

Determinação direta de mono, di e triglicerídeos em biodiesel: análise crítica da metodologia recomendada e sugestões de alteração nos parâmetros experimentais da HT-HRGC, visando estabilidade e consistência das medidas

Leidimara Pelisson^{1*}, Oscar Bahia Filho², Fernando Mauro Lanças¹

¹Instituto de Química, Universidade de São Paulo – USP, Cep 13560-970, São Carlos, SP, Brasil

²Consultoria em química analítica, Quality Total Works – TQW, Cep 13432-581, Piracicaba, SP, Brasil
e-mail: leidimarap@gmail.com

Resumo

O biodiesel é quimicamente definido como ésteres monoalquílicos de ácidos graxos derivados de óleos vegetais, gorduras animais ou matérias graxas de descarte. O processo mais utilizado para a sua produção é a transesterificação catalisada em meio alcóolico alcalino na presença de um catalisador inorgânico. O controle de qualidade do biodiesel produzido é essencial para a sua utilização como combustível. Nesse sentido, a Agência Brasileira Nacional do Petróleo (ANP) sugere a utilização de diferentes métodos de ensaio, com o objetivo de cobrir todas as especificações de biodiesel industrial. A cromatografia gasosa (GC) é a técnica de análise proposta para o controle de qualidade deste produto com a quantificação do glicerol livre e ligado. Este artigo discute os vários arranjos de métodos de cromatografia em fase gasosa sugeridos pela legislação brasileira e propõe uma nova metodologia para mono, di e triglicerídeos, como uma extensão da Resolução da Agência Nacional de Petróleo nº 42. A metodologia desenvolvida apresentou excelentes resultados para as análises de glicerol ligado em amostras de óleos e biodiesel.

Palavras-chave

Biodiesel; controle de qualidade; HT-HRGC; legislação brasileira; acilgliceróis.

Direct determination of mono, di and triglycerides in biodiesel: a critical analysis of the methodology recommends and suggestions for some experimental parameters of HT-HRGC, seeking stability and consistency of the measures

Abstract

Biodiesel is chemically defined as fatty acid mono-alkyl esters derived of vegetable oils, animal fats or discarded greases. The most commonly used process for its production is the based-catalysed transesterification in alcoholic alkaline medium in presence of inorganic catalyst. The quality control of the produced biodiesel is essential for its use as fuel. In this sense, the Brazilian National Agency of Petroleum

(ANP) suggest different methods with objective to cover all specifications of industrial biodiesel. Gas chromatography is the analytical technique proposed for testing quality control of this product with the quantification of free and bonded glycerol. This paper discusses the various arrangements of GC methods suggested by local legislation and proposes a new methodology for mono, di and triglycerides, as an extension of the resolution ANP 42. The developed methodology presented excellent results for bonded glycerol analyses in samples of oils and biodiesel.

Keywords

Biodiesel; process quality control; high temperature gas chromatography; Brazilian legislation; acylglycerols.

1 Introdução

Os derivados de óleos vegetais são substitutos adequados para o óleo diesel por não requerem modificações nos motores e apresentarem alto rendimento energético. Estes também apresentam um potencial promissor no mundo inteiro, não só pela sua enorme contribuição ao meio ambiente, com redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental^[1], mas também pela geração de energia renovável.

A alternativa mais viável de transformação dos óleos vegetais para gerar um combustível capaz de fazer funcionar um motor por compressão sem danificá-lo tem sido o biodiesel^[2].

De um modo geral o biodiesel foi definido pela *National Biodiesel Board* como o derivado monoalquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal^[3]. O processo mais referenciado para a produção de biodiesel é a transesterificação^[4], que consiste na reação de um triglicerídeo com um álcool de cadeia curta, na presença de um catalisador. Como resultado, obtêm-se ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerina^[5].

A transesterificação é composta de três reações consecutivas e reversíveis, nas quais são formados diglicerídeos e monoglicerídeos como intermediários^[4] (reações i a iii da Figura 1). Apesar da estequiometria geral da equação

requerer três mols do monoálcool (considerado o agente transesterificante) para cada mol de triglicerídeo, a reversibilidade das reações i, ii e iii (Figura 1) exige um excesso de álcool no meio reacional para promover um aumento no rendimento.

O biodiesel pode ser utilizado puro ou em misturas com o diesel convencional, em diferentes proporções. As misturas podem receber denominações de acordo com os percentuais do biodiesel adicionados, como, por exemplo, B20 para misturas contendo 20% em volume deste biocombustível, sendo atualmente usada a mistura B5, ou seja, 5% de biodiesel em 95% de diesel mineral.

Para garantia da qualidade da mistura dos combustíveis diesel nos postos de abastecimento, o biodiesel utilizado na mistura deve ser monitorado em seus principais compostos constituintes, quais sejam: glicerina, mono, di e triglicerídeos^[6]. A determinação destes intermediários não somente indica a qualidade do produto final, mas também a eficiência do processo de produção.

A mais recente versão da norma brasileira publicada pela Agência Nacional de Petróleo (ANP) de nº 7 de 19 de março de 2008^[7] sugere diferentes métodos de ensaios e limites de tolerância para especificação do biodiesel B100

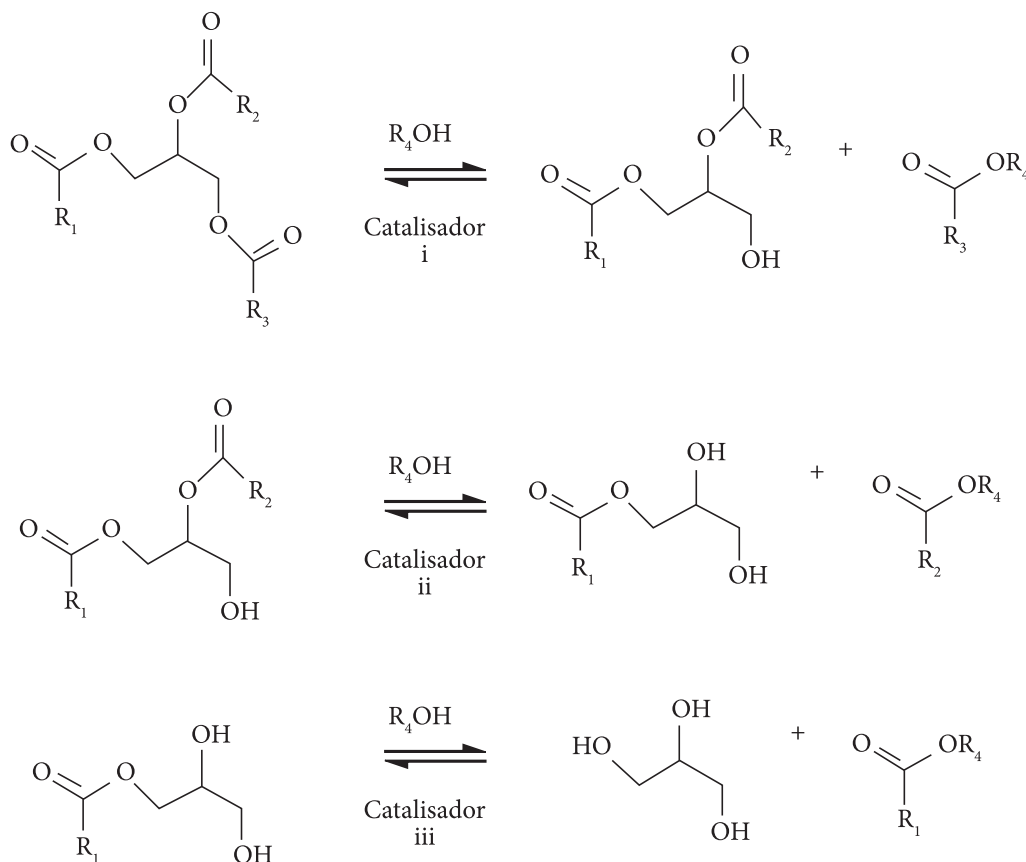


Figura 1 Reações envolvidas na transesterificação de triglicerídeos.

(puro, ou seja, sem a diluição com diesel de petróleo); esta em total consonância com normas brasileiras ABNT NBR 14883 (Associação Brasileira de Normas Técnicas) – Petróleo e produtos de petróleo - e internacionais como ASTM D 4057 (*American Society for Testing and Materials*) – Prática para amostragem de petróleo e produtos líquidos de petróleo - e EN/ISO 5555 (*Europée Normalisation/International Organization for Standardization*) – Gorduras e óleos animais e vegetais – Amostragem.

A relação direta da diretiva da ANP com especificações estrangeiras para o biodiesel tem imposto várias dificuldades no que se refere a uma especificação de um padrão de qualidade nacional ou internacional que cubra a grande diversidade do biodiesel. Entre as principais, uma está relacionada aos métodos de análise recomendados como referência, uma vez que norma

alemã (*DIN – Deutsches Institut für Normung*) que utiliza tais métodos é específica para ésteres metílicos do óleo de canola.

Experimentalmente é possível demonstrar que os métodos utilizados para atestar a qualidade do biodiesel metílico oriundo do óleo de canola como fontes de matéria-prima não são adequados para analisar o biodiesel de uma gama de outras fontes para a produção de biodiesel. Por exemplo, os métodos de análise propostos que utilizam a técnica de cromatografia em fase gasosa para determinar o teor de álcool, ésteres totais e de glicerol livre e ligado, não são tecnicamente adequados para analisar diferentes produtos, pois, sob as condições experimentais estabelecidas no método (programação de temperatura e mecanismos de análise quantitativa), dependendo da fonte da matéria-prima, pode haver sobreposição de picos de eluição, causando

interferências na avaliação quantitativa de mono, di e triglicerídeos. Observações como estas sugerem que as condições experimentais sejam inicialmente ajustadas e/ou otimizadas e posteriormente validadas com produtos que apresentem diferentes complexidades.

Neste sentido, entendemos que muitas das alterações estabelecidas na revisão atual da ANP estão voltadas para especificações de oleaginosas predominantes no Brasil e que podem ser utilizadas para produção de biodiesel. No nosso entendimento, alguns dos ajustes realizados na especificação parecem apropriados; entretanto alguns parâmetros instrumentais do sistema cromatográfico estabelecidos nos métodos propostos que quantificam vários compostos não são adequados, além de alguns limites de quantificação terem sido propostos sem fundamentação teórica ou mesmo experimental que os justifiquem.

O presente artigo visa contribuir com possíveis mudanças na metodologia de referência como base auxiliar na especificação do produto e auxílio na melhoria da fiscalização deste.

A Tabela 1, extraída da tabela Especificações do Biodiesel do documento da ANP^[7], mostra apenas os ensaios que utilizam a técnica de cromatografia em fase gasosa. Com estes métodos,

é possível determinar a soma de glicerina livre e total na forma de mono, di ou triglicerídeos durante o processo de esterificação. Os ensaios que utilizam esta técnica são de grande importância na especificação do biodiesel. Ambas as metodologias, EN 14105^[8] e ASTM D6584^[9], quantificam o conteúdo de acilgliceróis pelas bandas dos picos sem diferenciar adequadamente mono e diglicerídeos de ésteres metílicos de ácidos graxos e outros. Cumpre aqui salientar que, atualmente, devido à utilização de colunas capilares de tubo aberto, o termo utilizado é cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC), que é mais eficaz na determinação da composição de biodiesel por apresentar exatidão, sensibilidade, alta eficiência e rapidez na obtenção dos resultados^[10].

Uma das variáveis mais importantes da HRGC é a temperatura usada nas várias etapas experimentais, quais sejam: no dispositivo injetor responsável pela volatilização do extrato da amostra (biodiesel diluído); da coluna de separação, devido à estabilidade da fase estacionária; e do detector de ionização em chama para evitar possível condensação das porções separadas no bico do queimador. Quando se utilizam altas temperaturas, se dá a denominação de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução a Altas

Tabela 1 Especificações para o biodiesel B100 no Brasil (ANP nº 7) - Portaria 255^[7].

Característica	Unidade	Limite	Método		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Teor de éster	% massa	96,5	15342	-	EN 14103
Glicerina livre, máx.	% massa	0,02	15341	6584	EN 14105 EN 14106
Glicerina total, máx.	% massa	0,25	15344	6584	EN 14105
Mono, di, triacilgliceróis	% massa	Anotar	15342 15344	6584	EN 14105
Metanol ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110

Nota: A palavra anotar no limite para mono, di e triacilgliceróis significa que não existe um limite máximo especificado, o valor deve apenas estar dentro do limite de glicerina total (glicerina livre + mono, di e triacilgliceróis), portanto o valor obtido deve apenas ser anotado.

Temperaturas (HT-HRGC), que na análise de biodiesel é fundamental, devido às características do produto. Quando se utiliza a HT-HRGC, as maiores limitações são a estabilidade da fase estacionária e o material que recobre o capilar.

O objetivo deste trabalho foi explorar todo o potencial da técnica HT-HRGC para a determinação de mono, di e triglicerídeos do biodiesel etílico e metílico, usando como fonte de matéria-prima o óleo de soja, além de discutir os principais parâmetros instrumentais para este ensaio. Os dados aqui obtidos visam dar maior consistência e ferramenta tanto como base para definição da especificação do produto como fornecer dados para otimização do processo, que poderão ser utilizados por uma gama de matérias-primas.

2 Experimental

Para o desenvolvimento da metodologia analítica de análise direta de mono, di e triglicerídeos em amostras de biodiesel, é importante ressaltar que se partiu do pressuposto de que o biodiesel esteja dentro das especificações brasileiras (estabelecidas pela ANP), para, posteriormente, ser fortificada com adição de padrões. Para isso, neste trabalho, também foi produzido biodiesel metílico e etílico com aproximadamente 100% de pureza.

2.1 Produção de biodiesel

O biodiesel de óleo de soja refinado (Cargill, Mairinque, Brasil) foi produzido por transesterificação catalisada por base. Um resumo deste procedimento é apresentado a seguir:

Aqueceram-se, com agitação magnética moderada (agitador magnético, Fanem, São Paulo, Brasil), 20 mL de óleo vegetal. Quando a temperatura atingiu 60 °C, foram adicionados a 10 mL de solução 2% de NaOH (Mallinckrodt, Xalostoc, México) em etanol anidro (J. T. Baker,

Phillipsburg, USA) ou 8 mL de solução 2% de NaOH em metanol secado (J. T. Baker, Phillipsburg, USA). A mistura foi mantida durante 30 minutos, sempre a 60 °C e com agitação mecânica constante (200 rpm). Em seguida, a mistura foi transferida para um funil de separação, e observou-se a formação de duas fases. Deixou-se decantar durante 24 horas. Logo após as 24 horas, descartou-se a fase inferior (fase inorgânica), composta de glicerol, sabões, excesso de base e álcool, mais densa e mais escura, e lavou-se a fase superior (fase orgânica), menos densa e mais clara, contendo ésteres com água acidificada (ácido acético 0,05 mol L⁻¹ (Mallinckrodt, Xalostoc, México) quente (aproximadamente 70 °C). Lavou-se a solução com um volume de água acidificada de aproximadamente três vezes o volume de óleo inicial utilizado. Verificou-se o pH da solução com papel indicador (Merck, Darmstadt, Alemanha). As lavagens aquosas a quente de ácido proporcionam a retirada de impurezas e a ausência do catalisador básico foi confirmada através da medida do pH da solução, a qual deve estar neutra. A solução, após ser lavada, foi aquecida a 100 °C durante 60 minutos para eliminação de água e álcool. Como última etapa do procedimento, seguiu-se a filtragem da amostra. Esta transesterificação foi realizada segundo uma adaptação do método descrito por Christie^[11].

O óleo de soja utilizado para realização da reação de transesterificação foi o óleo de soja refinado. O emprego de óleo de soja refinado elimina o efeito causado pelos componentes não glicéricos, presentes nos óleos vegetais não refinados, sobre o rendimento da reação de transesterificação^[12].

Observou-se que no momento da ocorrência da reação há uma brusca mudança na cor da mistura, sendo esta escurecida e, logo após, retornando à coloração inicial. Normalmente a alcoólise alcalina de óleos vegetais é conduzida

a temperatura próxima do ponto de ebulição do álcool e a temperatura está correlacionada com o tempo de reação^[13]. Temperaturas de reação acima de 60 °C devem ser evitadas, pois estas tendem a acelerar a saponificação dos glicerídeos pelo catalisador alcalino antes da completa alcoólise. Logo, a temperatura de aproximadamente 60 °C foi adotada de modo a se obter uma conversão satisfatória de ésteres, não ultrapassando a temperatura do ponto de ebulição dos álcoois.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os óleos vegetais utilizados como matéria-prima para a produção de biodiesel foram previamente analisados por HRGC para determinação da composição de triglicerídeos presentes.

A conversão das reações também foi avaliada por HRGC, para confirmação de que apenas ésteres foram formados.

2.2 Identificação da composição dos óleos vegetais

Realizaram-se as análises cromatográficas de óleo de soja na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ em n-hexano (Merck, Darmstadt, Alemanha). Para as análises, utilizou-se um Cromatógrafo a Gás Shimadzu modelo GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um detector de ionização de chama FID a 380 °C e um injetor *split* a 360 °C. Utilizou-se um volume de injeção de 1 µL para uma razão de *split* de 1:30. Foram utilizados N₂ como gás auxiliar e hidrogênio como gás de arraste a uma velocidade linear média de 60 cm s⁻¹. Utilizaram-se colunas apolares NST-5-HT (5%fenil, 95%metilpolisiloxano) com dimensões (10 m × 0,25 mm × 0,08 µm), mantendo-se a temperatura do forno isotérmica a 350 °C.

A identificação dos picos foi realizada por meio de comparação de padrões analíticos nas mesmas condições cromatográficas das análises.

Todas as análises foram realizadas em quintuplicata, e calculados o valor da média das medidas e o desvio padrão.

2.3 Análises das amostras de biodiesel produzidas

A análise de mono, di e triglicerídeos por HRGC foi utilizada para verificar a conversão final do óleo em ésteres.

Realizaram-se as análises cromatográficas dos produtos das transesterificações metílicas e etílicas em catálise básica na concentração de 1,0 mg/mL. Para as análises, foram utilizados um Cromatógrafo a Gás Shimadzu modelo GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um detector de ionização de chama FID a 380 °C e um injetor *split* a 360 °C. Utilizou-se um volume de injeção de 1 µL para uma razão de *split* de 1:30. Foram utilizados N₂ como gás auxiliar e hidrogênio como gás de arraste a uma velocidade linear média de 60 cm s⁻¹. Utilizaram-se colunas apolares NST-5-HT (5% fenil, 95% metilpolisiloxano) com dimensões (10 m × 0,25 mm × 0,08 µm) e programação de temperatura descrita na Tabela 2.

A identificação dos picos foi feita com base na comparação com tempo de retenção de padrões analíticos nas mesmas condições cromatográficas das análises.

2.4 Preparação das amostras para análise do desenvolvimento da metodologia de análise

Foram preparadas soluções contendo 1,0 mg mL⁻¹ de biodiesel de soja em n-hexano e também soluções de 10 mg de biodiesel de soja fortificadas com 1 mg de monooleína (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), dioleína (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), trioleína

(Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e tricaprina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) em 10 mL de n-hexano.

2.5 Desenvolvimento da metodologia para análise por HRGC

Com o objetivo de aperfeiçoar a metodologia de análise de glicerol livre, mono, di e tri-glicérides, modificações foram realizadas no método normalizado pela ANP nº 42 para este tipo de análise.

Para obtenção dos cromatogramas, foram utilizados um cromatógrafo a Gás Shimadzu modelo GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um detector de ionização de chama FID a 370 °C e um injetor a 350 °C. As injeções foram realizadas por introdução mecânica e o volume de injeção correspondeu a 1 µL. Utilizaram-se N₂ como gás auxiliar e hidrogênio como gás de arraste a uma velocidade linear média de 22,5 cm s⁻¹. Utilizou-se coluna apolar NST-5-HT (5% fenil, 95% metilpolisiloxano) com dimensões (30 m × 0,25 mm × 0,1 µm) e utilizou-se também programação de temperatura com diferentes taxas de aquecimento e introdução de amostra em dois diferentes modos

de injeção. As amostras introduzidas foram de biodiesel de soja metílico e etílico normal e fortificado.

Foram testados para uma mesma programação de temperatura (Tabela 3) os seguintes modos de introdução de amostra: *splitless* com tempo de equilíbrio de 1 minuto; e uma razão de *split* de 1:10 e modo de introdução de amostra: *split* com razão de 1:10. Posteriormente, com o melhor resultado obtido para a introdução da amostra, foi realizada uma série de programações de temperaturas de forno diferentes e obtido o resultado considerado satisfatório.

A identificação dos picos foi feita com base na comparação com tempo de retenção de padrões analíticos e a quantificação por padronização interna e externa. Também nessa etapa, as análises foram realizadas em quintuplicata.

2.6 Parâmetros analisados para a avaliação do desempenho da metodologia – Parâmetros de Validação

O processo de validação de um método verifica, por meio de estudos laboratoriais, se suas características de desempenho estão de acordo

Tabela 2 Programação de temperatura do forno da coluna para análises do biodiesel produzido.

Programação de temperatura do forno da coluna		
Temperatura Inicial	150 °C	Permanência de 10 minutos
Rampa 1	10 °C/min até 200 °C	Permanência de 5 minutos
Rampa 2	7 °C/min até 260 °C	
Rampa 3	5 °C/min até 297 °C	Permanência de 2 minutos
Rampa 4	5 °C/min até 370 °C	Permanência de 5 minutos

Tabela 3 Programação de temperatura do forno da coluna, para análise do modo de introdução de amostras.

Programação de temperatura do forno da coluna		
Temperatura Inicial	50 °C	Permanência de 1 minuto
Rampa 1	15 °C/min até 180 °C	
Rampa 2	7 °C/min até 230 °C	
Rampa 3	30 °C/min até 380 °C	Permanência de 10 minutos

com as especificações apresentadas para a intenção do uso dos resultados analíticos. Assim, as características de desempenho determinadas foram: estudo da linearidade do método e precisão^[14].

As faixas lineares foram estabelecidas pelo método ASTM D 6584. Cada nível de concentração foi injetado 3 vezes no sistema cromatográfico desenvolvido neste trabalho. A linearidade do método para cada composto foi avaliada pelo coeficiente de determinação (r^2), após a construção da curva analítica.

2.6.1 Curva analítica, linearidade e determinação da quantidade de mono, di e triglicérides

Foram preparadas soluções estoque de padrão interno e das substâncias de referência em balões volumétricos de 10 mL como apresentadas na Tabela 4. O volume foi ajustado com n-hexano. O padrão de tricaprina foi utilizado como padrão interno, e monoleína, dioleína e trioleína foram usadas como substâncias

de referência para mono, di e triglicérides. Posteriormente foi montada a curva analítica usada para quantificação dos acilglicéris com as 5 soluções descritas na Tabela 5 pela transferência dos volumes específicos a um frasco de 10 mL, adicionando-se, no final, aproximadamente 8 mL de n-heptano. As soluções foram analisadas em triplicata seguindo as condições cromatográficas do método desenvolvido.

2.6.2 Precisão

A precisão do método foi avaliada devido às modificações ocorridas na programação de temperatura, forma de injeção e preparo das amostras para amostras de biodiesel metílico e etílico de óleo de soja. Sua avaliação foi realizada com os cinco níveis de calibração por meio da contaminação da amostra com os padrões. As injeções foram realizadas em triplicata. Esse procedimento foi efetuado em diferentes dias para a avaliação da precisão intermediária. A precisão foi expressa por meio do desvio padrão relativo.

Tabela 4 Tabela de soluções estoque.

Composto da Solução Estoque	Massa (mg)
Monoleína (1-Mono [<i>cis</i> -9-octadecenoil]- <i>rac</i> -glicerol)	50
Dioleína (1,2 – Di [<i>cis</i> -octadecenoil]glicerol)	50
Trioleína (1,2,3 – Tri [<i>cis</i> -octadecenoil]glicerol)	50
Tricaprina (1,2,3 – tridecanolilglicerol)	80

Tabela 5 Tabela de diluições das soluções padrão da curva analítica para quantificação de mono, di e triglicérides.

Soluções estoque	Volumes de soluções estoque (μ L)					
	Níveis da Curva	1	2	3	4	5
Monoleína		20	50	100	150	200
Dioleína		10	20	40	70	100
Trioleína		10	20	40	70	100
Tricaprina		100	100	100	100	100

2.7 Aplicações

Amostras de biodiesel de diferentes fontes apresentam também diferentes ésteres e, se a reação não for completa, apresenta mono, di e triglicerídeos, por isso, amostras de biodiesel comercial metílico de óleo de milho e palma foram testadas, visando provar a aplicação do método a diversas amostras de biodiesel. Foram preparadas soluções na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em n-hexano das amostras. Todas as análises foram realizadas em triplicata e calculados o valor da média das medidas e o desvio padrão.

3 Resultados e discussão

A determinação cromatográfica da fonte de matéria-prima usada mostrou que não havia outros compostos além dos triglicerídeos, o que demonstra a pureza do óleo utilizado. Desta forma, podemos inferir que todo e quaisquer outros compostos que possam estar presentes após a reação de transesterificação são oriundos do processo e não do óleo utilizado. Ainda, a alta pureza da fonte induz a um maior rendimento da reação que foi demonstrado na excelente conversão obtida dos triglicerídeos em ésteres metílicos e etílicos, próximos de 100%. Desta forma, os biodiéseis obtidos pela conversão do óleo de soja podem ser considerados padrões para o método proposto.

Para confirmação da taxa de conversão e ausência de glicerídeos nas amostras de biodiesel, foi utilizada mistura padrão de referência contendo mono, di e triglicerídeos para obter o tempo de retenção dos compostos (Figura 2). Em seguida, foram injetadas amostras de biodiesel produzidas no laboratório, representadas pelo cromatograma da Figura 3, que demonstra um biodiesel metílico do óleo de soja.

Uma das principais variáveis instrumentais da técnica analítica é a introdução da amostra de biodiesel. O método recomendado pelas metodologias EN 14105^[8] e ASTM D6584^[9] utiliza a injeção a frio *cool-on-column*. Entretanto, existe outro arranjo do injetor denominado *split/splitless*. Na forma de introdução de amostra na coluna denominada Injeção com Divisão (*split injection*) um grande volume é introduzido em um fluxo elevado de gás de arraste e, após evaporação, a mistura é dividida em duas porções (usualmente diferentes), das quais a menor é injetada na coluna. Em alguns casos, a amostra é uma solução diluída. Neste caso, usualmente a amostra é introduzida sem Divisão (*splitless*), a despeito da sobrecarga que irá produzir na coluna. Tanto no método de injeção com divisão de fluxo (*split*) quanto naquele sem divisão (*splitless*) a amostra é vaporizada em uma superfície quente e então transferida para a coluna pelo gás de arraste. Uma injeção, na qual a amostra condensada é colocada diretamente dentro da coluna não aquecida e lá se dissolve na fase líquida, é denominada Injeção na Coluna (*on-column injection*)^[15]. No método de injeção *on-column* para colunas capilares de reduzido diâmetro interno, é requerido o uso de uma pré-coluna com diâmetro interno maior (aproximadamente 0,53 mm), para que o excesso de amostra introduzido não sobrecarregue a coluna analítica, sendo isto uma desvantagem do método. Por isso, os métodos de introdução de amostras *split* e *splitless* foram testados neste trabalho com o objetivo de obter uma metodologia de análise mais vantajosa.

É possível concluir pela resolução dos cromatogramas obtidos, que o modo de introdução de amostras *splitless* apresentou melhores resultados, ou seja, componentes minoritários presentes nas amostras podem ser mais bem identificados, quando comparado com o modo de introdução *split*. Portanto, *splitless* foi utili-

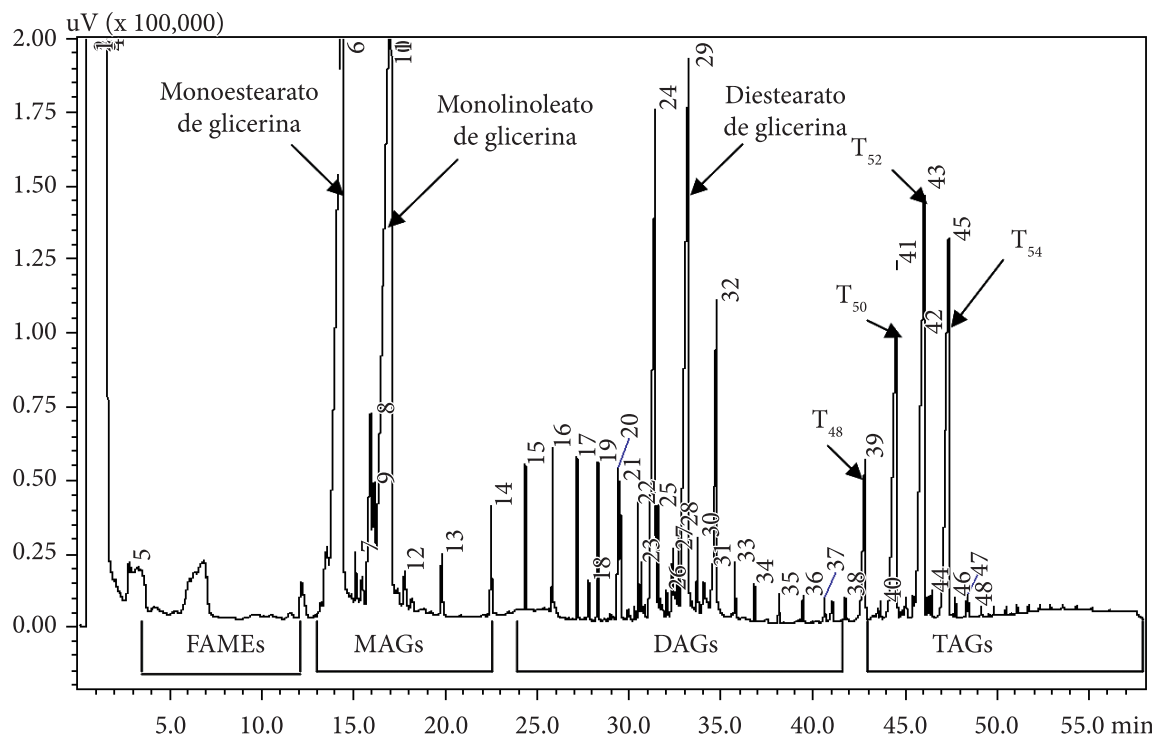


Figura 2 Cromatograma de mistura ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em n-hexano) contendo monoglicerídeos (MAGs), diglicerídeos (DAGs) e triglicerídeos (TAGs). Na figura é indicada também a banda de tempo de retenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES). T_{50} são os triglicerídeos com 50 átomos de carbono (excluindo os carbonos da cadeia de glicerol), T_{52} são os triglicerídeos com 52 átomos de carbono na cadeia, T_{54} triglicerídeos com 54 átomos de carbono na cadeia e T_{56} triglicerídeos com 56 átomos de carbono na cadeia.

zado neste trabalho na metodologia de análise de biodiesel, em contraposição à injeção *cool-on-column* do método recomendado.

Outra variável instrumental importante é a temperatura usada no forno. Os métodos recomendam a utilização de programação de temperatura apresentada na Tabela 3.

Utilizando a programação de temperatura preconizada pelos métodos de referência, foi possível observar baixa eficiência das separações obtidas principalmente no que diz respeito a separações dos triglicerídeos e dos diglicerídeos (Figura 4). Dessa forma, foi necessário determinar uma nova programação visando ganho de eficiência, para tanto, várias rampas foram testadas, obtendo-se como uma melhor programa-

ção para a análise simultânea de ésteres, mono, di e triglicerídeos a programação indicada na Tabela 6.

Para certificar que a nova rampa de temperatura pode ser utilizada para qualquer tipo de amostra de biodiesel, foi adicionada uma alíquota de mistura de padrão contendo os glicerídeos em uma amostra de biodiesel metílico de soja. O cromatograma obtido é mostrado na Figura 5. Neste cromatograma, é possível observar que a ordem de eluição de mono, di e triglicerídeos está relacionada ao número de carbonos. Assim, aqueles com o mesmo número de carbonos, mas saturados ou insaturados, são tecnicamente separados, sendo que os insaturados eluem primeiro. A banda de retenção para a identificação e quantificação dos ésteres na amostra de biodiesel foi estabelecida de 15 a 30 minutos, para os

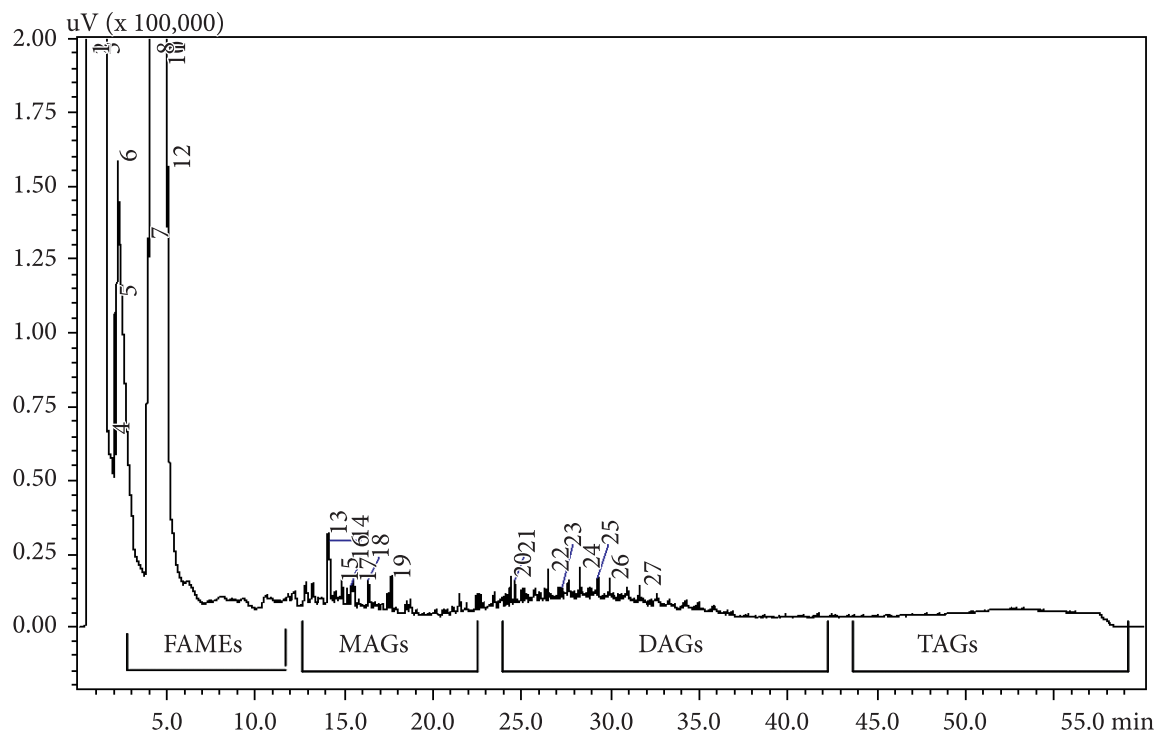


Figura 3 Cromatograma do biodiesel metílico de soja. FAMES (Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos); MAGs (Monoglicerídeos); DAGs (Diglicerídeos) e TAGs (Triglicerídeos).

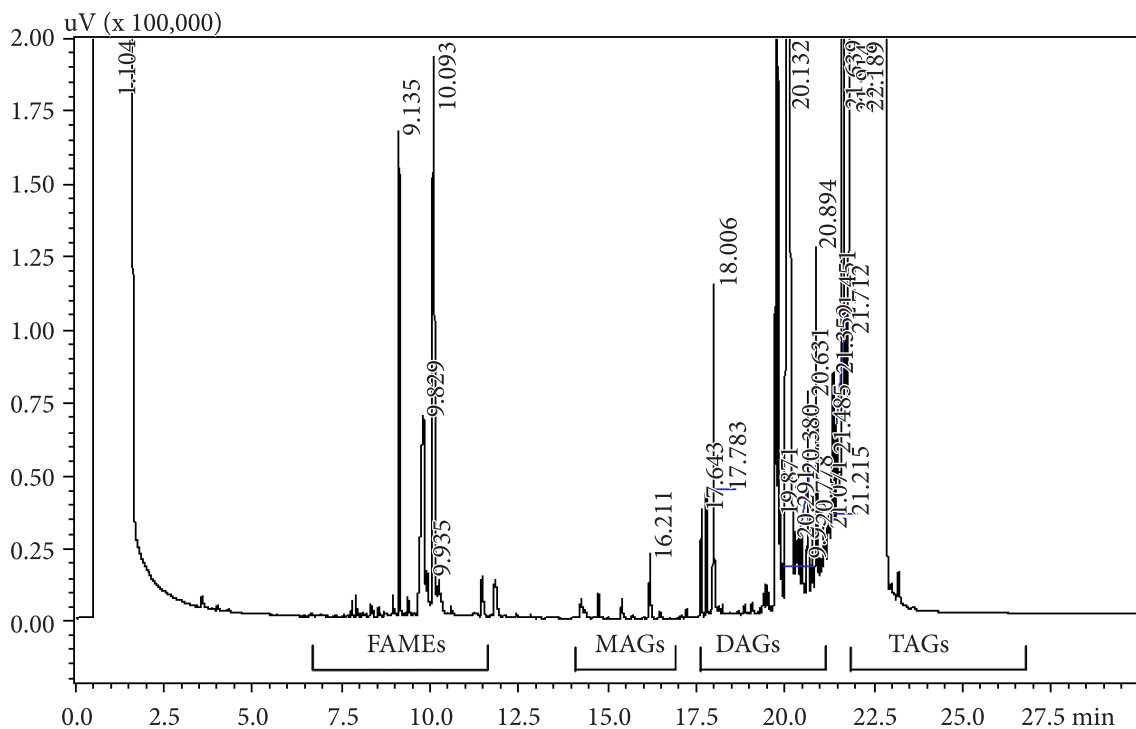


Figura 4 Cromatograma do biodiesel de soja fortificado utilizando a programação de temperatura de forno da ASTM D 6584.

Tabela 6 Tabela de programação de temperatura otimizada para análise de ésteres, mono, di e triglicerídeos em amostras de biodiesel.

Programação de temperatura da coluna		
Temperatura inicial	50 °C	Permanência de 3 minutos
Rampa 1	7 °C/min até 200 °C	Permanência de 5 minutos
Rampa 2	5 °C/min até 297 °C	Permanência de 2 minutos
Rampa 3	5 °C/min até 360 °C	Permanência de 15 minutos

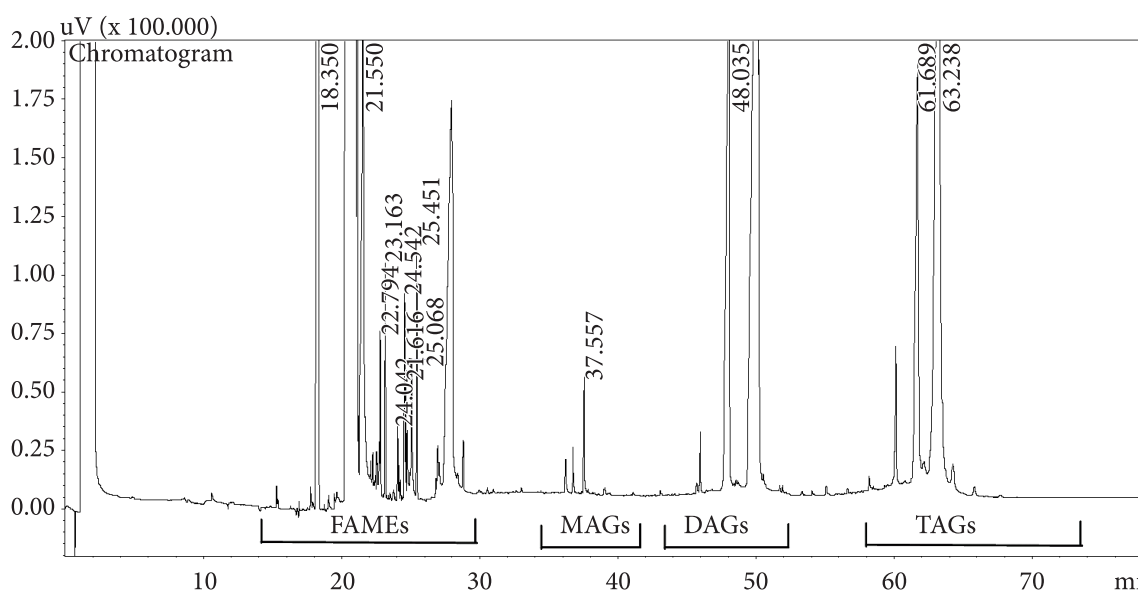


Figura 5 Cromatograma do biodiesel de soja fortificado utilizando a programação de temperatura de forno da Tabela 6.

monoglicerídeos foi de 35 a 42 minutos, para os diglicerídeos de 45 a 55 minutos e para os triglicerídeos de 57 a 75 minutos.

Com as variáveis de introdução de amostra e da rampa de temperatura definidas, foi possível assegurar a eluição de todos os constituintes das amostras com picos bem definidos e estabilidade da linha de base. O método proposto permitiu obter curva analítica para a quantificação de mono, di e triglicerídeos com boa repetibilidade para todos os níveis de calibração que apresentou coeficiente de regressão maior que 0,997 para todos os compostos, resultando em excelente linearidade. A precisão obtida mostrou desvio padrão relativo abaixo de 10%. Portanto, como

observado na figura 5, o método proposto separa eficientemente todos os mono, di e triglicerídeos, sem coeluições, além de separar os ésteres dos demais compostos. Pelas características analíticas demonstradas pelo método proposto, este foi escolhido para controle de qualidade do biodiesel.

Para o cálculo do percentual (m/m) da quantidade de mono, di e triglicerídeos presente nas amostras de biodiesel, foi utilizada a Equação sugerida pelo método ASTM D6584 que é mostrado na Equação 1.

$$G = \left[a \left(\frac{A_g}{A_{pi}} \right) + b \right] M_{pi} \left(\frac{100}{m} \right) \quad (1)$$

Onde G é o conteúdo em percentagem (m/m) dos glicerídeos individuais na amostra de biodiesel; A_g a área do pico dos glicerídeos individuais; A_{pi} a área do pico do padrão interno; M_{pi} a massa do padrão interno em mg; m a massa da amostra em mg; a a inclinação (coeficiente angular) da função de calibração dos mono, di e triglicerídeos; e b é o intercepto (coeficiente linear) da função de calibração dos mono, di e triglicerídeos.

Algumas diferenças foram notadas em relação ao método oficial, porque este não apresenta uma programação de temperatura suficiente para a separação dos picos, o que impede a integração destes. Isto mostra quão importante é uma completa e eficiente eluição de todos os componentes da amostra para a obtenção de uma análise de boa qualidade. O método proposto consegue separar os monoglicerídeos e diglicerídeos dos ésteres de cadeia longa, evitando assim maiores ou menores estimativas nas análises quantitativas.

O método proposto neste trabalho serve como sugestão para alteração dos parâmetros instrumentais do método da norma ASTM 6584 da ANP nº 42, o qual se mostrou ser mais eficiente para análises de mono, di e triglicerídeos. O método proposto foi aplicado com sucesso para análises de biodieleses de soja com catálise básica metálica e etílica além de análises de biodiesel de milho e palma. Portanto, ótimos resultados foram encontrados, demonstrando que seu objetivo, ou seja, a otimização de metodologia analítica para determinação de óleos e seus derivados, foi atingida.

4 Conclusões

Um grande número de estudos sobre reações de transesterificação com diferentes óleos vegetais pode ser encontrado na literatura, porém poucos esforços têm sido feitos no sentido de

identificar subprodutos como mono, di e triglicerídeos nas amostras de biodiesel. Os resultados das análises utilizando a metodologia indicada pela ANP nº 42 e, mais recentemente, ANP nº 7 indicaram que há a necessidade de aprimorar os métodos de controle de qualidade do biodiesel no que diz respeito a análises de glicerina ligada.

Com o aumento da eficiência de separação obtido com as modificações instrumentais e que resultam em maior resolução cromatográfica, foi possível a determinação dos subprodutos da reação de transesterificação. Os resultados obtidos neste trabalho permitem, assim, concluir que a técnica HRGC empregando o método proposto corresponde a uma excelente alternativa para realizar a determinação de mono, di e triglicerídeos em controle de qualidade de biodiesel metílico e etílico do óleo de soja além de palma e milho.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro na forma de bolsas de estudos e de apoio a projetos.

Referências

- 1 Usta N, Öztürk E, Can Ö, Conkur ES, Nas S, Çon AH et al. Combustion of biodiesel fuel produced from hazelnut soapstock/wast sunflower oil mixture in a Diesel engine. *Energy Conversion & Management* 2005; 46(5): 741-755. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2004.05.001>
- 2 Guarieiro LLN, Pinto AC, Aguiar PF, Ribeiro NM. Metodologia analítica para quantificar o teor de biodiesel na mistura biodiesel:diesel utilizando espectroscopia na região do infravermelho. *Química Nova* 2008; 31(2):421-426. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000200041>

- 3 Costa Neto PR, Zagonel LF, Ramos LP. Produção de Biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova* 2000; 23(4):531-537. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000400017>
- 4 Murugesan A, Umarani C, Chinnusamy TR, Krishnam M, Subramanian R, Neduzchezain N. Production and analysis of bio-diesel from non-edible oils – A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 2009; 13:825-834. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2008.02.003>
- 5 Schuchardt U, Serchel R, Vargas RM. Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 1998; 8(1):199-210. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50531998000300002>
- 6 Knothe G. Analyzing Biodiesel: Standards and other methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2008; 83(10):822-833. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-006-5033-y>
- 7 Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis – ANP [cited 2012 mai. 04]. Available from: [http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/mar%C3%A7o/ranp%207%20-%202008.xml?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0\\$q=\\$x=\\$nc=6637](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2008/mar%C3%A7o/ranp%207%20-%202008.xml?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0$q=$x=$nc=6637)
- 8 European Standards. *EN 14105:200*: Fat and oil derivatives – fatty acid methyl esters – determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents. European Standards; 2003.
- 9 American Society for Testing and Materials – ASTM. *ASTM D6584:2000*: Test method for determination of free and total glycerin in B100 biodiesel methyl esters by gas chromatography. 2000.
- 10 Monteiro MR, Ambrozini ARP, Lião LM, Ferreira AG. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. *Talanta* 2008; 77(2):593-605. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.001>
- 11 Christie WW. *Gas chromatography and lipids: a practical guide*. Ayr: The Oily Press; 1989.
- 12 Moretto E, Fett R. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais*. Rio de Janeiro: Varela; 1998.
- 13 Meher LC, Sagar DV, Naik SN. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2006; 10(3):248-268. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2004.09.002>
- 14 Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Mello LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 2005; 27(5):771-780. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- 15 Lanças FM. *Cromatografia em fase gasosa*. São Carlos: ACTA; 1993.

Recebido: 25/06/2012

Aceito: 14/07/2012