



10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016  
02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo  
ISBN 978-85-7029-135-6

**IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE MONOACILGLICERÍDEOS (MAG), DIACILGLICERÍDEOS (DAG) E TRIACILGLICERÍDEOS (TAG) EM GORDURAS E BIODIESEL PARA O MONITORAMENTO DA REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC).**

Júlia de Melo **Rocha**<sup>1</sup>; Roseli Aparecida **Ferrari**<sup>2</sup>; Ana Maria Rauen de Oliveira **Miguel**<sup>2</sup>;  
Vera Sônia Nunes da **Silva**<sup>3</sup>

**Nº 16229**

**RESUMO** - Óleos e gorduras são utilizados não somente como alimentos, mas também para a fabricação de tintas, sabões e combustíveis, como por exemplo, o biodiesel. O biodiesel é produzido através da reação de transesterificação de óleos vegetais, gorduras animais e outros materiais, tais como óleos de frituras que podem ser utilizados desde que controladas as impurezas como presença de água e/ou ácidos graxos livres. Assim os processos industriais aplicados na extração de óleo e na produção de biodiesel devem ser monitorados. A proposta deste estudo foi o emprego da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com a utilização de coluna de exclusão molecular, para a quantificação dos monoacilglicerídeos (MAG), diacilglicerídeos (DAG), triacilglicerídeos (TAG) em óleos e gorduras e como ferramenta de controle do processo de transesterificação para produção de biodiesel, adicionalmente foram avaliados parâmetros cromatográficos, como por exemplo, vazão. Os resultados mostraram uma boa resolução e quantificação para MAG, DAG e TGA nas amostras estudadas, a vazão da fase móvel não influenciou na separação e nas concentrações dos análitos. O método CLAE-GPC pode ser utilizado como ferramenta para avaliação do processo de extração de óleo, e em especial para o monitoramento da reação de transesterificação para produção de biodiesel.

**Palavras-chaves:** biodiesel, óleo, cromatografia de permeação em gel.

1 Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências dos Alimentos, ESALQ, Piracicaba-SP; julia\_m\_rocha@hotmail.com.

2 Colaborador: Pesquisador do CCQA - ITAL, Campinas-SP.

3 Orientador: Pesquisador do CCQA - ITAL, Campinas-SP; vera.silva@ital.sp.gov.br.



**ABSTRACT** – *Oils and fats are not only used as foods but also for the manufacture of paints, soaps and fuels such as biodiesel. Biodiesel is produced by transesterification reaction of vegetable oils, animal fats and other materials, such as frying oils. The industrial processes applied in oil extraction and biodiesel production should be monitored. The purpose of this study was the use of high performance liquid chromatography (HPLC) with size exclusion chromatography (SEC) to quantify the monoglycerides (MG), diglycerides (DG), triglycerides (TG) in oils and fats and as tool in the control process in the transesterification reaction for biodiesel production. The results showed a good resolution and quantification for MG, DG and TG in the samples studied, the flow of the mobile phase did not influence the separation and the concentrations of analytes. The HPSEC method may be used as a tool to evaluate the oil extraction process, particularly for monitoring the transesterification reaction for producing biodiesel.*

**Keywords:** biodiesel, oil, cromatografia de permeação em gel.

## **1. INTRODUÇÃO**

Os óleos e gorduras são considerados misturas complexas, sendo os ácidos graxos seus principais componentes. Os tipos de ácidos graxos presentes conferem aos óleos e gorduras suas propriedades físico-químicas e organolépticas. Para a extração de óleos e gorduras são necessárias diversas operações específicas para cada oleaginosa, dependendo de suas características e de seus contaminantes, desde o preparo da matéria-prima para extração até a purificação do produto final. Óleos e gorduras são utilizados não somente em alimentos, mas também na fabricação de tintas, sabões, combustíveis (RAMALHO; SUAREZ, 2013). Em especial para produção de biodiesel (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005).

Os pesquisadores Ferrari, Oliveira e Scabio (2005) baseados em seu estudo ressaltaram a importância da produção do biodiesel a partir de fontes renováveis, matérias-primas abundantes no Brasil, tanto nos aspectos econômicos (importação de diesel consumido no país), quanto na diminuição do impacto ambiental causados por combustíveis provenientes do petróleo.

O biodiesel é definido pela “National Biodiesel Board” dos Estados Unidos como o derivado mono-álquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal cuja utilização está associada à substituição de combustíveis fósseis em



**10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016**  
**02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-135-6**

motores de ignição por compressão. No Brasil, desde 1º de novembro de 2014, se tornou obrigatória à adição de 7% de biodiesel ao óleo diesel (ANP, 2014), que pode chegar até o percentual de 20%, essa ação contribui de forma positiva para redução de emissão de poluentes.

O biodiesel é produzido através da reação de transesterificação de óleos vegetais, gorduras animais e outros materiais, tais como óleos de frituras que podem ser utilizados desde que controladas as impurezas como presença de água e/ou ácidos graxos livres. Para tanto as indústrias do ramo de óleos e gorduras estão em busca de ferramentas confiáveis para o monitoramento dos processos industriais aplicados na extração de óleo e na produção de biodiesel.

Para o monitoramento, diversos métodos foram desenvolvidos dentre eles a cromatografia de permeação em gel (CPG), conhecida também como HPSEC (High performance size exclusion chromatography), essa técnica apresenta propriedades desejáveis, tais como simplicidade, insensibilidade a solventes e temperatura, condições amenas e versatilidade, pois é possível separar substâncias com massas molares abaixo de 1.000 ou de vários milhões, variando a matriz do gel. Distingue das demais cromatografias por apresentar o recheio da coluna constituído de macro moléculas que apresentam ligações cruzadas (COLLINS et al., 2006).

Dentro deste contexto, o objetivo deste estudo foi a utilização da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e detector de Índice de refração, com a utilização de coluna de exclusão molecular em série, como ferramenta de controle do processo de transesterificação, para a quantificação dos monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos, triacilglicerídeos, éster e ácidos graxos e também avaliar o perfil de MAG, DAG, TAG e ácidos graxos em óleos e gorduras.

## **1.1 Materiais e Métodos**

### **1.1.1 Matérias prima:**

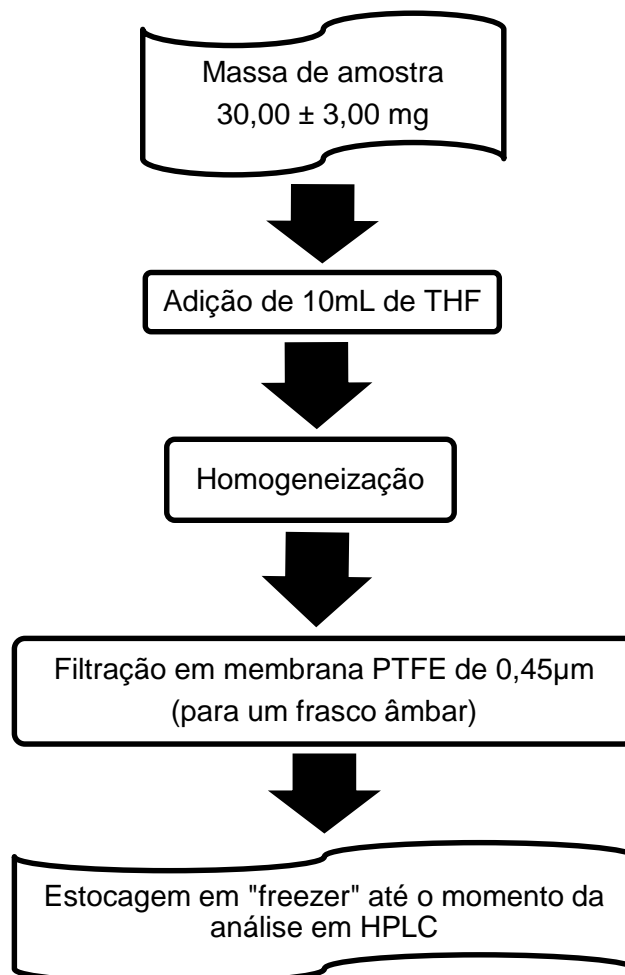
- Solução padrão de monoacilglicerídeo, diacilglicerídeo, triacilglicerídeo, éster e ácidos graxos;
- As amostras avaliadas foram: óleo comercial de girassol e de soja, óleo bruto de soja, gordura de origem vegetal (palma), gordura de origem animal (sebo), azeite e biodiesel. Sendo que as amostras de azeite e biodieseis foram provenientes de outros estudos realizados no ITAL.

**1.1.2 HPLC:** Cromatógrafo líquido de alta eficiência (marca Varian), detector de índice de refração, colunas em série (Jordi Gel DVB 100A 300 x 7,8 mm) e (Jordi Gel DVB 500 A 300 x 10 mm). Fase móvel: Tetrahydrofurano (THF) filtrado em membrana PTFE 0,45 µm.

## 1.2 Métodos

### 1.2.1 Preparo das amostras:

As amostras foram preparadas conforme a Figura 1. Para tanto foi utilizada uma massa de  $30,0 \text{ mg} \pm 0,3$  da amostra, a qual foi solubilizada em THF, o volume foi aferido para balão volumétrico com capacidade para 10 mL. A solução foi filtrada em membrana de PTFE  $0,45 \mu\text{m}$ , transferida para frasco âmbar com tampa rosqueável e armazenada em freezer até momento da análise.



**Figura 1.** Fluxograma simplificado do preparo das amostras e padrões de éster e de ácido graxo.



### **1.2.2 Preparo do padrão**

Os padrões utilizados foram: monostearina (18:0) 33,3%, distearina (18:0) 33,3% e tristearina (18:0) 33,3% da *Sigma Chemical*, com a adição de 1 mL de THF de grau cromatográfico e filtrado em membrana PTFE.

O conteúdo da ampola foi transferido para um frasco âmbar com tampa rosqueável, com o auxílio de uma pipeta de *pasteur*. Foi adicionado mais 1 mL de THF e transferido o conteúdo para o mesmo frasco totalizando 2 mL, para melhorar a solubilização do padrão foi utilizado o ultrassom. Posteriormente foram homogeneizados 0,1 mL de padrão somado a 0,9 mL de THF.

A solução padrão final foi composta por uma alíquota de 50 µL de mono, di e triacilglicerídeos, 50 µL do padrão de éster e 50 µL do padrão de ácidos graxos. Esta mistura de padrões foi homogeneizada e armazenada em freezer até o momento da análise por CLAE. Os padrões de éster e de ácido graxo foram preparados de acordo com o item 1.2.1 (Figura 1).

### **1.2.3 Estabelecimento das condições analíticas**

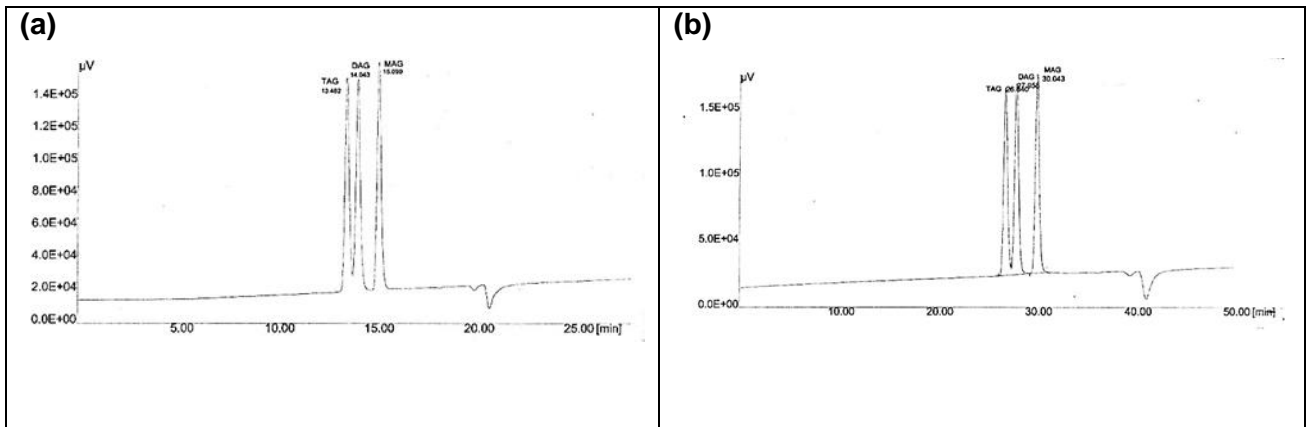
As condições analíticas da CLAE, cromatógrafo e detector de índice de refração (marca Varian), colunas em série (Jordi Gel DVB 100Å 300 x 7,8 mm) e (Jordi Gel DVB 500Å 300 x 10 mm). Fase móvel: Tetrahydrofurano (THF) filtrado em membrana PTFE 0,45 µm, volume injetado: 20µL, Vazão: 1mL.min<sup>-1</sup> e 0,5mL.min<sup>-1</sup>.

## **1.3 Resultados e Discussões**

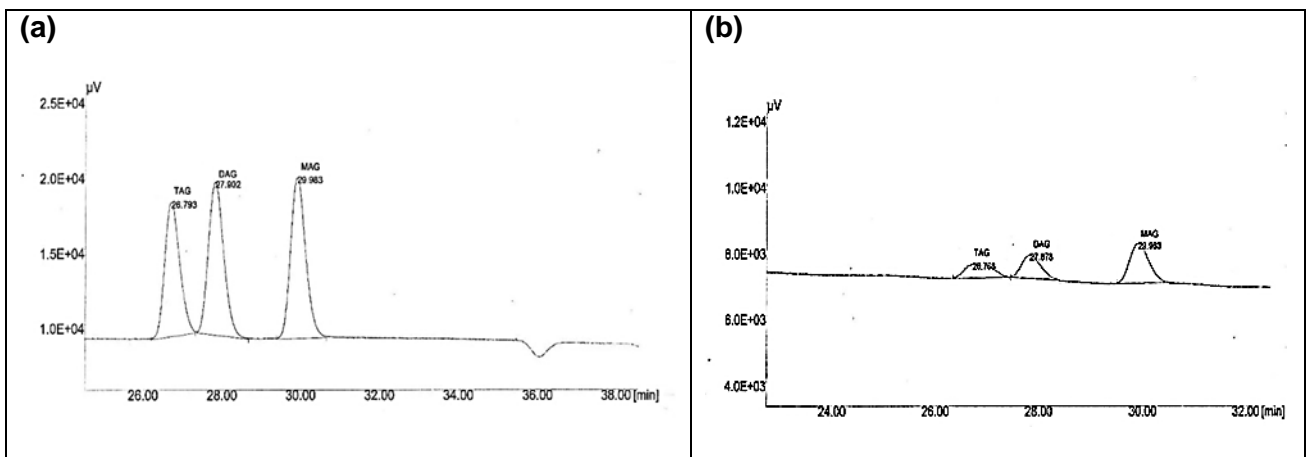
### **1.3.1 Resultados da separação dos picos dos padrões de MAG, DAG e TGA, ácido graxo e éster.**

Em cromatografia de permeação em gel, os analitos são separados por tamanho molecular, os picos são eluídos de acordo com a massa molecular, em ordem decrescente. O PMDT (Padrão de Mono, Di, Triacilglicerídeos) foi injetado em duas condições diferentes, na primeira foi utilizada uma vazão de fase móvel de 1,0 mL/min., (Figura 2a) e na segunda na vazão de fase móvel de 0,5 mL/min., (Figura 2b). Observa-se nos cromatogramas (Figuras 2a e 2b) que a diminuição da vazão promoveu o aumento no tempo de retenção.

Para avaliar se a concentração influenciou na separação dos analitos, o PMDT foi diluído 10 e 100 vezes e injetado na vazão de 0,5 mL/min, observou-se (Figura 3a e 3b) que a concentração não influenciou no TR, porém promoveu um pequeno alargamento dos picos.



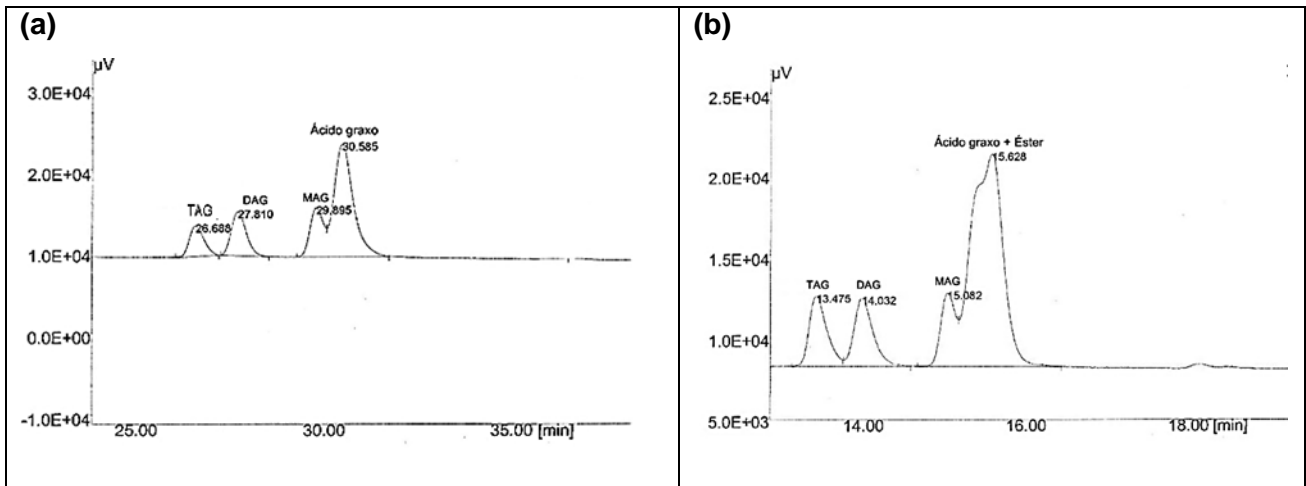
**Figura 2:** Representação do GPC - Cromatograma de Permeação em Gel (colunas conectadas em série 100Å e 500Å). Padrões de monoacilglicerídeo (MAG), diacilglicerídeo (DAG) e triacilglicerídeo (TAG). **(a)** Vazão: 1,0 mL/min., (50mg/mL), **(b)** Vazão: 0,5 mL/min., (50mg/mL).



**Figura 3:** Representação do GPC - Cromatograma de Permeação em Gel (colunas conectadas em série 100Å e 500Å). Padrões de monoacilglicerídeo (MAG), diacilglicerídeo (DAG) e triacilglicerídeo (TAG). **(a)** Vazão: 0,5 mL/min., (5mg/mL), **(b)** Vazão: 0,5 mL/min., (0,5mg/mL).

O padrão de PMDT + ácido oleico foi injetado com uma vazão de 0,5 mL/min (Figura 4a). Os picos de TAG, DAG e MAG não apresentaram variações no perfil de separação, porém os picos de ácido graxo e do MAG não apresentaram boa resolução por apresentarem massas moleculares similares.

Ao injetar o padrão de PMDT + ácido graxo + éster na vazão de fase móvel de 1,0 mL/min (Figura 4b), os picos do éster e do ácido graxo não apresentaram boa resolução. Para sanar o problema foi utilizado como fase móvel o tolueno com ácido acético 0,25% para compor a fase móvel, porém foi constatado que o THF ainda é a melhor alternativa.



**Figura 4:** Representação do GPC - Cromatograma de Permeação em Gel (colunas conectadas em série 100Å e 500Å). **(a)** Padrões de monoacilglicerídeo (MAG), diacilglicerídeo (DAG), triacilglicerídeo (TAG) e ácido graxo. Vazão: 0,5 mL/min. **(b)** Padrões de monoacilglicerídeo (MAG), diacilglicerídeo (DAG), triacilglicerídeo (TAG), ácido graxo e éster. Vazão: 1,0 mL/min.

Para os padrões estudados, os resultados percentuais foram adequados (Tabela 1), somente o ácido oleico apresentou uma variação (7%) entre o valor esperado em relação ao valor médio encontrado.

**Tabela 1:** Recuperação dos padrões.

PARÂMETROS	PADRÕES	
	Esperado (%)	Encontrado (%)*
Monoacilglicerídeos	33,33	32,20 (1,41)
Diacilglicerídeos	33,33	33,41 (0,28)
Triacilglicerídeos	33,33	34,39 (1,30)
Ácido Oleico	50,00	53,54 (1,12)
Ácido Oleico + éster	67,00	65,73 (1,08)

Padrões de monoacilglicerídeo (MAG), diacilglicerídeo (DAG) e triacilglicerídeo (TAG), ácido oleico e ácido oleico + éster. \*Resultados expressos como média ± desvio padrão das análises em triplicata.





### 1.3.2 Resultados de MAG, DAG, TGA, ácido graxo e éster das amostras

Foram avaliadas amostras de óleo bruto de soja, óleo de soja comercial (Figura 5), óleo de girassol comercial (Figura 6), azeite (Figura 7), gordura vegetal (palma) (Figura 8), gordura animal (sebo) (Figura 9), e biodiesel (Tabela 2). Para amostras de óleos e gordura vegetal já era esperado um teor de TAG superior a 98%, porém a amostra de sebo apresentou 59% de TAG. Essa diminuição do teor de TAG pode ser atribuída ao armazenamento inadequado da amostra, pois o armazenamento é de fundamental importância para a manutenção da qualidade características de óleos e gorduras.

**Tabela 2.** Resultados das amostras.

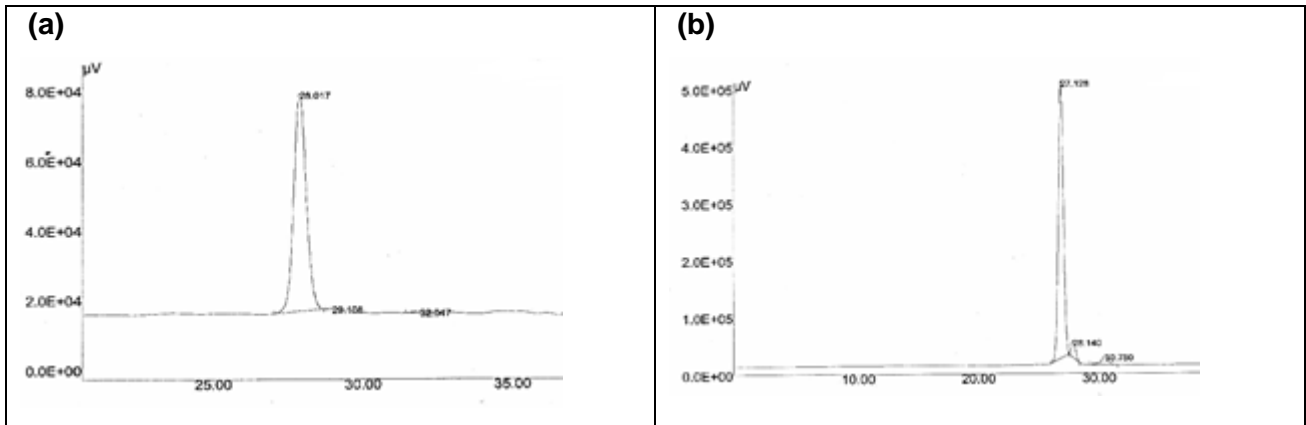
Amostra	TAG (%)	DAG (%)	MAG (%)	AGL (%)	Éster (%)
Óleo bruto (soja)**	98,62 ± 0,02	0,64 ± 0,08	ND***	0,75 ± 0,06	ND***
Óleo comercial (soja)**	92,03 ± 0,63	4,45 ± 0,11	ND***	3,52 ± 0,16	ND***
Óleo comercial (girassol)*	98,42 ± 0,03	1,58 ± 0,03	ND***	ND***	ND***
Biodiesel óleo comercial (girassol)**	ND***	1,65 ± 0,15	2,32 ± 0,22	ND***	96,03 ± 0,27
Azeite*	98,28 ± 0,01	0,56 ± 0,05	1,18 ± 0,06	ND***	ND***
Biodiesel de Azeite**	4,26 ± 0,30	1,73 ± 0,00	0,36 ± 0,06	ND***	93,67 ± 0,38
Gordura vegetal (palma)*	98,21 ± 0,08	1,80 ± 0,08	ND***	ND***	ND***
Biodiesel gordura vegetal (palma)**	7,09 ± 0,23	4,25 ± 0,24	1,58 ± 0,18	ND***	87,08 ± 0,91
Gordura animal (sebo)*	59,06 ± 0,06	34,14 ± 0,26	2,35 ± 0,06	1,18 ± 0,06	ND***
Biodiesel gordura animal (sebo)**	ND***	6,15 ± 0,19	16,14 ± 0,13	ND***	77,71 ± 0,28

Resultados expressos como média ± desvio padrão das análises em triplicata. **TAG:** Triacilglicerídeo; **DAG:** Diacilglicerídeo; **MAG:** Monoacilglicerídeo; **AGL:** ácido graxo livre e éster. Condições da CLAE, cromatógrafo e detector de índice de refração (marca Varian), colunas em série (Jordi Gel DVB 100Å 300 x 7,8 mm) e (Jordi Gel DVB 500Å 300 x 10 mm). Fase móvel: Tetrahydrofurano (THF) filtrado em membrana PTFE 0,45 µm, volume injetado: 20µL, \*vazão: 1mL.min<sup>-1</sup> e \*\*vazão: 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. \*\*\*ND: Não Detectado.

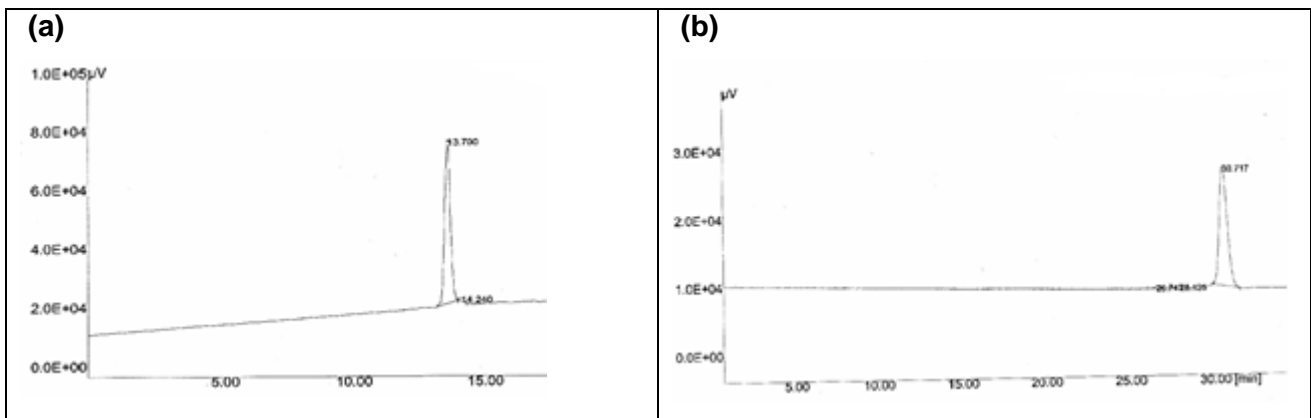
Os teores de ésteres encontrados em todos os biodieseis estudados (Tabela 2) foram inferiores ao teor de 96,5% que é valor preconizado pela Resolução N<sup>o</sup> 45, de 25 DE AGOSTO DE 2014 (ANP, 2014), esse resultado já era esperado, uma vez que os biodieseis avaliados foram produzidos no ITAL com a finalidade de avaliar o processo de transesterificação.

A ANP (2014) estabeleceu que para biodiesel ser considerado de alta qualidade o teor máximo de monoglicerídeo deve ser de 1% e para o diglicerídeo e triglicerídeo de 0,25%, os valores encontrados no estudo foram superiores para a maioria dos biodieseis, exceto o triglicerídeo do biodiesel de óleo de girassol comercial e o de gordura animal (sebo), indicando a necessidade de adequação do processo de transesterificação.

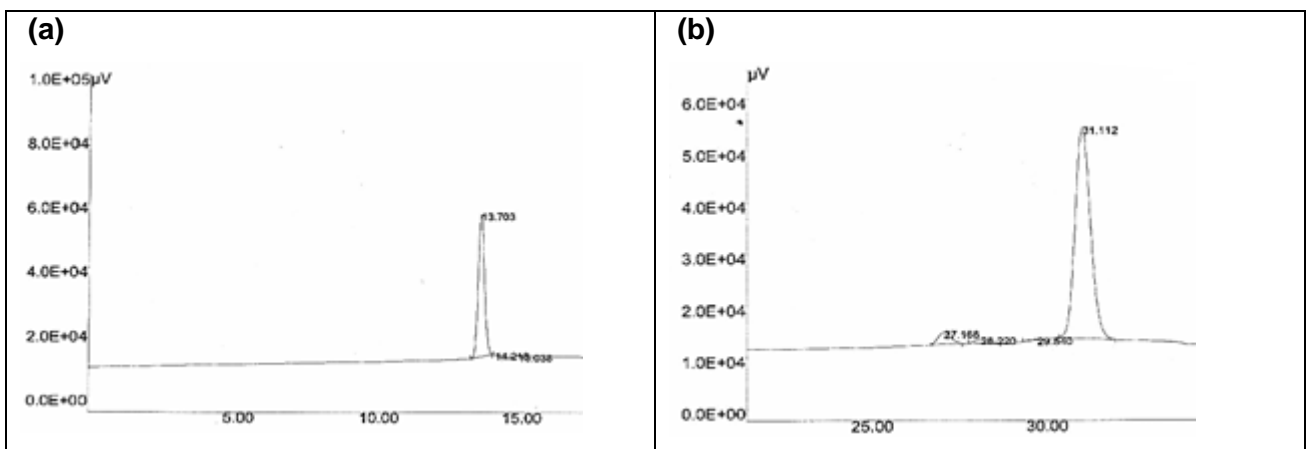




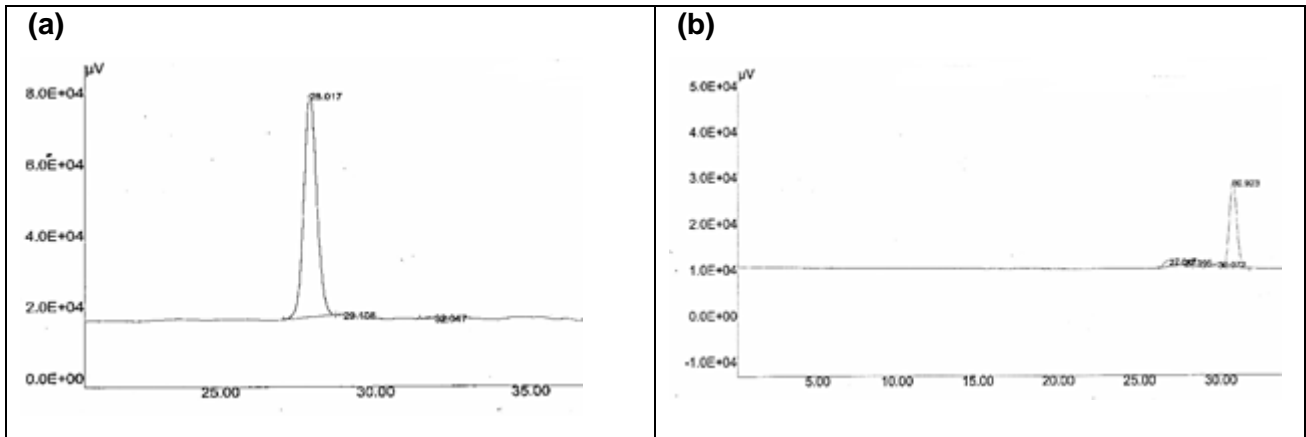
**Figura 5:** Representação da Cromatografia de Permeação em Gel (colunas conectadas em série 100Å e 500Å). **(a)** Amostra de óleo bruto de soja, vazão: 0,5 mL/min., **(b)** Amostra de óleo de soja comercial, vazão: 0,5 mL/min.



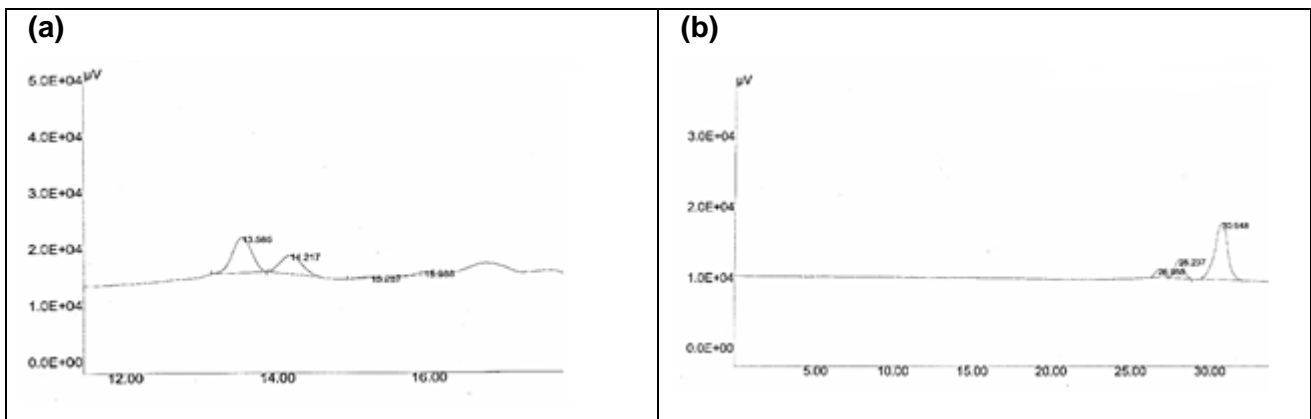
**Figura 6:** Representação da Cromatografia de Permeação em Gel (colunas conectadas em série 100Å e 500Å). **(a)** Amostra de óleo de girassol comercial, vazão: 1,0 mL/min., **(b)** Amostra de biodiesel óleo de girassol comercial, vazão: 1,0 mL/min.



**Figura 7:** Representação da Cromatografia de Permeação em Gel (colunas conectadas em série 100Å e 500Å). **(a)** Amostra de azeite, vazão: 1,0 mL/min., **(b)** Amostra de biodiesel de azeite, vazão: 0,5 mL/min.



**Figura 8:** Representação da Cromatografia de Permeação em Gel (colunas conectadas em série 100Å e 500Å). **(a)** Amostra de gordura vegetal (palma), vazão: 0,5 mL/min., **(b)** Amostra de biodiesel de gordura vegetal (palma), vazão: 1,0 mL/min.



**Figura 9:** Representação da Cromatografia de Permeação em Gel (colunas conectadas em série 100Å e 500Å). **(a)** Amostra de gordura animal (sebo), vazão: 1,0 mL/min., **(b)** Amostra de biodiesel de gordura animal (sebo), vazão: 1,0 mL/min.

## 1.4 Conclusão

O método CLAE-GPC pode ser utilizado como ferramenta para avaliação de processo de extração de óleo, e em especial para o monitoramento da reação de transesterificação para produção de biodiesel.

## 2 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CCQA – ITAL, pela oportunidade de estágio.



**10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016**  
**02 a 04 de agosto de 2016 – Campinas, São Paulo**  
**ISBN 978-85-7029-135-6**

### **3 REFERÊNCIAS**

ANP, Agência Nacional de Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis. Biodiesel. Brasil, 2014. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=73292&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1454503230337>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2016.

ANP, Agência Nacional de Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis. Biodiesel. RESOLUÇÃO ANP Nº 45 de 25/8/2014 (DOU de 26/8/2014). Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=78463&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&1467296867680>. Acesso em: 30 de junho de 2016.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

FERRARI, R. S, OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, Vol. 28, No. 1, 19-23, 2005

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino. **Revista Virtual Química**, 5 (1), 2-15. 2013.