



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

Separação e Isolamento de Acilgliceróis do Biodiesel por Extração em Fase Sólida (EFS) e Caracterização por Cromatografia

THIAGO CARVALHO CARDOSO
Projeto Final de Curso

ORIENTADORES: Débora de Almeida Azevedo (DQO-IQ-UFRJ)
Luiz Antonio d'Avila (DPO-EQ-UFRJ)
Débora França de Andrade (LABCOM-EQ-UFRJ)

RIO DE JANEIRO
Março/2012

Separação e Isolamento de Acilgliceróis do Biodiesel por Extração em Fase Sólida (EFS) e Caracterização por Cromatografia

Thiago Carvalho Cardoso

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

Aprovado por:

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

Luiz Antonio d'Ávila, D Sc.. – EQ/UFRJ
(Orientador)

Débora França de Andrade, D Sc. – EQ/UFRJ
(Orientadora)

Ligia Maria Marino Valente, D Sc.– IQ/UFRJ

Michelle Jakeline Cunha Rezende, D Sc. – IQ/UFRJ

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Março, 2012

Dedicatória

Dedico este projeto final de curso aos meus pais, Maristela de Andrade Carvalho e Carlos José Alves Cardoso e em especial a minha avó Ledda de Andrade Carvalho (*in memoriam*) pelo amor incondicional e por acreditarem em mim. Se hoje sou quem eu sou, devo tudo a eles.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao professor Luiz A. d'Ávila por ter me aceitado como aluno de projeto final e a professora Débora de Azevedo por ter aceitado a função de orientadora.

Quero agradecer também a Amanda P. Franco, por todo tempo dispensado a mim durante os treinamentos para utilização dos equipamentos no LABCOM, a Danielle Ignacio pelo auxílio nas análises de cromatografia em fase gasosa, a Deiseane Mendonça pelo auxílio nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência.

Ao Sr. Victor Solymossy do CENPES- Petrobras, por ceder o óleo de algodão utilizado neste projeto.

Aos companheiros do LABCOM, principalmente a Cristiane Gimenes e Rogério Cruz por todo auxílio técnico e pelo incentivo.

Aos Amigos que fiz durante o período da graduação, Laura G Sant'anna, Thiago Wolff, Débora Almeida, Valquíria Caetana, Juliana Araújo, Leonardo Rangel, Juliana Azevedo, Marcus Mattos e Thaís Prata.

Em especial, quero agradecer à Laura G. Sant'Anna, por toda dedicação, paciência, carinho, afeto, conselhos, amizade e amor, durante a graduação e em especial os últimos três anos em que estamos juntos como namorados.

Aos meus amigos de longa data do Colégio Luiz de Camões, aos amigos do Condomínio Independência, aos amigos do curso GPI e CNA.

Aos meus pais, Maristela A. Carvalho e Carlos José A. Cardoso, por poderem me proporcionar toda a educação para que eu pudesse chegar onde cheguei, seja no âmbito pessoal ou profissional.

Ao meu padrinho, Marcos de Andrade Carvalho por todo incentivo dado durante a graduação.

Ao meu irmão João Victor, pela paciência e por acreditar tanto em mim durante esta graduação e durante todo nosso tempo de convívio.

À minha nova-velha família, Lucimar A Furtado, Tatiane Furtado e Thaline Furtado, pelo carinho e atenção dada a mim durante todo este tempo ao qual convivemos bem e em harmonia. Gostaria de agradecer todos os

momentos que vivemos juntos, aos conselhos e por acreditarem em mim durante a graduação.

Ao Sr. Nelson Schineider, Domênico Capulli e Regina S. V. Nascimento pelas oportunidades de estágio que me fizeram vivenciar o mercado de trabalho, bem como seus bônus e ônus.

Em especial, quero agradecer a Débora Andrade, por todo o acompanhamento incondicional, pela orientação, pelo tempo cedido, pelas risadas, pelos momentos um pouco mais estressantes, porém não menos proveitosos, ou seja, por toda a atenção cedida a mim e ao meu projeto final de curso.

Por fim, gostaria de agradecer a todos presentes na minha vida e que de uma forma ou outra proporcionaram mudanças, pois uma parte do que sou hoje, é fruto de nossa convivência.

RESUMO

PROJETO DE CURSO

TÍTULO: SEPARAÇÃO E ISOLAMENTO DE ACILGLICERÓIS DO BIODIESEL POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS) E CARACTERIZAÇÃO POR CROMATOGRAFIA

ALUNO: Thiago Carvalho Cardoso

ORIENTADORES: Débora de Azevedo Almeida, DQO – Instituto de Química-UFRJ
Luiz Antônio d'Ávila, DPO – Escola de Química-UFRJ
Débora França de Andrade, LABCOM – Escola de Química-UFRJ

Durante a reação de transesterificação de óleos vegetais para a produção do biodiesel, ocorre a formação de acilgliceróis (intermediários de reação). Além destes intermediários, os triacilgliceróis (TAG) não reagidos também podem contaminar o produto final. A presença de monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e TAG no biodiesel pode levar a problemas operacionais severos quando utilizados em motores de combustão, incluindo a formação de depósitos no motor e o entupimento de filtros. Com o aumento da produção e consumo do biodiesel, é necessário o controle de qualidade para garantir um bom produto ao consumidor. Desta forma, especificações estão sendo adotadas de modo a assegurar a qualidade do biodiesel produzido. Porém, há a necessidade de se desenvolver técnicas mais rápidas, mais precisas e mais baratas, para que o controle seja extensivo e acessível, pois desta forma a garantia e a credibilidade sobre o produto será atestada.

No presente projeto, utilizaram-se cinco diferentes óleos vegetais (milho, canola, soja, algodão e girassol) para a obtenção de produtos de transesterificação de alta e baixa conversão. Utilizou-se a técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) para a determinação da conversão nos produtos de transesterificação obtidos. Esses produtos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por cromatografia em fase gasosa (CG). A técnica de extração em fase sólida (EFS) foi empregada para a separação e obtenção de frações enriquecidas em ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG) e em MAG, DAG e TAG. As frações obtidas por EFS foram analisadas por CG (ASTM D 6584, 2010 a) e por CLAE.

Foi possível evidenciar as diferenças de composição, por CLAE e CG, dos principais constituintes do biodiesel (EsMAG, MAG, DAG e TAG) quando analisamos os produtos de transesterificação de alta e baixa conversão. Além disso, as técnicas de CLAE e CG também foram empregadas para a avaliação da composição das frações obtidas através da EFS. A CLAE e a CG se mostraram adequadas para a avaliação da composição dos produtos de transesterificação obtidos com diferentes graus de conversão e, portanto, diferentes composições em cada classe (EsMAG, MAG, DAG e TAG).

ABSTRACT

FINAL COURSE PROJECT

TITLE: SEPARATION AND ISOLATION OF BIODIESEL GLYCERIDES IN SOLID PHASE EXTRACTION (SPE) AND CHROMATOGRAPHIC CHARACTERIZATION

STUDENT: Thiago Carvalho Cardoso

ADVISORS: Débora de Azevedo Almeida, DQO – Instituto de Química-UFRJ
Luiz Antônio d'Ávila, DPO – Escola de Química-UFRJ
Débora França de Andrade, LABCOM – Escola de Química-UFRJ

During the transesterification reaction of vegetable oils for biodiesel production, occurs the formation of glycerides (reaction intermediates). Besides these intermediates, the unreacted triacylglycerols (TAG) may also contaminate the final product. The presence of monoacylglycerols (MAG), diacylglycerols (DAG) and the TAG biodiesel can lead to severe operational problems when they are used in combustion engines, including the formation of engine deposits and clogging of filters. With the increase of the production and consumption of biodiesel, it is need the quality control to ensure a good product to the consumer. Therefore, specifications are being adopted to ensure the quality of biodiesel produced. However, it is a need to develop techniques faster, more accurate and cheaper, in order the control is extensive and accessible as in this way the security and credibility of the product will be certified.

In this work, it were used five different vegetable oils (corn, rapeseed, soybean, sunflower and cotton) to obtain a transesterification product of high and low conversion. It was used hydrogen nuclear magnetic resonance ($^1\text{H NMR}$) to determine the conversion of the obtained transesterification products. These products were analyzed through the high performance liquid chromatography (HPLC) and the gas chromatography (GC). It was used the technique of solid phase extraction (SPE) for separating and obtaining fractions enriched in methyl esters of fatty acids (EsMAG) and MAG, DAG and TAG. The fractions obtained through EFS were analyzed through GC (ASTM D 6584, 2010 a) and HPLC.

When analyzing the products of transesterification of high and low conversion, it was possible to highlight the differences in composition through HPLC and GC, the main constituents of biodiesel (EsMAG, MAG, DAG and TAG). Also were used HPLC and GC techniques for assessing the composition of the fractions obtained through EFS. The HPLC and GC showed to be adequated for assessment of the composition of the transesterification products obtained with different degrees of conversion, and therefore, different compositions in each class (EsMAG, MAG, DAG and TAG).

Lista de figuras

Figura 1. Reação geral de transesterificação. O álcool empregado para a produção de biodiesel é geralmente metanol ($R = CH_3$)	13
Figura 2. Produtos intermediários do processo de transesterificação	14
Figura 3. Reações consecutivas reversíveis para transesterificação dos triacilgliceróis	15
Figura 4. Equação de hidrólise de ésteres alquílicos a ácidos graxos livres (KNOTHE, GERPEN, KRAHL, RAMOS, 2006)	17
Figura 5. Deslocamentos químicos dos hidrogênios dos TAG (a exemplo do oleoil-linoleoil-linolenoil-glicerol) e EsMAG (R representando cadeias alifáticas) (ANDRADE, 2011)	20
Figura 6. Espectro de RN- ¹ H do produto de transesterificação do óleo de soja com baixa conversão (I3).	46
Figura 7. Classes de componentes presentes no produto de transesterificação do óleo de milho com baixa conversão	47
Figura 8. Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de milho, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão	49
Figura 9. Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de canola, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão	49
Figura 10. Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de soja, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão	50
Figura 11. Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de algodão, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão	50
Figura 12. Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de girassol, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão	50
Figura 13. Cromatograma de referência da norma ASTM D 6584 (2010)	54
Figura 14. Cromatogramas, obtidos por CG, dos produtos de transesterificação do óleo de milho, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão	55
Figura 15. Cromatogramas, obtidos por CG, dos produtos de transesterificação do óleo de canola, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão.	56
Figura 16. Cromatogramas, obtidos por CG, dos produtos de transesterificação do óleo de soja, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão	57
Figura 17. Cromatogramas, obtidos por CG, dos produtos de transesterificação do óleo de algodão, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão	58
Figura 18. Cromatogramas, obtidos por CG, dos produtos de transesterificação do óleo de girassol, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão	59
Figura 19. Curva de calibração da glicerina	61
Figura 20. Curva de calibração da monooleína.	62
Figura 21. Curva de calibração da dioleína	62
Figura 22. Curva de calibração da trioleína	63

Figura 23. Cromatograma: (a) controle, (b) fração 1, obtida na eluição com n-hexano e (c) fração 2, obtida na eluição com clorofórmio:metanol (2:1), do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de algodão	67
Figura 24. Cromatograma da amostra controle do produto de transesterificação do óleo de soja de baixa conversão	71
Figura 25. Cromatograma: (a) fração 1, obtida na eluição com n-hexano e (b) fração 2, obtida na eluição com clorofórmio:metanol (2:1), do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de soja	72

Lista de tabelas

Tabela 1. Estrutura química de alguns ácidos graxos (SRIVASTAVA <i>et al.</i> , 2000)	11
Tabela 2. Limites de quantidade (% massa) de MAG, DAG, TAG, EsAG e glicerina livre e total no B100 por especificações americana, europeia e brasileira	19
Tabela 3. Condições empregadas na análise de biodiesel, por CG, através das normas europeia (EN 14214, 2003) e americana (ASTM D-6584, 2010)	22
Tabela 4. Valores de massa (g) e volumes finais (mL) das soluções estoque em piridina (ASTM D6584, 2010)	36
Tabela 5. Volume de solução estoque (μL) necessários para o preparo das soluções padrão (ASTM D6584, 2010)	37
Tabela 6. Resultados da conversão (%) dos produtos de transesterificação segundo a equação de Gelbart <i>et al.</i> (1995)	45
Tabela 7. Identificação, por CLAE, dos componentes presentes nos produtos de transesterificação (adaptado de ANDRADE, 2011)	48
Tabela 8. Resultados da conversão (%) dos produtos de transesterificação por RMN- ^1H e CLAE.	51
Tabela 9. Resultados de composição (%) dos produtos de transesterificação por CLAE	53
Tabela 10. Tempos de retenção relativos usados para identificação dos picos (ASTM D6584, 2010)	60
Tabela 11. Resultados, em % massa, de MAG, DAG e TAG por CG	64
Tabela 12. Resultados, em % massa, de glicerina livre, combinada e total por CG	64
Tabela 13. Resultados de composição dos EsMAG e dos acilgliceróis (MAG, DAG e TAG), nas frações obtidas na EFS	69
Tabela 14. Resultados, em % massa, de glicerina combinada total por CG, nas frações obtidas na EFS	73

Lista de equações

Equação 1. Determinação da conversão por RMN- ¹ H por Gelbard <i>et al.</i> (1995)	20
Equação 2. Cálculo da glicerina livre	34
Equação 3. Cálculo do glicerina combinada (MAG, DAG, TAG)	38
Equação 4. Cálculo da glicerina total	39
Equação 5. Cálculo da glicerina combinada	39
Equação 7. Cálculo da composição das fases após a EFS	42

Lista de siglas

A	Área obtida diretamente de cada componente identificado no cromatograma obtido por CLAE
A_{Controle}	Área corrigida de cada classe de componentes, obtida por CLAE, sem passagem pelo processo de EFS
A_C	Área corrigida de cada componente identificado no cromatograma obtido por CLAE
A_{C Classe}	Área corrigida de cada classe de componentes, obtida por CLAE, após passagem pelo processo de EFS
A_{Total Classe}	Área total corrigida de todas as classes de componentes (MAG, EsMAG, DAG e/ou TAG)
A_{EM}	Área dos hidrogênios da metoxila dos ésteres metílicos e metínico em posição β - ao grupo olefínico do ácido ricinoléico
A_{CH2}	Área dos hidrogênios metilênicos em posição α - à carbonila
A_g	Área do pico da glicerina
A_{pi}	Área do pico do padrão interno
A_s	Área do pico do glicerídeo individual
a_s	Coefficiente angular das espécies Monooleína, dioleína ou trioleína
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM	American Society for Testing and Materials
b_g	Coefficiente linear da curva de calibração das espécies Monooleína, dioleína ou trioleína
B100	Biodiesel puro
BSTFA	<i>N,O</i> – bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
C_G	Conversão dos triacilgliceróis em ésteres metílicos segundo GELBARD <i>et al.</i> (1995)
C18	Grupo octadecilsilano
C_{CLAE}	Conversão dos triacilgliceróis em ésteres metílicos por CLAE
C_{Classe}	Composição relativa percentual de cada classe de componentes (MAG, EsMAG, DAG e/ou TAG)
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CG	Cromatografia gasosa
CGAR	Cromatografia gasosa de alta resolução
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAG	Diacilgliceróis
DEEL	Detector evaporativo de espalhamento de luz

DIC	Detector por ionização de chama
EFS	Extração em fase sólida
EM	Espectrometria de massas
EsMAG	Ésteres metílicos de ácidos graxos
EUA	Estados Unidos da América
FR	Fase reversa
FRNA	Fase reversa não aquosa
G	Percentagem massa de glicerina na amostra
G_s	Percentagem massa de glicerídeos individuais na amostra
GL	Glicerina
IV	Infravermelho
1-L	1-Monolinoleína
2-L	2-Monolinoleína
1,2-LL	1,2-Dilinoleína
1,3-LL	1,3-Dilinoleína
1-Ln	1-Monolinolenina
2-Ln	2-Monolinolenina
1,2-LnLn	1,2-Dilinoilenina
1,3-LnLn	1,3-Dilinoilenina
1,2-LLn	1,2-Linoleoil-linolenoil-glicerol
1,3-LLn	1,3-Linoleoil-linolenoil-glicerol
LnLnLn	Trilinoilenina
LLnLn	Dilinoilenoil-linoleoil-glicerol
LLLn	Dilinoilenoil-linolenoil-glicerol
LLL	Trilinoleína
M	Massa da amostra
M_{pi}	Massa do padrão interno
MAG	Monoacilgliceróis
MeL	Éster metílico do ácido linoleico
MeLn	Éster metílico do ácido linolênico
MeO	Éster metílico do ácido oleico
MeOH	Metanol
MM	Massa molecular
MM_{glicerina}	Massa molecular da glicerina
MM_{ac.graxo}	Massa molecular do ácido graxo
MM_{média}	Massa molecular média
MSTFA	N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
NCE	Número de carbono equivalente
1-O	1-Monooleína
2-O	2-Monooleína
1,2-OO	1,2-Dioleína

1,3-OO	1,3-Dioleína
1,2-OL	1,2-Oleoil-linoleoil-glicerol
1,3-OL	1,3-Oleoil-linoleoil-glicerol
1,2-OLn	1,2-Oleoil-linolenoil-glicerol
1,3-OLn	1,3-Oleoil-linolenoil-glicerol
OLnLn	Dilinolenoil-oleoil-glicerol
OLLn	Oleoil-linoleoil-linolenoil-glicerol
OLL	Dilinoleoil-oleoil-glicerol
OOLn	Dioleoil-linolenoil-glicerol
OOL	Dioleoil-linoleoil-glicerol
OOO	Trioleína
OOG	Dioleoil-gadoleoil-glicerol
ppm	Partes por milhão
RMN-¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TAG	Triacilgliceróis
UV	Ultravioleta

Sumário

1	Introdução	2
2	Objetivo	7
2.1	Objetivo geral	7
2.2	Objetivos específicos	7
3	Revisão bibliográfica	8
3.1	O biodiesel	8
3.1.1	Óleos Vegetais	8
3.1.2	A utilização de óleos vegetais como combustíveis	11
3.1.3	A produção do biodiesel	13
3.1.4	O controle de qualidade do biodiesel	17
3.2	Métodos de análise do biodiesel	19
3.2.1	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio	19
3.2.2	Cromatografia em fase gasosa	21
3.2.3	Cromatografia líquida de alta eficiência	23
3.2.4	Extração em fase sólida	28
4	Materiais e métodos	32
4.1	Reações de transesterificação	32
4.1.1	Óleos vegetais e reagentes	32
4.1.2	Reações de transesterificação	32
4.2	Análise por RMN- ¹ H	33
4.2.1	Reagentes.....	33
4.2.2	Análise por RMN ¹ H	34
4.2.3	Determinação da conversão por RMN- ¹ H	34
4.3	Análise por cromatografia gasosa	35
4.3.1	Reagentes	35
4.3.2	Análise de MAG, DAG, TAG por CG	35
4.3.2.1	Preparo das curvas de calibração dos padrões	36
4.3.2.2	Cálculo da glicerina livre, combinada e total por CG	38
4.4	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência	39
4.4.1	Reagentes	39
4.4.2	Método CLAE	40
4.5	Extração em fase sólida	41
4.5.1	Solventes	41
4.5.2	Separação e isolamento dos acilgliceróis por EFS	41
4.5.3	Determinação da área percentual por CLAE	42
5	Resultados e discussão	44
5.1	Obtenção de produtos de transesterificação	44
5.2	Determinação da conversão dos produtos de transesterificação por RMN- ¹ H	45
5.3	Análise dos produtos de transesterificação por CLAE	46
5.3.1	Determinação da conversão dos produtos de transesterificação por CLAE	51
5.3.2	Determinação de MAG, DAG, TAG e EsMAG por CLAE	52
5.4	Análise dos produtos de transesterificação por CG	54
5.4.1	Determinação de glicerina livre, combinada e total por CG	61

5.5	Separação e isolamento dos acilgliceróis por EFS	66
5.5.1	Análise das frações da EFS por CLAE	66
5.5.2	Análise das frações da EFS por CG	70
6	Conclusões	75
7	Perspectivas futuras	78
8	Referências	80
9	Anexos	87

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1. Introdução

A partir da primeira crise petrolífera, em 1973, a biomassa se tornou uma fonte de energia alternativa ao combustível fóssil. Dada a dependência do setor dos transportes em relação ao petróleo, a biomassa ganhou atenção especial devido ao seu potencial para a produção de combustíveis alternativos, em especial o biodiesel, no qual a utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em motores com funcionamento baseado no ciclo diesel (KNOTHE, 2002; HAAS *et al.*, 2001), sem haver a necessidade de nenhuma modificação no motor (LUE *et al.*, 2001).

O biodiesel pode ser definido como sendo um mono-alquil éster de ácidos graxos derivado de fontes renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais (CANAKCI *et al.*, 2001; MONYEM *et al.*, 2001), obtido através de um processo de transesterificação, no qual ocorre a transformação de triacilgliceróis (TAG) em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos (ENCINAR *et al.*, 1999; NOUREDDINI *et al.*, 1998). O biodiesel encontra-se registrado na “Environment Protection Agency – EPA – USA” como combustível e como aditivo para combustíveis, e pode ser usado puro a 100% (B100), em mistura com o diesel de petróleo (exemplo: B20 é constituído de 20 % de biodiesel e 80 % de diesel), ou em uma proporção baixa como aditivo de 1 a 5 % (RAMOS *et al.*, 2000).

Dentre as características do biodiesel, algumas são responsáveis pela autopromoção deste biocombustível e podemos destacar as seguintes: é virtualmente livre de enxofre e aromáticos, apresenta alto número de cetano, possui teor médio de oxigênio em torno de 11 %, maior ponto de fulgor que o

diesel convencional, apresenta nicho de mercado específico e diretamente associado a atividades agrícolas (RAMOS, 1999).

O biodiesel é geralmente obtido através da reação de transesterificação de óleos vegetais com álcoois primários. Quimicamente, os óleos vegetais são triésteres ou TAG naturais de ácidos graxos saturados ou insaturados, contendo cadeias de 8 a 24 átomos de carbono com diferentes graus de insaturação. Conforme a espécie de oleaginosa, variações na composição química do óleo vegetal são expressas por variações na relação molar entre os diferentes ácidos graxos presentes na estrutura, e desta forma constituem uma fonte diversificada da base química dos biocombustíveis (OLIVEIRA, *et al.*, 2008).

Durante a reação de transesterificação para produção do biodiesel, pode ocorrer a formação de intermediários da reação, monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG), caso as conversões não sejam completas. Além disso, podem estar presentes TAG, oriundos das fontes oleaginosas. De acordo com a concentração dos glicerídeos não reagidos (TAG) ou parcialmente reagidos (MAG e DAG) presentes no biodiesel, a viscosidade do combustível a qual o mesmo será adicionado poderá aumentar e, como consequência, o aumento da viscosidade pode reduzir a eficiência da combustão, causar o entupimento do filtro de combustível e ainda levar a ocorrência de depósitos em partes do motor (BOWMAN, HOLLIGOSS, RASMUSSEN, 2006).

A reação de transesterificação de um óleo vegetal com álcoois pode ser conduzida tanto em meio ácido quanto em meio alcalino. Geralmente, a reação de síntese do biodiesel empregada industrialmente utiliza uma razão molar óleo:álcool de 1:6, na presença de 0,4 % de hidróxido de sódio ou de potássio (catalisador), porque o meio básico apresenta melhor rendimento e menor tempo

de reação que o meio ácido (FREEDMAN, BUTTERFIELD, PRYDE, 1986). Por outro lado, o excesso de agente transesterificante (álcool primário) faz-se necessário devido ao caráter reversível da reação (RINALDI, *et al.*, 2007)

O controle de qualidade é um aspecto muito importante quando pensamos em comercialização do biodiesel. Como a preocupação com a qualidade do biodiesel oferecido ao consumidor é crescente em todo o mundo, o número de normas ou portarias que procuram especificar parâmetros a fim de padronizar a produção do biodiesel está aumentando. Como exemplo, pode-se citar a norma europeia EN 14214 (2003) e a americana ASTM D6584 (2010), assim como a resolução nº 7, de 19 de março de 2008 da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) (ANP, 2008).

Várias técnicas cromatográficas e espectroscópicas têm sido aplicadas para a análise de biodiesel (ésteres metílicos de ácidos graxos, EsMAG) e/ou acompanhamento da reação de transesterificação (PLANK, LORBEER, 1994; GELBARD *et al.*, 1995; MITTELBAACH, ROTH, BERGMANN, 1996; ZAGONEL, PERALTA-ZAMORA, RAMOS, 2004; ARZAMENDI *et al.*, 2006; TÜRKAN, KALAY, 2006; STAVARACHE *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2008). Artigos de revisão descritos na literatura apontam que os métodos cromatográficos são os mais utilizados, principalmente, a cromatografia em fase gasosa (CG) (PINTO *et al.*, 2005; MONTEIRO *et al.*, 2008).

Além da preocupação do controle de qualidade, está a necessidade pelo desenvolvimento de técnicas mais rápidas, mais precisas e mais baratas, para que o controle seja extensivo e acessível, pois desta forma a garantia e a credibilidade sobre o produto será atestada. Para isso, técnicas já conhecidas estão sendo adaptadas para atender as necessidades de controle do biodiesel.

Portanto, a análise da composição de ácidos graxos constitui o primeiro procedimento para a avaliação preliminar da qualidade do óleo bruto e/ou de seus produtos de transformação e isto pode ser obtido através de várias técnicas analíticas, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (PLANK, LORBEER, 1994), a CG (MITTELBAACH, ROTH, BERGMANN, 1996) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H) (GELBARD *et al.*, 1995).

Capítulo 2

Objetivo

Capítulo 2. Objetivo

2.1. Objetivo Geral

Separar de constituintes de biodiesel (monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis e éster metílicos de ácidos graxos), através da extração em fase sólida visando à obtenção de frações enriquecidas em classes e/ou constituintes individuais. Desta forma, simplificar a caracterização por métodos analíticos, notadamente os que utilizam técnicas cromatográficas, como a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Sintetizar produtos de transesterificação de diferentes origens (soja, milho, girassol, canola e algodão) e graus de conversão, e portanto, de diferentes composições de cada classe de componentes (EsMAG, MAG, DAG e TAG), para serem usadas como matéria-prima na etapa de extração em fase sólida e nas caracterizações cromatográficas (CG e CLAE).
- 2) Avaliar os resultados da conversão dos produtos de transesterificação sintetizados por RMN-¹H e CLAE.

3) Separar os produtos de transesterificação sintetizados, por EFS, em frações enriquecidas em EsMAG (biodiesel) e em glicerina combinada (MAG, DAG e TAG).

4) Comparar os resultados obtidos da caracterização cromatográfica (CG e CLAE) dos produtos de transesterificação sintetizados, assim como das frações obtidas por EFS.

Capítulo 3

Revisão

Bibliográfica

Capítulo 3. Revisão Bibliográfica

3.1. O biodiesel

3.1.1. Os óleos vegetais

Os óleos vegetais são constituídos principalmente de triacilgliceróis (TAG, muitas vezes chamados de triglicerídeos - cerca de 90 a 98 %), bem como de monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG), ácidos graxos livres (AGL), fosfolípidios, fosfatídeos, carotenos, compostos de enxofre e traços de água. Quimicamente, os TAG são ésteres de ácidos graxos (AG) com glicerol (1,2,3-propanotriol; glicerol é muitas vezes chamado de glicerina).

Os TAG de óleos vegetais e gordura animal contêm, tipicamente, diferentes tipos de AG. Assim, diferentes AG podem estar ligados à cadeia do glicerol. Os diferentes AG que estão contidos nos TAG revelam o perfil de AG (ou composição em AG) de óleos vegetais e gorduras animais. Como cada AG apresenta propriedades químicas peculiares, o perfil de AG é, provavelmente, o parâmetro de maior influência sobre as propriedades dos óleos vegetais e gorduras animais de onde se originam. Os ácidos graxos variam quanto ao comprimento da cadeia de carbono e quanto ao número de ligações duplas (**Tabela 1**) (SRIVASTAVA *et al.*, 2000).

Tabela 1. Estrutura química de alguns ácidos graxos (SRIVASTAVA *et al.*, 2000).

Ácido graxo	Nome sistemático	NC:NLD	Fórmula
Láurico	Ácido Dodecanóico	12:0	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
Mirístico	Ácido Tetradecanóico	14:0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Palmítico	Ácido Hexadecanóico	16:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Esteárico	Ácido Octadecanóico	18:0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Aracnídico	Ácido Eicosanóico	20:0	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
Berênico	Ácido Docosanóico	22:0	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
Lignocérico	Ácido Tetracosanóico	24:0	C ₂₄ H ₄₈ O ₂
Oléico	Ácido <i>Cis</i> -9-octadecenóico	18:1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Linoleico	Ácido <i>Cis</i> -9, <i>cis</i> -12-octadecadienóico	18:2	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
Linolênico	Ácido <i>Cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15-octadecatrienóico	18:3	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
Erucico	Ácido <i>Cis</i> -13-docosenóico	22:1	C ₂₂ H ₄₂ O ₂

NC- Número de Carbonos

NLD-Número de Ligações Duplas

3.1.2. A utilização de óleos vegetais como combustível

Por se tratar de uma fonte de energia renovável e seu uso sustentado não provocar danos ao meio ambiente, a biomassa tem atraído muita atenção nos últimos tempos. Dentre os derivados de biomassa prontamente disponíveis, os óleos vegetais têm sido largamente investigados como candidatos a programas de energia renovável, pois proporcionam uma geração descentralizada de energia e um apoio à agricultura familiar, criando melhores condições de vida em regiões carentes, valorizando potencialidades regionais e oferecendo alternativas a problemas econômicos e sócio-ambientais. Muitos óleos vegetais vêm sendo aplicados como combustível, os mais estudados são os óleos de soja, colza, girassol, dendê e óleos reciclados (PINTO *et al.*, 2005).

Os óleos vegetais ocupam uma posição proeminente no desenvolvimento de combustíveis alternativos embora existam muitos problemas associados ao uso de óleos vegetais *in natura* diretamente em motores diesel. Dentre os problemas ocasionados pelo uso direto de óleos

vegetais, se destacam (MEHER *et al.*, 2006): a) Atomização ineficiente do combustível nos bicos injetores resultando na obstrução dos orifícios, devido à alta viscosidade do óleo; b) Depósitos de carbono; c) Colagem de anéis no bico injetor, aumentando a pressão de bombeamento; d) Degradação do óleo lubrificante pela contaminação deste com o óleo vegetal e e) Problemas de lubrificação.

Outras desvantagens do uso de óleos vegetais, e principalmente da gordura animal, são a alta viscosidade (cerca de 11-17 vezes maior do que a do óleo diesel), a baixa volatilidade e o seu caráter poliinsaturado, o que causa atomização ineficiente e formação de depósitos nos motores levando à combustão incompleta (ENCINAR *et al.*, 1999; ENCINAR *et al.*, 2002; DORADO *et al.*, 2004; AGARWAL *et al.*, 2001). Estes problemas são associados ao tamanho das moléculas dos triacilgliceróis e à elevada MM (PETERSON *et al.*, 1983; MEHER *et al.*, 2006).

São várias as alternativas de transformações químicas ou físicas dos óleos vegetais para gerar combustíveis capazes de colocar em funcionamento um motor diesel sem problemas operacionais, como a formação de incrustações e depósitos. O uso de misturas binárias com petrodiesel, microemulsificação (ou mistura co-solvente), pirólise e transesterificação são alguns processos utilizados para diminuir os problemas com a alta viscosidade dos óleos vegetais (SCHWAB *et al.*, 1987). Apenas a transesterificação leva a produtos comumente denominados de biodiesel, isto é, ésteres alquílicos de óleos e gorduras (AL-WIDYAN *et al.*, 2002; DMYTRYSHYN *et al.*, 2004; ENCINAR *et al.*, 1999; NASCIMENTO *et al.*, 2001). Entre essas alternativas, a transesterificação tem se apresentado como a melhor opção (ENCINAR *et al.*,

1999; NOUREDDINI *et al.*, 1998), visto que o processo é relativamente simples (SHUCHARDT *et al.*, 1998)

3.1.3. A produção do biodiesel

O biodiesel é normalmente obtido através de um processo de transesterificação, no qual ocorre a transformação de triacilgliceróis em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos (etílicos ou metílicos) na presença de um catalisador (KOH, NaOH, NaOCH₃, etc). Neste processo também ocorre à formação do glicerol¹, conforme pode ser observado na

Figura 1.

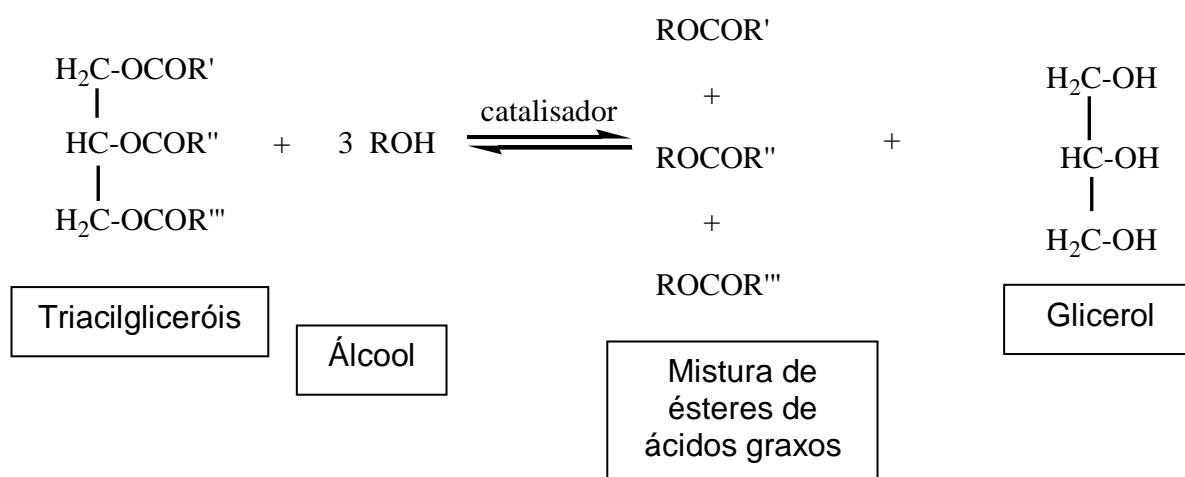


Figura 1. Reação geral de uma reação de transesterificação. O álcool empregado para a produção de biodiesel é geralmente metanol (R = CH₃).

¹ Apesar deste produto dispor de aplicações no mercado de cosméticos, o aumento de sua oferta precisa ser precedido de análise sobre aplicação em outros segmentos, o que pode configurar uma área específica de pesquisa, a gliceroquímica.

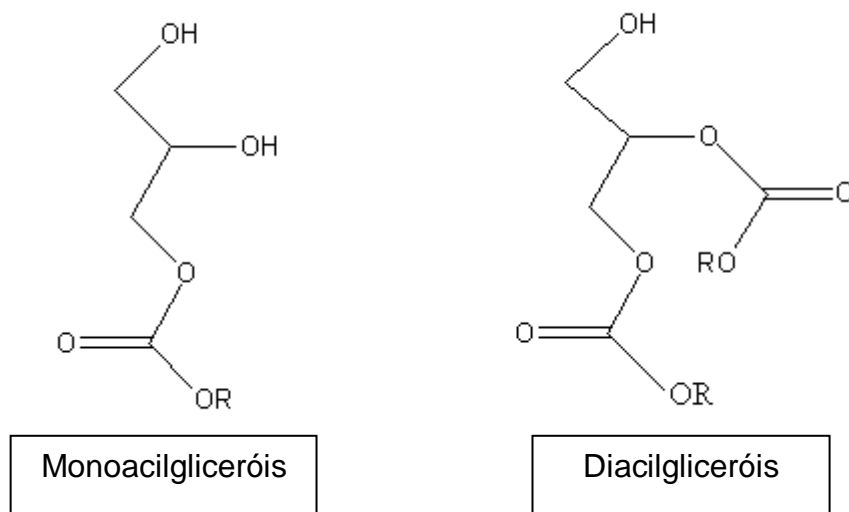


Figura 2. Produtos intermediários do processo de transesterificação.

Os DAG e os MAG são intermediários neste processo (MEHER *et al.*, 2004) (**Figura 2**).

Várias revisões bibliográficas relacionadas à transesterificação como processo para a produção de biodiesel já foram publicadas na literatura (BONDIOLI, 2004; HOYDONCKX *et al.*, 2004; DEMIRBAS, 2003; SHAH *et al.*, 2003; HAAS *et al.*, 2002; FUKUDA *et al.*, 2001; MA, HANNA, 1999; SCHUCHARDT *et al.*, 1998; GUTSCHE, 1997).

A transesterificação é uma classe de reação onde um éster é transformado em outro a partir da troca da parte alcóxi. Quando o éster original reage com um álcool, o processo de transesterificação é chamado alcoólise (**Figura 3**). Uma vez que a reação é um processo em equilíbrio, a transformação ocorre essencialmente pela simples mistura dos dois componentes. Entretanto, a presença de um catalisador (tipicamente um ácido ou uma base forte) acelera consideravelmente o estabelecimento do equilíbrio

e o álcool tem que ser usado em excesso a fim de se obter um alto rendimento do éster produzido.

De modo geral, a reação de transesterificação ocorre através de três reações consecutivas reversíveis (**Figura 3**). Os TAG são convertidos a DAG, MAG e finalmente a glicerol (glicerina). Três mols de álcool são necessários para reagir com um mol do TAG, produzindo um mol de éster em cada etapa. Apesar da reversibilidade da reação, durante a produção de ésteres alquílicos de óleos vegetais (biodiesel), a reação reversa não ocorre, ou seja, é consideravelmente negligenciável, porque o glicerol formado na reação não é miscível no produto, levando a um sistema de duas fases (SCHWAB *et al.*, 1987).

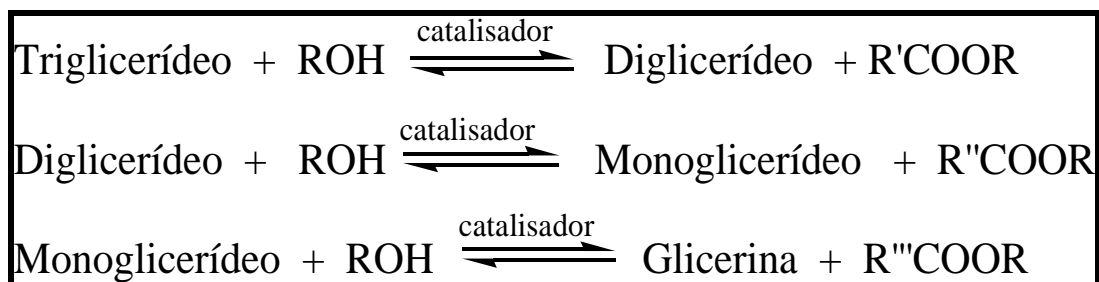


Figura 3. Reações consecutivas reversíveis para transesterificação dos triacilgliceróis (MEHER, VIDYA SAGAR, NAIK, 2004).

Por ser reversível, na reação de transesterificação é comum a utilização de um excesso de álcool, para que o equilíbrio seja deslocado de modo a produzir os ésteres de ácidos graxos.

O metanol é o álcool predominantemente utilizado em todo o mundo para a produção de EsMAG (FAME, *Fatty Acid Methyl Esters*) para uso como biodiesel e em motores estacionários, testes de campo e demonstrações práticas. As razões para esta escolha se devem ao fato de que o metanol é de longe o mais barato dos álcoois; nos Estados Unidos, o metanol é 50 % mais

barato que o etanol, seu competidor mais próximo. Em algumas regiões, mais notadamente no Brasil, a disponibilidade de matéria-prima e tecnologia permite a produção economicamente viável de etanol por processos fermentativos, resultando em um produto que é mais barato que o metanol (KNOTHE *et al.*, 2006). Nestas áreas, o biodiesel de natureza etílica é um produto em potencial. O etanol também foi utilizado para a produção de biodiesel nos Estados Unidos em situações onde havia disponibilidade de etanol derivado da fermentação de substratos ricos em amido (LOWE *et al.*, 1988). No entanto, a análise econômica detalhada deste processo ainda não foi realizada, e não foi esclarecido se esta operação poderia ser economicamente viável.

Além do tipo de catalisador (ácido ou básico), outras variáveis têm sido investigadas na reação de transesterificação incluindo a razão molar álcool:óleo vegetal, a temperatura, o tempo de reação, o grau de refino do óleo vegetal empregado e o efeito da presença de umidade e AGL (FREEDMAN, PRYDE, MOUNTS, 1984). Para que a reação de transesterificação tenha altos rendimentos, o álcool deve ser livre de umidade e o conteúdo de ácidos graxos livres do óleo vegetal deve ser inferior a 0,5 % (FREEDMAN, PRYDE, MOUNTS, 1984). A ausência de umidade na reação de transesterificação é importante, porque de acordo com a equação apresentada na **Figura 4** (representada para ésteres metílicos), pode ocorrer a hidrólise dos ésteres alquílicos a AGL. Da mesma forma, a reação de TAG com água pode formar AGL porque estas substâncias também são ésteres.

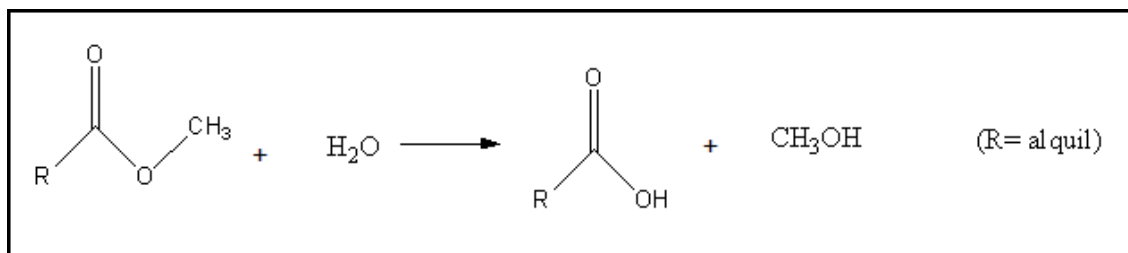


Figura 4. Equação de hidrólise de ésteres alquílicos a ácidos graxos livres (KNOTHE, GERPEN, KRAHL, RAMOS, 2006).

É importante ressaltar que na temperatura de 32^oC, a transesterificação atinge 99 % de conversão em 4 horas quando um catalisador alcalino é empregado (NaOH ou NaOCH₃) (FREEDMAN, PRYDE, 1984). Em temperaturas ≥ 60 °C, empregando óleos vegetais refinados em razões molares álcool:óleo de pelo menos 6:1, a reação pode se completar em 1 hora, fornecendo ésteres metílicos, etílicos ou butílicos (FREEDMAN, PRYDE, 1984). Apesar dos óleos brutos também poderem ser transesterificados, os rendimentos de reação são geralmente reduzidos, devido à presença de gomas e materiais de outra natureza química no óleo vegetal. Esta condição (temperatura de 60 °C e razão molar metanol:óleo de 6:1) têm se definido como uma condição padrão para a transesterificação metílica. Outros álcoois (etanol ou butanol) requerem temperaturas mais altas (75 e 114 °C, respectivamente) para uma conversão otimizada (FREEDMAN, PRYDE, 1984).

3.1.4. O controle de qualidade do biodiesel

A demanda por um combustível que se enquadre em normas que atendam os parâmetros ambientais está cada vez mais exigente. Dentre os bicomcombustíveis, o biodiesel já mostrou possuir uma forte pré-disposição a estes

parâmetros. Uma vez que é proveniente de fontes renováveis e possui um padrão de emissão de poluentes durante o processo de combustão melhor do que outros combustíveis (CORREA, ARBILLA, 2006).

Visando a qualidade do produto a ser exposto ao mercado consumidor, faz-se necessário estabelecer limites dos constituintes do biodiesel. Dada à necessidade de um controle de qualidade eficiente, a nova busca está na qualidade das análises laboratoriais. Com a demanda de produção cada vez maior, a rapidez e a precisão dos resultados de uma análise são consideradas pontos importantes para manutenção da qualidade do biodiesel.

Uma das justificativas para uma maior atenção sobre a especificação do biodiesel está na ocorrência de problemas operacionais críticos ao serem utilizados fora dos padrões, como por exemplo, a formação de depósitos nos motores e entupimento dos filtros (MITTELBACH *et al.*, 1983; PLANK, LORBEER, 1995; HOLCAPEK *et al.*, 1999). Estes problemas ocorrem devido à presença de resíduos de TAG não transesterificado, álcool, resíduo de catalisadores e AGL não reagidos. Além desses problemas, a estocagem do biodiesel também oferece risco à qualidade do mesmo, pois podem ocorrer processos oxidativos e absorção de umidade, incrementando assim os contaminantes que podem estar presentes no biodiesel (KNOTHE *et al.*, 2006).

Como citado anteriormente, existem atualmente algumas normas que já especificam parâmetros dos constituintes do biodiesel como a americana (ASTM D 6584, 2010a) e a europeia (EN 14214, 2003), assim como a resolução brasileira (ANP, 2008). Na **tabela 2**, estão presentes as especificações de cada uma destas normas.

Tabela 2. Limites de quantidade (% massa) de MAG, DAG, TAG, EsAG e glicerina livre e total no B100 por especificações americana, européia e brasileira.

Parâmetros	ASTM D 6751 (2002)	EN 14214 (2003)	Resolução Nº 7 ANP (2008)
MAG	-	≤ 0,80	anotar
DAG	-	≤ 0,20	anotar
TAG	-	≤ 0,20	anotar
GL Livre	≤ 0,02	≤ 0,02	≤ 0,02
GL Total	≤ 0,24	≤ 0,25	≤ 0,25
Ésteres	-	≥ 96,5	≥ 96,5

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

As normas americana e europeia, como a resolução brasileira são bastante similares, porém apresentam pontos flexíveis, devido a grande diversidade de matérias-primas disponíveis no Brasil (GUARIEIRO, 2006).

3.2. Métodos de análise do biodiesel

Durante os últimos anos, vários métodos analíticos foram desenvolvidos para analisar o teor de ésteres de ácidos graxos, MAG, DAG e TAG obtidos pela transesterificação de óleos vegetais (LIU *et al.*, 2008; STAVARACHE *et al.*, 2007; TURKAN, KALAY, 2006; ZAGONEL *et al.*, 2004; ARZAMENDI *et al.*, 2006) . Dentre estes métodos, apenas os realizados com as técnicas de RMN-¹H, CG e CLAE serão abordados neste projeto.

3.2.1. Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

O primeiro estudo apresentado na literatura para a determinação da conversão da reação de transesterificação por RMN-¹H foi o trabalho de

Gelbard *et al.* (1995). Este trabalho utilizou uma relação entre os sinais dos hidrogênios metilênicos em posição α - à carbonila (A_{CH_2} - 2,3 ppm) e dos hidrogênios da metoxila dos ésteres metílicos (A_{EM} - 3,7 ppm). A seguir encontra-se apresentada a **equação 1** descrita por Gelbard *et al.* (1995), para a determinação da conversão por RMN- 1H .

$$C_G = \frac{2A_{EM}}{3A_{CH_2}} \times 100$$

Equação 1. Determinação da conversão por RMN- 1H por Gelbard *et al.* (1995).

A **figura 5** apresenta os deslocamentos químicos dos hidrogênios dos TAG (a exemplo do oleoil-linoleoil-linolenoil-glicerol) e dos EsMAG .

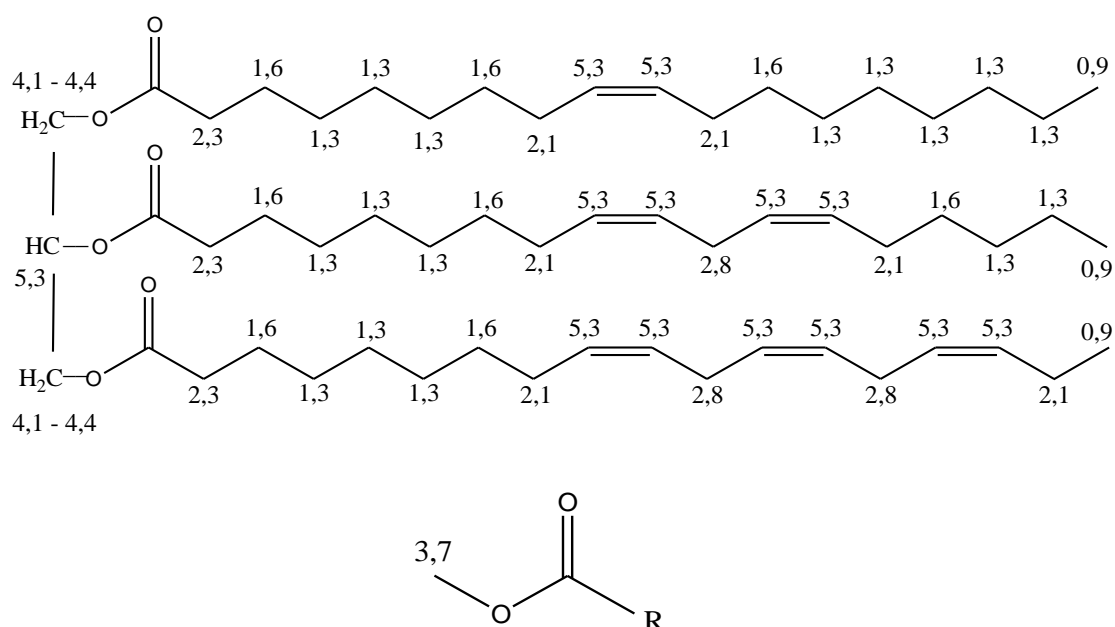


Figura 5. Deslocamentos químicos dos hidrogênios dos TAG (a exemplo do oleoil-linoleoil-linolenoil-glicerol) e EsMAG (R representando cadeias alifáticas) (ANDRADE, 2011).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou um trabalho referente a este tema, onde, propôs uma expressão para o cálculo do grau de insaturação, por RMN-¹H, além de propor equações para determinação das incertezas para as equações clássicas (ANDRADE *et al.*, 2012).

3.2.2. Cromatografia em fase gasosa

A CG é utilizada para a separação de compostos volatilizáveis, isto é, os analitos a serem separados devem apresentar uma razoável pressão de vapor à temperatura de separação. Do mesmo modo, à medida que aumenta o caráter iônico do composto e, portanto diminui a sua volatilidade, também é reduzida a possibilidade de separação via CG. Por outro lado, na CLAE separam-se compostos polares e não polares nos quais a pouca volatilidade não é inconveniente limitante (AQUINO NETO, NUNES, 2003).

Na CG é necessário que a amostra seja suficientemente volátil, a fim de que possa passar através da coluna na forma de vapor, e estável termicamente para não se decompor nas condições de separação. Os métodos de detecção utilizados em CG são mais rápidos e sensíveis, a aparelhagem mais fácil de ser manipulada e em geral mais barata (AQUINO NETO, NUNES, 2003).

Atualmente, a análise de biodiesel é amplamente realizada através da CG (KNOTHE, 2006). Dentre os métodos utilizados para o controle de qualidade do biodiesel existem normas técnicas com o objetivo de padronizar a análise e garantir a reprodutibilidade do método. Pode-se citar a norma europeia EN 14214 (2003) e a norma americana ASTM D-6584 (2010). Ambas as normas utilizam a CG como técnica de análise. A **tabela 3** apresenta as

condições empregadas na análise de biodiesel, por CG, através dessas normas.

Tabela 3. Condições empregadas na análise de biodiesel, por CG, através das normas europeia (EN 14214, 2003) e americana (ASTM D-6584, 2010).

	EN 14214	ASTM D-6584
Coluna capilar	100 % dimetilpolissiloxano ou 5 % difenilpolissiloxano; Comprimento: 10 m; Diâmetro interno: 0,32 mm; Espessura do filme: 0,1mm	5 % difenil-polidimetilsiloxano; Comprimento: 10 ou 15 m; Diâmetro interno: 0,32 mm; Espessura do filme: 0,1mm
Temperatura do forno	Inicial: 50 °C e Final: 370 °C	Inicial: 50 °C e Final: 380 °C
Injetor	<i>On Column</i>	<i>On Column</i>

A partir da **tabela 3** podemos observar que as duas normas não apresentam grandes diferenças nas condições de análise.

Mittelbach, em 1993, avaliou dois sistemas de detecção para análise de glicerina livre, por ionização em chama - DIC e por espectrometria de massa (EM). No estudo, foram obtidos elevados percentuais de recuperação do analito e limites de detecção da ordem de 10^{-5} % para EM e 10^{-4} % para DIC. Como conclusão, o autor afirma que a detecção por EM evita a sobreposição de picos, permitindo o uso de colunas mais curtas (MITTELBACK, 1993).

Baseado no método ASTM D6584 (2010) e calibração externa com solução padrão de mono-, di- e trioleína e glicerina, Plank utilizou a CG, em alta temperatura, para a quantificação de glicerina livre, MAG, DAG e TAG em biodiesel, em uma mesma corrida cromatográfica. Neste trabalho, o autor relatou a maior eficiência do MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida)

como derivatizante quando comparado ao BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) (PLANK, 1995).

Há também relatos sobre alteração nos métodos para simplificação do mesmo. Esse foi o caso do trabalho de Rezende *et al.*, em 2006, que propôs o uso de injeção *split* pulsado para análise de álcool, glicerina livre, ésteres, MAG, DAG e TAG utilizando uma única condição cromatográfica (REZENDE *et al.*, 2006).

Outro estudo que procurou alterar métodos para otimizar o processo de análise foi realizado por Dias *et al.* (2011). Este trabalho teve como objetivo a determinação simultânea dos glicerídeos, glicerina livre e total em biodiesel transesterificado a partir do óleo de mamona. Para tal, propuseram alterações nas normas ASTM D6584 (2010) e EN 14105 (2003). A alteração que chama atenção neste caso é o volume de MTSFA utilizado, que foi de 250 μL e o detector foi EM. Como resultado deste trabalho, os autores inferiram que não importa a matriz utilizada para obtenção do produto de transesterificação, desde que o volume de MTSFA seja alterado proporcionalmente as reações de derivatizações necessárias, ou seja, de acordo com a concentração dos glicerídios presentes na matriz trabalhada, o volume de MTSFA será diferente (DIAS *et al.*, 2011).

3.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

A CLAE apresenta algumas vantagens quando comparada a CG, como por exemplo, a redução do tempo de análise e não utilização de reagentes derivatizantes. Além destas vantagens, a CLAE viabiliza a quantificação de componentes pouco voláteis (AQUINO NETO, NUNES, 2003) e por se tratar de

uma análise onde não são necessárias altas temperaturas, é possível dizer que o risco de acontecer isomerização das ligações duplas dos ácidos graxos insaturados ou outras moléculas insaturadas diminui (CZAUDERNA, KOWALCZYK, 2001; LI *et. al.*, 2001). No entanto, a aplicação da CLAE à análise de biodiesel não é tão comum quanto a CG.

A CLAE é, em alguns aspectos, mais versátil do que a CG, pois não está limitada a amostras volatilizáveis e termicamente estáveis e na escolha das fases móvel e estacionária. Por outro lado, o advento da CG de alta resolução, com o uso da derivatização dos analitos para sua transformação em derivados mais voláteis e estáveis, fez com que a maior parte das análises de moléculas de massa molecular até 2500 Da seja preferencialmente realizada por CG (AQUINO NETO, NUNES, 2003). A CLAE requer somente que a amostra seja solúvel na fase móvel, sendo, portanto, considerada uma técnica ideal para a separação de espécies iônicas ou macromoléculas de interesse biológico, produtos naturais lábeis, bem como uma imensa variedade de outros compostos de alta MM e/ou baixa estabilidade térmica. A CLAE possui como vantagens adicionais: duas fases cromatográficas de interação seletiva com as moléculas da amostra, *versus* somente uma na CG e maior variedade de possíveis mecanismos de separação. Entretanto, a técnica apresenta como desvantagem a carência de um detector universal e seletivo.

O primeiro artigo sobre o uso da CLAE na análise de misturas de triglicerídeos foi descrito na literatura em 1990, por Trathnigg e Mittelback (TRATHNIGG, MITTELBACK, 1990). Neste trabalho, determinou-se a quantidade de MAG, DAG e TAG em EsMAG usando a CLAE acoplada a cromatografia por permeação em gel (CPG) isocrática, com detecção por densidade. A separação foi realizada pelo acoplamento de uma coluna de sílica

ciano-modificada com duas colunas de permeação em gel. Clorofórmio contendo um teor de 0,6 % de etanol foi utilizado como eluente. Este sistema permitiu a detecção de ésteres metílicos e de MAG, DAG e TAG como classes de compostos orgânicos, e também foi útil para a determinação do grau de conversão durante as reações de transesterificação (TRATHNIGG, MITTELBACK, 1990).

A utilização da CLAE com detecção por pulso amperométrico (DPA) foi utilizada para a determinação de glicerol livre em biodiesel proveniente de óleos vegetais. O método CLAE-DPA mostrou ser simples, rápido e acurado (KNOTHE, 2001). A maior vantagem deste método é a sensibilidade. A determinação de álcool residual após a transesterificação também se mostrou uma possibilidade para esta técnica (LOZANO *et al.*, 1996).

Em 1996, Marcato e Cecchin também empregaram a CLAE em fase reversa (FR), com detector evaporativo de espalhamento de luz (DEEL), para a análise simultânea de AGL, MAG, DAG, TAG e glicerina. Todas as classes de compostos analisadas foram separadas em uma simples corrida de 25 min. O método demonstrou ser altamente sensível e seletivo, sendo capaz de separar também os isômeros de posição (MARCATO, CECCHIN, 1996).

A utilização do detector por índice de refração (DIR) também já foi utilizada para a análise de biodiesel. Neste caso, o óleo utilizado para a transesterificação foi o óleo de soja. Neste estudo, a fase móvel era constituída de acetona e acetonitrila. Desta forma, os autores conseguiram quantificar os MAG, DAG e TAG no estudo de cinética de reação de transesterificação (NOUREDDINI, ZHU, 1997).

Em 1999, Holcapek *et al.* empregaram a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa para a determinação de compostos provenientes da produção de biodiesel de colza (canola) com vários meios de detecção diferentes (UV em 205 nm, o DEEL e a detecção por espectrometria de massa por ionização química em pressão atmosférica (EM-IQPA), no modo positivo de íons). Dois gradientes de solvente foram utilizados. O primeiro foi constituído de metanol (A) com uma mistura de 2-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v), com 100 % de A até 50 % A. O outro sistema de solvente foi constituído de água (A), acetonitrila (B) e uma mistura de 2-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v) (C), com dois gradientes lineares (30 % A + 70 % B no tempo zero, 100 % B no tempo 10 minutos, 50 % B + 50 % C no tempo 20 minutos, seguida por uma eluição isocrática nos últimos 5 minutos, com 50 % B + 50 % C). O primeiro sistema de solventes foi utilizado para determinação do rendimento da reação de transesterificação do óleo de canola com metanol comparando a soma das áreas dos picos representantes dos ésteres metílicos e dos TAG. Desta forma, cada TAG mostrou uma variação para determinação para este método. Os autores mostraram que a utilização da EM é mais apropriada para estas determinações do óleo de canola, uma vez que o detector UV apresentou relação diferente dependendo do triglicerídeo (HOLCAPEK *et al.*, 1999).

Em 2001, Komers *et al.* também realizaram um estudo para a determinação de MAG, DAG e TAG utilizando detector UV, em 205 nm, em estudos de transesterificação, com metanol, para o óleo de canola. Os autores utilizaram em seu estudo, uma coluna 150 x 3 mm com uma pré-coluna 30 x 3 mm, ambas envoltas com a fase estacionária de octadecilsilano (C-18), com partículas de diâmetros de 7 µm e fase móvel constituída de acetonitrila:água 8:2, v/v (A), acetonitrila (B) e *n*-hexano:2-propanol 4:5, v/v (C). Empregou-se o

gradiente: a) 0 a 2 minutos (100 % A), b) 2 a 12 minutos (100 % B), c) 12 a 22 minutos (50 % B e 50 % C), d) 22 a 29 minutos (100 % B), (e) 30 a 32 minutos (100 % B) e f) 32 a 33 minutos (100 % A) (KOMERS *et al.*, 2001).

Já em 2003, Holcapek publicou outro trabalho utilizando a CLAE-FRNA, onde apresentou a separação das classes de MAG, DAG e TAG com mesmo número de carbonos equivalentes (NCE), ou seja, mostrou em detalhes a composição de acilgliceróis das amostras (HOLCAPEK *et al.*, 2003).

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

Recentemente, em 2011, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um método alternativo utilizando a CLAE-FRNA na determinação da conversão e caracterização dos principais componentes do B100 (EsMAG, MAG, DAG e TAG). A esta análise, foi incorporado o processo de EFS para concentrar os acilgliceróis produzidos por diferentes óleos vegetais. Este método de CLAE-FRNA foi capaz de separar os acilgliceróis em 3 classes (MAG, DAG e TAG) e os ésteres (EsMAG). Neste estudo utilizou-se como fase estacionária o octadecilsilano (C-18), a fase móvel foi metanol (A) e *i*-propanol/*n*-hexano (5:4, v/v) (B) e o detector UV a 205 nm (ANDRADE, MAZZEI, d'AVILA, 2011).

3.2.4. Extração em fase sólida

A EFS, atualmente pode ser utilizada em substituição à extração líquido-líquido (ELL) e segue os princípios da CLAE. Essa substituição se deve a alguns problemas encontrados na ELL, como por exemplo, a formação de emulsão, o que pode diminuir o rendimento da remoção de um analito de uma das fases (RUIZ-GUTIÉRREZ, PÉREZ-CAMINO, 2000).

Trabalhos na literatura mostram que a EFS é utilizada para diversos fins, auxiliando diversas técnicas de análise, como por exemplo, a espectroscopia na região do UV, a CG e a CLAE (RUIZ-GUTIÉRREZ, PÉREZ-CAMINO, 2000).

A EFS vem sendo descrita na literatura para a utilização em análises de gorduras comestíveis, óleos e amostras biológicas (RUIZ-GUTIÉRREZ, PÉREZ-CAMINO, 2000). Desta forma, a utilização da EFS em biodiesel apresenta grande potencial, uma vez que a maioria dos constituintes do biodiesel é composto de lipídeos e seus derivados.

Dentre os fases estacionárias mais utilizados na EFS para a separação de lipídeos, destaca-se a sílica gel. Este cartucho é capaz de separar classes polares e não polares. Nesta situação, as misturas utilizadas são *n*-hexano:dietil éter (98:2, v/v) e metanol, *n*-hexano:dietil éter (9:1, v/v) e clorofórmio:metanol (2:1, v/v). Entretanto, quando se necessita de uma separação mais eficiente, pode-se utilizar suportes com grupamento NH₂, Si, NH₄⁺, C₁₈ dentre outras. Nesta outra situação, também são empregadas variadas misturas de solventes para a obtenção de frações enriquecidas nos componentes de interesse (RUIZ-GUTIÉRREZ, PÉREZ-CAMINO, 2000).

No trabalho de Kaluzny *et al.* (1985) foi descrito um método para a separação de diferentes classes lipídicas fazendo utilização da técnica de EFS. A fase estacionária dos cartuchos era constituída de aminopropilsilano, e estes, foram previamente acondicionados com *n*-hexano. O extrato utilizado neste trabalho era constituído de MAG, DAG, TAG, éster colesteril, colesterol, AGL, e fosfolípídeos. Essa mistura foi solubilizada em clorofórmio e aplicada no cartucho 1. Desta forma, os lipídeos neutros (MAG, DAG, TAG, éster colesteril e colesterol) ficaram retidos e foram eluídos com clorofórmio: *i*-propanol (2:1, v/v). Esta fração contendo os lipídeos neutros foi seca sob fluxo de nitrogênio e ressolubilizada em *n*-hexano e em seguida aplicada no cartucho 2. Foram eluídos os ésteres colesteril com *n*-hexano e os MAG, DAG, TAG e colesterol ficaram no cartucho 2. Sendo assim, o terceiro cartucho foi acoplado ao segundo, e eluiu uma mistura de *n*-hexano com 1% éter dietílico e 10% cloreto de metileno para eluição dos TAG. Nesta etapa, foram eluídos 90% do colesterol, DAG e MAG e no cartucho 3 apenas 10 % de colesterol. O colesterol presente nos cartuchos 2 e 3, foi eluído com 5 % acetato de etila em *n*-hexano. Com isso, DAG e MAG ficaram retidos no cartucho 2, e foram eluídos respectivamente com 15 % de acetato de etila em *n*-hexano e clorofórmio:metanol (2:1, v/v). Após obter os resultados de recuperação das classes, os autores inferiram que há eficiência na separação dessas classes por EFS (KALUZNY *et al.*, 1985).

Além da separação de classes lipídicas, há relatos na literatura na análise de metanol, onde a EFS foi utilizada para concentrar o componente (PARASCHIVESCU *et al.*, 2008). Neste trabalho utilizou-se a microextração em fase sólida acoplada a um cromatógrafo a gás, onde a fibra absorvedora do analito, foi acoplada ao injetor do CG, e o analito foi removido da fibra após

aquecimento e direcionado à análise. Os resultados obtidos apresentaram boa reprodutibilidade e sensibilidade.

Em 2009, Li *et al.* empregaram a EFS para a separação de classes lipídicas. Neste trabalho, os autores mostraram que foi possível a obtenção de frações enriquecidas em uma determinada classe proveniente do biodiesel. Através de uma fase estacionária contendo sais de prata e sílica, os autores mostraram que foi possível separar ésteres insaturados (C18:3 e C18:2) do biodiesel de soja, através do complexo- π . Além disso, observou-se que a emissão de NOx diminuiu e melhorou a estabilidade oxidativa do biodiesel, após a retirada destes ésteres insaturados (LI *et al.*, 2009).

Em 2011, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um método de EFS, utilizando cartuchos aminopropilsilano, para o enriquecimento e separação dos acilgliceróis (MAG, DAG e TAG) do biodiesel (EsMAG). Neste trabalho, as frações obtidas através da EFS foram analisadas apenas por CLAE (ANDRADE, MAZZEI, d'AVILA, 2011).

Capítulo 4

Materiais e

Métodos

Capítulo 4. Materiais e Métodos

4.1. Reações de transesterificação

4.1.1. Óleos vegetais e reagentes

Neste projeto foram empregados cinco tipos diferentes de óleos vegetais. Os óleos de soja, milho, girassol e canola foram comerciais refinados da marca Liza (Cargill, São Paulo). O óleo de algodão empregado foi cedido pelo Cenpes/Petrobras SA. Todos os óleos vegetais foram utilizados sem qualquer procedimento prévio de purificação e/ou tratamento.

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

4.1.2. Reações de transesterificação

As reações de transesterificação foram realizadas segundo o procedimento descrito por Andrade, Mazzei e d'Avila, em 2011. Desta forma, em um balão de fundo redondo, acoplado a um condensador de refluxo e contendo 50 mL do óleo vegetal previamente pesado, foram adicionados o catalisador (carbonato de potássio, 3 % mol) e o álcool (metanol) na razão molar de 1:3 ou 1:9 de óleo vegetal:metanol. As quantidades de reagentes utilizados nas reações de transesterificação foram calculadas a partir da estimativa da MM média dos óleos vegetais apresentados por ANDRADE (2011). A reação foi mantida sob agitação e refluxo por um período de 10 min

para as reações de proporção óleo:metanol 1:3, a fim de se obter uma reação de baixa conversão; e 60 min para as reações de proporção óleo:metanol 1:9, a fim de obter-se uma reação com alta conversão. Os meios reacionais foram posteriormente resfriados até temperatura ambiente. O excesso de metanol foi removido por evaporação à pressão reduzida. A fase com glicerina foi separada por decantação em funil de separação e desprezada, carreando consigo o excesso do álcool e do catalisador. A camada superior, contendo o produto desejado, foi extraída com 100 mL de *n*-hexano para evitar a formação de emulsão. Em seguida, a fase em hexano foi lavada com água destilada (3 extrações com 50 mL) para remover qualquer catalisador residual e outros contaminantes. O excesso de solvente foi retirado por evaporação sob pressão reduzida. Os traços de água foram removidos com adição de cerca de 2 g de sulfato de sódio anidro, durante aproximadamente 1 hora. O produto de transesterificação obtido foi filtrado em algodão, armazenado em frasco âmbar e estocado em freezer (aproximadamente -10 °C) até análise (ANDRADE, MAZZEI, D'AVILA, 2011).

4.2. Análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio

4.2.1. Reagentes

O solvente empregado na análise por RMN-¹H foi: clorofórmio deuterado (CDCl₃), obtido da Cambridge Isotope Laboratories-CIL (EUA).

4.2.2. Análise por RMN-¹H

As análises por RMN-¹H foram realizadas segundo o procedimento descrito por Andrade *et al.* (2012), ou seja, as amostras foram analisadas por RMN-¹H em espectrômetro BRUKER DPX200 (200,13 MHz/¹H e 50,29 MHz/¹³C, a 4,6975 Tesla), equipado com sonda dual (¹H, ¹³C), na concentração de 14-30 mg/mL em CDCl₃. Nos experimentos 1D (¹H) foram utilizadas: larguras espectrais SW = 20 ppm, período de relaxação de 1,0 s (D1), pulso de 90°/3 de 3,0 μs com -3,0 dB de atenuação de potência, 16 scans, a 25 °C. Os valores dos deslocamentos químicos foram expressos por (δ), em partes por milhão (ppm) da frequência aplicada. As áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica. O deslocamento químico de um átomo ou grupo de átomos de hidrogênio na amostra foi medido em relação ao sinal de tetrametilsilano.

4.2.3. Determinação da conversão por RMN-¹H

A conversão (%), por RMN-¹H, foi determinada através da **equação 1** (GELBARD *et al.*, 1995) (C_G):

$$C_G = \frac{2A_{EM} \times 100}{3A_{CH_2}}$$

Equação 1. Determinação da conversão por RMN-¹H por Gelbard *et al.* (1995)

Onde:

A_{EM} é o valor da integração (área) dos hidrogênios da metoxila dos ésteres metílicos e metínicos em posição β- ao grupo olefínico do ácido ricinoléico (3,7 ppm) e A_{CH₂} é o valor da integração (área) dos hidrogênios metilênicos em posição α- à carbonila (2,3 ppm).

4.3. Análise por cromatografia em fase gasosa

4.3.1. Reagentes

Para as análises por CG foram utilizados os solventes *n*-heptano e piridina da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), com grau de pureza P.A. Estes foram utilizados sem purificação prévia. Os padrões de monopalmitina, monooleína, monoestearina, dioleína, trioleína, butanotriol e tricaprina foram obtidos da Sigma-Aldrich, com pureza > 99 %. O agente derivatizante *n*-Metil-Trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) foi obtido da Pierce Chemical.

4.3.2. Análise de MAG, DAG e TAG por CG

As análises de MAG, DAG e TAG, por CG, foram realizadas em um cromatógrafo da Shimadzu, 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 minutos. A coluna analítica utilizada foi Elite-5HT, 15 m x 0,32 mm (diâmetro interno) e 0,10 µm de fase estacionária. O gás de arraste utilizado foi o hélio, a vazão constante de 3 mL/min. Foi utilizado o detector por ionização de chama com a 380 °C e com o gás hidrogênio na vazão de 45 mL/min e ar na vazão de 450 mL /min; o solvente de lavagem foi o *n*-heptano.

Os padrões foram preparados em piridina, segundo a norma ASTM D6584, 2010 (ver item 5.3.2.1). Estes e as amostras foram tratados utilizando o mesmo procedimento. Em frascos de 2 mL, pesou-se aproximadamente 100 mg de amostra ou padrão e registrou-se a massa. Em seguida, adicionaram-se 100 µL dos padrões internos butanotriol e tricaprina e 100µL de MSTFA. Após, a mistura foi deixada em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente e foram adicionados 8 mL de *n*-heptano. Em seguida, o frasco foi vedado e

agitado. Injetou-se 1 μL da amostra derivatizada diretamente na coluna, utilizando injetor frio do tipo “on column” (ASTM D6584, 2010).

4.3.2.1. Preparo das curvas de calibração dos padrões

As massas (g) e os volumes finais das soluções (mL), em piridina, necessários para o preparo das soluções estoque estão de acordo com a norma ASTM D6584 (2010), e encontram-se apresentados na **tabela 4**.

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

Componente	Massa aproximada (mg)	Volume final das soluções em piridina (mL)
Glicerina	25	50
Monooleína	50	10
Dioleína	50	10
Trioleína	50	10
Butanotriol	25	25
Tricaprina	80	10

A partir das soluções estoque preparadas de acordo com a **tabela 4** (ASTM D6584, 2010), foram preparadas 5 soluções padrão de acordo com as informações apresentadas na **tabela 5** (ASTM D6584, 2010).

Tabela 5. Volume de solução estoque (μL) necessários para o preparo das soluções padrão (ASTM D6584, 2010).

Volume (μL) de solução estoque	<i>Solução Padrão</i>				
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Glicerina	10	30	50	70	100
Monooleína	20	50	100	150	200
Dioleína	10	20	40	70	100
Trioleína	10	20	40	70	100
Butanotriol	100	100	100	100	100
Tricaprina	100	100	100	100	100

A partir das soluções padrão preparadas de acordo com a **tabela 5**, foram construídas curvas de calibração relacionando a r_{spi} (razão das áreas da substância de referência (A_i) pelas áreas dos respectivos padrões internos (A_s)), com a am_{ti} (razão das massas das substâncias de referência (m_i) pelas massas dos respectivos padrões internos (m_s)). Vale ressaltar que o butanotriol é o padrão interno da glicerina e a tricaprina é o padrão interno dos MAG, DAG e TAG.

4.3.2.2. Cálculo da glicerina livre, combinada e total por CG

A glicerina livre, combinada e total foram determinadas conforme a norma ASTM D6584 (2010), respectivamente, através das **equações 2, 3 e 4**.

$$G = \left(\frac{M_{pi}}{a_g} \right) \left[\left(\frac{A_g}{A_{pi}} \right) - b_g \right] \left(\frac{100}{M} \right)$$

Equação 2. Cálculo da glicerina livre.

Onde:

G é a percentagem em massa de glicerina na amostra; M_{pi} é a massa do padrão interno (butanotriol), em mg; a_g é o coeficiente angular da curva de calibração da glicerina; A_g é a área do pico da glicerina; A_{pi} é a área do pico do padrão interno (butanotriol); b_g é o coeficiente linear da curva de calibração da glicerina e M é a massa da amostra, em mg.

$$G_s = \left(\frac{M_{pi}}{a_s} \right) \left[\left(\frac{A_s}{A_{pi}} \right) - b_s \right] \left(\frac{100}{M} \right)$$

Equação 3. Cálculo da glicerina combinada (MAG, DAG, TAG).

Onde:

G_s é a percentagem em massa de glicerídeos individuais na amostra; M_{pi} é a massa do padrão interno (tricaprina), em mg; a_s é o coeficiente angular da curva de calibração da monooleína, dioleína ou trioleína; A_s é a área do pico do glicerídeo individual; A_{pi} é a área do pico padrão interno (tricaprina);

b_g é o coeficiente linear da curva de calibração da monooleína, dioleína ou trioleína e M é a massa da amostra, em mg.

A glicerina total é calculada através da **equação 4**.

$$Glicerina_{Total} = Glicerina_{Livre} + Glicerina_{Combinada}$$

Equação 4. Cálculo da glicerina total.

Onde a glicerina livre é calculada através da **equação 2** e a glicerina combinada é calculada através da **equação 5**.

$$Glicerina_{Combinada} = \sum (Gl_M, Gl_D, Gl_T)$$

Equação 5. Cálculo da glicerina combinada.

Onde:

$Gl_M = 0,2591 \times \sum$ monoacilgliceróis (% massa), determinado na **equação 4**;

$Gl_D = 0,1488 \times \sum$ diacilgliceróis (% massa), determinado na **equação 4**;

$Gl_T = 0,1044 \times \sum$ triacilgliceróis (% massa), determinado na **equação 4**.

4.4. Análises por cromatografia líquida de alta eficiência

4.4.1. Reagentes

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

4.4.2. Método por CLAE

As análises por CLAE foram realizadas segundo o procedimento descrito por Andrade, Mazzei e d'Avila (2011). Estas análises foram realizadas em coluna Varian Microsorb-MV (Lake Forest, California, EUA) de 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, com fase estacionária com octadecilsilano de 5 µm de tamanho de partícula com 100 Å de diâmetro de poro. Uma pré-coluna de 2 cm de comprimento, com fase octadecilsilano (Supelco, Bellefonte, EUA), foi adaptada entre o injetor e a coluna de separação. A fase móvel foi composta de metanol (A) e uma mistura de *i*-propanol/*n*-hexano (5:4, v/v) (B). As fases foram filtradas em membrana politetrafluoretileno (PTFE) da Millipore (Bedford, EUA) com 0,5 µm de poro e levadas a um ultra-som por 20 min antes do uso. As análises foram realizadas à temperatura ambiente com vazão de 1 mL/min e detecção UV a 205 nm. Foi empregado um equipamento da Varian (Walnut Creek, California, EUA), modelo Polaris, composto de duas bombas, um detector por varredura de espectro ao ultravioleta modelo 325 Varian e um injetor Rheodyne 7725i com alça de amostragem ("loop") de 20 µL. Um gradiente binário com duas rampas lineares foi empregado: 0 % a 50 % B de 0 a 15 min, seguido de 50% a 100% B até 25 min de corrida, e então por eluição isocrática com 100% B por mais 5 min. O tempo de análise total foi de 30 min. Todas as amostras foram previamente filtradas em filtro tipo membrana PTFE da Millipore (Bedford, EUA) com 0,45 µm de poro antes da injeção. As amostras foram aplicadas à temperatura ambiente em injetor Rheodyne (20 µL), após diluição na proporção de 3% (p/v) em *i*-propanol/*n*-hexano (5:4, v/v). Cada amostra (10 µL) foi analisada em triplicata. Os cromatogramas foram analisados e integrados pelo

programa de aquisição do Sistema Galaxie, versão 1.9.3.2 (Varian, Califórnia, EUA).

4.5. Extração em fase sólida

4.5.1. Solventes

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

4.5.2. Separação e isolamento dos acilgliceróis por EFS

A separação dos acilgliceróis (MAG, DAG e TAG) do biodiesel, por EFS, foi realizada através do procedimento descrito por Andrade, Mazzei e d'Avila (2011).

Os cartuchos contendo fase aminopropilsilano (500 mg, 3 mL, Bond Elut) foram condicionados com duas porções de 2 mL de *n*-hexano. As amostras foram diluídas em *n*-hexano na concentração de 5 % (v/v) antes da aplicação nos cartuchos de EFS. Foram aplicados 200 µL de amostra, sob pressão reduzida, com vazão de aproximadamente 1 mL/min. Em seguida efetuou-se a eluição dos EsMAG com 8 mL de *n*-hexano (fração 1). Os compostos retidos no cartucho após eluição com *n*-hexano, foram eluídos com 4 mL de clorofórmio:metanol (2:1, v/v) (fração 2). As frações foram secas sob fluxo lento de nitrogênio e o resíduo foi ressuspenso em 100 µL de *i*-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v) para as frações 1 e 500 µL para as frações 2.

Cada fração foi obtida em triplicata e uma alíquota de 10 µL foi analisada, em duplicata, por CLAE. Além das frações, foram reservadas

alíquotas dos materiais de controle, para análise direta por CLAE, sem passagem pelo processo de EFS, as quais foram secas, diluídas e analisadas identicamente. Os resultados destas amostras foram usados como controle para a avaliação da área percentual das diferentes classes de compostos presentes durante o processo de produção do biodiesel.

4.5.3 Determinação da área percentual de cada classe por CLAE

A área percentual ou composição relativa percentual de cada classe (C_{Classe}) de componentes (MAG, EsMAG, DAG e/ou TAG) presentes nas frações obtidas pelo processo de EFS foi determinada através da **equação 6**, desenvolvida por Andrade (2011).

$$C_{Classe} = \left(\frac{A_{C\ Classe}}{A_{C\ Total\ Classe}} \right) \times 100$$

Equação 6. Cálculo da composição das fases após a EFS.

Onde:

$A_{C\ Classe}$ e $A_{Total\ Classe}$ referem-se, respectivamente, as áreas corrigidas, em mUA x min, de cada classe e de todas as classes de componentes, obtidas por CLAE, após passagem pelo processo de EFS.

Capítulo 5

Resultados e

Discussão

Capítulo 5. Resultados e Discussão

5.1. Obtenção de produtos de transesterificação

Neste projeto foram sintetizados dez produtos de transesterificação, obtidos a partir de cinco fontes oleaginosas distintas (soja, milho, girassol, canola e algodão), contendo, portanto, diferentes teores de MAG, DAG, TAG e EsMAG. Estes produtos de transesterificação foram sintetizados conforme as condições apresentadas no **quadro 1**.

Quadro 1. Condições reacionais empregadas nas reações de transesterificação.

Fonte Oleaginosa	Razão molar óleo:metanol	Tempo reacional (min)	Código
Milho	1:3	10	I1
	1:9	60	C1
Canola	1:3	10	I2
	1:9	60	C2
Soja	1:3	10	I3
	1:9	60	C3
Algodão	1:3	10	I4
	1:9	60	C4
Girassol	1:3	10	I5
	1:9	60	C5

I: Reação incompleta, usando uma razão molar óleo:metanol de 1:3 e um tempo reacional de 10 minutos; C: Reação completa, usando uma razão molar óleo:metanol de 1:9 e um tempo reacional de 60 minutos.

As condições reacionais empregadas no **quadro 1**, caracterizadas pelo código “I”, foram usadas de modo a obter baixos teores de EsMAG, e consequentemente quantidades significativas de MAG, DAG e TAG. Entretanto, as condições reacionais caracterizadas pelo código “C”, foram utilizadas para obtenção de altos teores de EsMAG, e quantidades pequenas de MAG, DAG e TAG.

Vale lembrar que dentre as variáveis reacionais que influenciam na conversão da reação de transesterificação, apenas a razão molar óleo vegetal:metanol e o tempo de reação foram variados.

5.2. Determinação da conversão dos produtos de transesterificação por RMN-¹H

Os dez produtos de transesterificação obtidos neste projeto foram analisados por RMN-¹H, e os resultados de conversão encontram-se apresentados na **tabela 6**.

Tabela 6. Resultados da conversão (%) dos produtos de transesterificação segundo a equação de Gelbart *et al.* (1995).

Código da amostra	Fonte Oleaginosa	Razão molar óleo:metanol	Tempo reacional (min)	Conversão (%)
I1	Milho	1:3	10	39
C1		1:9	60	89
I2	Canola	1:3	10	51
C2		1:9	60	97
I3	Soja	1:3	10	44
C3		1:9	60	97
I4	Algodão	1:3	10	37
C4		1:9	60	95
I5	Girassol	1:3	10	30
C5		1:9	60	95

Os resultados apresentados na **tabela 6** mostram valores de conversão superiores a 89 %, usando uma razão molar óleo:metanol de 1:9 e um tempo reacional de 60 min. Já os produtos de transesterificação com razão molar óleo:metanol de 1:3 e tempo reacional de 10 min, apresentaram valores de conversão inferiores a 51 %. Estes resultados já eram esperados, já que para uma boa conversão é necessária a utilização de razão molar óleo:álcool superior à estequiométrica (1:3). De acordo com os

valores obtidos, é possível confirmar o efeito do tempo e proporção de óleo: metanol, e a importância dessas duas variáveis para a obtenção de um biodiesel de boa qualidade.

Como dito anteriormente, os valores de conversão foram obtidos através da equação proposta por Gelbard (1995) – **equação 2**, item 4.2.3.. As regiões representativas da **figura 6**, equivalem aos sinais da área do singlete dos prótons da metila diretamente ligada à carboxila do metil éster ($\delta=3,7$ ppm) e a área dos sinais dos seus prótons metilênicos α -carbonílicos ($\delta=2,3$ ppm)

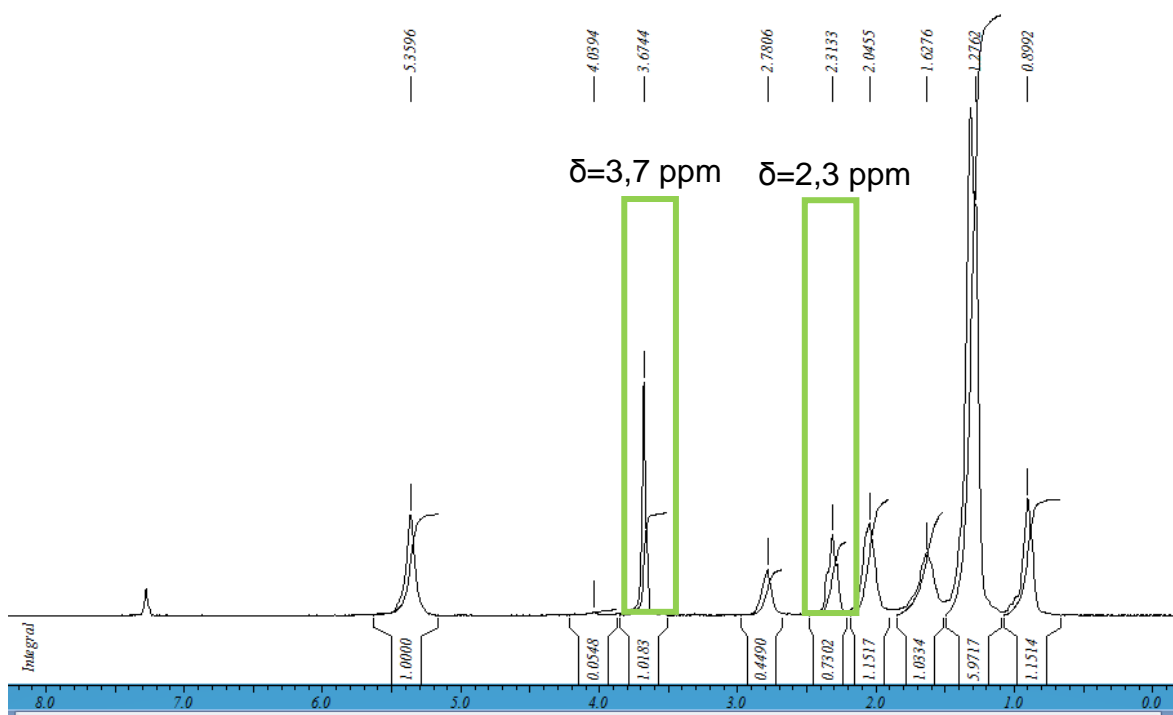


Figura 6. Espectro de RN-¹H do produto de transesterificação do óleo de soja com baixa conversão (I3).

5.3. Análise dos produtos de transesterificação por CLAE

A partir da análise dos produtos de transesterificação, por CLAE, verificamos nitidamente a presença de 4 classes normalmente encontradas no biodiesel (MAG, EsMAG, DAG e TAG), assim como os constituintes de cada classe foram identificados segundo Andrade, 2011. De modo a ilustrar essas classes, apresentamos a **figura 7**, que mostra o cromatograma de baixa conversão do produto de transesterificação do óleo de milho.

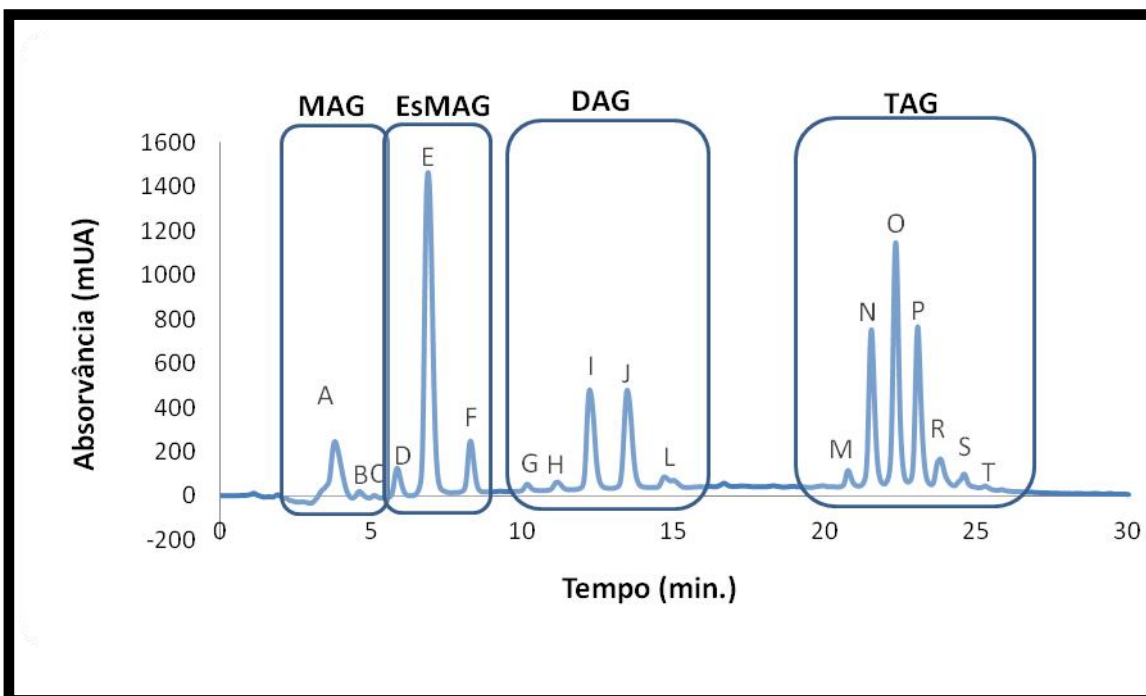


Figura 7. Classes de componentes presentes no produto de transesterificação do óleo de milho com baixa conversão (I1).

Através da **figura 6** 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 7**).

Tabela 7. Identificação, por CLAE, dos componentes presentes nos produtos de transesterificação (adaptado de ANDRADE, 2011).

Classes	Código (NCE)	Nome	Notação
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)	Trioeína	OOO
	T (50)	Dioil-gadoleoil-glicerol	OOG

NCE. Número de carbono equivalente (NCE= NC – 2 x 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

Segundo Holcapek *et al.* (1999), Holcapek *et al.* (2001) e Andrade (2011), a ordem de eluição dos acilgliceróis está diretamente relacionada com o NCE (**tabela 7**). Em sua tese de doutorado, Andrade mostrou que nas condições de análise, não houve separação de componentes de mesmo NCE. Desta forma, os isômeros de posição sn-2 e sn-1 dos MAG (como as 1- e 2-

monolinoleninas) e os isômeros sn-1,2 e sn-1,3 dos DAG não foram separados. Além dos isômeros sn-1,2 e sn-1,3, dentre os DAG, a dilinoleína também não foi separada do oleoil-linoleoil-glicerol, por terem o mesmo NCE. De mesmo modo, os pares de TAG: dilinoleoil-linoleoil-glicerol/dilinoleoil-oleoil-glicerol (NCE 40), trilinoleína/oleoil-linoleoil-linoleoil-glicerol (NCE 42) e dilinoleoil-oleoil-glicerol/dioleoil-linoleoil-glicerol (NCE 44) também não foram separados (ANDRADE, 2011).

Os dez produtos de transesterificação obtidos neste projeto foram analisados por CLAE, e os cromatogramas encontram-se apresentados nas **figuras 8 a 12**. Todos os componentes identificados nestes cromatogramas encontram-se listados na **tabela 7**.

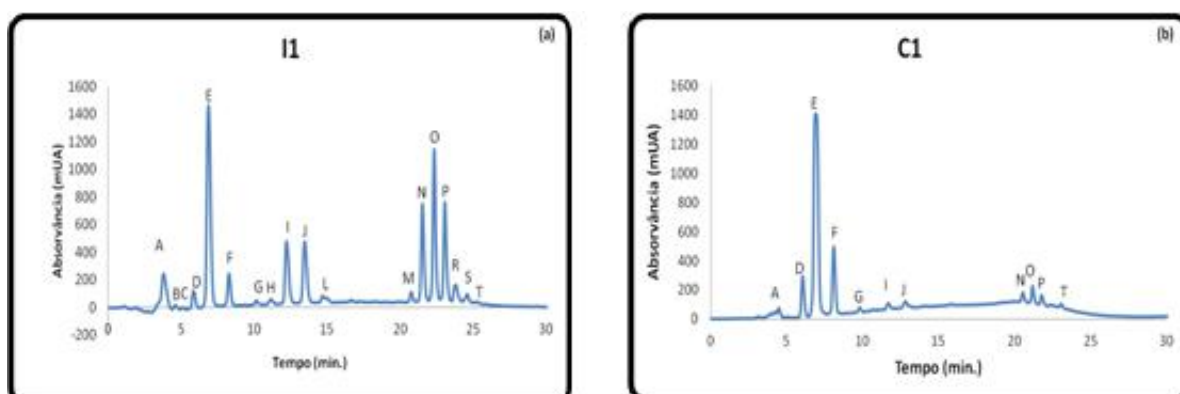


Figura 8. Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de milho, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão.

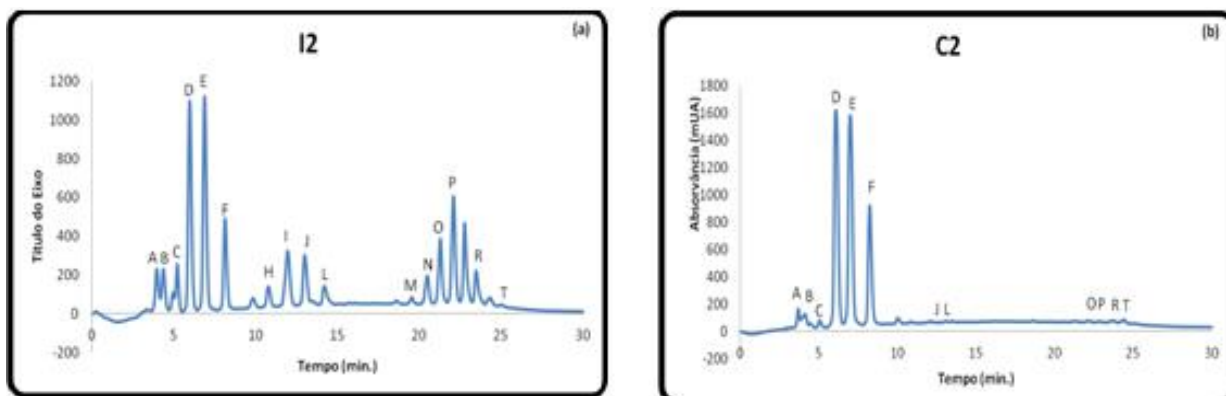


Figura 9. Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de canola, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão.

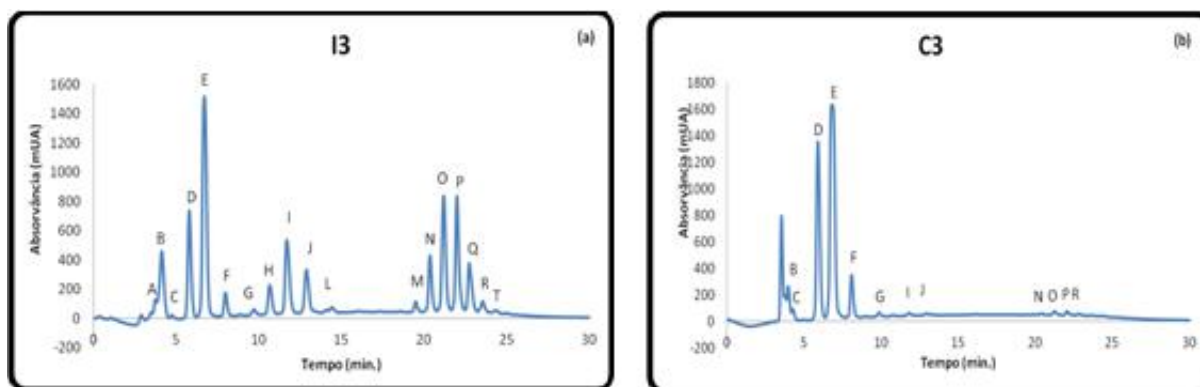


Figura 10. Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de soja, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão.

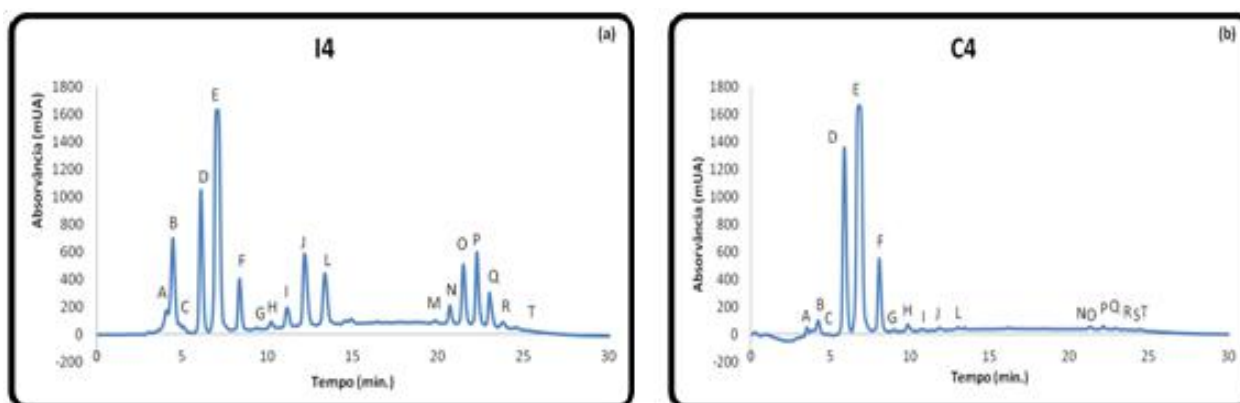


Figura 11. Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de algodão, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão.

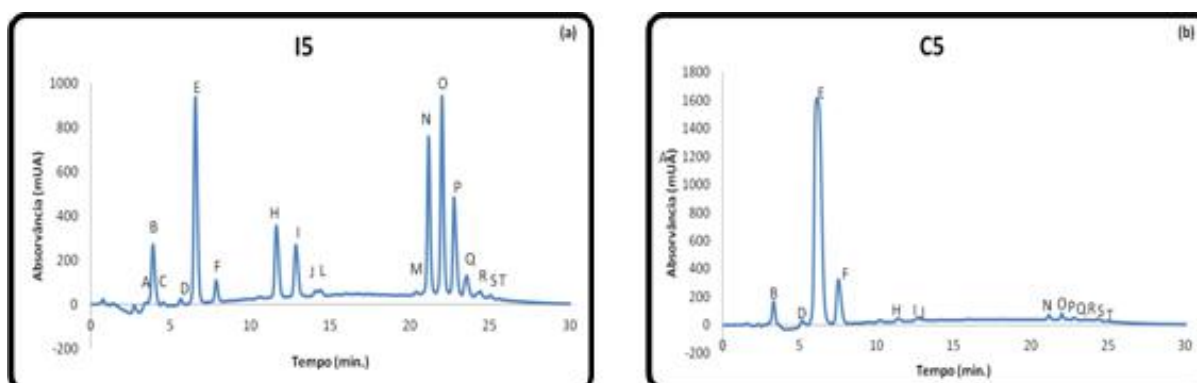


Figura 12. Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de girassol, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão.

Os cromatogramas apresentados nas **figuras 8 a 12** mostram que os produtos de transesterificação de baixa conversão, apresentam menores intensidades de absorvância nos EsMAG em comparação as absorvâncias dos produtos de alta conversão, e conseqüentemente, intensidades de absorvância significativas nos MAG, DAG e TAG. Já os produtos de transesterificação de alta conversão apresentam baixas absorvâncias nos MAG, DAG e TAG.

5.3.1. Determinação da conversão dos produtos de transesterificação por CLAE

Os resultados de conversão obtidos por CLAE, através da equação proposta por Andrade,(2011), foram comparados com os resultados obtidos, por RMN-¹H, segundo a expressão de GELBARD *et al.* (1995), e os resultados encontram-se apresentados na **tabela 8**.

Tabela 8. Resultados da conversão (%) dos produtos de transesterificação por e RMN-¹H e CLAE.

Fonte Oleaginosa	Razão molar óleo:metanol	Tempo reacional (min)	Conversão (%)	
			RMN- ¹ H	CLAE
Milho	1:3	10	39	32
	1:9	60	89	75
Canola	1:3	10	51	40
	1:9	60	97	92
Soja	1:3	10	44	34
	1:9	60	97	91
Algodão	1:3	10	37	45
	1:9	60	95	92
Girassol	1:3	10	30	28
	1:9	60	95	92

Os resultados de conversão por CLAE apresentados na **tabela 8** mostram valores de conversão superiores a 75 %, usando uma razão molar

óleo:metanol de 1:9 e um tempo reacional de 60 min. Já os produtos de transesterificação com razão molar óleo:metanol de 1:3 e tempo reacional de 10 min, apresentaram valores de conversão inferiores a 45 %.

Em 2011, Andrade analisou trinta e sete produtos de transesterificação, obtidos de diferentes origens e graus de conversão, e portanto, de diferentes composições de cada classe, por CLAE e RMN-¹H. Os resultados foram comparados usando o teste-t, e as técnicas foram consideradas estatisticamente equivalentes. Ou seja, concluiu-se que a expressão empregada para a determinação da conversão por CLAE, representa adequadamente a conversão dos produtos de transesterificação, independente da fonte oleaginosa e do grau de conversão.

5.3.2. Determinação de MAG, DAG, TAG e EsMAG por CLAE

Os dez produtos de transesterificação obtidos neste projeto foram analisados por CLAE e os resultados de composição (%), expressos em área percentual de MAG, DAG, TAG e EsMAG encontram-se apresentados na **tabela 9**.

Tabela 9. Resultados de composição (área %) dos produtos de transesterificação por CLAE.

Fonte Oleaginosa	Razão molar óleo:metanol	Tempo reacional (min)	Composição (área %)			
			MAG	EsMAG	DAG	TAG
Milho	1:3	10	13	51	16	20
	1:9	60	7	85	3	5
Canola	1:3	10	18	56	13	13
	1:9	60	4	94	1	1
Soja	1:3	10	18	50	17	15
	1:9	60	5	93	1	1
Algodão	1:3	10	18	59	16	7
	1:9	60	7	92	0	1
Girassol	1:3	10	16	45	16	23
	1:9	60	5	93	1	1

MAG. Monoacilgliceróis; EsMAG. Ésteres metílicos de ácidos graxos; DAG. Diacilgliceróis e TAG. Triacilgliceróis

Os resultados apresentados na **tabela 9** mostram que os produtos de transesterificação obtidos com razão molar óleo:metanol de 1:3 e tempo reacional de 10 min, apresentam baixos teores de EsMAG (45 a 59 %), e consequentemente quantidades significativas de MAG (13 a 18 %), DAG (13 a 17 %) e TAG (7 a 23 %). Já os produtos de transesterificação obtidos com razão molar óleo:metanol de 1:9 e tempo reacional de 60 min, apresentam altos teores de EsMAG (85 a 94 %), e quantidades pequenas de MAG (4 a 7 %), DAG (0 a 3 %) e TAG (1 a 5 %). Os resultados apresentados na **tabela 9** mostram que os produtos de transesterificação de alta conversão, apresentam aproximadamente o dobro de EsMAG que os produtos de transesterificação de baixa conversão. Essa proporção é obtida quando a razão é aproximada ao primeiro número inteiro.

5.4. Análise dos produtos de transesterificação por CG

A identificação, por CG, dos picos apresentados nos produtos de transesterificação obtidos neste projeto, foi realizada conforme cromatograma de referência presente na norma ASTM D 6584 (2010), como ilustra a **figura 13**.

Os dez produtos de transesterificação foram analisados por CG, segundo a norma ASTM D6584 (2010), e os cromatogramas encontram-se apresentados nas **figuras 14 a 18**.

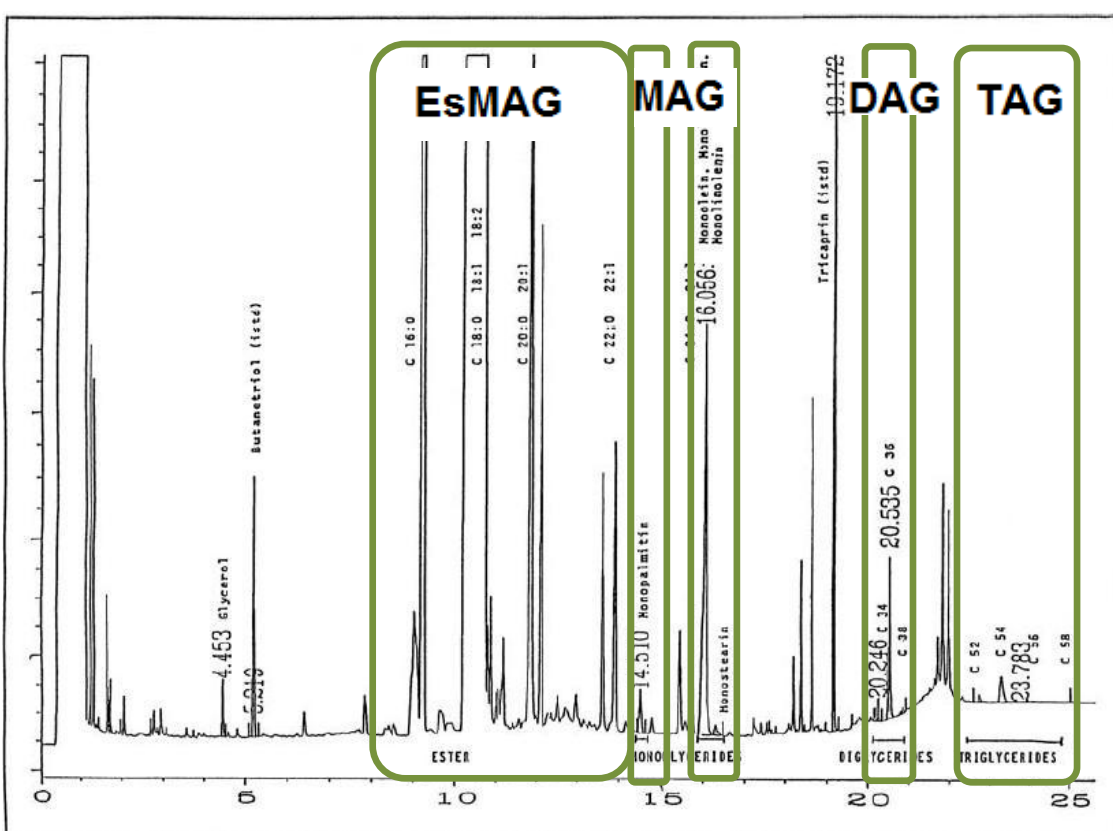


Figura 13. Cromatograma de referência da norma ASTM D 6584 (2010).

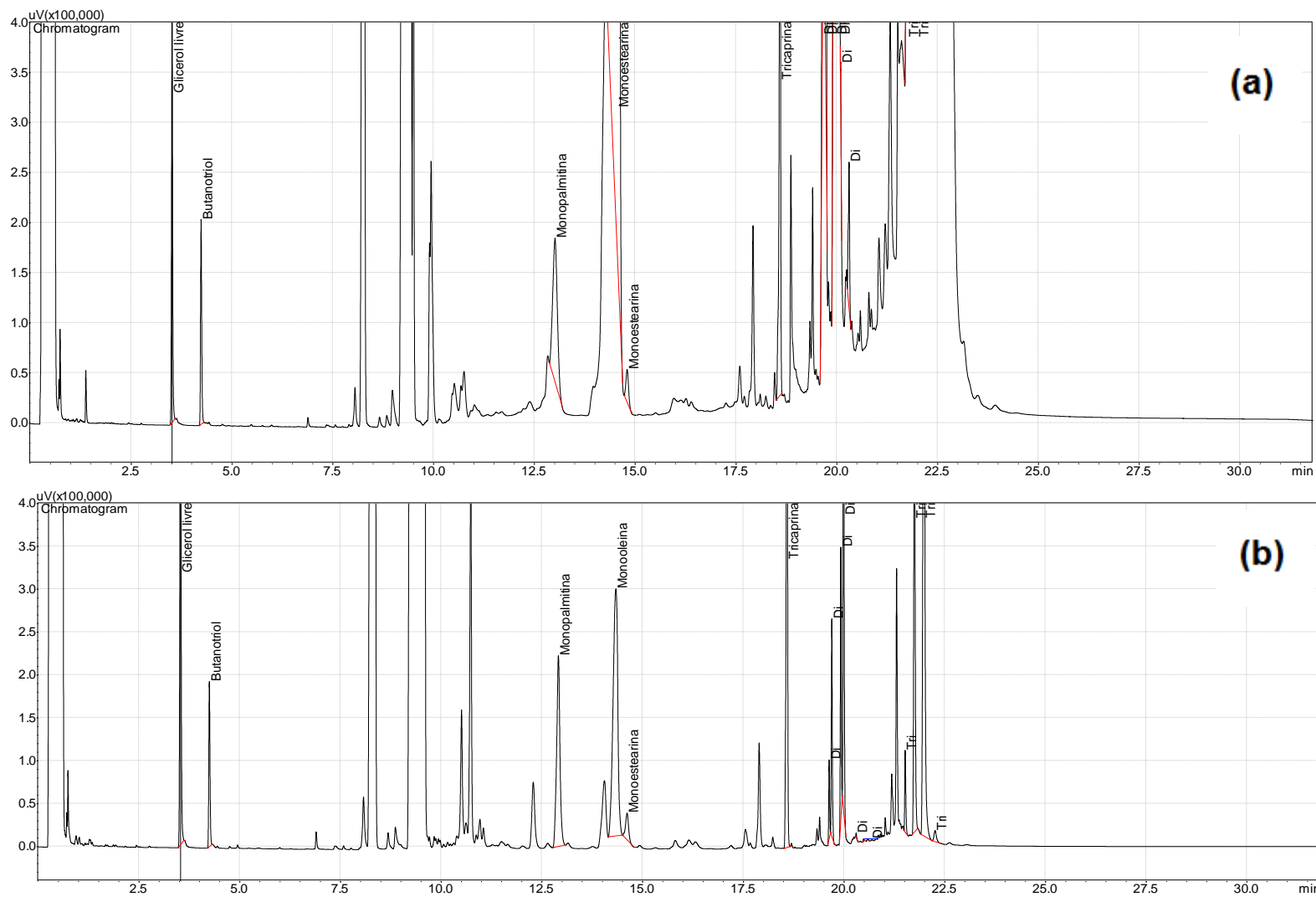


Figura 14. Cromatogramas, obtidos por CG, dos produtos de transesterificação do óleo de milho, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão.

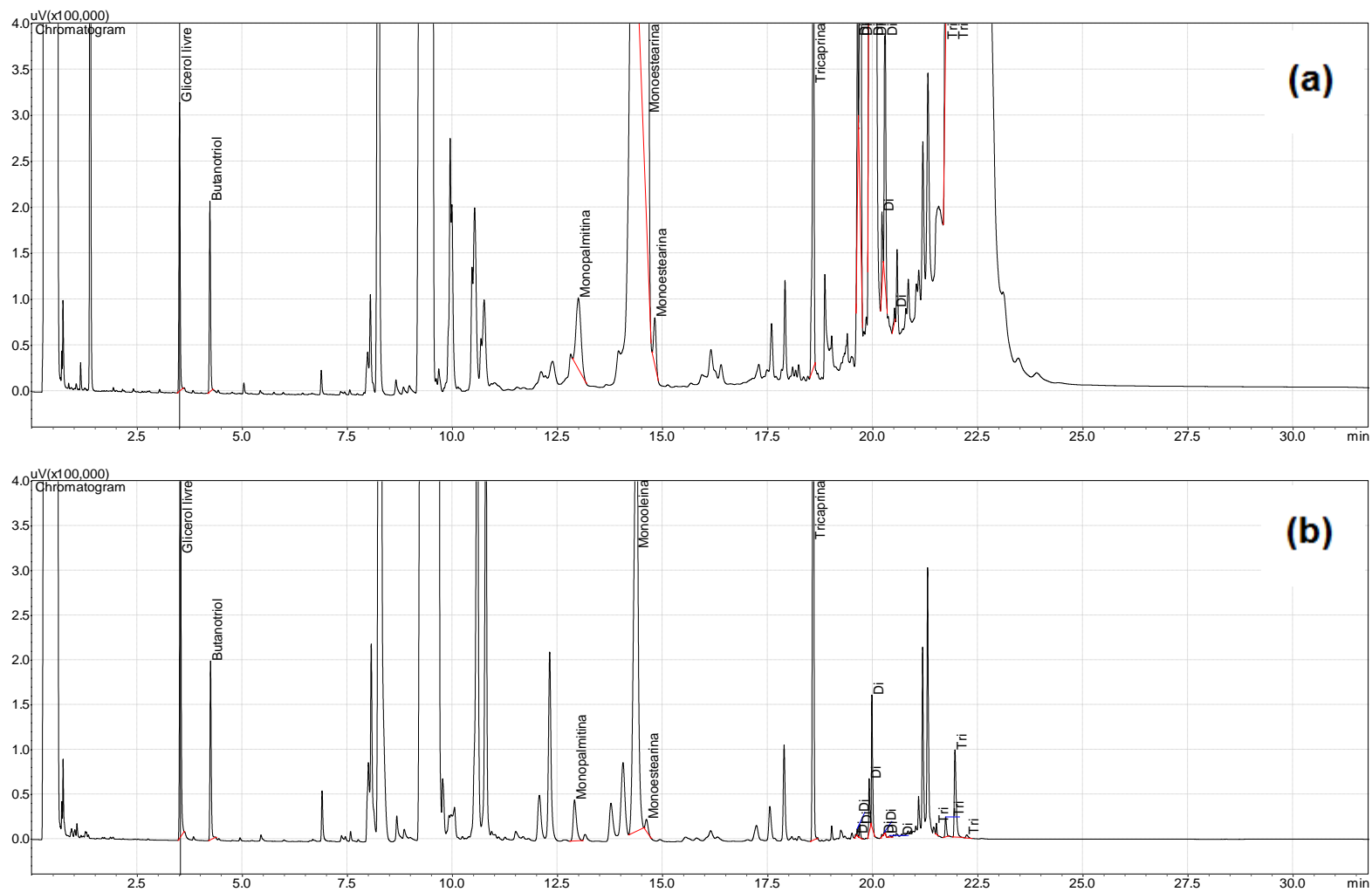


Figura 15. Cromatogramas, obtidos por CG, dos produtos de transesterificação do óleo de canola, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão.

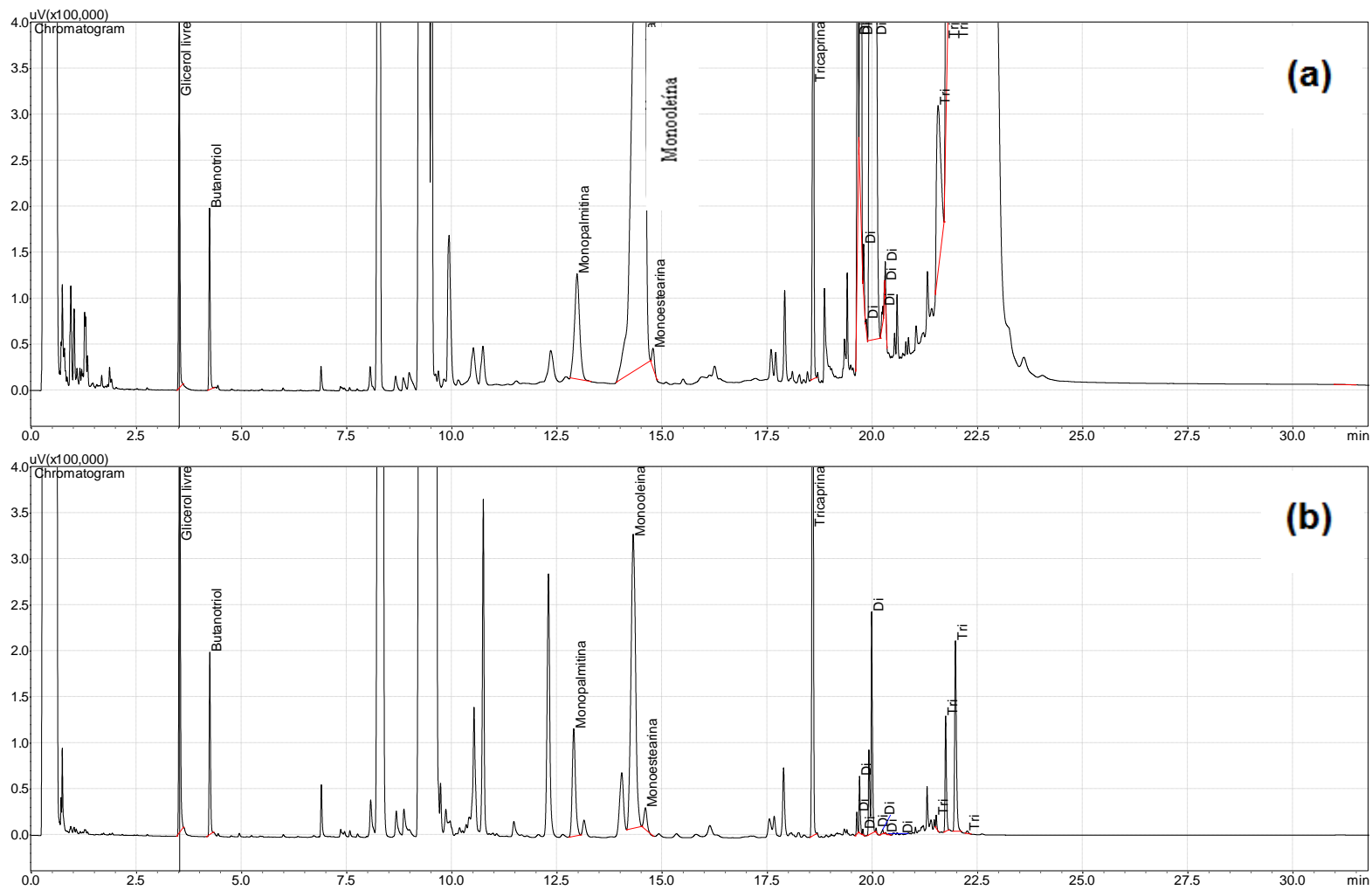


Figura 16. Cromatogramas, obtidos por CG, dos produtos de transesterificação do óleo de soja, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão.

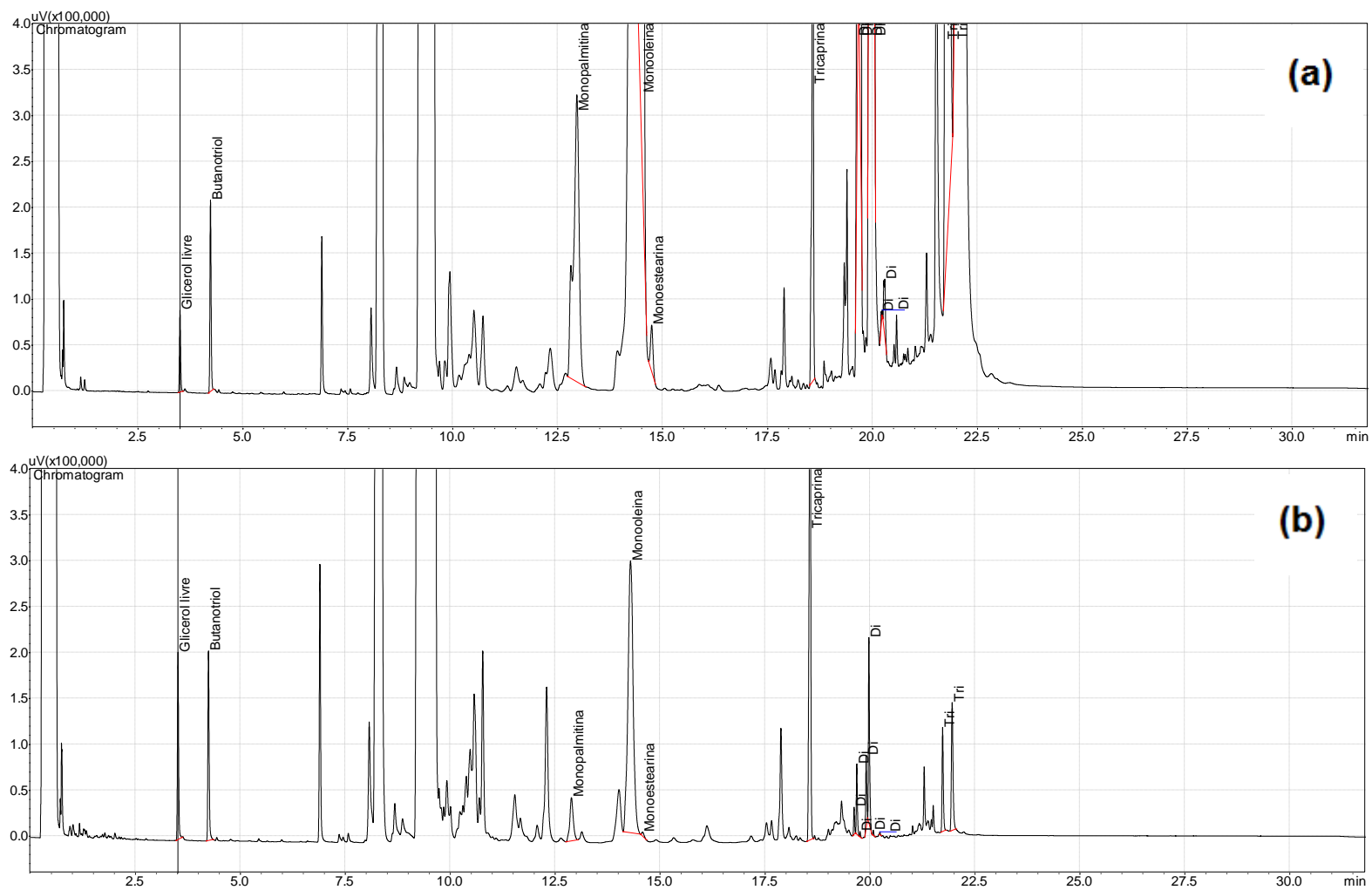


Figura 17. Cromatogramas, obtidos por CG, dos produtos de transesterificação do óleo de algodão, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão.

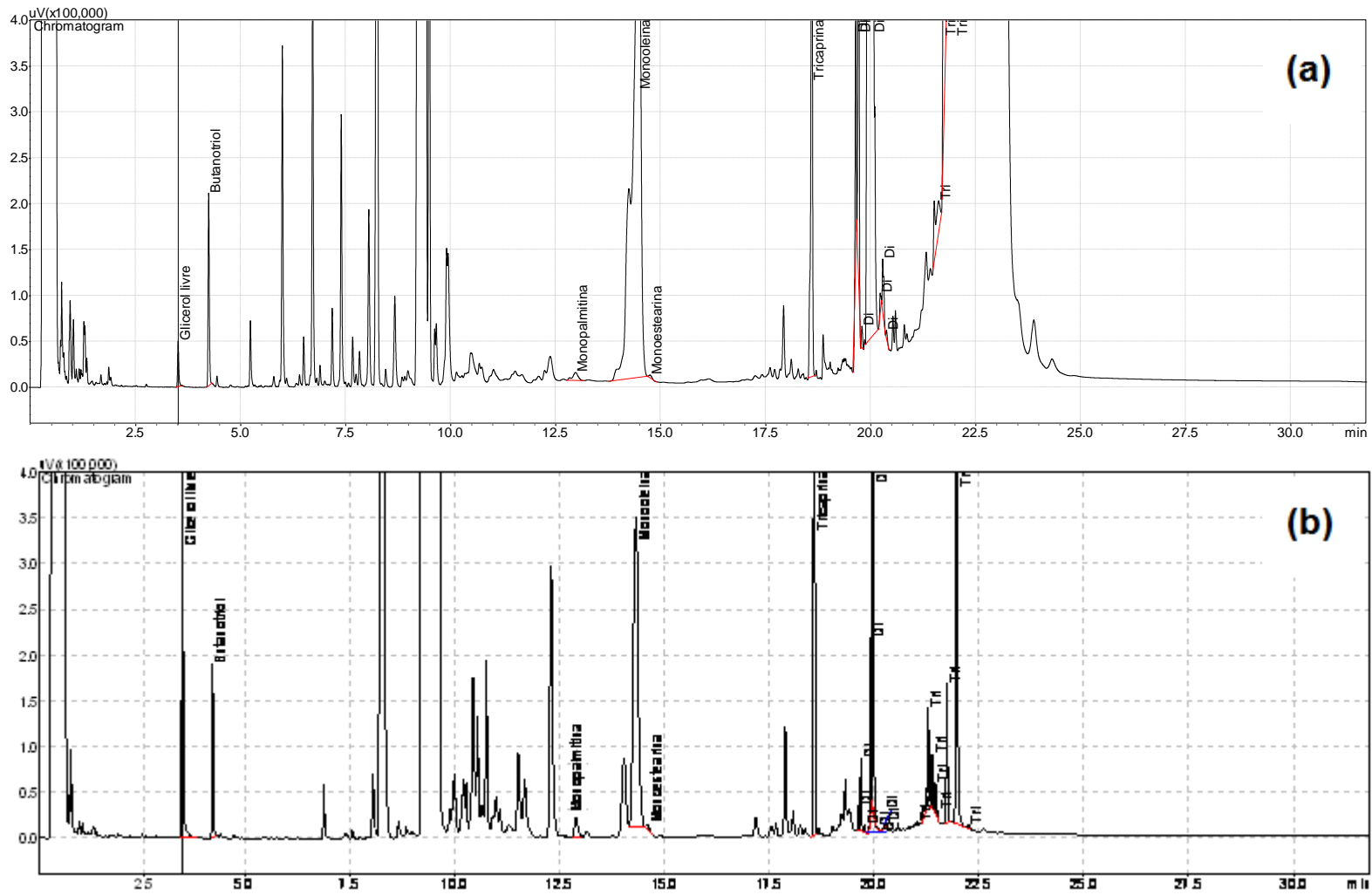


Figura 18. Cromatogramas, obtidos por CG, dos produtos de transesterificação do óleo de girassol, com (a) baixa conversão e (b) alta conversão.

É importante ressaltar que nos cromatogramas apresentados nas **figuras 14 a 18** o pico identificado como sendo monooleína, na verdade é referente às espécies monooleína, monolinoleína e monolinoleína.

Os cromatogramas apresentados nas **figuras 14 a 18** mostram que os produtos de transesterificação de baixa conversão, apresentam baixas intensidades dos picos nos EsMAG, e conseqüentemente, altas intensidades dos picos nos MAG, DAG e TAG. Já os produtos de transesterificação de alta conversão, apresentam altas intensidades dos picos nos EsMAG, e baixas intensidades dos picos nos MAG, DAG e TAG.

Os picos nomeados nos cromatogramas apresentados nas **figuras 14 a 18** foram identificados por comparação com os tempos de retenção relativo (TRR) dos padrões (**tabela 10**).

Tabela 10. Tempos de retenção relativos usados para identificação dos picos (ASTM D6584, 2010).

Componente	Tempo de retenção relativo	
	Padrão interno 1	Padrão interno 2
Glicerina	0,85	-
1,2,4 Butanotriol (padrão interno 1)	1,00	-
Monopalmitina	-	0,76
Monooleína, monolinoleína, monolinolenina e monoestearina	-	0,83 a 0,86
Tricaprina (padrão interno 2)	-	1,00
Diacilgliceróis	-	1,05 a 1,09
Triacilgliceróis	-	1,16 a 1,31

Segundo a norma ASTM D6584 (2010), os MAG, DAG e TAG são separados de acordo com o número total de carbono. Os MAG são caracterizados por 4 picos sobrepostos com TRR de 0,76 e 0,83 a 0,86 em relação ao respectivo padrão

interno (tricaprina). Um par de picos, com número total de carbono (NC) igual a 24, caracteriza os ésteres metílicos e não deve ser considerado como MAG. Um grupo de três a quatro picos, com TRR de 1,05 a 1,09 (NC 34, 36 e 38) deve ser atribuído aos DAG. Já os picos com TRR de 1,16 a 1,31 (NC 52, 54, 56 e 58), caracterizam os TAG (ASTM D6584, 2008).

5.4.1. Determinação de glicerina livre, combinada e total por CG

Para a determinação de glicerina livre, glicerina combinada (MAG + DAG + TAG) e glicerina total (glicerina livre + glicerina combinada), segundo a norma ASTM D6584 (2010), fez-se necessária a utilização de curvas de calibração de padrões de glicerina, monooleína, dioleína e trioleína. As curvas de calibração destes padrões encontram-se, respectivamente nas **figuras 19 a 22**. Vale lembrar que os termos rpsi e anti são definidos como a razão, respectivamente, das áreas e massas, da substância de referência pela do padrão interno.

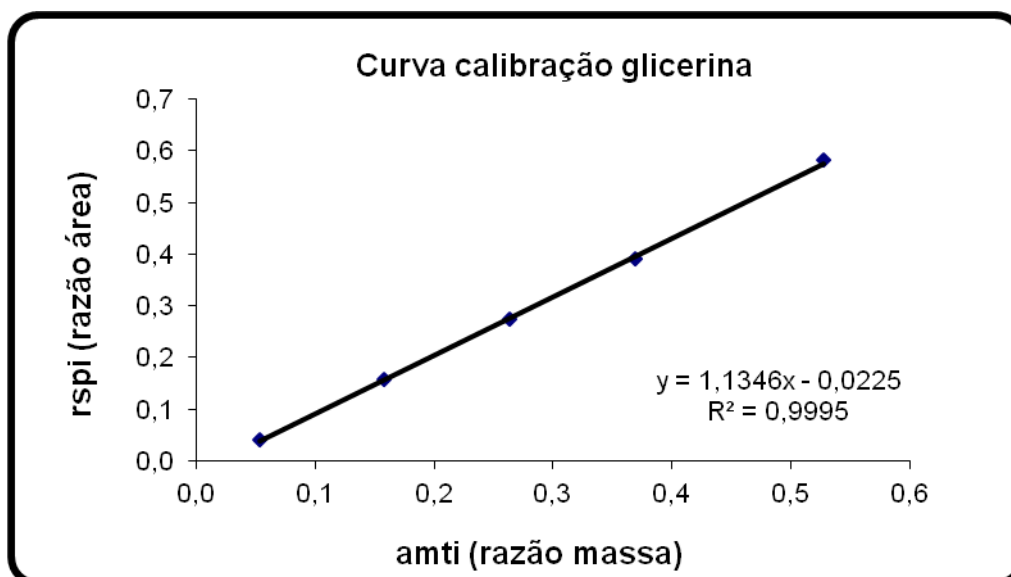


Figura 19. Curva de calibração da glicerina.

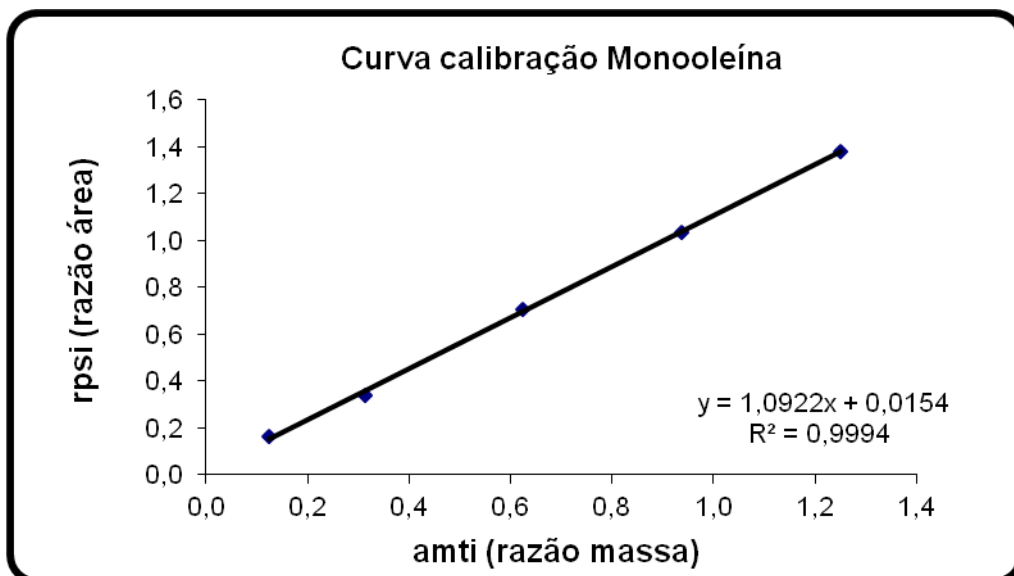


Figura 20. Curva de calibração da monooleína.

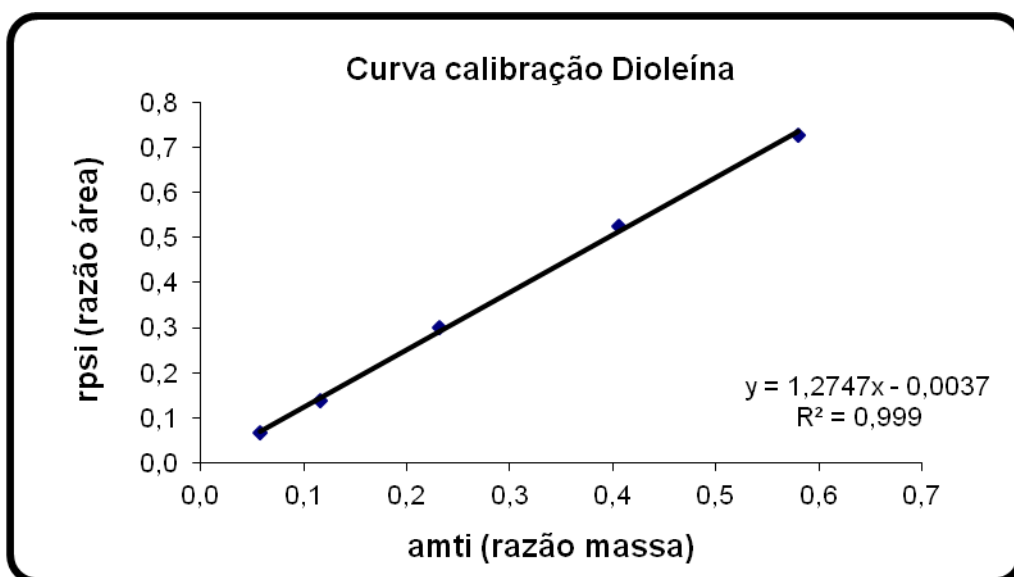


Figura 21. Curva de calibração da dioleína.

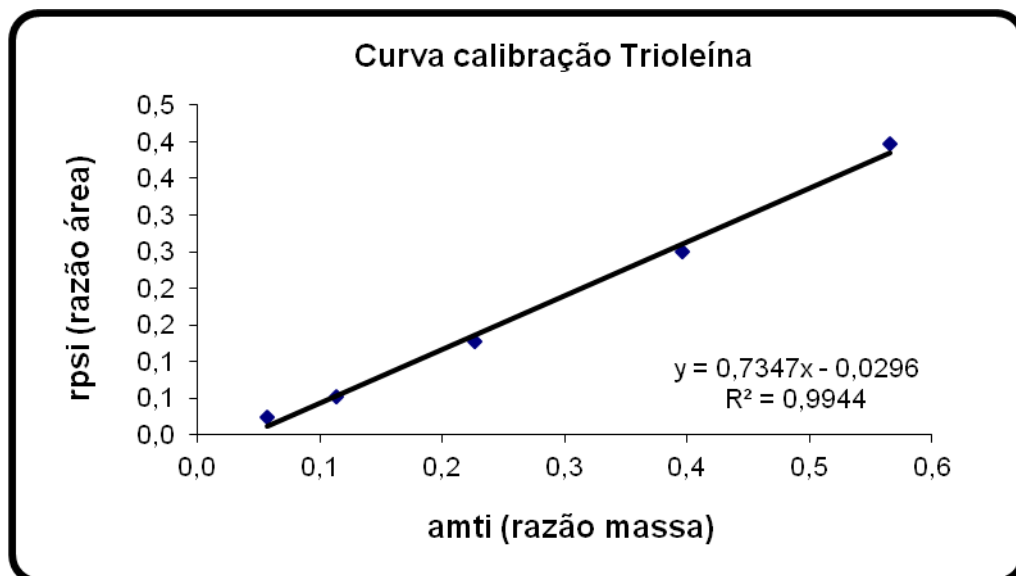


Figura 22. Curva de calibração da trioleína.

As curvas de calibração apresentadas nas **Figuras 19 a 22** mostram uma boa linearidade ($R^2 \geq 0,9944$). Desta forma, estas curvas foram empregadas para a determinação de glicerina livre, combinada e total, por CG, segundo a norma ASTM D6584 (2010), nos produtos de transesterificação obtidos neste projeto. Os resultados encontram-se apresentados nas **tabelas 11 e 12**. Os valores encontrados na **tabela 12** são os valores reais de MAG, DAG e TAG, porém para encontrarmos os valores de glicerina combinada, deve-se multiplicar os valores encontrados em cada uma dessas classes pelo seu respectivo fator de resposta (ver seção 5.3.2.2).

Tabela 11. Resultados, em % massa, de MAG, DAG e TAG por CG.

Código da Amostra	MAG	DAG	TAG
I1	5,45	6,83	6,59
I2	9,66	9,09	10,28
I3	7,59	10,05	6,19
I4	5,26	5,60	6,17
I5	3,13	8,20	7,91
C1	1,58	0,86	2,57
C2	1,63	0,15	0,27
C3	1,25	0,29	0,57
C4	1,14	0,25	0,41
C5	1,09	0,53	1,38

Tabela 12. Resultados, em % massa, de glicerina livre, combinada e total por CG.

Código da amostra	Glicerina Livre	Glicerina combinada			Glicerina combinada total	Glicerina total
		MAG	DAG	TAG		
I1	0,18	1,41	1,02	0,69	3,12	3,30
C1	0,36	0,41	0,13	0,27	0,81	1,16
I2	0,12	2,50	1,35	1,07	4,93	5,05
C2	0,30	0,42	0,02	0,03	0,47	0,77
I3	0,20	1,97	1,50	0,65	4,11	4,31
C3	0,34	0,21	0,06	0,09	0,36	0,70
I4	0,04	1,36	0,83	0,64	2,84	2,88
C4	0,08	0,30	0,04	0,04	0,38	0,46
I5	0,02	0,81	1,22	0,83	2,86	2,88
C5	0,30	0,28	0,08	0,14	0,51	0,81

MAG. Monoacilgliceróis; DAG. Diacilgliceróis; TAG. Triacilgliceróis; I: Reação incompleta, usando uma razão molar óleo:metanol de 1:3 e um tempo reacional de 10 minutos; C: Reação completa, usando uma razão molar óleo:metanol de 1:9 e um tempo reacional de 60 minutos.

Os resultados apresentados na **tabela 12** mostram que os produtos de transesterificação de alta conversão, com exceção para o obtido através do óleo de girassol, apresentam aproximadamente o dobro de glicerina livre que os produtos de transesterificação de baixa conversão. É importante ressaltar que a concentração de glicerina pode indicar a qualidade do biodiesel. A glicerina pode estar sob a forma de glicerina livre ou glicerina combinada, na forma de glicerídeos. A glicerina total é a soma da glicerina livre e combinada. Um alto teor de glicerina livre e combinada pode levar ao acúmulo destes nos tanques de combustível, ao entupimento das linhas de combustível, a contaminação de injetores e depósitos em válvulas. Desta forma, o Conselho Nacional Americano de Biodiesel adotou a especificação e o método analítico para biodiesel da ASTM. A ASTM recomenda o método D-6584 para a análise de glicerina em combustível biodiesel por CG.

O monitoramento do nível de glicerina livre e quaisquer MAG, DAG e TAG indicará a eficiência e o progresso da reação química durante o processo de produção do biodiesel. Os glicerídeos podem aparecer em amostras tomadas durante o processo de transesterificação, mas idealmente não devem permanecer no produto final. Os glicerídeos e a glicerina livre podem fazer o produto comportar-se mais como um sabão do que um combustível.

Os resultados apresentados na **tabela 12** mostram que os produtos de transesterificação de baixa conversão, apresentam teores de glicerina combinada e total maiores que os produtos de transesterificação de alta conversão. Estes resultados já eram esperados, uma vez que a utilização de razão molar óleo:álcool superior à estequiométrica (1:3) é necessária para uma boa conversão.

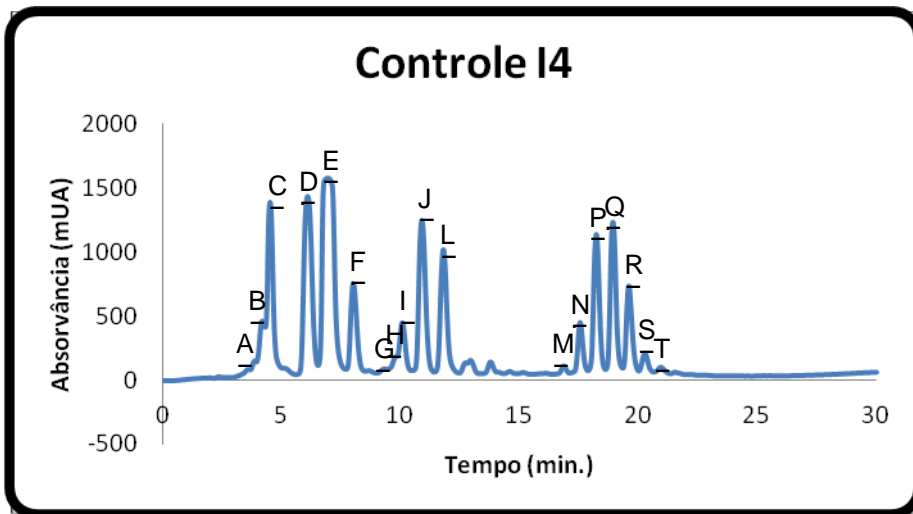
Os resultados apresentados até esta etapa do projeto fazem parte do trabalho intitulado “Comparação entre as técnicas de RMN-¹H, CLAE e CG no monitoramento da reação de transesterificação para a produção do biodiesel”, aceito no 5º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 8º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, que será realizado no período de 16 a 19 de Abril de 2012, em Salvador-BA. (Anexo A).

5.5. Separação e isolamento dos acilgliceróis por EFS

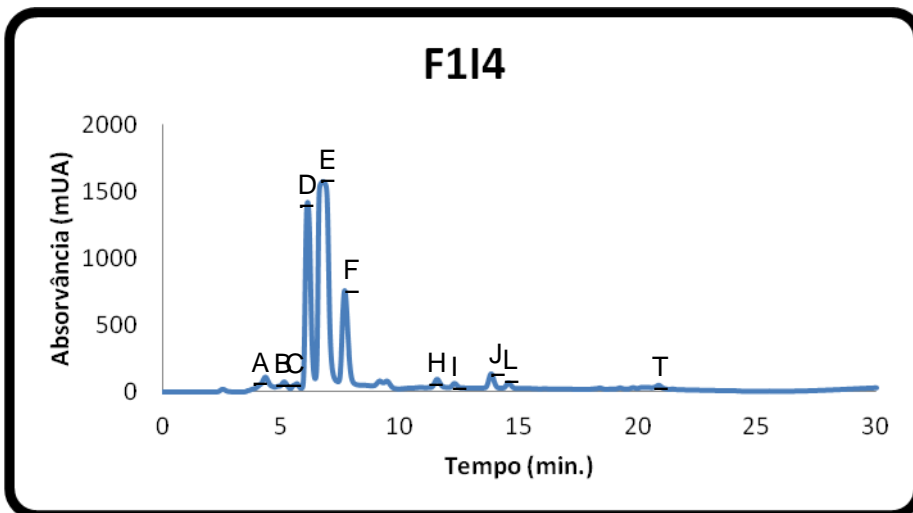
Dentre os dez produtos de transesterificação obtidos neste trabalho, apenas os cinco de baixa conversão, que apresentam quantidades significativas de MAG, DAG e TAG, foram submetidos à etapa de EFS. As frações obtidas através da etapa de EFS foram analisadas por CLAE e CG, e os resultados encontram-se apresentados nos itens subsequentes. Vale lembrar que em sua tese de doutorado, Andrade (2011) analisou as frações da etapa de EFS apenas por CLAE.

5.5.1. Análise das frações da EFS por CLAE

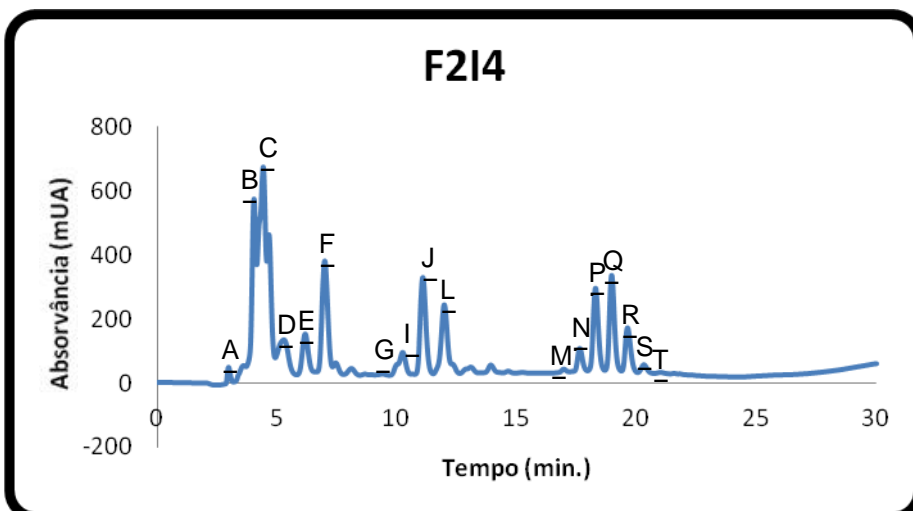
A eficiência na separação dos acilgliceróis (MAG, DAG e TAG) dos EsMAG, nos produtos de transesterificação de baixa conversão, encontra-se ilustrada na **figura 23**. Vale lembrar que as frações 1 (b) e 2 (c) foram eluídas, respectivamente, com *n*-hexano e clorofórmio:metanol 2:1, v/v e ambas foram obtidas a partir da amostra controle, amostras estas denominadas com (a) nos cromatogramas a seguir.



(a)



(b)



(c)

Figura 23. Cromatograma: (a) controle, (b) fração 1, obtida na eluição com n-hexano e (c) fração 2, obtida na eluição com clorofórmio:metanol (2:1), do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de algodão.

Através dos resultados apresentados nos cromatogramas exibidos na **figura 23** pode-se observar que a amostra controle, antes do processo de EFS **(a)**, apresenta nitidamente quatro classes distintas de compostos (MAG, DAG, TAG e EsMAG). No entanto, quando esta amostra foi submetidas à EFS, onde foi eluída com *n*-hexano, ficou evidente a presença predominante de EsMAG nas frações 1 **(b)**, assim como pequenas quantidades de MAG, DAG e TAG. Já nas frações 2 **(c)**, fica evidente a presença de quantidades significativas de MAG, DAG e TAG, além de pequenas quantidades de EsMAG, que não foram completamente eluídos nas frações 1.

Os demais cromatogramas da etapa de EFS dos produtos de transesterificação obtidos neste projeto, podem ser visualizados no **anexo B**.

A composição dos EsMAG e dos acilgliceróis (MAG, DAG e TAG) nas frações obtidas na EFS, foram determinadas por CLAE e os resultados encontram-se apresentados na **tabela 13**.

Tabela 13. Resultados de composição dos EsMAG e dos acilgliceróis (MAG, DAG e TAG), nas frações obtidas na EFS.

Amostra	Composição (%)			
	ÉSTER	MAG	DAG	TAG
Controle I1	46,9	13,7	17,8	21,5
Fração 1	88,2	7,7	2,9	1,3
Fração 2	8,9	56,4	13,4	21,3
Controle I2	51,6	18,2	11,6	18,7
Fração 1	81,6	15,3	1,8	1,3
Fração 2	13,7	51,6	13,4	21,3
Controle I3	39,0	24,4	20,4	16,2
Fração 1	92,8	5,4	1,5	0,3
Fração 2	6,5	64,4	16,6	12,4
Controle I4	47,5	24,7	16,6	11,2
Fração 1	89,6	8,0	2,3	0,1
Fração 2	24,3	51,4	14	10,3
Controle I5	42,6	13,5	19,9	24,0
Fração 1	82,6	10,6	4,5	2,2
Fração 2	8,5	61,6	10,2	19,7

Os resultados apresentados na **tabela 13** mostram que a fração 1 é constituída majoritariamente por EsMAG ($\geq 81,6$ % no produto de transesterificação do óleo de canola) e minoritariamente por acilgliceróis. Já a fração 2 é constituída majoritariamente por acilgliceróis ($\geq 75,7$ % no produto de transesterificação do óleo de algodão). Foi observado um enriquecimento de aproximadamente 2 vezes, tanto em EsMAG na fração 1 quanto em acilgliceróis na fração 2, demonstrando a eficiência do processo de EFS.

5.5.2. Análise das frações da EFS por CG

Todas as frações obtidas por EFS foram analisadas por CG. Nas **figuras 24 e 25**, é possível observar, respectivamente, o cromatograma da amostra controle do produto de transesterificação do óleo de soja de baixa conversão e os cromatogramas das frações 1 (a) e 2 (b) deste produto. Os demais cromatogramas estão apresentados no **anexo C**.

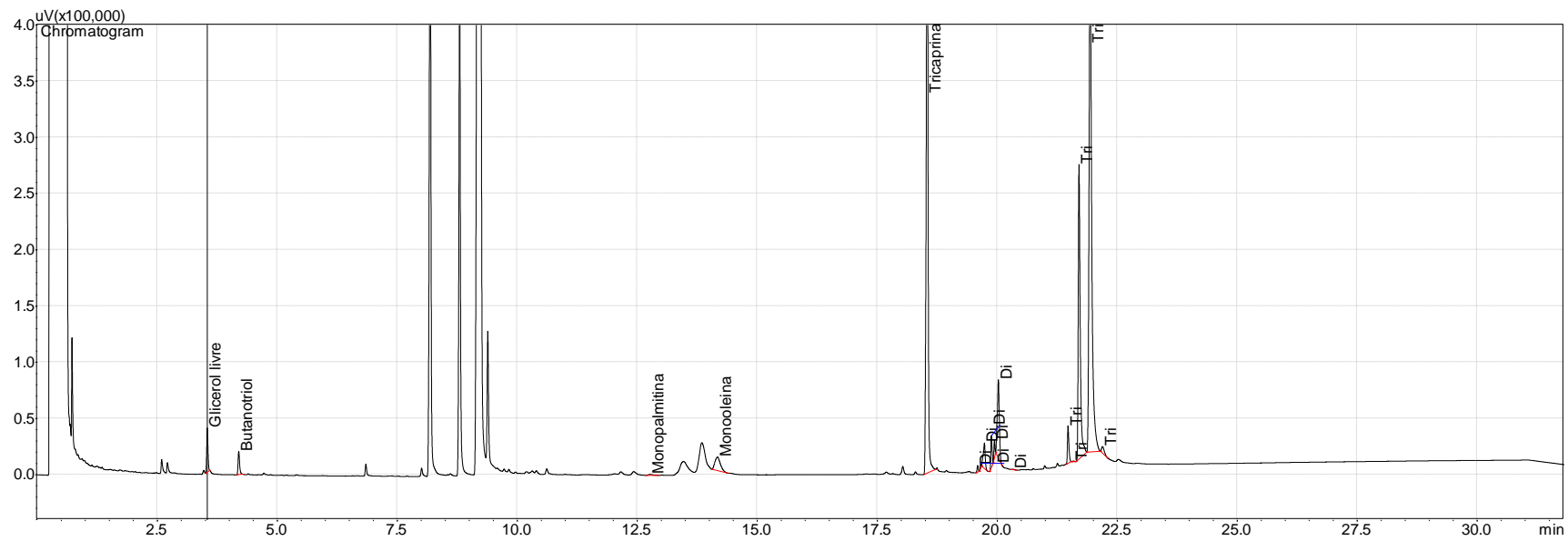


Figura 24. Cromatograma da amostra controle do produto de transesterificação do óleo de soja de baixa conversão.

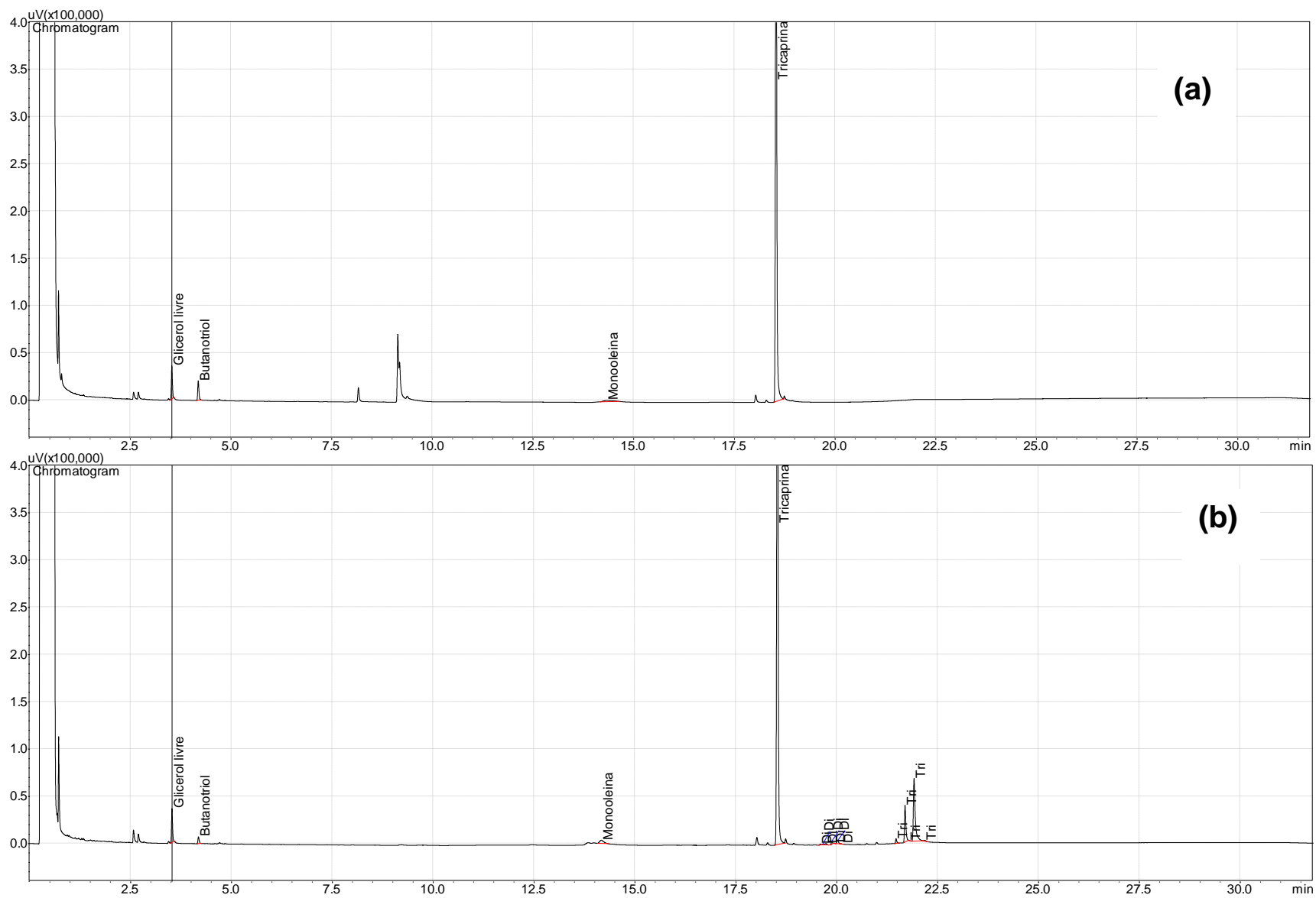


Figura 25. Cromatograma: (a) fração 1, obtida na eluição com *n*-hexano e (b) fração 2, obtida na eluição com clorofórmio:metanol (2:1), do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de soja.

As frações obtidas através da etapa de EFS foram analisadas por CG, e os resultados de glicerina combinada e total encontram-se apresentados na **tabela 14**.

Tabela 14. Resultados, em % massa, de glicerina combinada e total por CG, nas frações obtidas na EFS.

Amostra	Glicerina combinada			Glicerina combinada
	MAG	DAG	TAG	total
CI1	0,011	0,020	0,235	0,266
Fração 1	0,005	0,000	0,004	0,009
Fração 2	0,006	0,000	0,004	0,010
CI2	0,016	0,030	0,179	0,0225
Fração 1	0,005	0,000	0,004	0,009
Fração 2	0,007	0,003	0,032	0,042
CI3	0,016	0,021	0,189	0,0226
Fração 1	0,006	0,000	0,004	0,010
Fração 2	0,006	0,002	0,025	0,032
CI4	0,016	0,015	0,112	0,143
Fração 1	0,006	0,000	0,004	0,010
Fração 2	0,006	0,002	0,015	0,023
CI5	0,010	0,040	0,209	0,259
Fração 1	0,004	0,000	0,004	0,010
Fração 2	0,006	0,001	0,029	0,036

A partir dos resultados apresentados na **tabela 14** foi possível observar que o teor de glicerina combinada total, calculada através da **equação 6** (item 4.3.2.2) é maior (2 a 6 vezes, dependendo da fonte oleaginosa) nas frações 2, quando comparado aos teores presentes nas frações 1. Estes resultados corroboram os apresentados por CLAE, já que mostramos que as frações 1 e 2 são constituídas majoritariamente e respectivamente, por EsMAG e acilglicerois (MAG, DAG e TAG).

Capítulo 6

Conclusões

Capítulo 6. Conclusões

Os resultados de conversão dos produtos de transesterificação de alta e baixa conversão, obtidos a partir de diferentes óleos vegetais (soja, milho, girassol, algodão e canola) em ésteres metílicos de ácidos graxos, foram comparados por RMN-¹H e CLAE e se mostraram semelhantes. Desta forma, a CLAE, empregada no presente trabalho é indicada para o acompanhamento do processo de produção do biodiesel, uma vez que é capaz de acompanhar a extensão com que a reação de transesterificação foi processada. Esta técnica permite a identificação dos ésteres de ácidos graxos, triacilgliceróis (contaminantes remanescente da fonte oleaginosa não transesterificada) e dos intermediários da reação (mono e diacilgliceróis) em uma simples corrida de 25 min, além de analisar as diferenças das composições das frações entres os mesmos.

A técnica de extração em fase sólida, empregada neste projeto para a separação dos acilgliceróis (mono, di e triacilgliceróis) do biodiesel (ésteres de ácidos graxos), levou à obtenção de frações enriquecidas nas principais classes de impurezas (mono, di e triacilgliceróis). Sendo assim, esta técnica apresenta potencial para ser aplicada na caracterização química dos principais contaminantes do biodiesel, já que os concentra em uma mesma fração, aumentando assim a sensibilidade e, portanto, podendo simplificar sua caracterização por métodos analíticos (CLAE e CG). A CLAE e a CG se mostraram adequadas para a avaliação da composição dos produtos de transesterificação obtidos com diferentes graus de conversão e, portanto, diferentes composições em cada classe. No entanto, a não identificação de compostos saturados, por detecção UV, é considerada a principal desvantagem da CLAE. As principais vantagens da CLAE em comparação ao método regulamentado (CG) são as baixas temperaturas durante a análise, o que reduz o risco de isomerização de duplas

ligações e a não necessidade de reagentes de derivatização, o que reduz o tempo de análise.

Neste projeto, foi possível observar que as tendências apresentadas pelas técnicas da CLAE e da CG, em todas as etapas propostas, foram semelhantes. Desta forma, pode-se dizer que as técnicas de CG e CLAE foram eficientes na avaliação da composição dos produtos de transesterificação analisados. Face ao exposto, as técnicas presentes neste projeto mostraram-se úteis para a análise do biodiesel.

Capítulo 7

Perspectivas

Futuras

Capítulo 7. Perspectivas Futuras

Após a execução deste projeto, algumas investigações se mostraram necessárias e úteis para que todas as dúvidas e questionamentos que surgiram possam ser esclarecidos. Dentre as proposições, pode-se citar:

- 1) Quantificar os ésteres metílicos de ácidos graxos, mono-, di- e triacilgliceróis em biodiesel, por CLAE;
- 2) Otimizar o método de análise de glicerina livre e combinada por CG (ASTM D 6584,2010^a), para análise de produtos de transesterificação que apresentam altas concentrações de acilgliceróis;
- 3) Propor uma equação para a determinação da conversão do biodiesel por CG (ASTM D 6584,2010^a) e comparar com os resultados obtidos por CLAE e RMN-¹H;
- 4) Aplicação de um padrão interno nas análises por EFS, de modo a facilitar o acompanhamento deste processo;
- 5) Planejar e executar isolamento de padrões das classes constituintes do biodiesel (MAG, DAG, TAG e EsMAG) a partir do método de EFS acoplado a CLAE em escalas semipreparativas e preparativas, através de transposições cromatográficas.

Capítulo 8

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – ANP. Resolução nº 7, de 19 de março de 2008. Disponível em: <<http://www.anp.org.br>>. Acesso em: 10 de Setembro de 2011.)
ASTM D6584 (Determination of Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography) de 2010.

AL-WIDYAN, M.I.; AL-SHYOUKH, A.O. **Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel.** *Bioresource Technology*, v. 85, p. 253-256, 2002.

ANDRADE, D.F.; **Caracterização de Biodiesel através da Separação dos Constituintes por Cromatografia Líquida.** *Tese de Doutorado - Escola de Química*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011

ANDRADE, D.F.; MAZZEI, J.L.; d'AVILA, L.A., KAISER, C.R. **Assessment of Different Measurement Methods Using ¹H-NMR Data for the Analysis of the Transesterification of Vegetable Oils.** *Journal American Oil Chemistry Society*, v. 89, p. 619-630, 2012.

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

AGARWAL, A.K.; DAS, L.M. **Biodiesel development and characterization for use as a fuel in compression ignition engines.** *Journal of Engineering for Gas Turbines and Power*, v. 123, p. 440, 2001

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

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

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

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.; HOLLIGOSS, D.; RASMUSSEN, S.; **Biodiesel: A renewable and biodegradable fuel.** *Hydrocarbon Processing*. p. 103-106, 2006.

CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J. **Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids.** *American Society of Agricultural and Biological Engineering*, v.4, p.1429-1436, 2001

- CORREA, S.M.; ARBILLA, G.; **Aromatic hydrocarbons emissions in diesel and biodiesel exhaust.** *Atmospheric Environment*, v.40, p. 6821-6826, 2006
- 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.
- CZAUADERNA, M.; KOWALCZYK, J. **Separation of some mono-, di- and tri-unsaturated fatty acids containing 18 carbon atoms by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection.** *Journal of Chromatography B*, v. 760, p. 165-178, 2001.
- DEMIRBAS, A. **Biodiesel Fuels from Vegetable Oils via Catalytic and Non-Catalytic Supercritical Alcohol Transesterifications and Other Methods: A Survey.** *Energy Conversion and Management*, v. 44, p. 2093-2109, 2003.
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG- EN14214: **Automotive fuels. Fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines. Requirements and test methods.** [German], 2003
- DMYTRYSHYN, S.L.; DALAI, A.K.; CHAUDHARI, S.T.; MISHRA, H.K.; REANEY, M.J. **Synthesis and characterization of vegetable oil derived esters: evaluation for their diesel additive properties.** *Bioresource Technology*, v. 92, p. 55-64, 2004.
- DI NICOLA, G.; PACETTI, M.; POLONARA, F.; SANTORI, G.; STRYJEK, R. **Development and optimization of a method for analyzing biodiesel mixtures with non-aqueous reversed phase liquid chromatography.** *Journal of Chromatography A*, v. 1190, p. 120-126, 2008.
- DORADO, M.P.; BALLESTEROS, E.; ARNAL, J.M.; GÓMEZ, J.; JIMÉNEZ, F.J.L. **Testing waste olive oil methyl ester as a fuel in a diesel engine.** *Energy Fuels*, v. 17, p. 1560-1565, 2003.
- DORADO, M.P.; BALLESTEROS, E.; LÓPEZ, F.J.; MITTELBACH, M. **Optimization of alkali-catalyzed transesterification of Brassica Carinata oil for biodiesel production.** *Energy Fuels*, v. 18, p. 77-83, 2004.
- DUNN, D. O. **Effect of oxidation under accelerated conditions on fuel properties of methyl soyate (biodiesel).** *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 79, p. 915, 2002.
- ENCINAR, J.M.; GONZÁLEZ, J.F.; SABIO, E.; RAMIRO, M.J. **Preparation and properties of biodiesel from cynara cardunculus L. oil.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 38, p. 2927-2931, 1999.
- FREEDMAN, B.; PRYDE, E.H. **Fatty Esters from Vegetable Oils for Use as a Diesel Fuel.** *American Society of Agricultural and Biological Engineering*, p.117-122, 1982.
- FREEDMAN, B.; PRYDE, E.H. and MOUNTS, T.L. **Variables Affecting the Yields of Fatty Esters from Tranesterified Vegetable Oils.** *Journal of the American Oil Chemists Society*. v. 61, p. 1638-1643, 1984.

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

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

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

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

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

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

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

KNOTHE, G. **Analytical methods used in the production and fuel quality assessment of biodiesel.** *Transaction of American Society of Agricultural and Biological Engineering* v. 44, p. 193-200, 2001.

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

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

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

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.

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

LOZANO, P., CHIRAT, N., GRAILLE, J., PIOCH, D. **Measurement of free glycerol in biofuels.** *Journal of Analytical Chemistry*, v. 354, p. 319-322, 1996.

LOWE, G.A.; PETERSON, C.L.; THOMPSON, J.C.; TABERSKI, J.S.; MANN, P.T.; CHASE, C.L. 1988. **Producing HySEE Biodiesel from used french fry oil and ethanol for an over-the-road truck.** *American Society of Agricultural and Biological Engineering Paper n^o. 98-6081.*

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

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

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

MEHER, L.C.; SAGAR, D.V.; NAIK, S.N. **Technical Aspects of Biodiesel Production by Transesterification – A Review.** *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 10, p. 248-268, 2006.

MITTELBACH, M., **Diesel Fuel Derived from Vegetable Oils, V [I]: Gas Chromatographic Determination of Free Glycerol in Transesterified Vegetable Oils,** *Chromatographia*, v. 37, p. 623-626, 1993.

MITTELBACH, M; ROTH, G.; BERGMANN, A.; **Simultaneous gas chromatographic determination of methanol and free glycerol in biodiesel.** *Chromatographia* v.42, p.431, 1996.

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

NASCIMENTO, M.G.; COSTA NETO, P.R.; MAZZUCO, L.M. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento.* v. 19, p. 28, 2001.

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

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

- OLIVEIRA, F.C.C.; SUAREZ, P.A.Z.; SANTOS, W.L.P. **Biodiesel: Possibilidades e soluções.** *Química Nova na escola*. V. 28, p. 3-8, 2008
- PARASCHIVESCU, M.C.; ALLEY, E.G.; FRENCH W.T.; HERNANDEZ, R.; ARMBRUST, K. **Determination of methanol in biodiesel by headspace solid phase microextraction.** *Bioresourse Technology*, v. 99, p. 5901-5905, 2008
- PETERSON, C.L.; AULD, D.L.; KORUS, R. **Winte rape oil for diesel engines: recovery and utilization.** *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 60, p. 1579-1587, 1983.
- PÉREZ-PALACIOS, T.; RUIZ, J.; ANTEQUERA, T. **Improvement of a solid phase extraction method for separation of animal muscle phospholipid classes.** *Food Chemistry*, v.102, p.875-879, 2007
- 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.
- PINKART, H.C.; DEVEREUX, R.; CHAPMAN, P.J. **Rapid separation of microbial lipids using solid phase extraction columns.** *Journal of Microbiological Methods*, v.34, p.9-15, 1998
- PLANK, C.; LORBEER, E. **Minor components in vegetable oil methyl esters I: Sterols in rapeseed oil methyl ester.** *Fett Wissenschaft Technologie*, v.96, p.379-386, 1994.
- PLANK, C.; LORBEER, E. **Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography.** *Journal of Chromatography A*, v. 697, p. 461-468, 1995.
- RAMOS, L. P.; **Conversão de óleos vegetais em biocombustível alternativo ao diesel convencional. Não existe On line.** *Anais do Congresso Brasileiro de Soja*, Londrina, Brasil, 1999.
- RAMOS, L.P.; COSTA NETO, P.R.; ROSS, L.F.S.; ZAGONEL, G.F.; **Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras** *Química Nova*, v.23, p. 531, 2000
- REZENDE, D.R.; ALVES, M.I.R.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; **Determinação do teor de biodiesel em diesel.** *I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel*. Brasília, Brasil, 2006.
- RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L.L.; ROSSI, A.V.; SCHUCHARDT, U.; **Synthesis of biodiesel: a contextualized experiment proposal for the general chemistry laboratory.** *Química Nova*, v. 30, p. 1374-1380, 2007
- RUIZ-GUTIERREZ, V.; PEREZ-CAMINO, M.C.; **Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compound.** *Journal of chromatography*. v. 885, p. 321-341, 2000.

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

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

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M.N. **Enzymatic Transesterification for Biodiesel Production.** *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, v. 40, p. 392-399, 2003.

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

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

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

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

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*, v.127, p.34-44, 2006.

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

Capítulo 9

Anexos

Anexo A

Comparação entre as técnicas de RMN-¹H, CLAE e CG no monitoramento da reação de transesterificação para a produção do biodiesel

Thiago Carvalho Cardoso (Instituto de Química/IQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ, c thiagoc2@hotmail.com), Débora França de Andrade (Laboratório de Combustíveis e Derivados de Petróleo/ LABCOR, Escola de Química/EQ, deboraf Franca.andrade@gmail.com), Carlos Roland Kaiser (IQ, UFRJ, kaiser@iq.ufrj.br), Débora de Almeida Azevedo (IQ, UFRJ, deboradealmeida@iq.ufrj.br), Luiz Antonio d'Avila (EQ, UFRJ, davila@eq.ufrj.br).

Palavras Chave: biodiesel, RMN-¹H, CG, CLAE.

1- Introdução

Durante o processo de transesterificação de óleos vegetais para a produção de biodiesel (ésteres metílicos e/ou etílicos de ácidos graxos), intermediários como monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) são formados. Além destes intermediários, os triacilgliceróis (TAG) não reagidos também podem contaminar o produto final. Desta forma, a qualidade do biodiesel é imprescindível para seu uso como combustível, pois estes contaminantes podem levar a problemas operacionais severos quando utilizados em motores de combustão, incluindo a formação de depósitos no motor e o entupimento de filtros.

Várias técnicas cromatográficas e espectroscópicas têm sido aplicadas para a análise de biodiesel e/ou acompanhamento da reação de transesterificação.¹⁻⁵ Revisões apontam que os métodos cromatográficos são os mais utilizados, principalmente a cromatografia em fase gasosa (CG).^{6,7} Apesar de não ser tão difundida quanto a CG, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresenta as vantagens de separar componentes de diferentes números de ligações duplas (NLD), da redução da ocorrência de isomeria cis-trans, e da análise sem derivatização. Sendo assim, o principal objetivo do presente trabalho foi a avaliação comparativa das técnicas de RMN-¹H, CLAE e CG, em termos de conversão e teores de contaminantes (MAG, DAG,

TAG, glicerina livre (GL), glicerina combinada (GC) e glicerina total (GT)), de dez produtos de transesterificação, obtidos a diferentes graus de conversão, partindo dos óleos de soja, milho, girassol, canola e algodão.

2 - Material e Métodos

2.1. Óleos Vegetais

Neste trabalho foram empregados cinco tipos diferentes de óleos vegetais. Os óleos de soja, milho, girassol e de canola foram comerciais refinados da marca Liza (Cargill, São Paulo). O óleo de algodão foi cedido pelo Cenpes/Petrobras. Todos os óleos vegetais foram utilizados sem qualquer procedimento prévio de purificação e/ou tratamento.

2.2. Reações de Transesterificação

As reações de transesterificação dos óleos vegetais estudados, durante 10 e 60 minutos, respectivamente, empregando razão molar de 1:3 e 1:9 em óleo/metanol, foram realizadas de acordo com o procedimento descrito em uma recente publicação de nosso grupo de pesquisa.⁸

2.3. Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-¹H)

As análises por RMN-¹H foram realizadas através do procedimento descrito por Andrade *et al.*, 2011.⁹

2.4. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises por CLAE foram realizadas através do procedimento descrito pelo nosso grupo de pesquisa.⁸

2.5. Análise por Cromatografia em Fase Gasosa

As análises por CG foram realizadas segundo a norma ASTM D 6584 (2010).¹⁰

3 - Resultados e Discussão

Na tabela 1 são apresentados os resultados de conversão (%) por RMN-¹H e CLAE, e de caracterização, em termos de MAG, DAG, TAG, GL, GC e GT por CG, dos dez produtos de transesterificação dos óleos vegetais estudados, usando uma razão molar óleo vegetal:metanol de 1:3 e 1:9.

Tabela 1. Resultados de conversão (%) por RMN-¹H (C_{RMN-1H}) e CLAE (C_{CLAE}), e de caracterização, por CG, dos diferentes produtos de transesterificação.

Fonte Oleaginosa	Soja		Milho		Girassol		Canola		Algodão		
Razão Molar Óleo:Metanol	1:3	1:9	1:3	1:9	1:3	1:9	1:3	1:9	1:3	1:9	
Tempo Reacional (min.)	10	60	10	60	10	60	10	60	10	60	
C_{RMN-1H} (%) ^a	44	97	39	89	30	95	51	97	66	95	
Caracterização por CG ^b (% m/m) ¹⁰	MAG ^d	7,6	1,2	5,5	1,6	9,7	1,6	3,1	1,1	5,3	1,1
	DAG ^e	10,0	0,3	6,8	0,9	9,1	0,2	8,2	0,5	5,6	0,3
	TAG ^f	6,2	0,6	6,6	2,6	10,3	0,3	7,9	1,4	6,2	0,4
	GL ^g	0,2	0,3	0,2	0,4	0,02	0,3	0,1	0,3	0,04	0,1
	GC ^h	4,1	0,4	3,1	0,8	2,9	0,5	4,9	0,5	2,8	0,4
	GT ⁱ	4,3	0,7	3,3	1,2	2,9	0,8	5,0	0,8	2,9	0,5
C_{CLAE} (%) ^b	51	98	60	90	24	95	56	97	62	95	

^aRMN-¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio;

^bCG: Cromatografia em Fase Gasosa; ^cCLAE-UV: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; ^dMAG: monoacilgliceróis; ^eDAG: diacilgliceróis; ^fTAG: triacilgliceróis; ^gGL: glicerina livre, ^hGC: glicerina combinada, ⁱGT: glicerina total.

Vale lembrar que segundo a norma ASTM D 6584 (2010)¹⁰, a glicerina combinada -GC (tabela 1) foi calculada através do somatório dos valores de percentual em massa dos MAG, DAG e TAG multiplicados, respectivamente, pelos fatores de resposta 0,2591; 0,1488 e 0,1044.

A partir dos dados apresentados na tabela 1 observou-se uma maior conversão dos óleos vegetais em ésteres metílicos

nos produtos de transesterificação obtidos utilizando uma razão molar óleo:metanol de 1:9. É importante ressaltar que para uma boa conversão é comum a utilização de razão molar superior à estequiométrica de 1:3 de óleo:álcool, de modo a deslocar o equilíbrio para formação dos produtos.

Os resultados de conversão obtidos pelos métodos da CLAE, e da RMN-¹H (tabela 1), foram comparados usando o teste-t, e os métodos foram considerados estatisticamente equivalentes ($P > 0,05$). Ou seja, pode-se afirmar que a expressão empregada para a determinação da conversão por CLAE, representou adequadamente a conversão dos produtos de transesterificação, independente da fonte oleaginosa e do grau de conversão.

Através da tabela 1, observou-se um maior percentual de MAG, DAG, TAG, GC e GT, por CG, nos produtos de transesterificação de baixa conversão (obtidos utilizando uma razão molar óleo:metanol de 1:9). No entanto, observou-se por CG, teores muito semelhantes de GL nos produtos de transesterificação de baixa e alta conversão, sugerindo uma similaridade de remoção da GL durante o processo de produção dos produtos de transesterificação.

Na figura 1a, podemos observar a presença de quantidades significativas de MAG, DAG e TAG, além dos EsMAG, já na figura 1b, observamos quantidades residuais destes contaminantes e altos teores de EsMAG. Este perfil cromatográfico se mantém para os demais produtos de transesterificação obtidos pelos óleos vegetais de milho, girassol, canola e algodão.

Desta forma, verifica-se que o perfil cromatográfico dos produtos de transesterificação apresenta relação direta com os valores de conversão determinados, por RMN ¹H, através da expressão de Gelbard *et al.* (1995). Ou seja, à medida que a conversão aumenta, a intensidade dos sinais das classes de MAG, DAG e TAG diminui, e

consequentemente, a intensidade dos sinais da classe de EsMAG aumenta. A CLAE pode ser considerada uma ferramenta útil para a previsão de possíveis adulterações do biodiesel pela adição clandestina de óleo vegetal, uma vez que é capaz de diferenciar facilmente os EsMAG (biodiesel) dos TAG (principal constituinte dos óleos vegetais).

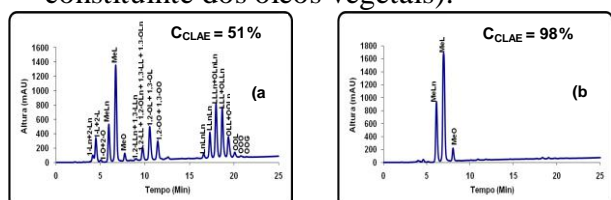


Figura 1. Cromatogramas dos produtos de transesterificação do óleo de soja, com baixa conversão (a) e alta conversão (b).

Todos os picos apresentados na figura 1, assim como em todos os cromatogramas obtidos neste trabalho, foram identificados por CLAE-FRNA, e a nomenclatura dos componentes encontra-se ilustrada na tabela 2.

Tabela 2. Nomenclatura e notação dos componentes identificados, por CLAE-FRNA, nos produtos de transesterificação e nos óleos correspondentes.

Classe	Nomenclatura	Notação
MAG	Monolinolenina	Ln
	Monolinoleína	L
	Monooleína	O
EsMAG	Éster metílico do ácido linolênico	MeLn
	Éster metílico do ácido linoléico	MeL
	Éster metílico do ácido oléico	MeO
DAG	Dilinenina	LnLn
	Linoleoil-linoleoil-glicerol	LLn
	Dilinoleína	LL
	Oleoil-linoleoil-glicerol	OLn
	Oleoil-linoleoil-glicerol	OL
	Dioloína	OO
TAG	Trilinenina	LnLnLn
	Dilinoil-linoleoil-glicerol	LLnLn
	Dilinoil-linoleoil-glicerol	LLLn
	Dilinoil-linoleoil-glicerol	OLnLn
	Trilinoleína	LLL
	Oleoil-linoleoil-linoleoil-glicerol	OLLn

Dilinoil-linoleoil-glicerol	OLL
Dioloil-linoleoil-glicerol	OOLn
Dioloil-linoleoil-glicerol	OOL
Trioleína	OOO
Dioloil-linoleoil-glicerol	OOG

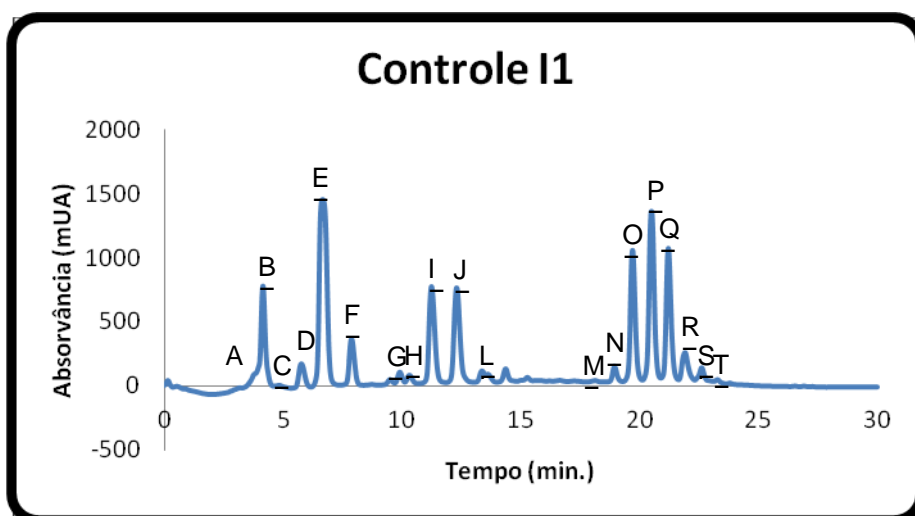
4 - Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do IQ-UFRJ, pelas análises espectroscópicas.

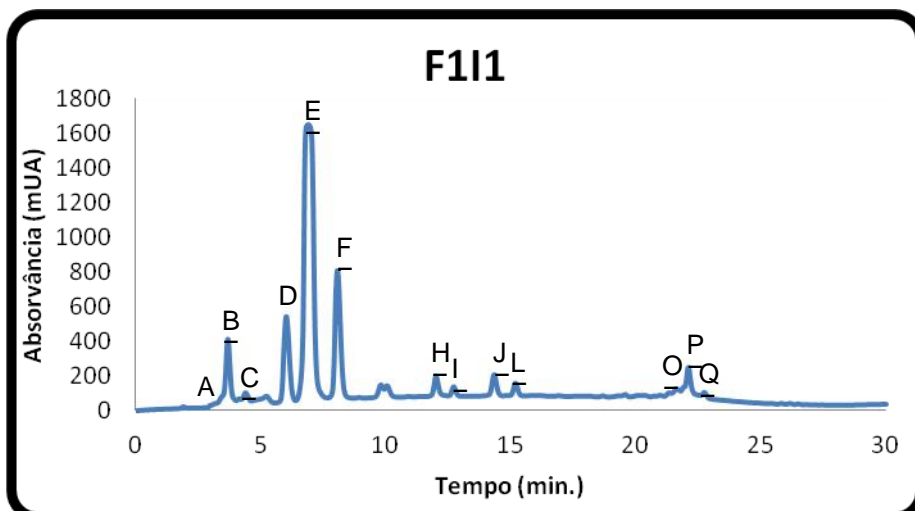
5 - Bibliografia

- Liu, X.; He, H.; Wang, Y.; Zhu, S.; Piao, X. *Fuel*. **2008**, *87*, 216.
- Stavarache, C.; Vinatoru, M.; Maeda, Y.; Bandow, H. *Ultrason. Sonochem.* **2007**, *14*, 413.
- Türkan, A.; Kalay, S. *J. Chromatogr. A*. **2006**, *127*, 34.
- Zagonel, G.F.; Peralta-Zamora, P.; Ramos, L.P. *Talanta*, **2004**, *63*, 1021.
- Arzamendi, G.; Arguinarena, E.; Campo, I.; Gandia, L.M. *Chem. Eng. J.* **2006**, *122*, 31.
- 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. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 1313.
- Monteiro, M.R.; Ambrozina, A.R.P.; Lião, L.M.; Ferreira, A.G. *Talanta*. **2008**, *77*, 593.
- Andrade, D.F.; Mazzei, J.L.; d'Avila, L.A. *Revista Virtual de Química*, **2012**, *4*.
- Andrade, D.F.; Mazzei, J.L.; Kaiser, C.R.; d'Avila, L.A. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **2011**.
- ASTM D6584 – “Standard Test Method for Determination of Total Monoglyceride, Total Diglyceride, Total Triglyceride, and Free and Total Glycerin in B-100 Biodiesel Methyl Esters by Gas Chromatography”, **2010**.

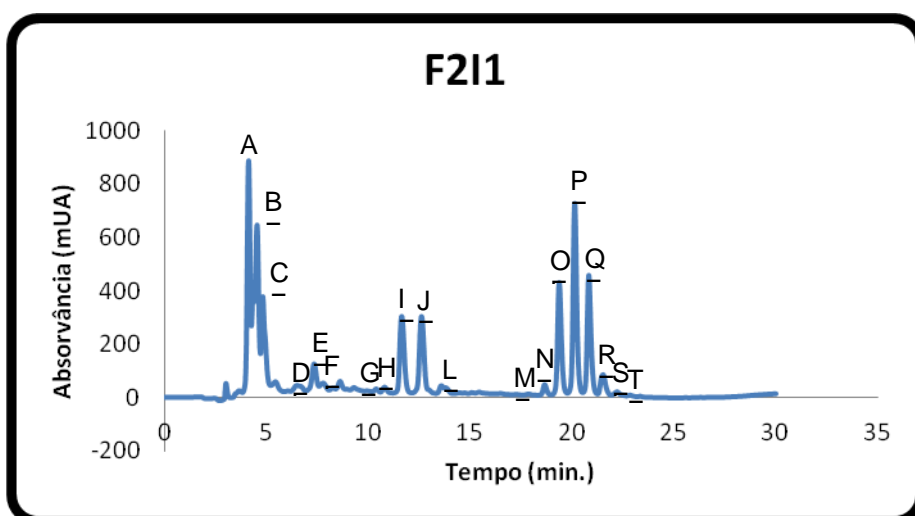
Anexo B



(a)

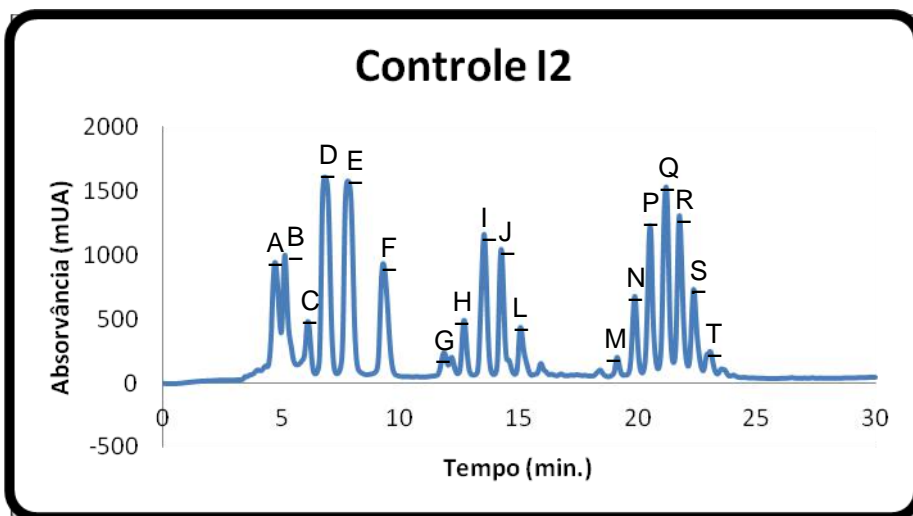


(b)

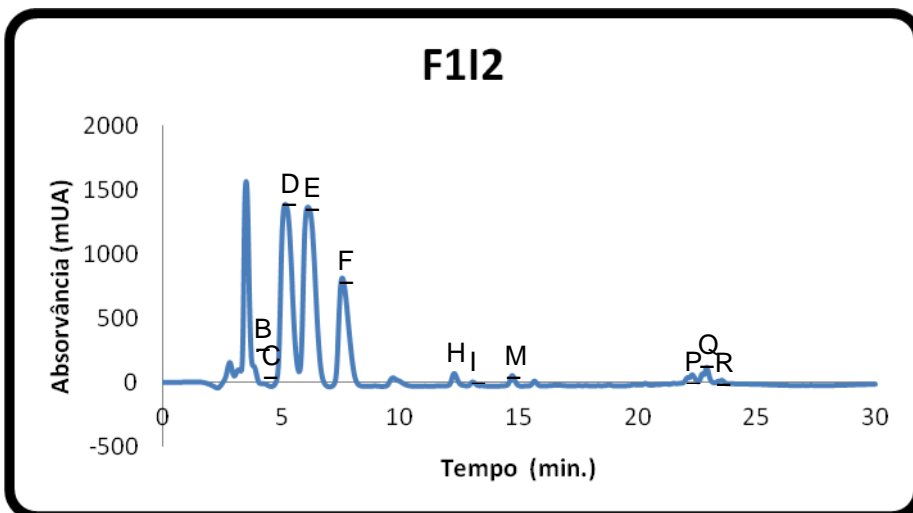


(c)

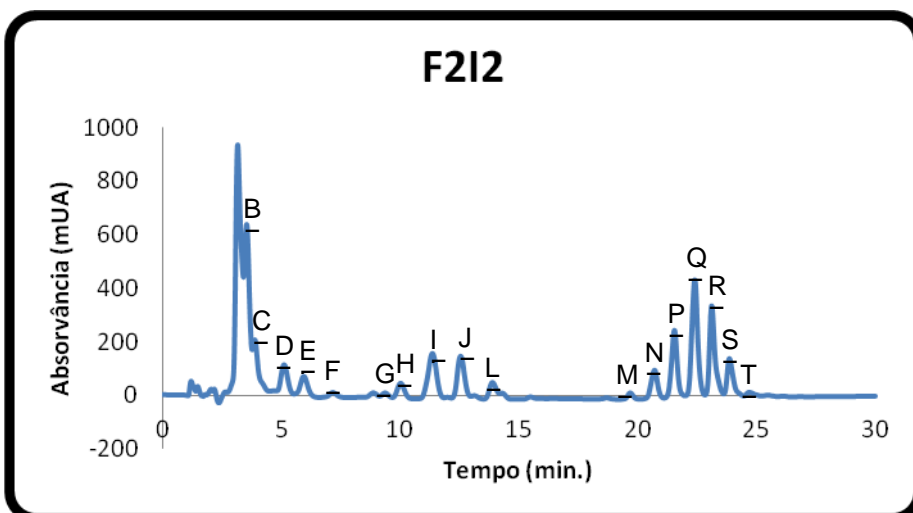
Figura 1. Cromatograma: (a) controle, (b) fração 1, obtida na eluição com *n*-hexano e (c) fração 2, obtida na eluição com clorofórmio:metanol (2:1), do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de milho.



(a)

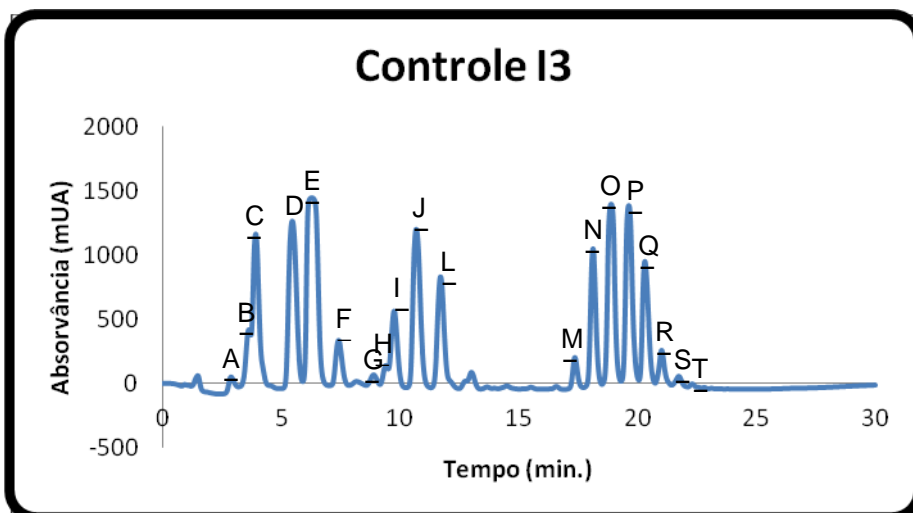


(b)

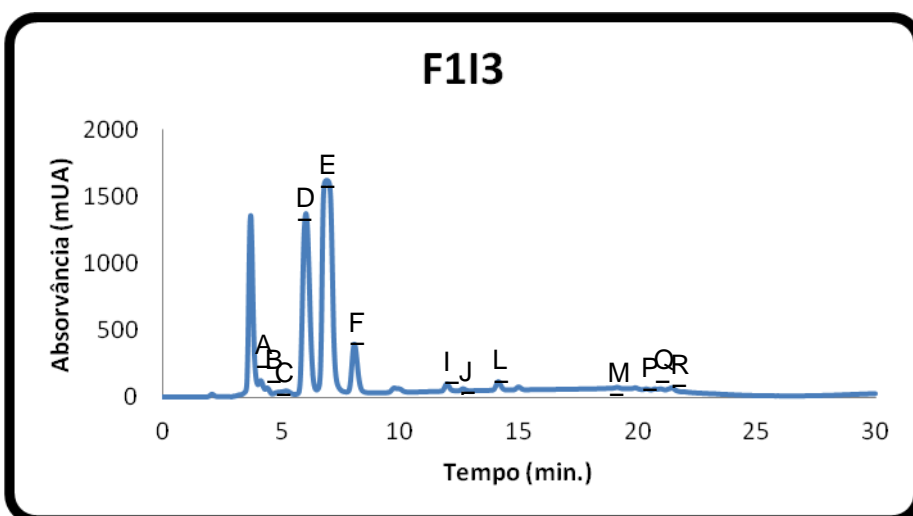


(c)

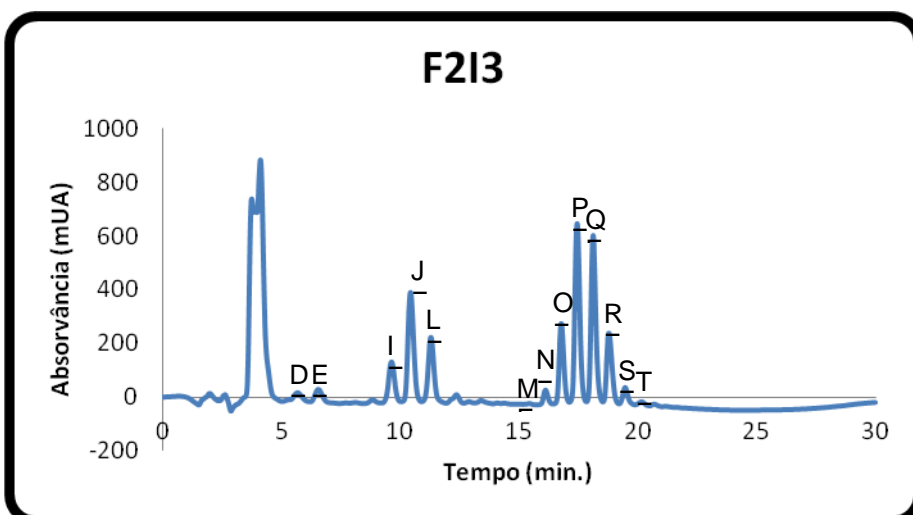
Figura 2. Cromatograma: (a) controle, (b) fração 1, obtida na eluição com *n*-hexano e e (c) fração 2, obtida na eluição com clorofórmio:metanol (2:1), do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de canola.



(a)

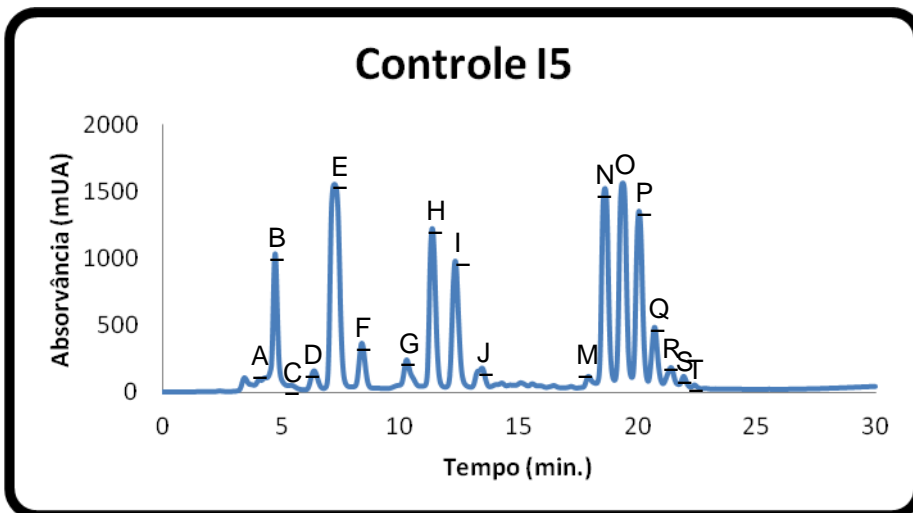


(b)

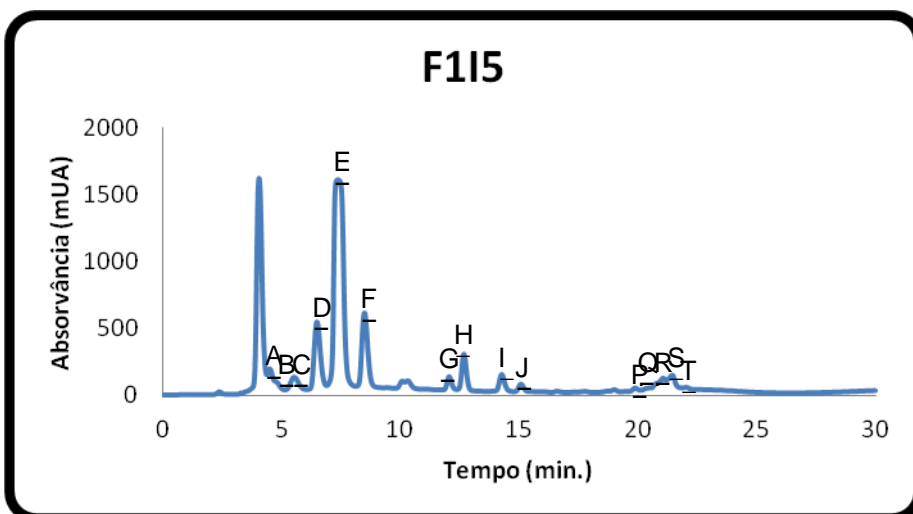


(c)

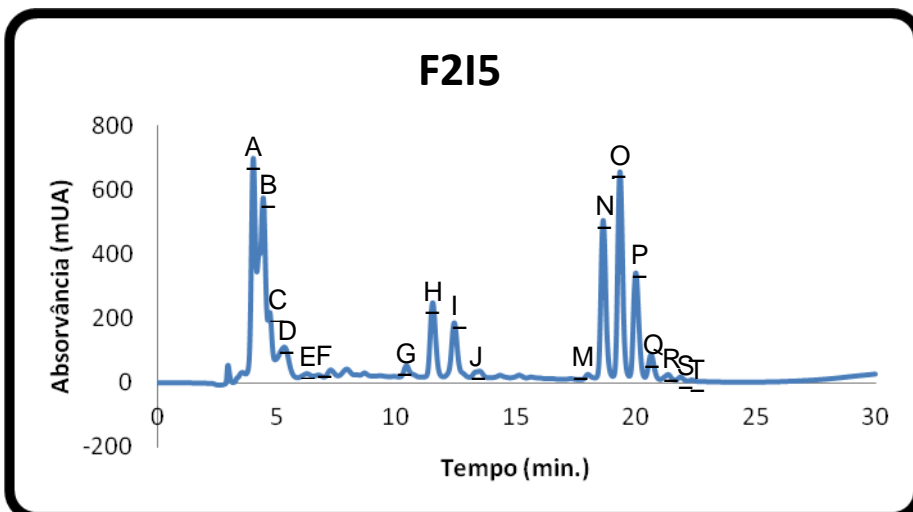
Figura 3. Cromatograma: (a) controle, (b) fração 1, obtida na eluição com *n*-hexano e (c) fração 2, obtida na eluição com clorofórmio:metanol (2:1), do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de soja.



(a)



(b)



(c)

Figura 4. Cromatograma: (a) controle, (b) fração 1, obtida na eluição com *n*-hexano e (c) fração 2, obtida na eluição com clorofórmio:metanol (2:1), do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de girassol.

Anexo C

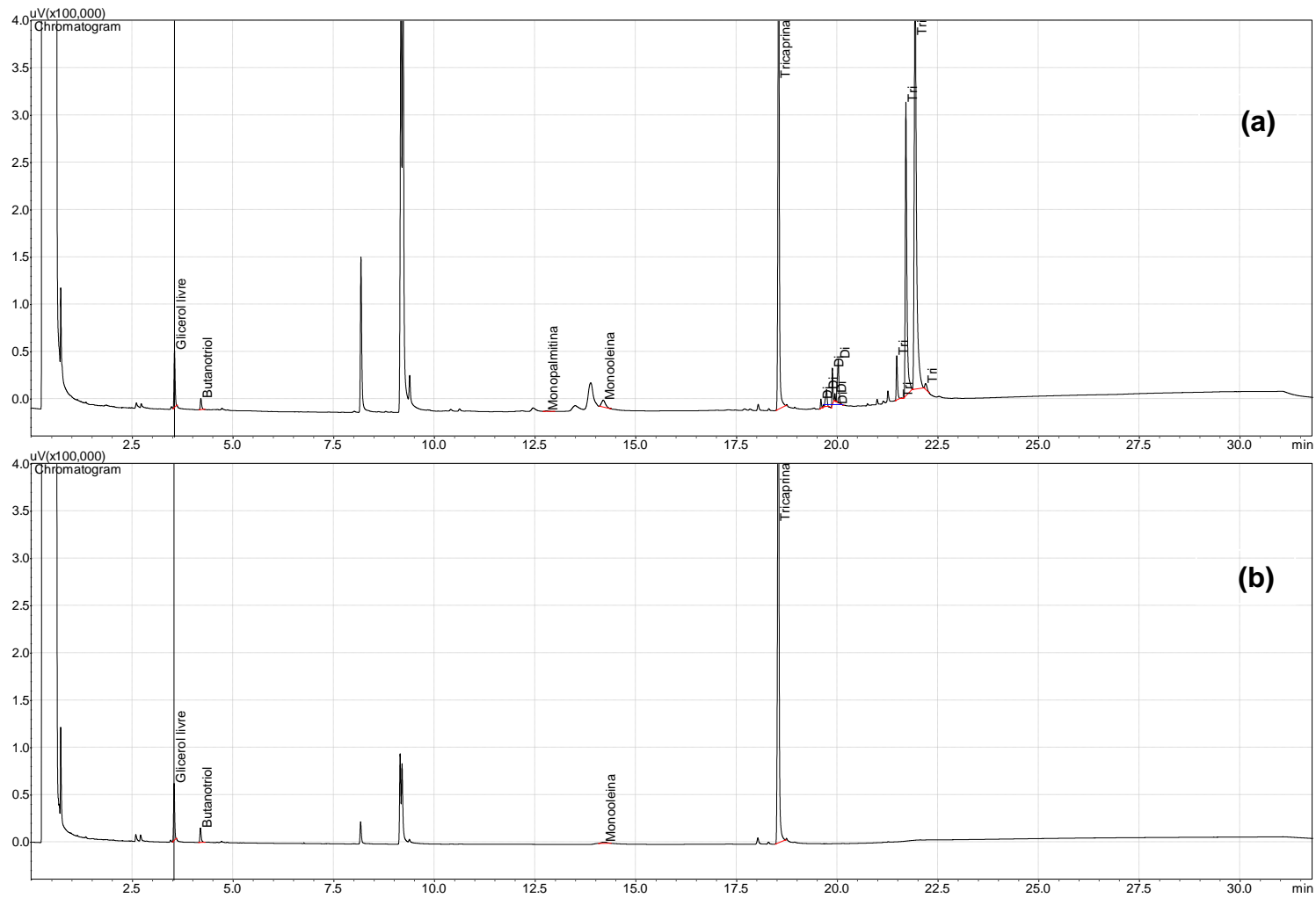


Figura 1. Cromatograma: (a) controle, (b) fração 1, obtida na eluição com *n*-hexano, do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de milho.

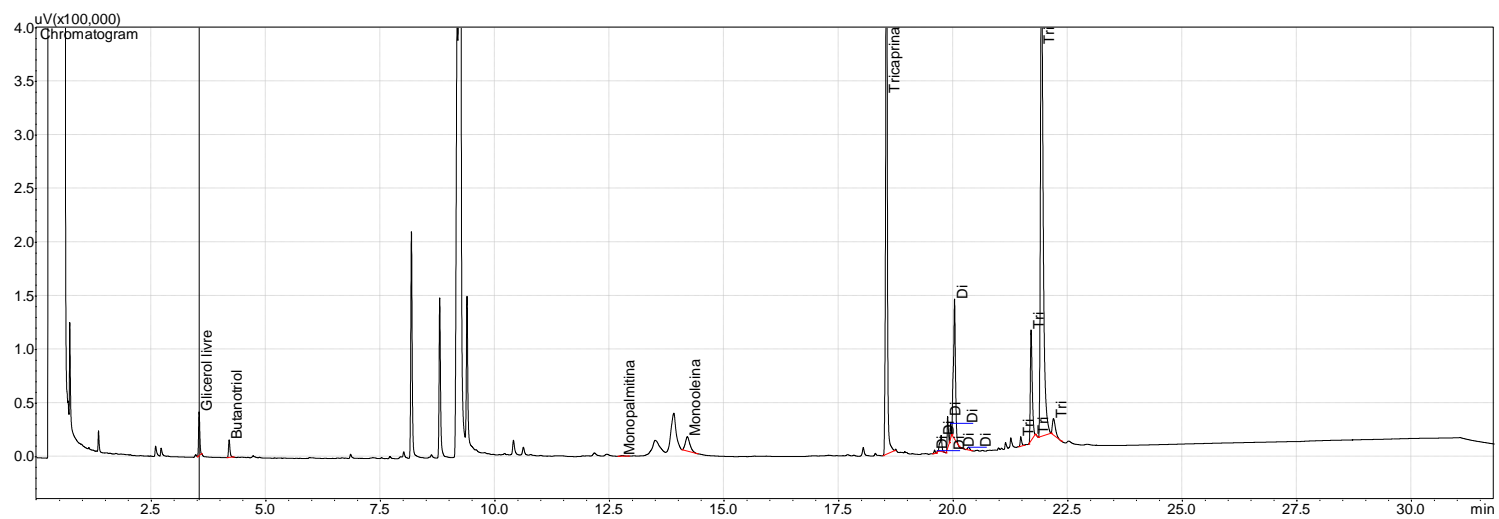


Figura 2. Cromatograma (a) fração 2, obtida na eluição com *n*-hexano, do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de milho.

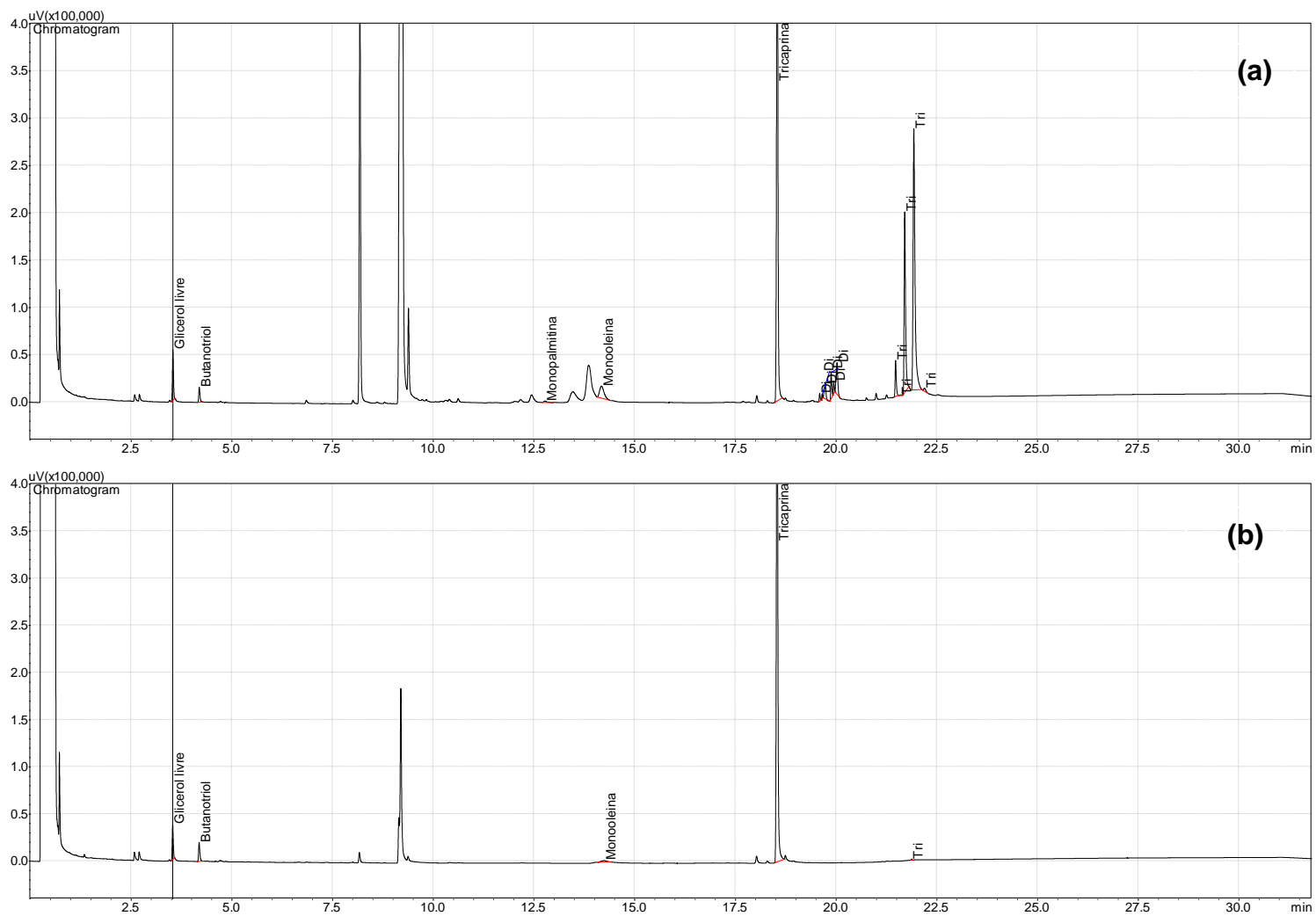


Figura 3. Cromatograma: (a) controle, (b) fração 1, obtida na eluição com *n*-hexano, do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de canola.

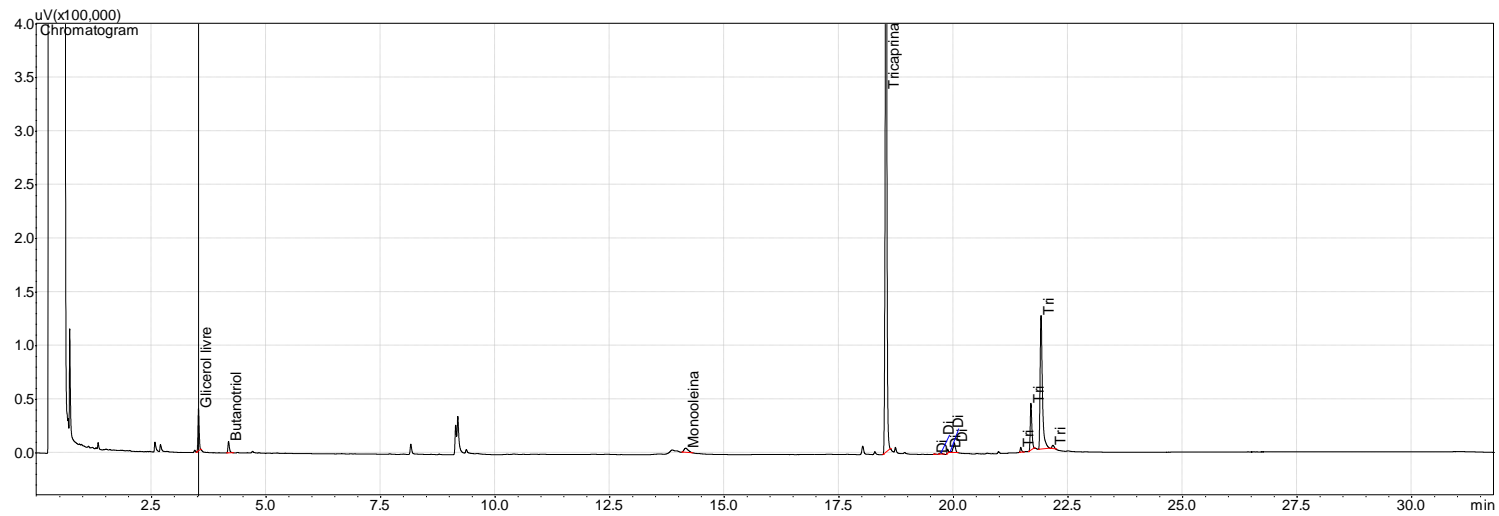


Figura 4. Cromatograma da fração 2, obtida na eluição com *n*-hexano, do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de canola.

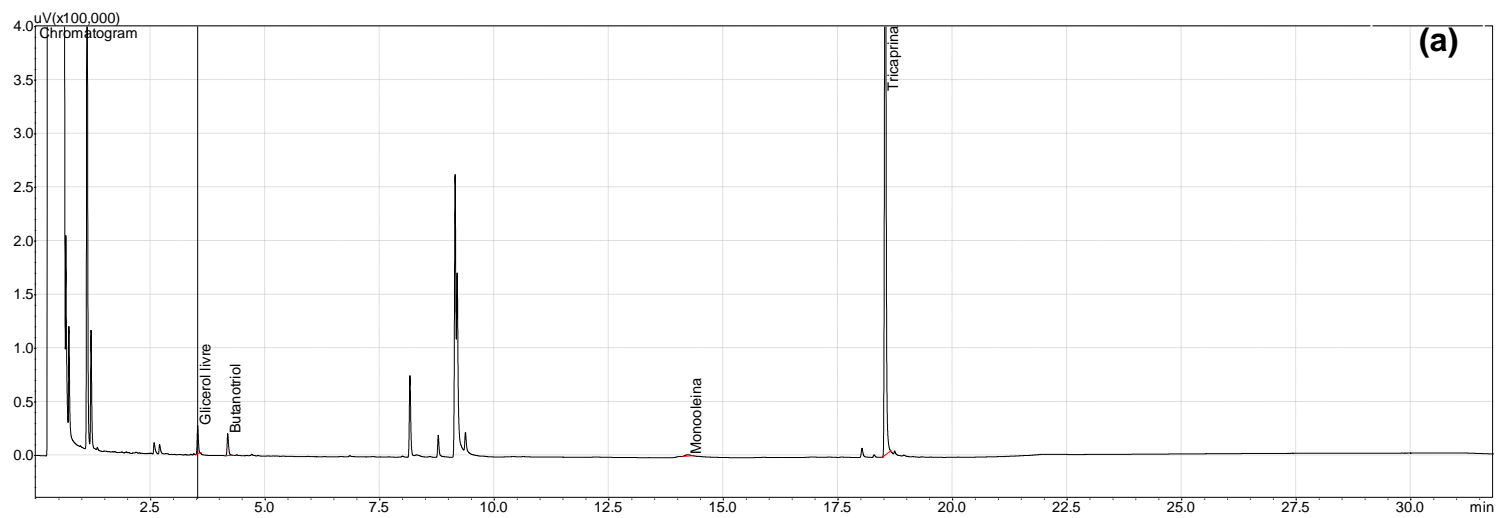
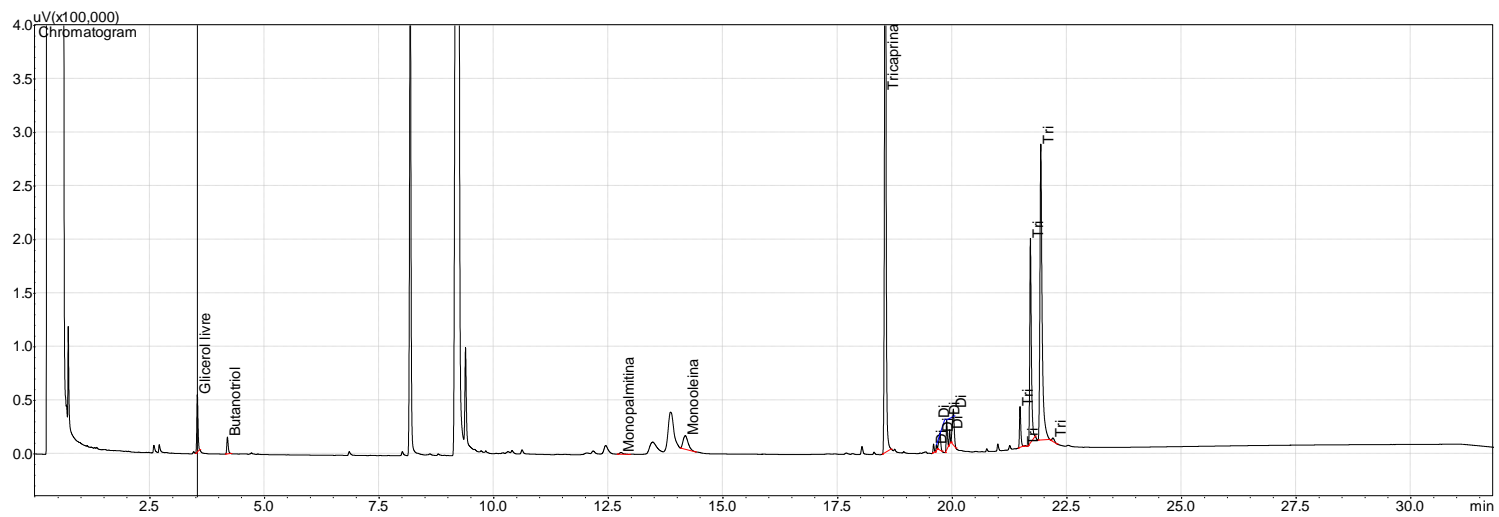


Figura 5. Cromatograma: (a) controle, (b) fração 1, obtida na eluição com *n*-hexano, do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de algodão.

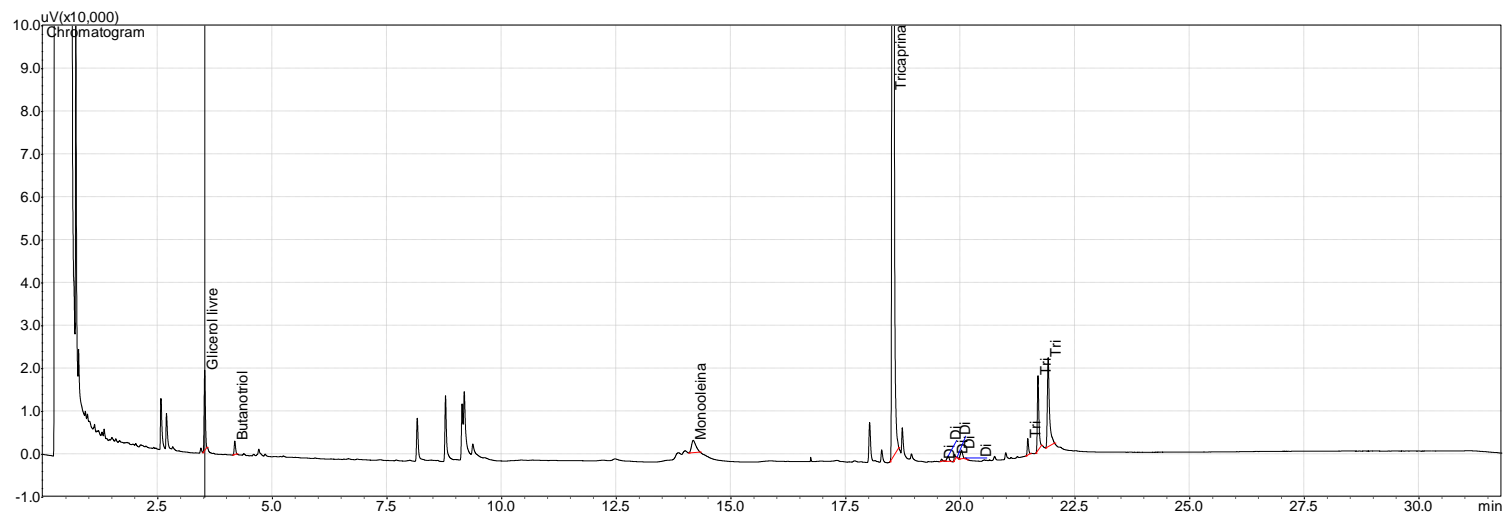


Figura 6. Cromatograma (a) fração 2, obtida na eluição com *n*-hexano, do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de algodão.

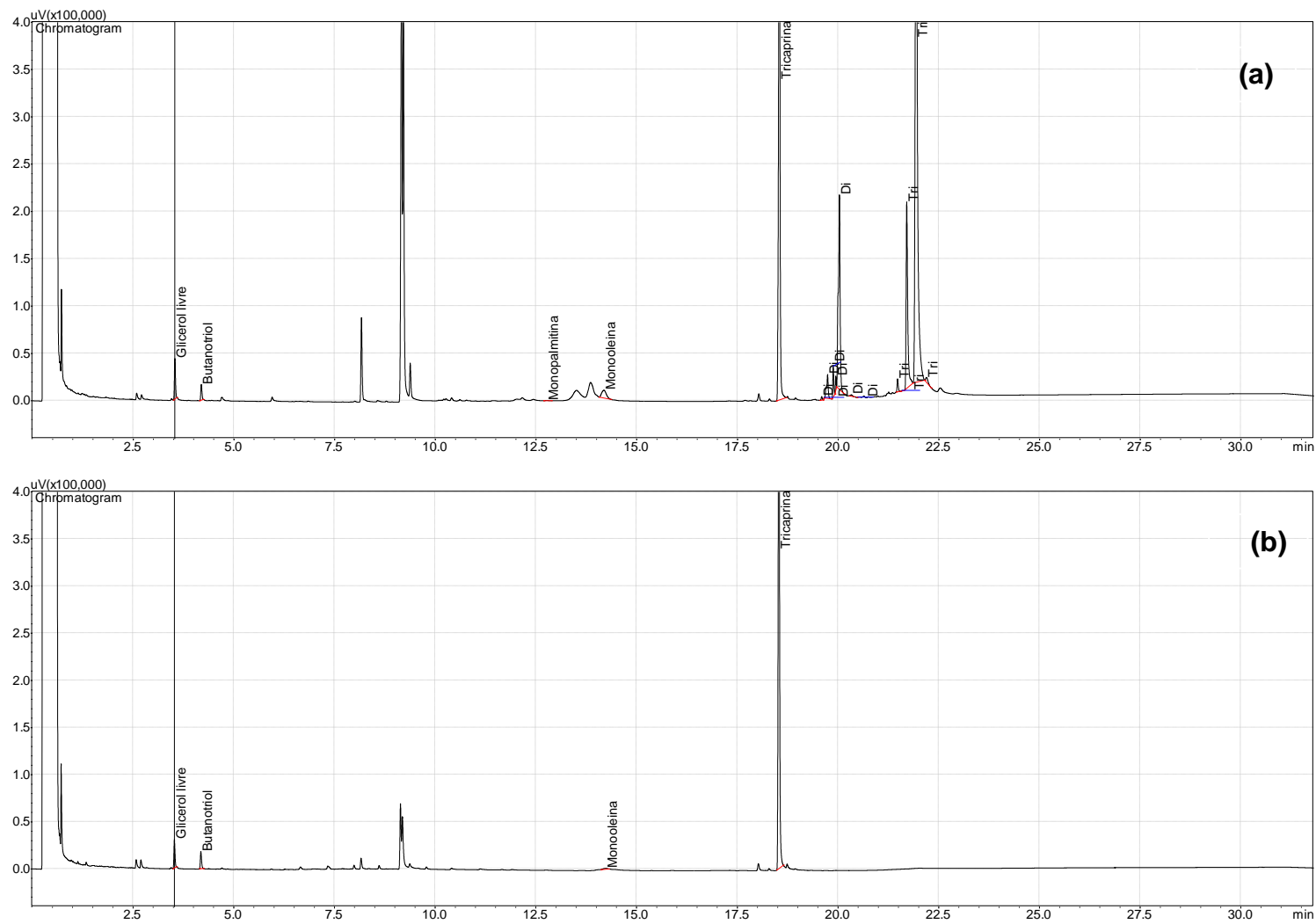


Figura 7. Cromatograma: (a) controle, (b) fração 1, obtida na eluição com *n*-hexano, do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de girassol.

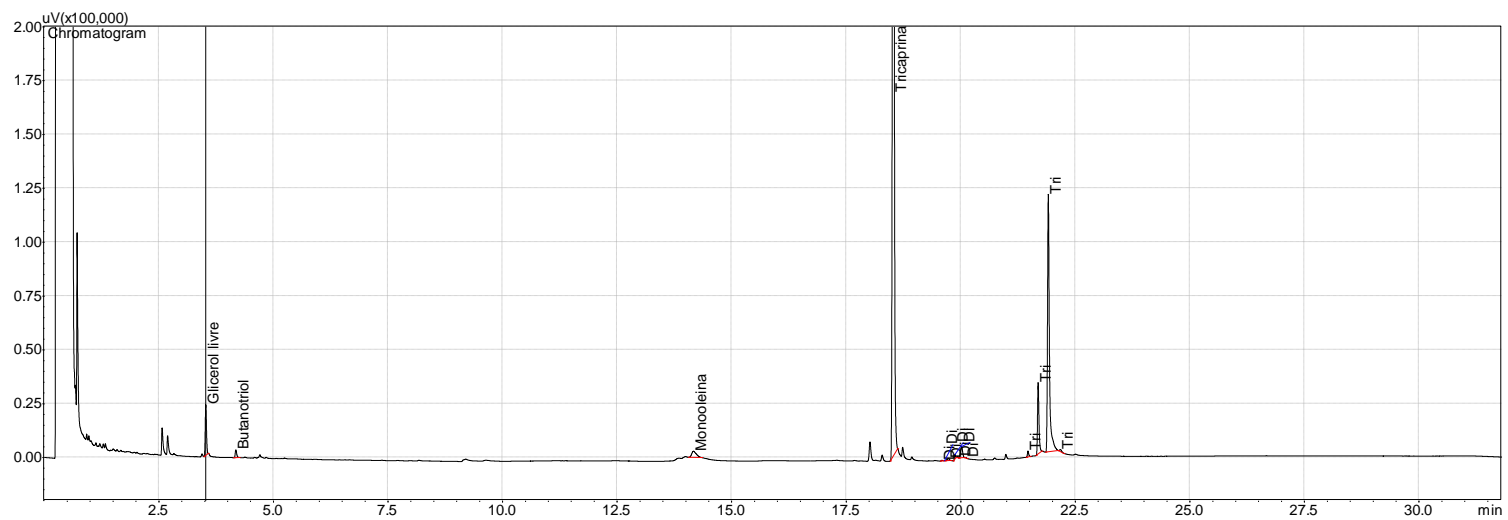


Figura 8. Cromatograma da fração 2, obtida na eluição com *n*-hexano, do produto de transesterificação de baixa conversão do óleo de girassol.