



**instituto de química**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA  
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Análise de acilgliceróis e determinação do teor de glicerol total em amostras de biodiesel por métodos enzimáticos e não cromatográficos, após separação e isolamento das principais classes constituintes por extração em fase sólida**

RENAN DE OLIVEIRA MUNIZ

Projeto Final de Curso

ORIENTADORA: Débora França de Andrade (DQA – IQ/UFRJ)

CO-ORIENTADORA: Eliane D'Elia (DQI – IQ/UFRJ)

RIO DE JANEIRO

Setembro/2016

# **Análise de acilgliceróis e determinação do teor de glicerol total em amostras de biodiesel por métodos enzimáticos e não cromatográficos, após separação e isolamento das principais classes constituintes por extração em fase sólida**

**Autor:**

**Renan de Oliveira Muniz**

Projeto final de curso submetido ao Corpo Docente do Curso de Química com atribuições tecnológicas do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Químico com atribuições tecnológicas.

**Orientadora:**

**Débora França de Andrade (DQA – IQ/UFRJ)**

**Co-orientadora:**

**Eliane D'Elia (DQI – IQ/UFRJ)**

**Rio de Janeiro, RJ – Brasil**

**Setembro, 2016**

## CIP - Catalogação na Publicação

M963a Muniz, Renan de Oliveira  
Análise de acilgliceróis e determinação do teor de glicerol total em amostras de biodiesel por métodos enzimáticos e não cromatográficos, após separação e isolamento das principais classes constituintes por extração em fase sólida / Renan de Oliveira Muniz. -- Rio de Janeiro, 2016.  
87 f.

Orientadora: Débora França de Andrade.  
Coorientadora: Eliane D'Elia.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Bacharel em Química, 2016.

1. Biodiesel. 2. Extração em fase sólida. 3. Métodos enzimáticos. 4. Espectrofotometria. 5. Cronoamperometria. I. Andrade, Débora França de, orient. II. D'Elia, Eliane, coorient. III. Título.

# **Análise de acilgliceróis e determinação do teor de glicerol total em amostras de biodiesel por métodos enzimáticos e não cromatográficos, após separação e isolamento das principais classes constituintes por extração em fase sólida**

**Renan de Oliveira Muniz**

Projeto final de curso submetido ao Corpo Docente do Curso de Química com atribuições tecnológicas do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de bacharel em Química com atribuições tecnológicas.

Aprovado por:

---

Débora França de Andrade, D Sc. – IQ/UFRJ  
(Orientadora e Presidente da banca)

---

Eliane D'Elia, D Sc. – IQ/UFRJ  
(Co-orientadora)

---

Emerson Schwingel Ribeiro, D Sc. – IQ/UFRJ

---

Luiz Antonio d'Avila, D Sc. – EQ/UFRJ

---

Fernanda Veronesi Marinho Pontes, D Sc.– IQ/UFRJ

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Setembro, 2016

## **Dedicatória**

Aos meus pais, Ana Maria Oliveira Muniz e Luiz Carlos Muniz, por todo o amor, carinho, apoio, paciência e por não medirem esforços para me proporcionar a melhor educação possível.

À minha madrinha Glória Penha da Silva (*in memoriam*) pelo exemplo de fé, perseverança, alegria e amor pela vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por não me deixar desanimar, principalmente nos momentos em que tudo parecia não dar certo.

Aos meus pais, minha família e familiares, por todo apoio e compreensão, principalmente nos momentos mais difíceis.

Às minhas queridas orientadoras, Débora França de Andrade e Eliane D'Elia, por toda a dedicação e ensinamentos. Por me ajudarem sempre que precisei.

À Cristiane Gimenes, por sempre se mostrar disponível a ficar no laboratório, com muita boa vontade, mesmo quando trabalhávamos até tarde.

À Sheila Barbosa, aluna de mestrado, que muito me ajudou a desenvolver as técnicas e os métodos utilizados. Pela parceria mútua formada, que, acredito eu, permanecerá.

Aos amigos do LABEE, em especial ao Bruno, Daniela, Isabel, Klícia, Patrícia, Sheila, Thayon e Yuri, por nos ajudarmos, trabalhando em conjunto e sempre prezando pela convivência amigável no ambiente de trabalho.

Aos amigos do LABCOM, em especial à Cristiane, João, Mayara, Rafael, Renato e Taís, por nos receberem de portas e braços abertos e pelas interessantes conversas durante o café.

Aos técnicos do LABCOM, pelas análises de CG realizadas.

A todos os amigos do IQ, em especial à Bruna Agonigi, Dandara Martins, Guilherme Priori, Guilherme Barbosa, Jéssica Costa, Kelly Ribeiro, Kleber Jendiroba, Lorena Clair, Mariana Casal, Michelle André, Rodrigo Gomes, Taissa Souza, Thamires Collares, Vinícius Grilo e muitos outros, por serem uma segunda família, dividindo os momentos de alegrias, tristezas e incertezas, sempre nos apoiando, uns aos outros.

Aos professores do IQ pela formação de excelência e por todos os ensinamentos, em especial às profas. Cássia Turci, Lúcia Paiva, Monica Padilha, Paula de Aguiar e aos profs. Emerson Ribeiro, Luiz Malta, Márcio Contrucci e Roberto Marchiori.

À FAPERJ e ao Grupo PSA – Peugeot Citroën pelo incentivo à pesquisa e apoio financeiro.

A todos que participaram, direta ou indiretamente, deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

*A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.*

*Charles Spencer Chaplin*

## RESUMO

### PROJETO DE CURSO

TÍTULO: ANÁLISE DE ACILGLICERÓIS E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GLICEROL TOTAL EM AMOSTRAS DE BIODIESEL POR MÉTODOS ENZIMÁTICOS E NÃO CROMATOGRÁFICOS, APÓS SEPARAÇÃO E ISOLAMENTO DAS PRINCIPAIS CLASSES CONSTITUINTES POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

ALUNO: Renan de Oliveira Muniz

ORIENTADORAS: Débora França de Andrade, DQA – Instituto de Química – UFRJ

Eliane D'Elia, DQI – Instituto de Química – UFRJ

A reação de transesterificação produz uma mistura de ésteres de ácidos graxos (biodiesel). Durante a reação existe, também, a formação de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG), que são intermediários do processo, além de glicerol livre (GL), co-produto da reação e de triacilgliceróis (TAG) que não reagiram por completo. Esses são os principais contaminantes do biodiesel e podem levar a sérios problemas ambientais e operacionais quando utilizados em motores a combustão.

Com o aumento da relevância do biodiesel na matriz energética brasileira, a garantia das propriedades e da qualidade do mesmo é um aspecto chave para o sucesso na sua comercialização e aceitação no mercado. Sendo assim, o estabelecimento de padrões de qualidade que fixam teores dos contaminantes no biodiesel é primordial para se garantir a qualidade do produto final.

Com isso, novas técnicas de análise menos dispendiosas e mais rápidas precisam ser desenvolvidas, sem que haja perda de sensibilidade. Neste projeto, foi utilizada a técnica de extração em fase sólida (EFS), aplicando cartuchos com fase estacionária de aminopropilsilano, para a separação e o isolamento das principais classes constituintes (GL, MAG, DAG e TAG) e ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG).

Como o método de referência, baseado na técnica de cromatografia em fase gasosa, apresenta como desvantagem o alto custo, em virtude do uso de agentes derivatizantes, a proposta inovadora deste projeto consistiu em associar a metodologia de separação por EFS a métodos de detecção simples, eletroquímico e espectrofotométrico, baseados em reações enzimáticas.

Neste projeto, foram utilizadas amostras de biodiesel de diferentes oleaginosas, que foram analisadas pelo método de referências e pelos métodos propostos, após separação por EFS.

Pela avaliação qualitativa da separação, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa Não Aquosa (CLAE-FRNA), pôde-se concluir que houve uma boa separação das amostras, gerando duas frações enriquecidas nos seus principais constituintes (EsMAG e glicerina total), apresentando um bom percentual de recuperação (entre 96,51 e 107,9%) de glicerina total.

Os resultados da análise de glicerina total foram comparados estatisticamente pelo teste t de Student, evidenciando que os métodos propostos geraram resultados estatisticamente semelhantes ao do método de referência, com 95% de confiança.



## ABSTRACT

### FINAL COURSE PROJECT

TITLE: GLYCERIDES ANALYSIS AND DETERMINATION OF TOTAL GLYCEROL CONTENT FOR BIODIESEL SAMPLES BY ENZYMATIC AND NOT CHROMATOGRAPHIC METHODS, AFTER SEPARATIONS AND ISOLATION OF THE MAJOR CONSTITUENTS CLASSES BY SOLID PHASE EXTRACTION

STUDENT: Renan de Oliveira Muniz

ADVISORS: Débora França de Andrade, DQA – Instituto de Química – UFRJ

Eliane D’Elia, DQI – Instituto de Química – UFRJ

The transesterification reaction produces a mixture of fatty acids esters (biodiesel). During the reaction, there is also the formation of monoacylglycerol (MAG) and diacylglycerol (DAG), which are intermediates of the process, besides free glycerol (GL), co-product of the reaction, and triacylglycerol (TAG) which have not reacted completely. These are the major biodiesel contaminants and can lead to serious environmental and operational problems when used in combustion engines.

With the increasing importance of biodiesel in the Brazilian energy matrix, the guarantee of properties and the quality of it is key to success in marketing and market acceptance. Thus, the establishment of quality standards, which set levels of contaminants in biodiesel, is essential to ensure the quality of the final product.

Thereby, new analysis techniques, less expensive and faster, need to be developed, without any loss of sensitivity. In this project, solid phase extraction (SPE) was used, applying cartridges with aminopropylsilane stationary phase, for separation and isolation of the main constituent classes (GL, MAG, DAG and TAG) and fatty acid methyl esters (FAMEs).

As the reference method, based on gas phase chromatography technique, has the disadvantage the high cost, due to the use of derivatizing agents, the innovative proposal of this project was to associate the separation methodology, by SPE, with simple detection methods, electrochemical and spectrophotometric, based on enzymatic reactions.

In this project, biodiesel samples from different kinds of oil were used, which were analyzed by reference and proposed methods, after separation by SPE.

For the qualitative evaluation of separation, by non-aqueous reverse phase high performance liquid chromatography (NARP-HPLC), it can be concluded that there was a good separation of the samples, generating two enriched fractions in its main constituents (FAMEs and Total Glycerin), showing a good total glycerin recovery percentage (between 96,51 and 107,9%).

The results of the total glycerin analysis were statistically compared by the Student’s t test, showing that the proposed method generate statistically similar results to the reference method, with 95% confidence.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Reação geral de uma reação de transesterificação. O álcool empregado para a produção de biodiesel é geralmente metanol ( $R = CH_3$ )	6
<b>Figura 2.</b>	Reações consecutivas reversíveis para a transesterificação dos triacilgliceróis	6
<b>Figura 3.</b>	Classes de componentes presentes em um produto de transesterificação de baixa conversão	13
<b>Figura 4.</b>	Exemplo de reação de saponificação de um glicerídeo (Triacilglicerol)	16
<b>Figura 5.</b>	Reações envolvidas no método iodométrico	16
<b>Figura 6.</b>	Reações enzimáticas envolvidas nos métodos propostos (enzimático colorimétrico e eletroenzimático)	16
<b>Figura 7.</b>	Reações eletroquímicas que ocorrem nos eletrodos	18
<b>Figura 8.</b>	Reação de produção de metóxido de potássio	22
<b>Figura 9.</b>	Representação esquemática do aparato de EFS	24
<b>Figura 10.</b>	Representação esquemática do método de separação do glicerol combinado (MAG, DAG e TAG – F2) dos ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG – F1)	24
<b>Figura 11.</b>	Representação esquemática dos componentes da célula de Clark em vista externa (esquerda) e interna (direita)	31
<b>Figura 12.</b>	Gráfico padrão ilustrando o comportamento da corrente obtido no decorrer da análise	32
<b>Figura 13.</b>	Cromatogramas, obtidos por CLAE-FRNA, de uma amostra de biodiesel de referência (a) antes da etapa de EFS, (b) após a etapa de EFS – Fração 1, (c) após a etapa de EFS – Fração 2 e (d) Fração 2 ampliada, na região de 2 a 5 minutos	36
<b>Figura 14.</b>	Curva analítica obtida pelo método enzimático colorimétrico, para cálculo do teor de glicerol total em biodiesel de referência	41
<b>Figura 15.</b>	Amperogramas das soluções padrão usadas para a construção da curva analítica do biodiesel de referência, obtidos pelo método eletroenzimático, utilizando a célula de Clark	44
<b>Figura 16.</b>	Curva analítica obtida pelo método eletroenzimático, para cálculo do teor de glicerol total em biodiesel de referência	45

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b>	Limites de quantidade (% mássica) de monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis, teor de éster e glicerina livre e total no B100, segundo o regulamento técnico N° 03/2014 contido na Resolução ANP N° 45/2014	8
<b>Tabela 2.</b>	Nomenclatura, fórmula molecular e estrutura química dos ácidos graxos predominantes nos óleos vegetais de algumas oleaginosas de grande produção no Brasil	9
<b>Tabela 3.</b>	Identificação, por CLAE, dos componentes presentes nos produtos de transesterificação	14
<b>Tabela 4.</b>	Valores de massa (g) e volumes finais (mL) das soluções estoque de padrões, em piridina	26
<b>Tabela 5.</b>	Volume de solução estoque de padrão (µL) necessários para o preparo das soluções padrão	27
<b>Tabela 6.</b>	Resultados obtidos, por análise de CG, para o teor de glicerol total antes e após a separação por EFS	39
<b>Tabela 7.</b>	Resultados do teste de Cochran para os dados obtidos pelo método enzimático colorimétrico	40
<b>Tabela 8.</b>	Resultados do teste de Cochran para os dados obtidos pelo método eletroenzimático	40
<b>Tabela 9.</b>	Resultados para o teor de glicerol total obtidos pelo método enzimático colorimétrico	42
<b>Tabela 10.</b>	Comparação entre os teores de glicerol total obtidos pelo método de referência (CG) e pelo método enzimático colorimétrico	43
<b>Tabela 11.</b>	Resultado do teste t, para comparação estatística dos resultados obtidos pelo método de referência (CG) e pelo método enzimático colorimétrico	43
<b>Tabela 12.</b>	Resultados para o teor de glicerol total obtidos pelo método eletroenzimático, utilizando a célula de Clark	46
<b>Tabela 13.</b>	Comparação entre os teores de glicerol total obtidos pelo método de referência (CG), pelo método enzimático colorimétrico e pelo método eletroenzimático	46

## Lista de Equações

<b>Equação 1.</b>	Cálculo do teor de glicerol livre	27
<b>Equação 2.</b>	Cálculo do teor dos acilgliceróis (MAG, DAG e TAG)	27
<b>Equação 3.</b>	Cálculo do teor de glicerol combinado	28
<b>Equação 4.</b>	Cálculo do teor de glicerol total	28
<b>Equação 5.</b>	Cálculo do valor de $C_{\text{calculado}}$ , para o teste de Cochran	35

## Lista de Abreviações

<b>AAP</b>	Aminoantipirina
<b>ADP</b>	Difosfato de Adenosina
<b>AG</b>	Ácidos Graxos
<b>AGL</b>	Ácidos Graxos Livres
<b>A<sub>i</sub></b>	Área do Pico da Substância de Referência
<b>ANP</b>	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
<b>A<sub>s</sub></b>	Área do Pico do Padrão Interno
<b>ASTM</b>	<i>American Society for Testing and Materials</i>
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>B100</b>	Biodiesel Puro
<b>B2</b>	2% de biodiesel em óleo diesel
<b>B3</b>	3% de biodiesel em óleo diesel
<b>B4</b>	4% de biodiesel em óleo diesel
<b>B5</b>	5% de biodiesel em óleo diesel
<b>B6</b>	6% de biodiesel em óleo diesel
<b>B7</b>	7% de biodiesel em óleo diesel
<b>BX</b>	X% de biodiesel em óleo diesel
<b>C18</b>	Grupo Octadecilsilano
<b>CG</b>	Cromatografia em Fase Gasosa
<b>CGAR</b>	Cromatografia em Fase Gasosa de Alta Resolução
<b>CG-DIC</b>	Cromatografia em Fase Gasosa com Detector por Ionização de Chama
<b>CG-EM</b>	Cromatografia em Fase Gasosa com detecção por Espectrometria de Massas
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>DAG</b>	Diacilgliceróis
<b>DAP</b>	Fosfato de Diidroxiacetona
<b>DIC</b>	Detector por Ionização de Chama
<b>EFS</b>	Extração em Fase Sólida
<b>ELL</b>	Extração Líquido-Líquido
<b>EM</b>	Espectrometria de Massas
<b>EsAG</b>	Ésteres de Ácidos Graxos
<b>EsMAG</b>	Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>F1</b>	Fração 1
<b>F2</b>	Fração 2

<b>FIA</b>	Análise por Injeção em Fluxo, do inglês <i>Flow Injection Analysis</i>
<b>FR</b>	Fase Reversa
<b>FRNA</b>	Fase Reversa Não Aquosa
<b>G-3-P</b>	Glicerol-3-fosfato
<b>GK</b>	Enzima Glicerol-quinase
<b>GL</b>	Glicerol Livre
<b>gl</b>	Graus de Liberdade
<b>GPO</b>	Enzima Glicerol-3-fosfato Oxidase
<b>GS</b>	Teor de Acilgliceróis Individuais
<b>GT</b>	Glicerol Total
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>1-L</b>	1-Monolinoleína
<b>2-L</b>	2-Monolinoleína
<b>1,2-LL</b>	1,2-Dilinoleína
<b>1,3-LL</b>	1,3-Dilinoleína
<b>1-Ln</b>	1-Monolinolenina
<b>2-Ln</b>	2-Monolinolenina
<b>1,2-LnLn</b>	1,2-Dilinolenina
<b>1,3-LnLn</b>	1,3-Dilinolenina
<b>1,2-LLn</b>	1,2-Linoleoil-linoleoil-glicerol
<b>1,3-LLn</b>	1,3-Linoleoil-linoleoil-glicerol
<b>LnLnLn</b>	Trilinolenina
<b>LLnLn</b>	Dilinoleoil-linoleoil-glicerol
<b>LLLn</b>	Dilinoleoil-linoleoil-glicerol
<b>LLL</b>	Trilinoleína
<b>Ltd.</b>	Companhia Limitada
<b>MAG</b>	Monoacilgliceróis
<b>MeL</b>	Éster metílico do ácido linoleico
<b>MeLn</b>	Éster metílico do ácido linolênico
<b>MeO</b>	Éster metílico do ácido oleico
<b>MG</b>	Minas Gerais
<b>m<sub>i</sub></b>	Massa da Substância de Referência
<b>m<sub>s</sub></b>	Massa do Padrão Interno
<b>MSTFA</b>	Reagente Derivatizante (N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida)
<b>n</b>	Número de Replicatas
<b>NC</b>	Número Total de Carbono
<b>NCE</b>	Número de Carbono Equivalente

<b>NLD</b>	Número de Ligações Duplas
<b>1-O</b>	1-Monooleína
<b>2-O</b>	2-Monooleína
<b>1,2-OO</b>	1,2-Dioleína
<b>1,3-OO</b>	1,3-Dioleína
<b>1,2-OL</b>	1,2-Oleoil-linoleoil-glicerol
<b>1,3-OL</b>	1,3-Oleoil-linoleoil-glicerol
<b>1,2-OLn</b>	1,2-Oleoil-linolenoil-glicerol
<b>1,3-OLn</b>	1,3-Oleoil-linolenoil-glicerol
<b>OLnLn</b>	Dilinolenoil-oleoil-glicerol
<b>OLLn</b>	Oleoil-linoleoil-linolenoil-glicerol
<b>OLL</b>	Dilinoleoil-oleoil-glicerol
<b>OOLn</b>	Dioleoil-linolenoil-glicerol
<b>OOL</b>	Dioleoil-linoleoil-glicerol
<b>OOO</b>	Trioleína
<b>OOG</b>	Dioleoil-gadoleoil-glicerol
<b>PTFE</b>	Politetrafluoretileno
<b>rpm</b>	Rotações Por Minuto
<b>TAG</b>	Triacilgliceróis
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visível
<b>Δ</b>	Diferença
<b>ΔI</b>	Diferença de Corrente

## Sumário

<b>1.</b>	Introdução.....	1
<b>2.</b>	Objetivo.....	4
<b>2.1.</b>	Objetivo Geral.....	4
<b>2.2.</b>	Objetivos Específicos.....	4
<b>3.</b>	Revisão Bibliográfica.....	5
<b>3.1.</b>	O Biodiesel.....	5
<b>3.2.</b>	Matérias-primas: Óleos e gorduras.....	8
<b>3.3.</b>	A Extração em Fase Sólida.....	9
<b>3.4.</b>	Métodos Cromatográficos Empregados na Análise de Biodiesel.....	11
<b>3.5.</b>	Métodos Não Cromatográficos Empregados na Análise de Biodiesel....	15
<b>4.</b>	Justificativa.....	20
<b>5.</b>	Materiais e Métodos.....	22
<b>5.1.</b>	Produção de Biodiesel.....	22
<b>5.2.</b>	Separação do Glicerol Total por Extração em Fase Sólida.....	23
<b>5.3.</b>	Métodos Cromatográficos de Análise.....	25
<b>5.3.1.</b>	Cromatografia em Fase Gasosa de Alta Resolução (CGAR).....	25
<b>5.3.2.</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa Não Aquosa (CLAE-FRNA) .....	28
<b>5.4.</b>	Métodos Enzimáticos de Análise.....	29
<b>5.4.1.</b>	Solução Enzimática Comercial e Soluções Padrão.....	29
<b>5.4.2.</b>	Método Eletroenzimático (Cronoamperometria).....	30
<b>5.4.3.</b>	Método Enzimático Colorimétrico (Espectrofotometria na Região do UV-Vis) .....	33
<b>5.5.</b>	Comparação entre os Métodos, por Meio do Teste t de Student.	33
<b>5.6.</b>	Comparação de Variâncias pelo Teste de Cochran.....	34
<b>6.</b>	Resultados e Discussão.....	36
<b>6.1.</b>	Separação do Glicerol Total por Extração em Fase Sólida.....	36
<b>6.2.</b>	Quantificação do Teor de Glicerol Total pelo Método de Referência (Cromatografia em Fase Gasosa) .....	38
<b>6.3.</b>	Comparação de Variâncias pelo Teste de Cochran.....	40
<b>6.4.</b>	Quantificação do Teor de Glicerol Total pelo Método Enzimático Colorimétrico.....	41
<b>6.5.</b>	Comparação entre o Método de Referência (CG) e o Método Enzimático Colorimétrico pelo Teste t de Student.....	42
<b>6.6.</b>	Quantificação do Teor de Glicerol Total pelo Método Eletroenzimático.....	44
<b>7.</b>	Conclusões.....	48
<b>8.</b>	Perspectivas Futuras.....	49
<b>9.</b>	Referências Bibliográficas.....	50
<b>10.</b>	Anexos e Apêndices.....	59
<b>Anexo 1</b>	Estruturas Químicas das Substâncias Envolvidas nas Reações Enzimáticas.....	59



<b>Anexo 2</b>	Tabela para Teste de Cochran.....	62
<b>Anexo 3</b>	Cromatogramas, obtidos por CLAE-FRNA, dos solventes utilizados na EFS.....	63
<b>Apêndice A</b>	Cromatogramas, obtidos por CLAE-FRNA, das amostras estudadas.....	64
<b>Apêndice B</b>	Curvas analíticas utilizadas para análise das amostras estudadas, obtidas pelo método enzimático colorimétrico.....	69
<b>Apêndice C</b>	Amperogramas das soluções padrão.....	72
<b>Apêndice D</b>	Curvas analíticas utilizadas para análise das amostras estudadas, obtidas pelo método eletroenzimático.....	73

# 1. Introdução

---

O emprego de derivados de biomassa como combustível remonta ao final do século XIX, quando a *French Otto Company* exibiu, em uma exposição, um motor a diesel funcionando, apropriadamente, com óleo de amendoim como combustível (KNOTHE *et al.*, 2006). Devido ao baixo custo dos combustíveis fósseis, aliado à dependência do setor de transportes em relação ao petróleo, o uso de biomassa somente ganhou importância após a primeira crise petrolífera, na década de 1970, quando se tornou uma fonte expressiva de energia, devido ao seu potencial para produção de combustíveis alternativos, como o biodiesel, que pode ser usado em substituição ou complemento ao diesel de petróleo, não necessitando de nenhuma modificação dos motores baseados no ciclo diesel (KNOTHE, 2002; HAAS *et al.*, 2001; LUE *et al.*, 2001).

O biodiesel é definido como um combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos derivados de fontes renováveis, como gorduras de origem vegetal ou animal (Resolução ANP N° 14, de 11/05/2012 – DOU 18/05/2012), produzido por meio da reação de transesterificação, na qual os triacilgliceróis (TAG) provenientes das gorduras são convertidos em ésteres de ácidos graxos. O biodiesel pode ser utilizado puro (B100) ou misturado ao diesel de petróleo (BX, onde X corresponde à porcentagem volumétrica de biodiesel no diesel de petróleo) (RAMOS *et al.*, 2000). No Brasil, a Lei n° 13.033, de 24 de setembro de 2014 tornou obrigatória a adição de 7%, em volume, de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. No entanto, recentemente, a Lei n° 13.263, de 23 de março de 2016, alterou a Lei n° 13.033 e estabeleceu os seguintes percentuais de adição obrigatória, em volume, de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional: a) 8% (oito por cento) em 2017, b) 9% (nove por cento) em 2018 e c) 10% (dez por cento) em 2019.

O biodiesel apresenta uma série de vantagens frente ao diesel de petróleo, pois é biodegradável, estabelece um ciclo fechado de carbono, ou seja, a quantidade de CO<sub>2</sub> liberada é a mesma consumida pela planta enquanto em fase de crescimento, e reduz significativamente a emissões de enxofre (20%), anidrido carbônico (9,8%), hidrocarbonetos não queimados (35%), material não

particulado (55%), gases causadores do efeito estufa (78 a 100%) e compostos sulfurados e aromáticos (100%) (COLETTI, 2006).

A qualidade do biodiesel pode sofrer variações devido à presença de contaminantes oriundos da matéria-prima, do processo de produção ou formados durante a estocagem do biodiesel. Os principais contaminantes presentes no biodiesel e que podem comprometer a qualidade do produto final são a glicerina livre (GL), principal coproduto, e os monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG), intermediários de reação, e, também, os ácidos graxos. Esses contaminantes podem aumentar a viscosidade do combustível e, com isso, reduzir a eficiência de combustão e causar entupimento do filtro de combustível e depósitos em partes do motor (BOWMAN, *et al.*, 2006).

Para a garantia da qualidade do biodiesel é necessário o estabelecimento de padrões de qualidade, objetivando fixar os teores limites dos contaminantes e o grau de conversão da reação que não prejudiquem a qualidade das emissões da queima, bem como o desempenho, a integridade do motor e a segurança no transporte e manuseio. Sendo assim, o controle da qualidade do biodiesel é primordial para sua comercialização e novos métodos de separação e análise vêm sendo investigadas, com o intuito de buscar métodos mais simples e rápidos, sem perder, logicamente, em sensibilidade (KNOTHE *et al.*, 2006; ANDRADE, 2011).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para a caracterização e análise do biodiesel, sendo a cromatografia em fase gasosa a mais comum (PINTO *et al.*, 2005) e a técnica de referência, segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica que ainda não é muito utilizada para a separação dos constituintes do biodiesel, apesar das vantagens operacionais frente à técnica de CG, como, por exemplo, a não necessidade de derivatização, que torna a análise menos custosa e mais rápida.

Algumas técnicas não cromatográficas vêm sendo propostas para análise de glicerol livre e total em biodiesel, como a espectrofotometria e a cronoamperometria. Estas técnicas estão associadas a reações enzimáticas, que permitem determinar o teor de glicerol livre e total no biodiesel eletroquimicamente, por meio do consumo de oxigênio durante uma reação, e

fotometricamente, por meio da produção de um composto colorido (GREENHILL e GREENHILL, 2004; LUETKMEYER, 2010).

A extração em fase sólida é uma técnica que vem sendo utilizada para separação e isolamento das principais classes de compostos presentes no biodiesel, visando a obtenção de frações enriquecidas nos seus constituintes para simplificar sua caracterização por métodos analíticos (BLATT *et al.*, 2012).

Desta forma, o principal objetivo deste trabalho foi empregar a EFS para a separação e o isolamento das principais classes presentes no biodiesel, acompanhando sua eficiência por CLAE, associado aos métodos enzimáticos, com detecção espectrofotométrica e eletroquímica.

## 2. Objetivos

---

### 2.1. Objetivo Geral

Separação e isolamento das principais classes constituintes do biodiesel (ésteres e glicerol livre, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis), por extração em fase sólida, e posterior quantificação do teor de glicerol total, por métodos enzimáticos com detecção eletroquímica e espectrofotométrica.

### 2.2. Objetivos Específicos

- 1) Empregar a técnica de extração em fase sólida para a separação do glicerol total do biodiesel.
- 2) Acompanhar a eficiência da separação do glicerol total utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência.
- 3) Associar o método de separação com métodos simples de análise para a quantificação do teor de glicerol total.
- 4) Quantificar as frações obtidas por extração em fase sólida, quanto ao teor de glicerol total, pelos métodos eletroenzimático (cronoamperometria) e enzimático colorimétrico (espectrofotometria na região do UV-Vis).
- 5) Comparar o teor de glicerol total, obtido pelos métodos propostos, com o obtido pelo método de referência (cromatografia em fase gasosa).

### 3. Revisão Bibliográfica

---

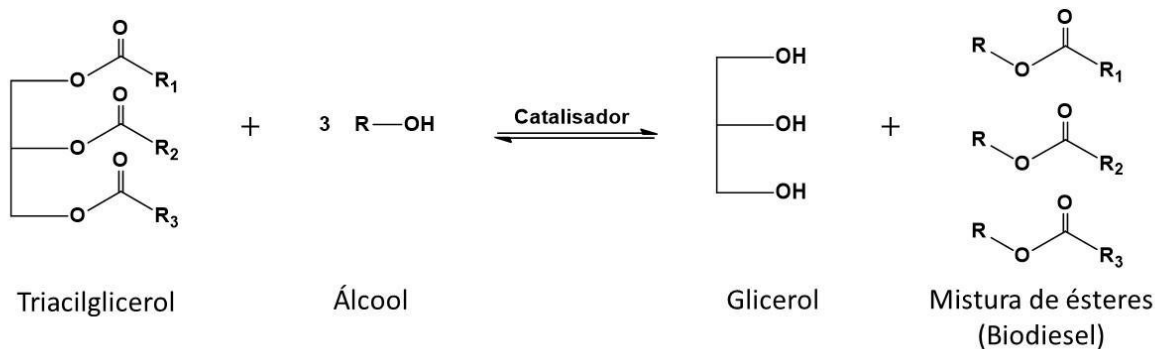
#### 3.1. O Biodiesel

O biodiesel (B100) é definido, segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), como um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal, e que atenda a especificação contida no Regulamento Técnico (Resolução ANP N° 14, de 11/05/2012 – DOU 18/05/2012).

O biodiesel pode ser produzido a partir de óleos vegetais, como soja, dendê, girassol, ou a partir de fontes de gordura animal, como sebo bovino. No Brasil, as principais matérias-primas são a soja e o sebo bovino.

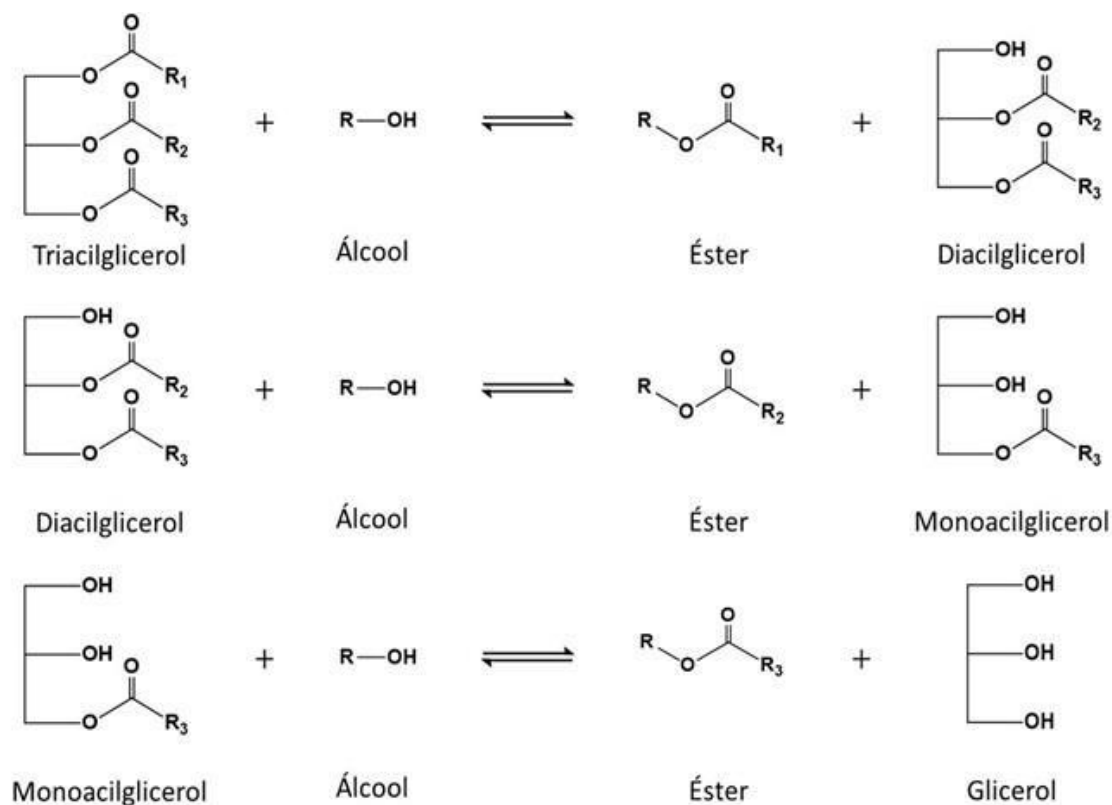
A molécula de óleo vegetal é formada por três ésteres ligados a uma molécula de glicerina, o que faz deste um triacilglicerol (ou triglicerídeo). Um dos processos utilizados para a transformação do óleo vegetal em biodiesel é a reação de transesterificação. A transesterificação é um termo geral usado para descrever uma importante classe de reações orgânicas, onde um éster é transformado em outro, por meio da troca do resíduo alcoxila (GERIS *et al.*, 2007).

A reação de transesterificação (**Figura 1**) dos triacilgliceróis (TAG) de óleos e gorduras de origem vegetal ou animal é, geralmente, praticada com um monoálcool de cadeia curta, tipicamente metanol ou etanol, na presença de um catalisador (ácido, básico ou enzimático), resultando na produção de uma mistura de ésteres, metílicos ou etílicos, de ácidos graxos e glicerol. A princípio, a reação de transesterificação é uma reação reversível. Porém, o glicerol, formado como subproduto da reação global, é praticamente insolúvel no biodiesel, contribuindo fortemente para o deslocamento do equilíbrio no sentido da produção de biodiesel, inibindo a reação reversa (LINS JUNIOR, 2014).



**Figura 1.** Reação geral de uma reação de transesterificação. O álcool empregado para a produção de biodiesel é geralmente metanol (R = CH<sub>3</sub>).

A reação de transesterificação global dos TAG é a soma de três reações consecutivas que produzem ésteres de ácidos graxos (EsAG) de uma das cadeias graxas, em cada etapa. Os TAG reagem com uma molécula de álcool sendo convertidos a diacilgliceróis (DAG), que, por sua vez, reagem com outra molécula de álcool e são convertidos a monoacilgliceróis (MAG) que, finalmente, são convertidos a glicerol, por meio de uma reação com outra molécula de álcool (**Figura 2**). Portanto, os DAG e os MAG são intermediários neste processo.



**Figura 2.** Reações consecutivas reversíveis para a transesterificação dos triacilgliceróis (LUETKMEYER, 2010).

No Brasil, o biodiesel foi introduzido na matriz energética pela Lei N° 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Deste então, a mistura de biodiesel ao óleo diesel passou por seis fases, até chegar a fase atual. Na primeira fase, referente ao período de janeiro de 2006 a dezembro de 2007, a mistura de 2% volumétrica de biodiesel (B2) era facultativa. A partir da segunda fase, que teve início em janeiro de 2008, a mistura de 2% volumétrica de biodiesel (B2) passou a ser obrigatória em todo o território nacional. De julho de 2008 a junho de 2009, a mistura obrigatória de biodiesel aumentou para 3% volumétrica (B3). No período entre julho e dezembro de 2009, a mistura obrigatória passou a ser de 4% volumétrica (B4). De janeiro de 2010 a junho de 2014, ocorreu novo aumento da mistura obrigatória, que passou a ser de 5% volumétrica (B5). Mais uma mudança aconteceu entre julho e outubro de 2014, elevando a mistura obrigatória para 6% volumétrica (B6). Esse percentual foi ampliado, em novembro de 2014, segundo a medida provisória (MP) N° 647/2014, até atingir na fase atual, a mistura obrigatória de 7% volumétrica (B7). Os consecutivos aumentos percentuais para 8% volumétrica, em 2017, 9% volumétrica, em 2018 e 10% volumétrica, em 2019, estão previstos segundo a Lei Federal N° 13.263, de 23 de março de 2016.

A determinação do glicerol residual é um dos critérios para avaliar a eficiência do processo de purificação do biodiesel. Altas concentrações de glicerol no biodiesel provocam problemas de armazenamento, como a separação de fases ao se misturar o biodiesel ao óleo diesel nos tanques de estocagem. Problemas como formação de depósitos, entupimento dos bicos injetores do motor e emissões de aldeídos também estão relacionados com a alta concentração de glicerol no biodiesel (LÔBO, FERREIRA *et al.*, 2009).

A soma da concentração de glicerol livre (GL) com a de glicerol combinado, composto por monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG), é denominada como glicerol total (GT). Segundo o regulamento técnico N° 03/2014 contido na Resolução ANP N° 45/2014, os limites, em porcentagem em massa (% mássica), de MAG, DAG, TAG, EsAG, GL e GT, alguns dos parâmetros da resolução, se encontram na **Tabela 1**.



**Tabela 1.** Limites de quantidade (% mássica) de monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis, teor de éster e glicerina livre e total no B100, segundo o regulamento técnico N° 03/2014 contido na Resolução ANP N° 45/2014.

<b>Característica</b>	<b>Limite</b>
<b>Monoacilgliceróis</b>	0,70 (máx.)
<b>Diacilgliceróis</b>	0,20 (máx.)
<b>Triacilgliceróis</b>	0,20 (máx.)
<b>Teor de éster</b>	96,5 (mín.)
<b>Glicerina Livre</b>	0,02 (máx.)
<b>Glicerina total</b>	0,25 (máx.)

### 3.2. Matérias-primas: Óleos e gorduras

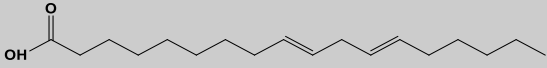
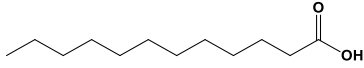
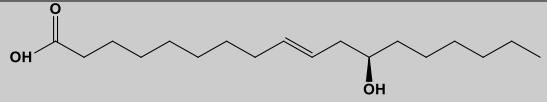
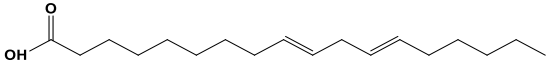
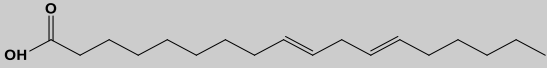
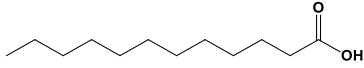
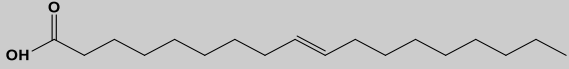
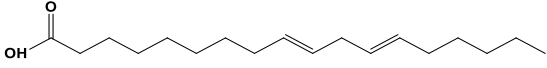
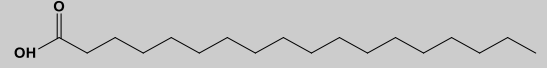
Os óleos e gorduras, de origem animal ou vegetal, são matérias primas hidrofóbicas, formados predominantemente por TAG, tri-ésteres de ácidos graxos (AG) com glicerol, com menores concentrações dos outros constituintes (MAG, DAG e AG). Os AG possuem cadeias longas monocarboxiladas, saturadas ou insaturadas, tendo, predominantemente, de 12 a 26 átomos de carbono (LINS JUNIOR, 2014).

Cada tipo de óleo e gordura possui variados tipos de AG, que diferem em sua predominância, os quais possuem propriedades químicas diferentes, sendo o fator deliberativo das características químicas e físicas de cada óleo.

A definição do óleo a ser utilizado na produção de biodiesel depende da abundância da oleaginosa na região. A União Europeia, detentora da maior produção mundial de biodiesel, utiliza óleo de canola como matéria-prima, enquanto o Brasil e os Estados Unidos, utilizam, principalmente, óleo de soja como matéria-prima. Além dos óleos de colza e soja, também são bastante utilizados os óleos de algodão, girassol, amendoim, milho e palma na produção mundial de biodiesel (LINS JUNIOR, 2014).

Na **Tabela 2** são apresentados alguns óleos, de grande produção no Brasil, que podem ser empregados na produção de biodiesel, com a respectiva nomenclatura, fórmula molecular e estrutura química de seus ácidos graxos predominantes.

**Tabela 2.** Nomenclatura, fórmula molecular e estrutura química dos ácidos graxos predominantes nos óleos vegetais de algumas oleaginosas de grande produção no Brasil.

Óleo	Ácido Graxo	Fórmula Molecular	Estrutura Química
Soja	Ácido linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$	
Babaçu	Ácido láurico	$C_{12}H_{24}O_2$	
Mamona	Ácido ricinoléico	$C_{18}H_{34}O_3$	
Girassol	Ácido linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$	
Algodão	Ácido linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$	
Dendê (Palma)	Ácido láurico	$C_{12}H_{24}O_2$	
Canola	Ácido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$	
Milho	Ácido linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$	
Sebo Bovino	Ácido esteárico	$C_{18}H_{36}O_2$	

### 3.3. A Extração em Fase Sólida

A Extração em Fase Sólida (EFS) é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia líquida clássica, na qual se emprega uma pequena coluna aberta contendo a fase estacionária, designada cartucho (LANÇAS, 2004). Esta técnica foi introduzida em substituição às desvantagens apresentadas pela extração líquido-líquido (ELL), pois possui as seguintes vantagens: a) não ocorre formação de emulsões (RUIZ-

GUTIÉRREZ, PÉREZ-CAMINO, 2000); b) os tempos de análise são reduzidos; c) menor consumo de solvente; d) o analito é manipulado menos vezes; e) possui facilidade de automação do processo (LANÇAS, 2004); f) alto percentual de recuperação do analito (JARDIM, 2010) e g) volume reduzido de resíduos.

A EFS apresenta como desvantagens o tempo elevado de análise, os altos custos dos cartuchos, que são utilizados uma única vez, e dos dispositivos multivias (*manifold*) e, possivelmente, a dificuldade em selecionar o adsorvente adequado para a aplicação desejada (JARDIM, 2010).

A superfície da sílica é composta por grupamentos silanóis (Si – OH) e siloxano (Si – O – Si) (BRAMBILLA, 2007), que podem ser quimicamente modificados, com o intuito de imobilizar compostos orgânicos. Atualmente, essa alteração química é feita por meio de radicais metila (– CH<sub>3</sub>), octila (– C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>), octadecila (– C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>) e fenila (– C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) (PAVIA *et al.*, 2009) e esses derivados de sílica são empregados em cromatografia líquida, principalmente em cromatografia em fase reversa, e cartuchos para EFS.

A utilização da EFS para a separação e o isolamento de lipídios neutros e polares vem sendo descrita na literatura, empregando 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).

Uma vez que as fases estacionárias empregadas na EFS são similares àquelas empregadas em cromatografia líquida em coluna, os mecanismos de separação também são similares. Materiais como sílica gel, alumina, silicato de magnésio, carvão ativado, polímeros e fases baseadas em sílica quimicamente ligadas são amplamente empregadas em EFS. Dependendo da natureza do grupo ligado à sílica, ou copolímero, a fase poderá ser classificada como não polar, polar ou trocador de íons (LANÇAS, 2004).

Em 2011, ANDRADE, MAZZEI e d'ÁVILA desenvolveram uma metodologia de separação entre ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG) e glicerol total (GL, MAG, DAG e TAG) de amostras biodiesel de diferentes oleaginosas e graus de conversão, utilizando a EFS, com cartuchos de fase estacionária constituído de aminopropilsilano. Neste trabalho, a caracterização das frações obtidas após extração foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa não aquosa (CLAE – FRNA), com detector UV a 205 nm. A eluição dos EsMAG foi

realizada utilizando-se n-hexano como solvente. Já o glicerol total foi eluído com uma mistura de clorofórmio:metanol, na proporção 2:1 em volume. Isto permitiu avaliar a separação das frações e se verificou que a EFS obteve alta recuperação, o que permitiu a separação do biodiesel dos contaminantes estudados.

### 3.4. Métodos cromatográficos empregados na análise de biodiesel

Alguns métodos cromatográficos estão sendo empregados na análise de biodiesel, dentre os quais pode se destacar a cromatografia em fase gasosa (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 cromatografia líquida de alta eficiência (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 resolução vigente utiliza a cromatografia em fase gasosa de alta resolução (CGAR) para a análise dos teores de EsAG e GL, assim como dos teores residuais de MAG, DAG e TAG, de acordo com as normas ASTM D6584 e EN 14105 (LÔBO, FERREIRA, 2009). Neste método há a necessidade de uma etapa de derivatização, onde ocorre modificação dos grupos funcionais polares responsáveis pelo aumento do ponto de ebulição, formando derivados voláteis e termicamente estáveis, mais adequados para análise por cromatografia gasosa, na qual se utiliza o reagente silanizante MSTFA (N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida) e, também, para quantificação, há a necessidade de padronização interna, utilizando-se 1,2,4-butanotriol, para a quantificação de GL, e tricaprina, para a quantificação de MAG, DAG e TAG. Soluções padrão com monooleína, dioleína e trioleína também são utilizadas para a obtenção dos tempos de retenção e da região do cromatograma, onde são verificados os picos referentes aos constituintes do glicerol combinado (MAG, DAG e TAG) presentes na amostra. Este método exige um longo tempo de resfriamento do injetor e a temperatura do forno, de aproximadamente 380 °C, não é adequada para o biodiesel derivado de algumas sementes oleaginosas, tais como de amendoim e de crambe, pois estas contêm cadeias longas de TAG. Além disso, nos picos

presentes no cromatograma não ocorre diferenciação entre MAG e DAG quando o biodiesel é de rota metílica (PRADOS *et al.*, 2012).

Em 2012, Dias *et al.* propuseram um método para a determinação simultânea de acilgliceróis, GL e GT, em biodiesel de ésteres etílicos de óleo de mamona, utilizando cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG – DIC) e cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG – EM).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é apontada como alternativa ao método por CG na análise de biodiesel por apresentar uma série de vantagens em relação a este, como, por exemplo, não necessitar de procedimentos de derivatização, possuir um tempo reduzido de análise, a capacidade de quantificar componentes não voláteis e operação em temperaturas baixas, o que diminui o risco de isomerização das ligações duplas presentes nos ácidos graxos (AG), possibilitando a análise de componentes termicamente instáveis (NETO, NUNES, 2003; CZAUDERNA, KOWALCZYC, 2001; LI *et al.*, 2001).

Em 2004, Foglia *et al.*, fizeram uma comparação entre CLAE e CG na análise de acilgliceróis em biodiesel. Os resultados obtidos pelos dois métodos não apresentaram diferenças significativas, entretanto, o método de CG apresentou algumas desvantagens quando comparado ao método de CLAE, como 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.

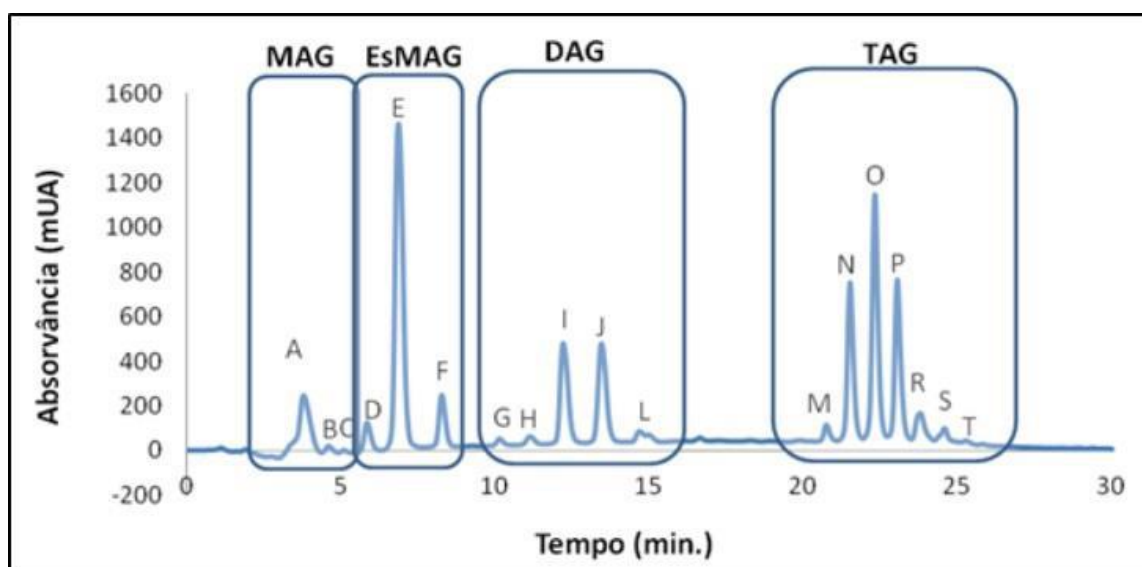
As análises por CLAE são realizadas, geralmente, em colunas que possuem a fase estacionária compactada em coluna de aço inoxidável, com diâmetro interno variando entre 0,45 e 2,2 cm e com comprimento variando entre 10 e 30 cm, dependendo do objetivo da separação. O detector mais empregado é o detector de absorção no ultravioleta (UV), porém, também são utilizados detectores de fluorescência, de índice de refração e eletroquímicos. Entretanto, é necessário que se utilize solventes transparentes na região de 200 a 220 nm e com alto grau de pureza, pois os acilgliceróis e os EsMAG não absorvem em comprimentos de onda maiores que 220 nm (HOLCAPEK *et al.*, 1999; HOLCAPEK *et al.*, 2001; HÉRON, TCHAPLA, 1999). A principal desvantagem da detecção UV é a não quantificação de compostos saturados (HOLCAPEK *et*

*al.*, 1999), sendo que, por outro lado, a detecção a 205 – 210 nm pode fornecer curvas analíticas lineares e com sensibilidade elevada (GEERAERT, DESCHEPPER, 1983).

Em 1999, Holcapek *et al.* empregaram a CLAE – FR na separação EsMAG, MAG, DAG e TAG dos ácidos oleico, linoleico e linolênico, assim como os ácidos graxos livres (AGL).

Em 2011, Andrade *et al.*, desenvolveram um método utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa não aquosa (CLAE-FRNA) para a determinação da conversão e caracterização dos principais constituinte do biodiesel (EsMAG, GL, MAG, DAG e TAG). Neste estudo, foi empregada uma coluna cromatográfica com fase estacionária de octadecilsilano (C18), utilizando, como fase móvel, um gradiente de metanol e *iso*-propanol:*n*-hexano (5:4, volumétrica), com detecção por UV, a 205 nm.

A **Figura 3** ilustra a separação dos MAG, EsMAG, DAG e TAG presentes em um produto de transesterificação de baixa conversão, sendo esta a ordem de eluição, com resolução analítica entre os constituintes de diferentes números de carbono equivalente (NCE), tornando factível a utilização de CLAE no monitoramento da qualidade do biodiesel.



**Figura 3.** Classes de componentes presentes em um produto de transesterificação de baixa conversão (ANDRADE, MAZZEI, d'AVILA, 2011).

A partir da **Figura 3** podemos verificar a região de cada uma das classes de constituintes dos produtos de transesterificação, assim como os constituintes pertencentes a cada uma dessas classes (ver **Tabela 3**).

**Tabela 3.** Identificação, por CLAE, dos componentes presentes nos produtos de transesterificação (adaptado de ANDRADE, 2011).

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

*NCE. Número de carbono equivalente ( $NCE = NC - 2 \times NLD$ , onde:  $NC$  é o número total de carbono e  $NLD$  é o número de ligações duplas);  $MAG$ . Monoacilgliceróis;  $EsMAG$ . Ésteres metílicos de ácidos graxos;  $DAG$ . Diacilgliceróis e  $TAG$ . Triacilgliceróis*

A CLAE-FRNA foi empregada em estudos para a caracterização de misturas biodiesel:diesel (BX), bem como na identificação de adulterações por óleos vegetais, desde que o BX seja submetido a uma etapa prévia de EFS para separar o diesel do biodiesel, e de frações enriquecidas nas principais classes de constituintes presentes no biodiesel ( $EsAG$  e  $GL$ ,  $MAG$ ,  $DAG$  e  $TAG$ ), empregando a cromatografia líquida em coluna para separação e isolamento desses constituintes (FERNANDES, LEITE, 2013; BLATT, 2014).

Resultados da literatura empregando a cromatografia de exclusão por tamanho (DARNOKO, CHERYAN *et al.*, 2000; MADRAS, KOLLURU *et al.*, 2004; ARZAMENDI, ARGUINARENA *et al.*, 2006; KITTIRATTANAPIBOON e KRISNANGKURA, 2008) têm demonstrado a possibilidade de separação e análise simultânea de  $MAG$ ,  $EsAG$ ,  $DAG$ ,  $TAG$  e até ácidos graxos livres ( $AGL$ ), em uma única corrida cromatográfica de cerca de 12 minutos.

### 3.5. Métodos não cromatográficos empregados na análise de biodiesel

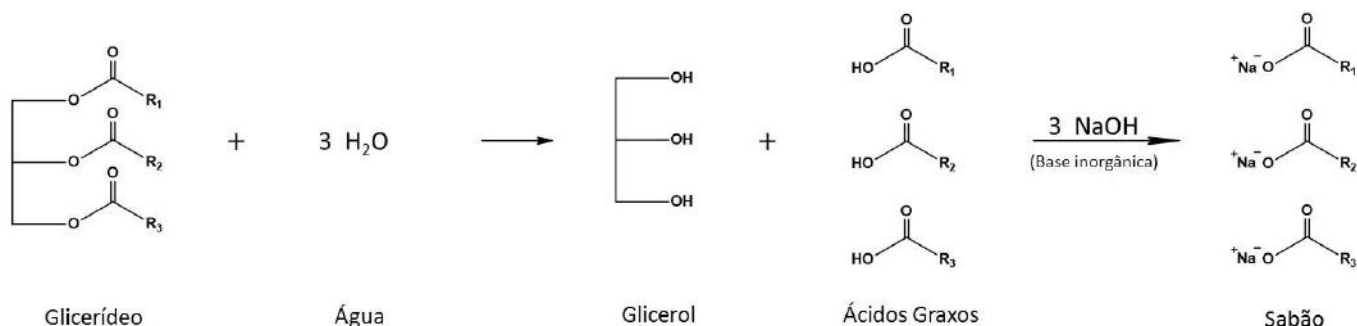
Os métodos analíticos não cromatográficos também vêm sendo descritos na literatura para a análise de glicerol livre e total. Dentre estes métodos, podemos destacar a iodometria, a cronoamperometria e a espectrofotometria.

Uma estratégia empregada é a oxidação do glicerol livre com ácido periódico, resultando em ácido fórmico e aldeído fórmico, em reação ilustrada na **Figura 5**, reação 2. A concentração de glicerol livre é calculada com base no resultado da titulação do ácido fórmico, obedecendo à estequiometria da reação de oxidação. Segundo Mittelbach, este método não possui sensibilidade suficiente para a quantificação do glicerol livre em biodiesel (LÔBO, FERREIRA *et al.*, 2009).

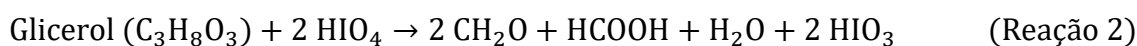
O glicerol total pode ser quantificado por iodometria. Neste caso, uma amostra de biodiesel é previamente saponificada para liberação de todo o glicerol que se encontra na forma de glicerídeos, em seguida o meio é acidificado, para neutralização completa dos sabões. O glicerol extraído na fase aquosa é, então, oxidado com excesso de ácido periódico. O ácido periódico remanescente é,



então, titulado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio (LÔBO, FERREIRA *et al.*, 2009). As reações envolvidas no método iodométrico são apresentadas nas **figuras 4 e 5**.

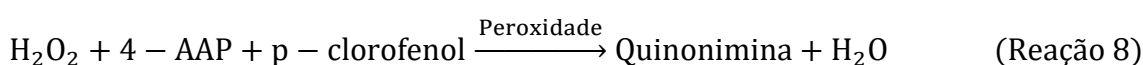


**Figura 4.** Exemplo de reação de saponificação de um glicerídeo (Triacilglicerol). (Reação 1)



**Figura 5.** Reações envolvidas no método iodométrico (Adaptado de FARIA, 2005).

Em 2004, um método utilizando análise fotométrica com reações enzimáticas foi desenvolvido pela empresa Sigma Aldrich Co (GREENHILL e GREENHILL, 2004) especialmente para amostras de biodiesel, e permite determinar o seu teor de glicerol livre e total. Em algumas amostras, a presença de produtos voláteis (solventes utilizados como aditivos) pode causar interferência na determinação do glicerol livre. As reações enzimáticas envolvidas neste método são apresentadas na **Figura 6**.



**Figura 6.** Reações enzimáticas envolvidas nos métodos propostos (SOUZA *et al.*, 2013).

Os acilgliceróis (MAG, DAG e TAG) são convertidos em glicerol e ácidos graxos livres em uma reação catalisada por uma enzima lipase (Reação 5, **Figura 6**). O glicerol formado, na presença de trifosfato de adenosina (ATP) e da enzima glicerol-quinase (GK), produz difosfato de adenosina (ADP) e glicerol-3-fosfato (G-3-P) (Reação 6, **Figura 6**) que, na presença da enzima glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) e oxigênio, é convertido a fosfato de diidroxiacetona (DAP) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Reação 7, **Figura 6**). Finalmente, na presença de uma enzima peroxidase, p-clorofenol (Aceptor de oxigênio) e 4-aminoantipirina (4-AAP), são formados a água e uma quinonimina (Reação 8, **Figura 6**), um composto colorido, que pode ser determinado espectrofotometricamente (SOUZA *et al.*, 2013). As estruturas químicas das substâncias envolvidas nas reações enzimática encontram-se nas figuras 1 a 8, do Anexo 1.

É possível, também, determinar o consumo do oxigênio produzido durante a reação enzimática em uma célula eletroquímica, por cronoamperometria, conforme pode ser visto na reação 7 (**Figura 6**), utilizando-se, para isso, uma célula eletroquímica de oxigênio do tipo Clark, a qual gera uma corrente catódica, proporcional à concentração de oxigênio presente na solução. Este tipo de análise já foi feito em outros tipos de matrizes, como amostras comerciais de tabaco e bebidas (KELLY e CHRISTIAN, 1984; MONTOYA, MARCH *et al.*, 1993; SOUZA *et al.*, 2013).

A cronoamperometria é uma técnica eletroanalítica que se baseia na oxidação ou redução da espécie eletroativa que se deseja determinar aplicando-se um potencial fixo ao eletrodo, com o monitoramento da corrente com o tempo. Durante o processo, é criado um gradiente de concentração através das reações redox na superfície do eletrodo e, quando se atinge o estado estacionário, não ocorre mais variação da corrente com o tempo. Em suma, a cronoamperometria estuda a variação da corrente com o tempo, onde um potencial fixo é aplicado com o intuito do aparecimento da reação redox (BRETT, 1998; AMADO, 2010).

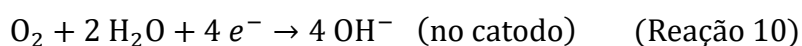
Em 2005, Wu e Cheng utilizaram, para determinação do glicerol, um sistema convencional de análise por injeção em fluxo (FIA), empregando-se um capilar com as enzimas GK e GPO co-imobilizadas, que permite um baixo custo e melhor sensibilidade e seletividade do método. Neste caso, o peróxido de hidrogênio produzido pela reação enzimática 3 (Figura 4) foi monitorado

amperometricamente em uma célula eletroquímica, utilizando um eletrodo de trabalho de platina polarizado em um potencial (+0,65 V<sub>Ag/AgCl</sub>) de modo a oxidar o peróxido de hidrogênio formado a oxigênio molecular. Este tipo de análise também foi feita para determinação de triglicerídeos utilizando-se um biossensor amperométrico construído a partir de uma membrana de acetato de celulose, na qual foram imobilizadas três enzimas: uma lipase comercial, a glicerol-quinase e a glicerol-3-fostato oxidase, sobre o eletrodo de trabalho de platina (MINAKSHI e PUNDIR, 2008).

A célula eletroquímica de oxigênio do tipo Clark é um dos dispositivos mais utilizados na determinação de oxigênio dissolvido em solução. Seu uso pode ser aplicado em diferentes campos, tais como na área ambiental, no controle de qualidade de vinhos e cervejas, na fermentação alcoólica de bactérias e no tratamento de efluentes.

O eletrodo consiste em um disco de platina (catodo), circundado por um anel de prata (anodo), ambos imersos em uma solução saturada de algum eletrólito (KCl, por exemplo) e separados da solução a ser analisada por uma membrana de Teflon, permeável ao oxigênio. Quando um potencial de, aproximadamente, 0,7 V é aplicado entre os eletrodos, o oxigênio dissolvido na solução é reduzido sobre a superfície do eletrodo de platina, negativo em relação ao eletrodo de prata, havendo um fluxo de corrente, cuja intensidade varia linearmente com a concentração de oxigênio na amostra (LUETKMEYER, 2010).

As reações eletroquímicas que ocorrem nos eletrodos estão apresentadas na **Figura 7**.



**Figura 7.** Reações eletroquímicas que ocorrem nos eletrodos (LUETKMEYER, 2010).

A principal vantagem deste eletrodo em relação aos outros tipos de sensores eletroquímicos é a utilização de uma membrana permeável ao oxigênio. Esta membrana separa o ambiente reacional dos eletrodos, evitando problemas de contaminação da solução ou mesmo o envenenamento dos eletrodos, eventos

possíveis quando os eletrodos ficam em contato com a solução teste (LUETKMEYER, 2010).

O método enzimático com detecção amperométrica, utilizando a célula de Clark, mostrou uma excelente correlação linear ( $R^2 = 0,9990$ ) em uma faixa de concentração de  $6,25 \times 10^{-5}$  a  $6,25 \times 10^{-4}$  % (m/v), os limites de detecção e quantificação foram  $1,0 \times 10^{-5}$  % e  $3,0 \times 10^{-5}$  % (m/v), respectivamente. O tratamento estatístico dos dados da curva analítica indicaram variâncias homogêneas da resposta com a variação da concentração do analito, o que caracteriza um comportamento homocedástico (LUETKMEYER, DOS SANTOS *et al.*, 2010).

O método enzimático com detecção espectrofotométrica mostrou uma ótima correlação linear ( $R^2 = 0,9937$ ), com resposta linear na faixa de concentração de  $4,95 \times 10^{-5}$  a  $3,96 \times 10^{-4}$  % em massa e limites experimentais de detecção e quantificação de  $7,10 \times 10^{-6}$  a  $2,10 \times 10^{-5}$  % em massa, respectivamente. O tratamento estatístico dos dados da curva analítica também indicaram variâncias homogêneas de resposta com a variação da concentração do analito, o que caracteriza um comportamento homocedástico (DA CAL VALDEZ, AMADO, *et al.*, 2012).

## 4. Justificativa

---

Nas últimas décadas, a busca por combustíveis alternativos que prometem uma correlação harmoniosa com o desenvolvimento sustentável, passou a ser destaque e cientistas de todo o mundo têm explorado diversas fontes alternativas de energia. Uma dessas mudanças foi a inserção do biodiesel na matriz energética brasileira, em 2005, por meio da Lei nº 11.097, a partir da obrigatoriedade de sua adição ao óleo diesel. Desde então, ficou estipulado o crescente incremento da concentração mínima de biodiesel no óleo diesel vendido ao consumidor, visando reduzir a importação do diesel derivado de petróleo. A Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014 tornou obrigatória a adição de 7%, em volume, de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. Sendo assim, atualmente todo o óleo diesel comercializado no país possui um percentual mínimo de 7% de biodiesel (B7). Recentemente, a Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016, alterou a Lei nº 13.033 e estabeleceu os seguintes percentuais de adição obrigatória, em volume, de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional: a) 8% (oito por cento) em 2017, b) 9% (nove por cento) em 2018 e c) 10% (dez por cento) em 2019. Como as propostas futuras são de aumentar esse percentual, existe hoje uma preocupação com a qualidade do biodiesel. A ANP estabelece por meio da Resolução ANP nº 45/2014 as especificações do biodiesel a ser comercializado.

O teor de glicerina total (soma do teor de glicerina livre e de glicerina combinada) no biodiesel é um indicador da qualidade deste combustível. Níveis altos de glicerina e acilgliceróis no biodiesel podem causar problemas de entupimento nos motores, além de diminuir a estabilidade deste produto durante o seu armazenamento. O limite máximo de glicerina total aceito no biodiesel está definido pela Resolução ANP Nº 45, 2014 e pelas normas EN 14214 e ASTM D6751, que estabelecem a cromatografia em fase gasosa como o método a ser empregado para tal determinação.

O método de referência, baseado na cromatografia em fase gasosa (ASTM D6584, 2013), empregado, pela ANP, para a determinação de MAG, DAG e TAG presente no biodiesel, utiliza o reagente silanizante MSTFA (*N*-metil-*N*-

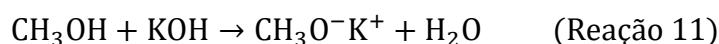
trimetilsilil-trifluoroacetamida) para a etapa de derivatização. A padronização interna é feita com 1,2,4-butanotriol para a quantificação da glicerina livre e com tricaprina para a quantificação dos MAG, DAG e TAG. Os métodos padronizados por CG, ASTM D6584 (2013) e EN14105 (2011), utilizam procedimentos de derivatização demorados e dispendiosos. Devido a isso, torna-se necessária a investigação de métodos alternativos para tais determinações. Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi a associação do método de separação por EFS aos métodos enzimáticos com detecção colorimétrica e amperométrica, utilizando kits enzimáticos comerciais, que são empregados nas análises de triacilgliceróis em sangue, visando um método de caracterização e quantificação simples, rápido e eficiente.

## 5. Materiais e Métodos

---

### 5.1. Produção de Biodiesel

As amostras de biodiesel de diferentes oleaginosas (soja, milho, canola e girassol) foram produzidos segundo procedimento descrito por Miranda e Moura, 2014. Utilizando uma capela, dissolveu-se 1,0 g de hidróxido de potássio (KOH) da Vetec, grau PA, em 35 mL de metanol (Vetec, grau PA), em um béquer de 100 mL, com o auxílio de agitação até dissolução completa do KOH. Nesta etapa, ocorreu a formação de uma solução de metóxido de potássio, conforme mostrado na **Figura 8**.



**Figura 8.** Reação de produção de metóxido de potássio.

Foram adicionados 100 mL de óleo comercial de diferentes oleaginosas em um balão de fundo redondo de 250 mL, com posterior adição de um agitador magnético ao mesmo. Posteriormente, o balão foi aquecido, em banho-maria, até temperatura de 45°C, quando se adicionou a solução de metóxido de potássio previamente preparada. Em seguida, a mistura reacional foi mantida aquecida a 45°C, sob forte agitação, por uma hora.

A mistura reacional foi transferida para um funil de separação e deixada em repouso por 24 horas, quando se observou a formação de duas fases: a superior, contendo o biodiesel, e a inferior, contendo glicerol, sabões e o excesso de base e álcool. A fase inferior foi recolhida em proveta de 100 mL.

Adicionou-se, ao funil contendo a fase restante, 25 mL de solução aquosa de ácido clorídrico 10%, deixando em repouso por 15 minutos. A fase aquosa foi removida e o processo de lavagem foi repetido com outros 25 mL ácido clorídrico 10%. Em seguida, foi realizada lavagem duas vezes com 20 mL de solução saturada de NaCl e uma vez com água destilada. A ausência do catalisador básico foi confirmada medindo-se o pH da última água de lavagem, que deve ser neutra.

Para secar o biodiesel, a solução obtida foi transferida para um erlenmeyer e se adicionou  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro (agente dessecante) e se aguardou 15 minutos. Posteriormente, a mistura foi filtrada e a fração obtida (biodiesel) foi transferida para uma proveta, para ter seu volume medido. O biodiesel obtido apresentou aspecto límpido, com coloração amarela.

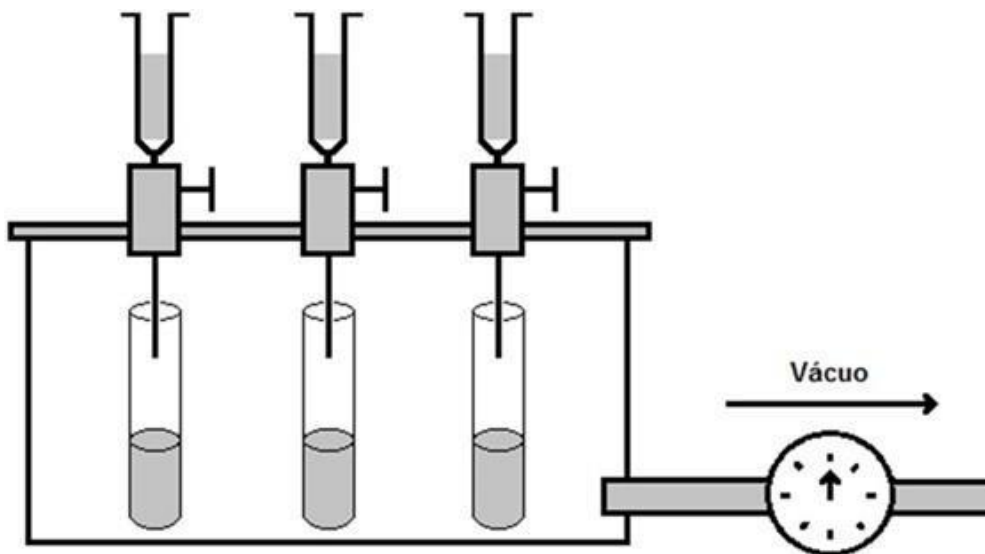
## 5.2. Separação do Glicerol Total por Extração em Fase Sólida

A separação do glicerol total (GL, MAG, DAG e TAG) presentes nas amostras de biodiesel foi realizada segundo procedimento adaptado dos trabalhos de ANDRADE, MAZZEI, d'AVILA, 2011 e LINS JUNIOR, 2014.

O procedimento utilizado permitiu a separação entre EsMAG e glicerina total (GL, MAG, DAG e TAG) do biodiesel B100, por EFS, utilizando cartuchos de 3 mL, contendo 500 mg de aminopropilsilano, da marca SiliCycle Ultra Pure (Quebec, Canadá), com tamanho de partícula variando entre 40 e 63  $\mu\text{m}$  e 60 Å de diâmetro de poro.

Para realizar as separações por EFS foi utilizado um dispositivo multivias (*manifold*), acoplado a uma bomba de vácuo da Prismatec, modelo 121 (Itu, São Paulo – Brasil), onde os cartuchos de aminopropilsilano foram acoplados e submetidos a vácuo, sob uma vazão de, aproximadamente, 1 mL/min e cada fração foi coletada em um tubo de ensaio com tampa rosqueável diferente. Na **Figura 9** se encontra uma representação esquemática que ilustra o aparato de extração em fase sólida.

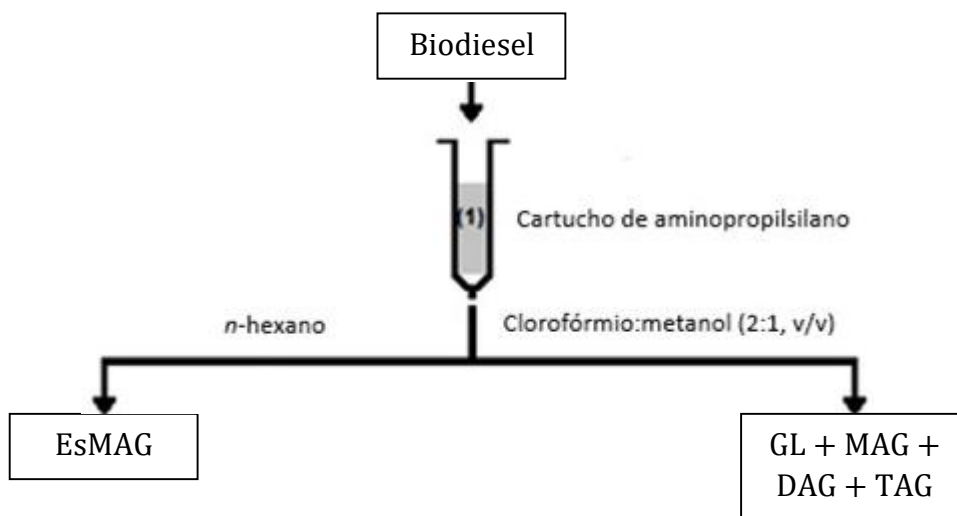




**Figura 9.** Representação esquemática do aparato de EFS (Adaptado de LANÇAS, 2004).

Os cartuchos utilizados nas separações foram previamente condicionados com duas porções de 2 mL de *n*-hexano, totalizando 4 mL. Todas as transferências volumétricas realizadas nas etapas de EFS foram feitas utilizando pipetas automáticas de volume variável (20-200  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L e 500-5000  $\mu$ L), da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha). Após o condicionamento dos cartuchos, foi aplicada uma alíquota de 100  $\mu$ L da amostra de biodiesel (B100), contendo EsMAG, GL, MAG, DAG e TAG, e a mesma foi submetida a vácuo.

A separação do biodiesel (EsMAG) de seus principais contaminantes (GL, MAG, DAG e TAG) foi realizada em uma etapa de EFS como apresentado na **Figura 10**.



**Figura 10.** Representação esquemática do método de separação do glicerol combinado (MAG, DAG e TAG – F2) dos ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG – F1).

A fração 1 (F1), constituída majoritariamente por EsMAG, foi eluída com 3 mL, aplicados de 1 em 1 mL, de *n*-hexano (Tedia, grau HPLC) e coletada em um tubo de ensaio. A fração 2 (F2), constituída majoritariamente por GL, MAG, DAG e TAG, foi eluída com 8 mL, aplicados de 2 em 2 mL, de uma solução de clorofórmio:metanol (2:1, v/v) (Vetec, grau PA) e, também, coletada em um tubo de ensaio. Ambas as frações foram evaporadas até *secura*, sob fluxo lento de gás nitrogênio.

As separações por EFS foram realizadas em triplicata e todas as amostras foram analisadas pelo método de referência (cromatografia em fase gasosa, de acordo com a resolução da ANP), pela cromatografia líquida de alta eficiência, para o acompanhamento da separação por EFS e pelos métodos enzimáticos propostos com detecção amperométrica e espectrofotométrica.

### 5.3. Métodos Cromatográficos de Análise

#### 5.3.1. Cromatografia em Fase Gasosa de Alta Resolução (CGAR)

As análises de MAG, DAG, TAG, glicerol livre e glicerol total foram realizadas segundo a norma ASTM D6584, em um cromatógrafo a gás da Shimatzu, modelo GC-2010, com o forno de coluna nas seguintes condições: 50 °C (1 min); 15 °C/min, até 180 °C; 7 °C/min, até 230 °C e 30 °C/min, até 380 °C, mantido por 10 min. Foi utilizada uma coluna Elite-5HT, de 15 m de comprimento por 0,32 mm de diâmetro interno e 0,10 µm de fase estacionária. Se utilizou, como gás de arraste, hélio, a uma vazão constante de 3 mL/min. A detecção foi por ionização de chama, com o detector a uma temperatura de 380 °C e os gases hidrogênio e ar a uma vazão de, respectivamente, 45 mL/min e 450 mL/min. O solvente de lavagem utilizado foi o *n*-heptano (Vetec, grau PA).

As amostras foram tratadas de acordo com o seguinte procedimento: Em frascos de 10 mL, foram pesados, aproximadamente, 100 mg de amostra (ou

solução padrão), sendo esta massa registrada. Em seguida, foram adicionados 100 µL dos padrões interno butanotriol (Sigma-Aldrich, grau de pureza > 99%) e tricaprina (Sigma-Aldrich, grau de pureza > 99%) e 100 µL da solução derivatizante MSTFA (Sigma-Aldrich, grau de pureza > 99%). Após, a mistura permaneceu em repouso por 20 minutos, à temperatura ambiente, e se adicionou 8 mL de *n*-heptano (Vetec, grau PA), vedando-se e agitando-se o frasco logo em seguida. Posteriormente, foi injetado 1 µL da amostra derivatizada diretamente na coluna, utilizando um injetor a frio (ASTM D6584, 2010).

As curvas analíticas foram preparadas com as massas de padrão listadas na **Tabela 4**, produzindo soluções estoque, em piridina, com os volumes listados na mesma tabela, de acordo com a norma ASTM D6584, de 2010.

**Tabela 4.** Valores de massa (g) e volumes finais (mL) das soluções estoque de padrões em piridina (ASTM D6584, 2010).

Componente	Massa aproximada (mg)	Volume final das soluções, em piridina (mL)
<b>Glicerina</b>	25	50
<b>Monooleína</b>	50	10
<b>Dioléina</b>	50	10
<b>Trioléina</b>	50	10
<b>Butanotriol</b>	25	25
<b>Tricaprina</b>	80	10

Em seguida, foram preparadas cinco soluções padrão, transferindo os volumes das soluções estoque listados na **Tabela 5** para frascos de vidro de 10 mL. Os volumes contidos nesses frascos foram submetidos ao mesmo tratamento das amostras, segundo procedimento descrito neste mesmo item, também de acordo com a norma ASTM D6584, de 2010.

**Tabela 5.** Volume de solução estoque ( $\mu\text{L}$ ) necessários para o preparo das soluções padrão (ASTM D6584, 2010).

<i>Número da solução padrão</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
<b>Volume de Glicerol (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	10	30	50	70	100
<b>Volume de Monooleína (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	20	50	100	150	200
<b>Volume de Dioleína (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	10	20	40	70	100
<b>Volume de Trioleína (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	10	20	40	70	100
<b>Volume de Butanotriol (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	100	100	100	100	100
<b>Volume de Tricaprina (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	100	100	100	100	100

A partir das soluções padrão preparadas, se construíram as curvas analíticas, que foram utilizadas para correlacionar a razão das áreas da substância de referência ( $A_i$ ) pelas áreas dos seus respectivos padrões internos ( $A_s$ ) com a razão das massas das substâncias de referência ( $m_i$ ) pelas massas dos respectivos padrões internos ( $m_s$ ), sendo que o padrão interno do glicerol é o butanotriol e o padrão interno dos acilgliceróis (MAG, DAG e TAG) é a tricaprina.

Os cálculos dos teores de glicerina livre, dos acilgliceróis, individualmente e de glicerina combinada e total, foram realizados, conforme a norma ASTM D6584 (2010), utilizando as **Equações 1, 2, 3 e 4**, respectivamente.

$$GL = (m_s/a_i) \left[ \left( \frac{A_i}{A_s} \right) - b_i \right] (100/m)$$

**Equação 1.** Cálculo do teor de glicerol livre.

Onde: GL é o teor de glicerol livre na amostra;  $m_s$  é a massas do padrão interno (butanotriol), em mg;  $a_i$  é o coeficiente angular da curva analítica de glicerol;  $A_i$  é a área do pico do glicerol;  $A_s$  é a área do pico do padrão interno (butanotriol);  $b_i$  é o coeficiente linear da curva analítica de glicerol; e  $m$  é a massa da amostra, em mg.

$$GS = (m_s/a_i) \left[ \left( \frac{A_i}{A_s} \right) - b_i \right] (100/m)$$

**Equação 2.** Cálculo do teor dos acilgliceróis (MAG, DAG e TAG)

Onde: GS é o teor de acilgliceróis individuais na amostra;  $m_s$  é a massa do padrão interno (tricaprina), em mg;  $a_i$  é o coeficiente angular da curva analítica da monooleína, dioleína ou trioleína;  $A_i$  é a área do pico do acilglicerol individual;  $A_s$  é a área do pico do padrão interno (tricaprina);  $b_i$  é o coeficiente linear da curva analítica da monooleína, dioleína ou trioleína; e  $m$  é a massa da amostra, em mg.

$$GC = \sum GS_{MAG} + GS_{DAG} + GS_{TAG}$$

**Equação 3.** Cálculo do teor de glicerol combinado.

Onde:

$$GS_{MAG} = 0,2591 \times \sum \text{Monoacilgliceróis (\% mássica), determinado na Equação 2}$$

$$GS_{DAG} = 0,1488 \times \sum \text{Diacilgliceróis (\% mássica), determinado na Equação 2}$$

$$GS_{TAG} = 0,1044 \times \sum \text{Triacilgliceróis (\% mássica), determinado na Equação 2}$$

$$\text{Glicerol Total} = \text{Glicerol Livre} + \text{Glicerol Combinado}$$

**Equação 4.** Cálculo do teor de glicerol total

### 5.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa Não Aquosa (CLAE-FRNA)

As análises por CLAE-FRNA foram realizadas, segundo procedimento descrito por ANDRADE, 2011 e ANDRADE, MAZZEI e d'ÁVILA, 2011, em um equipamento da Thermo Scientific (Massachussetts, EUA), modelo UHPLC Ultimate 3000, composto por uma bomba quaternária, modelo Dionex Ultimate 3000, um detector por varredura de espectro na região do ultravioleta, modelo Dionex UVD 170/340 UV/PDA e um injetor automático, modelo WPS-3000, com alça de amostragem de 100  $\mu$ L. Foi utilizada uma coluna Thermo Scientific AcclaimTM, de 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, com

fase octadecilsilano (C18) de 5 µm de tamanho de partícula e com 120 Å de diâmetro de poro. A fase móvel utilizada foi composta por metanol (A) e uma mistura de *iso*-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v) (B), ambas submetidas a um banho de ultrassom por 30 min antes da utilização.

As análises foram realizadas a uma temperatura de 40 °C (temperatura do forno de coluna), com uma vazão de 1 mL/min e detecção UV ao comprimento de onda de 205 nm. Um gradiente binário com duas rampas lineares foi empregado: 0% a 50% B de 0 a 15 min, seguido de 50% a 100% B até 25 min de corrida e, então, por eluição isocrática, ou seja, com a composição da fase móvel inalterada, com 100% B por mais 5 min. O tempo total de corrida foi de 40 minutos. Todas as amostras foram previamente filtradas em membrana politetrafluoretileno (PTFE) da Millipore (Bedford, EUA), com 0,45 µm de poro, antes da injeção. Todas as amostras analisadas por CLAE-FRNA foram diluídas a 3% volumétrica (30 µL da amostra e 970 µL da mistura de solventes *iso*-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v)) e injetadas em triplicata, em um volume de injeção de 10 µL (ANDRADE, 2011; ANDRADE, MAZZEI, d'ÁVILA, 2011).

## 5.4. Métodos Enzimáticos de Análise

### 5.4.1. Solução enzimática comercial e soluções padrão

#### a) Kit enzimático comercial

As reações enzimáticas foram realizadas utilizando uma solução enzimática comercial, pronta para uso, da Interkit (Belo Horizonte, MG – Brasil). O kit enzimático é composto por: **a) Reagente enzimático** - 1 frasco com 200 mL de solução aquosa contendo tampão Pipes 50 mmol/L pH 7,00; cloreto de magnésio 4 mmol/L; p-clorofenol 2,70 mmol/L (acceptor de oxigênio); 4-aminoantipirina 0,3 mmol/L; ATP 1,8 mmol/L; lipase lipoproteica ≥ 1.400 U/L; glicerol quinase ≥ 1.000 U/L; glicerol-3-fosfato oxidase ≥ 1.500 U/L; peroxidase ≥ 900 U/L; e azida sódica 0,95 g/dL e **b) Padrão** - 1 frasco com 5,0 mL de padrão, contendo glicerol 2,6

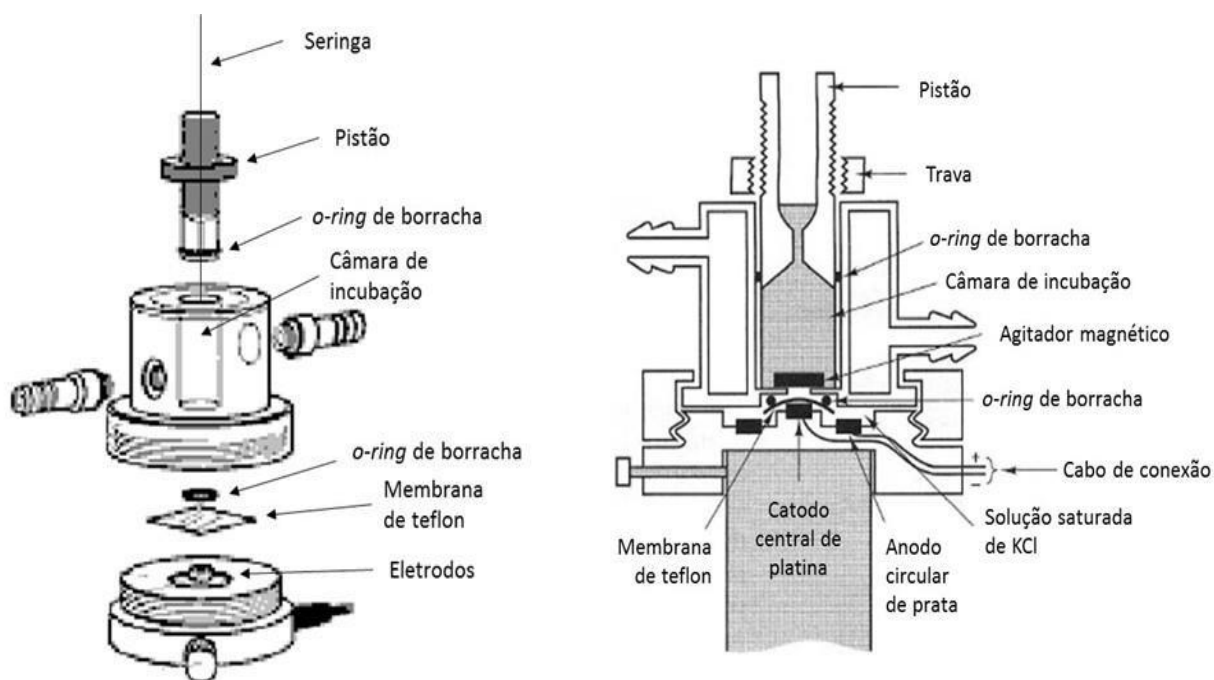
mmol/L, equivalente a 200 mg/dL ou 0,208% em massa de triglicerídeos, em solução aquosa e azida sódica 0,1 g/dL.

#### b) Soluções padrão para construção de curva analítica

As curvas analíticas foram construídas com soluções padrão de concentrações diferentes (0,0078 % mássica, 0,0104 % mássica, 0,0130 % mássica, 0,0156 % mássica, 0,0182 % mássica e 0,0208 % mássica), a partir da diluição do padrão incluso do kit enzimático comercial em etanol 99,9% (Vetec).

#### 5.4.2. Método Eletroenzimático (Cronoamperometria)

Neste método, adaptado de SOUZA *et al*, 2013, foi utilizada uma célula de oxigênio do tipo Clark, importado da Rank Brothers Ltd. (Cambridge, Reino Unido) e todas as medidas cronoamperométricas foram realizadas em um potenciostato Autolab PGSTAT128N da Metrohm (Utrecht, Holanda). Esta célula é constituída por um disco central de platina (catodo) e um anel de prata (anodo) imersos em uma solução saturada de KCl (eletrólito), que ficam separados do compartimento superior, na qual se situa a câmara de incubação, onde ocorre a reação, por uma membrana de teflon, usualmente de 12,7  $\mu\text{m}$ , permeável somente ao oxigênio. Os componentes da célula de Clark estão representados na **Figura 11**.



**Figura 11.** Representação esquemática dos componentes da célula de Clark em vista externa (esquerda) e interna (direita) (adaptado de Rank Brothers Ltd. 2002).

A limpeza dos eletrodos foi realizada a cada 40 leituras, primeiramente polindo os eletrodos com alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) e algodão e, posteriormente, lavando-os com água destilada. Em seguida, adicionou-se, aproximadamente, 1 mL de solução saturada de cloreto de potássio ( $3 \text{ mol L}^{-1}$ ) cobrindo-se toda a superfície dos eletrodos. Sobre a solução eletrolítica ( $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ ), colocou-se, com o auxílio de uma pinça, um círculo de papel de seda, de tamanho suficiente para cobrir os eletrodos e, sobre este papel, colocou-se um círculo de membrana de teflon, com tamanho semelhante, sem que houvesse bolhas de ar entre o papel e a membrana. Por fim, a célula foi fechada de modo que o o-ring de borracha ficasse com um estreito contato com o acrílico do compartimento superior, atuando como um componente de vedação.

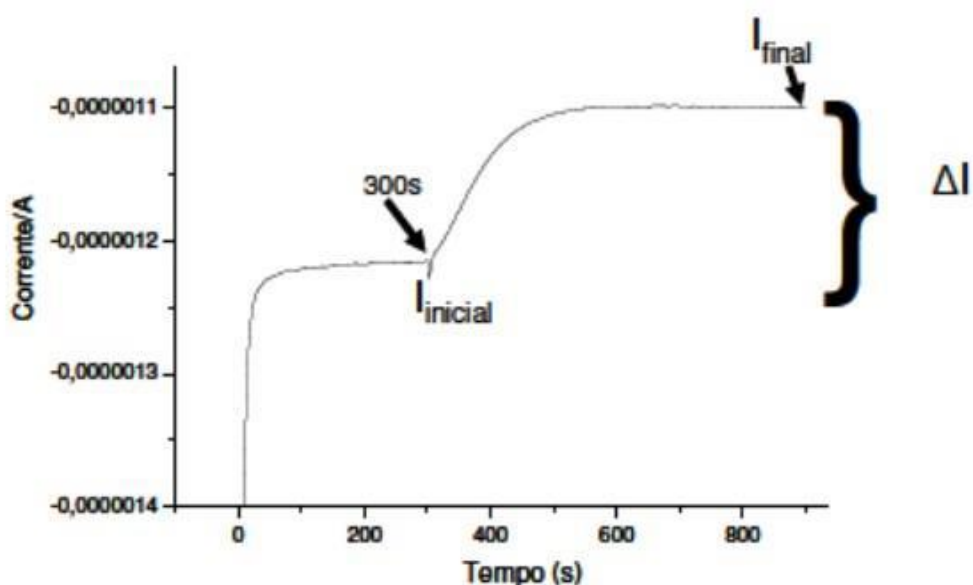
Para as medidas cronoamperométricas, adicionou-se 3 mL da solução enzimática comercial, da marca Interkit (Belo Horizonte, MG – Brasil) que foi submetida, com o auxílio de um agitador magnético, a uma agitação de 600 rpm, a fim de manter um gradiente estável de oxigênio sobre a membrana.

Após a estabilização da corrente, referente à concentração de oxigênio dissolvido na solução enzimática, em, aproximadamente 300 s, foi adicionada uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  da solução padrão ou da fração F2 de biodiesel,



contendo o glicerol total, que se desejar analisar, por meio de uma micro seringa de 250  $\mu\text{L}$  da Agilent (Califórnia, EUA).

Após o tempo total de análise, 1200 s para as soluções padrão e 1600 s para as frações de biodiesel, ocorreu a estabilização da corrente e obteve-se um amperograma, ilustrado pela **Figura 12**, onde se observa dois patamares de corrente: o primeiro, referente à concentração de oxigênio dissolvido na solução enzimática e o segundo, relativo à concentração de oxigênio remanescente após a adição do padrão ou amostra, contendo glicerol.



**Figura 12.** Gráfico padrão ilustrando o comportamento da corrente obtido no decorrer da análise (LUETKMEYER, 2010).

A diferença de corrente entre os dois patamares relaciona-se com a concentração de oxigênio consumido na reação enzimática, que, por sua vez, está relacionada com a concentração de glicerol presente na amostra. Assim, é possível correlacionar a diferença de corrente com a quantidade de oxigênio consumida na reação enzimática, mediante curva analítica construída com as soluções padrão descritas no item 5.4.1 e, finalmente, com o teor de glicerol presente na amostra.

### 5.4.3. Método Enzimático Colorimétrico (Espectrofotometria na Região do UV-Vis)

O procedimento, adaptado de SOUZA *et al*, 2013, consistiu em adicionar 1 mL do kit enzimático comercial da Interkit (Belo Horizonte, MG – Brasil) para cada 10 µL da amostra da fração F2 (constituída majoritariamente por GL, MAG, DAG e TAG), solubilizada em etanol. Sendo assim, se adicionou, em um tubo de ensaio, 4 mL do kit enzimático e 40 µL da solução etanólica da amostra, agitando o tubo em *vórtex*, por 2 s. Em seguida, o produto da reação foi adicionado a uma cubeta, previamente rinsada com o mesmo, para leitura das medidas de absorvância, realizadas a um comprimento de onda de 505 nm, em espectrofotômetro da Hach, modelo DR 5000 (Colorado, EUA). A correlação entre a absorvância obtida e o teor de glicerol total foi feita mediante curva analítica construída com as soluções padrão descritas no item 5.4.1, de acordo com a lei de Lambert-Beer. Todas as medidas de absorvância das soluções padrão foram realizadas em triplicata, onde todos os valores de absorvância foram plotados na mesma curva analítica.

### 5.5. Comparação entre os Métodos pelo Teste t de Student

Quando se deseja estudar se há diferenças entre dois métodos, na ocasião da realização dos ensaios, existem duas situações: a) **amostras independentes**, quando os dados são coletados de tal maneira que as observações não são relacionadas umas às outras e b) **amostras dependentes** (normalmente, chamadas de pareadas), quando uma mesma amostra é analisada por dois métodos diferentes (LOPES, 2007).

No caso de amostras independentes, é necessário fazer, primeiramente, o teste F, a fim de verificar se as variâncias das amostras podem ser consideradas iguais; no caso de amostras dependentes, não é necessária a aplicação deste teste. Em quaisquer dessas situações, os resultados são comparados por meio do teste t, de Student (LOPES, 2007).

Neste projeto, desejou-se comparar os resultados da quantificação de GT. Primeiramente, com os resultados obtidos pelo método de referência (CG) e o método enzimático colorimétrico em 6 amostras e, em seguida, entre os resultados obtidos pelo método de referência (CG) e o método eletroenzimático em 2 amostras. Deste modo, as amostras, neste trabalho, podem ser consideradas dependentes, não sendo, portanto, necessária a aplicação do teste F.

O teste t de Student é um teste de hipóteses, utilizado para avaliar as diferenças entre as médias de dois grupos. Para tanto, consulta-se uma a tabela com valores de t, determinados através do tamanho da amostra e do nível de confiança, usualmente 95%, com que se deseja determinar o intervalo no qual a média da população se encontra. O valor de t tabelado é comparado com o valor de t calculado, e, se o valor de t calculado for menor que o valor de t tabelado ( $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ ), pode-se afirmar, com 95% de confiança, ou qualquer outro nível que se deseje, que os métodos podem ser considerados equivalentes (FERNANDES, 2004).

Neste trabalho, para a comparação estatística dos métodos propostos com o método de referência, aplicou-se o **Teste t: duas amostras em par para médias**, aplicado no programa Microsoft Excel 2013, retornando os valores de t tabelado (t crítico) e t calculado (Stat t) automaticamente.

## 5.6. Comparação de Variâncias pelo Teste de Cochran

O teste de Cochran é utilizado para verificar a uniformidade das variâncias obtidas para cada valor de concentração distinto na reta analítica e deve ser realizado antes da construção da mesma. É fundamental que as variâncias se apresentem homogêneas em torno da reta, o que corresponde a um comportamento homocedástico. Essa condição é determinada por meio da **equação 5**.

O procedimento baseia-se em 2 etapas:

Primeiramente, se calcula o valor do parâmetro C ( $C_{\text{calculado}}$ ), por meio da **equação 5**:

$$C_{\text{calculado}} = \frac{s_{\text{máx.}}^2}{\sum_{i=1}^n s_i^2}$$

**Equação 5.** Cálculo do valor de  $C_{\text{calculado}}$ , para o teste de Cochran (MASSART, *et al.*, 1997).

Onde:

$s_{\text{máx.}}^2$  = Maior valor de variância (variância máxima).

$\sum_{i=1}^n s_i^2$  = Somatório de todas as variâncias

Em seguida, o valor de C obtido,  $C_{\text{calculado}}$ , é comparado com o valor de C tabelado ( $C_{\text{tabelado}}$ ), que pode ser verificado na **tabela 1 (Anexo 2)**, que varia em função do número de valores de concentração da curva analítica e o número de replicatas realizadas.

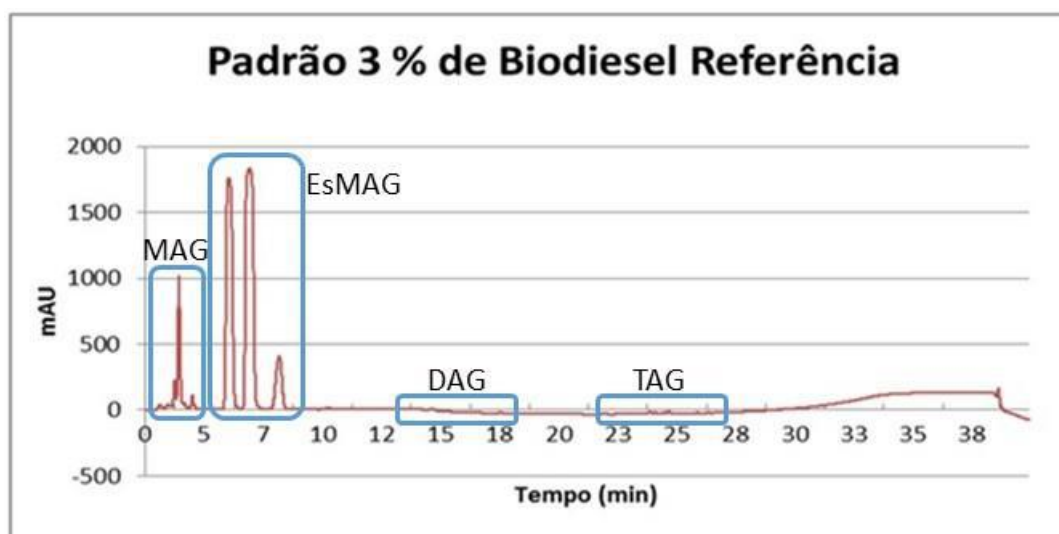
## 6. Resultados e Discussão

---

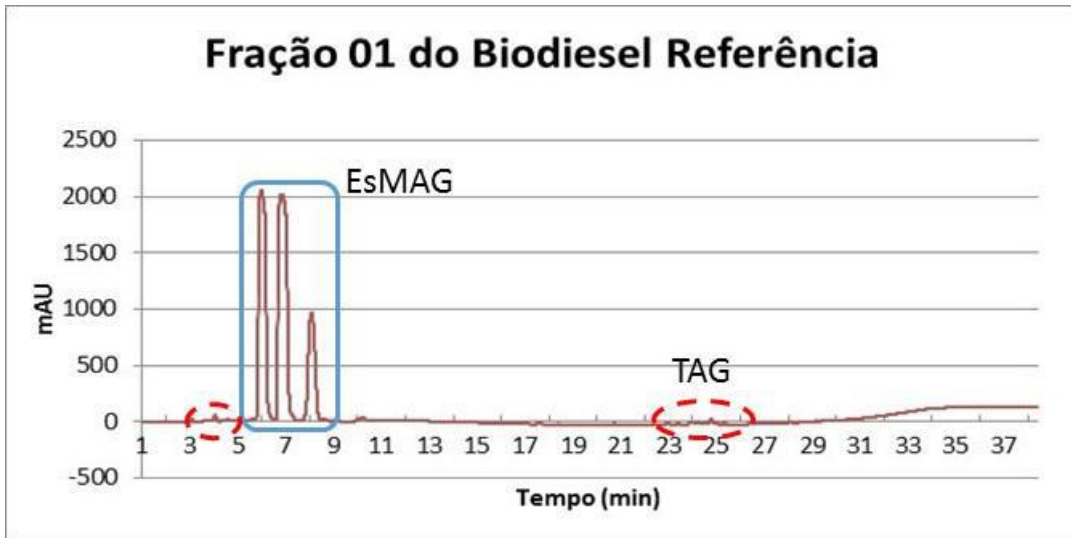
### 6.1. Separação do Glicerol Total por Extração em Fase Sólida

O monitoramento da etapa de extração em fase sólida (item 5.2), para a separação dos acilgliceróis (MAG, DAG e TAG) do biodiesel (EsMAG), foi feito empregando a CLAE-FRNA, conforme procedimento descrito no item 5.3.2.

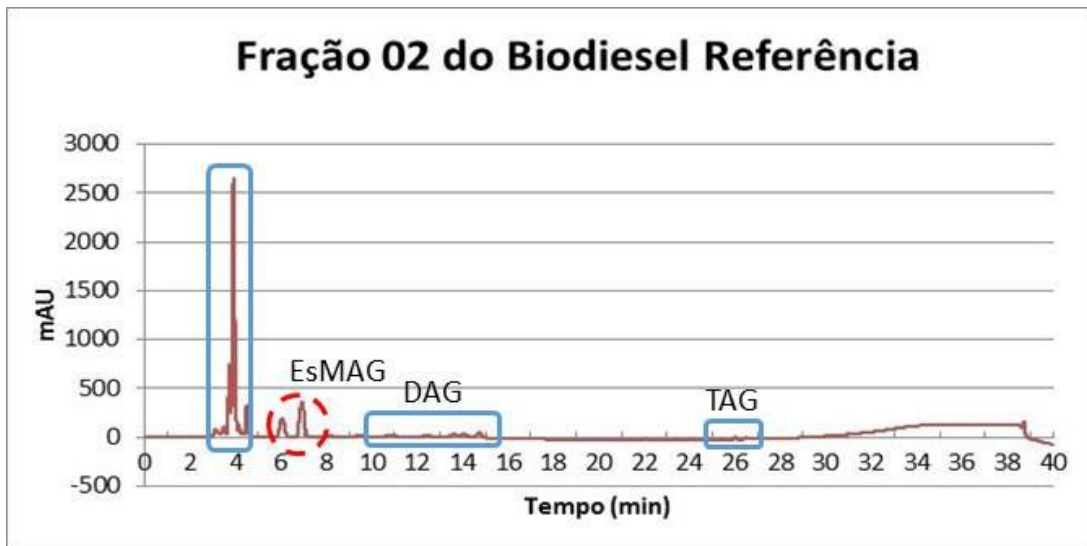
Todas as 6 amostras submetidas a etapa de EFS foram analisadas por CLAE-FRNA (antes e após a EFS) e os cromatogramas obtidos encontram-se apresentados nas **figuras 1 a 5 (Apêndice A)**. A título de ilustração, mostraremos os perfis cromatográficos da amostra de biodiesel de referência antes (**Figura 13a**) e após a etapa de EFS (**Figura 13b, Figura 13c e Figura 13d**). As demais amostras analisadas por CLAE-FRNA apresentaram perfis cromatográficos semelhantes ao biodiesel de referência.



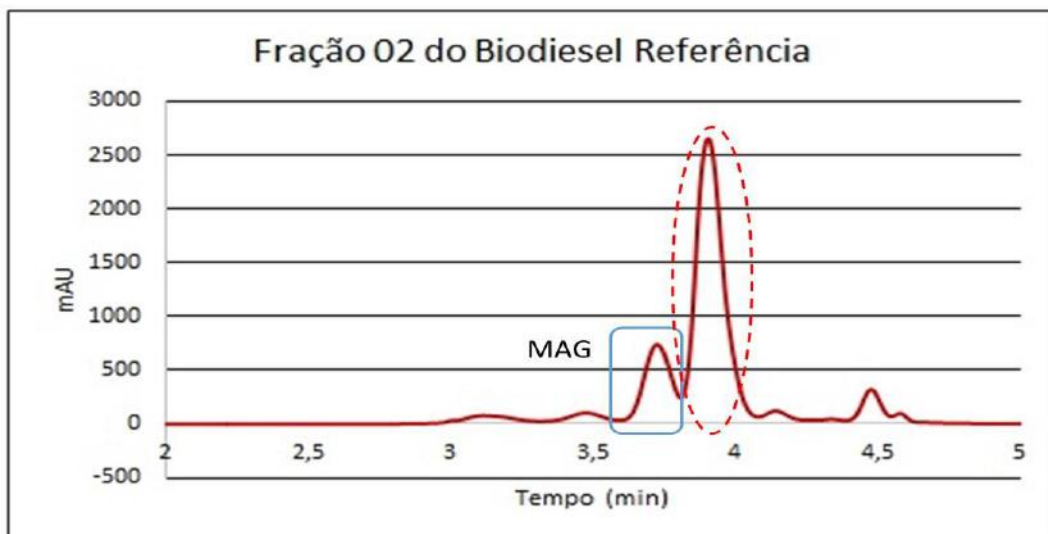
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 13.** Cromatogramas, obtidos por CLAE-FRNA, de uma amostra de biodiesel de referência (a) antes da etapa de EFS, (b) após a etapa de EFS – Fração 1, (c) após a etapa de EFS – Fração 2 e (d) Fração 2 ampliada, na região de 2 a 5 minutos.

A partir do cromatograma apresentado na **Figura 13a** observa-se que a amostra de biodiesel utilizada é de alta conversão, pois os picos referentes aos intermediários da reação de transesterificação, caracterizados pelas classes de DAG (12 a 18 minutos) e TAG (20 a 25 minutos) apresentam intensidade muito baixa.

A primeira etapa de EFS teve como objetivo separar a amostra de biodiesel em duas frações, uma constituída, predominantemente, por EsMAG (Fração F1), e a outra, por MAG, DAG e TAG (Fração F2). Os cromatogramas das frações F1 e F2 podem ser vistos, respectivamente, nas **Figuras 13b e 13c**.

Como pode ser observado no cromatograma apresentado na **Figura 13b**, a fração F1 é constituída majoritariamente por EsMAG (picos na região de 5 a 9 minutos) e uma pequena quantidade de TAG (picos na região entre 21 e 25 minutos) que foi eluída em conjunto. Também é possível detectar, na região entre 3 e 5 minutos, picos de baixa intensidade, referentes a MAG e a resíduos de solventes que não evaporaram por completo, conforme apresentado na **Figura 13d**.

No cromatograma apresentado na **Figura 13c**, observa-se que a fração F2 é constituída majoritariamente por MAG (picos na região de 2 a 5 minutos), DAG (picos na região de 10 a 15 minutos) e TAG (picos na região por volta de 22 minutos). Também se observa, pelos picos na região de 6 a 8 minutos, que uma pequena quantidade de EsMAG foi eluída em conjunto.

Os cromatogramas dos solventes utilizados para a eluição das frações 1 (*n*-hexano) e 2 (clorofórmio:metanol, 2:1) se encontram, respectivamente, nas **Figuras 1 e 2 (Anexo 3)**.

## 6.2. Quantificação do teor de glicerol total pelo método de referência (cromatografia em fase gasosa)

Todas as 6 amostras estudadas neste projeto foram analisadas pelo método de referência (CG), antes e após (Fração 2) o processo de EFS, e os resultados dos teores de glicerol total se encontram na **Tabela 6**.

Na **Tabela 6**, se encontram os teores de GT antes e após a separação, com  $n = 1$ , por EFS, sendo ambos analisados pela técnica de referência (CG). Esses resultados são importantes para a verificação do teor de recuperação do GT após a metodologia de extração.

**Tabela 6.** Resultados obtidos, por análise de CG, para o teor de glicerol total antes e após a separação por EFS

Amostra	Teor de Glicerol Total		Recuperação (%)
	(% mássica)		
	Antes EFS	Após EFS (Fração 2)	
<b>Biodiesel de Referência</b>	0,1197	0,1276	106,6
<b>Biodiesel de Fritura</b>	0,0974	0,0940	96,51
<b>Biodiesel de Soja</b>	0,0920	0,0980	106,5
<b>Biodiesel de Milho</b>	0,0649	0,0660	101,7
<b>Biodiesel de Canola</b>	0,0860	0,0840	97,67
<b>Biodiesel de Girassol</b>	0,0890	0,0960	107,9

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 6**, observa-se que a recuperação do glicerol total pelo método de EFS mostrou bons resultados, já que a mesma variou entre 96,51 e 107,9 %.

A separação da amostra, constituída majoritariamente, por EsMAG, GL, MAG, DAG e TAG, em duas frações acontece em virtude da diferença de polaridade dos constituintes. Os GL, MAG, DAG e parte dos TAG, mais polares, ficam retidos na fase estacionária de aminopropilsilano, enquanto os EsMAG e parte dos TAG são eluídos com n-hexano. A mudança de fase móvel, para a mistura de clorofórmio e metanol (2:1 volumétrica) faz com que os GL, MAG, DAG e o TAG remanescente, que estavam retidos no cartucho, sejam eluídos. Os TAG são eluídos tanto na fração F1 quanto na F2 devido ao seu caráter intermediário de polaridade, quando comparado com os EsMAG e os GL, MAG e DAG.



### 6.3. Comparação de Variâncias pelo Teste de Cochran

O teste de Cochran foi aplicado, segundo procedimento descrito no item 5.6, para os dados da curva analítica obtidos tanto pelo método enzimático colorimétrico, como pelo método eletroenzimático, cujos resultados se encontram, respectivamente, nas **tabelas 7 e 8**.

**Tabela 7.** Resultados do teste de Cochran para os dados obtidos pelo método enzimático colorimétrico.

<b>Amostra</b>	<b>C<sub>calculado</sub></b>	<b>C<sub>tabelado</sub></b>	<b>Comparação</b>
<b>Biodiesel de Referência</b>	0,359	0,616	C <sub>calculado</sub> < C <sub>tabelado</sub>
<b>Biodiesel de Fritura</b>	0,356	0,616	C <sub>calculado</sub> < C <sub>tabelado</sub>
<b>Biodiesel de Soja</b>	0,342	0,616	C <sub>calculado</sub> < C <sub>tabelado</sub>
<b>Biodiesel de Milho</b>	0,524	0,616	C <sub>calculado</sub> < C <sub>tabelado</sub>
<b>Biodiesel de Canola</b>	0,352	0,616	C <sub>calculado</sub> < C <sub>tabelado</sub>
<b>Biodiesel de Girassol</b>	0,349	0,616	C <sub>calculado</sub> < C <sub>tabelado</sub>

Como se pode observar, na **tabela 7**, os valores de C<sub>calculado</sub> para todas as 6 amostras de biodiesel possuem valor menor que o C<sub>tabelado</sub>, portanto, as variâncias apresentaram comportamento homocedástico.

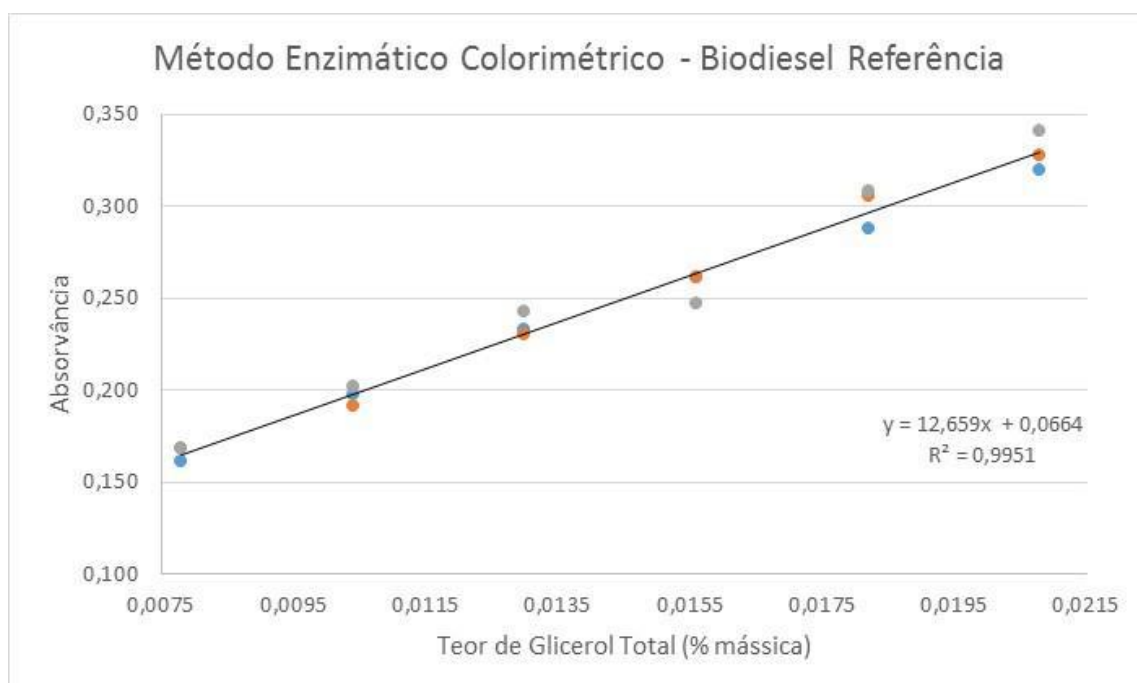
**Tabela 8.** Resultados do teste de Cochran para os dados obtidos pelo método eletroenzimático.

<b>Amostra</b>	<b>C<sub>calculado</sub></b>	<b>C<sub>tabelado</sub></b>	<b>Comparação</b>
<b>Biodiesel de Referência</b>	0,538	0,781	C <sub>calculado</sub> < C <sub>tabelado</sub>
<b>Biodiesel de Girassol</b>	0,522	0,781	C <sub>calculado</sub> < C <sub>tabelado</sub>

Como se pode observar, na **tabela 8**, os valores de C<sub>calculado</sub> para as 2 amostras de biodiesel possuem valor menor que o C<sub>tabelado</sub>, portanto, as variâncias apresentaram comportamento homocedástico.

#### 6.4. Quantificação do teor de glicerol total pelo método enzimático colorimétrico

A quantificação do teor de glicerol total nas 6 amostras de biodiesel analisadas foi feita submetendo-se a fração F2 de cada amostra ao procedimento descrito no item 5.4.3. Para cada análise foi construída uma curva analítica, com concentrações de padrão variando entre 0,0078% mássica e 0,0208% mássica, que encontram-se nas **Figuras 1 a 5 (Apêndice B)**. A curva analítica obtida para análise de biodiesel de referência é apresentada na **Figura 14**.



**Figura 14.** Curva analítica obtida pelo método enzimático colorimétrico, para cálculo do teor de glicerol total em biodiesel de referência.

Com base na curva analítica mostrada na **Figura 14**, é possível afirmar que a concentração de glicerol total na amostra se correlaciona muito bem com a absorvância medida ao final das reações enzimáticas, pois apresenta um ótimo coeficiente de determinação (0,9951), se mostrando, portanto, um bom método para a quantificação de glicerol total.

Na **Tabela 9** são encontrados os teores de glicerol total, bem como seus valores de absorvância medidos, com  $n = 3$ , para as seis amostras de biodiesel estudadas.

**Tabela 9.** Resultados para o teor de glicerol total obtidos pelo método enzimático colorimétrico.

Amostra	Absorvância			Fator de diluição	Concentrações			Teor de GT (% mássica)
	1	2	3		1	2	3	
<b>Biodiesel de Referência</b>	0,200	0,199	0,206	10x	0,106	0,105	0,110	0,107 ± 0,002
<b>Biodiesel de Fritura</b>	0,176	0,174	0,175	10x	0,0966	0,0951	0,0958	0,0958 ± 0,0006
<b>Biodiesel de Soja</b>	0,167	0,160	0,172	10x	0,0898	0,0840	0,0938	0,0892 ± 0,0040
<b>Biodiesel de Milho</b>	0,134	0,139	-	8x	0,0617	0,0647	-	0,0632 ± 0,0015
<b>Biodiesel de Canola</b>	0,176	0,174	0,182	10x	0,0875	0,0859	0,0923	0,0886 ± 0,0027
<b>Biodiesel de Girassol</b>	0,167	0,166	0,167	9x	0,0905	0,0898	0,0905	0,0903 ± 0,0003

#### 6.5. Comparação entre o método de referência (CG) e o método enzimático colorimétrico pelo Teste t de Student

Os valores dos teores de glicerol total, obtidos pelo método enzimático colorimétrico, foram comparados com os teores de glicerol total obtidos pelo método de referência (CG), e os resultados se encontram na **Tabela 10**.

**Tabela 10.** Comparação entre os teores de glicerol total obtidos pelo método de referência (CG) e pelo método enzimático colorimétrico.

Amostra	Teor de glicerol total (% mássica)	
	Método CG	Método enzimático colorimétrico
<b>Biodiesel de Referência</b>	0,1197	0,107
<b>Biodiesel de Fritura</b>	0,0974	0,0958
<b>Biodiesel de Soja</b>	0,0920	0,0892
<b>Biodiesel de Milho</b>	0,0649	0,0632
<b>Biodiesel de Canola</b>	0,0860	0,0886
<b>Biodiesel de Girassol</b>	0,0890	0,0903

Os métodos para análise de glicerol total (CG e Enzimático colorimétrico) foram comparados estatisticamente, pelo Teste t: duas amostras em par para médias, como descrito no item 5.5, e os resultados encontram-se apresentados na **tabela 11**.

**Tabela 11.** Resultado do teste t, para comparação estatística dos resultados obtidos pelo método de referência (CG) e pelo método enzimático colorimétrico.

Teste-t: duas amostras em par para médias

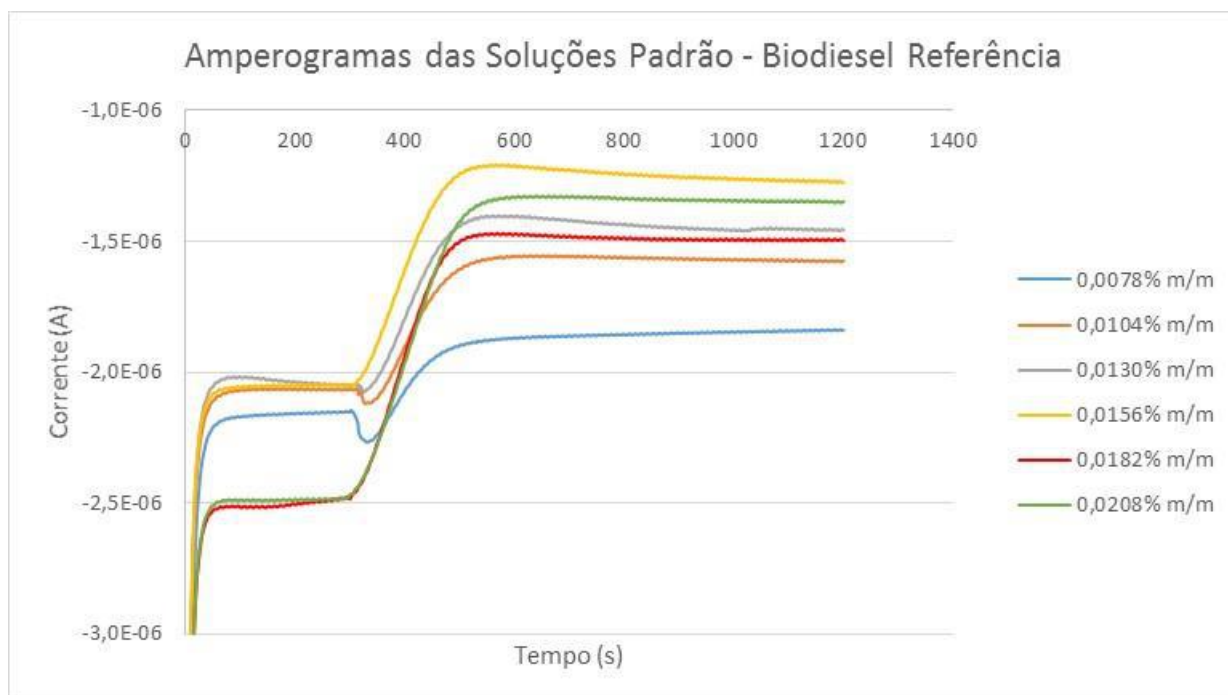
	CG	Enzimático Colorimétrico
Média	0,0915	0,088988
Variância	0,000315	0,000207
Observações	6	6
Correlação de Pearson	0,963792	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	5	
<b>Stat t</b>	<b>1,127819</b>	
P(T<=t) uni-caudal	0,155294	
t crítico uni-caudal	2,015048	
P(T<=t) bi-caudal	0,310589	
<b>t crítico bi-caudal</b>	<b>2,570582</b>	

gl – graus de liberdade; Stat t – t calculado; t crítico – t tabelado

Comparando o valor de t calculado (Stat t) e comparando-se com o valor de t crítico bicaudal (t tabelado bicaudal) é possível afirmar, como  $\text{Stat } t < t \text{ crítico bicaudal}$ , que os valores obtidos pelos métodos CG e enzimático colorimétrico são considerados estatisticamente semelhantes, com 95% de confiança.

## 6.6. Quantificação do teor de glicerol total pelo método eletroenzimático

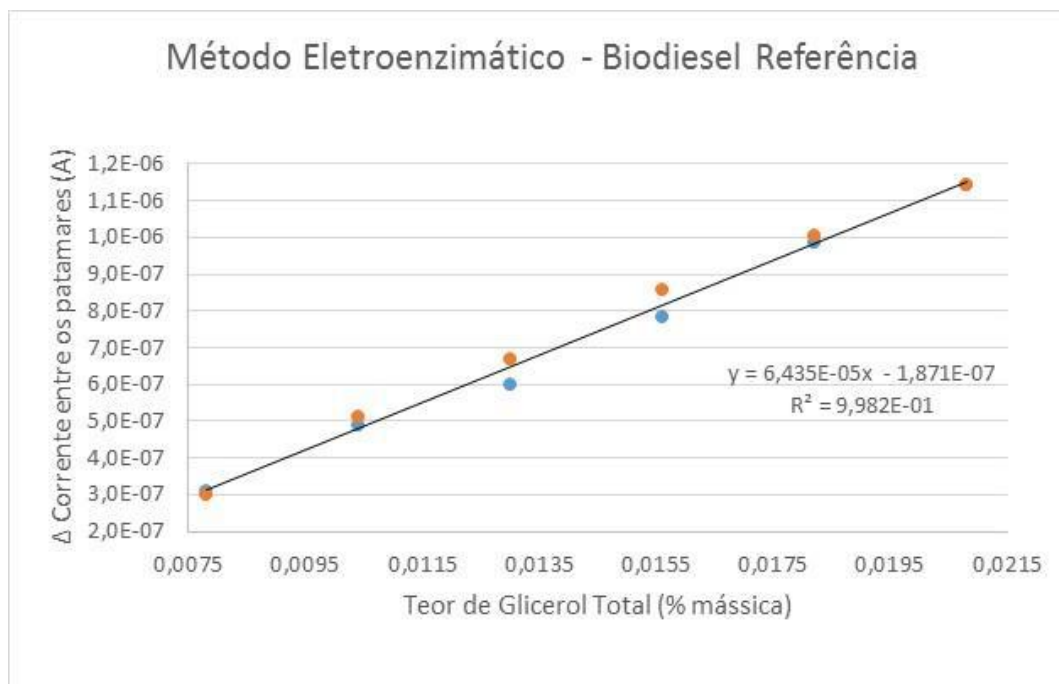
A quantificação de GT nas amostras de biodiesel pelo método eletroenzimático, segundo procedimento descrito no item 5.4.2, também foi realizada por meio de curva analítica, com concentrações de padrão variando entre 0,0078% mássica e 0,0208% mássica, resultando, cada análise, em um amperograma, conforme ilustrado na **figura 12**. Os amperogramas das soluções padrão usadas para a construção da curva analítica para análise de biodiesel de referência se encontram sobrepostos na **figura 15**.



**Figura 15.** Amperogramas das soluções padrão usadas para a construção da curva analítica, obtidos pelo método eletroenzimático, utilizando a célula de Clark.

É possível perceber, analisando os amperogramas apresentados na **Figura 15**, que, ao se aumentar a concentração dos padrões, se aumenta, também, a

diferença de corrente entre os dois patamares observados. Com isso, as diferenças entre os patamares de corrente, referentes a esta análise do biodiesel de referência, se encontram plotadas na curva analítica da **Figura 16**.



**Figura 16.** Curva analítica obtida pelo método eletroenzimático.

Ao se analisar a curva analítica mostrada na **Figura 16**, é possível verificar uma ótima correlação entre a concentração dos padrões e a diferença de corrente entre os dois patamares observados, apresentando um coeficiente de correlação igual a 0,9982.

Foram analisadas somente duas amostras de biodiesel, pelo método eletroenzimático pois, após a análise do biodiesel de referência, a célula eletroquímica de oxigênio do tipo Clark apresentou defeitos, ficando inutilizada por um período bastante longo (aproximadamente 10 meses) até ser reparada, o que não foi tão efetivo, pois, mesmo após a manutenção, ela não funcionou de forma adequada, pois não apresentou corrente estabilizada durante a análise. Também não havia tempo hábil para a aquisição de uma célula nova, pois a mesma não se encontra à venda no Brasil, necessitando de importação. Os resultados encontrados para estas duas amostras de biodiesel são mostrados na **Tabela 12**. Os amperogramas sobrepostos e a curva analítica obtidos pela

análise eletroenzimática do biodiesel de girassol encontram-se na **Figura 1**, dos **Apêndices C e D**, respectivamente.

**Tabela 12.** Resultados para o teor de glicerol total obtidos pelo método eletroenzimático, utilizando a célula de Clark.

<b>Amostra</b>	<b><math>\Delta</math> Corrente (A)</b>	<b>Fator de diluição</b>	<b>Teor de glicerol total (% mássica)</b>
<b>Biodiesel de Referência</b>	$8,081775200 \times 10^{-7}$	8x	0,1237
<b>Biodiesel de Girassol</b>	$1,220481580 \times 10^{-6}$	5x	0,0660

Os valores dos teores de glicerol total, obtidos pelo método enzimático colorimétrico e eletroenzimático, foram comparados com os teores de glicerol total obtidos pelo método de referência (CG), e os resultados se encontram na **tabela 13**.

**Tabela 13.** Comparação entre os teores de glicerol total obtidos pelo método de referência (CG), pelo método enzimático colorimétrico e pelo método eletroenzimático.

<b>Amostra</b>	<b>Teor de GT (% mássica)</b>		
	<b>CG</b>	<b>Enzimático Colorimétrico</b>	<b>Eletroenzimático</b>
<b>Biodiesel de Referência</b>	0,1197	0,1068	0,1237
<b>Biodiesel de Girassol</b>	0,089	0,0903	0,0660

Como é possível perceber, o teor de GT obtido para a amostra de biodiesel de referência é bem próximo ao obtido segundo as análises realizadas pelas outras duas técnicas, ao contrário do resultado obtido para a amostra de biodiesel de girassol. Isto concorda com o período de bom funcionamento da célula eletroquímica utilizada, ratificada pelo resultado ruim, obtido após o período de manutenção, quando a mesma apresentava muita variação na

corrente medida. Desta forma, não foi possível a análise das demais amostras pelo método eletroenzimático, impedindo assim a comparação do resultado com o método de referência.



## 7. Conclusões

---

O método de separação por EFS se mostrou eficiente, pois foi capaz de separar as amostras de biodiesel em duas frações enriquecidas dos seus principais constituintes (EsMAG e GL, MAG, DAG e TAG), com um bom percentual de recuperação (de 96,51 a 107,9%), essencial para a minimização das interferências causadas pelos EsMAG nas metodologias de análise propostas, ratificado pelos cromatogramas obtidos por análise de CLAE-FRMA.

O método enzimático colorimétrico de quantificação do glicerol total apresentou boas correlações lineares ( $R^2$  superiores a 0,9950) e o tratamento estatístico dos dados das curvas analíticas indicaram variâncias homogêneas da resposta com a variação da concentração do analito, o que caracterizou um comportamento homocedástico. O método enzimático colorimétrico forneceu resultados estatisticamente semelhantes aos obtidos pela metodologia de referência (CG), com 95% de confiança, apresentando vantagens frente a esta, como redução no tempo de análise, simplicidade do procedimento e custo bastante inferior, pois não utiliza agentes derivatizantes caros e gases e padrões com elevado grau de pureza.

O método eletroenzimático mostrou resultados promissores, porém, devido aos problemas encontrados com a célula eletroquímica utilizada e o número pequeno de amostras analisado, este não pôde ser comparado estatisticamente com o método de referência (CG).

## 8. Perspectivas Futuras

---

Dentre as perspectivas futuras para o aprimoramento e continuidade do projeto, podemos ressaltar:

- a. Realizar mais análises utilizando o método eletroenzimático, para melhor comparação entre os métodos;
- b. Validar os métodos, utilizando testes estatísticos;
- c. Desenvolver metodologia de separação, por EFS, a fim de gerar quatro frações enriquecidas com os principais constituintes do biodiesel (EsMAG, MAG, DAG e TAG);
- d. Quantificar cada um dos constituintes do biodiesel separadamente pelos métodos propostos.

## 9. Referências Bibliográficas

---

Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP. **Resolução n°. 14, de 11 de maio de 2012**. Publicada no diário oficial da união em 18 de maio de 2012. Disponível em <http://www.anp.org.br>.

AGUIAR, P. F. Apostila de Validação, DQA – IQ/UFRJ, 2005.

AGUIAR, P. F., ANDRADE, D. F. Apostila de Estatística Básica, DQA – IQ/UFRJ, 2015.

AMADO, R. S. **Estudo de diferentes métodos eletroenzimáticos para análise de glicerol livre e total em amostras de biodiesel**. (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

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

ANDRADE, D. F., MAZZEI, J. L., D'AVILA, L. A. **Separation of acylglycerols from biodiesel by high performance liquid chromatography and solid-phase extraction**. Revista Virtual de Química, v. 3, n. 6, p. 452-466, 2011.

ARZAMENDI, G., ARGUIÑARERA, E., CAMPO, I., GRANDÍA, L. M. **Monitoring of biodiesel production: Simultaneous analysis of the transesterification products using size-exclusion chromatography**. Chemical Engineering Journal, v. 122, n. 1-2, Sep, p. 31-40, 2006.

ASTM D6584 **Determination of Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography**, 2010.

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.** (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

BLATT, G. G., CARDOSO, T. C., ANDRADE, D. F., REZENDE, M. J. C., D'AVILA, L. A. **Extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência na separação das principais classes constituintes do biodiesel.** XIV Colacro, 01 a 05 de outubro de 2012, Florianópolis, Santa Catarina.

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.

BOWMAN, M.; HILLIGOSS, D.; RASMUSSEN, S. **Biodiesel: 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.** (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroanalysis,** Oxford Science Publications, Oxford, 1998.

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

COLETTI, R. A. **Biodiesel: Combustível renovável e ambientalmente correto.** Janeiro de 2006. Disponível em <http://www.biodieselbr.com>.

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.

CZAUDEANA, 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.

DA CAL VALDEZ, H., AMADO, R. S., DE SOUZA, F. C., D'ELIA, E., DE CASTRO VIEIRA, E. **Free and total glycerol determination in biodiesel samples by enzymatic method with colorimetric detection. Determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel por método enzimático com detecção colorimétrica,** Química Nova, v. 35, n. 3, p. 601-607, 2012.

DARNOKO, D., CHERYAN, M., PERKINS, E. G. **Analysis of vegetable oil transesterification products by gel permeation chromatography.** Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 23, n. 15, p. 2327, 2000.

DIAS, A. N., CERQUEIRA, M. B. R., MOURA, R. R., KURZ, M. H. S., CLEMENTIN, R. M., D'ORCA, M. G. M., PRIMEL, E. G. **Optimization of a method for the simultaneous determination of glycerides, free and total glycerol in biodiesel ethyl esters from castor oil using gas chromatography.** Fuel, v. 94, p. 178-183, 2012.

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

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

FARIA, F. R. D., **Metodologias Analítica Aplicadas nas Análises de Biodiesel de Mamona.** Petrobras/Cenpes/Química, Novembro de 2005.

FERNANDES, D. R.; **Estudo da determinação eletroquímica de enxofre elementar em gasolina** (Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

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** (Trabalho de conclusão de curso). 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.

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

GERIS, R., DOS SANTOS, N. A. C., AMARAL, B. A., MAIA, I. D., CASTRO, V. D., CARVALHO, J. R. M. **Biodiesel from soybean oil - Experimental procedure of transesterification for organic chemistry laboratories** *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1369-1373, 2007.

GREENHILL, S. e GREENHILL, S. J. **Determination of glycerin content of biodiesel sample involves subjecting sample to reagent mixture to produce colored compound, followed by measuring concentration and converting into glycerin concentration**: Stephan Co (Step): 1576366-A1: p. 2004.

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.

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

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

JARDIM, I. C. S. F. **Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas.** Scientia Chromatographica, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

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.

KELLY, T. A. e CHRISTIAN, G. D. **Amperometric determination of glycerol and triglycerides using an oxygen electrode**. Analyst, v. 109, n. 4, p. 453-456, 1984.

KITTIRATTANAPIBOON, K. e KRISNANGKURA, K. **Separation of acylglycerols, FAME and FFA in biodiesel by size exclusion chromatography**. European Journal of Lipid Science and Technology, v. 110, n. 5, May, p. 422-427, 2008.

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., VAN GERPEN, J. O. N., KRAHL, J., RAMOS, L. P. **Manual de biodiesel**, Edgard Blucher, 2006.

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

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.

LINS JUNIOR, F. P. **Separação e isolamento das principais classes constituintes do biodiesel por extração em fase sólida** (Trabalho de conclusão de curso). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

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., DA CRUZ, R. S. **Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos**. Química Nova, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.



LOPES, P. A.; **Estatística aplicada a laboratórios de ensaio e calibração**; Rede de tecnologia, 2007.

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.

LUETKMEYER, T. **Determinação de glicerol livre e total em biodiesel utilizando a célula eletroquímica de oxigênio tipo Clark** (Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

LUETKMEYER, T., DOS SANTOS, R. M., DA SILVA, A. B., AMADO, R. S. DE CASTRO VIERIA, E., D'ELIA, E. **Analysis of Free and Total Glycerol in Biodiesel Using an Electrochemical Assay Based on a Two-Enzyme Oxygen-Electrode System**. Electroanalysis, v. 22, n. 9, p. 995-999, 2010.

MADRAS, G., KOLLURU, C., KUMAR, R. **Synthesis of biodiesel in supercritical fluids**. Fuel, v. 83, n. 14-15, p. 2029-2033, 2004.

MASSART, D. L. **Handbook of chemometrics and qualimetric: part A**, 20A, Elsevier. New York, 1997.

MINAKSHI e PUNDIR, C. S. **Construction of an amperometric enzymic sensor for triglyceride determinations**. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 133, n. 1, p. 251-255, 2008.

MIRANDA, J. L. e MOURA, L. C. **Workshop Biodiesel: Obtenção e Análise de Qualidade**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 28 de julho a 01 de agosto de 2014.

MONTOYA, A., MARCH, C., MOCHOLÍ, A., ABAD, A., MANCLÚS, J. J., FERRERO, J. M. **Electrochemical assays based on enzyme-electrode systems to determine glycerol and propylene glycol in tobacco casing**. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 16, n. 1-3, p. 429-434, 1993.

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.

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

Operating manual: **The Rank Brothers oxygen electrode**, 7 p., 2002.

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.

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.

PRADOS, C. P., REZENDE, D. R., BATISTA, L. R., ALVES, M. I. R., ANTONIOSI FILHO, N. R. **Simultaneous gas chromatographic analysis of total esters, mono-, di- and triacylglycerides and free and total glycerol in methyl or ethyl biodiesel.** Fuel, v. 96, p. 476-481, 2012.

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-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.

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

SOUZA, F. C. de; VASCONCELLOS JUNIOR, F. J. de; CABRAL, R. C.; FERNÁNDEZ, T. L.; D'ELIA, E. **Simple enzymatic methods for glycerol analysis in comercial beverages**. CyTA – Journal of Food, v.11, p. 270-276, 2013.

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

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.

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.

WU, L. –C. e CHENG, C. –M. **Flow-injection enzymatic analysis for glycerol and triacylglycerols**. Analytical Biochemistry, v. 346, n. 2, p. 234-240, 2005.

## 10. Anexos e Apêndices

---

### ANEXO 1 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS ENVOLVIDAS NAS REAÇÕES ENZIMÁTICAS

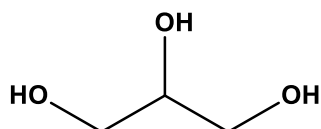


Figura 1. Estrutura química da molécula de glicerol (SOUZA *et al.*, 2013).

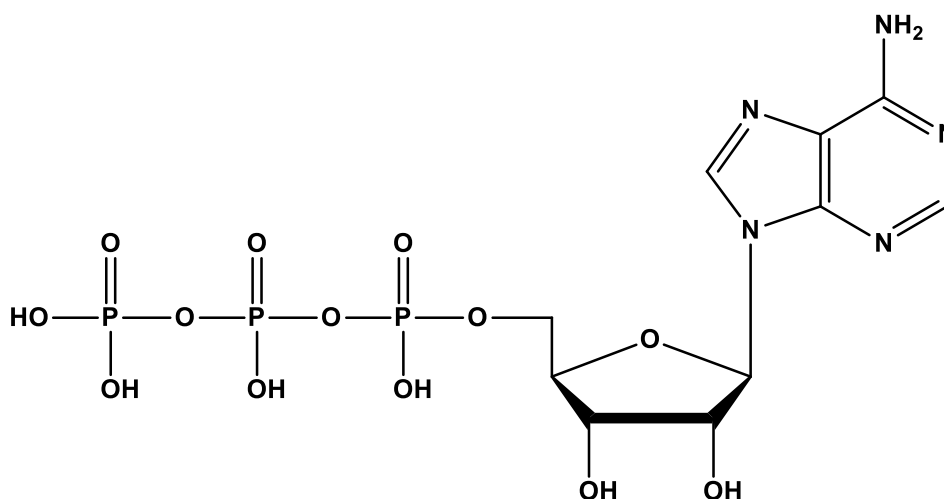


Figura 2. Estrutura química da molécula de trifosfato de adenosina (ATP) (SOUZA *et al.*, 2013).

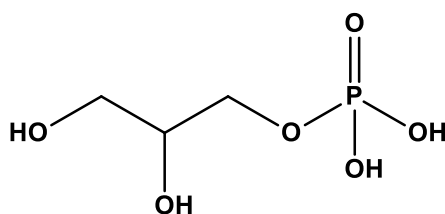
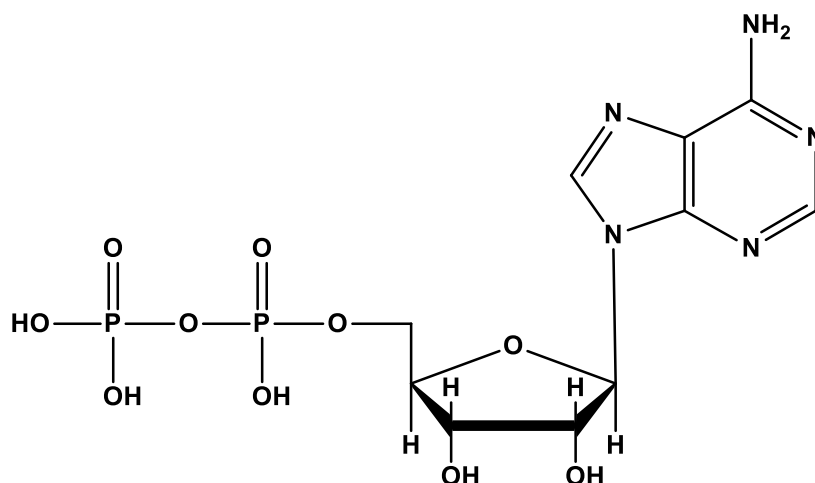
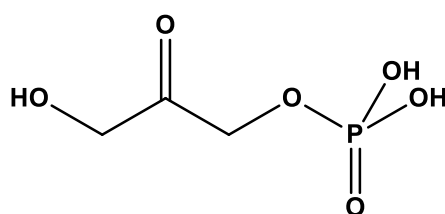


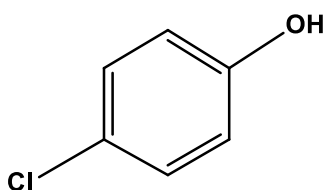
Figura 3. Estrutura química da molécula de glicerol-3-fosfato (G-3-P) (SOUZA *et al.*, 2013).



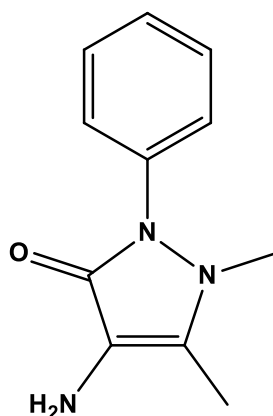
**Figura 4.** Estrutura química da molécula de difosfato de adenosina (ADP) (SOUZA *et al.*, 2013).



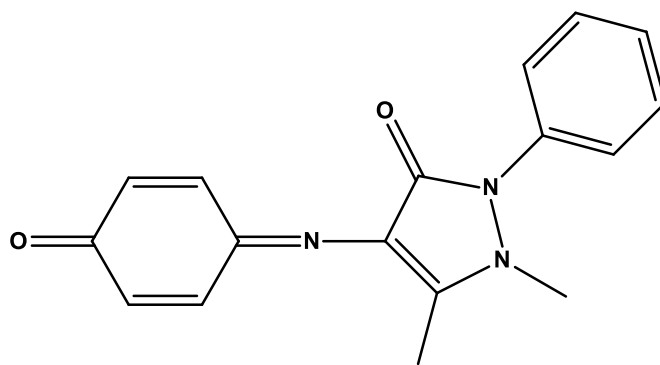
**Figura 5.** Estrutura química da molécula de diidroxiacetona (DAP) (SOUZA *et al.*, 2013).



**Figura 6.** Estrutura química da molécula de p-clorofenol (SOUZA *et al.*, 2013).



**Figura 7.** Estrutura química da molécula de 4-aminoantipirina (4-AAP) (SOUZA *et al.*, 2013).



**Figura 8.** Estrutura química da molécula de quinoneimina formada (SOUZA *et al.*, 2013).

## ANEXO 2 – TABELA PARA TESTE DE COCHRAN

**Tabela 1.** Valores de  $C_{\text{tabelado}}$  para teste de Cochran, a nível de 95% de confiança (MASSART, *et al.*, 1997).

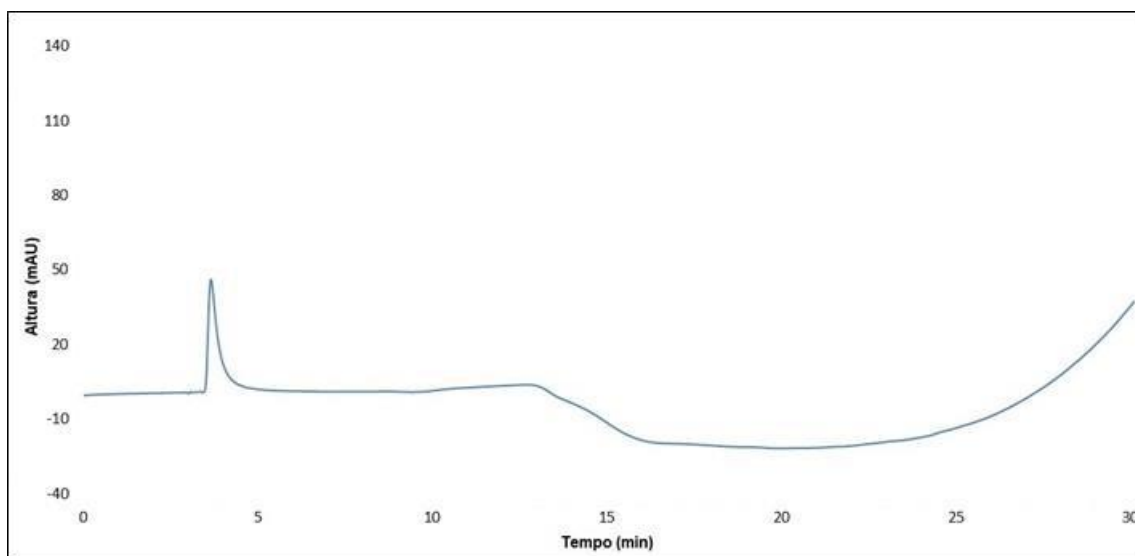
Tabela com os valores críticos de Cochran ( $\alpha=0,05$ )

l	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	n=7	n=8	n=9	n=10	n=11
2	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8872	0,8534	0,8332	0,8159	0,8010	0,7880
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,6530	0,6333	0,6167	0,6025
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017	0,4884
5	0,8412	0,6838	0,5981	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241	0,4118
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4184	0,3980	0,3817	0,3682	0,3568
7	0,7271	0,5612	0,4800	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3259	0,3154
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,3910	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926	0,2829
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3007	0,2901	0,2768	0,2659	0,2568
10	0,6020	0,4450	0,3733	0,331	0,3029	0,2828	0,2666	0,2541	0,2439	0,2353
11	0,0570	0,4170	0,3480	0,3080	0,2810	0,2626	0,2466	0,2355	0,2249	0,2183
12	0,5410	0,3924	0,3264	0,2880	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098	0,2020
13	0,5150	0,3710	0,3070	0,2710	0,2430	0,2297	0,2160	0,2054	0,1978	0,1862
14	0,4920	0,3520	0,2910	0,2550	0,2320	0,2152	0,2034	0,1934	0,1860	0,1752
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736	0,1671
16	0,4520	0,3190	0,2620	0,2300	0,2080	0,1926	0,1809	0,1717	0,1641	0,1590
17	0,4340	0,3050	0,2500	0,2190	0,1980	0,1829	0,1716	0,1628	0,1556	0,1510
18	0,4180	0,2930	0,2400	0,2090	0,1890	0,1753	0,1645	0,1560	0,1490	0,1430
19	0,4030	0,2810	0,2300	0,2000	0,1810	0,1684	0,1579	0,1497	0,1429	0,1360
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357	0,1303
21	0,3770	0,2610	0,2120	0,1850	0,1670	0,1526	0,1429	0,1353	0,1324	0,1253
22	0,3650	0,2520	0,2040	0,1780	0,1600	0,1469	0,1376	0,1302	0,1275	0,1193
23	0,3540	0,2430	0,1970	0,1720	0,1550	0,1431	0,1340	0,1268	0,1209	0,1143
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1286	0,1216	0,1160	0,1113
25	0,3340	0,2280	0,1850	0,1600	0,1440	0,1327	0,1241	0,1173	0,1116	0,1078
26	0,3250	0,2210	0,1790	0,1550	0,1400	0,1283	0,1200	0,1134	0,1075	0,1044
27	0,3160	0,2150	0,1730	0,1500	0,1350	0,1244	0,1162	0,1098	0,1038	0,1011
28	0,3080	0,2090	0,1680	0,1460	0,1310	0,1208	0,1129	0,1066	0,1006	0,0979
29	0,3000	0,2030	0,1640	0,1420	0,1270	0,1175	0,1097	0,1036	0,0975	0,0948
30	0,2929	0,1980	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958	0,0921
31	0,2830	0,1930	0,1550	0,1340	0,1200	0,1099	0,1034	0,0975	0,0932	0,0895
32	0,2800	0,1880	0,1510	0,1310	0,1170	0,1073	0,1009	0,0952	0,0911	0,0865
33	0,2730	0,1840	0,1470	0,1270	0,1140	0,1047	0,0985	0,0928	0,0889	0,0839
34	0,2670	0,1790	0,1440	0,1240	0,1110	0,1021	0,0960	0,0905	0,0868	0,0814
35	0,2620	0,1750	0,1400	0,1210	0,1080	0,0995	0,0936	0,0882	0,0847	0,0791
36	0,2560	0,1720	0,1370	0,1180	0,1060	0,0969	0,0912	0,0859	0,0826	0,0770
37	0,2510	0,1680	0,1340	0,1160	0,1030	0,0943	0,0887	0,0836	0,0804	0,0751
38	0,2460	0,1640	0,1310	0,1130	0,1010	0,0917	0,0863	0,0812	0,0783	0,0735
39	0,2420	0,1610	0,1290	0,1110	0,0990	0,0891	0,0838	0,0789	0,0762	0,0721
40	0,2370	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,0780	0,0745	0,0713
41	0,2338	0,1554	0,1241	0,1066	0,0954	0,0874	0,0815	0,0769	0,0734	0,0702
42	0,2307	0,1532	0,1223	0,1050	0,0939	0,0861	0,0803	0,0757	0,0723	0,0691
43	0,2275	0,1509	0,1204	0,1034	0,0925	0,0847	0,0790	0,0746	0,0711	0,0681
44	0,2243	0,1487	0,1186	0,1019	0,0911	0,0834	0,0778	0,0734	0,0700	0,0670
45	0,2212	0,1465	0,1168	0,1003	0,0897	0,0821	0,0766	0,0723	0,0689	0,0659
46	0,2180	0,1443	0,1150	0,0987	0,0882	0,0808	0,0754	0,0712	0,0678	0,0648
47	0,2148	0,1420	0,1132	0,0971	0,0868	0,0795	0,0742	0,0700	0,0666	0,0637
48	0,2117	0,1398	0,1113	0,0955	0,0854	0,0781	0,0729	0,0689	0,0655	0,0627
49	0,2085	0,1376	0,1095	0,0939	0,0839	0,0768	0,0717	0,0677	0,0644	0,0616
50	0,2054	0,1354	0,1077	0,0924	0,0825	0,0755	0,0705	0,0666	0,0633	0,0605

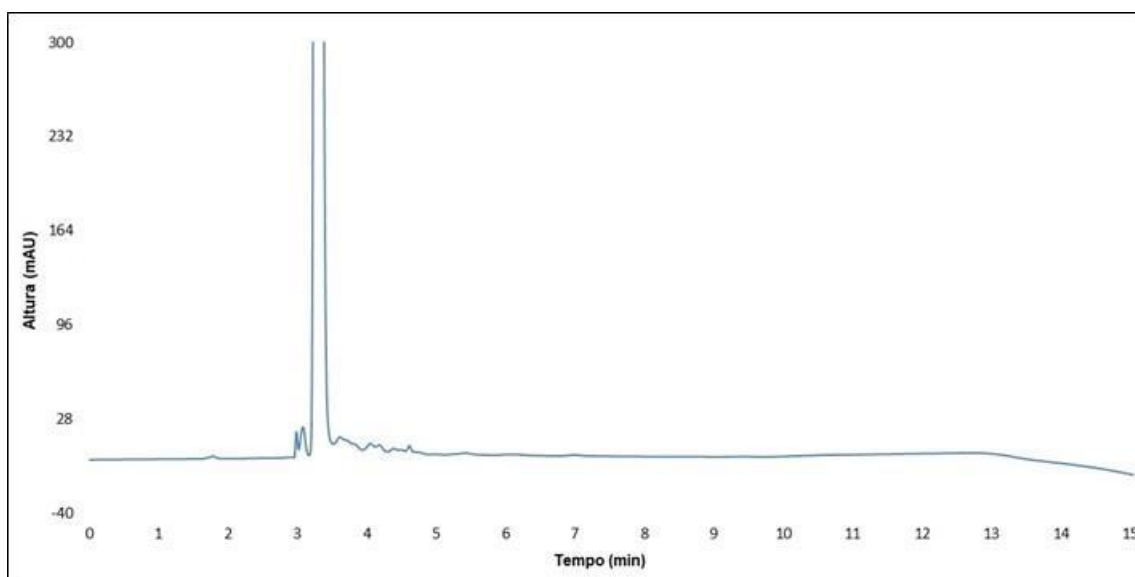
l – Número de soluções padrão, de diferentes concentrações, utilizadas na construção da curva analítica;

n – Número de replicatas realizadas.

**ANEXO 3 – CROMATOGRAMAS, OBTIDOS POR CLAE-FRNA, DOS SOLVENTES UTILIZADOS NA EFS**



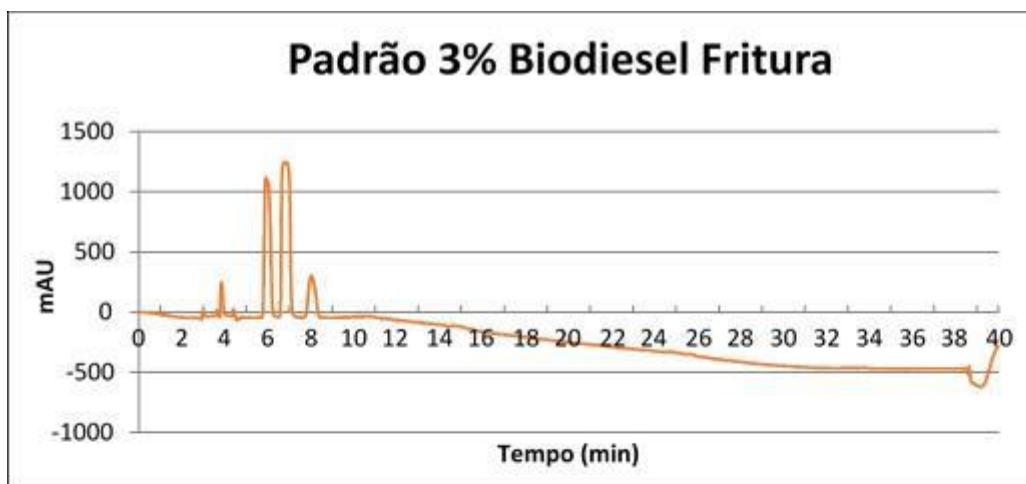
**Figura 1.** Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, do *n*-hexano (LINS JUNIOR, 2014).



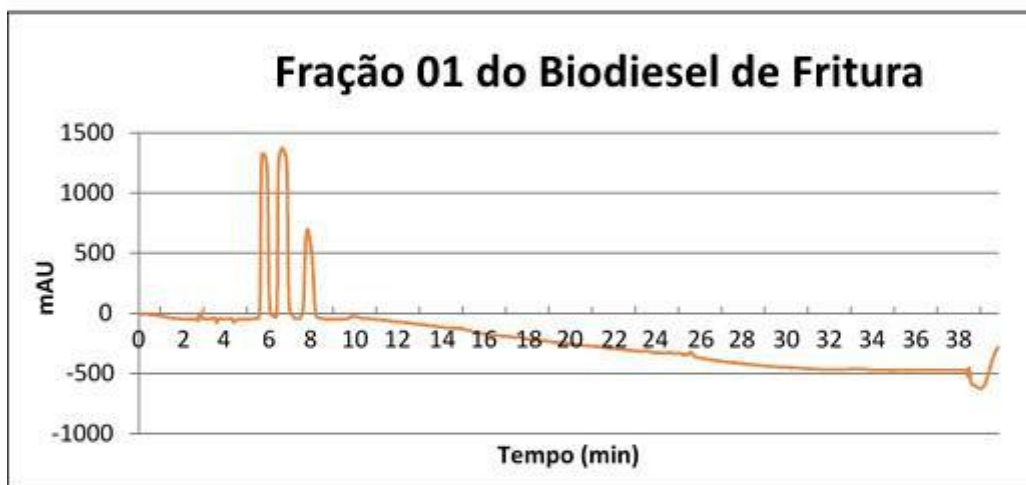
**Figura 2.** Cromatograma, obtido por CLAE-FRNA, de uma solução clorofórmio:metanol (2:1) (LINS JUNIOR, 2014).



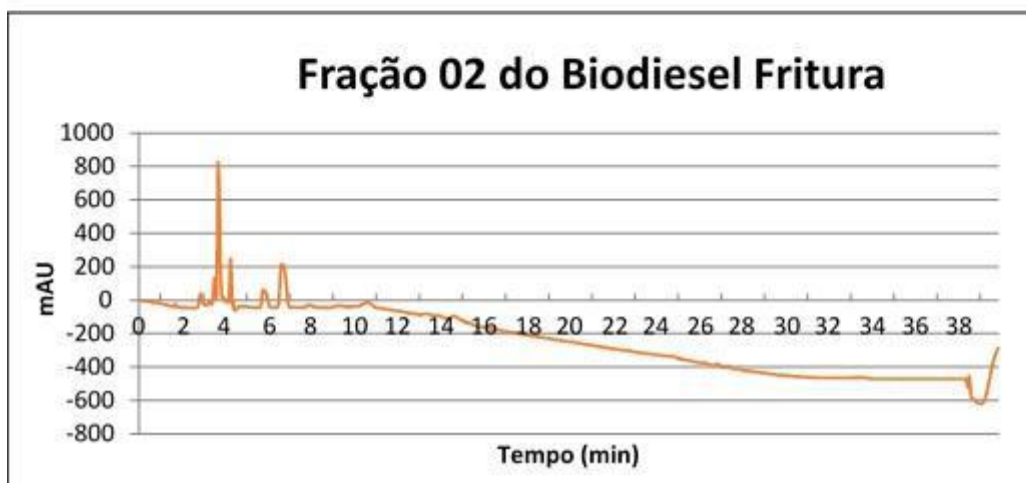
**APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS, OBTIDOS POR CLAE-FRNA, DAS AMOSTRAS ESTUDADAS**



(a)

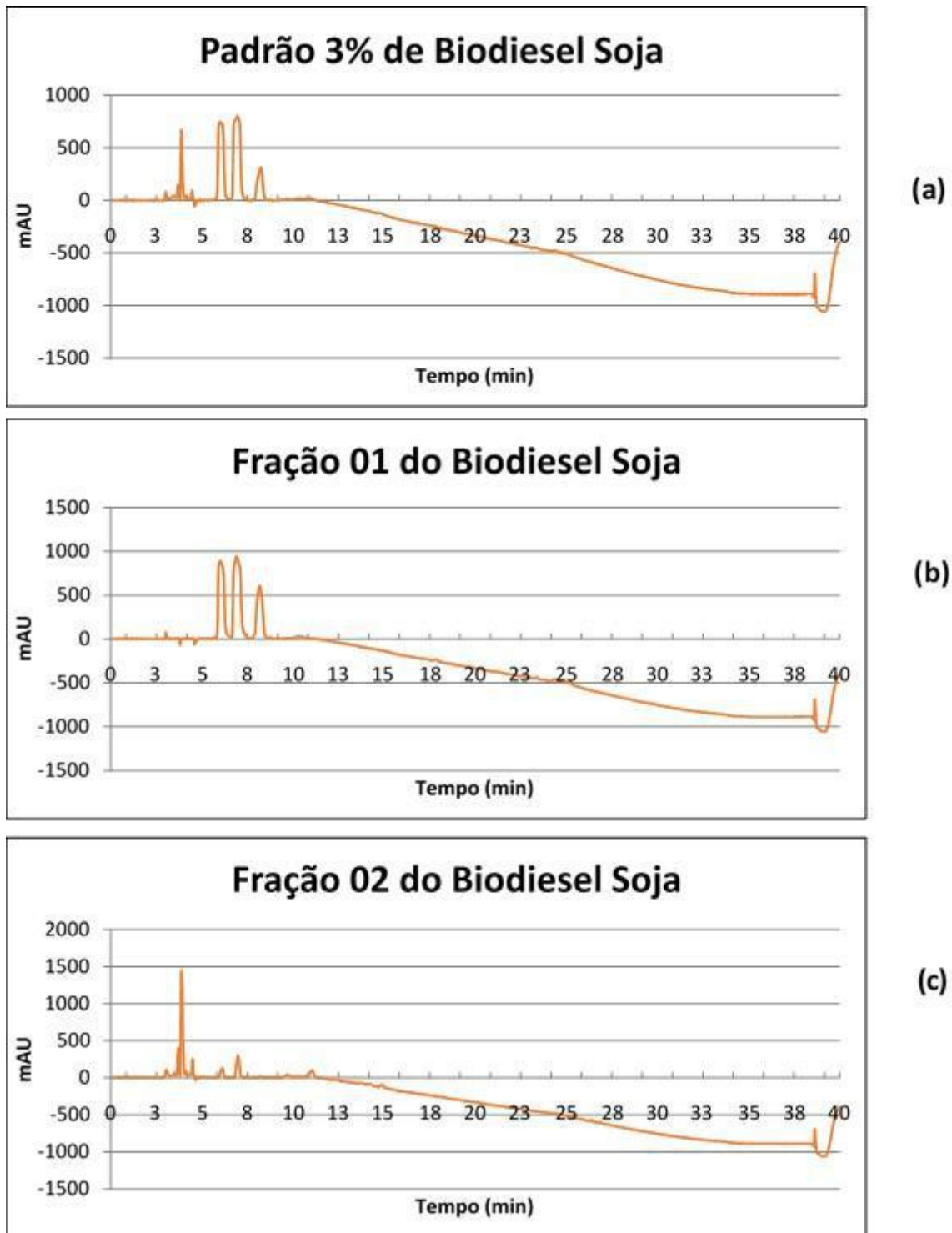


(b)

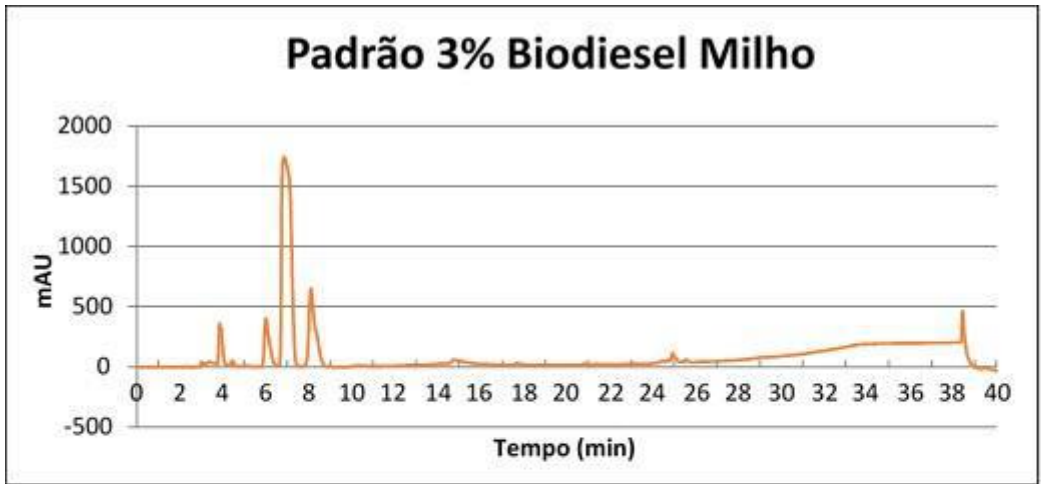


(c)

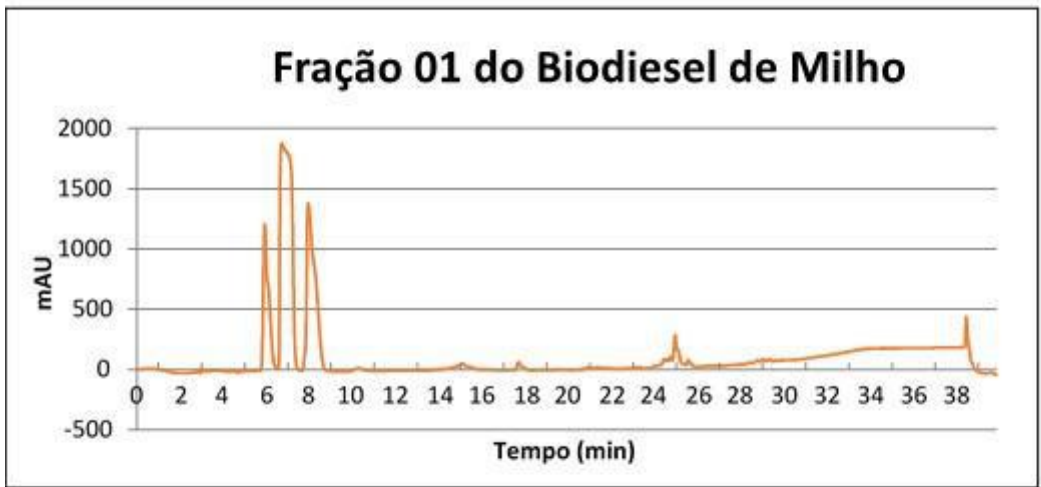
**Figura 1.** Cromatogramas, obtidos por CLAE-FRNA, de uma amostra de biodiesel de óleo de fritura (a) antes da etapa de EFS, (b) após a etapa de EFS – Fração 1 e (c) após a etapa de EFS – Fração 2.



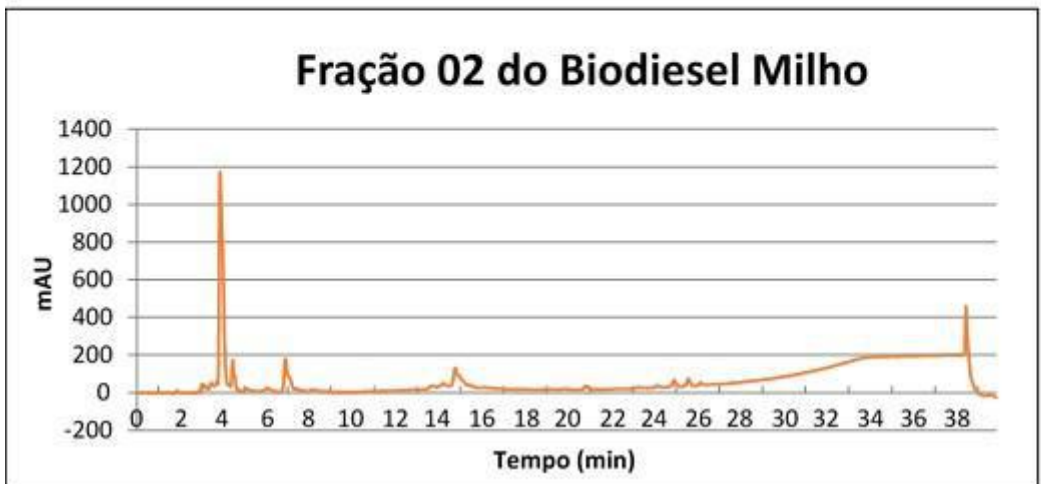
**Figura 2.** Cromatogramas, obtidos por CLAE-FRNA, de uma amostra de biodiesel de soja (a) antes da etapa de EFS, (b) após a etapa de EFS – Fração 1 e (c) após a etapa de EFS – Fração 2.



(a)

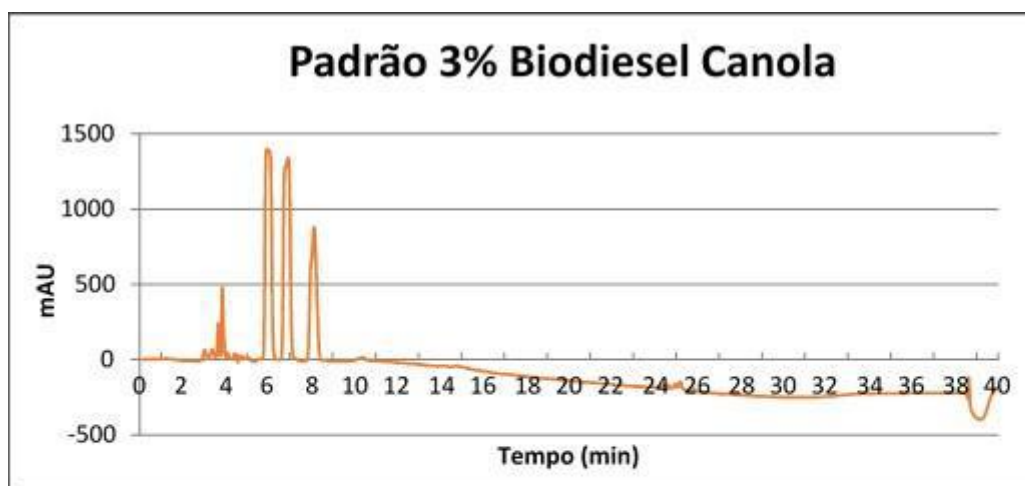


(b)

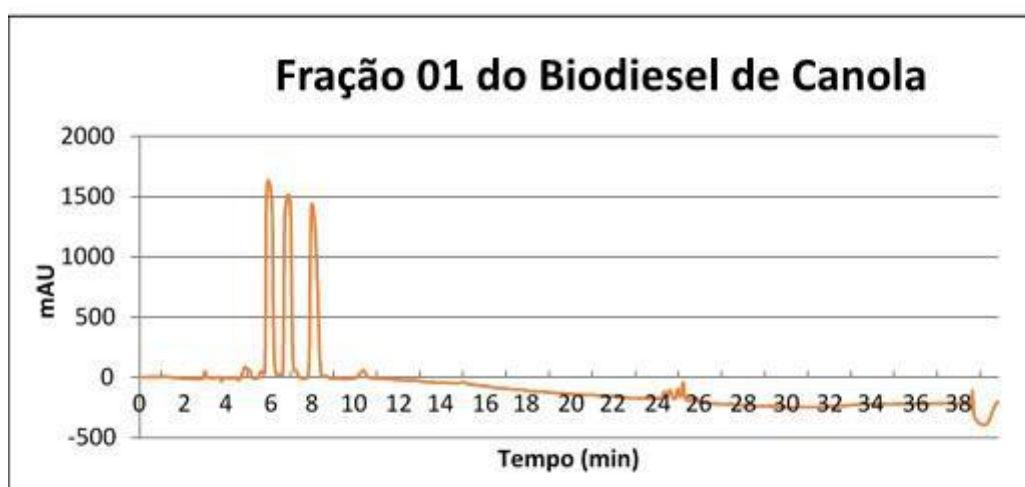


(c)

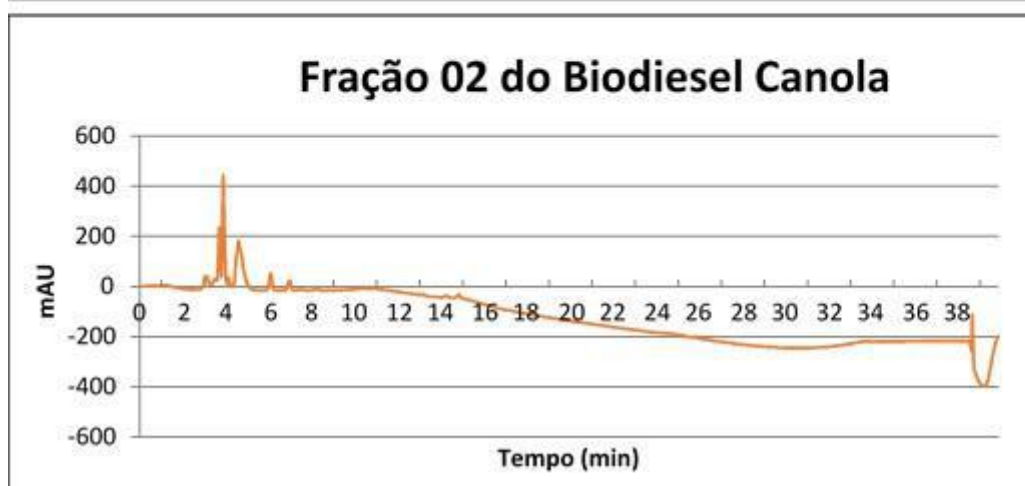
**Figura 3.** Cromatogramas, obtidos por CLAE-FRNA, de uma amostra de biodiesel de milho (a) antes da etapa de EFS, (b) após a etapa de EFS – Fração 1 e (c) após a etapa de EFS – Fração 2.



(a)

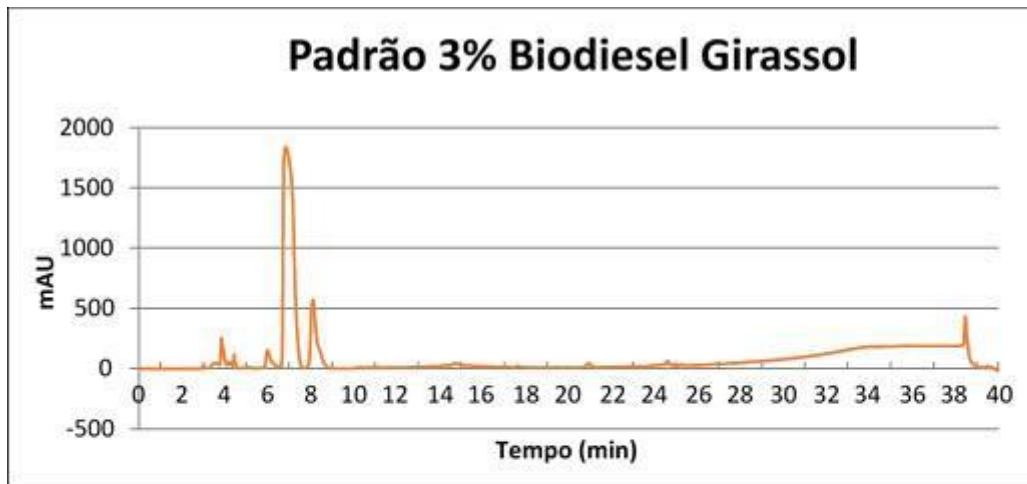


(b)

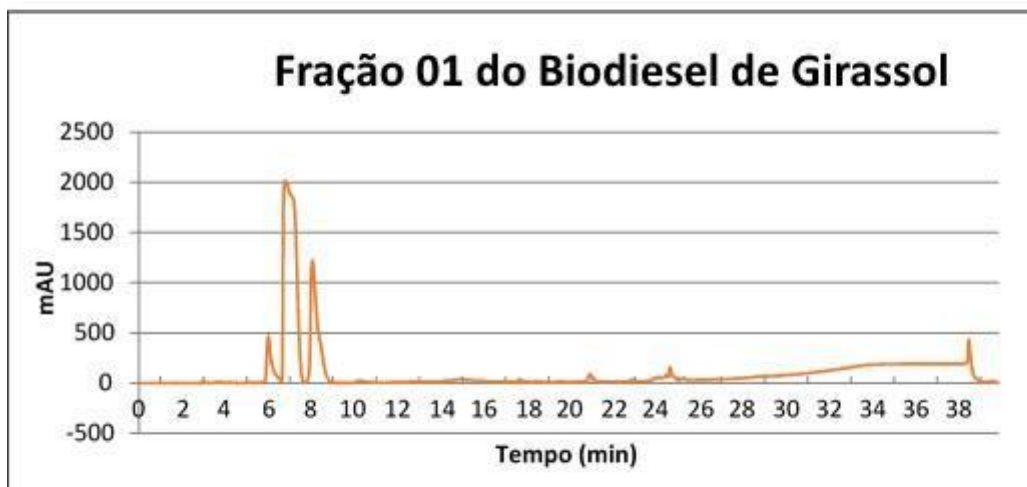


(c)

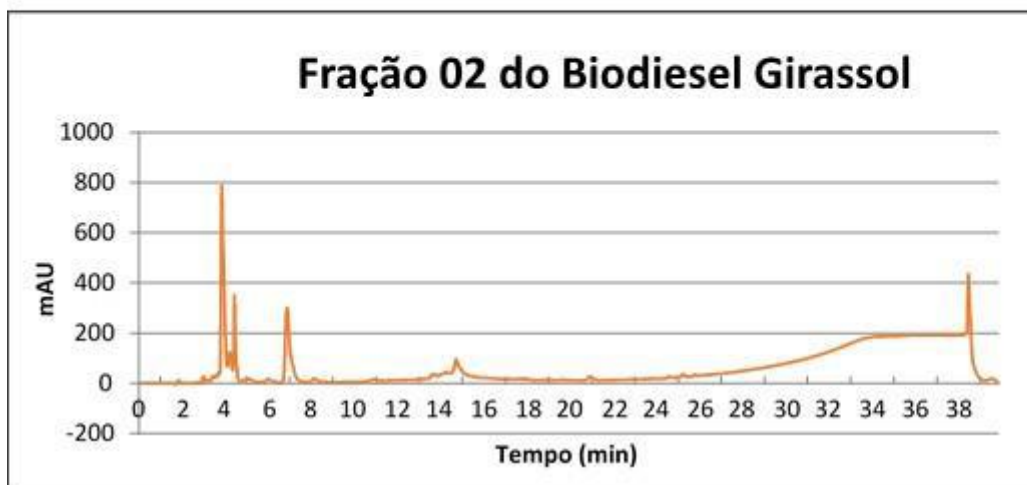
**Figura 4.** Cromatogramas, obtidos por CLAE-FRNA, de uma amostra de biodiesel de canola (a) antes da etapa de EFS, (b) após a etapa de EFS – Fração 1 e (c) após a etapa de EFS – Fração 2.



(a)



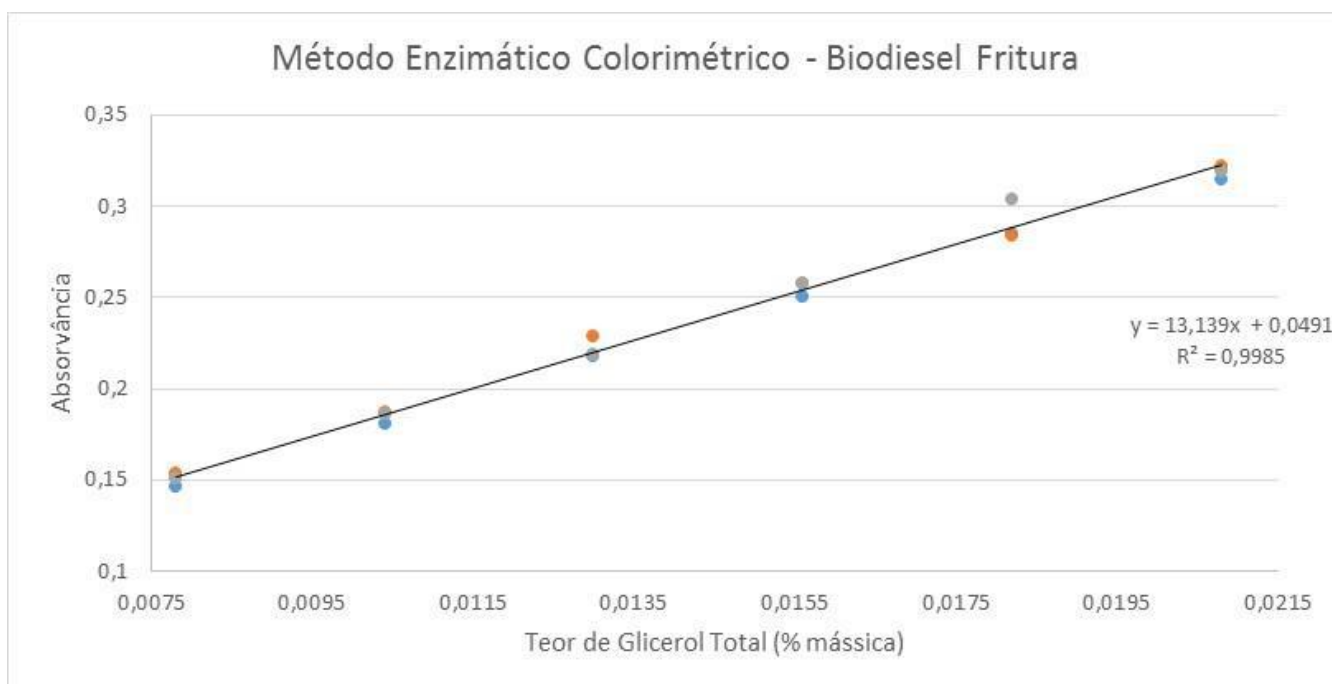
(b)



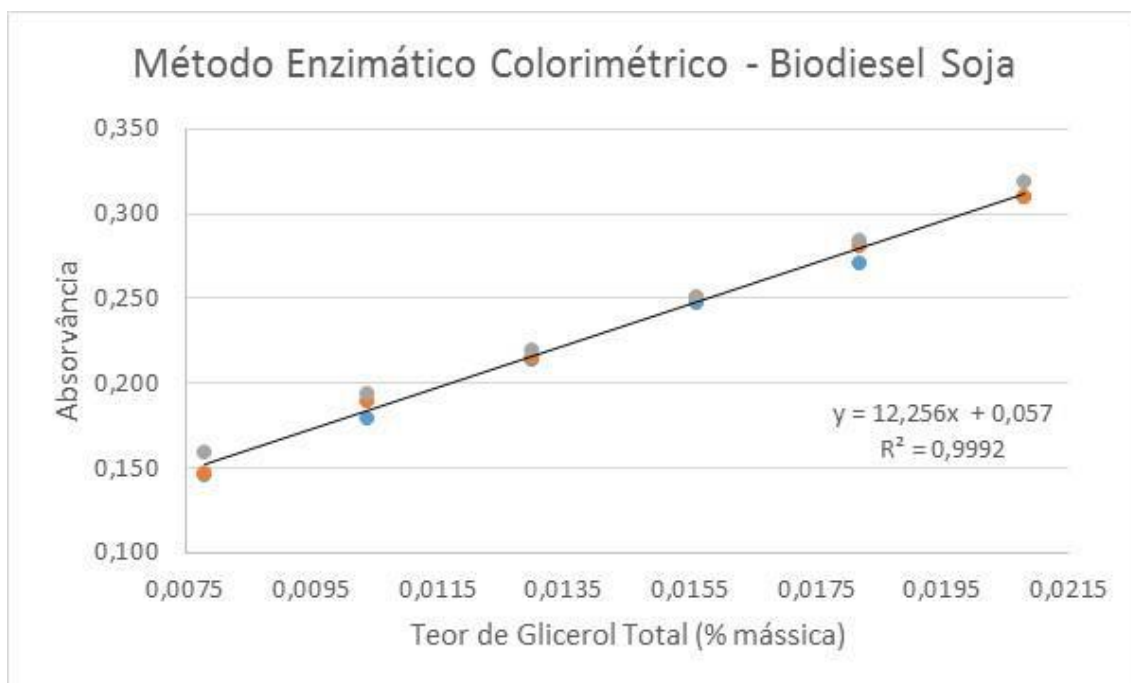
(c)

**Figura 5.** Cromatogramas, obtidos por CLAE-FRNA, de uma amostra de biodiesel de girassol (a) antes da etapa de EFS, (b) após a etapa de EFS – Fração 1 e (c) após a etapa de EFS – Fração 2.

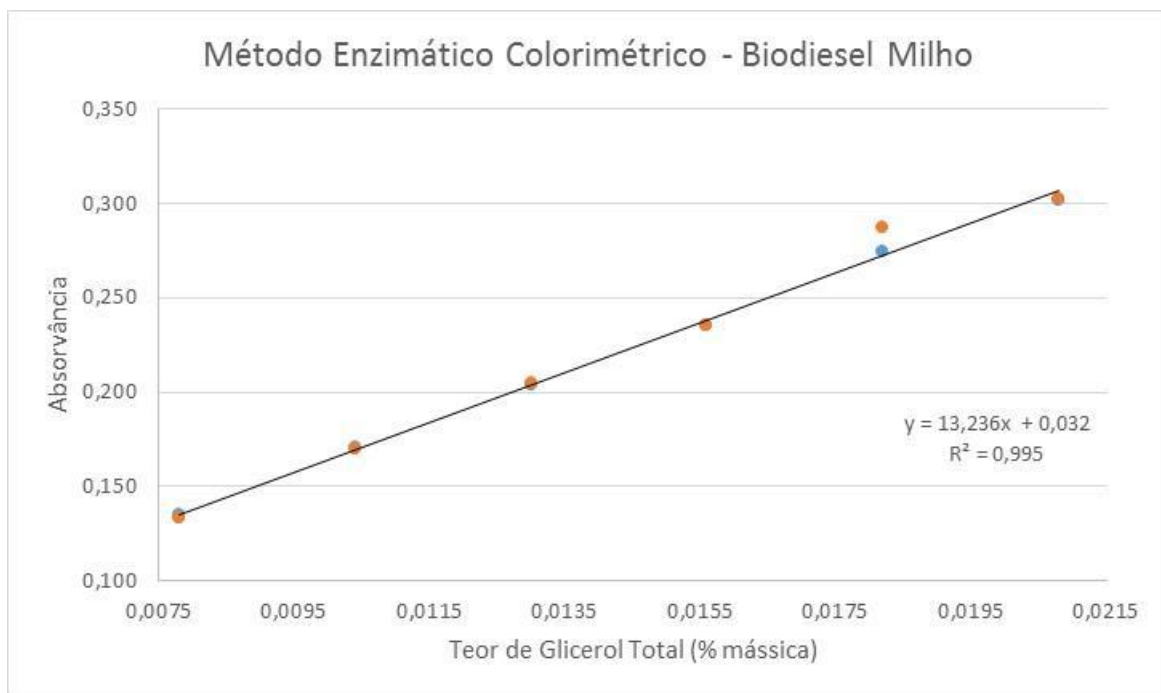
**APÊNDICE B – CURVAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA ANÁLISE DAS AMOSTRAS ESTUDADAS, OBTIDAS PELO MÉTODO ENZIMÁTICO COLORIMÉTRICO**



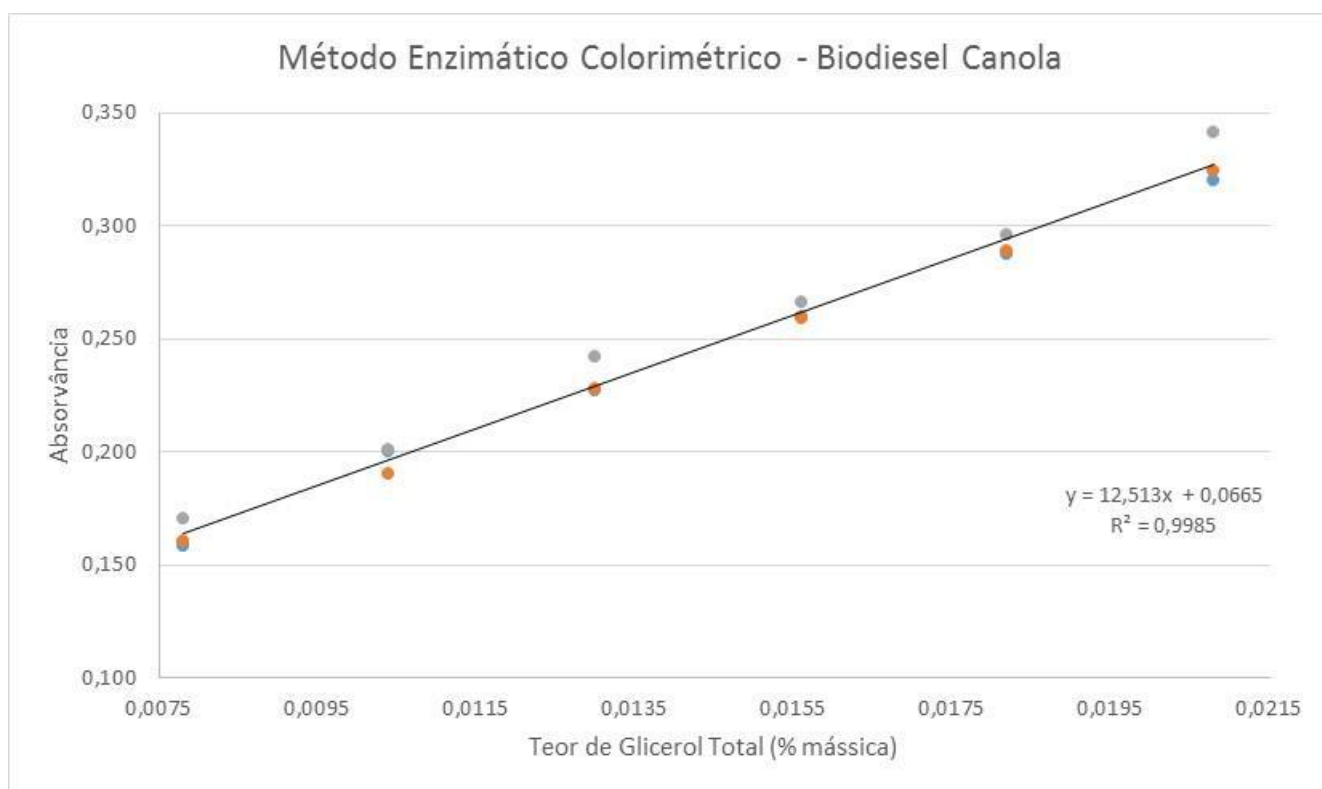
**Figura 1.** Curva analítica obtida pelo método enzimático colorimétrico, para cálculo do teor de glicerol total em biodiesel de óleo de fritura.



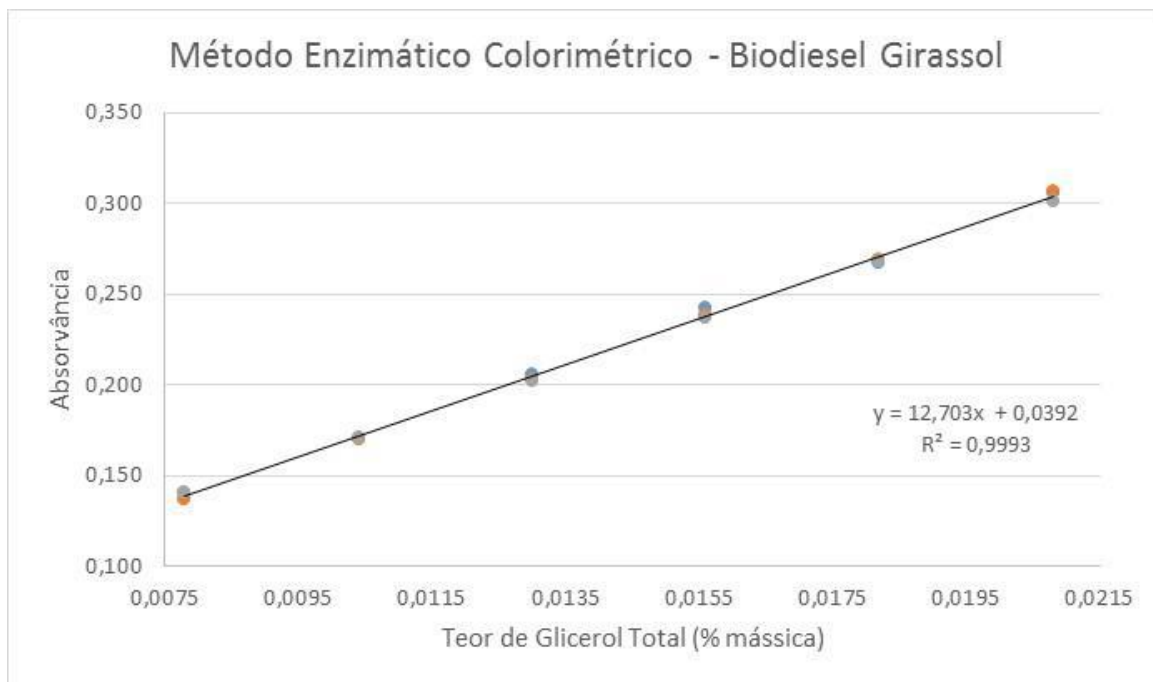
**Figura 2.** Curva analítica obtida pelo método enzimático colorimétrico, para cálculo do teor de glicerol total em biodiesel de soja.



**Figura 3.** Curva analítica obtida pelo método enzimático colorimétrico, para cálculo do teor de glicerol total em biodiesel de milho.



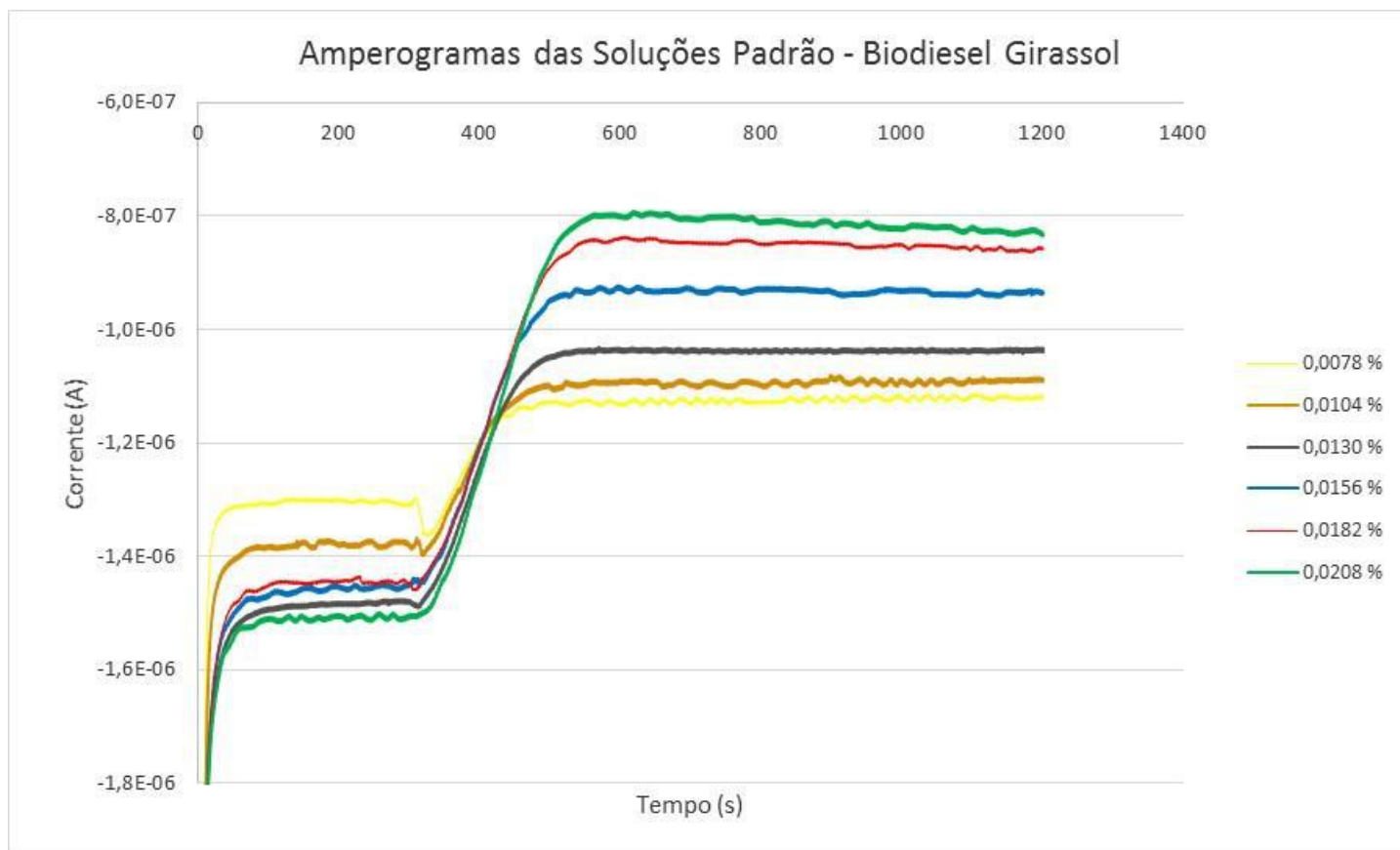
**Figura 4.** Curva analítica obtida pelo método enzimático colorimétrico, para cálculo do teor de glicerol total em biodiesel de canola.



**Figura 5.** Curva analítica obtida pelo método enzimático colorimétrico, para cálculo do teor de glicerol total em biodiesel de girassol.

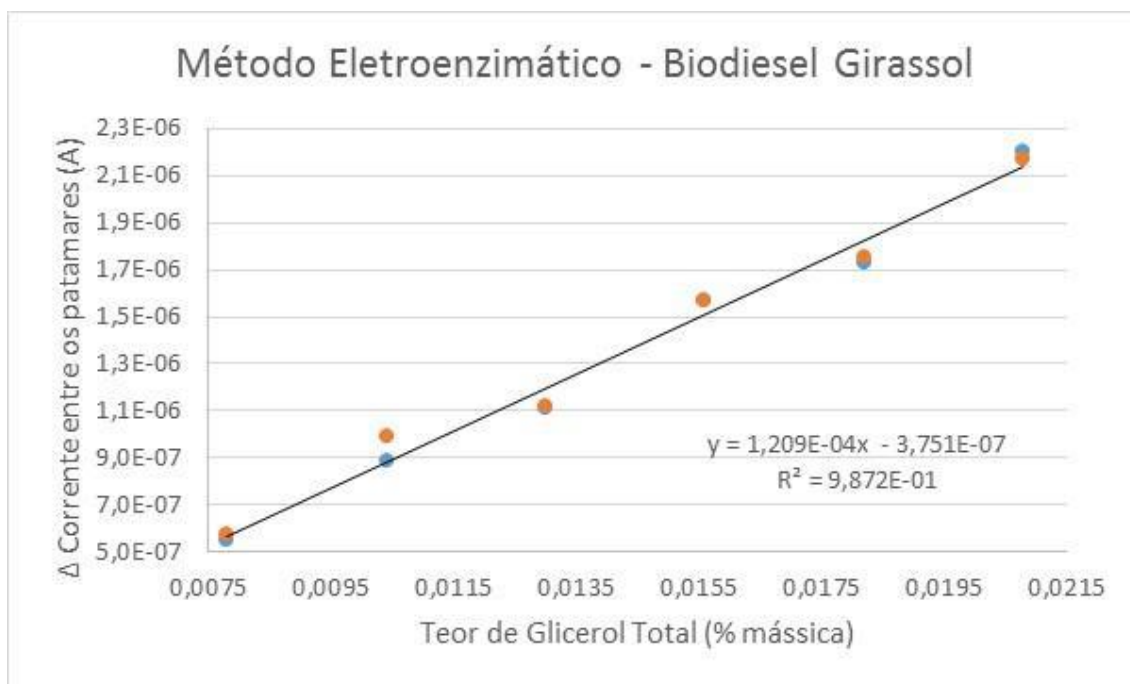


## APÊNDICE C – AMPEROGRAMAS DAS SOLUÇÕES PADRÃO



**Figura 1.** Amperogramas das soluções padrão usadas para a construção da curva analítica, obtidos pelo método eletroenzimático, para análise de biodiesel de girassol.

**APÊNDICE D – CURVAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA ANÁLISE DAS AMOSTRAS ESTUDADAS, OBTIDAS PELO MÉTODO ELETOENZIMÁTICO**



**Figura 1.** Curva analítica obtida pelo método eletroenzimático, para cálculo do teor de glicerol total em biodiesel de girassol.