE-FRNA, da fração 5, constituída de DAG, obtida na terceira EFS, através da eluição com solução 45% de éter dietílico em éter de petróleo.	62
Figura 15: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, da fração 6, constituída de MAG, obtida na terceira EFS, através da eluição com éter dietílico.	63

Índice de Tabelas

Tabela 1: Concentração mássica (% p/p) de AGL em algumas matérias primas (VAN GERPEN <i>et al.</i> 2006).	14
Tabela 2: Nomenclatura, fórmula estrutural condensada, massa molecular (MM), número de carbonos (NC) e número de ligações duplas (NLD) de alguns AG constituintes de TAG em óleos e gorduras naturais (adaptado de SRIVASTAVA, PRASAD, 2000; SAAD, 2005).	17
Tabela 3: Concentração mássica (% p/p) de AG em alguns óleos vegetais usados para a produção de biodiesel (Baseado em dados de ANVISA, 1999; MA, HANNA, 1999; SRIVASTAVA, PRASAD, 2000; COSTA NETO <i>et al.</i> , 2000; DEMIRBAS, 2003; DMYTRYSHYN <i>et al.</i> , 2004; PINTO <i>et al.</i> , 2005; GUARIEIRO, 2006 e CONCEIÇÃO <i>et al.</i> , 2007).	18
Tabela 4: Limites em porcentagem mássica dos MAG, DAG, TAG, GL, GT e EsAG exigidos pelas normas americana, europeia e brasileira, respectivamente.	21
Tabela 5: Componentes identificáveis no produto de transesterificação pelo método da CLAE-FRNA (adaptado de ANDRADE, MAZZEI e d'ÁVILA, 2011).	39
Tabela 6: Composições (%), em MAG, EsMAG, DAG e TAG, da amostra controle da primeira EFS (primeiro controle) do produto de transesterificação do óleo de soja de baixa conversão.	50
Tabela 7: Composição (%) da fração 1 obtida pela primeira EFS e recuperação (%) das classes constituintes em relação a primeira amostra controle.	52
Tabela 8: Composição (%) da fração 2 obtida pela primeira EFS e recuperação (%) das classes constituintes em relação a primeira amostra controle.	54
Tabela 9: Composição (%) da fração 3 obtida pela segunda EFS e recuperação (%) das classes constituintes em relação a segunda amostra controle.	58
Tabela 10: Composição (%) da fração 4 obtida pela segunda EFS e recuperação (%) das classes constituintes em relação a segunda amostra controle.	59

Tabela 11: Composição (%) da fração 5 obtida pela terceira EFS e recuperação (%) das classes constituintes em relação a terceira amostra controle.	63
Tabela 12: Composição (%) da fração 6 obtida pela terceira EFS e recuperação (%) das classes constituintes em relação a terceira amostra controle.	64
Tabela 13: Fator de recuperação das classes constituintes do biodiesel após a sequências de EFS.	65

Índice de Equações

Equação 1. Determinação da área corrigida (A_c) de cada componente (códigos A até T – tabela 5) identificado nos cromatogramas obtidos por CLAE.	40
Equação 2. Determinação da recuperação de cada classe (R_{Classe}) de componentes (MAG, EsMAG, DAG e/ou TAG) presentes nas frações obtidas pelo processo de EFS.	45
Equação 3. Determinação da composição relativa percentual de cada classe (C_{Classe}) de componentes (MAG, EsMAG, DAG e/ou TAG) presente nas frações obtidas pelo processo de EFS.	45
Equação 4. Fator de recuperação percentual de cada classe (Ef_{Classe}) de componentes (MAG, EsMAG, DAG e TAG) ao final de todas as etapas de EFS.	46

Nomenclatura

A_{classe}	Área obtida diretamente de cada componente identificado no cromatograma obtido por CLAE
A_{Controle}	Área de cada classe de componentes, obtida por CLAE, das amostras controle.
ABIOVE	Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais
AT_{Classe}	Área total corrigida de todas as classes de componentes (MAG, EsMAG, DAG e/ou TAG)
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
B100	Biodiesel puro
B2	Mistura de biodiesel e diesel de petróleo contendo 2% de biodiesel em volume
B5	Mistura de biodiesel e diesel de petróleo contendo 5% de biodiesel em volume
BX	Mistura de biodiesel e diesel de petróleo contendo X% de biodiesel em volume
C_{Classe}	Composição percentual de cada classe de componentes (MAG, EsMAG, DAG e/ou TAG)
CCF	Cromatografia em camada fina
CEN	<i>Comité Européen de Normalisation</i>
CG	Cromatografia gasosa
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
DAG	Diacilgliceróis
DEEL	Detector evaporativo de espalhamento de luz
DRD	Detector por refratometria diferencial
EM-IQPA	Espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica
EsAG	Ésteres de ácidos graxos

EsMAG	Ésteres metílicos de ácidos graxos
EUA	Estados Unidos da América
FR	Fase reversa
GCom	Glicerina Combinada
GL	Glicerina livre
GT	Glicerina total
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IV	Infravermelho
L	Monolinoleína
LABCOM	Laboratório de Combustíveis e Derivados de Petróleo
LL	Dilinoleína
Ln	Monolinolenina
LnLn	Dilinolenina
LLn	Linoleoil-linoleoil-glicerol
LnLnLn	Trilinolenina
LLnLn	Dilinoleoil-linoleoil-glicerol
LLLn	Dilinoleoil-linoleoil-glicerol
LLL	Trilinoleína
MAG	Monoacilgliceróis
MeL	Éster metílico do ácido linoleico
MeLn	Éster metílico do ácido linolênico
MeO	Éster metílico do ácido oleico
MM	Massa molecular
NARP	<i>Non aqueous reverse phase</i>
NC	Número de carbonos
NCE	Número de carbono equivalente
NLD	Número de ligações duplas
O	Monooleína
OO	Dioleína
OL	Oleoil-linoleoil-glicerol
OLn	Oleoil-linoleoil-glicerol
OLnLn	Dilinoleoil-oleoil-glicerol
OLLn	Oleoil-linoleoil-linoleoil-glicerol
OLL	Dilinoleoil-oleoil-glicerol

OOLn	Dioleoil-linoleoil-glicerol
OOL	Dioleoil-linoleoil-glicerol
OOO	Trioleína
OOG	Dioleoil-gadoleoil-glicerol
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TAH	Teste colorimétrico do ácido hidroxâmico
TAG	Triacilgliceróis
US	<i>United States</i>
UV	Ultravioleta

Sumário

1	Introdução	2
2.	Objetivo	7
2.1	Objetivo geral	7
2.2	Objetivos específicos	7
3	Revisão bibliográfica	9
3.1	O biodiesel	9
3.2	Os Óleos Vegetais como Matérias Primas.....	15
3.3	O Controle de Qualidade e a Especificação do Biodiesel.....	19
3.4	Métodos Empregados para a Análise do Biodiesel.....	21
3.4.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	22
3.4.2	Extração em Fase Sólida (EFS).....	28
4	Materiais e Métodos.....	35
4.1	Produto de Transesterificação de Baixa Conversão do Óleo de Soja	36
4.2	Preparo da Amostra do Produto de Transesterificação de Baixa Conversão do Óleo de Soja.....	36
4.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa Não Aquosa.....	36
4.3.1	Determinação da Área Corrigida	40
4.4	Extração em Fase Sólida.....	40
4.4.1	Reagentes.....	40
4.4.2	Separação de EsMAG, TAG, DAG e MAG por EFS.....	40
4.4.2.1	Primeira EFS (obtenção de frações enriquecidas em EsMAG e TAG – Fração 1 e em DAG e MAG – Fração 2)	42
4.4.2.2	Segunda EFS (obtenção de frações enriquecidas em EsMAG – Fração 3 e em TAG – Fração4)	42
4.4.2.3	Terceira EFS (obtenção de frações enriquecidas em DAG – Fração 5 e em MAG – Fração 6)	43
4.4.3	Determinação da recuperação.....	45
4.4.4	Determinação da composição.....	45
4.4.5	Fator de Recuperação.....	46
5	Resultados e Discussão.....	48

5.1 Análise do Produto de Transesterificação de Baixa Conversão do Óleo de Soja por CLAE-FRNA.....	48
5.2 Análise das Frações obtidas, por EFS, por CLAE-FRNA.....	51
5.2.1 Frações da Primeira EFS.....	51
5.2.2 Frações da Segunda EFS.....	55
5.2.3 Frações da Terceira EFS.....	60
5.2.4 Fator de Recuperação.....	65
6 Conclusões.....	67
7 Perspectivas Futuras.....	69
8 Referências Bibliográficas.....	71
Anexos.....	86

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1. Introdução

A tentativa de utilizar biomassa como combustível, remonta ao ano de 1900, quando a *French Otto Company* apresentou em uma exposição um motor de ciclo Diesel funcionando, adequadamente, usando óleo de amendoim como combustível (KNOTHE *et al.*, 2006). Devido ao baixo custo dos combustíveis fósseis, o uso de biomassa como fonte de energia não foi importante até a primeira crise petrolífera, na década de 1970, quando a biomassa se tornou uma significativa fonte de energia alternativa. Dada a dependência do setor dos transportes em relação ao petróleo, a biomassa ganhou atenção especial devido ao seu potencial para a produção de combustíveis alternativos, como o biodiesel, que pode ser utilizado em substituição ao diesel de petróleo em motores com funcionamento baseado no ciclo diesel (KNOTHE, 2002; HAAS *et al.*, 2001), sem haver a necessidade de nenhuma modificação no motor (LUE *et al.*, 2001).

O biodiesel pode ser definido, de um modo geral, como sendo uma mistura de mono-álquil éster de ácidos graxos derivados de fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais (CANAKCI *et al.*, 2001; MONYEM *et al.*, 2001), obtido através de um processo de transesterificação, no qual ocorre a transformação de triacilgliceróis (TAG) em ésteres de ácidos graxos (ENCINAR *et al.*, 1999; NOUREDDINI *et al.*, 1998). O biodiesel pode ser usado puro a 100% (B100) ou misturado ao diesel de petróleo (BX, onde X é a porcentagem de biodiesel em volume adicionado ao diesel de petróleo) (RAMOS *et al.*, 2000). No Brasil, a lei federal n.º 11.097 de 2005 introduz o biodiesel na matriz energética brasileira. Atualmente, a Medida Provisória Nº 647 de 2014 estipula a adição de 6% de biodiesel ao diesel comercializado em todo território nacional (B6).

Dentre as características do biodiesel podemos destacar as seguintes: apresenta alto número de cetano, possui oxigênio diferentemente do diesel de petróleo, maior ponto de fulgor que o diesel convencional, é praticamente isento de aromáticos, apresenta mercado diretamente associado a atividades agrícolas (RAMOS, 1999), é biodegradável, possui maior viscosidade que o diesel de petróleo (DEMIRBAS, 2003) e reduz drasticamente as emissões de dióxido de enxofre (100% a menos), hidrocarbonetos (37% a menos), monóxido de carbono (46% a menos) e material particulado (84% a menos) quando comparado ao diesel de petróleo (MCMILLEN *et al.*, 2005).

O biodiesel é geralmente obtido através da reação de transesterificação de óleos vegetais com álcoois primários. Quimicamente, os óleos vegetais são triésteres ou TAG naturais de ácidos graxos, contendo cadeias de 8 a 24 átomos de carbono com diferentes graus de insaturação. Dependendo da espécie de oleaginosa, existem variações na composição química do óleo vegetal, pois cada óleo terá uma diferente razão molar dos diferentes ácidos graxos presentes (OLIVEIRA, *et al.*, 2008). Desta forma a composição química do biodiesel depende da fonte oleaginosa usada.

Durante a reação de transesterificação para produção do biodiesel, ocorre a formação de intermediários da reação, monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG), que podem estar presentes no produto final caso as conversões não sejam elevadas. Além disso, podem estar presentes TAG, não reagidos, e o glicerol, que é um sub produto da reação. De acordo com a concentração dos contaminantes (TAG, DAG, MAG e glicerol) a viscosidade do combustível poderá aumentar e, como consequência, pode haver redução da eficiência de combustão, entupimento do filtro de combustível e ainda levar a ocorrência de depósitos em partes do motor (BOWMAN, HILLIGOSS, RASMUSSEN, 2006).

A manutenção da oferta de um combustível de alta qualidade, que minimize os problemas operacionais, é um pré-requisito para a aceitação do biodiesel no mercado (KNOTHE *et al.*, 2006). Devido ao grande número de fontes de matérias primas (oleaginosas e álcoois) e de processos disponíveis para a produção do biodiesel, diversas regulamentações e portarias foram criadas para especificar o produto (ASTM D6751, 2008; EN 14214, 2008 e Resolução Nº 14 ANP, 2012). Dentre os parâmetros descritos nas especificações do biodiesel, destacam-se os que se referem ao grau de conversão da reação, como os níveis máximos de contaminantes tolerados (KNOTHE *et al.*, 2006). Sendo assim, o controle da qualidade do biodiesel é fundamental para sua comercialização e novas técnicas capazes de separá-lo de seus contaminantes devem ser desenvolvidas (ANDRADE, 2011).

Diversas técnicas analíticas têm sido usadas para a caracterização do biodiesel, sendo a cromatografia em fase gasosa (CG) a mais comum (PINTO *et al.*, 2005) sendo, também, método de referência da norma brasileira (Resolução Nº 14 ANP, 2012). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ainda é uma técnica pouco utilizada para a separação dos componentes do biodiesel, no entanto, apresentam algumas vantagens operacionais. Dentre as vantagens da CLAE sobre a CG, podemos destacar a não necessidade do uso de agentes derivatizantes, o que torna a análise menos dispendiosa e mais rápida.

A extração em fase sólida (EFS) é uma técnica que vem sendo empregada para a separação de classes lipídicas em matrizes complexas. Entretanto, vem sendo pouco empregada na separação das principais classes constituintes do biodiesel (MAG, DAG, TAG e EsMAG). Desta forma, o principal objetivo deste trabalho é empregar a EFS e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a separação e isolamento das principais classes presentes

no biodiesel (EsMAG, MAG, DAG e MAG), visando à obtenção de frações enriquecidas nos seus constituintes para simplificar sua caracterização por métodos analíticos. É importante ressaltar que para a quantificação de MAG, DAG, TAG e EsMAG, faz-se necessária a aquisição de padrões de cada uma dessas classes de componentes. No entanto, esses padrões apresentam um custo muito elevado. Sendo assim, a obtenção de frações enriquecidas nas principais classes presentes no biodiesel é de fundamental importância para o controle de qualidade do biodiesel.

Capítulo 2

Objetivo

Capítulo 2. Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método para a separação e o isolamento das principais classes constituintes do biodiesel (MAG, DAG, TAG e EsMAG), através da EFS, visando a obtenção de frações, enriquecidas em cada uma destas classes. O desenvolvimento deste método possibilitará a simplificação da análise do biodiesel por métodos analíticos, em especial a CLAE, bem como a geração de padrões dessas classes constituintes.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Caracterização do produto de transesterificação do óleo de soja de baixa conversão, por CLAE.
- 2) Otimizar as condições da extração em fase sólida (fase estacionária e fase móvel) de modo a obter frações enriquecidas em cada uma das classes presentes no biodiesel (MAG, DAG, TAG e EsMAG).
- 3) Acompanhar a eficiência de separação, obtida através da extração em fase sólida, por cromatografia líquida de alta eficiência.
- 4) Obtenção de frações enriquecidas em cada uma das classes constituintes do biodiesel (MAG, DAG, TAG e EsMAG).

Capítulo 3
Revisão
Bibliográfica

Capítulo 3. Revisão Bibliográfica

3.1. O biodiesel

No Brasil, o biodiesel é definido como um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação ou esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal (Resolução ANP N° 14, 2012).

A forma mais amplamente utilizada para a obtenção de biodiesel é o processo de transesterificação, no qual ocorre a transformação de TAG em ésteres de ácidos graxos (EsAG) e glicerina, na presença de um catalisador (ácido, básico ou enzimático) (FREEDMAN, BUTTERFIELD, PRYDE, 1986). Os catalisadores alcalinos proporcionam processos mais rápidos que os catalisadores ácidos (FREEDMAN, PRYDE, 1982; FREEDMAN, PRYDE, MOUNTS, 1984; CANAKCI, VAN GERPEN, 1999). A reação de transesterificação geral e global de um triacilglicerol pode ser vista na **figura 1**.

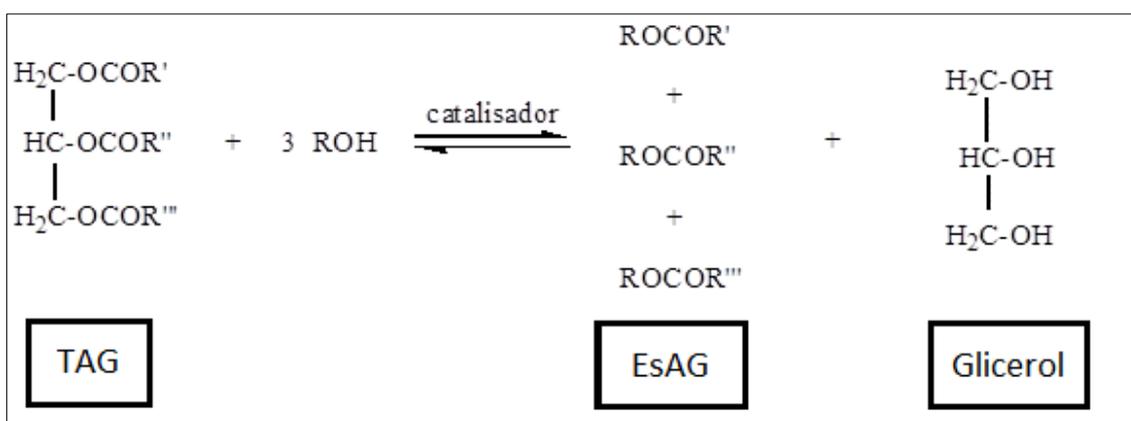


Figura 1: Reação de transesterificação geral e global de um triacilglicerol. O grupo R representa a cadeia do álcool. Os grupos R', R'' e R''' representam as cadeias hidrocarbônicas alifáticas saturadas ou insaturadas; podendo ser iguais ou diferentes (adaptado de CARDOSO, 2012).

A reação de transesterificação global dos TAG é a soma de três reações reversíveis consecutivas que produzem EsAG de uma das cadeias graxas em cada etapa (**figura 2**). Os TAG reagem com uma molécula de álcool sendo convertidos a DAG, estes por sua vez são convertidos a MAG e finalmente a glicerol (FREEDMAN, BUTTERFIELD, PRYDE, 1986), portanto os DAG e os MAG são intermediários neste processo (MEHER *et al.*, 2006).

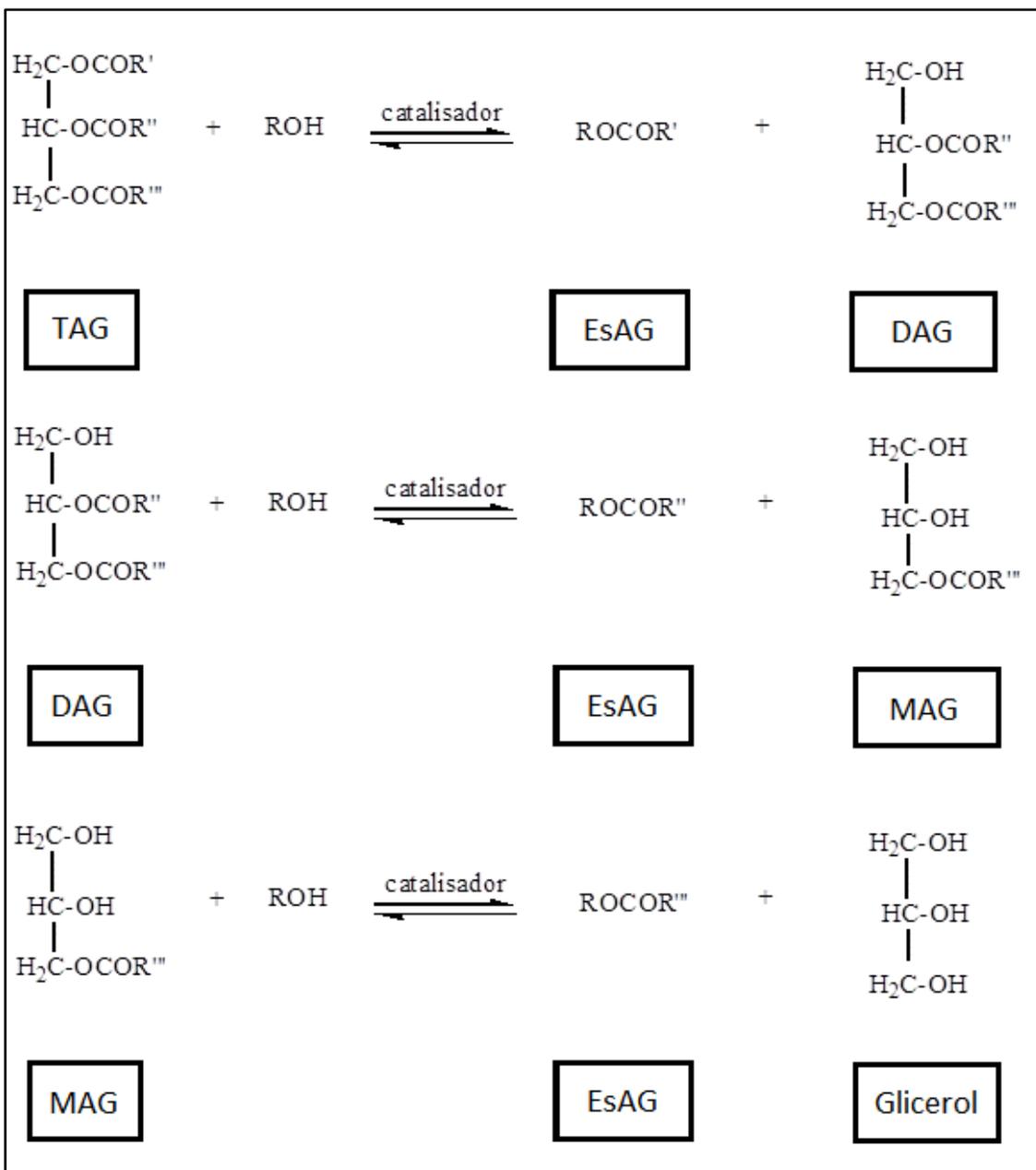


Figura 2: Reações consecutivas reversíveis para a transesterificação dos triacilgliceróis. O grupo R representa a cadeia do álcool. Os grupos R', R'' e R''' representam as cadeias hidrocarbônicas alifáticas saturadas ou insaturadas; podendo ser iguais ou diferentes (Adaptado de MEHER, SAGAR, NAIK, 2006).

A reação de transesterificação é a transformação de um éster em outro a partir da substituição da parte alcóxi da molécula, no caso de uma reação com um álcool a reação é chamada alcoólise. O uso de catalisadores acelera o equilíbrio da reação sendo que os catalisadores alcalinos são muito mais

eficientes que os ácidos (FREEDMAN, PRYDE, 1982; FREEDMAN, PRYDE, 1984; CANAKCI, VAN GERPEN, 1999).

Atualmente, a catálise heterogênea vem sendo estudada na transesterificação para a produção de biodiesel com o objetivo de melhorar a qualidade do produto e diminuir a produção de resíduos (CORDEIRO *et al.*, 2012; DI SERIO *et al.*, 2008). Diversos compostos químicos vêm sendo estudados como catalisadores sólidos para esterificação e transesterificação na produção de biodiesel, entre eles as zeólitas, as resinas de troca iônica, os óxidos inorgânicos, as guanidinas e os complexos metálicos (CORDEIRO *et al.*, 2011).

Apesar da natureza reversível da reação de transesterificação, a reação inversa a formação de EsAG não ocorre em escala apreciável, pois o glicerol não é solúvel no produto e forma um sistema de duas fases conforme acontece a reação (SCHWAB *et al.*, 1987). Porém, esta mesma natureza reversível da reação, torna o uso de excesso de álcool para a produção do biodiesel um fator importante. Para se obter altos graus de conversão, valores da ordem de 60% até 200% de excesso de álcool são utilizados sendo 100% um valor comum (VAN GERPEN, 2005).

O processo de produção do biodiesel pode ser influenciado por vários fatores operacionais, tais como: a razão molar de álcool: óleo, a concentração e o tipo de catalisador, o tempo de reação, a temperatura, a intensidade de agitação e por características das matérias primas como o tipo de álcool, o grau de refino do óleo vegetal e a pureza dos reagentes (FREEDMAN, PRYDE, MOUNTS, 1984).

O mecanismo e a cinética da reação de transesterificação são alvos de muitos trabalhos na literatura (MA, HANNA, 1999; MEHER, SAGAR, NAIK, 2006;

ENCINAR, GONZÁLEZ, RODRÍGUEZ-REINARES, 2007). O uso da reação de transesterificação para a produção de biodiesel também é amplamente descrito na literatura (DEMIRBAS, 2003; BONDIOLI, 2004; HOYDONCKX *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2005; MEHER, SAGAR, NAIK, 2006; MURUGESAN *et al.*, 2009).

Os álcoois mais amplamente utilizados para a produção de biodiesel são o metanol e o etanol devido aos seus baixos custos e características físico-químicas (pequena cadeia e alta polaridade). O metanol, entretanto, é o álcool mais comumente utilizado nas plantas produtoras de biodiesel devido ao seu baixo custo em relação ao etanol. Por consequência, a maior parte do biodiesel utilizado no mundo é composto por EsMAG. Nos Estados Unidos o preço do metanol chega a ser a metade do preço do etanol, mas em áreas ricas em matérias primas, como o Brasil, a produção de etanol por processos fermentativos torna seu uso economicamente viável na produção de biodiesel (KNOTHE *et al.*, 2006).

As principais fontes de matéria prima para a produção do biodiesel são os óleos de origem vegetal (SCHUCHARDT, SERCHELI, VARGAS, 1998). Outras fontes de ácidos graxos como, óleo de fritura, gordura de esgoto e gordura animal vem sendo estudadas como possíveis matérias primas (LOTERO *et al.*, 2005). Estas fontes possuem baixo custo e boa disponibilidade e seu uso na produção de biodiesel representa um bom modo de reciclagem. Em contrapartida, essas e outras fontes animais e não naturais possuem altas concentrações de ácidos graxos livres (AGL) como pode ser visto na **tabela 1**.

Tabela 1: Concentração mássica (% p/p) de AGL em algumas matérias primas (VAN GERPEN *et al.*, 2006).

Gordura ou Óleo	Concentração de AGL (%)
Óleos Vegetais Refinados	< 0,05
Óleos Vegetais Crus	0,3-0,7
Óleo de Fritura de Restaurante	2-7
Gordura Animal	5-30
Gordura de Caixa de Gordura	40-100

Em concentrações superiores a 5%, os AGL podem reagir com o catalisador básico gerando sabão, portanto, matérias primas com alta concentração de AGL devem receber um pré-tratamento para reduzi-los a valores inferiores à 0,5% antes de serem usadas na produção de biodiesel (VERTÈS *et al.*, 2010). O pré-tratamento aumenta o custo do produto final.

Apesar das vantagens técnicas e ambientais do biodiesel sobre o diesel de petróleo, a viabilização econômica de sua produção em larga escala continua sendo o maior obstáculo a sua utilização, devido ao alto custo dos óleos vegetais (LANG *et al.*, 2001). Além disso, o biodiesel de primeira geração (produzido a partir de óleos vegetais comestíveis) e o biodiesel de segunda geração (produzido através de óleos vegetais não comestíveis) geram polêmica, pois as plantações destinadas a produção do biodiesel usam terreno fértil que poderia ser usado para a produção de alimentos (CHISTI, 2008; MARSH, 2009).

Atualmente, o foco das pesquisas em biodiesel está voltado para a terceira geração, que utiliza algas microscópicas, cultivadas hidroponicamente (GUPTA *et al.*, 2014). As principais vantagens do uso das algas são: a) a alta produtividade de óleo por hectare, maior que qualquer cultura vegetal (CHISTI,

2007; HAAG, 2007), b) não há necessidade do uso de terras férteis, pois as algas são cultivadas na água e c) as algas podem crescer em alguns efluentes industriais ricos em fósforo e nitrogênio podendo ajudar no seu tratamento (MALLICK,2002) e assim não competem por água potável (CAMPBELL, 2008). A característica mais interessante do uso das algas para a produção de biodiesel é que estas crescem melhor se dióxido de carbono extra for fornecido ao meio. Desta forma, emissões de algumas indústrias, como as termo elétricas, podem ser usadas no cultivo de algas diminuindo seu impacto ambiental (CHISTI, 2007).

No Brasil, a introdução do biodiesel na matriz energética é disposta pela Lei Nº 11.097, publicada em 13 de janeiro de 2005, onde se torna obrigatória a adição de 2%, em volume (B2), de biodiesel ao diesel a partir de 2008.

A resolução CNPE Nº 6, de 16 de setembro de 2009, do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), antecipou a obrigatoriedade da adição de 5% de biodiesel ao diesel de petróleo comercializado no Brasil (B5).

A resolução ANP Nº 14, de 11 de maio de 2012, da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), estabelece, dentre outras, as especificações do biodiesel brasileiro bem como os métodos que devem ser utilizados para o controle de sua qualidade.

Atualmente, a Medida Provisória Nº 647 de 28 de maio de 2014, fixa em 6% o percentual mínimo de biodiesel que deve ser adicionado a todo o óleo diesel comercializado em território nacional (B6) e estipula um percentual mínimo de 7% (B7) a partir de novembro de 2014.

3.2 Os Óleos Vegetais como Matérias Primas

Os óleos vegetais são constituídos predominantemente por TAG, com menores concentrações de outros compostos como DAG, MAG, AGL, água e

outros. Quimicamente os TAG são tri ésteres de ácidos graxos (AG) com glicerol (1,2,3-propanotriol, também chamado de glicerina). Os AG apresentam cadeias longas saturadas ou insaturadas, tendo, predominantemente, 12 a 26 átomos de carbono e normalmente apenas uma carboxila. Os óleos vegetais, são predominantemente compostos por TAG de AG insaturados, que apresentam menor ponto de fusão, sendo líquidos a temperatura ambiente.

Cada óleo vegetal possui diferentes tipos de AG que variam em sua predominância. Como cada AG possui propriedades químicas diferentes, o principal fator determinante das características químicas e físicas de cada óleo, será a concentração dos diferentes AG ou perfil de AG.

A **tabela 2** mostra as características de alguns dos principais AG presentes nos óleos vegetais e gorduras animais. A **tabela 3** apresenta as composições mássicas de AG em alguns óleos vegetais usados na produção de biodiesel.

Tabela 2: Nomenclatura, fórmula estrutural condensada, massa molecular (MM), número de carbonos (NC) e número de ligações duplas (NLD) de alguns AG constituintes de TAG em óleos e gorduras naturais (adaptado de SRIVASTAVA, PRASAD, 2000; SAAD, 2005).

Ácido Graxo	Nomenclatura	Fórmula Condensada	NC (NLD)	MM
Láurico	Ácido Dodecanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12:0	200
Palmítico	Ácido Hexadecanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16:0	256
Palmitoleico	Ácido <i>c</i> -9-Hexadecenóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	16:1 (Δ^9)	254
Estearíco	Ácido Octadecanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	18:0	284
Oleico	Ácido <i>c</i> -9-Octadecenóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:1 (Δ^9)	282
Linoleico	Ácido <i>c</i> -9, <i>c</i> -12-Octadecadienóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:2 ($\Delta^{9,12}$)	280
Linolênico	Ácido <i>c</i> -9, <i>c</i> -12, <i>c</i> -15-Octadecatrienóico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	18:3 ($\Delta^{9,12,15}$)	278
Ricinoleico	Ácido 12-Hidroxi-9-Octadecenóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	12 OH 18:1 (Δ^9)	298

(Δ^n): Posição da ligação dupla.

Tabela 3: Concentração mássica (% p/p) de AG em alguns óleos vegetais usados para a produção de biodiesel (Baseado em dados de ANVISA, 1999; MA, HANNA, 1999; SRIVASTAVA, PRASAD, 2000; COSTA NETO *et al.*, 2000;

DEMIRBAS, 2003; DMYTRYSHYN *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2005; GUARIEIRO, 2006 e CONCEIÇÃO *et al.*, 2007).

Óleo Vegetal	Ácidos Graxos							
	Saturados			Insaturados				
	14:0	16:0	18:0	16:1 (Δ^9)	18:1 (Δ^9)	18:2 ($\Delta^{9,12}$)	18:3 ($\Delta^{9,12,15}$)	12 OH 18:1(Δ^9)
Algodão	< 2	17-31	0,9-4	< 2,0	13-44	33-59	< 2,1	-
Canola	< 0,2	1,5-6,5	0,5-3,1	< 3,0	8-70	9-30	5,0 13	-
Girassol	< 0,5	3-10	1-10	< 1,0	13-40	48-75	< 0,3	-
Milho	< 2	6-14	0,5-5	< 0,5	24-49	6-62	< 0,2	-
Soja	< 0,5	6-14	1,4-5,5	< 0,5	18-30	44-64	4-11	-
Palma	0,5-2	35-47	3,5-6,5	< 0,6	36-47	6,5-15	< 0,5	-
Mamona	-	0,1-2	0,9-3,1	< 3,0	2,8-6	1,2-5	< 0,5	84-91
Linhaça	-	4-7	2-4	< 0,3	13-40	17,5-40	25-60,7	-
Dendê	14,1	8,8-44	1,3-5	-	18,5-44	0,7-10	-	-
Colza	-	2-4	8-2	-	52-66	17-25	8-11	-

(Δ^n): Posição da ligação dupla.

Os principais óleos vegetais usados no mundo para a produção industrial do biodiesel são os de colza, soja, algodão, girassol, amendoim, milho e palma (GUPTA *et al.*, 2014). A decisão de qual óleo usar depende da disponibilidade da oleaginosa na região. A União Europeia, o maior produtor de biodiesel mundial, utiliza óleo de colza como principal fonte de matéria prima (*European Biodiesel Board*, 2013). No entanto, países como o Brasil e os Estados Unidos utilizam óleo de soja como principal matéria prima (*United State Department of Agriculture*, 2014, Ministério de Minas e Energia, 2012).

Segundo a ANP e a Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE), no ano de 2013, o Brasil produziu aproximadamente 2,917

milhões de metros cúbicos de biodiesel, sendo 73% produzidos a partir de óleo de soja.

O óleo de soja também correspondeu, em 2013, a aproximadamente 56% das matérias primas usadas para a produção de biodiesel nos Estados Unidos (*U.S. Energy Information Administration, 2014*) e 7,5% das usadas na União Européia em 2012 (*European Biodiesel Board, 2012*). Isto torna o óleo de soja muito importante para a produção mundial de biodiesel.

3.3 O Controle de Qualidade e a Especificação do Biodiesel

Com o crescente interesse do mercado no biodiesel, surge a necessidade de um rigoroso controle de qualidade sobre a produção do combustível. Devido à grande diversidade de processos e matérias primas que podem ser usadas para obtenção do biodiesel, o combustível produzido pode apresentar características diferentes de acordo com a sua origem. Sendo assim, normas que especifiquem o combustível e garantam sua qualidade são fundamentais para o uso e a comercialização do biodiesel (ANDRADE, 2011).

Dentre os parâmetros mais importantes a serem monitorados estão as concentrações dos constituintes do biodiesel. A presença de contaminantes pode alterar as propriedades do combustível e acarretar em problemas operacionais graves como o entupimento do filtro e a formação de depósitos no motor (MITTELBACH *et al.*, 1983; PLANK, LORBEER; 1995; HOLCAPEK *et al.*, 1999).

Para garantir a qualidade do biodiesel é necessário o estabelecimento de limites nos teores dos contaminantes para que estes não comprometam a qualidade da queima do combustível, a integridade e o desempenho do motor,

bem como o transporte, manuseio e estocagem de combustível (LÔBO, FERREIRA, 2009).

Dependendo da eficiência do processo usado na produção do biodiesel, podem existir em diferentes concentrações: glicerina livre, AG não reagidos (glicerina combinada), resíduos de catalisador e álcool, sabão e água (LÔBO, FERREIRA, 2009).

A glicerina ou glicerina livre (GL) é um subproduto da reação de transesterificação empregada na produção do biodiesel. Altas concentrações de glicerina no biodiesel provocam problemas de armazenamento, formação de depósitos, entupimento dos bicos injetores do motor e emissão de aldeídos durante a queima (KNOTHE *et al.*, 2006; LÔBO, FERREIRA, 2009).

Outros contaminantes que podem estar presentes no biodiesel são MAG e DAG, intermediários da reação (FOGLIA *et al.*, 2004; KNOTHE *et al.*, 2006), e os TAG oriundos da matéria prima não reagida. Os MAG, DAG e TAG compõem a glicerina combinada (GCom). Dependendo da sua concentração, a GCom pode aumentar a viscosidade do biodiesel, diminuindo a eficiência da combustão (LÔBO, FERREIRA, 2009).

Durante o armazenamento, podem ocorrer a absorção de umidade além de processos oxidativos, que contribuem para a presença de impurezas como água, peróxidos e ácidos carboxílicos de baixo peso molecular (KNOTHE, 2006; LÔBO, FERREIRA, 2009).

Nos Estados Unidos, as especificações do biodiesel são determinadas pela Norma ASTM D6751, de novembro de 2008, da *American Society of Testing and Materials* (ASTM), enquanto na União Europeia pela norma EN 14214, de novembro de 2008, do *Comité Européen de Normalisation* (CEN). Ambas as normas são utilizadas como referência ou base para outros países (LÔBO,

FERREIRA, 2009). No Brasil, o Regulamento Técnico N° 4, parte integrante da Resolução ANP N° 14 de 2012, contém as especificações que devem ser atendidas pelo biodiesel produzido no país (ANP, 2012).

Dentre os diversos parâmetros especificados por estas normas e resolução, alguns dos mais importantes são os que se referem ao grau de conversão da reação de transesterificação que limitam o teor de contaminantes. Esses parâmetros são o limite mínimo de EsAG e os limites máximos de GL, MAG, DAG, TAG e Glicerina Total (GT). A **tabela 4** mostra uma comparação entre os limites dos parâmetros citados exigidos pelas especificações americana, europeia e brasileira.

Tabela 4: Limites em porcentagem mássica dos MAG, DAG, TAG, GL, GT e EsAG exigidos pelas normas americana, europeia e brasileira, respectivamente.

Parâmetros	ASTM D6751 (2008)	EN 14214 (2008)	Resolução N° 14 ANP (2012)
MAG	-	≤ 0,8	≤ 0,8
DAG	-	≤ 0,2	≤ 0,2
TAG	-	≤ 0,2	≤ 0,2
GL	≤ 0,02	≤ 0,02	≤ 0,02
GT	≤ 0,24	≤ 0,25	≤ 0,25
EsAG	-	≥ 96,5	≥ 96,5

MAG. Monoacilgliceróis; DAG. Diacilgliceróis; TAG. Triacilgliceróis; GL. Glicerina Livre; GT. Glicerina Total; EsAG. Ésteres de ácidos graxos.

3.4 Métodos Empregados para a Análise do Biodiesel

Diversos métodos cromatográficos vêm sendo utilizados na análise do biodiesel, dentre eles destacam-se a CG (STAVARACHE *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2008), a cromatografia em camada fina (CCF) (SHAH *et al.*, 2004;

STAVARACHE *et al.*, 2005) e a CLAE (CUNHA, OLIVEIRA, 2006; KALO *et al.*, 2006; STAVARACHE *et al.*, 2007; TÜRKAN, KALAY, 2006, ANDRADE, MAZZEI, d'ÁVILA, 2011; JONES *et al.*, 2012).

A CG é o método mais amplamente utilizado atualmente para a análise do biodiesel (KNOTHE, 2006). As normas brasileira, americana e europeia utilizam métodos baseados na CG para a determinação dos teores de EsAG, MAG, DAG, TAG e glicerina (livre e total) presentes no biodiesel (LÔBO e FERREIRA, 2009).

A CLAE vem sendo apontada como uma alternativa a CG pois apresenta um menor tempo de análise e não necessita de agentes derivatizantes, o que permite a redução do custo da análise e assim viabiliza seu emprego no monitoramento da reação de transesterificação (LÔBO e FERREIRA, 2009).

A EFS é uma ferramenta muito útil em cromatografia, pois pode servir como pré tratamento das amostras visando sua purificação, ou a separação e concentração de analitos específicos. O mecanismo da EFS é o mesmo da cromatografia em fase líquida (LANÇAS, 2004). A CLAE e a EFS e seus usos na análise do biodiesel serão abordados neste trabalho.

3.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Nas últimas quatro décadas, a CLAE tem sido a técnica analítica mais difundida e empregada em laboratórios de análise das indústrias químicas e farmacêuticas e até em órgãos governamentais. Essa expansão está diretamente associada a necessidade de análises mais rápidas sem que haja a perda da qualidade e do desempenho cromatográfico (MALDANER e JARDIM, 2009).

A CLAE apresenta uma série de vantagens em relação a CG, como o tempo reduzido de análise, não possuir a necessidade de derivatização e a capacidade de quantificar componentes não voláteis (NETO, NUNES, 2003). Além destas, a CLAE opera em temperatura baixas, o que diminui o risco de isomerização das ligações duplas presentes nos AG, possibilitando a análise de componentes termicamente instáveis (CZAUDERNA, KOWALCZYK, 2001; LI *et al.*, 2001).

Em 2004, Foglia *et al.* compararam o uso da CLAE e da CG na análise de gliceróis em biodiesel. Não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados obtidos pelos dois métodos, porém foram apontadas algumas desvantagens na utilização da CG. Entre as desvantagens estão a necessidade de derivatização, a necessidade de uso de padrões internos de gliceróis, a necessidade do uso de diferentes padrões em função da matéria-prima do biodiesel e a limitação na determinação dos EsAG.

As colunas utilizadas em CLAE geralmente possuem a fase estacionária compactada em uma coluna de aço inoxidável com diâmetro interno que varia entre 0,45 e 2,2 cm e comprimento que varia entre 10 e 30 cm dependendo do objetivo da separação. O detector mais utilizado para as separações por CLAE é o detector de absorção no ultravioleta (UV), sendo também empregados detectores de fluorescência, de índice de refração e eletroquímicos. O registro de dados é feito através de um computador (DEGANI, CASS, VIEIRA, 1998).

Apesar do detector UV ser o mais utilizado em CLAE, como os acilgliceróis e os EsMAG não absorvem em comprimentos de onda maiores que 220 nm, a detecção UV somente é possível em comprimentos de onda muito baixos, sendo necessário o uso de solventes transparentes na região de 200 a 220 nm e com alto grau de pureza (HOLCAPEK *et al.*, 1999; HOLCAPEK *et al.*, 2001; HÉRON,

TCHAPLA, 1999). A não quantificação de compostos saturados é considerada a principal desvantagem da detecção UV (HOLCAPEK *et al.*, 1999). Por outro lado, a detecção UV a 205-210 nm pode fornecer curvas de calibração lineares e com sensibilidade elevada (GEERAERT, DESCHEPPER, 1983).

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) é uma técnica versátil e de ampla aplicabilidade, o que incentivou nos últimos anos muitos estudos para o seu desenvolvimento. As fases estacionárias usadas em CLAE-FR são compostos orgânicos apolares fixados a um suporte cromatográfico, sendo muitos estudos dedicados ao aperfeiçoamento destas fases. (MALDANER, COLLINS, JARDIM, 2010).

Semporé e Bézard (1992), usaram a CLAE-FR para a separação de misturas complexas de MAG. Diferentes proporções entre acetonitrila e água foram usadas para eluição. Os MAG foram separados de acordo com o tamanho da cadeia e o grau de insaturação. As áreas dos picos foram usadas para quantificar os MAG detectados.

Holcapek *et al.* (1999), empregaram a CLAE-FR para a separação de TAG, DAG, MAG e EsMAG dos ácidos oleico, linoleico e linolênico, assim como os AGL, em uma corrida de 25 min, usando como eluente um gradiente linear de água, acetonitrila e uma mistura de 2-propanol:*n*-hexano (5:4).

Holcapek, Jandera e Fischer (2001), empregaram a CLAE-FR, com duas colunas cromatográficas com fase octadecilsilano em série, para a separação de TAG, DAG, MAG e EsMAG com o mesmo número de carbono equivalente (NCE). Foram empregados diferentes métodos para a detecção: detector de absorção no UV a 205 nm, detector evaporativo de espalhamento de luz (DEEL) e o detector por espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica (EM-IQPA), no modo de íons-positivos. Todos os componentes

individuais da amostra foram identificados usando o detector por EM-IQPA. A determinação de TAG com diferentes NCE foi possível usando o detector de absorção no UV a 205 nm, o DEEL e o detector por EM-IQPA. A detecção UV não permitiu a quantificação de AG saturados.

Komers *et al.* (2001), aplicaram a CLAE-FR para a quantificação de MAG, DAG, TAG e EsMAG presentes na metanólise do óleo de colza.

Holcapek *et al.* (2003), empregaram a CLAE-FR para a separação de TAG, DAG, MAG e EsMAG com o mesmo NCE, fornecendo informações detalhadas sobre a composição dos acilgliceróis na amostra. A separação de alguns TAG com NCE semelhantes foi possível.

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa não aquosa (CLAE-FR_{NA}) vem sendo largamente usada para a separação de amostras de TAG naturais. Esta técnica utiliza os modos de eluição isocrático (STOLYHWO *et al.*, 1985; HÉRON, TCHAPLA, 1994; HÉRON, LESELLIER, TCHAPLA, 1995) e gradiente (BYRDWELL, EMKEN, 1995; NEFF, BYRDWELL, 1995; LIN, WOODRUFF, MCKEON, 1997).

A CLAE-FR_{NA} usando acetonitrila-diclorometano (68:32, v/v) como fase móvel, foi usada por Héron, Lesellier e Tchaplá (1995) e permitiu a distinção entre os TAG com semelhantes massas moleculares (MM) e diferentes NCE.

Noureddini e Zhu (1997), também empregaram a CLAE-FR_{NA}, com detector por refratometria diferencial (DRD), para o estudo da cinética de transesterificação do óleo de soja com metanol.

Holcapek *et al.* (1999), utilizaram a CLAE-FR_{NA} para o monitoramento da conversão dos TAG do óleo de colza em EsMAG e para a determinação quantitativa de TAG com diferentes NCE. Os resultados mostraram que os TAG

com os mesmos valores de NCE eluem juntos, mostrando apenas um pico no cromatograma.

Chen e Wu (2003), aplicaram a técnica da CLAE-FRNA, adaptado de Holcapek *et al.* (1999), para a determinação do teor de EsMAG em misturas reacionais obtidas pela metanólise do óleo de soja. A utilização de metanol e iso-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v), como fases móveis, foi descrita nos trabalhos de Holcapek *et al.* (1999 e 2001) apenas para a separação de TAG e EsMAG. A adaptação realizada permitiu a separação de EsMAG, MAG, DAG e TAG.

Cunha e Oliveira (2006), aplicaram a CLAE-FRNA com DEEL para a análise de óleos vegetais de diferentes origens (algodão, milho, amendoim, soja, avelã, noz, gergelim e oliva). Foram separados e identificados 15 picos neste estudo.

Di Nicola *et al.* (2008) descreveram o desenvolvimento e a otimização de um método para a análise de EsMAG e de glicerina combinada por CLAE-FRNA, com detecção UV.

Em 2011, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um método alternativo utilizando a CLAE-FRNA na determinação da conversão e caracterização dos principais componentes do biodiesel B100 (EsMAG, MAG, DAG e TAG). Neste estudo utilizou-se como fase estacionária o octadecilsilano (C18), a fase móvel foi um gradiente de metanol e iso-propanol/*n*-hexano (5:4, v/v). Foi utilizado o detector UV a 205 nm. Este método conseguiu separar e identificar os EsMAG e os acilglicerois em três classes (MAG, DAG e TAG) como pode ser visto na **figura 3** (ANDRADE, MAZZEI, d'AVILA, 2011).

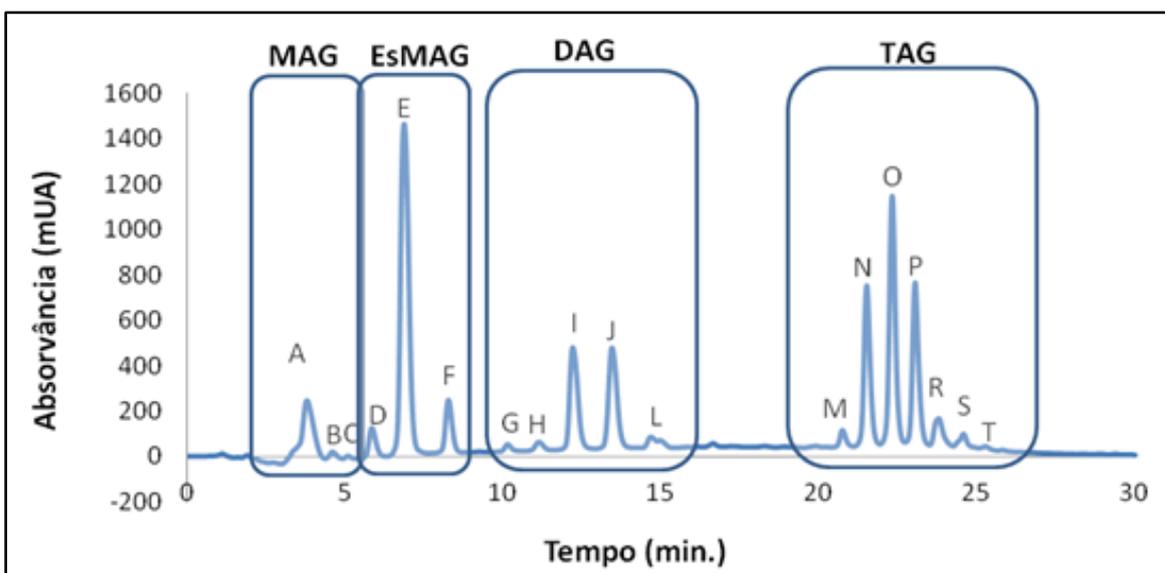


Figura 3: Cromatograma típico, obtido por CLAE-FRNA, de um produto de transesterificação de baixa conversão (ANDRADE, MAZZEI, d'AVILA, 2011).

Santos (2012), desenvolveu uma metodologia de separação e identificação de adulterantes presentes em B5. Um dos métodos utilizados foi a metodologia de CLAE-FRNA com detecção UV, desenvolvida por Andrade em 2011. Os resultados mostraram que o método poderia identificar adulterantes com eficiência.

Ainda em 2012, nosso grupo de pesquisa realizou um trabalho para a identificação da adulteração de biodiesel, por óleos vegetais, usando a CLAE-FRNA com detecção UV, como metodologia de análise. Foram utilizados biodieseis produzidos a partir de diversos óleos vegetais e o método se mostrou eficiente para detectar adulterantes em uma concentração mínima de 1% (BROUCK, 2012).

Em 2013, nosso grupo de pesquisa (FERNANDES, LEITE, 2013) empregou, dentre outras técnicas, a CLAE-FRNA para a caracterização de misturas biodiesel:diesel (BX) e identificação de adulterações por óleos vegetais. A CLAE-FRNA se demonstrou viável na identificação de adulterações por óleos

vegetais desde que o BX passe por uma etapa prévia de EFS para separar o diesel do biodiesel.

Em 2014, nosso grupo de pesquisa (BLATT, 2014) empregou a CLAE-FRNA para a caracterização das frações enriquecidas nas principais classes de constituintes presentes no biodiesel (EsMAG, MAG, DAG e TAG). Neste trabalho, desenvolveu-se uma metodologia, empregando a cromatografia líquida em coluna, para a separação e o isolamento das principais classes de constituintes presentes no biodiesel.

3.4.2 Extração em Fase Sólida (EFS)

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

Esta técnica é comumente usada em substituição a extração líquido-líquido (ELL), pois possui vantagens como: a) não ocorre formação de emulsão (RUIZ-GUTIÉRREZ, PÉREZ-CAMINO, 2000), b) os tempos de análise são reduzidos, c) emprega-se menores volumes de solvente, d) o analito é manipulado menos vezes e e) possui um processo facilmente automatizado (LANÇAS, 2004).

Trabalhos na literatura mostram que a EFS pode ser usada como 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 sílica (óxido de silício) foi o material empregado nas primeiras separações cromatográficas e atualmente, com características

tecnologicamente mais avançadas, ainda é o material mais apropriado para a cromatografia (MALDANER, COLLINS e JARDIM, 2010), sendo o adsorvente mais comumente usado em EFS de fase normal seguido pela alumina (óxido de alumínio) (LANÇAS, 2004).

A superfície da sílica é constituída por grupos silanóis (Si-OH) e siloxano (Si-O-Si) (BRAMBILLA, 2007). Tais grupos podem ser alterados quimicamente para receber compostos orgânicos que são imobilizados na superfície da sílica. Esta sílica funcionalizada tem recebido grande destaque como fase estacionária em processos de cromatografia em fase reversa. Atualmente são utilizados em cromatografia líquida os derivados da sílica: metila (-CH₃), octila (-C₈H₁₇), octadecila (-C₁₈H₃₇) e fenila (-C₆H₅) (PAVIA *et al.*, 2009). Alguns derivados da sílica também são utilizados em cartuchos para EFS, como o aminopropilsilano, usado neste projeto.

A aplicação da EFS para a separação e o isolamento de compostos lipídicos neutros e polares vêm sendo descrita na literatura usando cartuchos de fase sílica (NASH, FRANKEL, 1986; NEFF, ZEITOUN, WEISLEDER, 1992) e de fase aminopropilsilano (KALUZNY *et al.*, 1985; HOPIA *et al.*, 1992; EBELER, SHIBAMOTO, 1994; EBELER, EBELER, 1996; BODENNEC *et al.*, 2000).

Kaluzny *et al.* (1985), descreveram o uso da EFS para a separação de classes lipídicas. Foram empregados três cartuchos com fase estacionária aminopropilsilano, condicionados com *n*-hexano. A mistura de lipídios, contendo TAG, DAG, MAG, éster colesteril, colesterol, AGL e fosfolipídeos, foi dissolvido em clorofórmio e aplicado no primeiro cartucho. Os lipídeos neutros (TAG, DAG, MAG, éster colesteril e colesterol) foram eluídos com clorofórmio:*i*-propanol (2:1, v/v) (Fração 1). Os AGL, retidos no cartucho, foram eluídos com 2% de ácido acético em éter dietílico (Fração 2) e os fosfolipídios foram eluídos com metanol

(Fração 3). A Fração 1 foi seca sob nitrogênio, redissolvida em *n*-hexano e aplicada no segundo cartucho. Os ésteres de colesterol foram eluídos com *n*-hexano (Fração 4) e os TAG, DAG, MAG e colesterol ficaram retidos no segundo cartucho. Este cartucho foi então conectado ao terceiro cartucho e uma solução de *n*-hexano com 1% éter dietílico e 10% cloreto de metileno foi utilizada para eluir os TAG (Fração 5). O colesterol retido no sistema formado pelos segundo e terceiro cartuchos foram eluídos com uma solução 5% de acetato de etila em *n*-hexano (Fração 6). Após eluição do colesterol ficaram retidos no segundo cartucho os DAG e MAG. Os DAG foram eluídos com uma solução 15% de acetato de etila em *n*-hexano e os MAG com uma solução de clorofórmio:metanol (2:1, v/v). Através da análise das recuperações de todas as classes de lipídios envolvidas no estudo, a EFS se mostrou uma técnica apropriada e eficiente.

Hamilton e Comai (1988), descreveram um método simples para a separação de lipídeos neutros, AGL e lipídeos polares. Diferentes proporções dos solventes *n*-hexano e metil t-butil éter foram empregados para a eluição progressiva dos ésteres de colesterol e os TAG obtendo-se ao final do estudo altas recuperações.

Perez-Camino, Moreda e Cert (1996), descreveram um método eficiente e de boa reprodutibilidade para a determinação de isômeros dos DAG em óleos vegetais, por EFS, seguida pela análise por CG. Este método permitiu a quantificação e separação de DAG de acordo com o NC, a estrutura isomérica (1,2 e 1,3) e o grau de insaturação.

Pinkart, Devereux e Chapman (1998), desenvolveram um método por EFS para a separação de classes de lipídeos encontrados em microorganismos (polihidroxicanoatos, fosfolipídeos, esteróis, TAG, DAG, MAG e ésteres). O método é baseado no uso de cartuchos de aminopropilsilano como fase

estacionária e lipídeos extraídos da cianobactéria *Spirulina platensis* como amostra. O método apresentou alto rendimento para todas as classes com exceção para os esteróis e os polihidroxicanoatos.

Ruiz *et al.* (2004), utilizaram a EFS para a análise das principais classes lipídicas (lipídeos neutros, ácidos graxos livres e lipídeos polares) de uma amostra de músculo de porco. O método adotado foi adaptado do método desenvolvido por Pinkart, Devereux e Chapman (1998). A gordura intramuscular foi dissolvida em *n*-hexano:clorofórmio:metanol (95:3:2) e uma alíquota foi adicionada a uma coluna de aminopropilsilano, previamente condicionada com *n*-hexano. As três classes de lipídeos foram separadas por eluição com diferentes soluções. O método apresentou alta recuperação e alto grau de separação.

Li *et al.* (2009), empregaram a EFS para a separação de classes lipídicas. O estudo mostrou que foi possível a obtenção de frações enriquecidas em uma determinada classe proveniente do biodiesel. Utilizando de uma fase estacionária contendo sais de prata e sílica, os autores mostraram que foi possível separar ésteres insaturados do biodiesel de soja. Observou-se ao final do trabalho, que a emissão de óxidos de nitrogênio diminuiu e a resistência a oxidação do combustível melhorou após a retirada destes ésteres insaturados.

Nosso grupo de pesquisa (ANDRADE, MAZZEI, d'ÁVILA, 2011) desenvolveu um método para a separação entre EsMAG e glicerina combinada (MAG, DAG e TAG) do biodiesel B100, produzido a partir de diferentes oleaginosas e com diferentes graus de conversão, por EFS, utilizando cartuchos de aminopropilsilano. Neste trabalho, as frações obtidas por EFS, foram caracterizadas por CLAE-FRMA com detector UV à 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.

Nosso grupo de pesquisa (CARDOSO, 2012), utilizou a EFS para separar o biodiesel da glicerina combinada, gerando frações enriquecidas em cada uma das classes, visando a simplificação da sua caracterização analítica. As frações obtidas foram analisadas por CLAE-FRMA e CG mostrando uma alta recuperação na etapa de extração, corroborando os resultados obtidos por Andrade, Mazzei e d'Avila em 2011.

Ainda em 2012, nosso grupo de pesquisa (SANTOS, 2012) empregou o teste colorimétrico do ácido hidroxâmico (TAH) para a identificação de adulterações em misturas biodiesel:diesel, por óleo vegetal. Neste estudo, empregou-se a EFS para a separação da mistura biodiesel:diesel:óleo vegetal em duas frações, uma constituída de diesel (fração F₁) e outra constituída de biodiesel e óleo vegetal (fração F₂). A partir da fração F₂, foi realizada outra EFS, para a separação da mistura biodiesel:óleo vegetal nas frações F₃ e F₄, contendo, respectivamente, biodiesel e óleo vegetal, baseados no método desenvolvido por Andrade, 2011. Empregou-se o TAH nas frações constituídas por diesel (fração F₁), biodiesel (fração F₃) e óleo vegetal (fração F₄). Como a fração F₁ é constituída apenas por diesel, esta fração não apresentou coloração. Contudo, as frações F₃ e F₄ apresentaram uma coloração amarela, laranja ou vermelha, dependendo da concentração de biodiesel e/ou óleo vegetal. Com isso, o aparecimento de cor na fração F₄ é uma forma de identificar a presença de adulteração por óleo vegetal na mistura biodiesel/diesel.

Em 2013, nosso grupo de pesquisa (FERNANDES, LEITE, 2013) desenvolveu um método para a identificação de adulteração em BX, por óleos

vegetais, utilizando duas etapas de EFS, que permitiram separar o diesel, o biodiesel e a glicerina combinada em frações individuais. Na primeira etapa, a mistura de diesel:biodiesel:óleo vegetal é aplicada em um cartucho de sílica onde o diesel é separado por cromatografia frontal. O biodiesel e o óleo vegetal retidos no cartucho são eluídos com etanol. Após a evaporação e ressuspensão em *n*-hexano, a fração contendo o biodiesel e o óleo vegetal foi adicionada ao segundo cartucho, de fase estacionária aminopropilsilano. O biodiesel foi eluído com *n*-hexano e a glicerina combinada (MAG, DAG e TAG) com uma solução de clorofórmio metanol (2:1). Os resultados foram analisados por CLAE-FRNA, espectroscopia na região do infravermelho (IV) e pelo teste colorimétrico do ácido hidroxâmico. Foi mostrado no estudo que o uso da CLAE-FRNA como técnica analítica para análise do BX, demanda que a amostra seja submetida a primeira etapa de EFS, enquanto as técnicas de IV e TAH demandam as duas etapas de EFS para serem utilizadas.

Em 2014, nosso grupo de pesquisa (BLATT, 2014) desenvolveu uma metodologia, empregando a cromatografia líquida em coluna, para a separação e o isolamento das principais classes de constituintes presentes no biodiesel (EsMAG, MAG, DAG e TAG). Esta metodologia desenvolvida visa à obtenção de frações enriquecidas em cada uma dessas classes. Os resultados mostraram que empregando-se uma fase estacionária de octadecilsilano (C18), com diferentes composições dos solventes metanol e iso-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v), foram obtidas frações distintas, enriquecidas em MAG, DAG, TAG e em EsMAG, separadamente. Neste estudo, o acompanhamento da separação obtida através da cromatografia líquida em coluna foi feito por cromatografia em camada delgada e por CLAE-FRNA. A CLAE se mostrou uma ferramenta simples, eficiente e bastante útil para a caracterização dos constituintes de

cada fração. Esta técnica mostrou que a separação e o isolamento das classes constituintes do biodiesel foi eficiente.

O presente trabalho visa dar continuidade aos métodos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa para a análise do biodiesel. Este projeto, difere dos demais trabalhos já realizados pelo grupo, pois utiliza as técnicas de EFS e CLAE-FRNA objetivando a separação de cada classe constituinte do biodiesel (EsMAG, MAG, DAG e TAG), em frações individuais enriquecidas, para facilitar o emprego de métodos analíticos e possibilitar o futuro desenvolvimento de padrões destas classes através do aperfeiçoamento do método. Este projeto difere do realizado por Blatt (2014), pois empregamos cartuchos de EFS (500 mg) contendo fase sílica e aminopropilsilano, enquanto que Blatt (2014), empregou uma coluna de vidro (200 mm de comprimento e 15 mm de diâmetro interno) recheada com fase octadecilsilano (C18).

Capítulo 4

Materiais e

Métodos

Capítulo 4. Materiais e Métodos

4.1 Produto de Transesterificação de Baixa Conversão do Óleo de Soja

O produto de transesterificação utilizado neste projeto, fornecido pelo LABCOM, foi produzido a partir do óleo de soja refinado da marca Liza (Cargill, São Paulo, Brasil) em uma reação de transesterificação com metanol anidro (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil), utilizando como catalisador o carbonato de potássio (MERCK, Darmstadt, Alemanha). A razão molar entre o óleo de soja e o álcool (metanol) foi de 1:3 e o tempo de reação foi de 10 minutos, com objetivo de se produzir um produto de transesterificação de baixa conversão (CARDOSO, 2012).

O produto de transesterificação foi previamente caracterizado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e CLAE-FRNA. Os resultados da RMN ^1H mostraram uma conversão em ésteres de 44% e a CLAE-FRNA mostrou uma conversão de 34% em ésteres (CARDOSO, 2012).

4.2 Preparo da Amostra do Produto de Transesterificação de Baixa Conversão do Óleo de Soja.

A amostra foi preparada em um micro tubo, dissolvendo-se uma massa de biodiesel, previamente pesada em balança analítica eletrônica, em *n*-Hexano grau cromatográfico (TEDIA, São Paulo, Brasil) de modo a se obter uma solução 5% (p/v).

4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa Não Aquosa

As análises por CLAE-FRNA foram realizadas de acordo com o método desenvolvido por Andrade, Mazzei e d'Ávila, em 2011. 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 iso-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. Empregou-se o equipamento da Thermo Scientific (Massachusetts, EUA) modelo Ultimate 3000, composto por uma bomba quaternária modelo LPG-3400 SD, um detector por varredura de espectro ao ultravioleta modelo DAD-3000 e um injetor automático modelo WPS-3000 SL com alça de amostragem de 100 µL. Foi utilizado 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. 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 convertidos para Excel 2013 (Microsoft, Estados Unidos) pelo programa de aquisição *Chromeleon*.

A **tabela 5** mostra os componentes presentes no produto de transesterificação identificáveis pelo método da CLAE-FRNA (ANDRADE, MAZZEI e d'ÁVILA, 2011), sua notação e código de identificação nos cromatogramas, além do número de carbono equivalente (NCE) e número de ligações duplas (NLD). A presença ou ausência destes componentes, assim

como sua concentração, variam de acordo com a oleaginosa usada na produção do biodiesel e do grau de conversão da reação de transesterificação.

Tabela 5: Componentes identificáveis no produto de transesterificação pelo método da CLAE-FRNA (adaptado de ANDRADE, MAZZEI e d'ÁVILA, 2011).

Classes	Nome	Notação	Código (NCE)[NLD]
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]
	Dioloína	OO	L (32) [2]
TAG	Trilinenina	LnLnLn	M (36) [9]
	Dilinoeoil-linoleoil-glicerol	LLnLn	N (38) [8]
	Dilinoeoil-linoleoil-glicerol+ Dilinoeoil-oleoil-glicerol	LLLn+OLnLn	O (40) [7]
	Trilinoeína+ oleoil-linoleoil-linoleoil-glicerol	LLL+OLLn	P (42) [6]
	Dilinoeoil-oleoil-glicerol+ Dioleoil-linoleoil-glicerol	OLL+OOLn	Q (44) [5]
	Dioleoil-linoleoil-glicerol	OOL	R (46) [4]
	Trioloína	OOO	S (48) [3]
	Dioleoil-gadoleoil-glicerol	OOG	T (50) [3]

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

4.3.1 Determinação da Área Corrigida

A área corrigida (A_C) de cada componente (códigos A até T – **tabela 5**) identificado no cromatograma obtido por CLAE, foi determinada através da **equação 1**.

$$A_C = \frac{A}{NLD} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

A_C e A referem-se, respectivamente, as áreas, em mAU x min, corrigida e obtida diretamente de cada componente.

As áreas corrigidas de cada classe de componentes (EsMAG, MAG, DAG e TAG) foram obtidas através da soma das A_C dentro de cada classe.

4.4 Extração em Fase Sólida

4.4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados na EFS foram: éter de petróleo (P.A., ISOFAR, Rio de Janeiro, Brasil), álcool etílico (P.A., 99,8% de pureza, ACS), éter etílico (P.A., ACS), clorofórmio (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) e *n*-hexano (TEDIA, São Paulo, Brasil).

4.4.2 Separação de EsMAG, TAG, DAG e MAG por EFS

A separação dos principais componentes e contaminantes do biodiesel (EsMAG, MAG, DAG e TAG) em frações individuais foi realizada em três etapas de EFS como apresentado na **figura 4**.

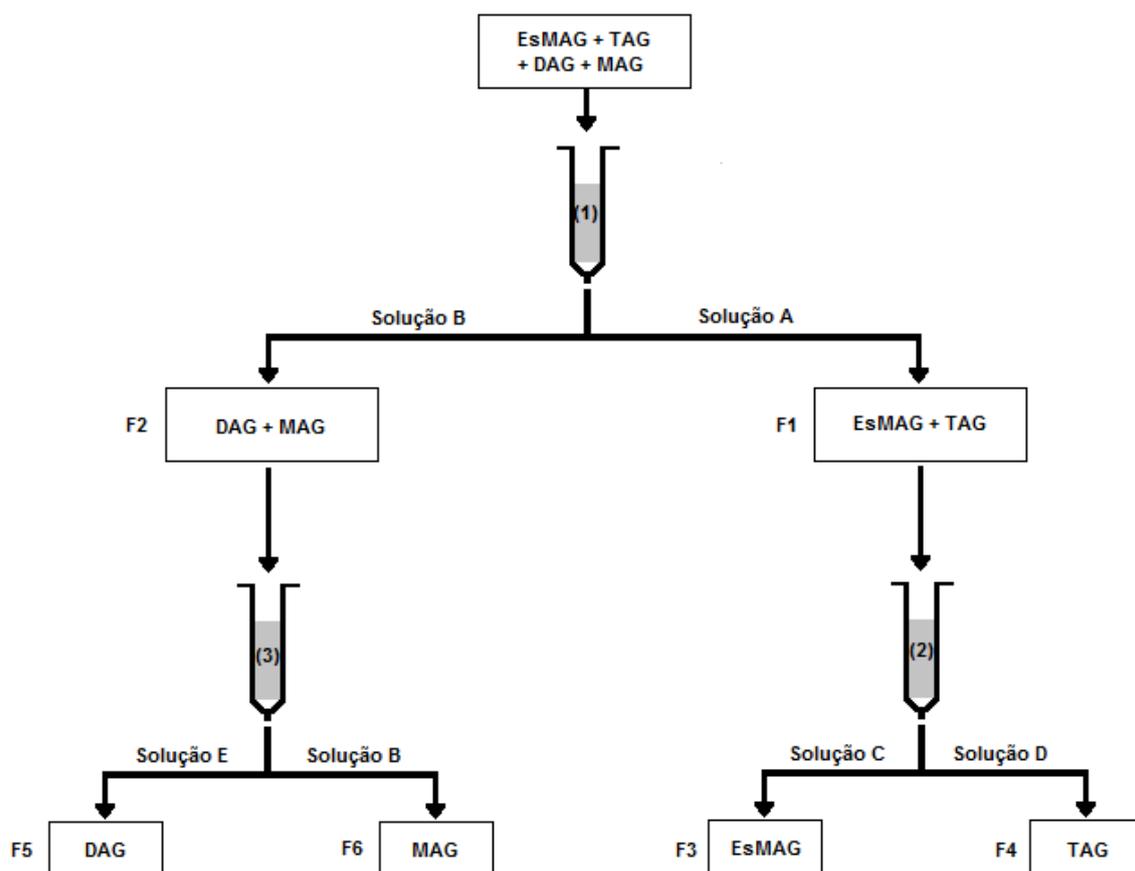


Figura 4: Representação esquemática do método de separação dos EsMAG, MAG, DAG e TAG, por EFS. Onde os cartuchos (1) e (3) são constituídos da fase estacionária sílica, 500mg, 3 mL, tamanho de partícula 230-400 mesh, marca SILICYCLE ULTRA PURE e o cartucho (2) da fase estacionária aminopropilsilano, 500 mg, 3 mL, tamanho de partícula 40 μ m, marca Bond Elut. As fases móveis são constituídas por: solução A- 15% (v/v) éter dietílico em éter de petróleo, solução B- éter dietílico, solução C- *n*-hexano, solução D- clorofórmio:metanol (2:1) e solução E- 45% (v/v) éter dietílico em éter de petróleo.

Para realizar as extrações foi utilizado um equipamento de extração em fase sólida (*Manifold*), conforme representação esquemática mostrada na **figura 5**. 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.

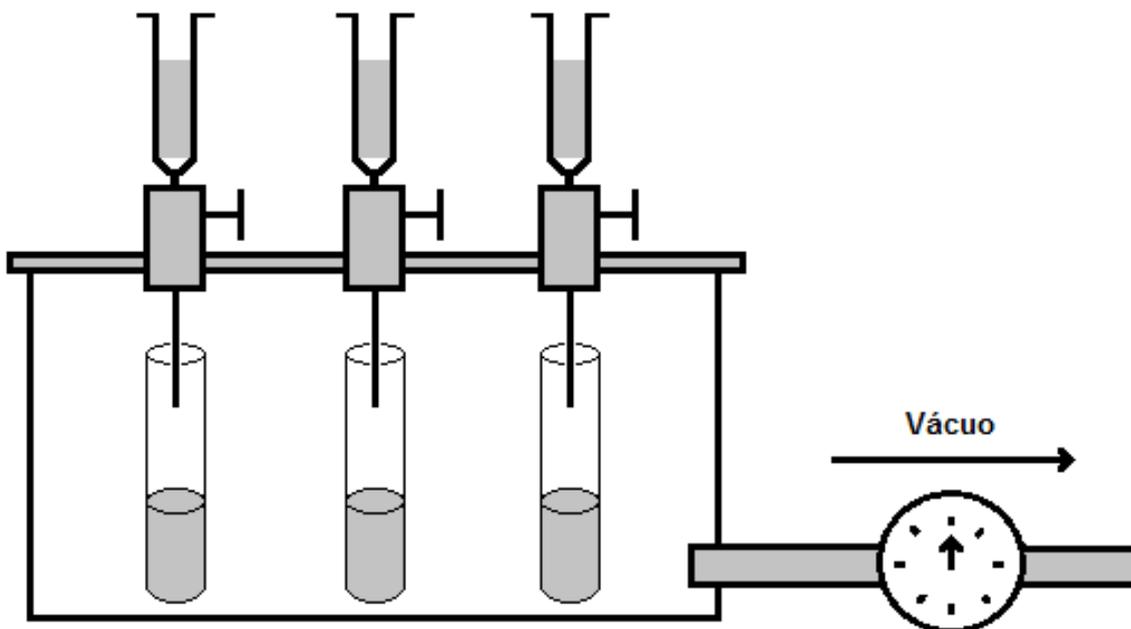


Figura 5: Representação esquemática do sistema analítico usado na EFS (adaptado de LANÇAS, 2004).

Os três cartuchos usados nas etapas de EFS foram condicionados com duas porções de 2 mL de *n*-hexano, totalizando 4 mL. Todos os processos de evaporação das frações e alíquotas foram executados sob fluxo lento de nitrogênio. As transferências volumétricas da amostra, resíduos e eluentes foram realizadas utilizando pipetadores automáticos de volume variável (100-1000 μL ou 10-100 μL) da marca BRAND (Wertheim, Alemanha).

4.4.2.1 Primeira EFS (obtenção de frações enriquecidas em EsMAG e TAG – Fração 1 e em DAG e MAG – Fração 2)

Uma alíquota de 200 μL da amostra (produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de soja), na concentração de 5% (p/v) em *n*-hexano grau cromatográfico (TEDIA, São Paulo, Brasil), foi transferida diretamente para um *vial*, para servir como amostra controle da primeira EFS (primeiro controle) e permitir o cálculo do rendimento desta etapa. Esta alíquota, foi evaporada até

secura, sob fluxo lento de nitrogênio e diluída em 1,2 mL de solução *i*-propanol:*n*-hexano (5:4 v/v).

O cartucho 1 (fase estacionária sílica, 500mg, 3 mL, tamanho de partícula 230-400 mesh, marca SILICYCLE ULTRA PURE) – (1, **figura 4**) foi acoplado ao sistema de EFS (*manifold*) e condicionado com duas porções de 2 mL de *n*-hexano, totalizando 4 mL. Uma alíquota de 200 µL da amostra (produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de soja), constituída de EsMAG, TAG, DAG e MAG, foi aplicada no cartucho 1. A fração 1 (F1, **figura 4**), constituída majoritariamente de EsMAG e TAG, foi eluída com 8 mL de solução 15% (v/v) de éter dietílico em éter de petróleo (Solução A, **figura 4**). A fração 2 (F2, **figura 4**), constituída majoritariamente pelos MAG e DAG retidos no cartucho 1, foi eluída com 5 mL de éter dietílico (Solução B, **figura 4**). 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, para que os analitos apresentem o mesmo fator de diluição da amostra controle da primeira EFS (primeiro controle).

4.4.2.2 Segunda EFS (obtenção de frações enriquecidas em EsMAG – Fração 3 e em TAG – Fração 4)

Uma alíquota de 200 µL da fração 1, constituída majoritariamente por EsMAG e TAG, foi evaporada até *secura*, sob fluxo lento de nitrogênio e diluída em 400 µL de solução iso-propanol:*n*-hexano (5:4 v/v), para servir como amostra controle da segunda extração (segundo controle) e permitir o cálculo do rendimento desta etapa. O cartucho 2 (fase estacionária aminopropilsilano, 500 mg, 3 mL, tamanho de partícula 40 µm, marca Bond Elut) – (2, **figura 4**) foi acoplado ao *manifold* e condicionado com duas porções de 2 mL de *n*-hexano,

totalizando 4 mL. A fração 3 (F3, **figura 4**), constituída majoritariamente pelos EsMAG, foi eluída com 8 mL de *n*-hexano (Solução C, **figura 4**). A fração 4 (F4, **figura 4**), constituída majoritariamente pelos TAG retidos no cartucho 2, foi eluída com 5 mL de solução clorofórmio:metanol (2:1, v/v) (Solução D, **figura 4**). Ambas as frações foram evaporadas até *secura*, sob fluxo lento de nitrogênio e os resíduos foram diluídos em 400 µL de solução iso-propanol:*n*-hexano (5:4 v/v).

4.4.2.3 Terceira EFS (obtenção de frações enriquecidas em DAG – Fração 5 e em MAG – Fração 6)

Uma alíquota de 200 µL da fração 2, constituída majoritariamente por DAG e TAG, foi evaporada até *secura*, sob fluxo lento de nitrogênio e diluída em 400 µL de solução iso-propanol:*n*-hexano (5:4 v/v), para servir de amostra controle da terceira extração (terceiro controle) e permitir o cálculo do rendimento desta etapa. O cartucho 3 (fase estacionária sílica, 500mg, 3 mL, tamanho de partícula 230-400 mesh, marca SILICYCLE ULTRA PURE) – (3, **figura 4**) foi acoplado ao *manifold* e condicionado com duas porções de 2 mL de *n*-hexano, totalizando 4 mL. A fração 5 (F5, **figura 4**), constituída majoritariamente pelos DAG, foi eluída com 5 mL de solução 45% (v/v), de éter dietílico em éter de petróleo (Solução E, **figura 4**). A fração 6 (F6, **figura 4**), constituída majoritariamente pelos MAG retidos no cartucho 3, foi eluída com 6 mL de éter dietílico. Ambas as frações foram evaporadas até *secura*, sob fluxo lento de nitrogênio e os resíduos foram diluídos em 400 µL de solução iso-propanol:*n*-hexano (5:4 v/v).

Após a terceira extração, os vials contendo as frações 1 e 2 dissolvidas em 800 µL de *n*-hexano (volume restante após a retirada das alíquotas para as

amostras controle e para injeção no cartucho) tiveram seus conteúdos evaporados e ressuspensos em 800 µL de solução iso-propanol:*n*-hexano (5:4 v/v).

Todo o método de separação, por EFS, foi realizado em triplicata e todas as amostras controle e frações obtidas foram analisadas em triplicata, por CLAE-FRNA, de acordo com a técnica descrita no **item 4.3**.

4.4.3 Determinação da recuperação

A recuperação de cada classe (R_{Classe}) de componentes (MAG, EsMAG, DAG e/ou TAG) presentes nas frações obtidas pelo processo de EFS foi determinada através da **equação 2**.

$$R_{Classe} = 100 \times \left(\frac{A_{Classe}}{A_{Controle}} \right) \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

A_{Classe} e $A_{Controle}$ referem-se, respectivamente, as áreas de cada classe de componentes, obtidas por CLAE, após o processo de EFS e das amostras controle correspondentes.

4.4.4 Determinação da composição

A composição relativa percentual de cada classe (C_{Classe}) de componentes (MAG, EsMAG, DAG e/ou TAG) presente nas frações obtidas pelo processo de EFS foi determinada através da **equação 3**.

$$C_{Classe} = 100 \times \left(\frac{A_{Classe}}{AT_{Classe}} \right) \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

A_{Classe} e AT_{Classe} referem-se, respectivamente, as áreas de cada classe e de todas as classes de componentes, obtidas por CLAE, após o processo de EFS.

4.4.5 Fator de Recuperação

O fator de recuperação de cada classe (Ef_{Classe}) de componentes (MAG, EsMAG, DAG e TAG) ao final de todas as etapas de EFS é determinado pela **equação 4**.

$$Ef_{Classe} = (R1_{classe} \times R2_{classe})/100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

$R1_{Classe}$ e $R2_{Classe}$ referem-se, respectivamente, as recuperações percentuais de cada classe calculadas pela **equação 2** após a primeira e segunda EFS pela qual são submetidas (primeira e segunda EFS para EsMAG e TAG e primeira e terceira EFS para MAG e DAG).

Capítulo 5

Resultados e

Discussão

Capítulo 5. Resultados e Discussão

5.1 Análise do Produto de Transesterificação de Baixa Conversão do Óleo de Soja por CLAE-FRNA

Uma alíquota do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de soja (sem ser submetida a nenhuma etapa de EFS) foi separada como amostra controle da primeira etapa de EFS (primeiro controle). A alíquota foi analisada por CLAE-FRNA como descrito no **item 4.3**. O cromatograma obtido é mostrado na **figura 6**.

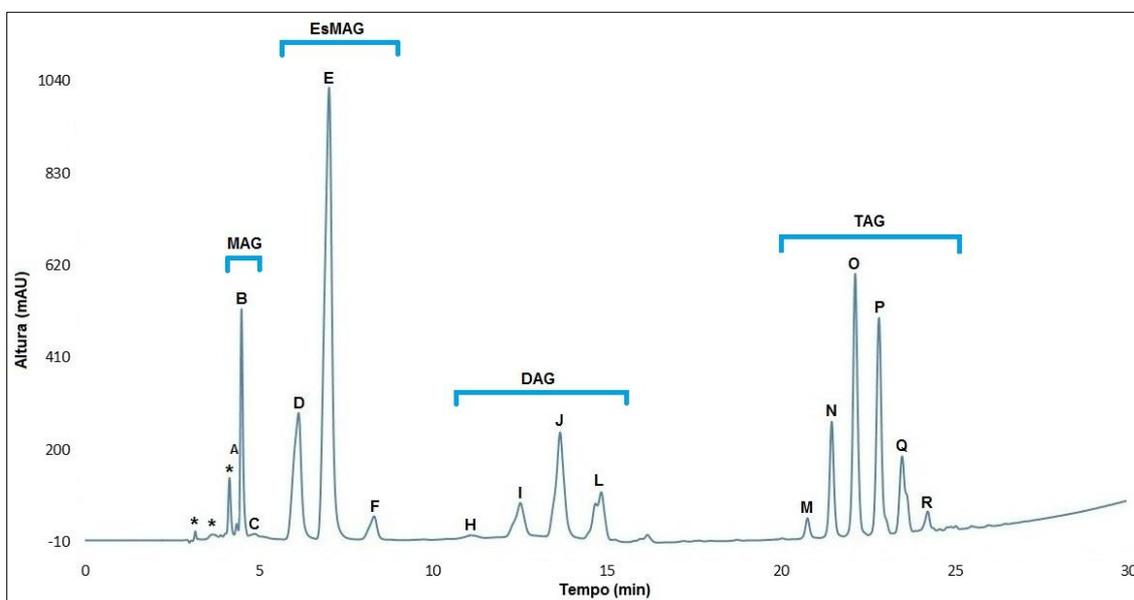


Figura 6: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, do produto de transesterificação do óleo de soja de baixa conversão.

O resultado apresentado na **figura 6** mostra que a amostra controle da primeira EFS (primeiro controle) apresenta todas as quatro classes de constituintes do biodiesel separadas em regiões bem definidas: MAG (picos A, B e C, 4 a 5 minutos), EsMAG (picos D, E e F, 5 a 10 minutos), DAG (picos H, I, J e L, 10 a 18 minutos), e TAG (picos M, N, O, P, Q e R, 20 a 25 minutos). Os

picos marcados com asterisco (*) são atribuídos a presença de resíduos de solventes não evaporados (**figuras 1 a 5** - Anexo). A **figura 7** mostra o cromatograma do produto de transesterificação do óleo de soja de baixa conversão aproximado na região dos MAG.

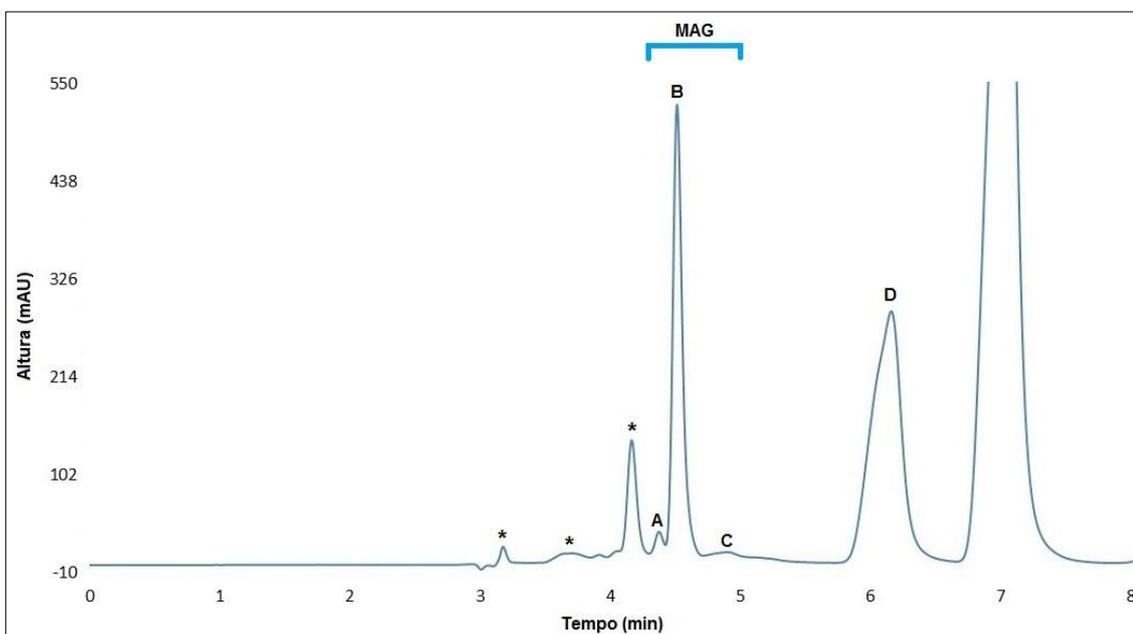


Figura 7: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, do produto de transesterificação do óleo de soja de baixa conversão – aproximação na região dos MAG.

Os picos correspondentes aos MAG (picos A, B e C) podem ser identificados observando-se a **figura 7**. Os três picos são eluídos em um intervalo inferior a um minuto sendo apenas a monolinoleína (pico B) presente em quantidade significativa.

A ordem na qual os acilgliceróis são eluídos está diretamente relacionada ao NCE (HOLCAPEK *et al.*, 1999, HOLCAPEK *et al.*, 2001 e ANDRADE, MAZZEI e d'ÁVILA, 2011), como mostrado por Andrade, 2011. Nas condições utilizadas, a CLAE-FRNA não foi capaz de separar componentes com mesmo NCE. Sendo assim, os isômeros de posição sn-2 e sn-1 dos MAG e os isômeros sn-1,2 e sn-

1,3 dos DAG não foram separados e portanto cada pico contém ambos os isômeros. Ainda dentro da classe dos DAG, a LL também não foi separada do OLn, por terem o mesmo NCE. Os pares de TAG, LLLn/OLnLn (NCE 40), LLL/OLLn (NCE 42) e OLL/OOLn (NCE 44) também não foram separados por este método (ANDRADE, MAZZEI e d'ÁVILA, 2011). A **tabela 6** apresenta as composições (%), em MAG, EsMAG, DAG e TAG, da amostra controle da primeira EFS (primeiro controle) do produto de transesterificação do óleo de soja de baixa conversão, calculadas pela **equação 2**.

Tabela 6: Composições (%), em MAG, EsMAG, DAG e TAG, da amostra controle da primeira EFS (primeiro controle) do produto de transesterificação do óleo de soja de baixa conversão.

Componente	Composição (%)
MAG	7,7±1,2 ^a
EsMAG	59,9±0,4 ^a
DAG	17,1±0,8 ^a
TAG	15,3±0,8 ^a

^a*Incertezas calculadas pelo desvio padrão das réplicas.*

Os resultados apresentados na **Tabela 6** mostram que a amostra controle da primeira EFS (primeiro controle), referente ao produto de transesterificação do óleo de soja de baixa conversão é constituída majoritariamente por EsMAG (59,9%). Esta amostra controle também apresenta quantidade significativa de TAG (15,3%), materiais não convertidos durante a reação de transesterificação, e de DAG (17,1%) e MAG (7,7%), intermediários formados durante a reação de transesterificação.

5.2 Análise das Frações obtidas, por EFS, por CLAE-FRNA

5.2.1 Frações da Primeira EFS

A primeira EFS foi realizada com o objetivo de separar a amostra do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de soja, constituída de EsMAG, MAG, DAG e TAG em duas frações, uma constituída de EsMAG e TAG (fração 1) e outra constituída de MAG e DAG (fração 2). Os cromatogramas das frações 1 e 2 podem ser vistos nas **figuras 8 e 9** respectivamente. As composições das frações 1 e 2 bem como as recuperações de cada classe constituinte da amostra, calculadas pela **equação 4**, podem ser vistos na **tabela 7 e 8** respectivamente.

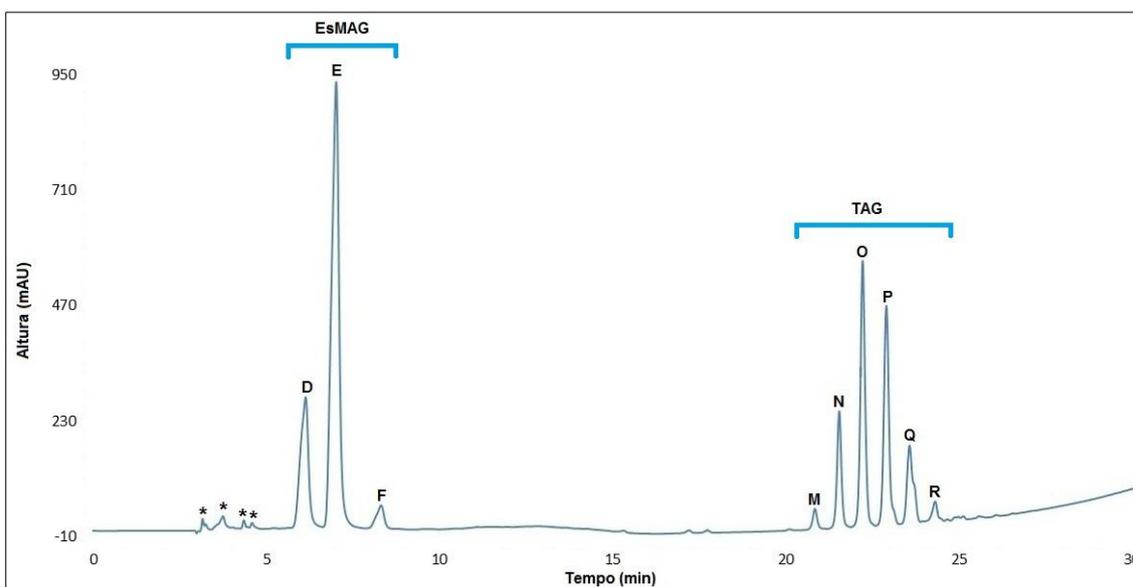


Figura 8: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, da fração 1, contendo EsMAG e TAG, obtida na primeira EFS através da eluição com solução 15% (v/v) de éter dietílico em éter de petróleo.

Como pode ser observado pelo cromatograma apresentado na **figura 8**, a fração 1 é constituída majoritariamente de EsMAG (picos D, E e F, na região de 5 a 10 minutos) e TAG (picos M, N, O, P, Q e R, na região de 20 a 25 minutos). Nesta fração não foi detectada a presença de DAG e MAG. Podemos observar a presença de picos de baixa intensidade na região dos 2 a 5 minutos (*) pertencentes a resíduos não evaporados de solvente (**figura 1** – anexo).

Tabela 7: Composição (%) da fração 1 obtida pela primeira EFS e recuperação (%) das classes constituintes em relação a primeira amostra controle.

Componente	Composição (%)	Recuperação (%)
MAG	0	-
EsMAG	79,5±0,2 ^b	95,6±3,6 ^b
DAG ^a	0	-
TAG	20,5±0,9 ^b	96,1±3,4 ^b

^aNão foi detectado DAG e MAG na Fração 1, obtida pela primeira EFS.

^bIncertezas calculadas pelo desvio padrão das réplicas.

Os resultados apresentados na **tabela 7** mostram que a fração 1, obtida pela primeira EFS, é composta majoritariamente por EsMAG (79,5%) com quantidade significativa de TAG (20,5%). A recuperação em EsMAG e TAG foi superior a 95% e não foi detectada a presença de DAG e MAG nesta fração.

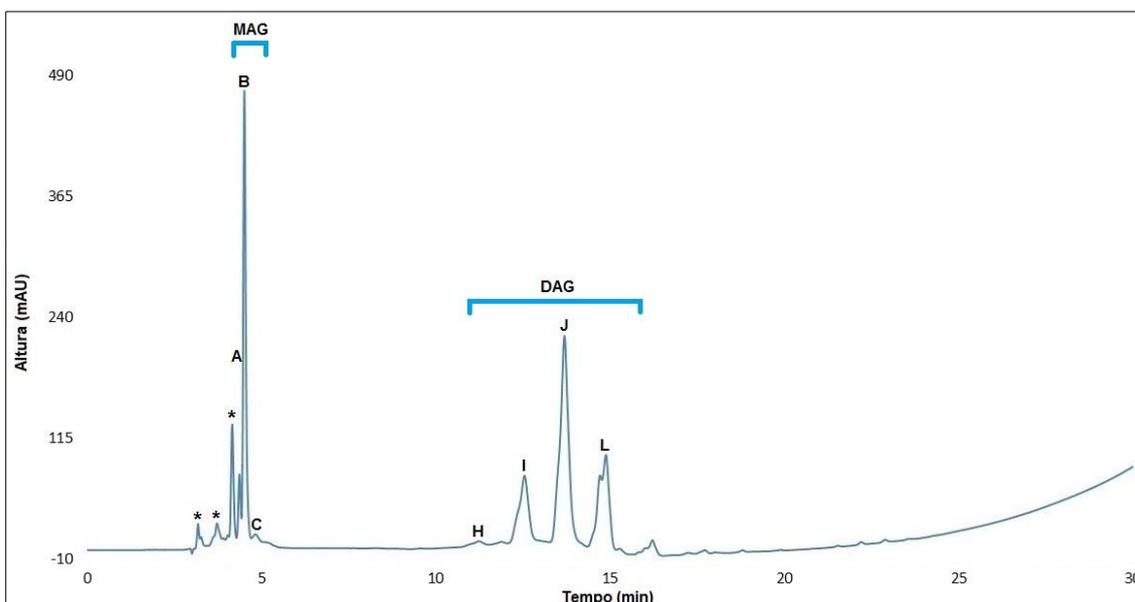


Figura 9: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, da fração 2, Contendo MAG e DAG, obtida na primeira EFS através da eluição com éter dietílico.

Através do cromatograma apresentado na **figura 9**, pode-se observar que a fração 2 é constituída de MAG (picos A e B, na região de 4 a 5 minutos) e DAG (picos H, I, J e L, na região de 10 a 18 minutos). Nesta fração não foi detectada a presença de EsMAG (picos D, E e F, 5 a 10 minutos) e TAG (picos M, N, O, P, Q e R, 20 a 25 minutos). Os picos marcados com asterisco (*) são atribuídos a presença de resíduos de solventes não evaporados (**figura 2** – anexo)

Tabela 8: Composição (%) da fração 2 obtida pela primeira EFS e recuperação (%) das classes constituintes em relação a primeira amostra controle.

Componente	Composição (%)	Recuperação (%)
MAG	30,3±1,0 ^a	92,2±2,5 ^a
EsMAG ^b	0	-
DAG	69,7±0,4 ^a	95,0±3,7 ^a
TAG ^b	0	-

^aIncertezas calculadas pelo desvio padrão das réplicas.

^bNão foram detectados EsMAG e TAG na Fração 2, obtida pela primeira EFS.

Os resultados apresentados na **tabela 8** mostram que a fração 2, obtida pela primeira EFS, é composta majoritariamente por DAG (69,7%) com quantidade significativa de MAG (30,3%). A recuperação de ambas as classes foi superior a 92% e não foram detectadas as presenças de EsMAG e TAG nesta fração.

A separação da amostra constituída de EsMAG, MAG, DAG e TAG em duas frações, uma constituída de EsMAG e TAG (fração 1) e outra constituída de MAG e DAG (fração 2) acontece desta forma em virtude da diferença de polaridade dos componentes. Os DAG e MAG, mais polares, ficam retidos na fase estacionária constituída por sílica, enquanto os TAG e EsMAG, menos polares são eluídos com solução 15% (v/v) de éter dietílico em éter de petróleo, de baixa polaridade. Em seguida, a mudança de fase móvel para o éter dietílico, mais polar que a solução anterior, faz com que os DAG e MAG que estavam retidos no cartucho, sejam eluídos.

A primeira EFS apresentou recuperações de todas as classes constituintes (EsMAG, MAG, DAG e TAG) superiores a 92%, além de alta

eficiência ao separar as classes mais polares (MAG e DAG) das menos polares (TAG, EsMAG).

5.2.2 Frações da Segunda EFS

A segunda EFS foi realizada com o objetivo de separar os EsMAG e TAG presentes na fração 1 em duas frações, uma constituída de EsMAG (fração 3) e outra contendo os TAG (fração 4). Para isso, uma alíquota da fração 1 foi aplicada em um cartucho de fase aminopropilsilano, a fração 3 foi eluída com *n*-hexano e a fração 4 com solução de clorofórmio:metanol (2:1).

As frações obtidas através da segunda EFS encontravam-se em diluições diferentes a diluição da fração 1. Sendo assim, foi necessário usar uma segunda amostra controle (segundo controle) para realizar os cálculos de rendimento desta etapa. O cromatograma correspondente ao segundo controle é exibido na **figura 10**. As composições são idênticas as da fração 1 porém as concentrações são diferentes.

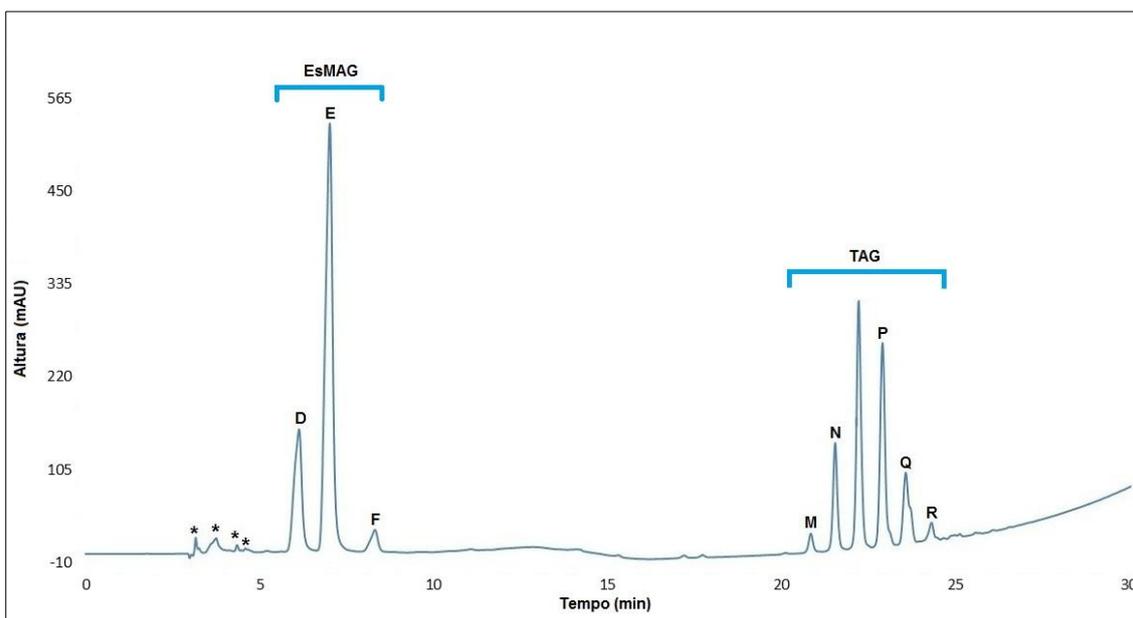


Figura 10: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, da segunda amostra controle, contendo EsMAG e TAG (Fração 1 da 1ª Extração).

Como pode ser observado pelo cromatograma apresentado na **figura 10**, a segunda amostra controle é constituída majoritariamente de EsMAG (picos D, E e F, na região de 5 a 10 minutos) e TAG (picos M, N, O, P, Q e R, na região de 20 a 25 minutos). Não foi detectada a presença de DAG e MAG nesta fração. Podemos observar a presença de picos de baixa intensidade na região entre 2 e 5 minutos (*) atribuídos a presença de resíduos de solventes não evaporados (**figuras 1, 2 e 3**– anexo).

Os cromatogramas das frações 3 (constituída majoritariamente por EsMAG) e 4 (constituída majoritariamente por TAG) podem ser vistos nas **figuras 11 e 12**, respectivamente. As composições das frações 3 e 4 e as recuperações de cada classe constituinte, podem ser vistas na **tabela 9 e 10** respectivamente.

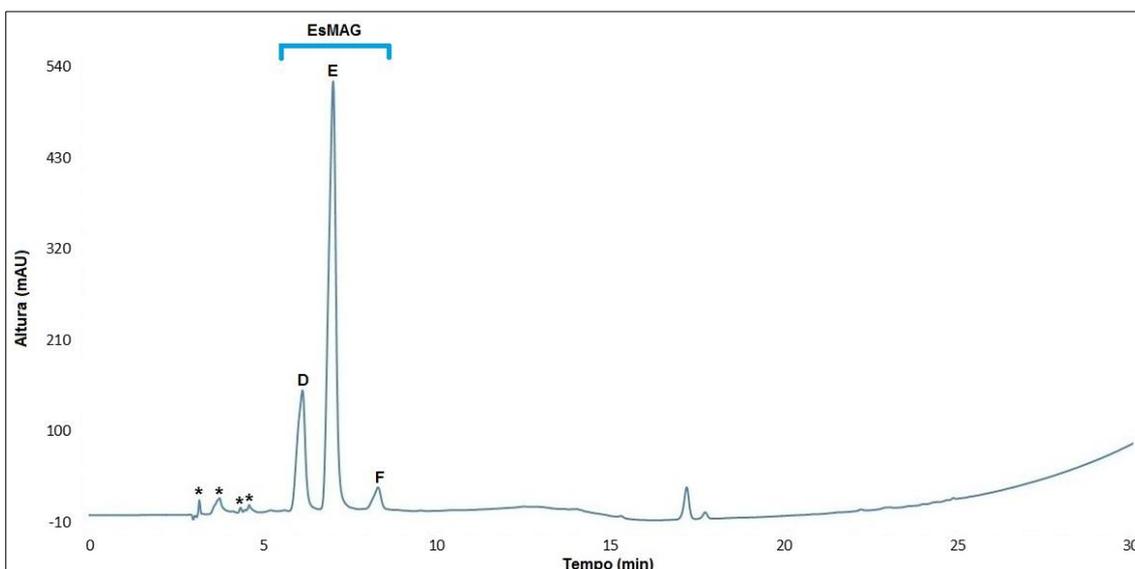


Figura 11: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, da fração 3, contendo EsMAG, obtida na segunda EFS através da eluição com *n*-hexano.

Através do cromatograma apresentado na **figura 11**, pode-se observar que a fração 3 é constituída majoritariamente de EsMAG (picos D, E e F, na região de 5 a 10 minutos). Nesta fração não foi detectada a presença de TAG (picos M, N, O, P, Q e R, na região de 20 a 25 minutos) e DAG (picos H, I, J e L, na região de 10 a 18 minutos). Contudo, observamos a presença de picos de baixa intensidade na região de 2 a 5 minutos (*) que são atribuídos a presença de resíduos de solvente não evaporados (**figura 1, 3 e 4**– anexo).

Tabela 9: Composição (%) da fração 3 obtida pela segunda EFS e recuperação (%) das classes constituintes em relação a segunda amostra controle.

Componente	Composição (%)	Recuperação (%)
MAG	0	-
EsMAG	100	94,9±1,4 ^b
DAG ^a	0	-
TAG ^a	0	-

^aNão foram detectados DAG e TAG na Fração 3, obtida pela segunda EFS.

^bIncertezas calculadas pelo desvio padrão das réplicas.

Os resultados apresentados na **tabela 9** mostram que a fração 3, obtida pela segunda EFS, é composta por EsMAG (100%). A recuperação em EsMAG foi superior a 94% e não foram detectadas as presenças de MAG, DAG e TAG nesta fração.

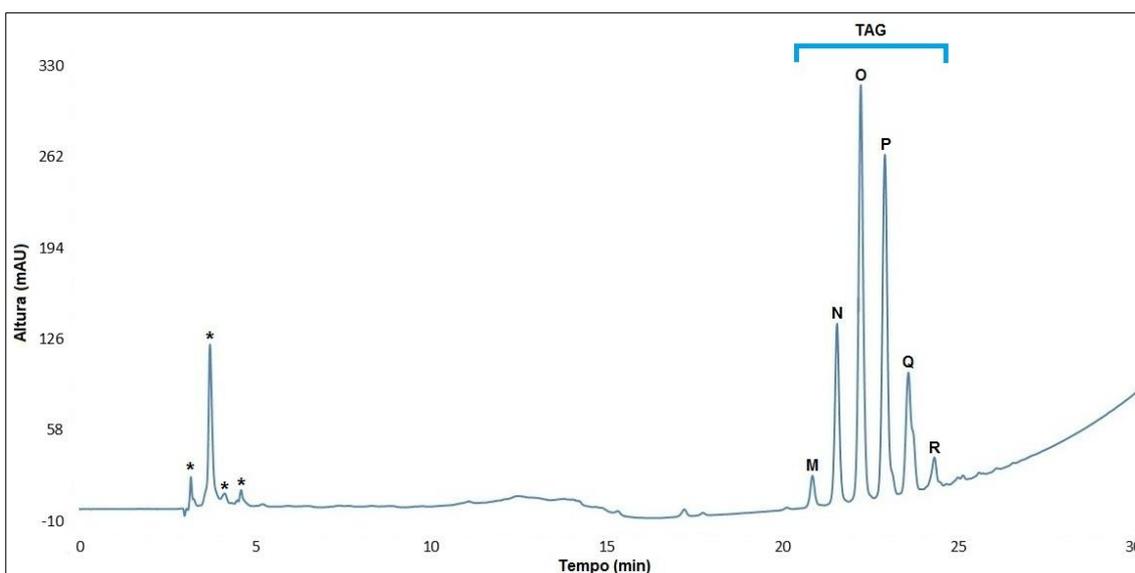


Figura 12: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, da fração 4, contendo TAG, obtida na segunda EFS através da eluição com solução clorofórmio:metanol (2:1).

Através do cromatograma apresentado na **figura 12**, pode-se observar que a fração 4 é constituída de TAG (picos M, N, O, P, Q e R, na região de 20 a 25 minutos). Nesta fração não foi detectada a presença de EsMAG (picos D, E e F, na região de 5 a 10 minutos), DAG (picos H, I, J e L, na região de 10 a 18 minutos) e MAG (picos A, B e C na região de 4 a 5 minutos). Os picos de baixa intensidade na faixa de 2 a 5 minutos (*) são devidos a resíduos de solvente não evaporados (**figura 1 a 5** – anexo).

Tabela 10: Composição (%) da fração 4 obtida pela segunda EFS e recuperação (%) das classes constituintes em relação a segunda amostra controle.

Componente	Composição (%)	Recuperação (%)
MAG	0	-
EsMAG ^a	0	-
DAG ^a	0	-
TAG	100	97,5±0,4 ^b

^aNão foram detectados EsMAG e DAG na Fração 4, obtida pela segunda EFS.

^bIncertezas calculadas pelo desvio padrão das réplicas.

Os resultados apresentados na **tabela 10** mostram que a fração 4, obtida pela segunda EFS, é composta por TAG (100%). A recuperação em TAG foi superior a 97% e não foram detectadas as presenças de MAG, DAG e EsMAG nesta fração.

Antes da segunda etapa de EFS a amostra contém ambos TAG e EsMAG como classes constituintes. Após a EFS fica evidente a separação das classes constituintes em duas frações enriquecidas em apenas um componente cada. A

fração 3 é constituída por EsMAG, enquanto a fração 4 por TAG e a recuperação desta etapa foi superior a 94% para ambas as classes.

A EFS usando o cartucho de fase aminopropilsilano foi descrita por Andrade, Mazzei e d'Ávila, em 2011, para separar o biodiesel (EsMAG) da glicerina combinada (MAG, DAG, TAG). Neste projeto, aplicou-se a EFS usando o mesmo cartucho para a separação dos EsMAG dos TAG.

5.2.3 Frações da Terceira EFS

A terceira EFS foi realizada com o objetivo de separar os DAG e MAG presentes na fração 2 em duas frações, uma constituída de DAG (fração 5) e outra contendo os MAG (fração 6). Para isso, uma alíquota da fração 2 foi aplicada em um cartucho de fase sílica. A fração 5 foi eluída com uma solução 45% (v/v) de éter dietílico em éter de petróleo e a fração 6 com éter dietílico.

As frações obtidas através da terceira EFS encontravam-se em diluições diferentes da diluição da fração 2. Sendo assim foi necessário usar uma terceira amostra controle (terceiro controle) para realizar os cálculos de rendimento desta etapa. O cromatograma correspondente ao terceiro controle é exibido na **figura 13**. As composições são idênticas as da fração 2 porém as concentrações são diferentes.

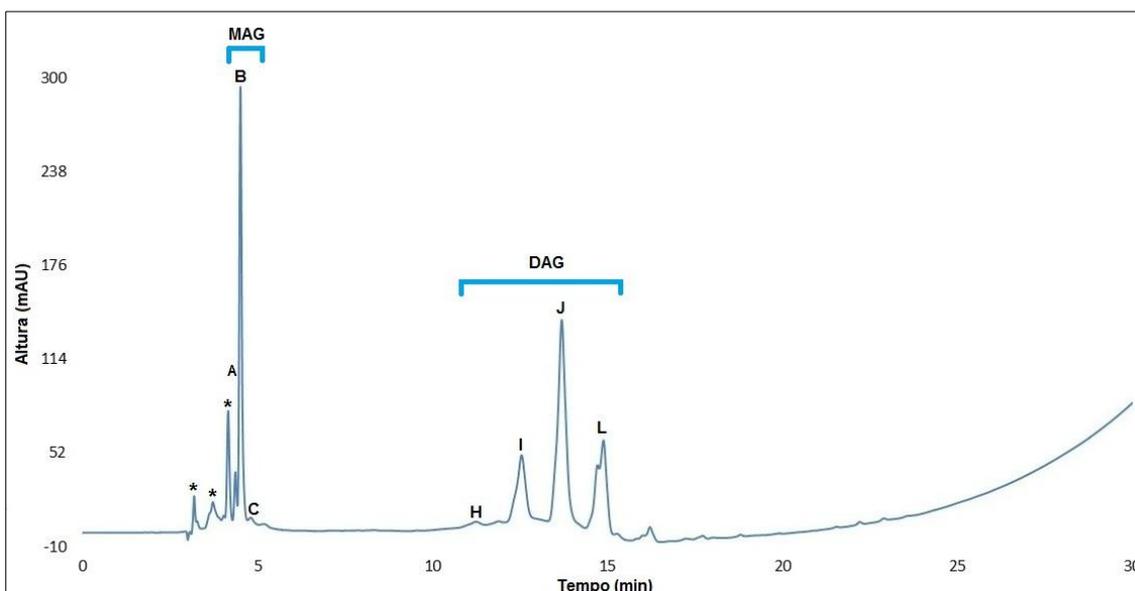


Figura 13: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, da terceira amostra controle, constituída de MAG e DAG (Fração 2 da 1^a extração).

Como pode ser observado pelo cromatograma apresentado na **figura 13** a terceira amostra controle é constituída de MAG (picos A e B, na região de 2 a 5 minutos) e DAG (picos H, I, J e L, na região de 10 a 18 minutos). Não foi detectada a presença de EsMAG (picos D, E e F, na região de 5 a 10 minutos) e TAG (picos M, N, O, P, Q e R, na região de 20 a 25 minutos) nesta amostra. Os picos de baixa intensidade (*) anteriores aos MAG se devem a presença de resíduos de solventes não evaporados (**figura 1 e 2** – anexo).

Os cromatogramas das frações 5 (constituída majoritariamente por DAG) e 6 (constituída por MAG) podem ser vistos nas **figuras 14 e 15** respectivamente. As composições das frações 5 e 6 e as recuperações de cada classe constituinte, podem ser vistas na **tabela 11 e 12**, respectivamente.

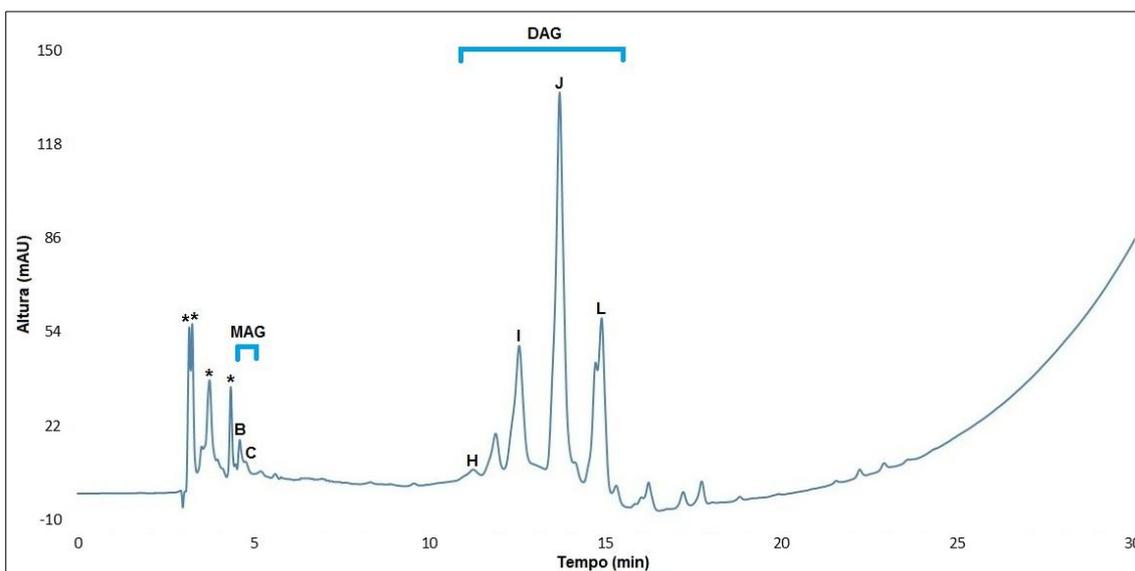


Figura 14: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, da fração 5, constituída de DAG, obtida na terceira EFS através da eluição com solução 45% de éter dietílico em éter de petróleo.

A partir do cromatograma apresentado na **figura 13**, podemos observar que a fração 5 é constituída majoritariamente de DAG (picos H, I, J e L, na região de 10 a 18 minutos). Não foi detectada a presença de EsMAG (picos D, E e F, na região de 5 a 10 minutos) e TAG (picos M, N, O, P, Q e R, na região de 20 a 25 minutos) nesta fração. Contudo, observamos a presença de picos de pequena intensidade na região dos MAG (picos B e C na região de 4 a 5 minutos). Os picos de baixa intensidade anteriores aos MAG (*), são atribuídos a presença de resíduos de solvente não evaporado (**figura 1, 2 e 5 – anexo**).

Tabela 11: Composição (%) da fração 5 obtida pela terceira EFS e recuperação (%) das classes constituintes em relação a terceira amostra controle.

Componente	Composição (%)	Recuperação (%)
MAG	0,3±0,2	-
EsMAG ^a	0	-
DAG	99,7±1	84,7±8,2 ^b
TAG ^a	0	-

^aNão foram detectados EsMAG e TAG na Fração 5, obtida pela terceira EFS.

^bIncerteza calculada pelo desvio padrão das réplicas.

Os resultados apresentados na **tabela 11** mostram que a fração 5, obtida pela terceira EFS, é composta majoritariamente por DAG (99,7%). Contudo, observamos a presença de quantidades relativamente pequenas de MAG (0,3 %). A recuperação em DAG foi superior a 84% e não foram detectadas as presenças de TAG e EsMAG nesta fração.

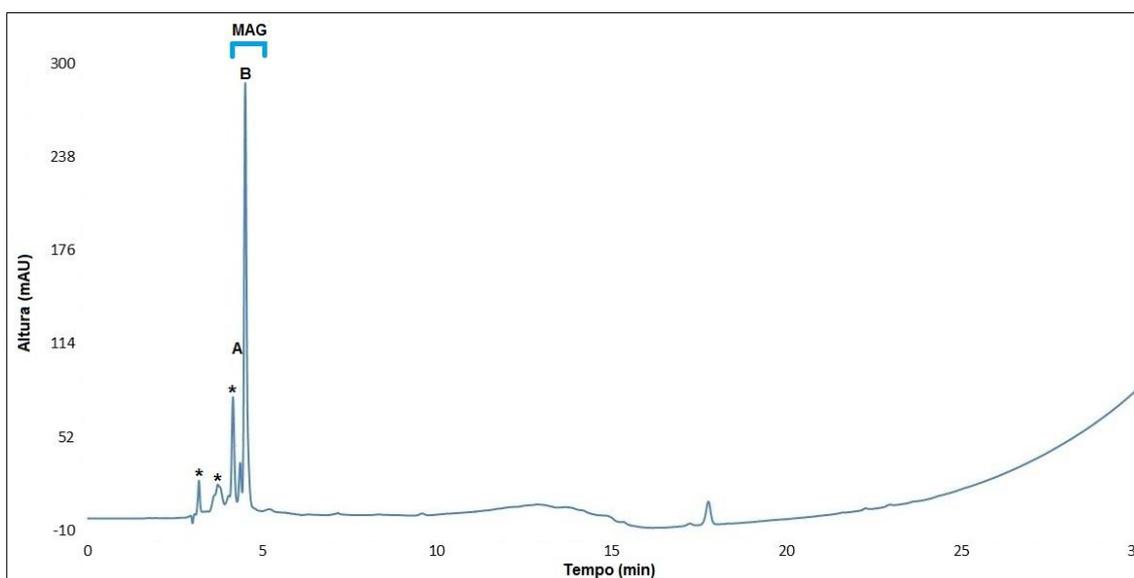


Figura 15: Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, da fração 6, constituída de MAG, obtida na terceira EFS através da eluição com éter dietílico.

A partir do cromatograma apresentado na **figura 14**, podemos observar que a fração 6 é constituída majoritariamente de MAG (picos A e B, na região de 4 a 5 minutos). Não foi detectada a presença de EsMAG (picos D, E e F, na região de 5 a 10 minutos), DAG (picos H, I, J e L, na região de 10 a 18 minutos) e TAG (picos M, N, O, P, Q e R, na região de 20 a 25 minutos) nesta fração.

Tabela 12: Composição (%) da fração 6 obtida pela terceira EFS e recuperação (%) das classes constituintes em relação a terceira amostra controle.

Componente	Composição (%)	Recuperação (%)
MAG	100	88,7±3,4 ^b
EsMAG ^a	0	-
DAG ^a	0	-
TAG ^a	0	-

^aNão foram detectados EsMAG, DAG e TAG na Fração 6, obtida pela terceira EFS.

^bIncerteza calculada pelo desvio padrão das réplicas.

A separação da fração 2 (constituída de MAG e DAG) em duas frações, uma constituída de DAG (fração 5) e outra constituída de MAG (fração 6) é possível em virtude da diferença de polaridade dos componentes. Os DAG (ver **figura 2**, página 10), que possuem uma hidroxila, são menos polares que os MAG, que possuem duas hidroxilas, por isso, interagem menos com a fase estacionária constituída por sílica. Sendo assim, os DAG são eluídos com solução 45% de éter dietílico em éter de petróleo (menos polar) antes dos MAG, eluídos com éter dietílico (mais polar).

As recuperações das classes constituintes (**tabelas 11 e 12**) para esta etapa de EFS foram menores que as recuperações das etapas anteriores, sendo de 84,7±8,2 %, para os DAG e 88,7±3,4 %, para os MAG.

5.2.4 Fator de Recuperação

O fator de recuperação, proposto neste trabalho, definido como o fator de recuperação máxima de uma amostra de biodiesel após ser submetida a sequência de EFS como descrito no **item 4.4.5**, dado pela **equação 3**, foi calculada e os resultados encontram-se na **tabela 13**.

Tabela 13: Fator de recuperação das classes constituintes do biodiesel após a sequências de EFS.

Componente	Fator (%)
MAG	81,8±3,2 ^a
EsMAG	90,9±2,9
DAG	80,4±4,8 ^a
TAG	93,7±3,2 ^a

^a*Incertezas calculadas pelo desvio padrão das réplicas.*

Os resultados exibidos na **tabela 13**, mostram que o fator de recuperação das classes mais polares (MAG e DAG) estão na ordem de 80%, sendo menores que o fator de recuperação das classes menos polares (EsMAG e TAG) que estão na ordem de 90%. Esta diferença pode ocorrer devido a adsorções irreversíveis das classes mais polares na fase estacionária constituída de sílica, o que faz uma parte destas classes não serem eluídas com os solventes utilizados.

Capítulo 6

Conclusões

Capítulo 6. Conclusões

O método proposto neste projeto, baseado na EFS, foi capaz de gerar frações enriquecidas em cada uma das principais classes constituintes do biodiesel (MAG, DAG, TAG e EsMAG). Desta forma, o método desenvolvido possui potencial para ser empregado na obtenção de padrões aplicáveis no controle da qualidade do biodiesel simplificando assim a caracterização química do biodiesel por métodos analíticos, como por exemplo, a CLAE.

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 fator de recuperação superior a 80% em todas as classes de componentes (MAG – 81,8%, EsMAG – 90,7%, DAG – 80,4% e TAG – 93,7%).

A análise, por CLAE-FRNA, das frações obtidas na EFS do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de soja, mostrou que a separação e o isolamento das classes constituintes do biodiesel foi eficiente.

Capítulo 7

Perspectivas Futuras

Capítulo 7. Perspectivas Futuras

Dentre as perspectivas futuras para a continuidade do projeto, podemos destacar:

1. Planejar o isolamento de materiais de referência das classes (EsMAG, MAG, DAG e TAG), através de transposições de escala, a partir dos dados de recuperação e eficiência obtido no desenvolvimento dos métodos analíticos, para biodiesel de diversas oleaginosas;
2. Isolar materiais de referência das classes (EsMAG, MAG, DAG e TAG) ou de seus constituintes para biodiesel de diversas oleaginosas;
3. Realizar os estudos de caracterização do Material de Referência;

Capítulo 8

Referências

Bibliográficas

Capítulo 8. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS – ANP. Resolução N° 7, de 19 de março de 2008. Disponível em www.anp.gov.br. Acesso em: 3 de março de 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS – ANP. Resolução N° 14, de 11 de maio de 2012. Disponível em www.anp.gov.br. Acesso em: 3 de março de 2014

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Norma ASTM D6751 de novembro de 2008. Disponível em www.astm.org. Acesso em 10 de março de 2014

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

ANDRADE, D. F. de; 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, n. 6, p. 452 -466, 2011.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS – ABIOVE; AGENCIA NACIONAL DE PETROLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS – ANP. Produção de biodiesel por matéria-prima. Disponível em www.abiove.org.br. Acesso em 6 de abril de 2014

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.** Tese de Mestrado. 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.

BONDIOLI, P. **The Preparation of Fatty Acid Esters by Means of Catalytic Reactions.** Topics in Catalysis, v. 27, p. 77-82, 2004.

BOWMAN, M.; HILLIGOSS, D.; RASMUSSEN, S. **Biodisel: a renewable and biodegradable fuel.** Hydrocarbon Processing, v.88, p. 103-106, 2006

BRAMBILLA, R. **Sílicas funcionalizadas com octadecilsilano pelos métodos sol-gel e crafting.** Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

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.

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

CAMPBELL, M.N. **Biodiesel: algae as a renewable source for liquid fuel.** Guelph Engeneering Journal, v.1, p.1916-1107. 2008.

CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J. **Biodiesel Production via Acid Catalysis.** Trans. ASAE, v. 42, p. 1203-1210, 1999.

CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J. **Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids**. Trans. ASAE, v.4, p.1429-1436, 2001.

CARDOSO, T.C.; **Separação e Isolamento de Acilgliceróis do Biodiesel por Extração em Fase Sólida (EFS) e Caracterização por Cromatografia**. Monografia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

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

CHISTI, Y. **Biodiesel from microalgae**. Biotechnology Advances. v.25, p.294-306, 2007.

CHISTI, Y. **Biodiesel from microalgae beats bioethanol**. Trends in Biotechnology, v.26, p.126-131, 2008

COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION – CEN. Norma EN 14214 de novembro de 2008. Disponível em www.cen.eu. Acesso em 8 de março de 2014.

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

CORDEIRO, C.S.; SILVA, F.R.; WYPYCH, F.; RAMOS, L.P. **Catalisadores Heterogêneos para a Produção de Monoésteres Graxos (biodiesel)**. Quim. Nova, v.34, p.477-486, 2011.

CORDEIRO, C.S.; SILVA, F.R.; MARANGONI, R.; WYPYCH, F.; RAMOS, L.P. **LDHs instability in esterification reactions and their conversion to catalytically active layered carboxylates**. Catalysis Letters, v.142, p. 763-770, 2012

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

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

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

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. **Cromatografia: um breve ensaio.** Química Nova na Escola, n. 7, 1998.

DEMIRBAS, A. **Biodiesel Fuels from Vegetable Oils via Catalytic and Non-Catalytic Supercritical Alcohol Transesterifications and Other Methods: A Survey.** Energy Conv. Managem, v. 44, p. 2093-2109, 2003.

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

DI SERIO, M.; TESSER, R.; PENGMEI, L.; SANTACESARIA, E. **Heterogeneous catalysts for biodiesel production.** Energy Fuels, v. 22, p. 207-217, 2008

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

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

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

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

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

EUROPEAN BIODIESEL BOARDS. Land Use Change Greenhouse Gas Emissions of European Biofuel Policies Utilizing the Global Trade Analysis Project (GTAP) Model, de Agosto de 2013. Disponível em www.ebb-eu.org. Acesso em 15 de abril de 2013.

FERNANDES, T. E. S.; LEITE, D. S. da S. **Desenvolvimento de método para separação e identificação de biodiesel e/ou óleos vegetais em óleo diesel.** Monografia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

FOGLIA, T.A.; JONES, K.C.; NUÑEZ, A.; PHILIPS, J.G.; MITTELBAACH, M. **Comparison of chromatographic methods for the determination of bound glycerol in biodiesel.** Chromatographia, v.60, p.305-311, 2004.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E.H. **Fatty Esters from Vegetable Oils for Use as a Diesel Fuel.** ASAE Publ. 4-82, Vegetable Oil Fuels, p.117-122, 1982.

FREEDMAN, B.; PRYDE, E.H. and MOUNTS, T.L. **Variables Affecting the Yields of Fatty Esters from Tranesterified Vegetable Oils.** Journal of the American Oil Chemists Society. v. 61, p. 1638-1643, 1984.

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

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

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

GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G.; KUBICEK, C. P.; SADLER, J.; XU, F. **Bioenergy Research: Advances and Applications**. Editora Elsevier, Londres, 1ªedição, 2014.

HAAS, M.J.; SCOTT, K.M.; ALLEMAN, T.L.; MCCORMICK, R.L.; **Engine Performance of Biodiesel Fuel Prepared from Soybean Soapstock: A High Quality Renewable Fuel Produced from a Waste Feedstock**. Energy & Fuels, v.15, p.1207-1212, 2001

HAAG, A.L. **Algae bloom again**. Nature, v.447, p.520-521, 2007

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

HÉRON, S.; TCHAPLA, A. **Fingerprints of triacylglycerols from oils and fats by HPLC isocratic elution and evaporative light scattering detection, ELSD**. Sedex 45, Sedere, Alfortville, 1994.

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

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

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

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

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

HOPIA, A.I.; PIIRONEN, V.I.; KOIVISTOINEN, P.E.; HYVONEN, L.E.T. **Analysis of lipid classes by solid-phase extraction and high-performance size-exclusion chromatography,** Journal of the American Oil Chemists' Society, v.69, p. 772-776, 1992.

HOYDONCKX, H.E.; DE VOS, D.E.; CHAVAN, S.A.; JACOBS, P.A. **Esterification and Transesterification of Renewable Chemicals.** Topics in Catalysis, v. 27, p. 83-96, 2004.

JONES, J.; MANNING, S.; MONTOYA, M.; KELLER, K.; POENIE, M. **Extraction of algal lipids and their analysis by HPLC and mass spectrometry.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v 89, p.1371-1381, 2012.

KALO, P.J.; OLLILAINEN, V.; ROCHA, J.M.; VALCATA, F.X. **Identification of molecular species of simple lipids by normal phase liquid chromatography-**

positive electrospray tandem mass spectrometry, and application of developed methods. International Journal of Mass Spectrometry, v.254, p.106-121, 2006.

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

KOMERS, K.; STLOUKAL, R.; MACHEK, J.; SKOPAL, F. **Biodiesel from rapeseed oil, methanol and KOH. 3. Analysis of composition of actual reaction mixture.** European Journal of Lipid Science and Technology, v.103, p.363-371, 2001.

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

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

KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual de biodiesel.** Editora Blücher; São Paulo, 1ª edição, 2006.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE).** Editora Rima, São Carlos, 4ª edição, 2004

LANG, X.; DALAI, A.K.; BAKHSHI, N.N.; REANY, M.J.; HERTZ, P.B. **Preparation and characterization of biodiesel from various bio-oils.** Bioresource. Technology. V.80, p.53-62, 2001

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

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

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

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

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C. **Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos.** Química Nova, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

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

LUE, Y.F.; YEH, Y.Y.; WU, C.H.; **The emission characteristics of a small D.I. diesel engine using biodiesel blends fuels.** Journal of Environmental Science and health. v.36, p.845, 2001

MA, F.; HANNA, M.A. **Biodiesel Production: A Review.** Bioresources Technology, v. 70, p.1-15, 1999.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. **O Estado da Arte da Cromatografia Líquida Ultra Eficiência.** Química Nova, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.** Química Nova, v. 33, n.7, p. 1559-1568, 2010.

MALLICK, N. **Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review.** *BioMetals*, v.15, p.377-390, 2002.

MARSH, G. **Small wonders: biomass from algae.** *Renewable Energy Focus*, v.9, p.74-78, 2009

MCMILLEN, S.; SHAW, P.; JOLLY, N.; GOULDING, B.; FINKLE, V. **Biodiesel: Fuel for Thought, Fuel for Connecticut's Future.** Connecticut Center for Economic Analysis Report. University of Connecticut, 2005

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.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Boletim mensal dos combustíveis renováveis, agosto de 2012. Disponível em www.mme.gov.br. Acesso em 6 de abril de 2014

MITTELBACH, M.; WOERGETTER, M.; PERNKOPF, J.; JUNEK, H. **Diesel fuel derived from vegetable oils: Preparation and use of rape oil methyl ester.** *Energy & Agriculture*, v.2, p.369-384, 1983.

MONYEM, A.; VAN GERPEN, J. **The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions.** *Biomass & Bioenergy*. Vol. 20, p.317-325, 2001

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

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

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

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

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

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

NOUREDDINI, H.; HARKEY, D.; MEDIKONDURU, V. **A Continuous Process for the Conversion of Vegetable Oils into Methyl Esters of Fatty Acids.** Journal of the American Oil Chemistry Society, v. 75, p. 1775-1783, 1998.

OLIVEIRA, F.C.C.; SUAREZ, P.A.Z.; SANTOS, W.L.P. **Biodiesel: Possibilidades e soluções.** Química nova na escola. V. 28, p. 3-8, 2008

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. **Química Orgânica Experimental: Técnicas de escala pequena.** Editora Bookman; Porto Alegre, 2ª edição, 2009.

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

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

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

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

RAMOS, L. P.; **Conversão de óleos vegetais em biocombustível alternativo ao diesel convencional**. Anais do Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, Brasil, 1999.

RAMOS, L.P.; COSTA NETO, P.R.; ROSS, L.F.S.; ZAGONEL, G.F.; **Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras**. Química nova, v.23, p. 531, 2000.

RUIZ, J.; ANTEQUERA, T.; ANDRES, A. I.; PETRON, M. J.; MURIEL, E. **Improvement of a solid phase extraction method for analysis of lipid fractions in muscle foods**. Analytica Chimica Acta, v. 520, p. 201-205, 2004.

RUIZ-GUTIERREZ, V.; PEREZ-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

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

SANTOS, A. P. F.; **Desenvolvimento de métodos para separação e identificação do biodiesel e/ou óleo vegetal no óleo diesel e de aditivos em gasolina**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. World Agricultural Supply and Demand Estimates, Junho de 2014. Disponível em www.usda.gov. Acesso em 5 de abril de 2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. EU Biofuels Annual, Junho de 2012. Disponível em www.usda-france.fr. Acesso em 15 de abril de 2014

U.S. ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION. Monthly Biodiesel Production Report, Junho de 2014. Disponível em www.eia.gov. Acesso em 6 de abril de 2014.

VAN GERPEN, J. **Biodiesel processing and production**. Fuel Processing Technology, v.86, p.1097-1107, 2005

VAN GERPEN, J.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; SHANKS, B.; KNOTHE, G. **Building a successful biodiesel business**. Biodiesel Basics, Dubuque, Iowa, 2006

VERTÈS, A. A.; QURESHI, N.; BLASHEK, H. B.; YUKAWA, H. **Biomass to Biofuels – Strategies for Global Industries**. Editora John Wiley & Sons, Nova Jersey, Estados Unidos, 2010.

ANEXOS

Anexos:

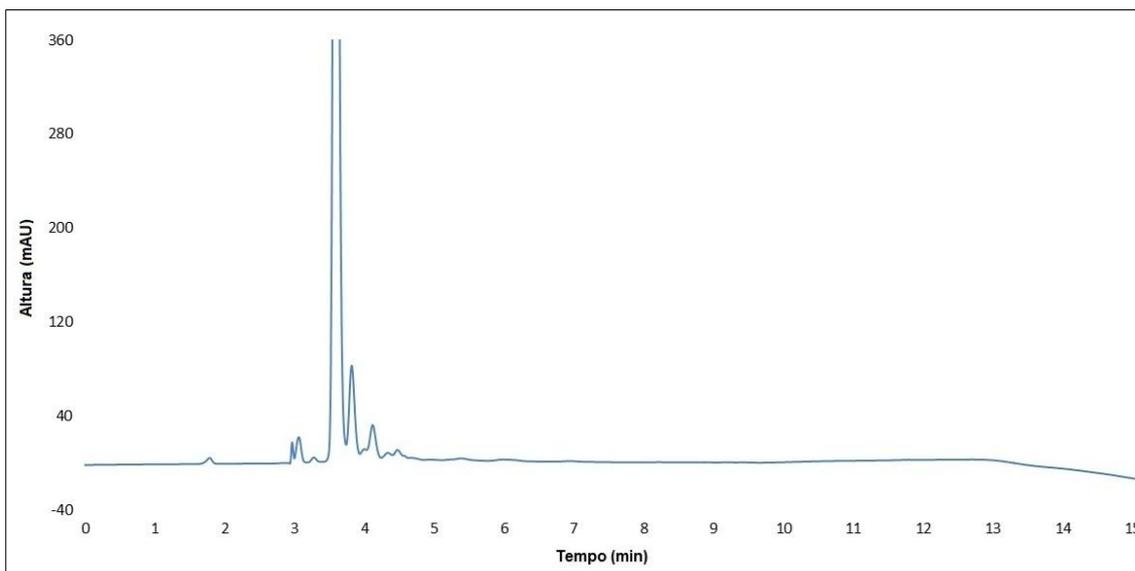


Figura 1: Cromatograma obtido por CLAE-FRNA da solução A (15% (v/v) éter dietílico em éter de petróleo)

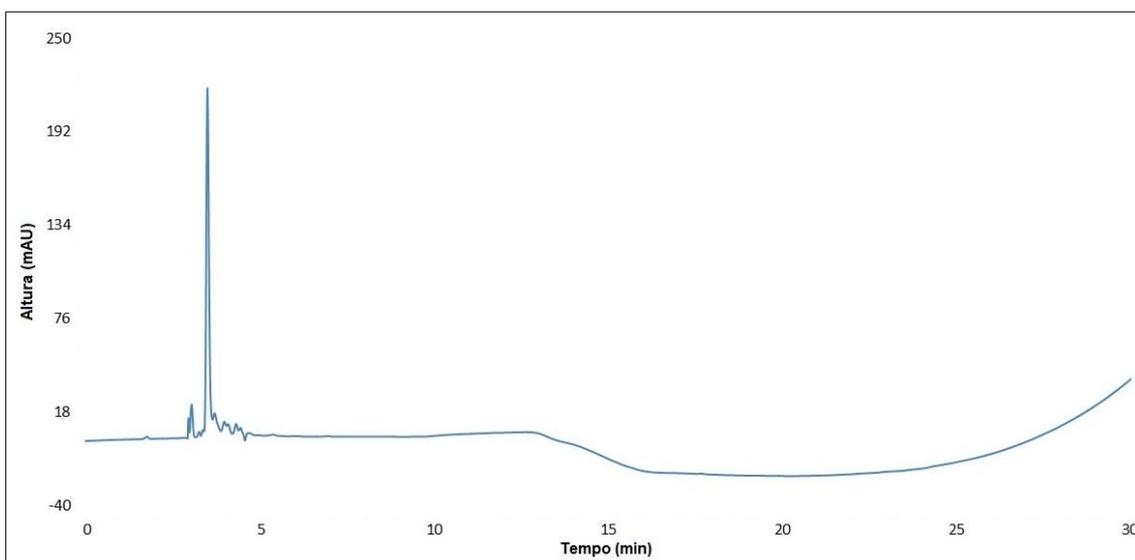


Figura 2: Cromatograma obtido por CLAE-FRNA da solução B (éter dietílico)

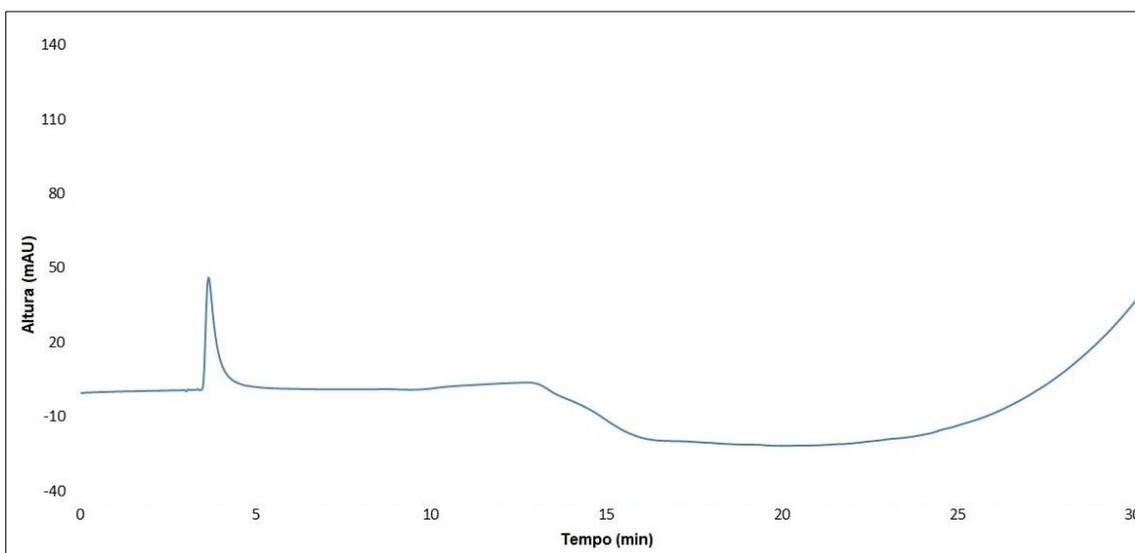


Figura 3: Cromatograma obtido por CLAE-FRNA da solução C (*n*-hexano)

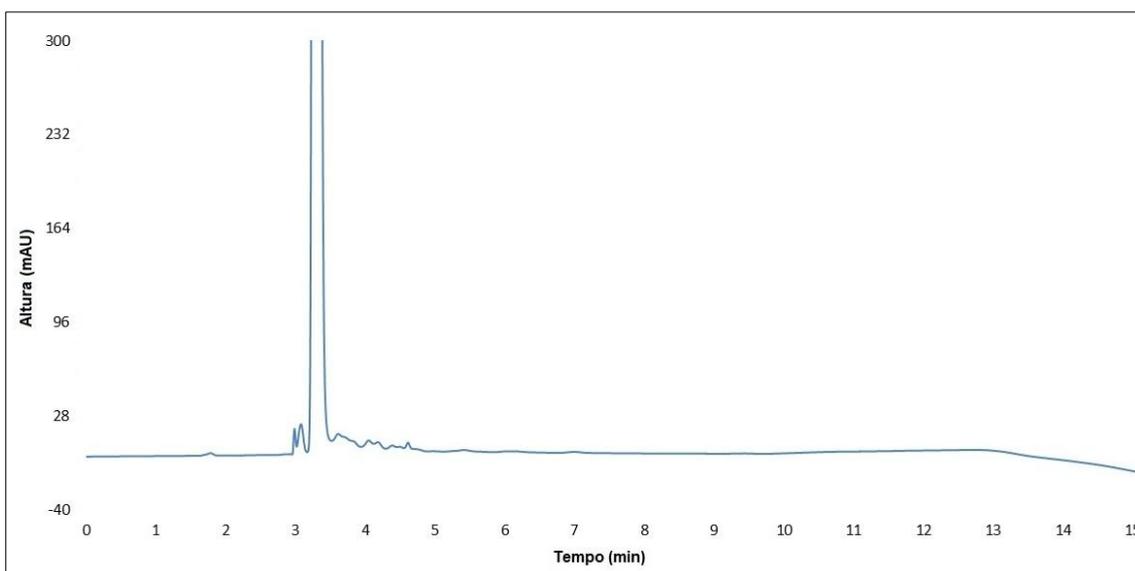


Figura 4: Cromatograma obtido por CLAE-FRNA da solução D (clorofórmio:metanol (2:1)).

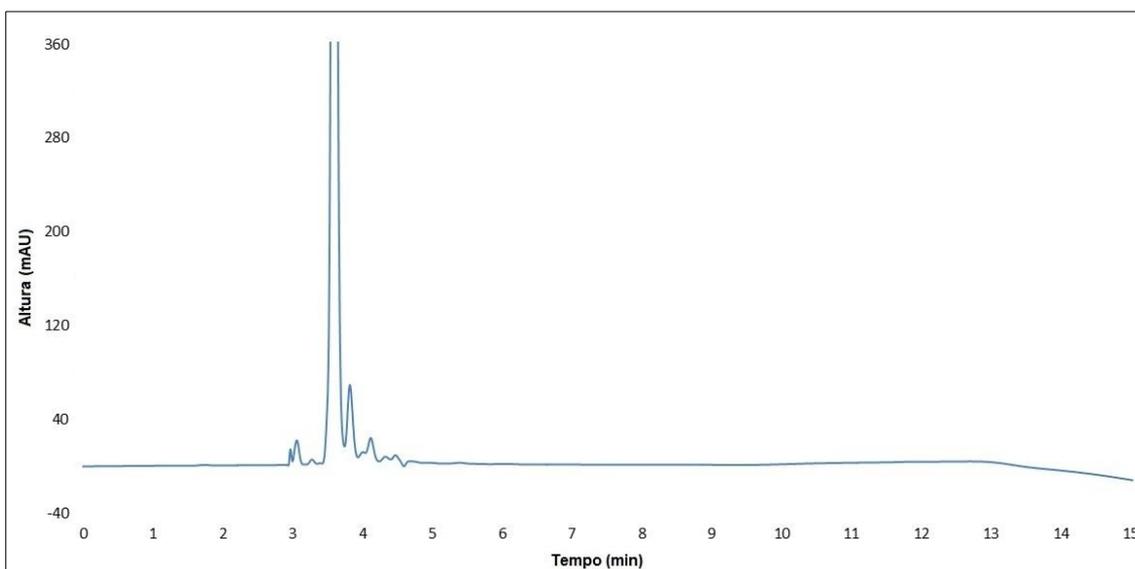


Figura 5: Cromatograma obtido por CLAE-FRNA da solução E (45% (v/v) éter dietílico em éter de petróleo)