



**UFAL**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**MARIA DOS PRAZERES MENEZES DE JESUS**

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MONOÉSTERES EM BIODIESEL: UM  
ESTUDO COMPARATIVO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO.**

**Maceió – AL**

**2013**

MARIA DOS PRAZERES MENEZES DE JESUS

**DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MONOÉSTERES EM BIODIESEL: UM  
ESTUDO COMPARATIVO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Pfa. D<sup>a</sup>. Simoni Margareti Plentz  
Meneghetti

Coorientadora: Pfa. D<sup>a</sup>. Isis Martins Figueiredo

Maceió – AL

2013

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

J58

Jesus, Maria dos Prazeres Menezes de.

Determinação do teor de monoésteres em biodiesel : um estudo comparativo por cromatografia líquida de alta eficácia e ressonância magnética nuclear de hidrogênio / Maria dos Prazeres Menezes de Jesus. – 2013.

96 f. : il., tabs., grafs.

Orientadora: Simoni Margareti. Plentz Meneghetti.

Co-Orientadora: Isis Martins Figueiredo.

Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 72-75.

Apêndices: f. 76-96.

1. Biodiesel. 2. Biodiesel – Teor de ésteres. 3. Óleo de soja. 4. MMN<sup>1</sup>H.  
5. CLAE. I. Título.

CDU: 662.753.1

Aos meus pais Maria das Dores Menezes de Jesus e José Inácio de Jesus (*in memoriam*). A minha sentença de cura: minha pequena grande Ellen Menezes. Meu pedacinho.

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me proporcionar esta oportunidade, sabedoria e discernimento. E por ter me concedido a graça de renascer.

A minha MÃE, irmãos e irmãs por todo apoio, incentivo e participação em minha vida de aluna constante.

De uma forma bastante carinhosa, agradeço ao meu companheiro Alex, pelo incentivo, paciência, amor, amizade, respeito e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simoni Margareti Plentz Meneghetti, pela orientação, tanto ao trabalho, quanto ao decorrer do curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti pelas dúvidas tiradas e pelos ensinamentos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isis Figueiredo pela orientação.

Ao Prof. Dr. Edson de Souza Bento, pelo incentivo e ensinamentos. E pela amizade.

A todos os professores do Curso de Pós – Graduação em Engenharia Química.

Aos colegas do curso, que contribuíram com sua amizade e incentivo para a realização deste trabalho.

A todos que fazem parte do Grupo de Catálise e Reatividade Química do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (GCaR/IQB/UFAL). Especialmente à Jhosianna Patrícia pelo companheirismo e ajuda na realização de análises e dúvidas tiradas no processo de realização desse trabalho.

Aos professores, Dr<sup>a</sup>. Janaina Bortoluzzi e ao Dr. Edgar Catari, por tantas vezes que os solicitei aflita por alguma ajuda.

A todos os colegas do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, especialmente ao Alexandre Crispim pela grande contribuição na realização das reações e análises de RMN.

Ao Laboratório de Materiais e Combustíveis do Instituto de Química da Universidade de Brasília (IQ/UNB), em nome do Prof. Dr. Paulo Anselmo Ziani Suarez.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.

(Albert Einstein)

## RESUMO

O presente trabalho consiste na utilização das técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para fins comparativos, na avaliação do teor de ésteres formados por transesterificação metílica e etílica do óleo de soja. Para isso, equações citadas na literatura foram utilizadas, onde as mesmas são utilizadas para a quantificação de ésteres metílico e etílico de soja por RMN  $^1\text{H}$ . Diversas reações de transesterificação metílica e etílica foram realizadas a fim de se obter amostras com distintas concentrações em ésteres alquílicos. Realizou-se atribuição aos sinais dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  do óleo de soja, ésteres metílicos e etílicos do óleo de soja com conversão total e parcial. A técnica de RMN apesar de ser considerada uma técnica qualitativa e quantitativa não se mostrou eficaz para a determinação do teor de ésteres provenientes de transesterificação metílica e etílica devido à sobreposição dos sinais utilizados para o cálculo das áreas. Ao comparar os resultados obtidos através das duas técnicas estudadas, obteve-se diferenças máximas de ~15% e ~20% para ésteres metílicos e ésteres etílicos, respectivamente.

**Palavras – chave:** Biodiesel. Óleo de soja. RMN  $^1\text{H}$ , CLAE. Quantificação.

## ABSTRACT

In this study the use of techniques  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and high performance liquid chromatography are compared for evaluating the content of methyl and ethyl esters formed by transesterification of soybean oil. For that, equations reported in the literature were used and that has been developed for the quantitation of methyl and ethyl esters of soybean by  $^1\text{H}$  NMR. Several samples were obtained by transesterification in order to obtain models exhibiting different ester concentrations. The signals of  $^1\text{H}$  NMR spectra of the soybean oil, methyl and ethyl esters of soybean oil with total and partial conversion were assigned. The NMR technique, despite being regarded as a qualitative and quantitative technique, was not effective for determination of methyl and ethyl esters due to the overlap of the signals used for calculating the areas. By comparing the results obtained using both techniques, we obtained differences of  $\sim 15\%$  and  $\sim 20\%$  for methyl esters and ethyl esters, respectively.

Keywords: Biodiesel. Soybean oil.  $^1\text{H}$ -NMR, HPLC. Quantification.

## LISTA DE ESQUEMAS

|             |                                                                                                                                           |    |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Esquema 1 - | Representação da transesterificação de triglicerídeos onde $R'$ , $R''$ e $R'''$ representam as cadeias carbônicas dos ácidos graxos..... | 38 |
| Esquema 2 - | Transesterificação de triglicerídeos: sequência de três reações consecutivas e reversíveis.....                                           | 38 |
| Esquema 3 - | Reação de transesterificação de triglicerídeos, onde R representa a cadeia carbônica dos ácidos graxos.....                               | 49 |
| Esquema 4 - | Transesterificação metílica com destaque dos hidrogênios utilizados para o cálculo do teor de ésteres metílicos.....                      | 60 |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 –  | Experiência de Packard, em 1951. Mostra os deslocamentos de Ressonância Magnética Nuclear dos núcleos $^1\text{H}$ do álcool etílico.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 21 |
| Figura 2 –  | Núcleo em movimento gerando um campo magnético.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 22 |
| Figura 3 –  | A movimentação da carga num próton possui um campo magnético.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 23 |
| Figura 4 –  | Níveis de energia de um próton na presença de um campo magnético, onde E é a energia; $B_0$ intensidade do campo magnético externo; $\Delta E$ é a energia liberada quando o campo magnético é desligado.....                                                                                                                                                                                  | 23 |
| Figura 5 –  | Esquema do movimento de precessão, interação spin eletrônico/campo magnético $B_0$ .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 25 |
| Figura 6 –  | (a) Representação dos prótons de forma aleatória: os vetores se cancelam não havendo formação de momento magnético; (b) Alinhamentos dos prótons após serem colocados sob um campo magnético forte; (c) Após os núcleos absorverem radiação eletromagnética de um campo externo, eles passam do estado de menor energia para o de maior energia: esse fenômeno designa-se por ressonância..... | 26 |
| Figura 7 –  | Transformação do FID em Espectro de RMN.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 26 |
| Figura 8 –  | Tubos apropriados para diferentes tipos de sonda e experimentos de RMN.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 27 |
| Figura 9 –  | Diagrama de um espectrômetro de RMN.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 29 |
| Figura 10 – | Esquema da instrumentação básica de um CLAE.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 32 |
| Figura 11 – | Representação estrutural dos cinco ácidos graxos majoritários presentes na composição do óleo de soja.....                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 42 |
| Figura 12 – | Representação dos compostos interemediários, MAG e DAG, formados em uma reação de transesterificação de conversão parcial....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 42 |
| Figura 13 – | Reator utilizado para a realização das reações de transesterificação.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 47 |

|             |                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 14 – | Espectro de RMN $H^1$ de (a) alíquota de 5 minutos de reação. (b) amostra de óleo de soja puro e (c) biodiesel padrão metílico de soja, em $CDCl_3$ .....                                                                           | 50 |
| Figura 15 – | Espectro de RMN $H^1$ de (a) mistura de B100 etílico de soja com óleo de soja; (b) biodiesel padrão etílico de soja (B100) e (c) óleo de soja puro, em $CDCl_3$ .....                                                               | 51 |
| Figura 16 – | Espectros de RMN $H^1$ do óleo de soja refinado, biodiesel metílico de soja e biodiesel etílico de soja, em $CDCl_3$ .....                                                                                                          | 52 |
| Figura 17 – | Espectro de RMN $H^1$ de uma reação de transesterificação do óleo de soja de 5 minutos.....                                                                                                                                         | 55 |
| Figura 18 – | Expansão (Figura 17) da região de 3,5 – 5,3 ppm no espectro de RMN $H^1$ , que mostra a presença dos sinais dos intermediários reacionais, após 5 minutos de metanólise do óleo de soja a 120 °C.....                               | 56 |
| Figura 19 – | Cromatograma obtido por análise de CLAE do óleo de soja.....                                                                                                                                                                        | 57 |
| Figura 20 – | Análise por CLAE de uma amostra obtida da metanólise do óleo de soja (4 horas de reação a 160 °C).....                                                                                                                              | 58 |
| Figura 21 – | Análise por CLAE de uma etanólise do óleo de soja (40 minutos de reação a 160 °C).....                                                                                                                                              | 58 |
| Figura 22 – | Espectro de RMN $H^1$ de uma reação de transesterificação metílica do óleo de soja em andamento (cinco minutos).....                                                                                                                | 61 |
| Figura 23 – | Espectro de RMN $H^1$ do óleo de soja obtido em $CDCl_3$ .....                                                                                                                                                                      | 61 |
| Figura 24 – | Espectro de RMN $H^1$ de uma amostra de ésteres metílicos de soja obtido em $CDCl_3$ .....                                                                                                                                          | 62 |
| Figura 25 – | Ampliação da região 3,4 -4,4 ppm do espectro de RMN $H^1$ da Figura 24. Mostra a formação de intermediários reacionais.....                                                                                                         | 62 |
| Figura 26 – | (a) Região do espectro de RMN $H^1$ (a) do óleo de soja que mostra os sinais dos hidrogênios beta da porção glicerídica. (b) do biodiesel etílico de soja (B100) que mostra o sinal dos hidrogênios do grupo $CH_3-CH_2-OCOR$ ..... | 64 |

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 27 – | Região dos espectros de RMN $H^1$ onde acontece a sobreposição dos sinais em uma mistura de B100 etílico de soja com óleo de soja.....                                                                                                                                                                                                                                     | 65 |
| Figura 28 – | Espectro de RMN $H^1$ do óleo de soja que mostra a relação do sinal dos hidrogênios dos dois $CH_2$ da porção glicerídica (dois duplos dupletos) com o sinal (triplete) dos hidrogênios alfa à carbonila ( $R-\underline{CH_2}-COO-CH_2-CH_3$ ).....                                                                                                                       | 65 |
| Figura 29 – | Espectro de RMN $H^1$ de uma amostra de ésteres etílicos obtidos a partir da transesterificação do óleo de soja que mostra a relação dos hidrogênios dos grupos $R-COO-\underline{CH_2}-CH_3$ (quarteto em 4,12 ppm) e $R-\underline{CH_2}-COO-CH_2-CH_3$ (triplete em 2,29 ppm) quando a conversão é total.....                                                           | 66 |
| Figura 30 – | Sobreposição dos espectros de RMN $H^1$ do óleo de soja (a), (b) de uma alíquota de 1h de transesterificação etílica do óleo de soja e (c) de uma mistura de B100 etílico de soja mais óleo de soja na proporção de 1:1(m/m).....                                                                                                                                          | 68 |
| Figura 31 – | (a) Região do espectro de RMN $H^1$ do óleo de soja que mostra os sinais dos hidrogênios beta da porção glicerídica (4,0 – 4,4 ppm). (b) Região do espectro de RMN $H^1$ de uma alíquota proveniente do monitoramento de uma reação de transesterificação do óleo de soja (c) Região do espectro de RMN $H^1$ de uma mistura de FAEEs obtida a partir do óleo de soja..... | 68 |
| Figura 32 – | Figura 32 – Região dos espectros de três amostras de biodiesel metílico: mostra que os sinais na região de 4,0 – 4,4 ppm não são simétricos. Consequência da existência de intermediários da reação de transesterificação.....                                                                                                                                             | 69 |

## LISTA DE TABELAS

|             |                                                                                                                                                                                            |    |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 -  | Diferenças entre CG e CLAE.....                                                                                                                                                            | 31 |
| Tabela 2 -  | Tabela 2- Produtividade de óleo das principais plantas usadas na produção de biodiesel.....                                                                                                | 41 |
| Tabela 3 -  | Tabela de composição dos ácidos graxos do óleo de soja.....                                                                                                                                | 41 |
| Tabela 4 -  | Condição reacional para as amostras selecionadas para o estudo de quantificação.....                                                                                                       | 46 |
| Tabela 5 -  | Tabela de reagentes e solventes utilizados.....                                                                                                                                            | 47 |
| Tabela 6 -  | Tabela de deslocamentos químicos dos sinais de RMN nos espectros dos ésteres metílicos de soja, ésteres etílicos de soja e óleo de soja, seguindo a numeração dos sinais da Figura 16..... | 56 |
| Tabela 7 -  | Deslocamentos químicos dos sinais nos espectros do óleo de soja, biodiesel metílico de soja e biodiesel etílico de soja. Conforme Figura 18.....                                           | 56 |
| Tabela 8 -  | Resultado das análises de CLAE para os Ésteres Metílicos obtidos a partir da transesterificação do óleo de soja refinado.....                                                              | 59 |
| Tabela 9 -  | Resultado das análises de CLAE para os Ésteres Etílicos obtidos a partir da transesterificação do óleo de soja.....                                                                        | 59 |
| Tabela 10 - | Teor de ésteres metílicos obtidos por RMN $H^1$ através da Equação 5 e pela técnica de CLAE.....                                                                                           | 63 |
| Tabela 11 - | Comparativo do teor de ésteres etílicos de soja obtidos por RMN $H^1$ e CLAE.....                                                                                                          | 67 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                    |                                                                         |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| AGL                | Ácido graxo livre                                                       |
| RMN <sup>1</sup> H | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio                             |
| CLAE               | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                                |
| ANP                | Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis             |
| CG                 | Cromatografia Gasosa                                                    |
| NIR                | <i>Near Infrared</i> - Infravermelho Próximo                            |
| TAG                | Triacilglicerídeo                                                       |
| DAG                | Diacilglicerídeo                                                        |
| MAG                | Monoacilglicerídeo                                                      |
| FAMES              | <i>Fatty acid methyl esters</i> – Ésteres metílicos de ácidos graxos    |
| FAEEs              | <i>Fatty acid Ethyl esters</i> – Ésteres etílicos de ácidos graxos      |
| EE                 | Ésteres etílicos                                                        |
| EM                 | Ésteres metílicos                                                       |
| DIL                | Decaimento de Indução Livre                                             |
| GCAR               | Grupo de Catálise e Reatividade                                         |
| IQB – UFAL         | Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas |
| DBTDL              | <i>Dibutyltin dilaurate</i> - Dibutil dilaurato de estanho              |
| PrHex              | Propanol-hexano                                                         |
| CDCl <sub>3</sub>  | Clorofórmio deuterado                                                   |
| UV                 | Ultravioleta                                                            |
| Vis                | Visível                                                                 |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                                 |                                                          |
|---------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>r.f.</b>                     | radiofrequência                                          |
| <b><math>\Delta E</math></b>    | Diferença de energia                                     |
| <b><math>\mu</math></b>         | Momento magnético nuclear                                |
| <b>I</b>                        | Número quântico de spin                                  |
| <b>J</b>                        | Momento angular                                          |
| <b><math>B_0</math></b>         | Campo Magnético externo                                  |
| <b>E</b>                        | Energia                                                  |
| <b><math>h</math></b>           | Constante de Plank                                       |
| <b><math>\nu</math></b>         | Frequência da radiação eletromagnética                   |
| <b><math>\gamma</math></b>      | Constante giromagnética ou razão giromagnética           |
| <b><math>\omega_0</math></b>    | Frequência angular de precessão – (frequência de Larmor) |
| <b>K</b>                        | Kelvin                                                   |
| <b><math>\alpha</math>-spin</b> | spin no nível de menor energia                           |
| <b><math>\beta</math></b>       | spin nonível de maior energia                            |

## SUMÁRIO

|            |                                                                                           |           |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                    | <b>17</b> |
| <b>2</b>   | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                     | <b>22</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Objetivo Geral.....</b>                                                                | <b>22</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Objetivos Específicos.....</b>                                                         | <b>22</b> |
| <b>3</b>   | <b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>                                                         | <b>23</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....</b>                               | <b>23</b> |
| 3.1.1      | Histórico sobre RMN.....                                                                  | 23        |
| 3.1.2      | Princípio da Técnica de Ressonância Magnética Nuclear.....                                | 25        |
| 3.1.3      | Obtenção do sinal de RMN.....                                                             | 28        |
| 3.1.4      | Preparação das Amostras para Análise de RMN.....                                          | 30        |
| 3.1.4.1    | Tubos e volume da amostra.....                                                            | 30        |
| 3.1.5      | Instrumentação – espectrômetro de RMN.....                                                | 31        |
| <b>3.2</b> | <b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.....</b>                               | <b>33</b> |
| 3.2.1      | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia Gasosa.....                      | 33        |
| 3.2.2      | Técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....                                 | 34        |
| <b>3.3</b> | <b>O Biodiesel.....</b>                                                                   | <b>40</b> |
| 3.3.1      | Soja.....                                                                                 | 42        |
| <b>3.4</b> | <b>RMN e CLAE para determinação de rendimentos.....</b>                                   | <b>46</b> |
| <b>4</b>   | <b>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....</b>                                                   | <b>49</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Materiais.....</b>                                                                     | <b>49</b> |
| 4.1.1      | Metodologia Analítica.....                                                                | 50        |
| 4.1.2      | Determinação do Rendimento em Biodiesel por Cromatografia líquida de Alta Eficiência..... | 50        |
| 4.1.2.1    | Determinação do Rendimento em Biodiesel por Ressonância Magnética Nuclear.....            | 51        |
| <b>5</b>   | <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>                                                       | <b>54</b> |

|     |                                                                                                                                        |    |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1 | Atribuição dos sinais de RMN $H^1$ nos espectros do óleo, biodiesel metílico e etílico de soja.....                                    | 54 |
| 5.2 | Atribuição dos sinais de RMN $H^1$ para monoacilglicerídeo (sn-MAG) e diacilglicerídeo (sn-DAG).....                                   | 56 |
| 5.3 | Determinação do teor de esteres metílicos, esteres etílicos, monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos e triacilglicerídeos por CLAE..... | 59 |
| 5.4 | Determinação do teor de ésteres metílicos por RMN $H^1$ .....                                                                          | 62 |
| 5.5 | Determinação do teor de ésteres etílicos por RMN $H^1$ .....                                                                           | 66 |
| 6   | CONCLUSÃO.....                                                                                                                         | 73 |
| 7   | PERSPECTIVAS.....                                                                                                                      | 73 |
|     | REFERÊNCIAS.....                                                                                                                       | 72 |
|     | APÊNDICES.....                                                                                                                         | 76 |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Gerais

O uso de biodiesel como combustível vem crescendo de uma forma contínua, com potencial promissor no mundo inteiro (LIMA et al., 2007). Em primeiro lugar, pela sua contribuição ao meio ambiente, com a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental. Em segundo lugar, como fonte estratégica de energia renovável em substituição ao óleo diesel. No cenário brasileiro, o seu uso pode também reduzir a dependência de importação deste combustível (FARIAS et al., 2007).

No Brasil, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), define o biodiesel como sendo “um combustível para motores a combustão interna com ignição por compressão, renovável e biodegradável, derivado de óleos vegetais ou de gorduras animais, que possa substituir parcial ou totalmente o óleo diesel de origem fóssil”.

O biodiesel antes de ser comercializado deve passar por uma série de testes e análises que atendam às exigências da ANP. Algumas técnicas analíticas têm sido usadas para a determinação, verificação ou quantificação do biodiesel obtido através da reação de transesterificação. Além da Cromatografia Gasosa (CG), que é a técnica requerida pela Resolução N° 14, da ANP, de 11.05.2012, que determina as especificações para o biodiesel, a Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) também são técnicas que vem sendo, frequentemente, utilizadas para o monitoramento da reação e determinação da existência dos coprodutos, glicerina, diacilglicerídeo e monoacilglicerídeo (PESTANA, 2010).

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica de espectroscopia amplamente utilizada na identificação de compostos, sendo inclusive empregada no estudo de monitoramento da reação de transesterificação de óleos/gorduras e na verificação da pureza do biodiesel (COSTA NETO et al., 2004; GELBARD et al., 1995; GHESTI et al., 2007; KNOTHE, 2000). KNOTHE (2001) propôs o uso da RMN de  $^1\text{H}$  em combinação com NIR (espectroscopia no infravermelho próximo) para a quantificação do conteúdo de biodiesel metílico de soja em diesel mineral.

A cromatografia de alta eficiência também tem sido um dos métodos utilizados, pois permite, em uma única corrida para analisar a conversão reacional: TAG, DAG, MAG e biodiesel (CARVALHO et al., 2012).

No presente trabalho os resultados do teor de ésteres obtidos por transesterificação etílica e metílica, através das duas técnicas utilizadas, são comparados.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Determinar o teor de monoésteres em biodiesel utilizando as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e assim, fazer uma análise comparativa dos resultados obtidos por ambas as técnicas.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Obter alíquotas provenientes do monitoramento de reações de transesterificação etílica e metílica do óleo de soja, a fim de obter amostras com diversos teores de monoésteres (biodiesel), mono-, di-, triglicerídeo (MAG, DAG e TAG, respectivamente).
- Verificar os teores de monoésteres, mono-, di- e triacilglicerídeo das alíquotas obtidas.
- Determinar o rendimento reacional (% FAMEs – ésteres metílicos de ácidos graxos e % FAEEs – ésteres etílicos de ácidos graxos) das várias reações, por meio das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear  $^1\text{H}$  e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Comparar a eficiência das duas técnicas utilizadas para a quantificação do rendimento reacional.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Em Química e Física o termo espectroscopia é a designação para toda técnica de levantamento de dados físico-químicos através da transmissão, absorção ou reflexão da energia radiante incidente em uma amostra. Dentre essas técnicas espectroscópicas destaca-se a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (FARIAS et al., 2007).

A Ressonância Magnética Nuclear é a principal técnica espectroscópica para a identificação de compostos orgânicos e está entre as técnicas líderes para a determinação de suas estruturas (SKOOG et al., 2002). Em particular é um método decisivo na determinação de estruturas tridimensionais de moléculas no estado líquido e no estudo de substâncias sólidas. Ocupa, igualmente, um lugar saliente no campo da análise qualitativa e quantitativa, desde componentes em produtos alimentares, por exemplo, a fluidos biológicos e metabolitos em tecidos e órgãos de seres vivos intactos, de um modo não invasivo e não destrutivo (TAVARES et al., 2008).

##### 3.1.1 Histórico sobre RMN

A origem da técnica da RMN remota à investigação fundamental efetuada nas décadas de 1920-30 sobre o comportamento de átomos e moléculas na presença de campos magnéticos. No início dos anos 1920 Otto Stern (1888 – 1969) e Walther Gerlach (1889 – 1979), físicos alemães, verificaram que um feixe de átomos sujeito a um campo magnético não-homogêneo é desviado de acordo com a orientação dos campos magnéticos. Foi Wolfgang Ernst Pauli (1900 – 1958), físico austríaco, quem sugeriu em 1924 a existência de núcleos magnéticos, tendo nos anos 1930 o aperfeiçoamento das experiências de Stern-Gerlach permitindo a determinação de momentos magnéticos nucleares.

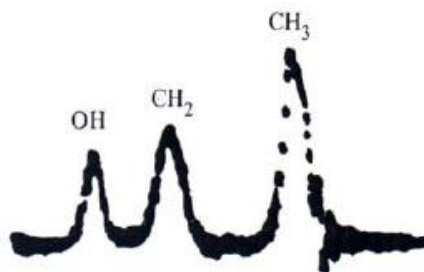
Em 1939, o físico Isidor Isaac Rabi (1898 – 1988) da Universidade da Columbia, Nova Iorque, EUA, ao colocar um feixe de moléculas de hidrogênio (em alto vázio) num campo magnético homogêneo forte, observou que, quando submetido a ação de ondas de rádio (r.f.) de certa frequência bem definida, esse feixe molecular absorvia energia e sofria um pequeno desvio. Essa frequência é característica da substância utilizada, permitindo sua identificação. Estes resultados foram interpretados pela absorção das ondas de rádio pelos

núcleos atômicos da substância orientados no campo magnético, alterando essa sua orientação no processo. Esta seria, de fato, a primeira observação de ressonância magnética nuclear.

A detecção deste fenômeno em amostras líquidas e sólidas só foi realizada em 1946 por Felix Bloch (1905 – 1983), físico suíço, da Universidade de Stanford e Edward Purcell (1912 – 1997), físico norte-americano, da Universidade de Harvard (ambas nos EUA), que, ao procurarem medir momentos magnéticos nucleares com maior precisão, observaram sinais de absorção r.f. por parte dos prótons da água e de parafina, respectivamente, tendo recebido em conjunto o Prêmio Nobel de Física em 1952 (ARAÚJO, 2002).

O fenômeno de RMN começou a interessar aos químicos por volta de 1950-51, quando Packard, um colaborador de Bloch, substituiu a água por etanol como amostra. Ao observarem três sinais (Figura 1) devidos aos prótons dessa amostra, em vez de um só como na água, sentiram-se desapontados, pois a medida rigorosa de momentos magnéticos nucleares por este método estava definitivamente comprometida.

**Figura 1 - Experiência de Packard, em 1951. Mostra os deslocamentos de Ressonância Magnética Nuclear dos núcleos  $^1\text{H}$  do álcool etílico.**



Fonte:Araújo, 2002.

Porém ao atribuírem corretamente a ocorrência destes três sinais à estrutura química da substância, chamado desvio químico (*“chemical shift”*) ao fenômeno, reconheceram o enorme potencial da técnica RMN para estudos em Química (BATHISTA & NOGUEIRA, 2002; GERALDES, 2003).

A CLAE é uma técnica de ultra-microanálise que emprega A partir de 1953, com a produção e comercialização do primeiro espectrômetro RMN, já com boa resolução e sensibilidade, desenvolveu-se uma vastíssima aplicação em vários domínios da Química. Os enormes avanços tecnológicos verificados na instrumentação, tais como a introdução por volta de 1970 de técnicas de impulso r.f. aliada à análise matemática baseadas em transformações de Fourier (GIL & GERALDES, 1987), bem como mais recentemente o

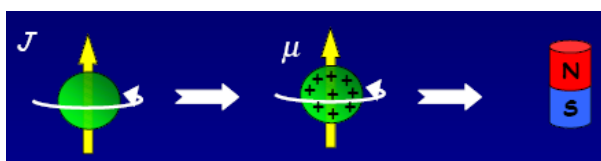
desenvolvimento de magnetos supercondutores cada vez mais intensos, sensíveis e homogêneos (chegando atualmente a frequências de ressonância protônicas de 1 GHz (BRUKER 2010; GERALDES, 2003).

### 3.1.2 Princípio da Técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Sob condições apropriadas, uma amostra pode absorver uma radiação eletromagnética na região de frequência em uma frequência governada pelas características estruturais da amostra. A absorção é função de determinados núcleos da molécula. Um registro gráfico das frequências dos sinais de absorção contra suas intensidades constitui-se em um espectro de RMN. Este trabalho será restrito, apenas, a discussão do espectro de ressonância magnética nuclear do hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ), visto que, existem outros tipos de experimentos, além de  $^1\text{H}$ , utilizando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear.

Todos os núcleos possuem carga e, em alguns casos essa carga gira em torno do eixo nuclear gerando um dipolo magnético ao longo do eixo (Figura 2). O momento angular ( $J$ ) da carga em movimento pode ser descrito em termos do “número de spin”  $I$ , que pode assumir os valores de 0,  $\frac{1}{2}$ , 1,  $\frac{3}{2}$ , etc. ( $I = 0$  corresponde a um núcleo que não gira em torno do seu eixo). A magnitude do dipolo gerado é expressa em termos do momento magnético nuclear,  $\mu$ .

**Figura 2 - Núcleo em movimento gerando um campo magnético.**



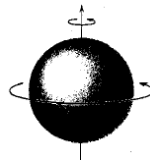
Fonte: Araújo, 2002.

Cada próton e cada nêutron têm o seu próprio spin ( $I$ ), e o número  $I$  é a resultante destes spins. Se a soma dos prótons e nêutrons for um número par,  $I$  terá o valor zero ou um valor inteiro (0, 1, 2,...). Se a soma for ímpar,  $I$  terá valores fracionários ( $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{3}{2}$ ,  $\frac{5}{2}$ ,...). Se o número de prótons e nêutrons for par,  $I$  terá o valor zero. Tanto o  $^{12}\text{C}$  como o  $^{16}\text{O}$  caem nesta última categoria, não produzindo, portanto, sinal na RMN.

Vários núcleos possuem um número de spin ( $I$ )  $\frac{1}{2}$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{31}\text{P}$ ) e, portanto uma distribuição de carga esférica e uniforme (Figura 3). Os núcleos com número de spin  $I$ , 1, ou maior do que 1 possuem uma distribuição de carga não esférica. O spin é o movimento de

rotação do elétron. Assim, em função dos dois sentidos de rotação para o elétron, são conhecidos dois valores para o spin:  $+\frac{1}{2}$  e  $-\frac{1}{2}$ .

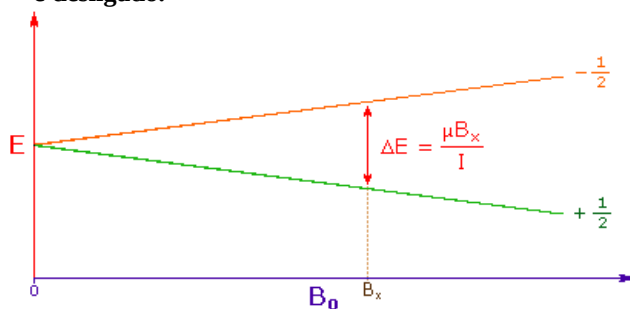
**Figura 3 – A movimentação da carga num próton possui um campo magnético.**



Fonte: Silverstein et al., 1979.

O número de spin  $I$  determina o número de orientações diversas que um núcleo pode assumir quando colocado dentro de um campo magnético externo uniforme, de acordo com a fórmula  $2I + 1$ . Como já foi mencionado, este trabalho será restrito ao próton cujo número de spin  $I$  é  $\frac{1}{2}$ , e que possui duas orientações possíveis em relação ao campo magnético externo uniforme: ou o núcleo se coloca paralelamente ao campo aplicado (alinhado com o campo:  $+1/2$ ) ou antiparalelamente (alinhado contra o campo:  $-1/2$ ). O primeiro destes estados tem menor energia (é mais estável). Os níveis de energia dos estados são uma função da magnitude do momento magnético nuclear  $\mu$  e da força do campo externo aplicado  $B_0$  (Figura 4).

**Figura 4 – Níveis de energia de um próton na presença de um campo magnético, onde  $E$  é a energia;  $B_0$  intensidade do campo magnético externo;  $\Delta E$  é a energia liberada quando o campo magnético é desligado.**



Fonte: Adaptado de Silverstein et al., 1979.

Estabelecidos os níveis de energia para o próton, podemos agora introduzir os quanta de energia  $h\nu$  ( $h$  é a constante de Plank e  $\nu$  é a frequência da radiação eletromagnética de forma a que a orientação paralela (estado de menor energia) possa converter-se na orientação antiparalela (estado de maior energia) sob a ação de um campo magnético de uma dada força  $B_0$ . A equação fundamental da RMN relaciona frequência eletromagnética com a força do campo:

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (1)$$

A constante  $\gamma$  é chamada razão giromagnética e é uma constante nuclear fundamental. A razão giromagnética é a constante de proporcionalidade entre o momento magnético  $\mu$  e o número de spin  $I$ .

$$\gamma = \frac{2\pi\mu}{hI} \quad (2)$$

onde  $h$  é a constante de Plank.

Diante do que foi descrito anteriormente, consideremos agora o que acontece a um pequeno ímã girando em um campo magnético externo: o eixo do pequeno ímã (o próton) terá um movimento de precessão ao redor do campo magnético externo, de modo análogo ao que acontece com um giroscópio em movimento sob a influência do campo gravitacional (Figura 5). A velocidade angular de precessão,  $\omega_0$ , é igual ao produto da razão giromagnética  $\gamma$  e da força do campo aplicado  $B_0$  (SILVERSTEIN et al., 1979).

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0$$

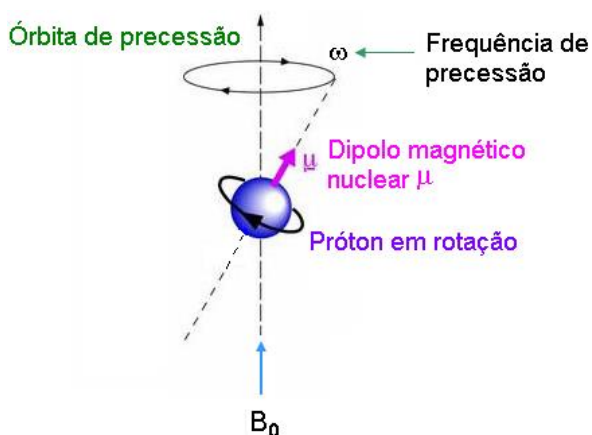
Dado que a equação fundamental da RMN é:

$$\gamma B_0 = 2\pi \nu$$

Portanto

$$\omega_0 = 2\pi \nu \quad (3)$$

**Figura 5 - Esquema do movimento de precessão, interação spin eletrônico/campo magnético  $B_0$ .**



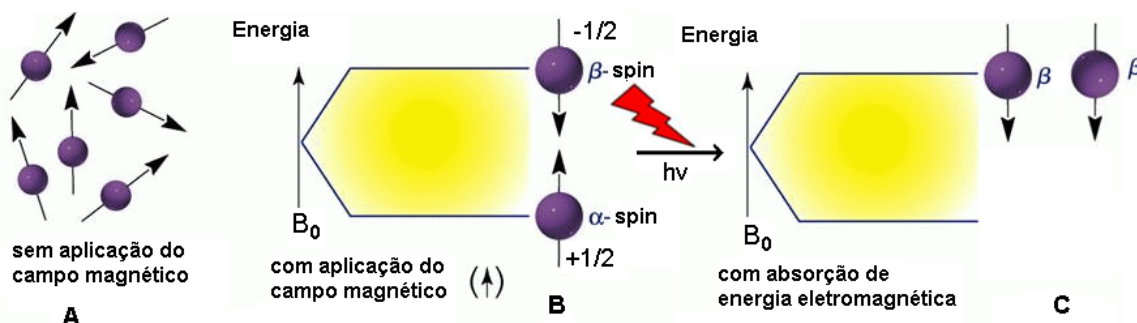
Fonte: Adaptado de Silverstein et al., 1979.

### 3.1.3 Obtenção do sinal de RMN

Para obtermos um sinal de RMN precisamos colocar a amostra a ser examinada dentro de um campo magnético alto  $B_0$  o qual pode variar a intensidade de acordo com a frequência do aparelho. Este campo magnético ( $B_0$ ) é gerado pela corrente elétrica circulando por um supercondutor que precisa ser continuamente refrigerado a uma temperatura de 4K, por meio de hélio líquido a fim de manter as características supercondutoras do magneto. O campo magnético é maior e mais homogêneo no centro do magneto, onde a amostra será posicionada, mas nunca devemos esquecer que também existe um campo magnético em volta do magneto, o suficiente para causar estragos se algum objeto metálico ficar por perto.

Após a amostra ser posicionada no centro do magneto os spins começam a “sentir” o efeito do campo magnético externo  $B_0$  e seus momentos magnéticos (rotação “spin”) se alinham no mesmo sentido (+1/2) e no sentido contrário (-1/2) aos do campo  $B_0$  (Figura 6B). Este alinhamento, conhecido como polarização, não é instantâneo, leva alguns segundos para ser concluído, simultaneamente se irradia o composto com pulsos de energia eletromagnética e os núcleos absorvem essa energia, num processo denominado *ressonância magnética* (Figura 6c) (AZEVEDO, 2006, HAGE & IWASAKI, 2009).

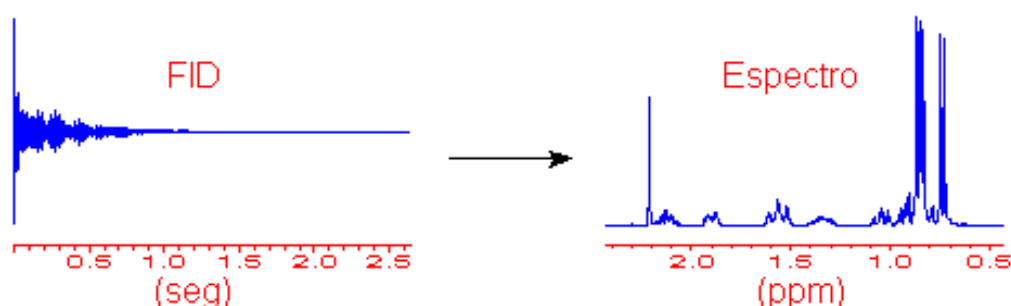
**Figura 6 – (A) Representação dos prótons de forma aleatória: os vetores se cancelam não havendo formação de momento magnético; (B) Alinhamentos dos prótons após serem colocados sob um campo magnético forte; (C) Após os núcleos absorverem radiação eletromagnética de um campo externo, eles passam do estado de menor energia para o de maior energia: Esse fenômeno designa-se por ressonância.**



Fonte: Adaptado de Silverstein et al., 1979.

Quando o pulso de rádiofrequência é subitamente desligado, os spins voltam à sua posição normal (em um processo denominado relaxação), se realinham, e nessa circunstância eles emitem um sinal que é captado por uma bobina localizada ao redor da amostra a ser examinada. O sinal gerado é denominado FID (“*Free Induction Decay*”) ou Decaimento de Indução Livre (DIL), o qual é captado pela bobina, sendo utilizado pelo computador que, através de um procedimento matemático (Transformada de Fourier), é transformado no espectro de RMN como mostra a Figura 7.

**Figura 7 – Transformação do FID em Espectro de RMN.**



Fonte: Manual Bruker, 2010.

### 3.1.4 Preparação das Amostras para Análise em RMN.

Para a execução de experimentos de RMN é necessário diluir/solubilizar a substância a ser analisada em um solvente deuterado.

A seleção do solvente adequado para a análise de RMN é baseada numa série de critérios. Como a maioria dos espectrômetros depende de um sistema de *lock* de deutério para manter a estabilidade do campo, um solvente deuterado é invariavelmente necessário. O canal de *lock* regula o campo através da observação de ressonância de deutério em modo de dispersão (ao contrário do que é habitual em RMN onde os sinais são observados em modo de absorção) e tem como objetivo manter o centro dessa ressonância a uma frequência constante.

O requisito mais óbvio para a escolha do solvente é a solubilidade do analito, o qual tem que ser solúvel no solvente na concentração necessária para a análise. Esta concentração depende de uma série de fatores incluindo a sensibilidade do núcleo a observar, a sensibilidade do aparelho e o tipo de experiência, entre outros. Se forem realizar experiências a outra temperatura que não a temperatura ambiente, o ponto de fusão e o ponto de ebulição dos solventes também têm que ser tomados em consideração. Quando se trabalha a temperaturas muito baixas é necessário garantir que não ocorre precipitação do analito em solução. Os solventes mais utilizados a alta temperatura são o dimetilsulfóxido ou o tolueno e a baixa temperatura o diclorometano, metanol ou tetrahidrofurano. A viscosidade do solvente afeta a resolução e os melhores resultados são obtidos com solventes menos viscosos, tal como a acetona (que é usada como solvente para os testes de resolução dos aparelhos).

#### 3.1.4.1 Tubos e volume da amostra

Existem diversos tipos de tubos de RMN, diferentes em qualidade e preço. Qualquer desvio pode produzir artefatos indesejáveis no espectro, normalmente sob a forma de “bandas-laterais”. Normalmente o diâmetro do tubo a utilizar é determinado pelas dimensões da sonda. Tubos de 2.5 ou 3.0 mm são os apropriados para utilizar numa microsonda, os tubos de 5.0 mm são os mais correntes e os de 10.0 mm (Figura 8) são normalmente utilizados para a observação de núcleos pouco sensíveis com limitações de solubilidade do material estudado.

**Figura 8 - Tubos apropriados para diferentes tipos de sonda e experimentos de RMN.**



Os tubos devem ser mantidos limpos, secos e livres de poeiras e riscos no vidro, uma vez que estes podem levar a distorções do cilindro onde a amostra é colocada. É importante evitar também a contaminação exterior dos tubos de RMN, tal como as impressões digitais “oleosas” uma vez que estas contaminações são transferidas para o interior da sonda e conduzem a uma degradação progressiva no desempenho do aparelho.

### 3.1.5 Instrumentação – Espectrômetro de RMN

O requisito fundamental para a realização de RMN de alta resolução é o intenso campo magnético estático. Este campo magnético é criado através de magnetos solenóides supercondutores constituídos por uma liga de nióbio. O solenóide funciona imerso num banho de hélio líquido (4 K) cercado por um escudo de radiação e arrefecido por um banho de nitrogénio líquido (a 77K), que por sua vez está rodeado por uma câmara sobre vácuo. Esta construção constitui um sistema extremamente eficiente e uma vez ativado o magneto pode operar durante muitos anos.

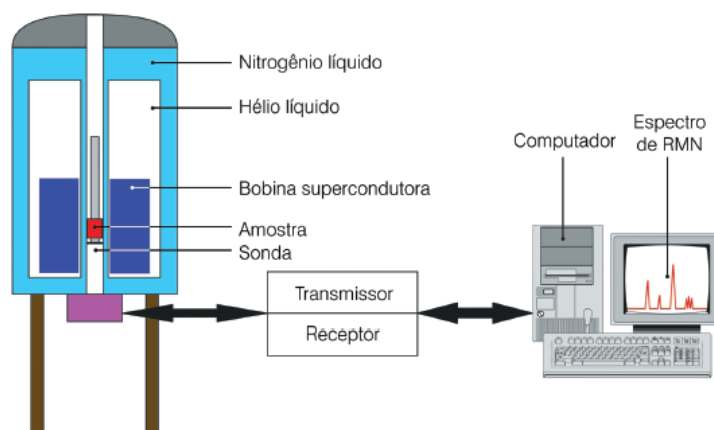
Para o funcionamento e manutenção do magneto são necessários enchimentos periódicos de nitrogénio e hélio, semanalmente ou de 15 em 15 dias para o nitrogénio ( $N_2$ ) e cada seis meses para o hélio (He). O *dewar* do magneto é atravessado por um tubo central oco que se encontra à temperatura ambiente, aí estão situadas uma série de bobinas elétricas, conhecidas por bobinas de *shim*, que geram os seus próprios pequenos campos magnéticos e são utilizadas para otimizar o campo central estático, permitindo remover heterogeneidades residuais, num processo conhecido como *shimming*. Este processo é necessário para cada amostra a analisar. Exatamente no centro do campo magnético, rodeada pelas bobinas de *shim*, fica colocada a cabeça da sonda, o coração do espectrômetro de RMN (BRUKER, 2010).

Na Figura 9 é apresentado um diagrama de um espectrômetro de RMN com ímã supercondutor. A amostra é colocada dentro da sonda de RMN que fica no centro de uma bobina supercondutora, resfriada por nitrogénio e hélio líquidos. Um computador central comanda o equipamento, enviando, captando e processando os sinais de RMN (COLNAGO et al., 2002).

A sonda contém as bobinas de radiofrequência e os circuitos associados que atuam como antenas, transmitindo e recebendo a radiação eletromagnética. Estas bobinas podem

estar rodeadas por outras bobinas de gradientes que servem para destruir a homogeneidade de campo de maneira controlada. A amostra é colocada num tubo de vidro e está encaixada numa turbina ou rotor (*spinner*) que desce sustentada por uma coluna de ar ou nitrogênio ao longo do centro do magneto até a cabeça da sonda.

**Figura 9 - Diagrama de um espectrômetro de RMN.**



Fonte: Colgano, 2002.

Existem numerosos tipos de sondas, de vários tamanhos e diâmetros que dependem da construção do magneto e que são normalmente referenciadas de acordo com o diâmetro do tubo de amostra que comportam.

A sonda é introduzida pela base do *dewar* do magneto enquanto a amostra é introduzida pelo topo. O rotor onde está encaixado o tubo de amostra descansa no topo da sonda de tal modo que o volume da amostra fica posicionado no centro das bobinas da sonda. Esta posição em relação às bobinas é muito importante e por esse motivo a posição do tubo de amostra no rotor deve ser corretamente ajustada antes de ser colocado no magneto (COLNAGO et al., 2002).

### 3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação. As razões para a popularidade desse método é a sua sensibilidade, a fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, sua adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis, e acima de tudo, sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria, para muitos campos da ciência e para o público. Exemplos desses materiais incluem: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos,

hidrocarbonetos, carboidratos, drogas, terpenóides, pesticidas, antibióticos, esteroides, espécies organometálicas e muitas substâncias inorgânicas.

Sob alguns aspectos a cromatografia líquida de alta eficiência é mais versátil do que a cromatografia em fase gasosa porque ela não está limitada a amostras voláteis e termicamente estáveis e porque a escolha de fases estacionárias e móveis é mais ampla (SCKOOG et al., 2002).

### 3.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa

Atualmente a cromatografia gasosa é uma técnica amplamente difundida, e levando-se em consideração que há um grande número de pessoas familiarizado com ela, é conveniente compará-la com a CLAE.

Na Tabela 1 estão resumidas as principais características de ambas as técnicas. Na CG, é necessário que a amostra seja suficientemente volátil, a fim de que possa passar pela coluna na forma de vapor, e estável termicamente, para não se decompor nas condições de separação.

Independentemente da limitação da volatilidade ou da estabilidade térmica, a CLAE requer somente que a amostra seja solúvel na fase móvel. Assim, a CLAE é o método ideal para a separação de espécies iônicas ou macromoléculas de interesse biológico e produtos naturais lábeis, bem como uma ampla variedade de compostos de massa molar alta e/ou estabilidade térmica baixa.

**Tabela 1- Diferenças entre a CG e a CLAE.**

| Fator                                          | CG                                                                                                     | CLAE                                                                                       |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Requisitos para amostra                        | Amostra ou derivado volátil, termicamente estável na temperatura de operação do sistema cromatográfico | Amostra solúvel na fase móvel                                                              |
| Tipos de amostra                               | Gases líquidos e sólidos. M: 2 a 1.200                                                                 | Líquidos e sólidos, iônicos ou covalentes<br>M: 32 até 4.000.0000                          |
| Quantidades mínimas detectáveis                | $10^{-10}$ g a $10^{-13}$ g <sup>a</sup>                                                               | $10^{-10}$ g a $10^{-12}$ g <sup>b</sup>                                                   |
| Tempo de análise                               | Minutos até uma hora                                                                                   | Minutos até poucas horas                                                                   |
| Número de pratos por coluna                    | 2.000 (colunas recheadas)<br>50.000 (colunas capilares)                                                | 5.000 – 25.000 (colunas recheadas)                                                         |
| Capacidade preparativa                         | Pobre, necessitando de múltiplas injeções                                                              | Boa, com facilidade de coleta e capacidade de mecanização                                  |
| Capacidade analítica                           | Excelente, separação de amostra com até 200 componentes                                                | Excelente, separação de até 100 componentes em uma amostra                                 |
| Grau de dificuldade no manuseio do equipamento | Relativamente fácil                                                                                    | Requer maior tempo de treinamento, devido ao conjunto de diferentes modalidades possíveis. |

a: Detector por ionização de chama e captura de elétrons, respectivamente.

b: Detector por absorvância no UV e por fluorescência, respectivamente.

M: Massa molar

Fonte: Collins, 2006.

Frequentemente, as separações mais difíceis são desenvolvidas mais facilmente pela CLAE do que pela CG, e a CLAE:

- Possui duas fases cromatográficas (móvel e estacionária) de interação seletiva com as moléculas da amostra, *versus* somente uma em CG (a fase estacionária);
- Possui uma maior variedade de fases estacionárias que atuam em diversos mecanismos de separação;
- Permite a separação de compostos termicamente instáveis por ser feita a baixas temperaturas (COLLINS, 2006).

### 3.2.2 Técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência

Há seis diferentes mecanismos que governam as separações em CLAE. Mediante a troca da fase estacionária e da fase móvel, é possível utilizar cada um deles com o mesmo equipamento. Estes incluem (1) partição ou cromatografia líquido-líquido; (2) adsorção ou cromatografia líquido-sólido; (3) troca iônica ou cromatografia de íons; (4) cromatografia por exclusão; (5) cromatografia por afinidade; e (6) cromatografia quiral.

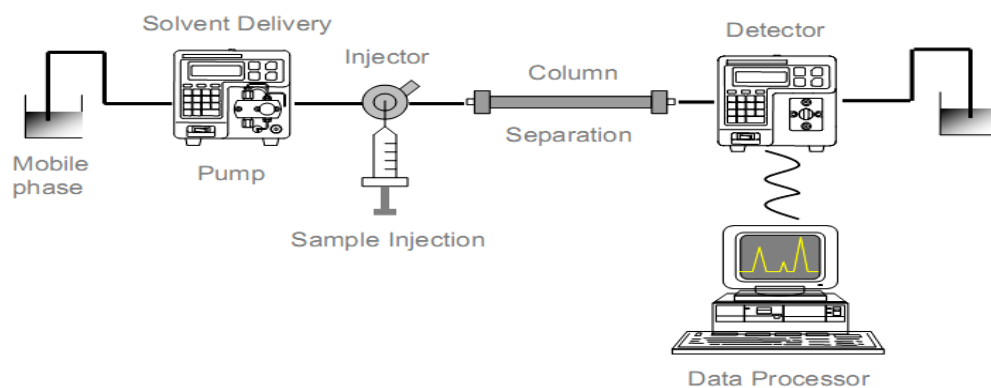
O tipo de CLAE mais utilizado é a cromatografia por partição, na qual a fase estacionária é um segundo líquido que é imiscível com o líquido da fase móvel. A cromatografia por partição pode ser subdividida em cromatografia líquido-líquido e

cromatografia líquida com fase ligada. A diferença entre as duas está na forma com a qual a fase estacionária é imobilizada nas partículas de suporte do recheio. O líquido é imobilizado por adsorção física em cromatografia líquido-líquido, enquanto é retido por meio de ligações químicas na cromatografia líquida com fase ligada. Inicialmente a cromatografia por partição era exclusivamente do tipo líquido-líquido; atualmente, contudo, os métodos de fase ligada predominam por causa de sua maior estabilidade. Os recheios do tipo líquido-líquido estão hoje em dia relegados a certas aplicações especiais (SKOOG et al.,2002).

A CLAE é uma técnica de ultra-microanálise que emprega um conjunto de equipamentos especiais, esses aparelhos são chamados de *cromatógrafos líquidos* e se caracterizam por terem os seguintes componentes:

1. Reservatório e sistema de bombeamento de fase móvel;
  - a) Bomba
  - b) Controles de pressão
  - c) Controles de fluxo
  - d) Filtro de entrada
2. Sistema de injeção da amostra;
3. Sistema analítico (coluna cromatográfica e termostato das colunas);
4. Sistema de detecção (um ou mais detectores);
5. Sistema de registro e tratamento de dados.

**Figura 10 - Esquema da instrumentação básica de um CLAE.**



Fonte: Skoog, 2002.

## **Reservatório e sistema de bombeamento de fase móvel**

O frasco para armazenamento de fase móvel deve ser de vidro (borossilicato) e, às vezes, dependendo da fase móvel empregada, deve ser de teflon ou outro polímero conveniente, com capacidade de um a três litros. Sua tampa deve ter furos de passagem da tubulação da fase móvel e de um gás (hélio) – para sistemas onde não tenha desgaseificadores – empregado para remover ar e outros gases dissolvidos no solvente. A linha do solvente possui em sua extremidade, um filtro de aço inoxidável que permite reter as partículas sólidas porventura existentes, as quais poderiam atrapalhar o funcionamento das bombas e causar entupimento da coluna cromatográfica.

### *Bombas para CLAE*

Os requisitos para um sistema de bombeamento de CLAE são rigorosos e incluem: (1) a geração de pressões de até 500 atm, (2) vazão contínua sem pulsos, ou, se pulsando, com amortecedor de pulsos, (3) velocidades de fluxo variando de 0,1 a 10ml/min, (4) reprodutibilidade e constância da vazão de 1%, (5) componentes resistentes à corrosão (SKOOG, 2002).

As válvulas e pistões geralmente são de safira, cerâmica ou rubi. A tubulação é geralmente de aço inoxidável, teflon e em caso especiais de titânio.

### *Bombeamento isocrático e por gradiente*

A eluição isocrática é feita com um único solvente (ou com uma mistura de solventes de composição constante). Uma eluição por gradiente é feita quando um solvente não propicia uma eluição suficientemente rápida de todos os componentes. Neste caso, quantidades crescentes de outro solvente são adicionadas para criar um gradiente. Essa composição pode ser alterada linearmente ou por leis que seguem variações. Além do mais, pode-se fazer uso com dois, três ou mesmo, quatro solventes, tem como vantagem análises mais rápidas, melhores separações e maior simetria nos sinais, em contraste à eluição isocrática, que pode tomar muito tempo com forma de sinais nem sempre adequados. As desvantagens incluem a necessidade de regenerar a coluna antes de fazer uma nova injeção de amostra e a incompatibilidade com o detector em certos casos.

## 1. *Sistema de injeção da amostra*

A introdução da amostra pode ser realizada por meio de uma válvula de amostragem ou por meio de uma seringa de injeção. O efluente desses dispositivos preenche uma serpentina de volume conhecido e o acionamento da válvula transfere, integralmente, esse volume para a corrente de fase móvel. Os instrumentos mais utilizados são as válvulas de amostragem de pequeno volume.

## 2. *Sistema analítico (coluna cromatográfica)*

As colunas mais utilizadas são feitas de tubo de aço inoxidável de diâmetro interno controlado. A fase estacionária, ou empacotamento, é retida por filtros de aço inoxidável com poros de 2  $\mu\text{m}$  ou menos, colocados em cada extremidade. As colunas podem ser analíticas ou preparativas.

### Colunas analíticas

São destinadas a separação de pequenas quantidades de material, não existindo, na maioria dos casos, o objetivo de isolar, ou seja, são utilizadas para fins de identificação ou outros.

Os tubos das colunas são cheios com a fase estacionária conveniente, geralmente sílica ou seus derivados de granulometria 3,5,7 ou 10 micra. Como o material de enchimento é extremamente compactado dentro da coluna, a queda de pressão dentro desses tubos é enorme, fato que obriga as colunas a serem relativamente curtas e os tubos com paredes espessas, a fim de se evitar deformações internas da fase estacionária. (CIOLA, 2003).

### Colunas preparativas

Também são empregadas fases estacionárias de granulometria extremamente baixa (7 a 10 micra), porém, as colunas são projetadas com diâmetros e vazões de operação muito maiores, apresentam diâmetros de 10, 20 e até 80 cm, nesse caso são utilizadas bombas de maiores vazões.

As aplicações estão dirigidas para preparação e isolamento de compostos para fins de identificação, preparação de padrões puros, materiais de alto valor e de difícil purificação por outros métodos.

### *Pré-colunas*

Geralmente, uma pequena pré-coluna é introduzida antes da coluna analítica para aumentar sua duração por remoção, não somente de material particulado e de contaminantes dos solventes, mas também de componentes das amostras que se ligam irreversivelmente à fase estacionária. Além disso, em cromatografia líquido-líquido, a pré-coluna serve para saturar a fase móvel com a fase estacionária de modo a minimizar as perdas desse solvente. A composição da fase estacionária da pré-coluna deve ser muito próxima da fase estacionária da coluna analítica, mas o tamanho de partícula costuma ser maior para minimizar a queda de pressão. É utilizada para proteger a coluna analítica, que é mais cara. (SKOOG, 2002)

### 3. *Sistema de detecção*

O detector é o olho do sistema cromatográfico, ele mede as mudanças de concentração ou a massa dos compostos da amostra que está deixando a coluna.

É um transdutor que converte uma mudança de concentração da fase móvel eluída em um sinal, que poderá ser registrado por um processador de dados ou por um registrador conveniente. A interpretação desse registro produz dados qualitativos e quantitativos sobre a amostra e seus constituintes.

Algumas características importantes dos detectores são:

*Sensibilidade:* freqüentemente expressa como a concentração equivalente de ruído, isto é, a concentração de soluto que produz um sinal ao nível de ruído do detector. (VOGEL, 2002)

*Seletividade:* é a habilidade relativa de um detector medir um composto e não outro; um detector mais seletivo para as mesmas massas analisadas produzirá um sinal muito maior que para outro.

*Exatidão:* é a medida de quão perto está o valor verdadeiro. A maioria dos detectores baseia-se na padronização para produzir resultados precisos. Ou seja, seus resultados são comparados com outros obtidos por injeção, de um mesmo volume, de uma solução padrão, do mesmo composto, em condições iguais.

*Precisão:* é a repetibilidade da medida, um detector preciso dá a mesma repetibilidade de resposta, ou muito próxima.

Os detectores mais utilizados são: absorção no UV e no visível, fluorescência, índice de refração e eletroquímico.

### Detectores de absorvância no UV e no visível

O funcionamento dos detectores espectrofotométricos baseia-se na absorvância da luz por parte da amostra, ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética, a maioria de substâncias absorve na radiação UV, incluindo todas as substâncias que têm elétrons  $\pi$  e elétrons desemparelhados.

Existem três tipos de detectores de absorvância: o chamado fotométrico, que funciona com um ou dois comprimentos de onda fixos; o de comprimento de onda variável (espectrofotômetro), que não só é de aplicação mais variada, mas também mais caro; e aquele por arranjo de diodos, que detecta vários comprimentos de onda simultaneamente.

Espectro fotômetros de comprimento de onda variável no UV-Vis, que seleciona o comprimento de onda desejado do feixe de luz emitido pelas lâmpadas de deutério (UV) ou tungstênio (Vis), oferecem várias vantagens sobre os instrumentos de comprimento de onda fixo, dentre elas, apresentarem altas absorvâncias para vários componentes devido à escolha de comprimento de onda, maior seletividade.

### Detectores por fluorescência

A espectroscopia de fluorescência pode ser usada como um método de detecção específica e é um dos mais sensíveis da atualidade para compostos que fluorescem, como materiais farmacêuticos, produtos naturais, amostras clínicas e produtos do petróleo, e muitas vezes, o número de espécies fluorescentes pode ser aumentado por tratamento preliminar com reagentes que formam derivados que fluorescem. Esses detectores medem as mudanças da fluorescência no eluente das colunas quando este for exposto a comprimentos de onda selecionados.

As fontes de luz são as mesmas que as empregadas nos detectores de absorvância diferindo pela existência de monocromadores ou filtros de interferência para a seleção da radiação de incidência e para a seleção da radiação fluorescente que deve ser medida.

### Detectores por índice de refração

Os detectores por índice de refração medem as mudanças do índice de refração do eluente das colunas. Eles respondem a todos os compostos, porém a detecção somente é possível quando o índice de refração da fase móvel for diferente do índice de refração da substância analisada, não sendo empregados em análises por programação por gradiente, pois

o índice de refração da fase móvel varia com a composição da mistura. Portanto, é um detector universal, não seletivo, não muito sensível e por isso empregado quando os outros não respondem ao composto de interesse (CIOLA, 2003).

#### Detectores eletroquímicos

Os detectores eletroquímicos se baseiam na possibilidade de muitos compostos serem oxidados ou reduzidos quando estiverem na presença de um potencial elétrico. Eles têm as vantagens de alta seletividade, alta sensibilidade e de serem muito bons para as análises de traços. Este detector é seletivo, porque o polarógrafo normalmente fixa um potencial e passa, neste caso, a detectar somente as espécies que se oxidam (ou reduzem) em um potencial inferior ou igual ao fixado (COLLINS et al., 2006).

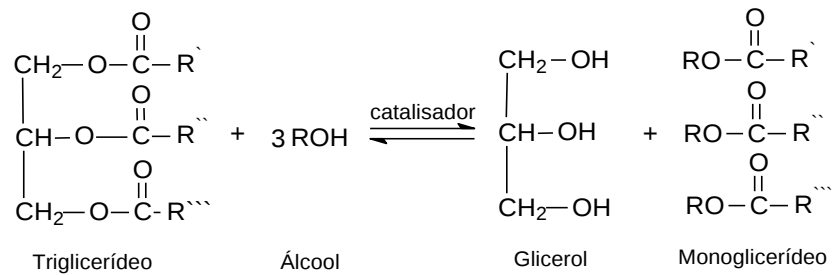
#### *4. Sistema de registro e tratamento de dados*

Para registrar ou manipular os dados obtidos pelos detectores na CLAE pode se usar simplesmente um registrador ou, de uma maneira sofisticada, um integrador ou mesmo um microcomputador. Atualmente, para manter ou aumentar a versatilidade, exatidão e precisão, o microcomputador é mais utilizado. Tanto para processar os dados obtidos pelo detector, armazenando e registrando, como para controlar a composição da fase móvel para separações com eluição isocrática ou com gradiente, a vazão que sai da bomba, injeção da amostra, temperatura da coluna, monitorando continuamente os parâmetros da separação e detectando possíveis problemas (SCKOOG et al., 2002).

### **3.3 O Biodiesel**

O biodiesel é uma mistura de ésteres de ácidos graxos, renovável e biodegradável, produzida a partir da reação de transesterificação de óleos ou gorduras de origem animal ou vegetal com um álcool de cadeia curta (etanol ou metanol). O processo de transesterificação consiste na transformação de moléculas de triglicerídeos em moléculas menores de ésteres alquílicos de ácidos graxos. A estequiometria da reação requer três (3) mols do álcool utilizado para um (1) mol do triglicerídeo, obtendo-se como produto três (3) mols de ésteres de ácidos graxos e um (1) mol de glicerina (coproduto) como mostra o Esquema 1. Esse processo é constituído por três reações consecutivas e reversíveis, nas quais os monoacilglicerídeos e diacilglicerídeos (Figura 12) constituem os produtos intermediários de acordo com Esquema 2.

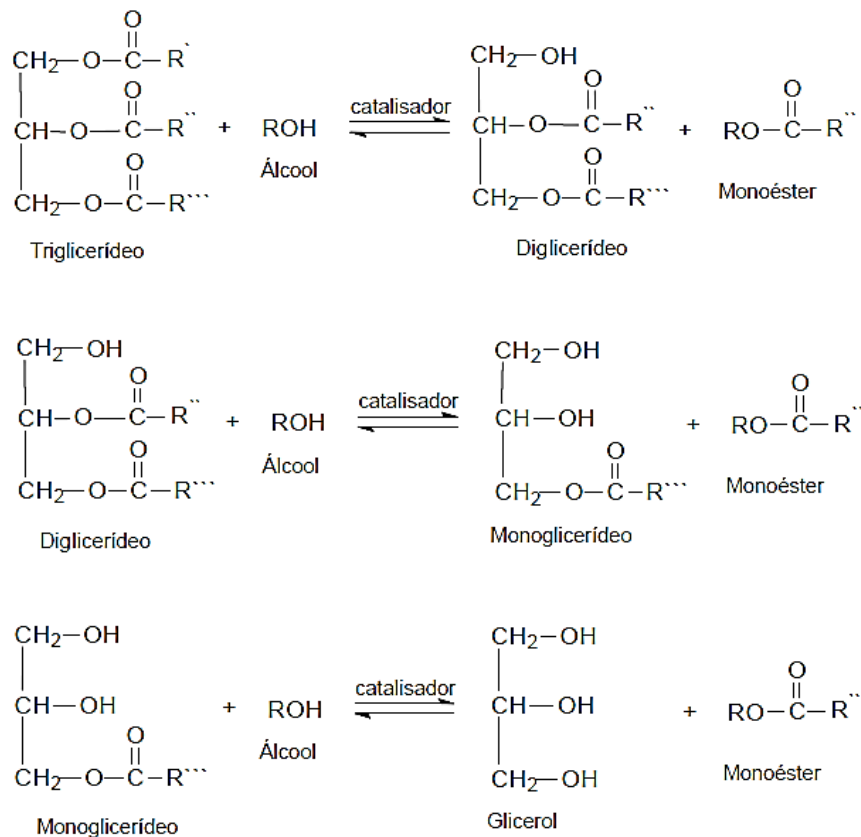
**Esquema 1 – Representação da transesterificação de triglicerídeos onde R', R'' e R''' representam as cadeias carbônicas dos ácidos graxos.**



Fonte: Schuchardt et al., 1998.

O biodiesel também pode ser obtido através dos processos de esterificação (SCHUCHARDT et al., 1998).

**Esquema 2 – Transesterificação de triglicerídeos: sequência de três reações consecutivas e reversíveis.**



Fonte: Schuchardt et al, 1998

No mundo inteiro, o uso de biodiesel como combustível tem se mostrado promissor principalmente porque, quando comparado aos combustíveis fósseis, sua utilização diminui a emissão de CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub> e de hidrocarbonetos lançados ao ambiente e, conseqüentemente, ocorre a redução qualitativa e quantitativa dos níveis de poluição ambiental. Devido a tais características o biodiesel pode ser utilizado para a substituição de combustíveis fósseis (diesel), sem haver necessidade de nenhuma mudança no motor (FAGUNDES et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

O nome biodiesel muitas vezes é confundido com a mistura diesel+biodiesel, disponível em alguns postos de combustível. A designação correta para a mistura vendida nestes postos deve ser precedida pela letra B (do inglês *Blend*). Neste caso, a mistura de 5% de biodiesel ao diesel de petróleo é chamada de B5 e assim sucessivamente, até o produto puro, denominado B100 (ANP, 2011).

### 3.3.1 Soja

Soja (*Glycine max*), originária da China e do Japão, é um grão rico em proteínas, cultivado como alimento tanto para humanos quanto para animais. A soja pertence à família *Fabaceae* (leguminosa), assim como o feijão, a lentilha e a ervilha. É empregada na alimentação, sobretudo na indústria de óleos comestíveis. A palavra soja vem do japonês *shoyu*.

O óleo de soja é o mais utilizado pela população mundial no preparo de alimentos. A soja é extensivamente usada na produção de rações animais. Outros produtos derivados da soja são: óleo, farinha, sabão, cosméticos, resinas, solventes, entre outros.

Além dos produtos citados acima, um outro que entra nessa lista é o biodiesel. A maior parte do biodiesel nacional é produzida a partir do óleo desse grão, o qual é um dos principais produtos agrícolas do Brasil.

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja atrás apenas dos EUA. Na safra 2011/2012 o país colheu 165,9 milhões de toneladas de grãos, num avanço tímido de 1,9% em relação ao recorde acumulado na safra anterior (REVISTA SAFRA, 2013).

Na história comercial mais recente, pela segurança e abundância em termos de oferta, o óleo de soja se tornou a principal matéria-prima para a produção do biodiesel. O óleo de soja representa mais de 80% da demanda total da fabricação de biodiesel no Brasil.

O Brasil é o segundo país na produção e processamento mundial de soja, sendo também o segundo maior exportador de grão, óleo e farelo de soja. Estima-se que a cadeia produtiva da soja reúna no País mais de 243 mil produtores, e um mercado de 1,4 milhões de empregos. Atualmente, 70% da produção de grão, óleo e farelo de soja são exportados (APROSOJA BRASIL, 2013).

Atualmente, existem 61 plantas autorizadas pela ANP para a produção e comercialização de biodiesel. Mesmo com esse grande leque de possibilidades, 82% da produção nacional desse biocombustível provêm do óleo de soja, uma das matérias-primas mais caras desse mercado (ANP – BOLETIM MENSAL - OUTUBRO DE 2012).

De acordo com dados da ANP, entre janeiro de 2004 e fevereiro de 2011, o preço do óleo de soja esteve em média 36% acima do valor do sebo bovino, segundo recurso mais usado na produção de biodiesel. Além disso, a soja é uma das plantas que menos rendem óleo – cerca de 400 kg por hectare –, 13 vezes menos do que o dendê, por exemplo. Mesmo assim, segundo Amélio Dall’Agnol, engenheiro agrônomo da Empresa de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) esse grão se mantém como líder no mercado por ser uma cultura amplamente conhecida, que tem uma cadeia produtiva estabelecida e uma tecnologia agrícola já bem desenvolvida.

Outro fator decisivo para a manutenção do uso da soja na produção do biodiesel é a forte demanda do mercado internacional pelo seu farelo, usado como ração para gado, frango e porco. Sendo dessa forma, não se planta soja por causa do óleo, mas por causa do farelo. O óleo fica como uma consequência que foi bem aproveitada pelos grandes produtores no Brasil, segundo Amélio Dall’Agnol. Além da soja, outras oleaginosas, tidas como as principais utilizadas para a produção de biodiesel estão mostradas na Tabela 2.

**Tabela 2- A tabela mostra a produtividade de óleo das principais espécies usadas na produção de biodiesel.**

|                      |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                    |                                                                                     |                                                                                     |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Plantas do biodiesel |  |  |  |  |  |
|                      | Soja                                                                              | Algodão                                                                           | Girassol                                                                           | Dendê                                                                               | Pinhão manso                                                                        |
| % de óleo            | 18 – 20                                                                           | 15 – 20                                                                           | 40 – 45                                                                            | 18 – 22                                                                             | 30 – 39                                                                             |

Fonte: Instituto Ciência Hoje, 2013.

O óleo de soja é composto por vários ácidos graxos, tendo como os principais o ácido linoléico, o ácido oleico e o ácido palmítico, ácido linolênico e ácido esteárico, como mostra a Tabela 3 (INSTITUTO CIÊNCIA HOJE, 2013.).

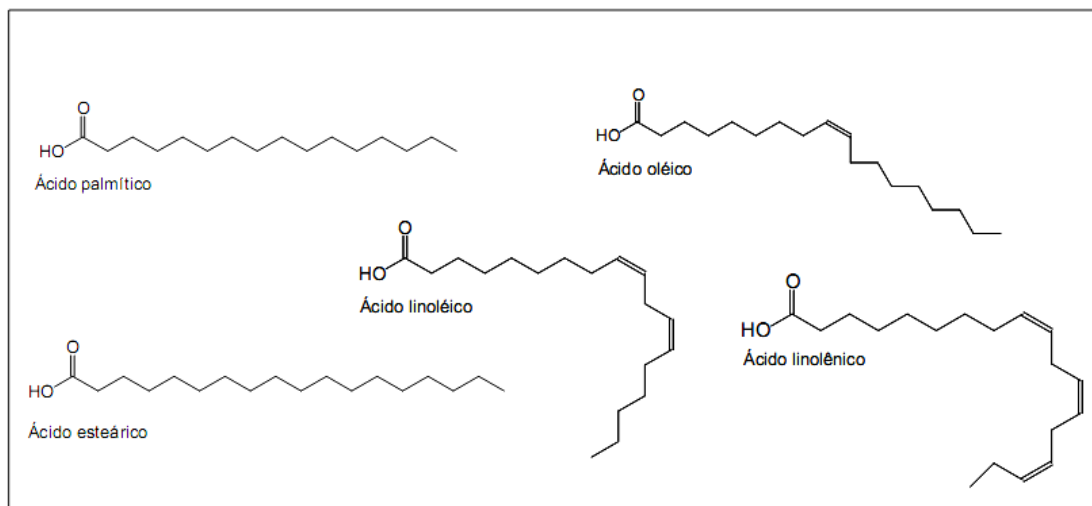
**Tabela 3 - Tabela de composição dos ácidos graxos do óleo de soja.**

| Representação  | Nome IUPAC                                  | Nome trivial | Composição (%) |
|----------------|---------------------------------------------|--------------|----------------|
| C12:0          | Ácido dodecanoico                           | Láurico      | 0,1 (máximo)   |
| C14:0          | Ácido tetradecanoico                        | Mirístico    | 0,2 (máximo)   |
| C16:0          | Ácido hexadecanoico                         | Palmítico    | 9,9 - 12,2     |
| C16: 1(9)      | Ácido delta-9-cis-hexadecénico              | Palmitoléico | Traços - 0,2   |
| C18:0          | Ácido octodecanoico                         | Esteárico    | 3 - 5,4        |
| C18:1(9)       | Ácido (9Z)-9-octadecenoico                  | Oleico       | 17,7 – 26      |
| C18:2(9,12)    | Ácido <i>cis,cis</i> -9,12-octadecadienoico | Linoléico    | 49,7 - 56,9    |
| C18:3(9,12,15) | Ácido 9,12,15-octadecatrienoico             | Linolênico   | 5,5 - 9,5      |
| C20:0          | Ácido Eicosanoico                           | Araquídico   | 0,2 - 0,5      |
| C20:1          | Ácido eicosenoico                           | Gadolêico    | 0,1 - 0,3      |
| C22:0          | Ácido Docosanoico                           | Behênico     | 0,3 - 0,7      |
| C22:1          | Ácido <i>cis</i> -13- Docosenoico           | Erúcico      | 0,3            |
| C24:0          | Ácido Tetradocosanoico                      | Lignocérico  | 0,4            |

Fonte: Moretto e Fett, 1998.

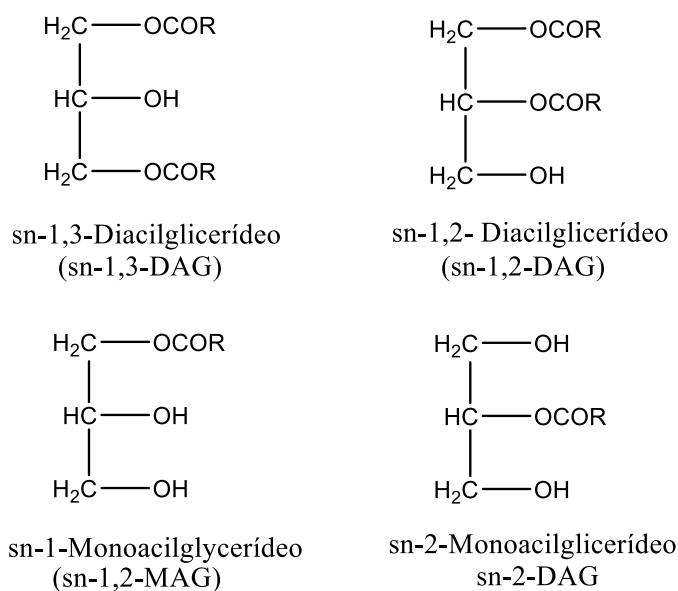
Na Figura 11 estão as estruturas químicas dos principais ácidos graxos que compõem o óleo de soja.

**Figura 11 – Representação estrutural dos cinco ácidos graxos majoritários presentes na composição do óleo de soja.**



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 12 – Representação das moléculas dos compostos intermediários, MAG e DAG, formados em uma reação de transesterificação de conversão parcial.**



Fonte: Autora, 2013.

### 3.4 Emprego das Técnicas de RMN $^1\text{H}$ e CLAE para Determinação de Rendimento de Ésteres Alquílicos de Ácidos Graxos (FAAEs) Formados por Transesterificação

#### Ressonância Magnética Nuclear de $^1\text{H}$

Vários métodos analíticos têm sido propostos para determinar a conversão de óleo vegetal em biodiesel. Cada método tem vantagens e desvantagens, por isso a escolha do mais apropriado depende das necessidades e meios do usuário. A qualidade da análise, custo e duração, incluindo um possível pré-tratamento, são aspectos muito importantes que devem ser levados em conta para fazer a seleção adequada.

Atualmente o método indicado pela ANP para determinação de contaminações como glicerol livre, glicerol total, mono, di e tri glicerídeos é o ASTM 6584, que tem como fundamento a Cromatografia Gasosa (CG) (PELISSON et al, 2012).

Nos últimos anos, a literatura tem apresentado muitos trabalhos envolvendo o uso de diferentes técnicas analíticas utilizadas a fim de monitorar e determinar contaminações em biodiesel. Dentre estas técnicas está a RMN  $^1\text{H}$ , a qual vem se destacando por ser uma técnica rápida e não necessitar de nenhum pré-tratamento das amostras (KNOTHE, 2000).

A espectroscopia de RMN é um método primário de análise e pode ser utilizado para a quantificação de diversos produtos. Para isso, é importante que a substância seja inerte e com baixa volatilidade, já que durante o tempo de aquisição a concentração da substância pode ser afetada. Um único espectro de RMN de próton fornece a proporcionalidade direta entre a área do pico e o número de núcleos responsáveis por este pico. Como resultado, uma determinação quantitativa de um composto específico não requer amostras puras para calibração (SCKOOG et al. 2009). Essa é uma grande vantagem da RMN em relação a outros métodos utilizados para análise quantitativa, já que métodos como cromatografia gasosa e infravermelho, por exemplo, necessitam de um fator de resposta como a absorvidade molar para fazer a quantificação.

O método utilizado para realizar a quantificação por RMN  $^1\text{H}$  é a integração do (s) sinal (is) referente (s) à parte que se deseja quantificar. Na integração do sinal deve-se levar em conta a intensidade do sinal, que é diretamente proporcional ao número de núcleos que absorvem naquela determinada frequência e também a concentração molar.

O sinal a ser utilizado para a quantificação deve ser separado de outros picos. Por conta disso, o solvente utilizado não pode ter sinais de ressonância na região espectral de interesse. Pois, sinais sobrepostos dificultam a integração e acarreta erros no valor da área do referido sinal. Outro fator que interfere na quantificação são os sinais satélites, causados, principalmente, pela inhomogeneidade do campo magnético em torno da amostra e pela falta de rotação do tubo da amostra. Estes podem aparecer sobrepostos ou bem próximos ao (s) sinal (is) que será (ão) integrado (s), acarretando erros no método. (BRUKER, 2010).

Vale lembrar, que apesar do grande número de aplicações úteis da RMN, o uso intensivo dessa técnica para fins quantitativos tem sido inibido devido ao alto custo dos instrumentos. Além disso, não são todos os tipos de substâncias que podem ser quantificadas pela técnica, pois a probabilidade da sobreposição dos picos de ressonância aumenta com a complexidade da amostra. Deve-se considerar, também, que a espectroscopia de RMN com frequência não é suficientemente sensível ou conveniente para competir com outras técnicas (KNOTHE, 2000; SCKOOG et al. 2009).

#### Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas mais poderosas para a quantificação de substância, a qual vem sendo bastante utilizada tanto para a qualificação como para a quantificação dos produtos oriundos de uma reação de transesterificação. Como já mencionado anteriormente, atualmente a cromatografia gasosa é a técnica mais utilizada para a determinação de rendimentos em biodiesel e teor de mono-, di- e triglicerídeo (EN 14105 e ASTM D6584). Mas trabalhos já realizados mostraram que, em comparação entre as técnicas de cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência, não há diferenças significativas entre os resultados obtidos (CARVALHO, 2012).

Além dos métodos citados, mais de dez métodos cromatográficos foram propostos e utilizados para análise de biodiesel desde a década de 90. Tais métodos e técnicas foram comparados, quanto ao uso de derivatizantes, tempo necessário para cada análise, entre outros (LÔBO e FERREIRA, 2009).

Dentre os métodos cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência é tida como uma boa alternativa por apresentar vantagens, tais como: menor tempo de análise, não necessitar de derivatizantes e quantificação de alquilésteres, ácidos graxos livres,

triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos, permitindo, assim, o seu uso no monitoramento de reações de transesterificação (LÔBO e FERREIRA, 2009).

## 4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 4.1 Materiais

As amostras foram sintetizadas no Laboratório do Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCAR) do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL (IQB – UFAL).

As reações de transesterificação metílica e etílica do óleo de soja foram catalisadas por dibutil dilaurato de estanho, comercializado como DBTDL  $[(C_4H_9)_2Sn(C_{12}H_{23}O_2)_2]$  – onde a relação molar álcool: óleo: catalisador foi de 400:100:1 (SILVA, 2012). Os reagentes foram mantidos num sistema fechado, equipado com monômetro, controlador de temperatura, agitador mecânico e válvula para a retirada de alíquotas (Figura 13). As reações ocorreram a temperaturas variáveis, de 80 °C a 150 °C, a depender do rendimento a ser obtido e o tempo variou de 5 minutos a 7 horas.

As amostras foram lavadas cinco vezes com água destilada e a separação das fases se fez por centrifugação. Após o processo de lavagem transferiu-se para frascos de vidro âmbar e em seguida foi adicionado o agente dessecante (sulfato de magnésio). Todas as amostras foram estocadas em freezer.

**Tabela 4 - Condição reacional para as amostras selecionadas para o estudo de quantificação.**

| Condição Reacional –<br>tempo / T (° C) | Amostra | Condição Reacional -<br>tempo / T (° C) | Amostra |
|-----------------------------------------|---------|-----------------------------------------|---------|
| 30 minutos; 120 °C                      | 1E      | 10 minutos; 120 °C                      | 1M      |
| 60 minutos; 120 °C                      | 2E      | 15 minutos; 120 °C                      | 2M      |
| 90 minutos; 120 °C                      | 3E      | 20 minutos; 120 °C                      | 3M      |
| 105 minutos; 120 °C                     | 4E      | 25 minutos; 120 °C                      | 4M      |
| 120 minutos; 120 °C                     | 5E      | 40 minutos; 80 °C                       | 5M      |
| 135 minutos; 120 °C                     | 6E      | 30 minutos; 120 °C                      | 6M      |
| 30 minutos; 160 °C                      | 7E      | 40 minutos; 120 °C                      | 7M      |
| 45 minutos; 120 °C                      | 8E      | 45 minutos; 160 °C                      | 8M      |
| 60 minutos; 120 °C                      | 9E      | 60 minutos; 160 °C                      | 9M      |
| 180 minutos; 80 °C                      | 10E     | 80 minutos; 160 °C                      | 10M     |
| 195 minutos; 80 °C                      | 11E     | 110 minutos; 160 °C                     | 11M     |
| 210 minutos; 80 °C                      | 12E     | 120 minutos; 160 °C                     | 12M     |
| 225 minutos; 80 °C                      | 13E     | 180 minutos; 160 °C                     | 13M     |
| 250 minutos; 120 °C                     | 14E     | 210 minutos; 160 °C                     | 14M     |
| 80 minutos; 160 °C                      | 15E     | 270 minutos; 160 °C                     | 15M     |
| 100 minutos; 160 °C                     | 16E     |                                         | -       |
| 3600 minutos; 80 °C                     | 17E     | -                                       | -       |
| 3660 minutos; 80 °C                     | 18E     | -                                       | -       |

Fonte: Autora, 2013.

Para a realização do presente estudo, foram selecionadas 33 amostras de biodiesel etílico e metílico.

**Figura 13 – Reator utilizado para a realização das reações de transesterificação.**



Fonte: Autora, 2013.

Para a execução dos trabalhos experimentais todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau de pureza analítica (P.A.) e não foram submetidos a qualquer tratamento adicional (Tabela 5).

**Tabela 5 – Tabela de reagentes e solventes utilizados.**

| Reagente                      | Pureza   | Fornecedor                                   |
|-------------------------------|----------|----------------------------------------------|
| Metanol                       | > 99,5%  | Dinâmica                                     |
| Etanol                        | > 99,5%  | Dinâmica                                     |
| Óleo de soja                  | Refinado | Bunge Alimentos                              |
| Dibutil dilaureato de estanho | 95,0%    | Aldrich                                      |
| Sulfato de magnésio anidro    | 98,0%    | Vetec                                        |
| Propan-2-ol                   | 99,5%    | -                                            |
| Clorofórmio deuterado         | 99,8%    | -                                            |
| Hexano                        | 99,0%    | CIL – ( Cambridge Isotope Laboratories, Inc. |

Fonte: Autora, 2013.

#### 4.1.1 Metodologia Analítica

Para a determinação do rendimento (%) em biodiesel metílico e etílico (FAMEs e FAEEs, respectivamente), foi realizada a caracterização dos ésteres empregando-se as técnicas de RMN  $^1\text{H}$  e CLAE.

Além disso, utilizando a CLAE determinou-se o teor de monoacilglicerídeos (MAGs) e ácidos graxos livres (AGLs), diacilglicerídeo (DAG) e triacilglicerídeo (TAG) presentes nas amostras. A presença dos mesmos foi confirmada por RMN  $^1\text{H}$ , a fim de verificar a aplicabilidade dessa técnica comparativamente a uma metodologia mais tradicional para essa avaliação, como é o caso da CLAE.

#### 4.1.2 Determinação do Rendimento em Biodiesel por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os produtos obtidos a partir da reação de transesterificação do óleo de soja foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em um instrumento CTO-2A (Shimadzu), equipado com um detector ultravioleta (UV 205nm).

As análises foram realizadas no Laboratório de Materiais e Biocombustíveis no Instituto de Química da Universidade de Brasília. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 VP-ODS (gel de sílica Octadecil Silano) modelo Shim-Pack (250 mm x 4,6 mm, 5 mm) mantida a 40 ° C. Cerca de 25  $\mu\text{L}$  da amostra foi dissolvido em 2 mL de 2-propanol-hexano (PrHex) 5:4 (v / v). O volume de amostra injetado foi de 10  $\mu\text{L}$  a uma taxa de fluxo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ , utilizando um gradiente de eluição de metanol e solução 2-propanol-hexano 5:4 (v / v) (PrHex): 100% de metanol em 0 min, 50% de metanol e 50% de PrHex em 10 min, mantida com eluição isocrática de PrHex durante 10 minutos. O teor de ésteres foi calculado pela comparação da soma das áreas dos sinais do cromatograma obtido. Os cromatogramas foram gerados pelo LabSolutions software (Shimadzu) (CARVALHO et al. 2012).

##### 4.1.2.1 Determinação do Rendimento em Biodiesel por Ressonância Magnética Nuclear

Cálculo para a determinação do teor de ésteres metílicos

Os experimentos de RMN  $^1\text{H}$  foram executados em equipamento Bruker 400 MHz Ultra Shield, à temperatura ambiente (22 °C). Cada uma das amostras foi preparada a partir de 0,4 mL de clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e 25 mg de biodiesel. Foram acumuladas 16

repetições para cada decaimento induzido livre (FID). Os espectros foram processados através do TopSpin 2.1 software (Bruker).

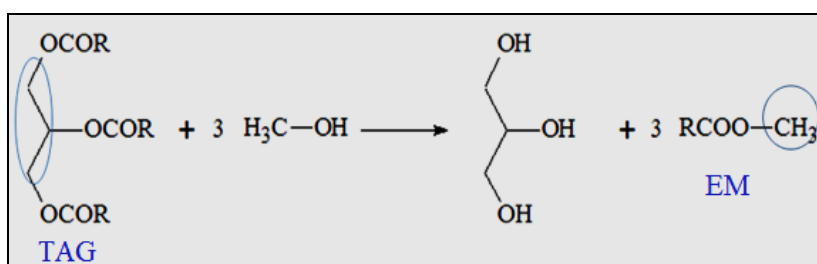
A taxa de conversão do triacilglicerídeo do óleo de soja (TAG) em ésteres metílicos (EM) foi avaliada por RMN  $H^1$  através da integração dos sinais da região do espectro entre 4 – 4,3 ppm, correspondente aos prótons metilênicos e metínicos da porção glicerídica do óleo de partida e da área referente aos grupos metoxila em 3,7 ppm, como mostra a Equação (5):

$$\% C_{EM} = 100 \cdot \left( \frac{5 \cdot I_{EM}}{5 \cdot I_{EM} + 9 \cdot I_{TAG}} \right) \quad (5)$$

em que,  $\%C_{EM}$  = rendimento em ésteres metílicos,  $I_{EM}$  e  $I_{TAG}$  correspondem, respectivamente, às integrações das áreas dos grupos metoxila no éster e a integração da porção glicerídica do óleo (dos metilênicos e metínicos) do óleo vegetal. Os coeficientes 5 e 9 estão relacionados com o número de prótons dos grupos  $CH_2$  e  $CH$  presentes no TAG e com as metilas ( $3 \times CH_3$ ) do éster formado como mostrado no esquema 3 (KNOTHE, 2000).

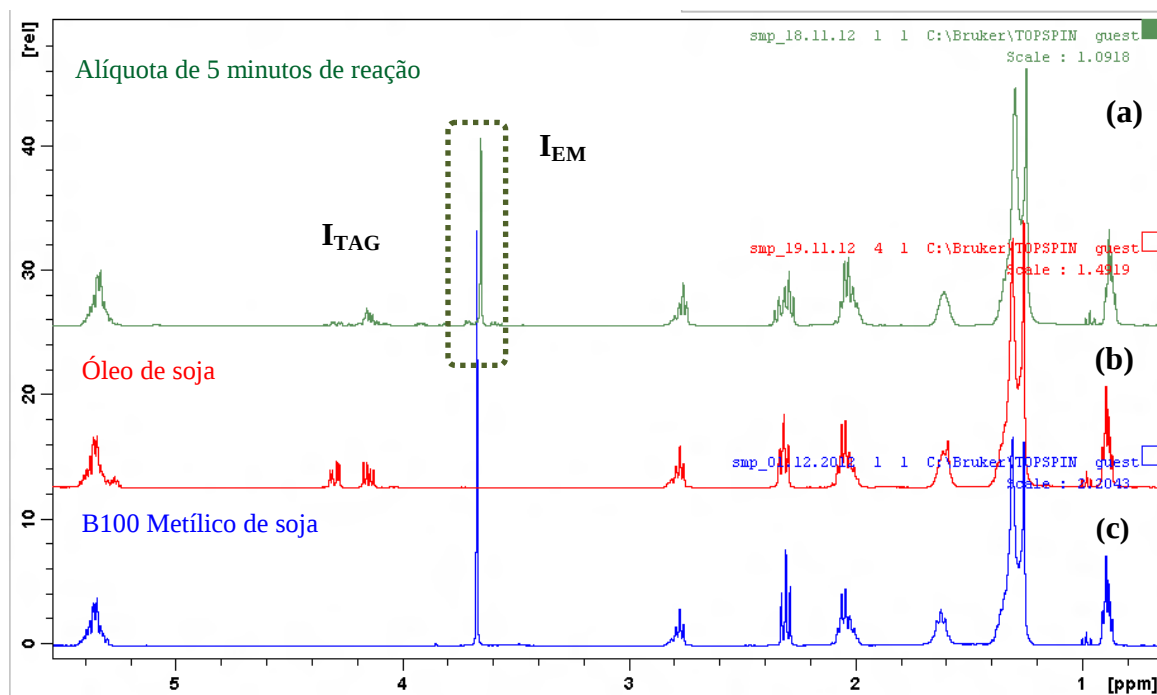
Na Figura 14 estão sobrepostos os espectros de: a) uma amostra de cinco minutos de reação de transesterificação; b) óleo de soja c) éster metílico de soja. Nos quais estão localizados os termos utilizados na Equação 5.

**Esquema 3 - Reação de transesterificação de triglicerídeos, onde R representa a cadeia carbônica dos ácidos graxos.**



Fonte: Schuchardt et al., 1998.

Figura 14 – Espectro de RMN  $H^1$  de (a) alíquota de 5 minutos de reação. (b) amostra de óleo de soja puro e (c) biodiesel padrão metílico de soja, em  $CDCl_3$ .



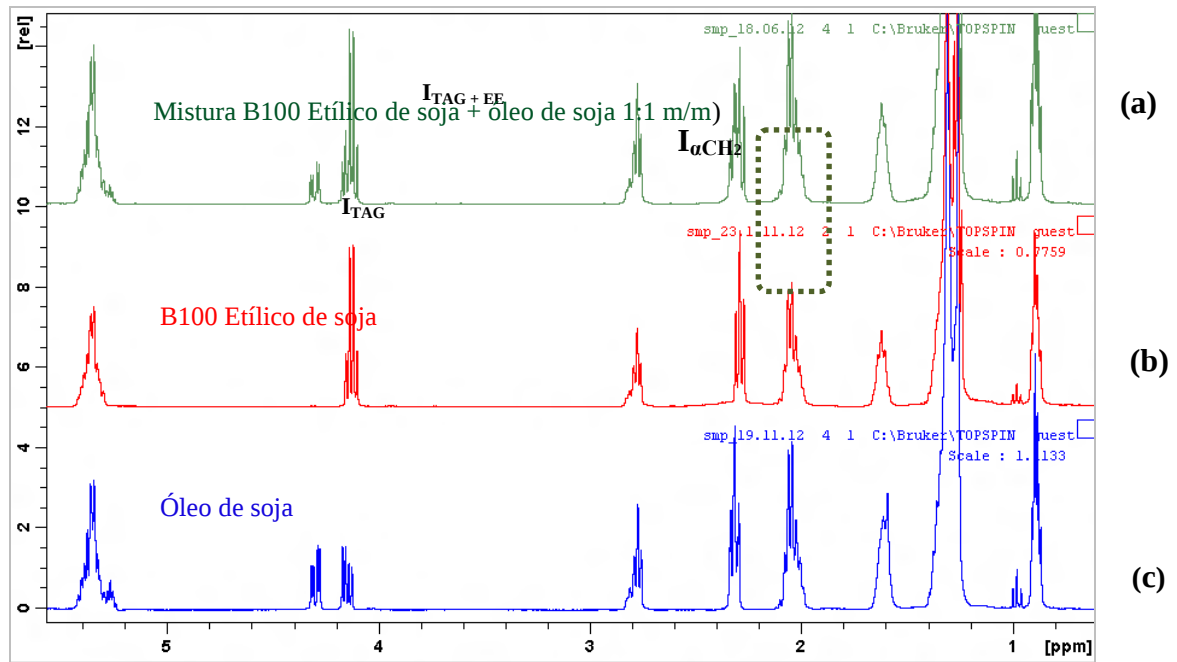
Fonte: Autora, 2013.

#### *Cálculo para a determinação do teor de ésteres etílicos*

Para o cálculo da conversão do TAG de soja em ésteres etílicos ( $C_{EE}$ ), utilizou-se a Equação 6 a qual tem base na determinação das áreas (integração) de três grupos de sinais:  $I_{TAG+EE}$  representa a área do sinal do quarteto no espectro de  $H^1$  RMN entre 4,05 – 4,25 ppm associado com os dois hidrogênios do grupo  $-O-\underline{CH}_2-CH_3$  presentes apenas nos ésteres etílicos produzidos e no triglicerídeo que não reagiu;  $I_{TAG}$  representa a área relativa aos duplos dupletos entre 4,25 – 4,4 ppm associados aos hidrogênios de  $-\underline{CH}_2$  da porção glicerídica presente no óleo;  $I_{\alpha CH_2}$  representa a área relativa aos sinal do tripleto no espectro de RMN  $H^1$  entre 2,40 – 2,25 ppm associada a dois hidrogênios do grupo  $R-\underline{CH}_2-CO$  (alfa à carbonila) presente em MAG, DAG e TAG tanto do óleo vegetal como do éster como mostrado na Figura 15 (GHESTI,2007).

$$\%C_{EE} = 100 \left( \frac{(I_{TAG+EE} - I_{TAG})}{I_{\alpha CH_2}} \right) \quad (6)$$

Figura 15 - Espectro de RMN  $H^1$  de (a) mistura de B100 etílico de soja com óleo de soja; (b) biodiesel padrão etílico de soja (B100) e (c) óleo de soja puro, em  $CDCl_3$ .



Fonte: Autora, 2013.

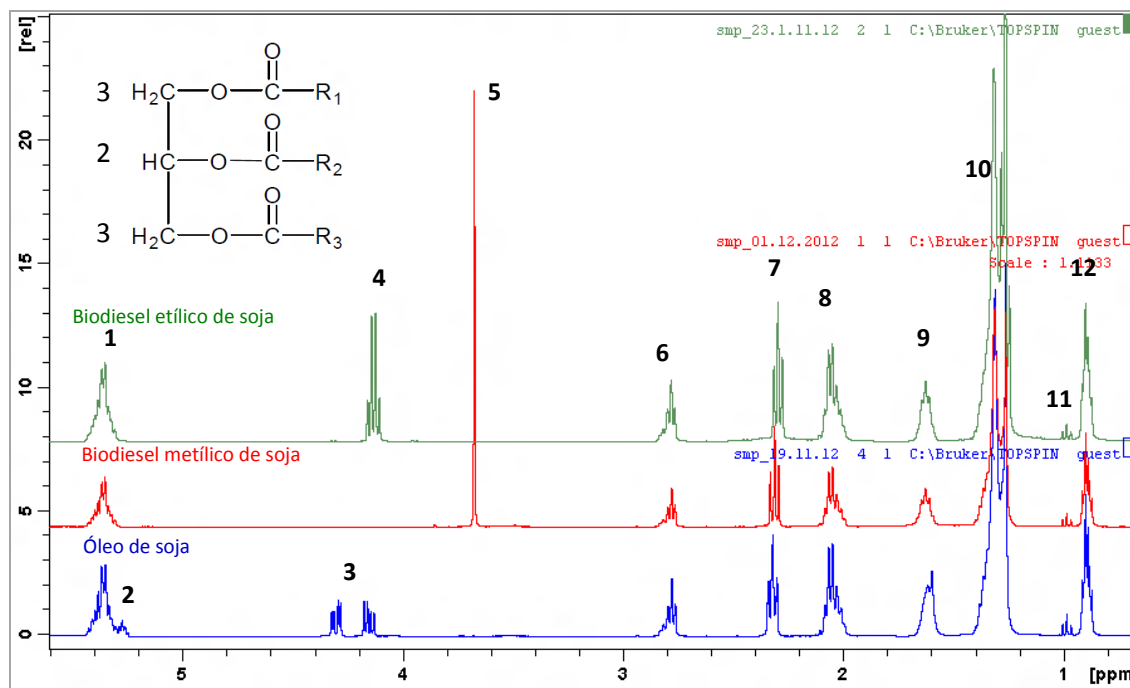
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente tópico serão apresentados os dados obtidos em termos de rendimentos em ésteres metílicos (FAMES %) e etílicos (FAEES %) obtidos a partir do óleo de soja, seguido da discussão envolvendo os espectros de RMN e cromatogramas obtidos a fim de realizar o monitoramento reacional. Para tanto, a atribuição aos sinais dos compostos presentes nas amostras será efetuada, bem como a quantificação dos mesmos. E por fim será apresentada a comparação dos resultados obtidos através das técnicas RMN  $H^1$  e CLAE.

### 5.1 Atribuição dos sinais de RMN $H^1$ nos espectros do óleo, biodiesel metílico e etílico de soja.

Ao compararmos os espectros de RMN  $H^1$  do óleo de soja com os espectros dos ésteres etílico e metílico de soja, descritos na Figura 16, é possível observar que a única diferença entre eles está nos sinais 2, 3, 4 e 5. No espectro do óleo existem dois sinais típicos de triglicerídeo, os sinais 2 e 3.

**Figura 16 – Espectros de RMN  $H^1$  do A) óleo de soja refinado, B) biodiesel metílico de soja e C) biodiesel etílico de soja, em  $CDCl_3$ .**



Fonte: Autor, 2013.

Ao comparar os espectros do óleo de soja e do biodiesel na Figura 16, após uma metanólise e/ou etanólise de conversão total, os sinais 2 e 3 do óleo deixam de existir dando lugar ao sinal 5 para ésteres metílicos e sinal 4 para ésteres etílicos. A presença desses sinais indica a formação de monoésteres (KNOTHE et al. 2000; GELBARD et. al 1995; SACCHI 1996; GIN et al. 2006; ANDRADE et. al 2012; GHESTI et al, 2007; MORGENSTERN et al, 2006).

Na Tabela 6 estão descritos os deslocamentos e atribuições para cada um dos sinais nos espectros da Figura 16.

**Tabela 6 – Deslocamentos químicos ( $\delta$ /ppm) dos sinais de RMN nos espectros dos ésteres metílicos de soja, ésteres etílicos de soja e óleo de soja, seguindo a numeração dos sinais na Figura 16.**

| Deslocamentos químicos dos sinais de RMN $H^1$ |                |                                 |                                                                 |
|------------------------------------------------|----------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Sinal                                          | $\delta$ (ppm) | H                               | Atribuição                                                      |
| 1                                              | 5,35           | $\underline{CH=CH}$             | Todos os olefínicos                                             |
| 2                                              | 5,27           | $-\underline{CH}$               | H $\beta$ da porção glicerídica                                 |
| 3                                              | 4,1-1,35       | $-\underline{CH_2}$             | Hs $\alpha$ da porção glicerídica                               |
| 4                                              | 4,1            | $CH_3-\underline{CH_2}-OCOR$    | Ésteres etílicos                                                |
| 5                                              | 3,6            | $\underline{CH_3}-OCO-R$        | Ésteres metílicos                                               |
| 6                                              | 2,78           | $CH=CH-\underline{CH_2}CH=CH$   | Linoleico                                                       |
| 7                                              | 2,29           | $CH_2-COOR$                     | Todos alfa à carbonila                                          |
| 8                                              | 2,05           | $-\underline{CH_2}-CH=CH-$      | Todos os Hs alílicos                                            |
| 9                                              | 1,62           | $\underline{CH_2}-CH_2-COOR$    | Todos os Hs beta à carbonila                                    |
| 10                                             | 1,28           | $-(\underline{CH_2})_n-$        | Todos os $CH_2$ no meio de cadeia                               |
| 11                                             | 0,98           | $-\underline{CH=CH-CH_2-CH_3}$  | Hs do $CH_3$ terminal a 2 ligações da dupla ligação (linoleico) |
| 12                                             | 0,9            | $-\underline{CH_2CH_2CH_2CH_3}$ | Todos os Hs dos $CH_3$ terminais exceto o 11 (oleico)           |

Fonte: Knothe et al. 2000; Gelbard et. al 1995; Sacchi 1996; Gin et al. 2006; Andrade et. al 2012; Ghesti et al, 2007; Morgenstern et al, 2006

## 5.2 Atribuição dos sinais de RMN $H^1$ para monoacilglicerídeo (sn-MAG) e diacilglicerídeo (sn-DAG)

Através da técnica de RMN  $H^1$ , GIN et. al (2006) fez atribuições aos sinais do espectro do óleo de colza. Neste mesmo trabalho, ele também fez um estudo dos intermediários formados na reação de transesterificação deste óleo, porém não foi possível para GIN determinar/detectar os sinais de todos os intermediários formados em uma reação de transesterificação. Assim como para todo triglicerídeo, ele mostrou que os hidrogênios dos grupos acil ( $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ ) ressoam entre 0,8 e 2,9 ppm, já os hidrogênios 1, 2 e 3 (alfa, beta, alfa) que estão ligados aos carbonos do glicerol, aparecem entre 4,0 -5,2 ppm e os hidrogênios olefínicos entre 5,3 -5,5 ppm (Figura 16; conforme a Tabela 6 – Tópico 5.1).

Durante o processo reacional, quando um ou dois grupos acil são desligados de TAGs, são formados sn-DAG ou sn-MAGs como produtos de transesterificação e, através da análise do espectro de RMN  $H^1$  é possível identificar a presença de sn-1,2-DAG, sn-1,3-DAG, sn-1(3)-MAG e sn-2-MAG apenas pelos hidrogênio das posições 1, 2 e 3 dos resíduos de glicerol.

A presença de sn-1-MAG, sn- 2-MAG, sn-1,2 DAG, sn-1,3-DAG e TAG na amostra em estudo, foi confirmada através dos sinais do H-2 (hidrogênio alfa). Para tanto foi observado a presença de cinco multipletos com deslocamentos em 3,9; 4,9; 5,07; 4,06 e 5,25 ppm respectivamente atribuídos a cada um dos compostos mencionados.

Inicialmente foi feito a identificação dos hidrogênios 2 (beta) de sn-2-MAG e sn-1,2-DAG. Para isso tomou-se como base o deslocamento químico do H-2 do TAG que apresenta um multipeto em 5,25 ppm. Em seguida identificou-se os sinais do H-2 do sn-1,2-DAG e sn-2-MAG com deslocamentos químicos a 5,07 ppm e 4,9 ppm respectivamente, confirmado com dados da literatura (GIN 2006; SACCHI 1996; KARMEE 2005; SERDAREVICH 1966; MANNINA,2002). Esses valores de deslocamentos são justificados por conta da perda de um grupo acil da molécula de TAG de um dos carbonos alfa (C-1 ou C-3) originando assim uma molécula de sn-1,2-DAG; e pela perda de dois grupos acil dos dois carbonos alfa (C-1 e C-3) e originando uma molécula de sn-2-MAG. Como na posição 2 (Carbono beta) das moléculas de TAG, sn-1,2-DAG e sn-2-DAG existe um grupo acil ligado, e cada um deles possui um grupo acil a menos que o outro, logo os deslocamentos químicos do H-2 de cada um deles

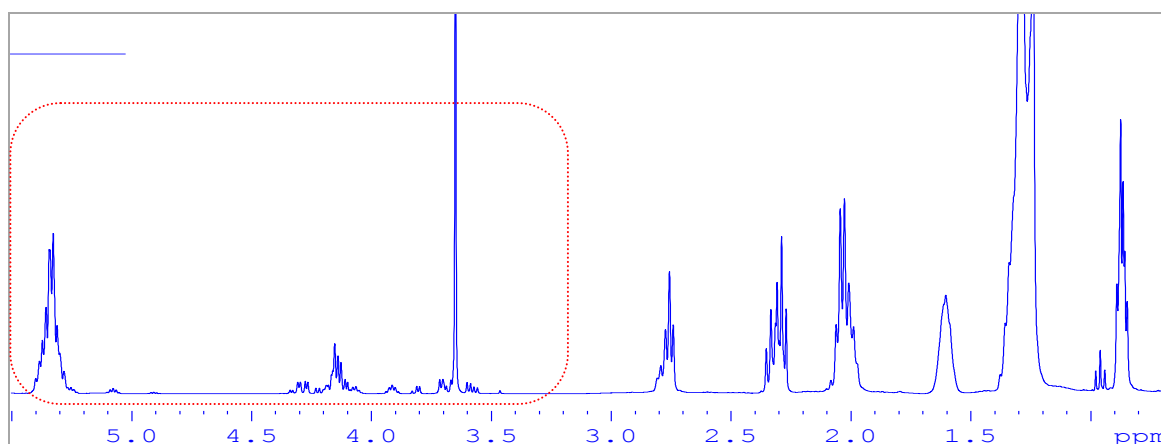
serão ligeiramente diferentes devido a uma diferença gradual de densidade eletrônica sobre os H-2 dos mesmos devido a perda de grupo acil.

Para sn-1-MAG e sn-1,3-DAG, que não possuem grupo acil ligado C-2, os sinais dos seus prótons H-2 terão deslocamentos em campo mais alto em relação aos sinais dos prótons H-2 dos demais compostos. Logo H-2 de sn-1-MAG e sn-1,3-DAG apresentarão os seus sinais em 3,9 e 4,06 ppm respectivamente, como cita a literatura (GIN 2006; SACCHI 1996; KARMEE 2005; GUILLÉN 2001; COMPTON, 2007).

A atribuição aos sinais dos prótons H-1 e H-3 para estes compostos foi feita com base nos deslocamentos químicos dos sinais de TAG (4,1-4,35 ppm) como mostrado no espectro do óleo de soja (tópico 5.1 - Figura 16). Logo os prótons H-1 e H-3 de sn-2-MAG, sn-1,2-DAG e sn-1,3-DAG e H1 do sn-1-MAG ressoam entre 4,1 - 4,4 ppm. E o H-3 do sn-1-MAG encontra-se na região de 3,55-3,75 ppm como descrito por KNOTHE 2006 e HATZAKIS 2011. Não foi encontrado nenhum dado na literatura sobre a existência do sinal em 3,8 ppm. Os valores de deslocamento químico atribuídos aos prótons em estudo encontram-se na Tabela 6.

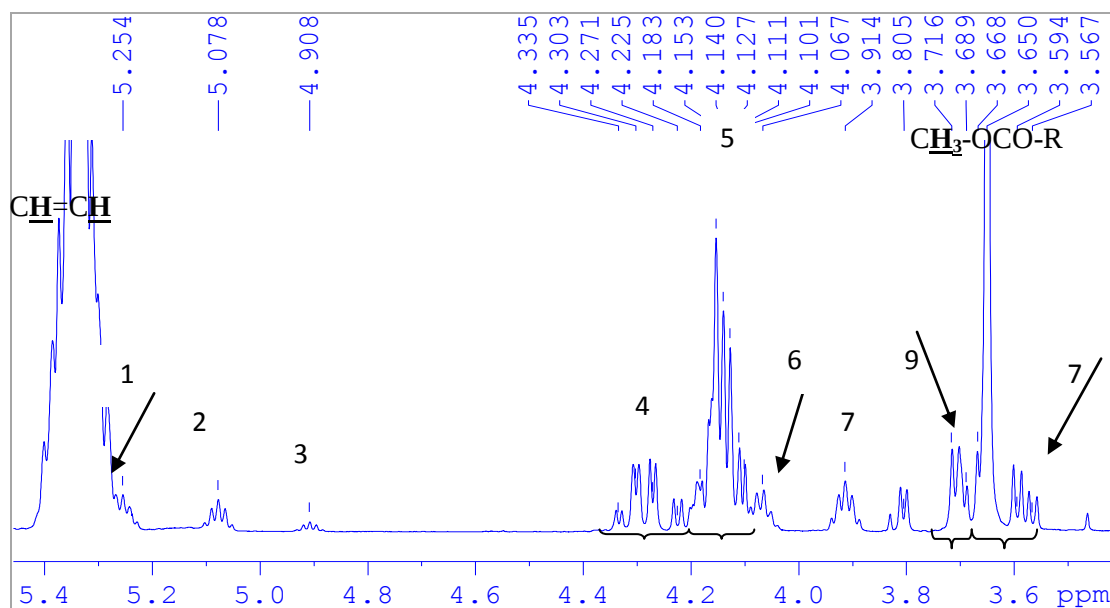
Todas estas atribuições foram feitas através de um espectro de uma transesterificação com tempo reacional de cinco minutos (Figura 17), especificamente da região entre 3,5 – 5,5 ppm (Figura 18).

**Figura 17 – Espectro de RMN  $H^1$  de uma reação de transesterificação do óleo de soja (tempo reacional de 5 minutos).**



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 18 – Expansão (Figura 17) da região de 3,5 – 5,3 ppm no espectro de RMN  $H^1$ , que mostra a presença dos sinais dos intermediários reacionais, após 5 minutos de metanólise do óleo de soja a 120 °C.**



Fonte: Autora, 2013.

**Tabela 7 - Deslocamentos químicos dos sinais nos espectros do óleo de soja, biodiesel metílico de soja e biodiesel etílico de soja, conforme Figura 18.**

| Sinal | $\delta$ (ppm) | Próton (H)                                         | Atribuição                          |
|-------|----------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 1     | 5,25           | $\text{CHOCO-R}$                                   | H-2 doTAG                           |
| 2     | 5,07           | $\text{CHOCO-R}$                                   | H-2 do sn-1,2-DAG                   |
| 3     | 4,9            | $\text{CHOCO-R}$                                   | H-2 de sn-2-MAG                     |
| 4     | 4,22-4,33      | $\text{CH}_2\text{OCO-R}$                          | H-1 e H-3 do TAG                    |
| 5     | 4,22-4,05      | $\text{CH}_2\text{OCOR}$<br>$\text{CH}_2\text{OH}$ | H-1e H-3 de sn-1,3-DAG<br>sn-2-MAG; |
| 6     | 4,06           | $\text{CHOH}$                                      | H-2 de sn-1,3-DAG                   |
| 7     | 3,91           | $\text{CHOH}$                                      | H-2 de sn-1-MAG                     |
| 8     | 3,80           | -                                                  | Não identificado                    |
| 9     | 3,75-3,5       | $\text{CH}_2\text{OCOR}$                           | H-3 de sn-1-MAG; sn-1,2-DAG         |

Fonte: Gin 2006; Sacchi 1996; Karmee 2005; Guillén 2001; Compton, 2007.

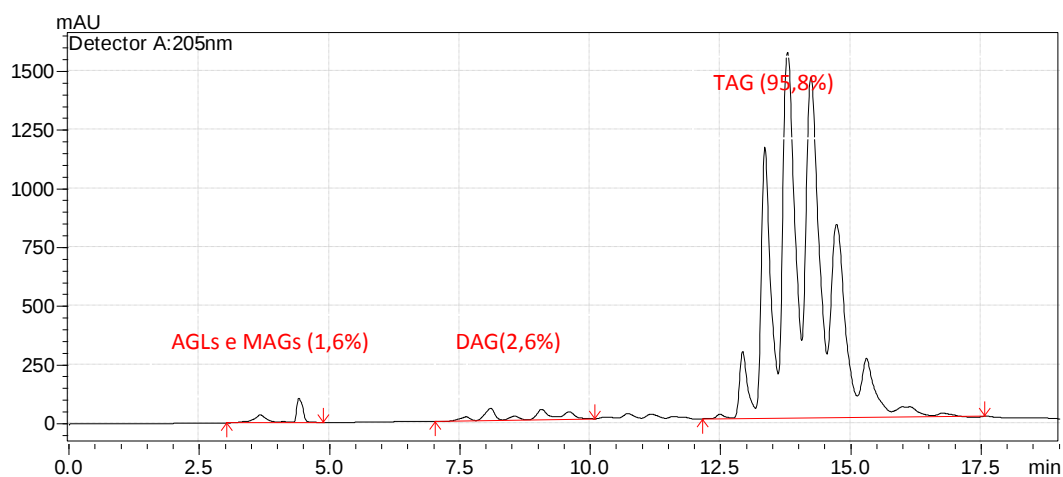
### 5.3 Determinação do teor dos Ésteres Metílicos, Ésteres Etílicos, Monoacilglicerídeos, Diacilglicerídeos e Triacilglicerídeos por CLAE.

Inicialmente os produtos obtidos da transesterificação metílica e etílica do óleo de soja foram submetidos à caracterização utilizando a técnica de CLAE a fim de se obter os valores de conversão do TAG em FAMES e FAEEs, MAGs, DAGs e também determinar o teor de TAG que não reagiu.

Em todos os cromatogramas obtidos por CLAE, tanto para os ésteres metílicos (EM), quanto para ésteres etílicos (EE), bem como para o óleo de soja, observa-se a presença de sinais de tempo de retenção atribuídos aos ácidos graxos livres (AGLs) e MAGs (2,5 a 5 min.), EM ou EE (5 – 8 min.) DAGs (8 – 11 min.) e TAG (12 – 17 min.), conforme indicações da literatura (CARVALHO et al, 2012).

No presente trabalho serão apresentados cromatogramas obtidos para o óleo de soja (Figura 19) e para duas amostras com rendimentos de 87% em EM e 38,7% em EE (Figuras 27 e 28, respectivamente). Os demais cromatogramas estão apresentados no APENDICE A.

**Figura 19 – Cromatograma obtido por análise de CLAE do óleo de soja.**



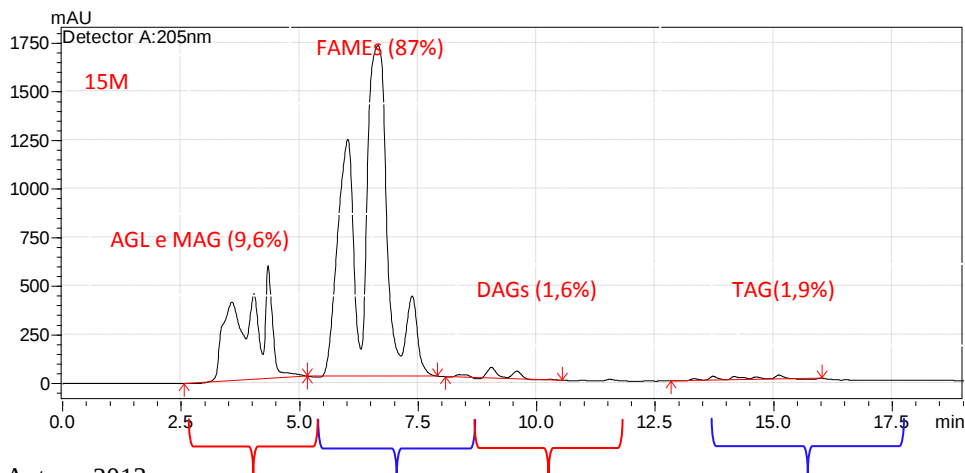
Fonte: Autora, 2013.

No cromatograma do óleo de soja (Figura 19) é possível observar a existência de AGLs, MAGs, FAMES, DAGs e TAGs, porém, alta concentração de TAGs, como já se esperava. Já nos cromatogramas das duas amostras (Figuras 20 e 21,) tanto para a que possui alto teor de FAMES como para a que possui baixo teor, é possível observar a presença dos

intermediários reacionais (MAGs e DAGs), AGLs e TAG, porém em concentrações diferentes.

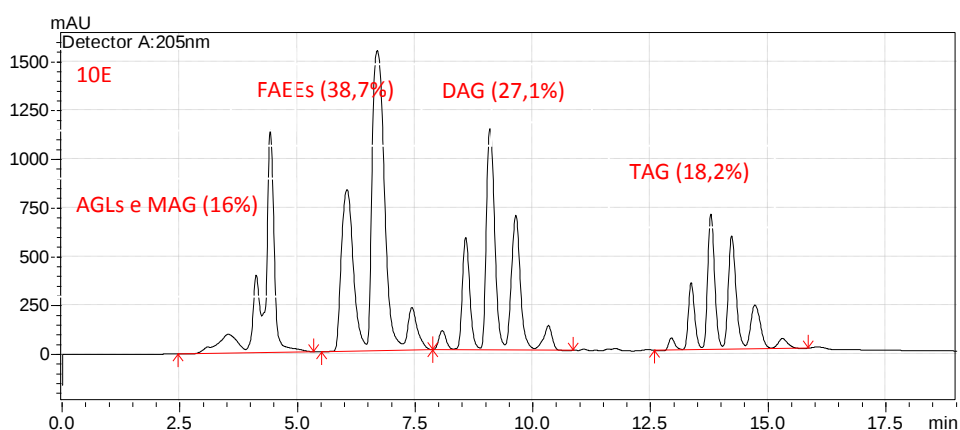
Na Figura 20 observa-se a formação de 87% de FAMEs através do sinal com tempo de retenção de 5 a 7 minutos.

**Figura 20 – Análise por CLAE de uma amostra obtida da metanólise do óleo de soja (4 horas de reação a 160 °C).**



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 21 – Análise por CLAE de uma etanólise do óleo de soja (40 minutos de reação a 160 °C).**



Fonte: Autora, 2013.

Os resultados para os ésteres metílicos e etílicos, obtidos por CLAE, para cada amostra estão mostrados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

**Tabela 8 – Resultado das análises de CLAE para os Ésteres Metílicos obtidos a partir da transesterificação do óleo de soja refinado (M = Metílico).**

| Ésteres Metílicos do óleo de soja – CLAE |                 |          |         |           |
|------------------------------------------|-----------------|----------|---------|-----------|
| Código da Amostra                        | AGLs e MAGs (%) | DAGs (%) | TAGs(%) | FAMEs (%) |
| 1M                                       | 1,8             | 16,9     | 72,8    | 8,6       |
| 2M                                       | 2,7             | 23,9     | 59,3    | 14,1      |
| 3M                                       | 4,0             | 27,8     | 49,9    | 18,3      |
| 4M                                       | 4,9             | 29,0     | 45,4    | 20,7      |
| 5M                                       | 7,9             | 28,8     | 39,1    | 24        |
| 6M                                       | 7,1             | 30,9     | 37,8    | 24,3      |
| 7M                                       | 7,8             | 31,0     | 35,0    | 26,2      |
| 8M                                       | 20,4            | 24,4     | 12,1    | 43,1      |
| 9M                                       | 19,2            | 23,2     | 9,7     | 48        |
| 10M                                      | 21,0            | 17,9     | 4,6     | 57        |
| 11M                                      | 29,7            | 6,6      | 0,64    | 63        |
| 12M                                      | 20,3            | 13       | 1,8     | 64,8      |
| 13M                                      | 23,0            | 6,2      | 0,02    | 71        |
| 14M                                      | 19,2            | 4,1      | 0,02    | 76,6      |
| 15M                                      | 9,6             | 1,6      | 1,9     | 87        |

Fonte: Autora, 2013.

**Tabela 9 – Resultado das análises de CLAE para os Ésteres Etílicos obtidos a partir da transesterificação do óleo de soja (E = Etílico).**

| Ésteres Etílicos do óleo de soja – CLAE |                 |         |          |           |
|-----------------------------------------|-----------------|---------|----------|-----------|
| Código da Amostra                       | AGLs e MAGs (%) | DAGs(%) | TAGs (%) | FAEEs (%) |
| Óleo de soja                            | 1,6             | 2,6     | 95,8     | 0,0       |
| 1E                                      | 4,6             | 20,4    | 62,2     | 12,9      |
| 2E                                      | 5,7             | 24,7    | 52,4     | 17,2      |
| 3E                                      | 8,3             | 26,9    | 40,6     | 24,1      |
| 4E                                      | 9               | 27,9    | 38,5     | 24,8      |
| 5E                                      | 11,7            | 28,2    | 30,1     | 29,9      |
| 6E                                      | 12,1            | 27,9    | 29,4     | 30,5      |
| 7E                                      | 15,1            | 27      | 23,1     | 34,7      |
| 8E                                      | 14,6            | 27,7    | 22,6     | 35,1      |
| 9E                                      | 16,4            | 26,7    | 18,9     | 38        |
| 10E                                     | 16,             | 27,1    | 18,2     | 38,7      |
| 11E                                     | 16,5            | 26,8    | 16       | 40,7      |
| 12E                                     | 20              | 22,8    | 10,7     | 46,4      |
| 13E                                     | 20,9            | 18      | 4,8      | 56,3      |
| 14E                                     | 22,1            | 15,3    | 2,9      | 59,6      |
| 15E                                     | 23              | 12,8    | 2,4      | 61,8      |
| 16E                                     | 22              | 11,8    | 2,1      | 64,       |
| 17E                                     | 22,7            | 10,5    | 1,4      | 65,4      |
| 18E                                     | 22              | 1,4     | 0,9      | 75,6      |

Fonte: Autora, 2013

#### 5.4 Determinação do teor de ésteres metílicos por RMN $^1\text{H}$

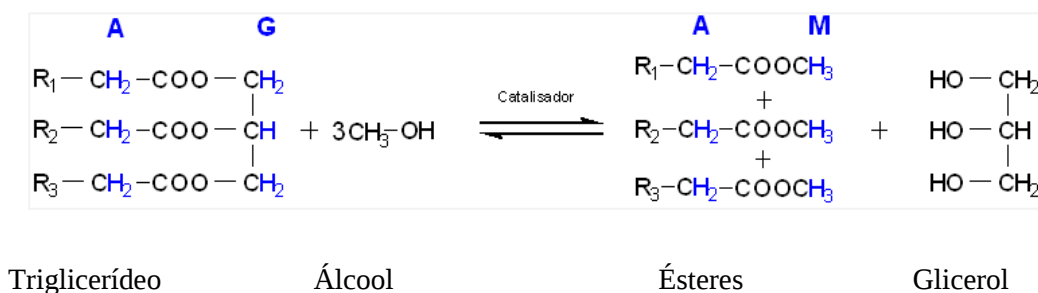
Como mencionado na metodologia, as amostras de biodiesel foram submetidas a experimentos de RMN  $^1\text{H}$  a fim de se obter o teor de ésteres através desta técnica.

As amostras estudadas foram previamente quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência e tiveram seu rendimento em FAMES e FAEEs determinado por RMN  $^1\text{H}$  de acordo com a Equação 5 (tópico 4.1.2.1). Cabe salientar que para o biodiesel metílico e etílico obtido a partir do óleo de soja existem na literatura diversos trabalhos que utilizaram a técnica de RMN  $^1\text{H}$  para avaliação quantitativa e qualitativa da reação de transesterificação (GELBARD et. al 1995; KNOTHE et al. 2000; COSTA NETO et al. 2004; GHESTI, 2007; ROSSET et al, 2011; ANDRADE et. al 2012).

Foi com base nestes trabalhos que se realizou a quantificação do biodiesel metílico e etílico do óleo de soja.

No Esquema 4 as letras **A**, **G** e **M** representam os hidrogênios alfa à carbonila ( $\alpha\text{-CH}_2$ ), os hidrogênios glicerídicos ( $\text{CH}_2\text{OCO}$ ) e os hidrogênios dos ésteres metílicos ( $\text{CH}_3\text{-R}$ ), respectivamente, conforme foi especificado na Tabela 6 (Tópico 5.1).

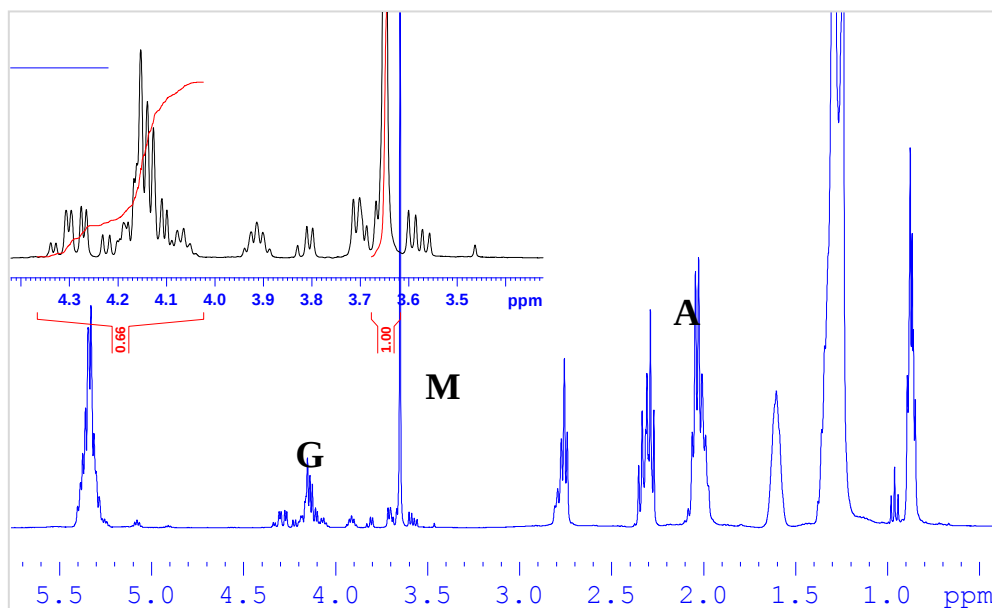
**Esquema 4 – Transesterificação metílica com destaque dos hidrogênios utilizados para o cálculo do teor de ésteres metílicos.**



Fonte: Knothe, 2000.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 22) é possível verificar o deslocamento e a multiplicidade desses sinais: **A** - multiplete entre 2,20 e 2,40 ppm; **G** - multiplete entre 4,00 e 4,50 ppm e **M** - singlete a  $\approx 3,60$  ppm (KNOTHE, 2000).

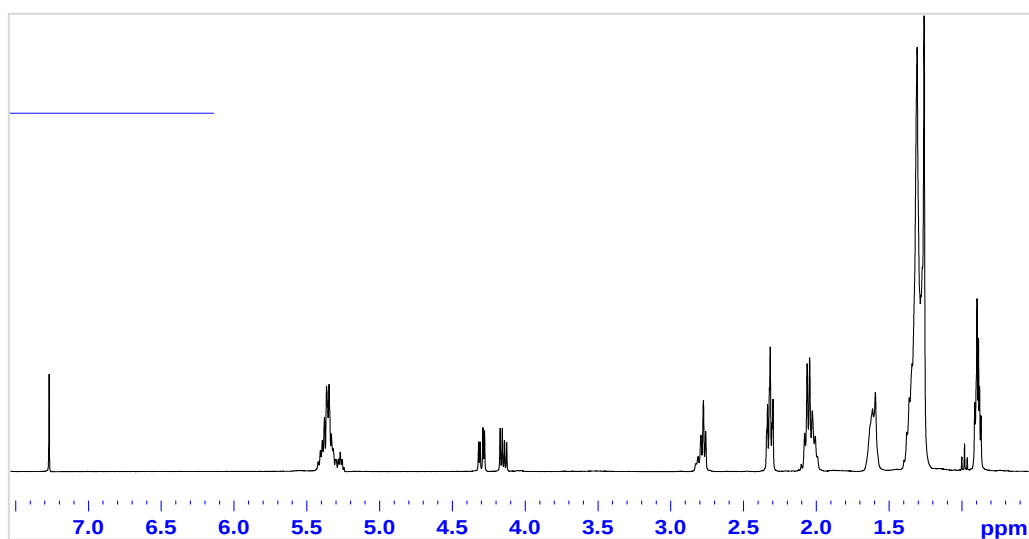
**Figura 22 - Espectro de RMN  $H^1$  de uma reação de transesterificação metílica do óleo de soja em andamento (cinco minutos).**



Fonte: Autora, 2013.

A partir da análise do espectro acima (Figura 22), pode-se observar que a diminuição do sinal entre 4,00 e 4,50 ppm, presente no óleo (multipeto “G” da Figura 22), pode indicar quanto do triglicerídeo foi transformado em monoésteres, através do surgimento do singlete “M”, com deslocamento químico de  $\approx 3,60$  ppm, que é o sinal indicativo da formação de monoésteres (biodiesel).

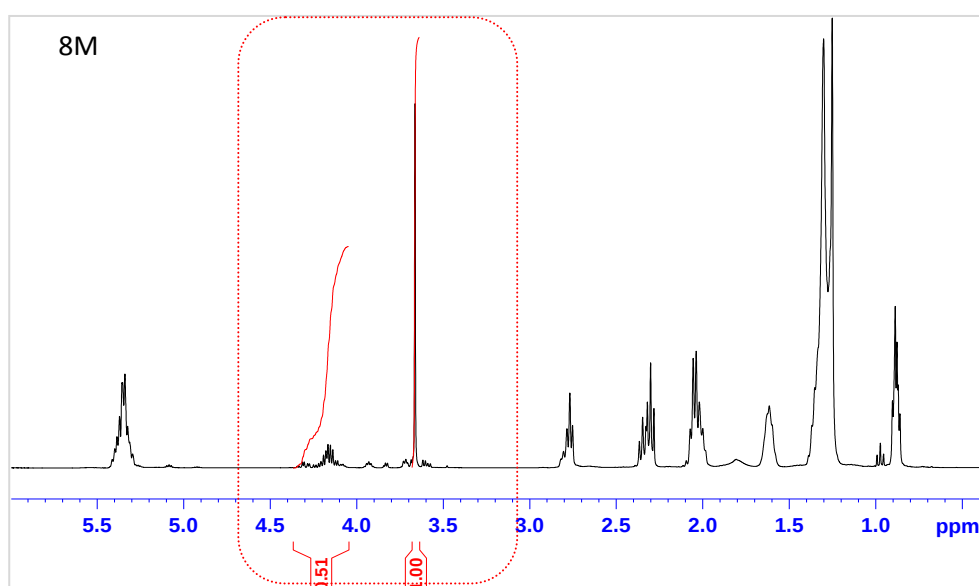
**Figura 23 – Espectro de RMN  $H^1$  do óleo de soja obtido em  $CDCl_3$ .**



Fonte: Autora, 2013.

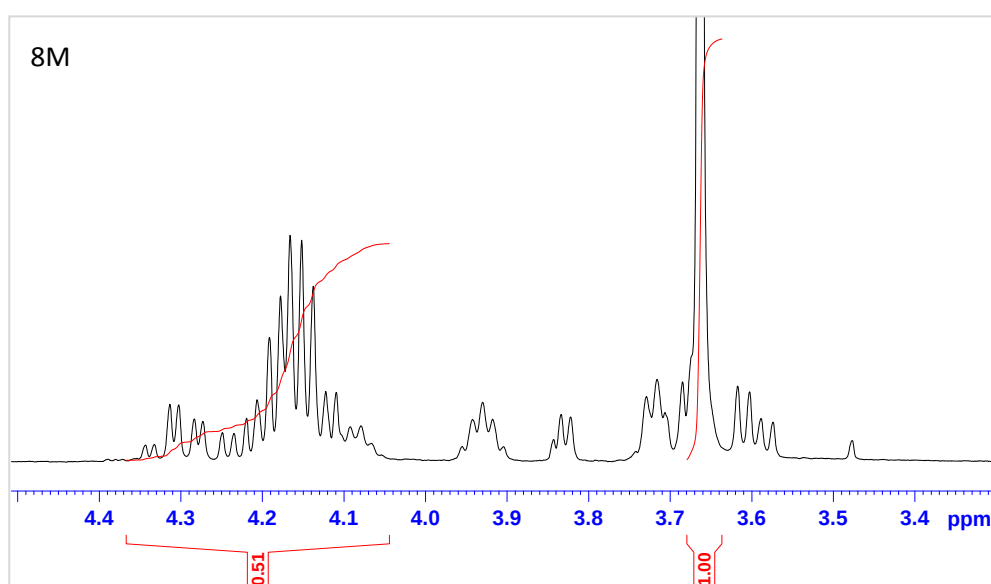
No presente estudo, avaliamos os espectros do óleo de soja e das amostras de biodiesel obtido a partir desse óleo. Nas Figuras 23 e 24, estão apresentados, respectivamente, os espectros de RMN  $^1\text{H}$  do óleo e de uma das amostras obtidas experimentalmente, a título de exemplo. A Figura 25 mostra a região em que os sinais são integrados.

**Figura 24 – Espectro de RMN  $\text{H}^1$  de uma amostra de ésteres metílicos de soja obtido em  $\text{CDCl}_3$ .**



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 25 – Ampliação da região 3,4 -4,4 ppm do espectro de RMN  $\text{H}^1$  da Figura 24. Mostra a formação de intermediários reacionais.**



Fonte: Autora, 2013.

Ao analisarmos o espectro de RMN  $H^1$  da amostra **8M** é possível observar que há uma sobreposição dos sinais referente aos ésteres metílicos ( $CH_3-OCO-R$ ) com o multipeto pertencente a subprodutos reacionais, cujos deslocamentos químicos estão descritos na tabela 6 (tópico 5.2). Essa sobreposição causa um alargamento da base do sinal atribuído aos ésteres metílicos e, conseqüentemente aumentando a área desse sinal. Em virtude dessa sobreposição, haverá um erro no valor da integração do referido sinal (GIN 2006; SACCHI 1996; KARMEE 2005; GUILLÉN 2001; COMPTON, 2007).

Na Tabela 10 estão apresentados os rendimentos (% FAMEs) obtidos com o emprego técnica de RMN  $H^1$  através da Equação 5 para as diversas reações de transesterificação.

**Tabela 10 - Teor de ésteres metílicos obtidos por RMN  $H^1$  através da Equação 5 e pela técnica de CLAE.**

| TEOR DE ESTER METÍLICO OBTIDO POR RMN $H^1$ |           | TEOR DE ESTER METÍLICO OBTIDO POR CLAE |
|---------------------------------------------|-----------|----------------------------------------|
| Código da Amostra                           | FAMEs (%) | FAMEs (%)                              |
| 1M                                          | 6,4       | 8,6                                    |
| 2M                                          | 12,7      | 14,1                                   |
| 3M                                          | 17,5      | 18,3                                   |
| 4M                                          | 20,7      | 20,7                                   |
| 5M                                          | 25,3      | 24,2                                   |
| 6M                                          | 25,1      | 24,3                                   |
| 7M                                          | 27,3      | 26,2                                   |
| 8M                                          | 52,0      | 43,1                                   |
| 9M                                          | 54,0      | 48,0                                   |
| 10M                                         | 66,0      | 56,6                                   |
| 11M                                         | 75,0      | 63,1                                   |
| 12M                                         | 78,5      | 64,8                                   |
| 13M                                         | 77,5      | 71,0                                   |
| 14M                                         | 91,0      | 76,6                                   |
| 15M                                         | 92,0      | 87,0                                   |

Fonte: Autora, 2013.

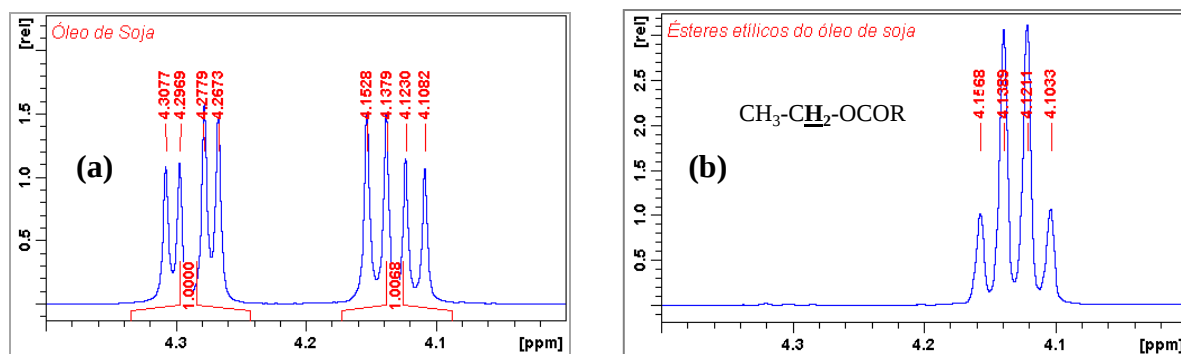
Ao comparar os resultados obtidos, para o teor de ésteres metílicos, a partir das duas técnicas (Tabela 10) é possível observar que a diferença entre uma técnica e outra pode chegar a 15%. Além disso, a maioria dos valores obtidos por RMN  $H^1$  são maiores do que os obtidos por CLAE, e isso se deve ao fato de o sinal a  $\sim 3,66$  ppm estar sobreposto a sinais de MAG e DAG, como já mencionado.

## 5.5 Determinação do teor de ésteres etílicos por RMN $H^1$

Em estudos recentes COSTA NETO e seus colaboradores (2004) utilizam a técnica de RMN  $H^1$  para quantificar o teor de ésteres etílicos de misturas conhecidas de óleo de soja com ésteres etílicos de soja (B100). Nesse caso a determinação do teor de éster etílico através da técnica de RMN  $H^1$  é mais complexa do que a quantificação para o éster metílico devido à sobreposição dos sinais referentes aos hidrogênios beta da porção glicerídica do óleo de soja e o sinal atribuído ao grupo  $CH_3-\underline{CH}_2-OCOR$  do éster etílico (4,10 – 4,15 ppm; biodiesel) (ver figura 16 e Tabela 6).

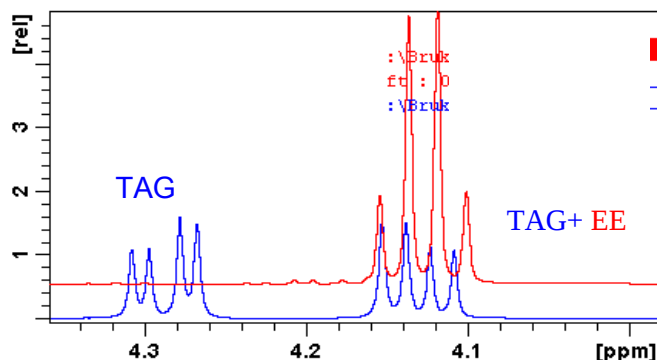
Como COSTA NETO utilizou a técnica de RMN  $H^1$  para quantificar amostras de concentrações conhecidas, ou seja, mistura de B100 etílico de soja mais óleo de soja, então ele considera que as áreas dos dois sinais (duplos dupletos) atribuídos aos hidrogênios beta da porção glicerídica entre 4,10 – 4,30 ppm são iguais. Como mostrado na Figura 26 estes sinais de fato possuem áreas equivalentes e isso é confirmado pelo valor da integração de cada um deles, o qual tem proporção de 1:1 ou 2:2 que refere-se ao números de hidrogênios atribuídos a cada um dos dois grupos de sinais. Então, ao se preparar uma mistura de óleo de soja puro mais B100 puro, o sinal que diferencia B100 de triglicerídeo no espectro de RMN  $H^1$  (quarteto entre 4,10 – 4,15 ppm) se sobrepõe a um dos duplo dupletos (4,10 -4-15 ppm) característicos do triglicerídeo como mostrado na Figura 27.

**Figura 26 - Região do espectro de RMN  $H^1$  (a) do óleo de soja que mostra os sinais dos hidrogênios beta da porção glicerídica. (b) do biodiesel etílico de soja (B100) que mostra o sinal dos hidrogênios do grupo  $CH_3-\underline{CH}_2-OCOR$ .**



Fonte: Autora, 2013.

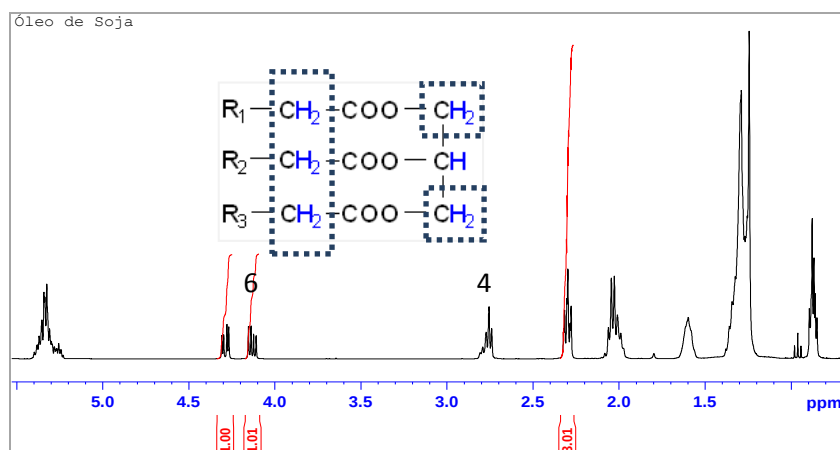
**Figura 27 – Região dos espectros de RMN  $H^1$  onde acontece a sobreposição dos sinais em uma mistura de B100 etílico de soja com óleo de soja.**



Fonte: Autora, 2013.

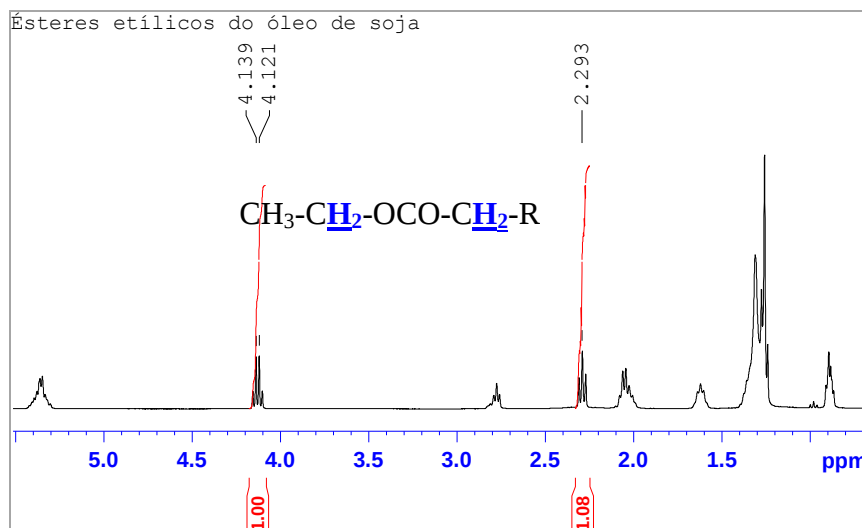
O valor da área obtido para os ésteres etílicos ( $I_{EE}$ ) será relacionado com a área do sinal dos hidrogênios beta à carbonila ( $CH_3-\underline{CH}_2-OCOR$ ) através da Equação 6 (página 56). Assim, quando a conversão dos triglicerídeos em ésteres etílicos de soja é total, a área do sinal referente aos hidrogênios pertencentes apenas aos ésteres etílicos ( $CH_3-\underline{CH}_2-OCOR$ ) será igual à área do sinal pertencente aos hidrogênios alfa à carbonila, já que cada um destes sinais pertence à mesma quantidade de hidrogênios (dois hidrogênios), como mostrado na Figura 27. Já a relação de proporção do sinal dos Hs alfa à carbonila com o sinal dos Hs dos dois  $CH_2$  da porção glicerídica é diferente. Como mostrado na Figura 28 temos uma relação de 2:3 ou 4:6 que, na verdade, são os quatro Hs dos dois  $CH_2$  da porção glicerídica, para 6 Hs alfa à carbonila.

**Figura 28 – Espectro de RMN  $H^1$  do óleo de soja que mostra a relação do sinal dos hidrogênios dos dois  $CH_2$  da porção glicerídica (dois duplos dupletos) com o sinal (triplete) dos hidrogênios alfa à carbonila ( $R-\underline{CH}_2-COO-CH_2-CH_3$ ).**



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 29** – Espectro de RMN  $H^1$  de uma amostra de ésteres etílicos obtidos a partir da transesterificação do óleo de soja que mostra a relação dos hidrogênios dos grupos  $R-COO-\underline{CH_2}-CH_3$  (quarteto em 4,12 ppm) e  $R-\underline{CH_2}-COO-CH_2-CH_3$  (triplete em 2,29 ppm) quando a conversão é total.



Fonte: Autora, 2013.

Como já mencionado, um dos objetivos desse trabalho foi quantificar o teor (em %) dos ésteres etílicos de amostras provenientes do monitoramento de reações de transesterificação etílica do óleo de soja utilizando-se a técnica de RMN  $H^1$ , e não de misturas previamente preparadas e de concentrações conhecidas. Como as amostras são provenientes de uma reação em andamento, haverá então a presença dos intermediários reacionais MAG, DAG e TAG que não reagiu.

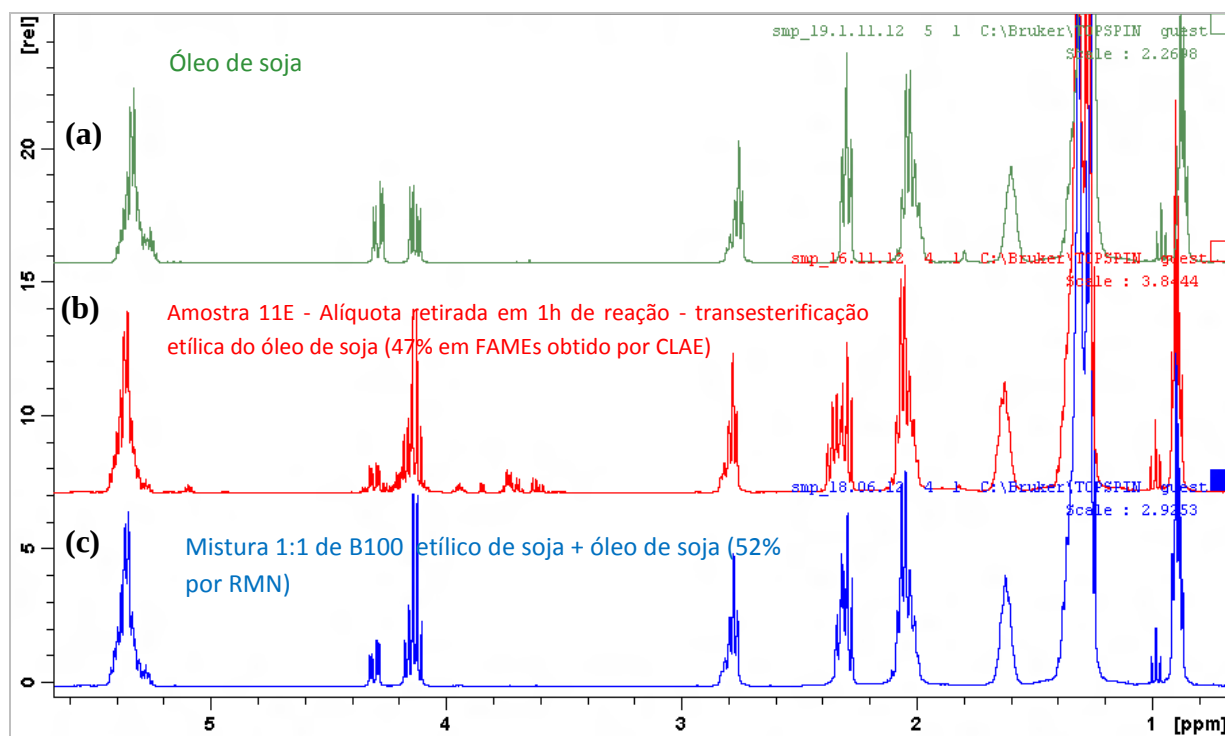
Através dos espectros de RMN  $H^1$  das amostras, foi possível confirmar a existência dos intermediários reacionais, assim como foi detectado por CLAE. No espectro de RMN  $H^1$  da amostra 11E (Figura 30b), na região entre 3,5 -4,0 ppm existem pequenos sinais, os quais são atribuídos aos hidrogênios da porção glicerídica de MAG e DAG. Já na região entre 4,0 e 4,4 ppm estão os sinais dos hidrogênios da porção glicerídica do TAG (Figura 30a). Esses sinais, que antes eram dois duplos dupletos, passarão a ter uma forma continuamente assimétrica à medida em que a reação acontece, como mostrado na Figura 32. Outro sinal que tem a sua forma alterada é o triplete atribuído aos hidrogênios alfa à carbonila. O fato de existir outros compostos na mistura reacional com o mesmo tipo de hidrogênio, no espectro de RMN acaba gerando uma sobreposição parcial dos sinais dos hidrogênios alfa à carbonila (2,2 -2,4 ppm) do TAG, MAG, DAG e FAEEs. Os resultados obtidos por RMN  $H^1$  estão mostrados na Tabela 11, onde os mesmos estão sendo comparados com os obtidos pela técnica de CLAE.

Tabela 11 - Comparativo do teor de ésteres etílicos de soja obtidos por RMN H<sup>1</sup> e CLAE.

| TEOR DE ESTER ETÍLICO<br>OBTIDO POR RMN H <sup>1</sup> |           | TEOR DE ESTER ETÍLICO<br>OBTIDO POR CLAE |
|--------------------------------------------------------|-----------|------------------------------------------|
| Código da<br>Amostra                                   | FAEEs (%) | FAEEs (%)                                |
| Óleo de soja                                           | 0,0       | 0,0                                      |
| 1E                                                     | 13,8      | 12,9                                     |
| 2E                                                     | 22,3      | 17,2                                     |
| 3E                                                     | 37,1      | 24,1                                     |
| 4E                                                     | 39,9      | 24,8                                     |
| 5E                                                     | 44,5      | 29,9                                     |
| 6E                                                     | 46,8      | 30,5                                     |
| 7E                                                     | 33,2      | 34,7                                     |
| 8E                                                     | 47,1      | 35,1                                     |
| 9E                                                     | 58,3      | 38,0                                     |
| 10E                                                    | 59,0      | 38,7                                     |
| 11E                                                    | 61,6      | 40,7                                     |
| 12E                                                    | 60,0      | 46,4                                     |
| 13E                                                    | 61,3      | 56,3                                     |
| 14E                                                    | 63,1      | 59,6                                     |
| 15E                                                    | 59,2      | 61,8                                     |
| 16E                                                    | 62,2      | 64,0                                     |
| 17E                                                    | 70,6      | 65,4                                     |
| 18E                                                    | 89,1      | 75,6                                     |

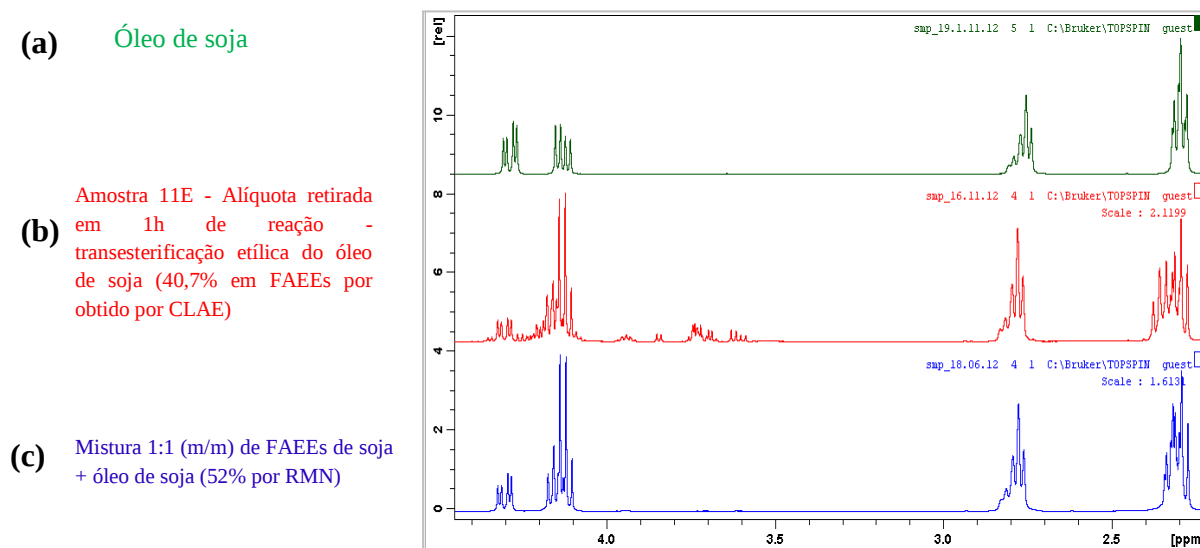
Fonte: Autora, 2013.

**Figura 30** – Sobreposição dos espectros de RMN  $H^1$  do óleo de soja (a), (b) de uma alíquota de 1h de transesterificação etílica do óleo de soja e (c) de uma mistura de B100 etílico de soja mais óleo de soja na proporção de 1:1(m/m).



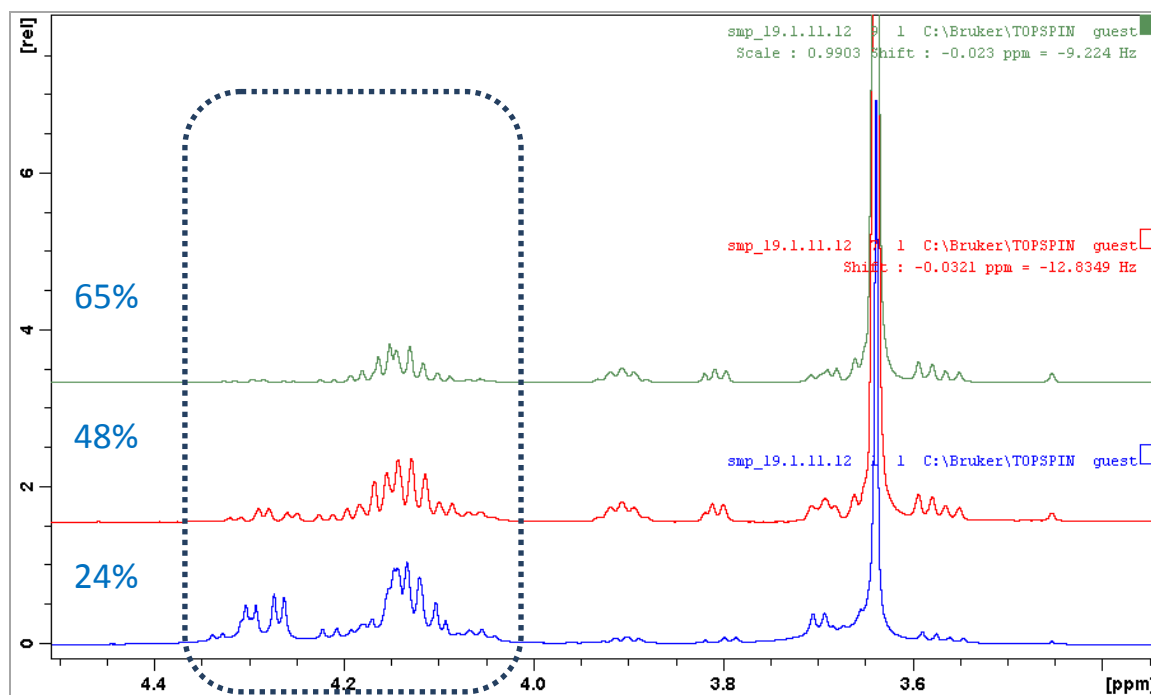
Fonte: Autora, 2013.

**Figura 31** – (a) Região do espectro de RMN  $H^1$  do óleo de soja que mostra os sinais dos hidrogênios beta da porção glicerídica (4,0 – 4,4 ppm). (b) Região do espectro de RMN  $H^1$  de uma alíquota proveniente do monitoramento de uma reação de transesterificação do óleo de soja (c) Região do espectro de RMN  $H^1$  de uma mistura de FAEs obtida a partir do óleo de soja.



Fonte: Autora, 2013.

**Figura 32 – Região dos espectros de três amostras de biodiesel metílico que mostra que os sinais na região de 4,0 – 4,4 ppm não são simétricos. Consequência da existência de intermediários da reação de transesterificação.**



Fonte: Autora, 2013.

Ao comparar os resultados do teor de ésteres etílicos de soja obtidos através das duas técnicas (CLAE e RMN  $H^1$ ) observa-se grandes diferenças, que chegam a assumir valor de 20% entre uma técnica e outra. Alguns resultados foram coerentes para as duas técnicas, mas a maior parte deles foram maiores por RMN  $H^1$  e isso se deve ao fato de o sinal dos ésteres etílicos estar sobreposto aos sinais dos hidrogênios da porção glicérica (4,0 -4,2 ppm). Além disso, outros fatores importantes influenciam para que essa diferença seja ainda maior, tais como ajuste da linha de base que faz com que a integração não seja eficiente, a razão sinal/ruído, entre outros. Mesmo assim, o fator que mais contribui para esse erro é a sobreposição dos sinais pertencentes aos intermediários reacionais com o sinal (quarteto) pertencente aos ésteres etílicos. Neste caso, quando se trata de amostras reais, ou seja, proveniente de reação de transesterificação e não de amostras preparadas através da mistura de triglicerídeo e monoésteres, não é conveniente o uso da Equação 6. Isso pode ser confirmado ao compararmos os valores obtidos por CLAE com os que foram obtidos por RMN  $H^1$  (Tabela 11).

## 6 CONCLUSÃO

Dentro do planejamento proposto e dos resultados, a espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$ , que é uma excelente técnica qualitativa e quantitativa, não se mostrou eficaz para a quantificação do teor de ésteres metílicos e etílicos provenientes do monitoramento de reação de transesterificação do óleo de soja devido à sobreposição de sinais na região na qual os mesmos devem ser integrados.

A diferença de resultados entre as técnicas foi de ~15% para ésteres metílicos e ~20% para ésteres etílicos. Isso pode estar associado a erros das técnicas. No caso da RMN  $^1\text{H}$ , os erros podem ser causados pela falta de homogenização do campo magnético em torno da amostra (*shimming*), baixa razão sinal/ruído e associados principalmente às equações utilizadas.

## 7 PERSPECTIVAS

- Utilizar campo magnético de 600 MHz (14,1 Tesla) a fim de obter uma melhor separação dos sinais utilizados para o estudo de quantificação dos ésteres.
- Calcular erros associados a ambas as técnicas para o cálculo do teor de ésteres, principalmente para a técnica de RMN  $H^1$ .
- Utilizar programas de pulsos diferenciados com o objetivo de obter o melhor tempo de relaxação para os sinais que serão integrados. Obter a maior razão sinal/ruído, para minimizar erros na integração dos sinais.
- Executar análises de RMN bidimensionais homonuclear e heteronuclear, a fim de confirmar, exatamente, quais são os sinais dos prótons de DAG, MAG e TAG formados após uma reação de transesterificação.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, D. F.; MAZZEI, J. L.; KAISER, C. R. Assessment of different measurement methods using  $^1\text{H}$  nmr data for the analysis of the transesterification of vegetable oils. **J. Am. Oil.Chem. Soc.**, v. 89, p.: 619-630, 2012.

AGENCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Resolução ANP nº 14, de 11 de maio de 2012. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 maio 2012. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes\\_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml](http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2012/maio/ranp%2014%20-%202012.xml)>. Acesso em: 10 out. 2012.

APROSOJA BRASIL [on line]. Brasil. Disponível em: < <http://aprosojabrasil.com.br/>>. Acesso em: 12 fev. 2013.

ARAÚJO, D. B. **Sobre neuroimagens funcionais por magnetoencefalografia e ressonância magnética**: novos métodos e aplicações. Tese (Doutorado em Física) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002. Disponível em: <[http://www.neuroimago.usp.br/dissertacoestes/Tese\\_Draulio.pdf](http://www.neuroimago.usp.br/dissertacoestes/Tese_Draulio.pdf)>. Acesso em: 28 out. 2012.

AZEVEDO, R. B.V. **Análise de grãos e sementes por ressonância magnética nuclear**. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Química. Rio de Janeiro abr. 2006. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/painelsetorial/palestras/PalestraRMN.pdf>>. Acesso: 20 maio 2012.

BATHISTA, A. L. B. S.; NOGUEIRA J. S. Elementos históricos da ressonância magnética nuclear. In: ENCONTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, 7., 2002 Maringá. **Anais....** Maringá, 2002. Disponível em: < [http://geocities.ws/andreathista/andre\\_auremn\\_maringa.pdf](http://geocities.ws/andreathista/andre_auremn_maringa.pdf)>. Acesso em: 30 maio. 2012.

BRUKER. **Almanac**: 50 Years of Innovation. 2010. Disponível em: <<http://www.pascal-man.com/pulseprogram/Almanac2010.pdf>>. Acesso em 28 out. 2012.

CARVALHO, S. C. et al. Chromatographic Analyses of fatty acid methyl esters by HPLC-UV and CG-FID. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 4, 473-769, 2012.

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

COLNAGO, L.A.; ALMEIDA, F.C.L.; VALENTE, A. P. Espectrometria de massa e RMN multidimensional e multinuclear: revolução no estudo de macromoléculas biológicas. **Química Nova**, n.16. 2002 .Disponível em: <[http://edb.fisica.ufs.br/wiki/index.php/Fen%C3%B4meno\\_de\\_Resson%C3%A2ncia\\_Magn%C3%A9tica](http://edb.fisica.ufs.br/wiki/index.php/Fen%C3%B4meno_de_Resson%C3%A2ncia_Magn%C3%A9tica)>. Acesso em: 6 set. 2012.

COMPTON, D.L. VERMILLION, K.E.; LASZLO, J.A. Acyl migration kinetics of 2-monoacylglycerols from soybean oil via  $^1\text{H}$  NMR. **J. Amer. Oil Chem. Soc.**, AOCS, n.84, p.: 343-348, 2007.

COSTA NETO, P. R. et al. Quantification of soybean oil ethanolysis with  $^1\text{H}$  NMR. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v. 81, p. 1111-1114, 2004. ISSN 0003-021X.

FAGUNDES, F. P. et al. Avaliação das propriedades do óleo de mamona na produção de bicomcombustível. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE P & D EM PETRÓLEO E GÁS, 3., 2005, Salvador. **Anais...** Salvador, 2005. Disponível em: <[http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/3/trabalhos/IBP0617\\_05.pdf](http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/3/trabalhos/IBP0617_05.pdf)>. Acesso em: 29 maio 2012.

GELBARD, G. et al.  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance determination of the yield of the transesterification of rapeseed oil with methanol. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 72, p.:1239-1241, 1995.

GERALDES, C. F. G. C.; **Imagem através de ressonância magnética nuclear**: prêmio nobel de medicina ou fisiologia de 2003. Disponível em: <[http://www.spq.pt/boletim/docs/BoletimSPQ\\_091\\_047\\_09.pdf](http://www.spq.pt/boletim/docs/BoletimSPQ_091_047_09.pdf)>. Acesso em: 9 out. 2012.

GHESTI, G. F. et al. FT-Raman spectroscopy quantification of biodiesel in a progressive soybean oil transesterification reaction and its correlation with  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy methods. **Energy Fuels**, Washington, v. 21, p. 2475-2480, 2007. ISSN 0887-0624.

GIL, VICTOR M. S.; GERALDES, CARLOS F. G. C.; **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações**, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.

GIN, F. et al. NMR spectroscopic study on methanolysis reaction of vegetable oil. **Elsevier. Fuel**.v. 86, p.: 1201-1207, 1996.

GUILLÉN, M.D.; RUIZ, A. High resolution  $^1\text{H}$  NMR nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. **Trends in Food Science & technology**. n. 12, p.: 328-338, 2001.

HAGE, M. C. F. N. S.; IWASAKI, M. Imagem por ressonância magnética: princípios básicos. **Ciência Rural**. v. 39, Santa Maria, Jul. 2009. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/cr/2009nahead/a147cr1097.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2012.

HATZAKIS, E. et al. High-resolution NMR spectroscopy: an alternative fast tool for qualitative and quantitative analysis of triacylglycerol (TAG) oil. **J. Am. Oil Chem soc.**, no. 88, p.: 1695-1708, 2011.

INSTITUTO CIÊNCIA HOJE [on line]. Domínio da soja. Moutinho, S. **Copyright**. Disponível em: < <http://cienciahoje.uol.com.br> >.\_Acesso em: 18 out 2012.

KARMEE, S.K. et al. Kinetic study of base-catalysed transesterification of monoglycerides from pongamia oil. **J. Am. Oil Chem soc**, v.81, n. 5, p.: 425 – 430, 2004.

KNOTHE, G. Determining the blend level of mixtures of biodiesel with conventional diesel fuel by fiber-optic near-infrared spectroscopy and  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Am. Oil Chem soc**, v. 78, p.:1025-1028, 2001.

KNOTHE, G. Monitoring a progressing transesterification reaction by fiber-optic near infrared spectroscopy with correlation to  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Am. Oil Chem soc**, v. 77, p.:489-493, 2000.

KNOTHE, G.  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy of fatty acids and their derivatives: Glycerol Esteres. **The OACS Lipid Library**. Disponível em: < <http://lipidlibrary.aocs.org/nmr/1NMRglyc/index.htm> >. Acesso em: 10 out 2012.

LIMA, J. R.O. Biodiesel de babaçu (*Orbignya sp.*) obtido por via etanólica. **Quím. Nova**, v.30, n.3, p.: 600-603, 2007.

MANNINA, L.; SEGRE, A. High resolution nuclear magnetic resonance: from chemical structure to food authenticity. **Grasas y Aceites**. v.53 Fasc.1, p.: 22-23, 2002. Disponível em: < <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/viewArticle/287> >. Acesso em: 10 de maio 2012.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda, 1998.

MORGENSTERN, M.; JESSICA, C.; MEYER, S.; CATALDO, S. Determination of the Kinetics of Biodiesel Production using Proton Nuclear magnetic resonance Spectroscopy ( $^1\text{H}$  NMR). **Energy & Fuels**. n. 20, p.: 1350-1353, 2006.

OTADUY, M.G.; LEITE, C.C. **Princípios Físicos da Ressonância Magnética (RM)**. Disponível em: <[www.hcnet.usp.br/.../Fisica%20basica%20da%20ressonancia%20magnetica.doc](http://www.hcnet.usp.br/.../Fisica%20basica%20da%20ressonancia%20magnetica.doc)>. Acesso em: 8 out. 2012.

PEALISSON, L.; FILHO, O. B.; LANÇAS, F.M. 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 a estabilidade das medidas. **Scientia Chromatographica**, p.: 111 – 124. 2012.

REVISTA SAFRA, 2013. Disponível em: < [www.revistasafra.com.br](http://www.revistasafra.com.br) >. Acesso em: 22 de mar. 2013.

ROSSET, I.G. et al. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and  $^1\text{H}$  NMR and CG quantification of the ethyl esteres (biodiesel). **Elsevier. Applied Catalysis A: General**. n.392, p.: 136-142, 2011.

SACCHI, R.; ADDEO, F.; PAOLILLO, L.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR of virgin olive oil: An overview. **Magnetic resonance in chemistry**, v.35, p.: 133 -135,1997.

SANTOS, R.B. et al. **Síntese e estudo do biodiesel do óleo da cutieira (*Joannesia princeps*)**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30, 2007. Águas de Lindoia, SP. **Anais....**Águas de Lindoia, SP: [s.n], 2007. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T1897-1.pdf>>. Acesso em: 14 maio 2012.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R.M. Transesterification of vegetable oils: a review. **J. Braz. Chem. Soc.** v.9, n. 1, p.: 199-210, 1998.

SILVA, J.P.V.; **Avaliação do efeito de diferentes ligantes, presentes na estrutura de complexos de estanho (IV), na reação de metanólise de óleo de soja**. 2012. 85 f.

Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Maceió, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C.; **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois S.A., 1979.

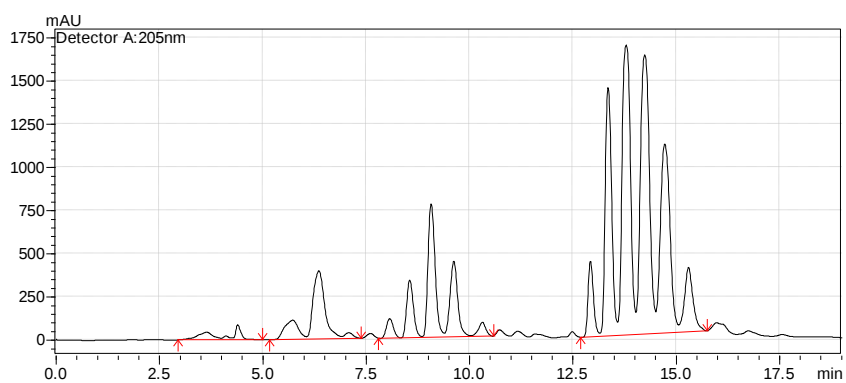
SKOOG, DOUGLAS A.; HOLLER, F. JAMES; NIEMAN, TIMOTHY A.; **Princípios de Análise Instrumental**, 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

TAVARES, M.I.B. et al. Estudo de argilas organicamente modificadas por RMN no estado sólido. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31, 2008, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Águas de Lindóia, SP: [s.n], 2008.

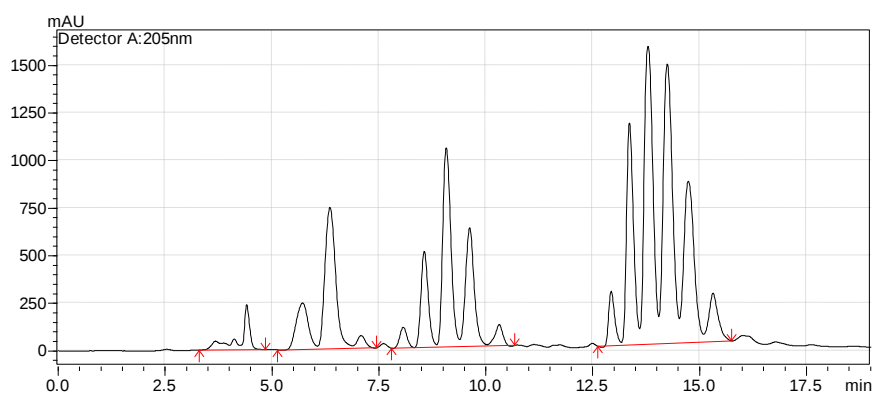
## APÊNDICE A

### CROMATOGRAMAS DAS ANÁLISES DE CLAE, REALIZADAS DOS PRODUTOS OBTIDOS A PARTIR DA TRANSESTERIFICAÇÃO METÍLICA DO ÓLEO DE SOJA.

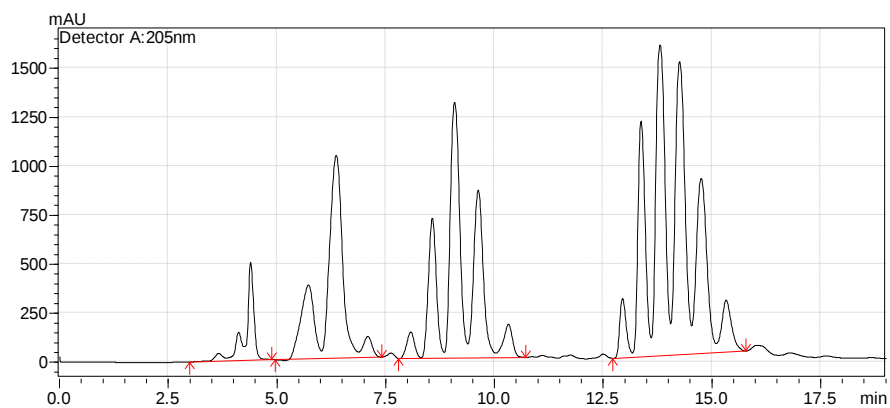
#### ▪ 1M



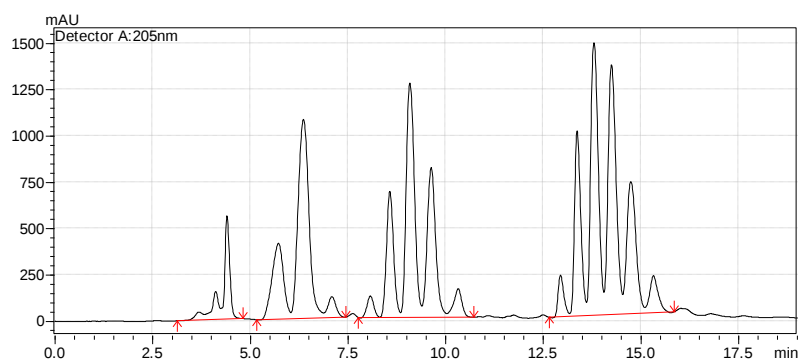
#### ▪ 2M



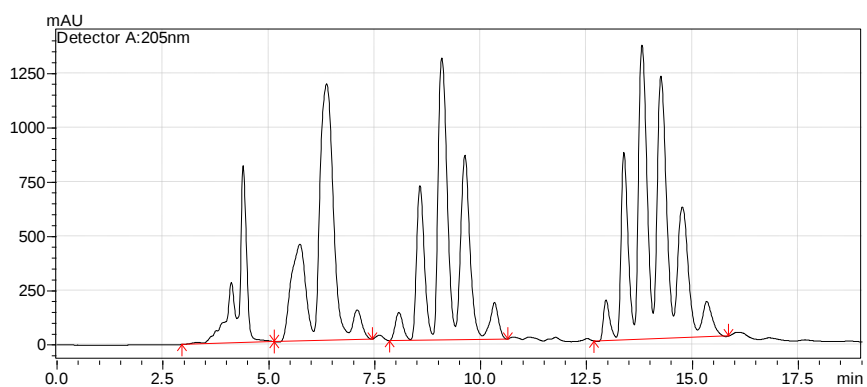
#### ▪ 3M



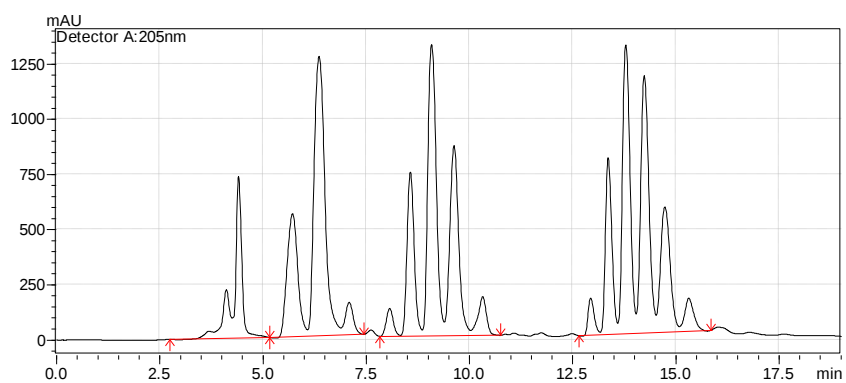
## ■ 4M



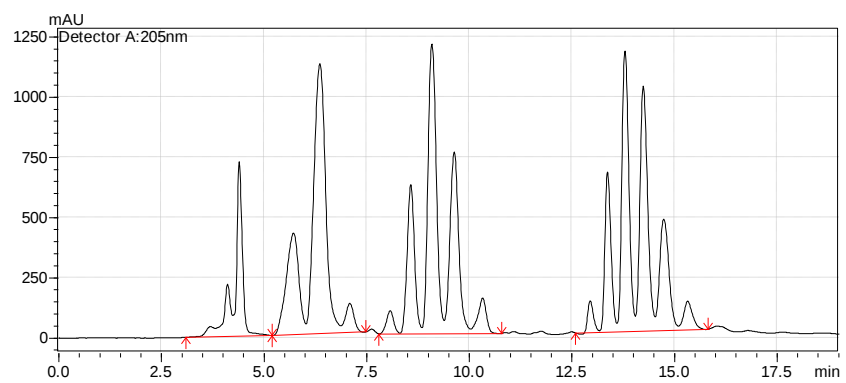
## ■ 5M



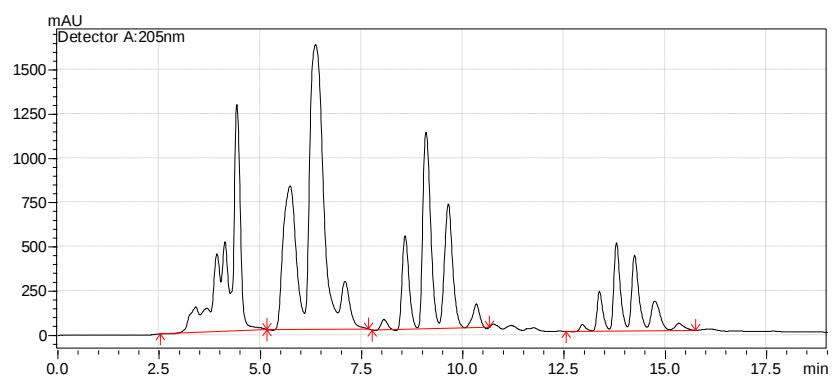
## ■ 6M



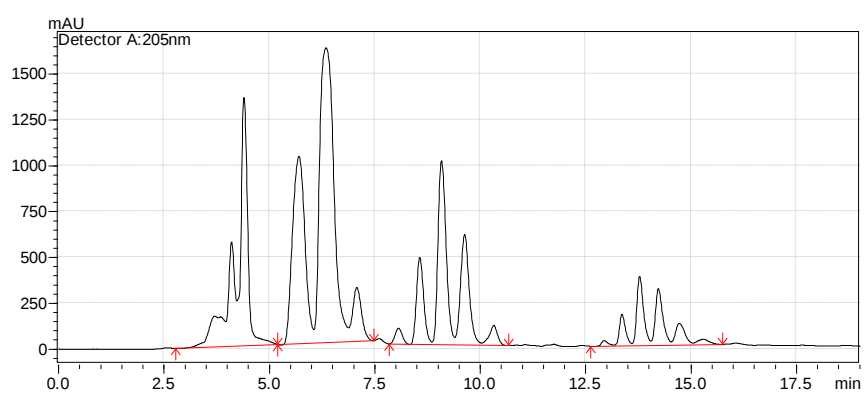
## ■ 7M



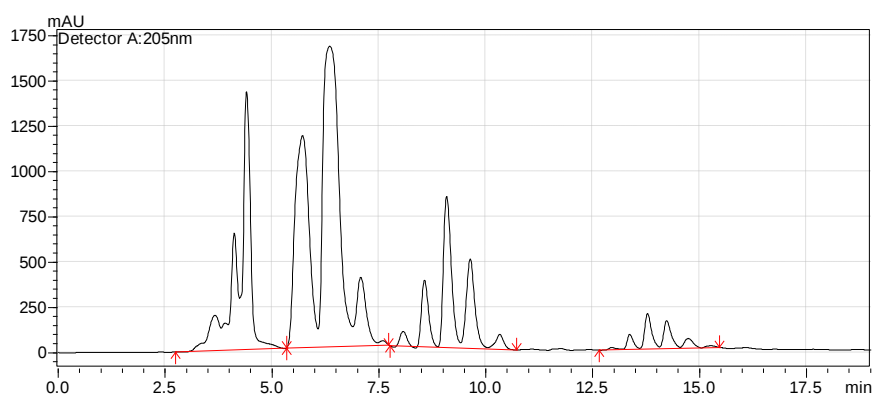
## ■ 8M



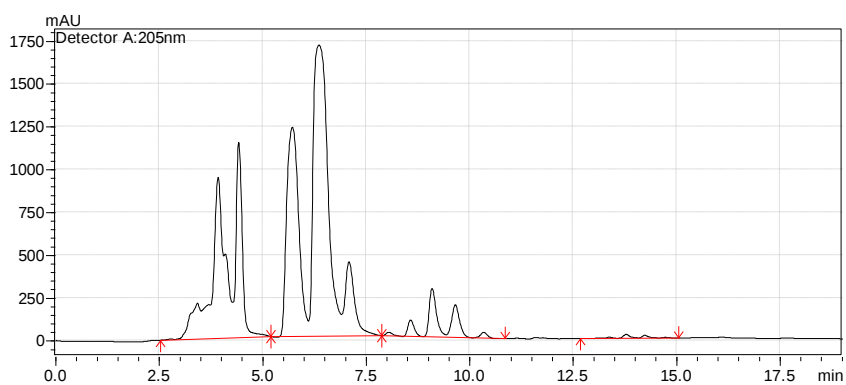
## ■ 9M



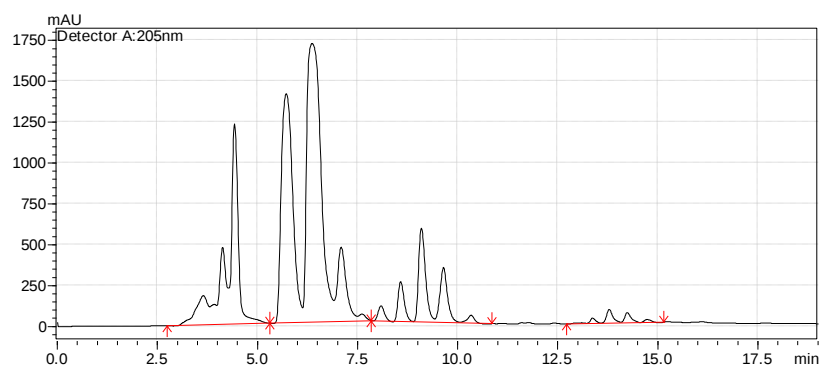
## ■ 10M



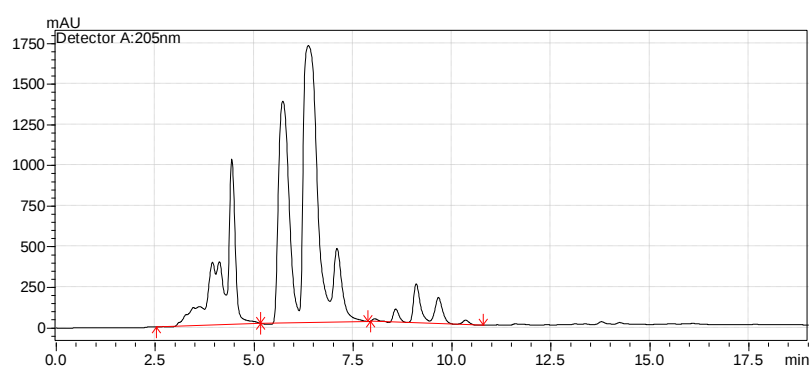
## ■ 11M



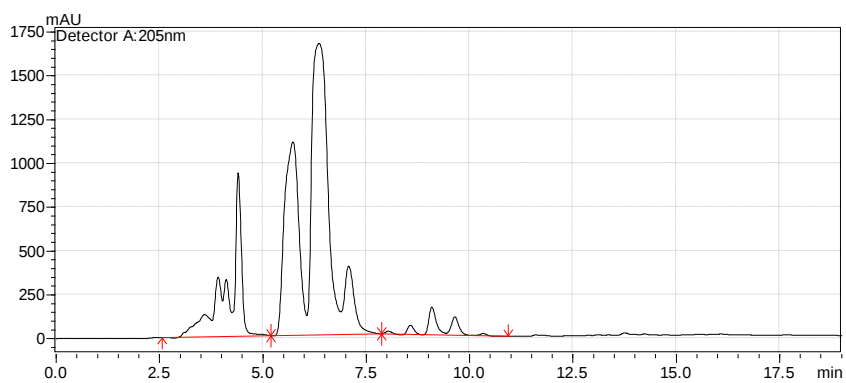
## ■ 12M



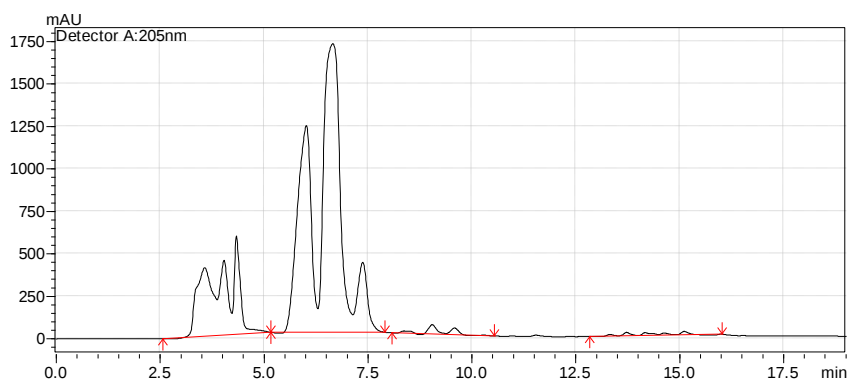
## ■ 13M



## ■ 14M

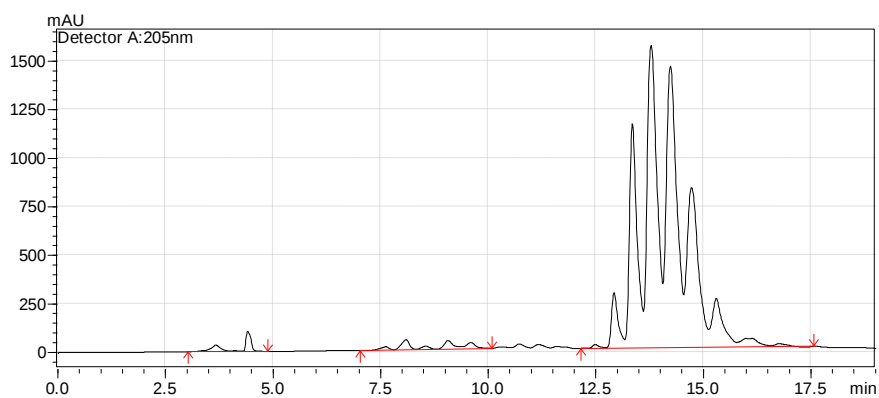


## ■ 15M

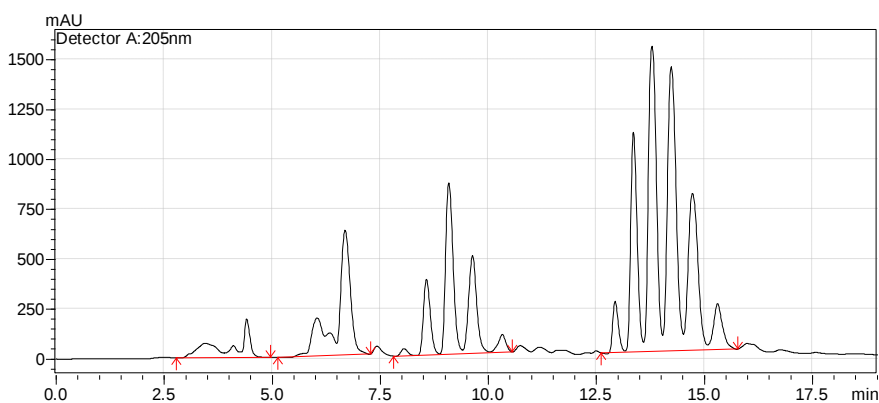


## CROMATOGRAMAS DAS ANÁLISES DE CLAE, REALIZADAS DOS PRODUTOS OBTIDOS A PARTIR DA TRANSESTERIFICAÇÃO ETÍLICA DO ÓLEO DE SOJA.

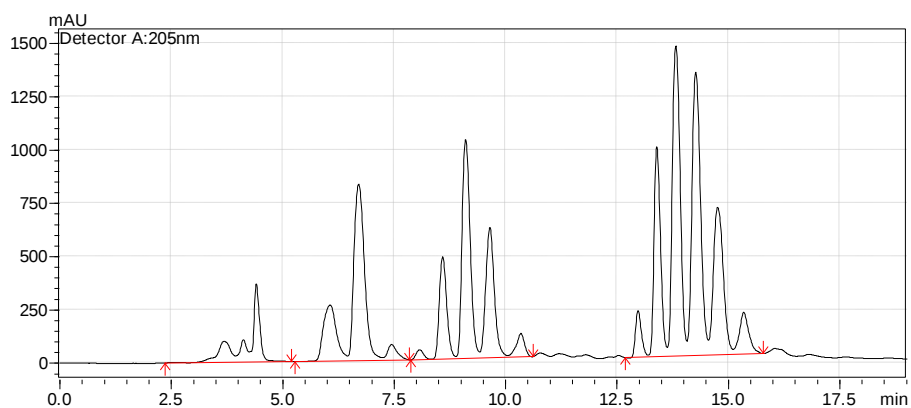
### ▪ Óleo de Soja



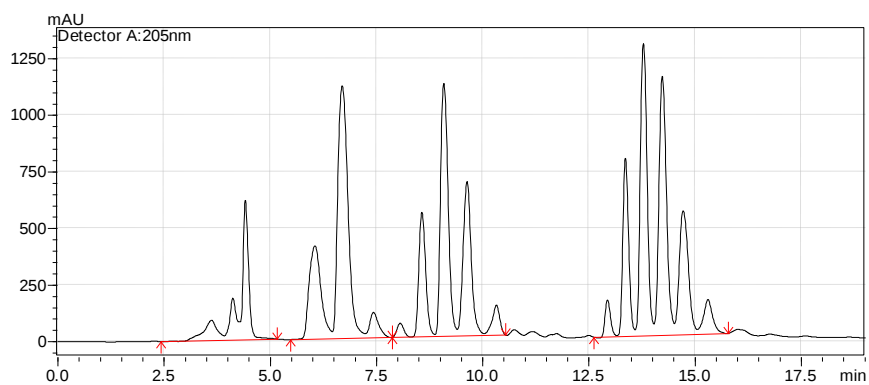
### ▪ 1E



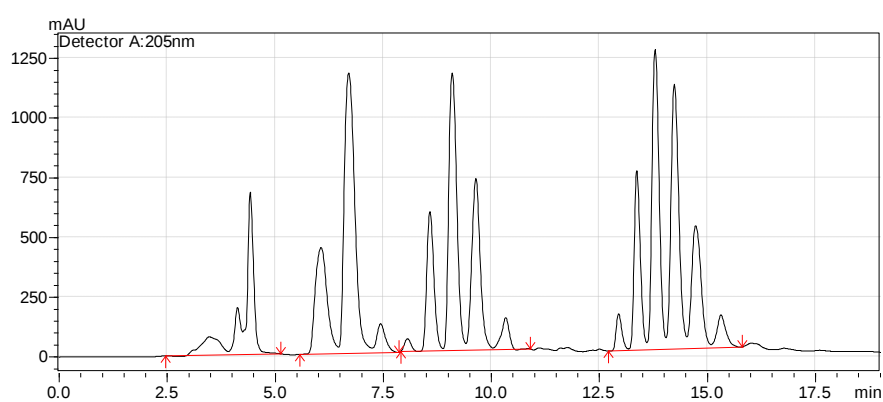
### ▪ 2E



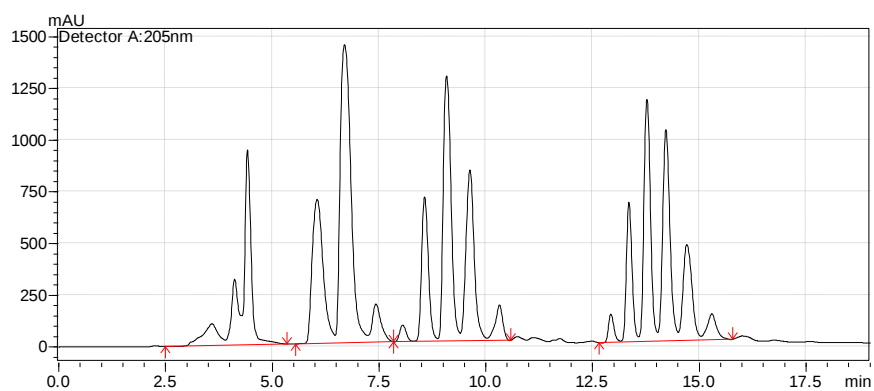
## ■ 3E



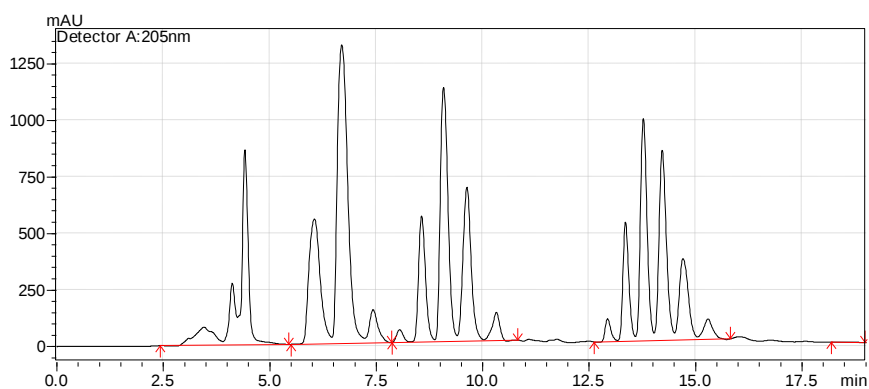
## ■ 4E



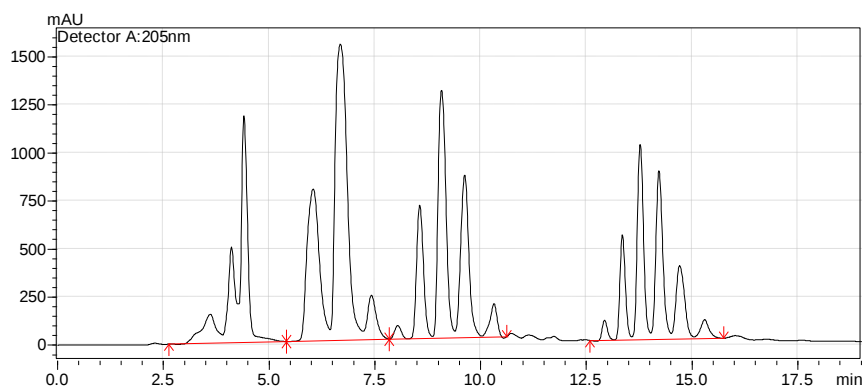
## ■ 5E



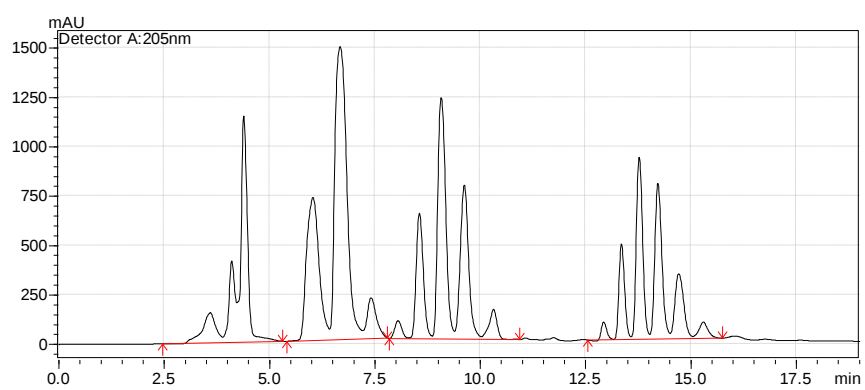
## ■ 6E



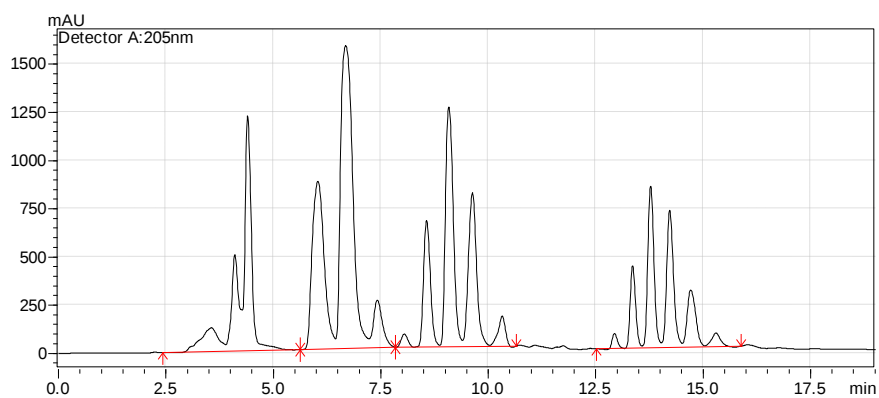
## ■ 7E



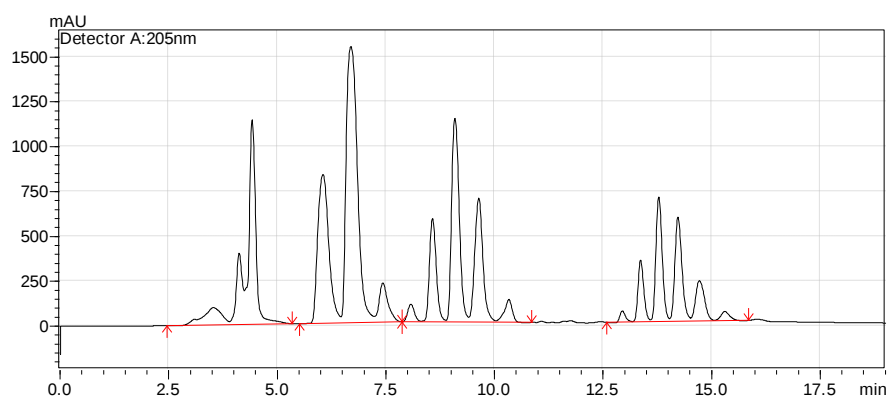
## ■ 8E



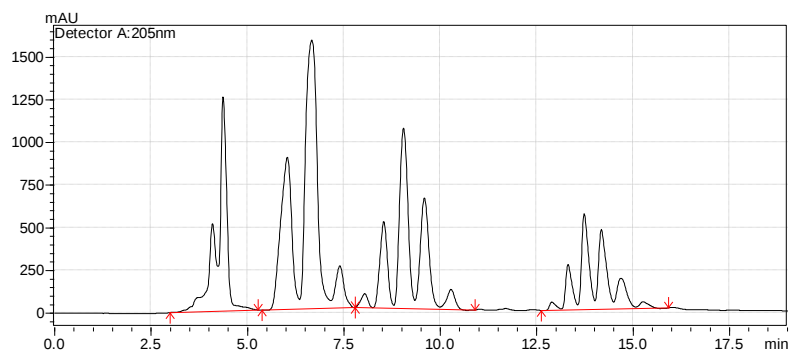
## ■ 9E



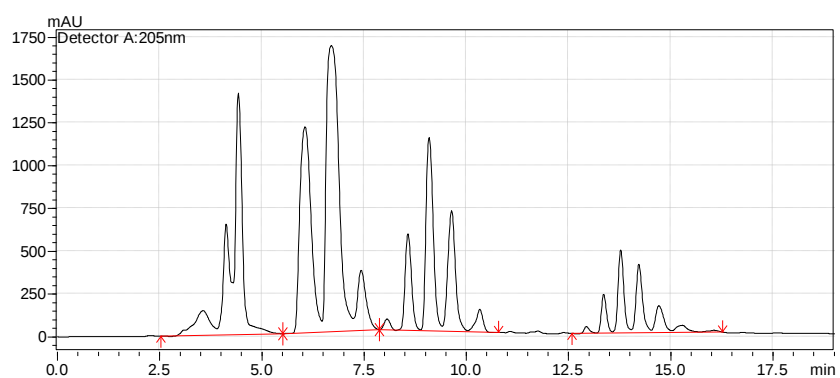
## ■ 10E



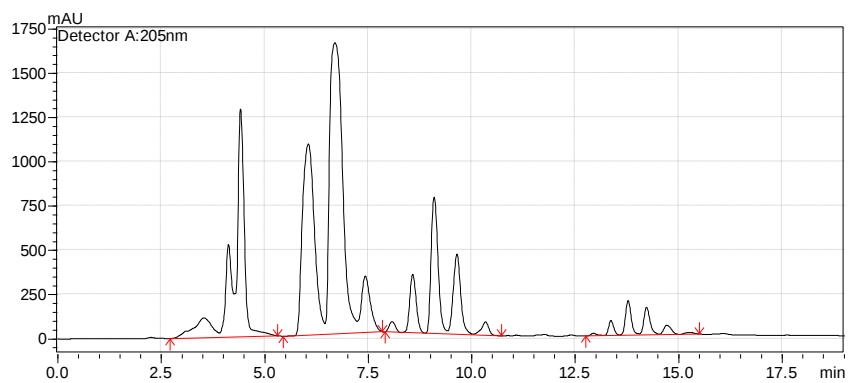
## ■ 11E



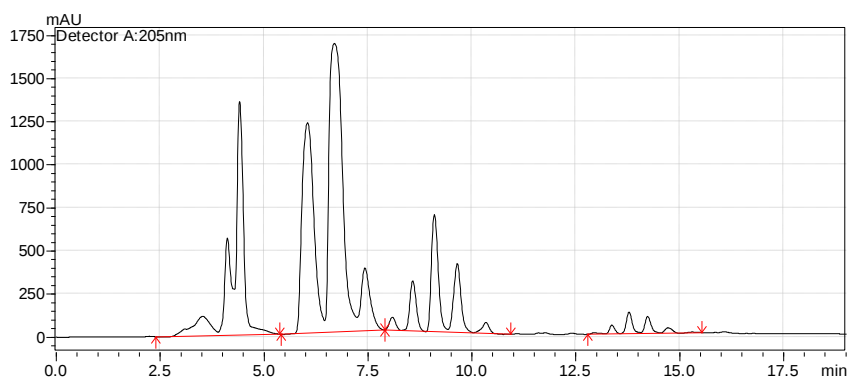
## ■ 12E



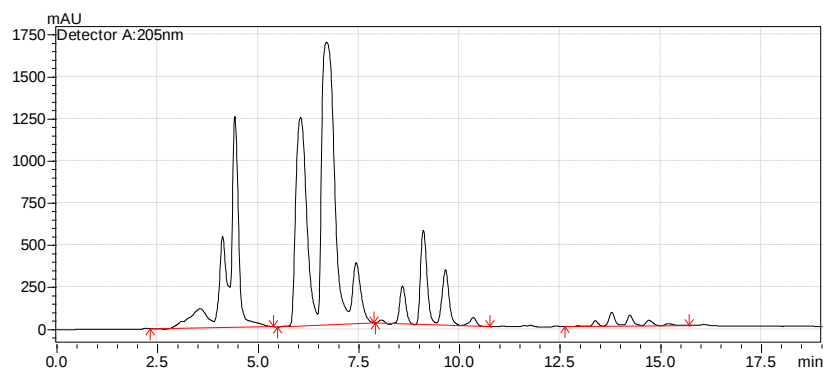
## ■ 13E



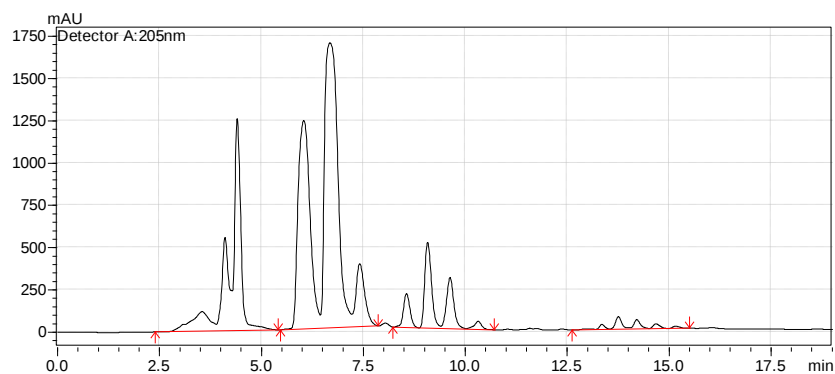
## ■ 14E



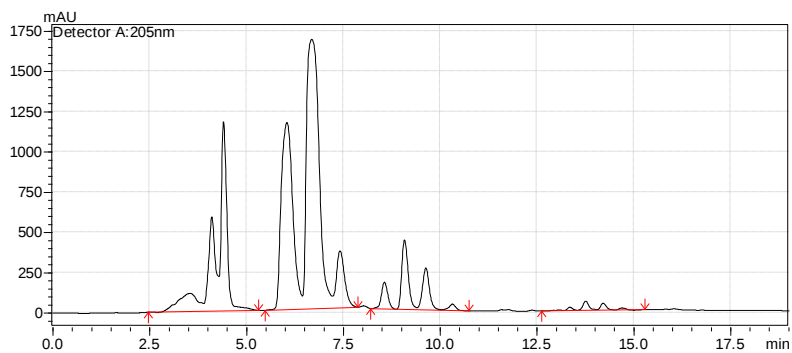
## ■ 15E



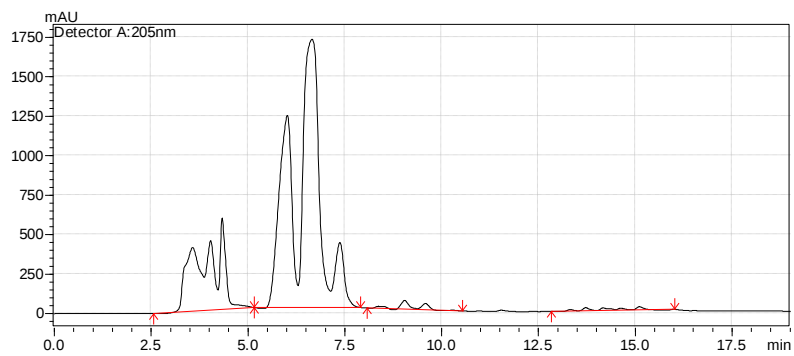
## ■ 16E



## ■ 17



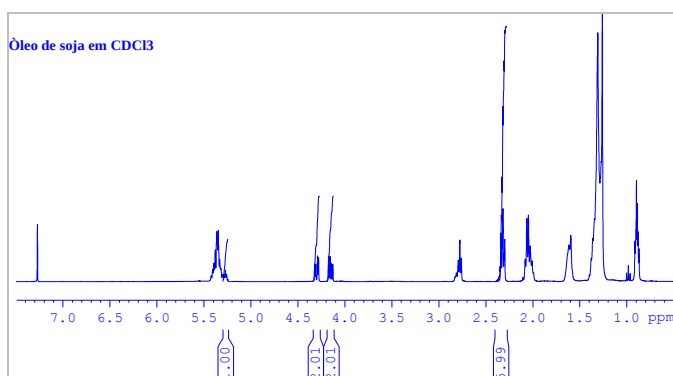
## ■ 18E



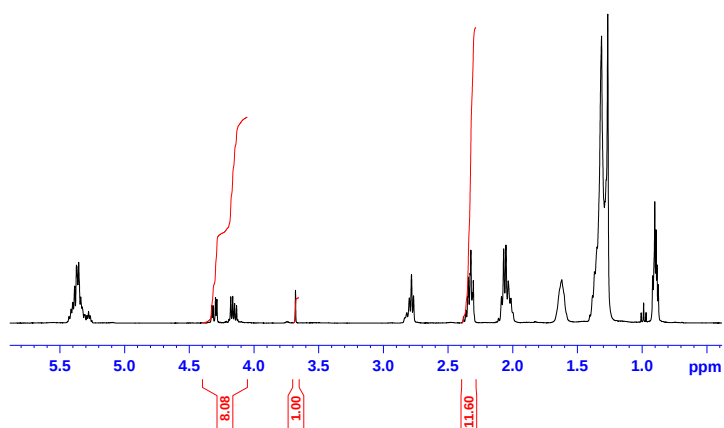
## APÊNDICE B

ESPECTROS DE RMN  $H^1$  EM  $CDCl_3$  DOS ÉSTERES OBTIDOS POR  
TRANSESTEREIFICAÇÃO METÍLICA DO ÓLEO DE SOJA

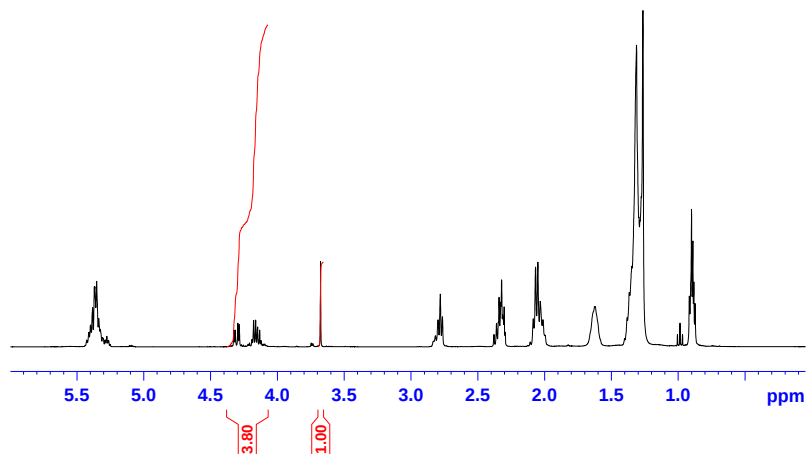
## • Óleo de soja



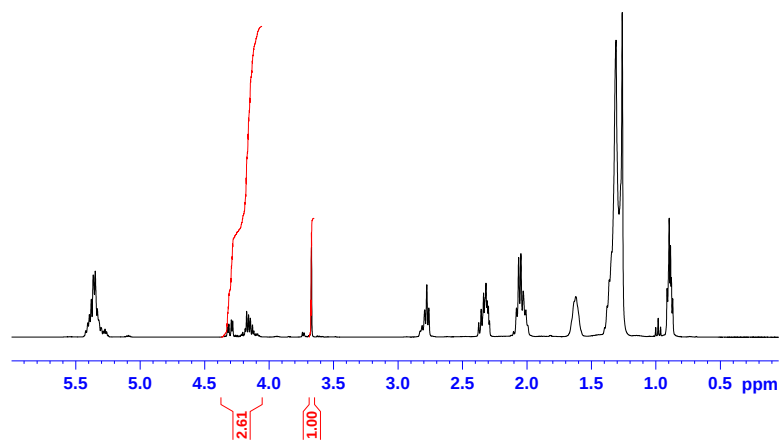
## ▪ 1M



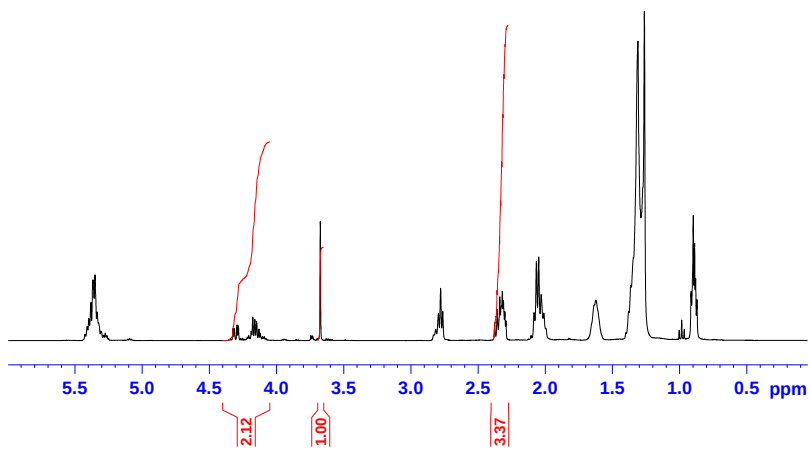
## ▪ 2M



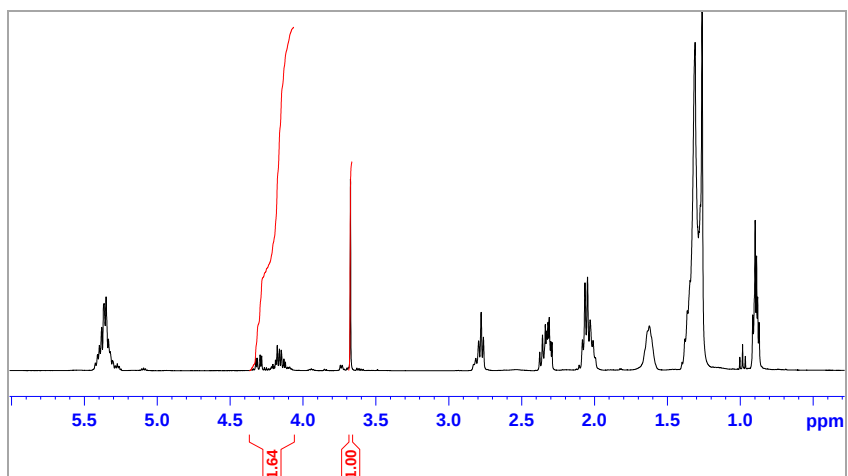
## ▪ 3M



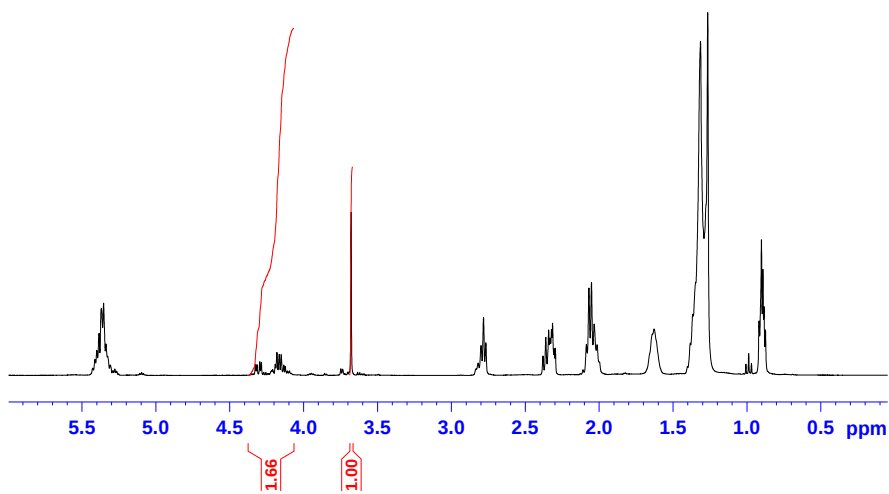
## ▪ 4M



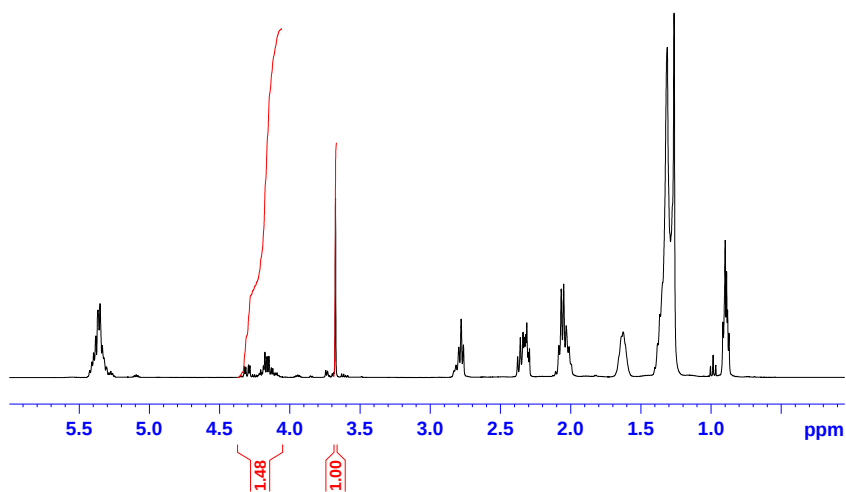
## ▪ 5M



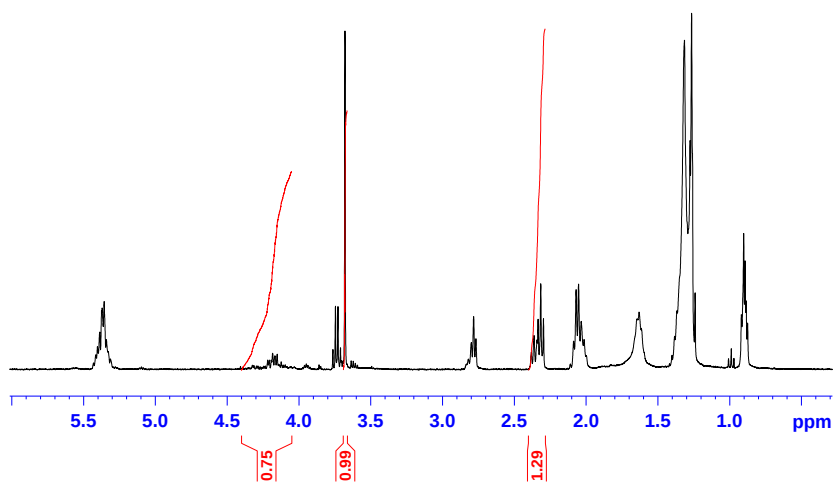
▪ 6M



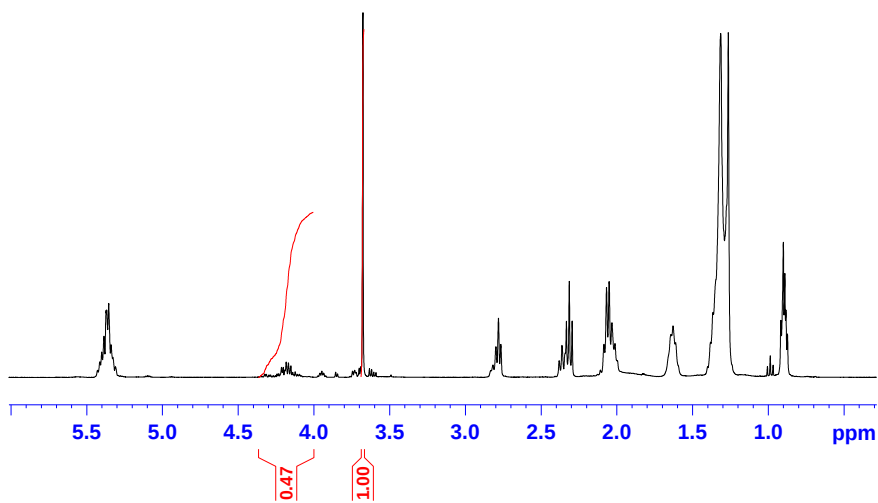
▪ 7M



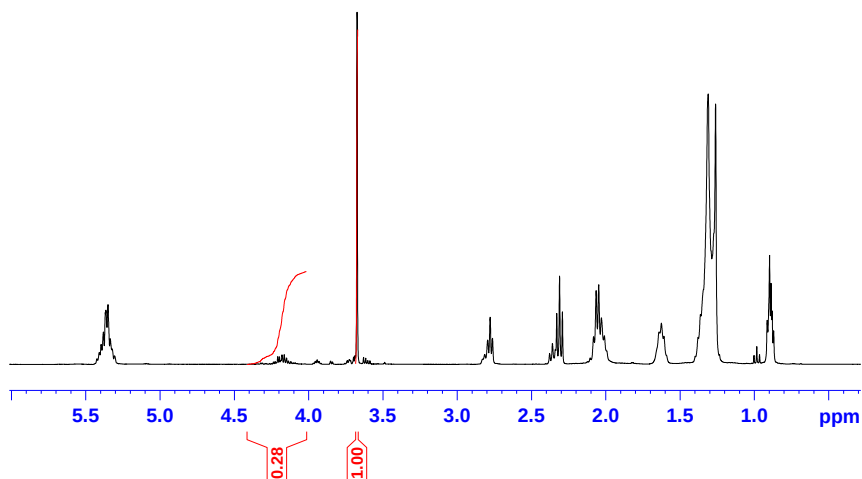
▪ 8M



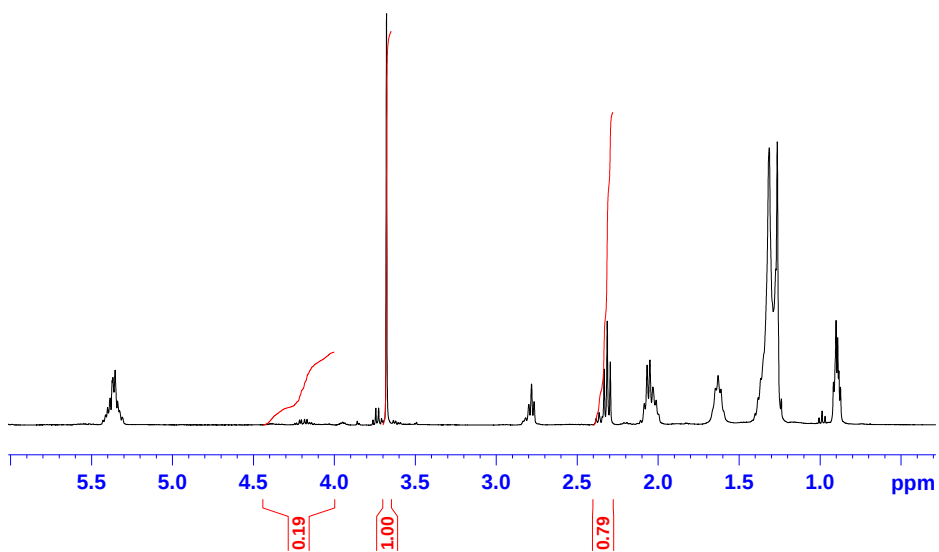
▪ 9M



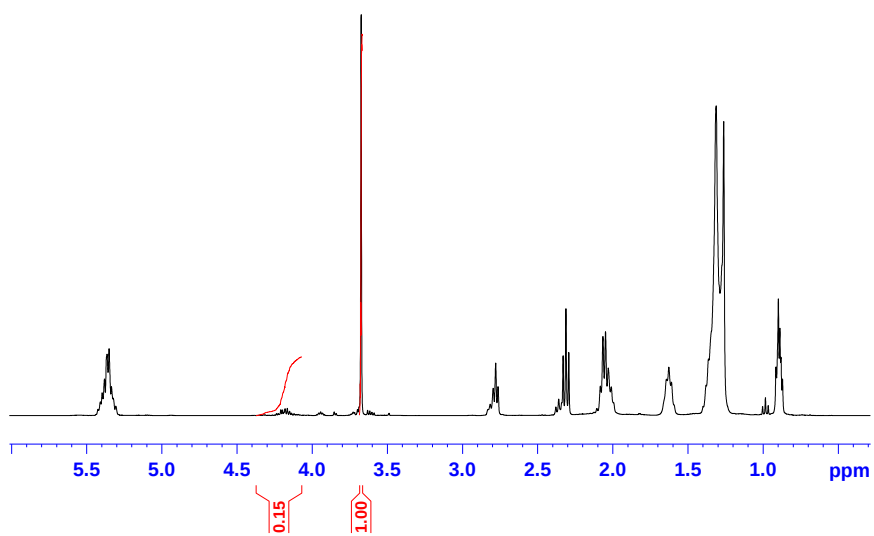
▪ 10M



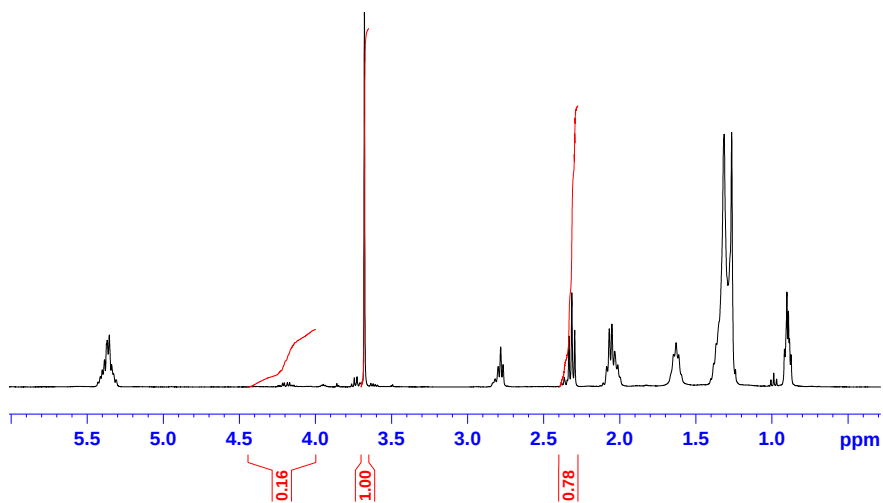
▪ 11M



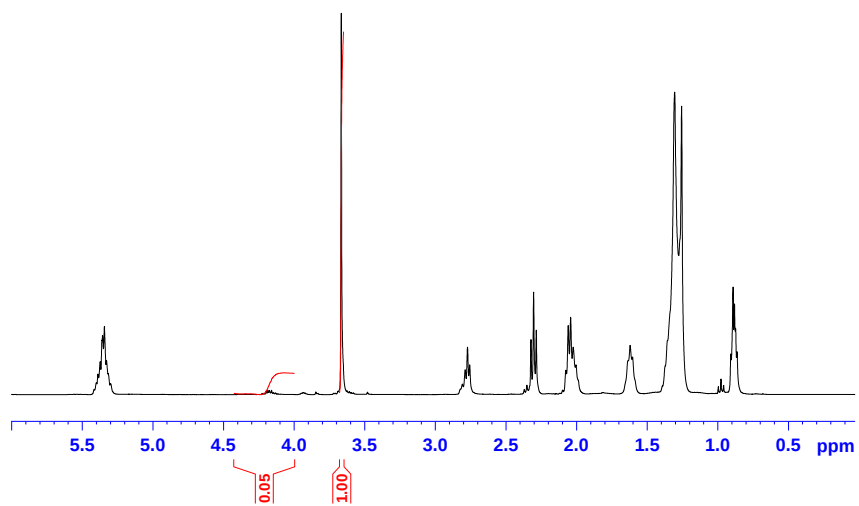
## ■ 12M



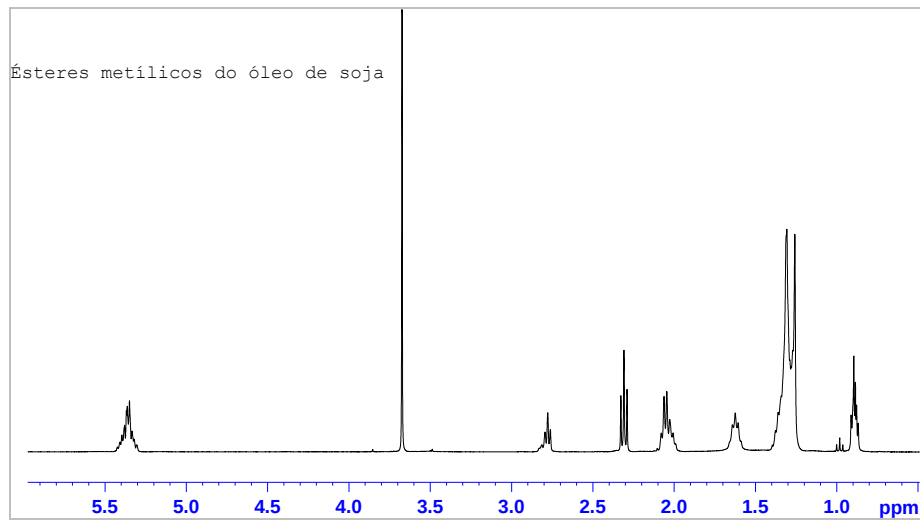
## ■ 13M



## ■ 14M

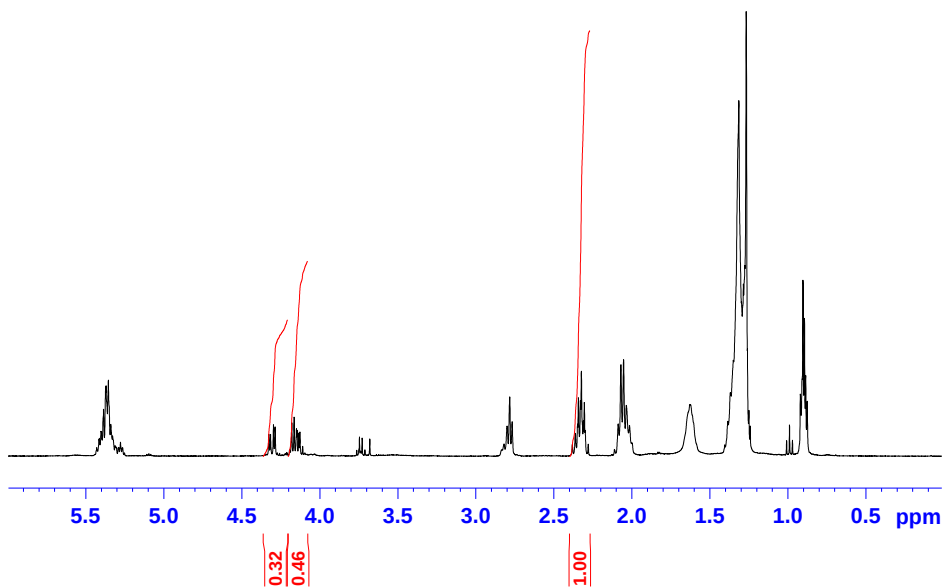


## ▪ 15M

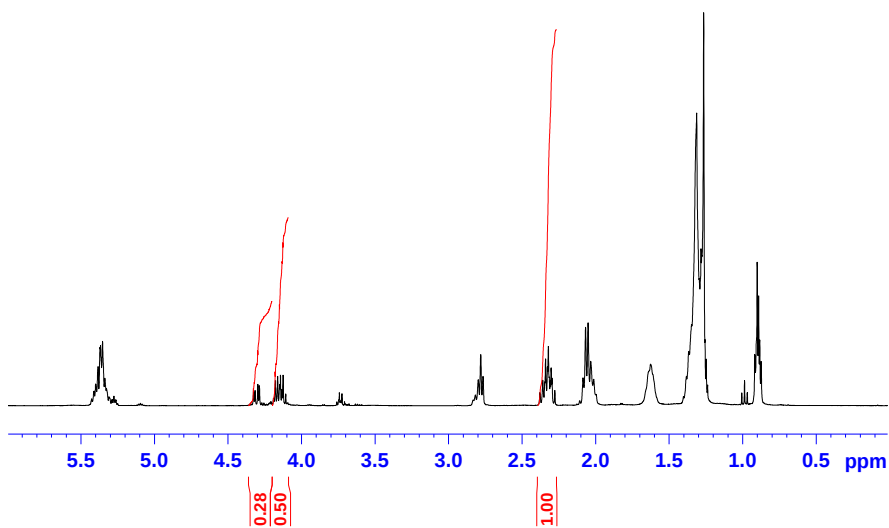


**ESPECTROS DE RMN H<sup>1</sup> EM CDCl<sub>3</sub> DOS ÉSTERES OBTIDOS POR  
TRANSESTEREIFICAÇÃO ETÍLICA DO ÓLEO DE SOJA**

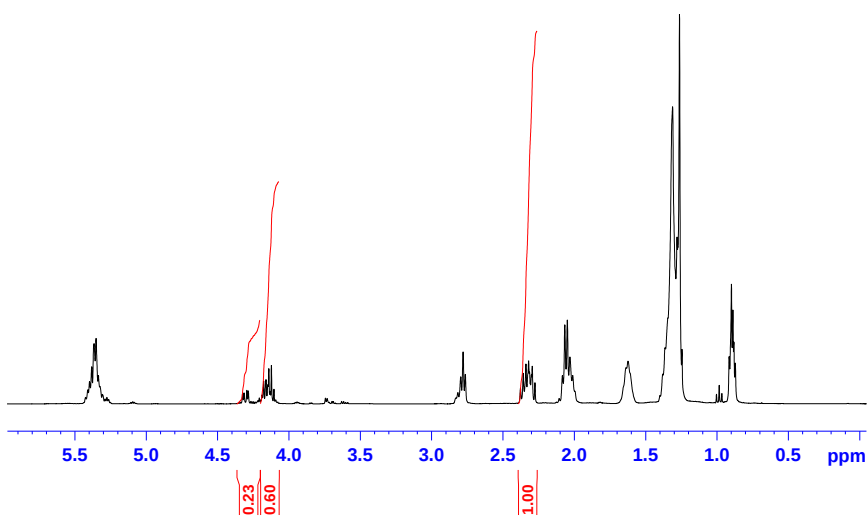
## ▪ 1E



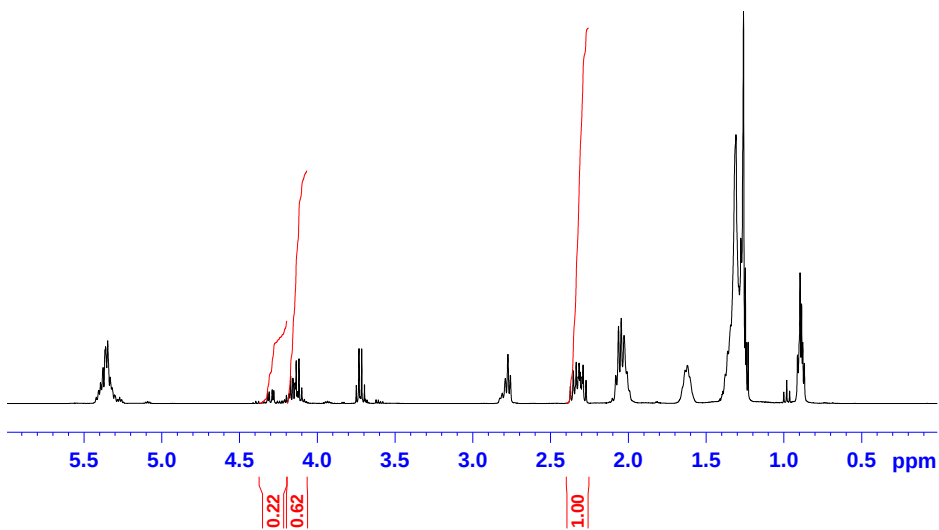
## ■ 2E



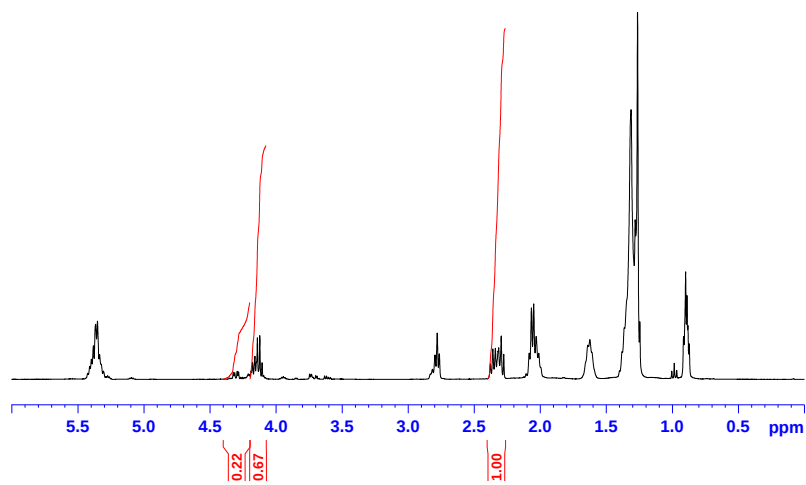
## ■ 3E



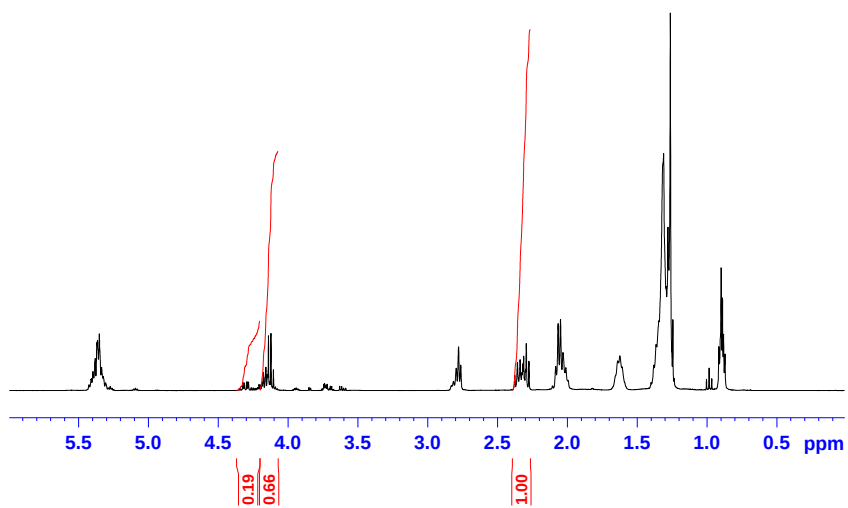
## ■ 4E



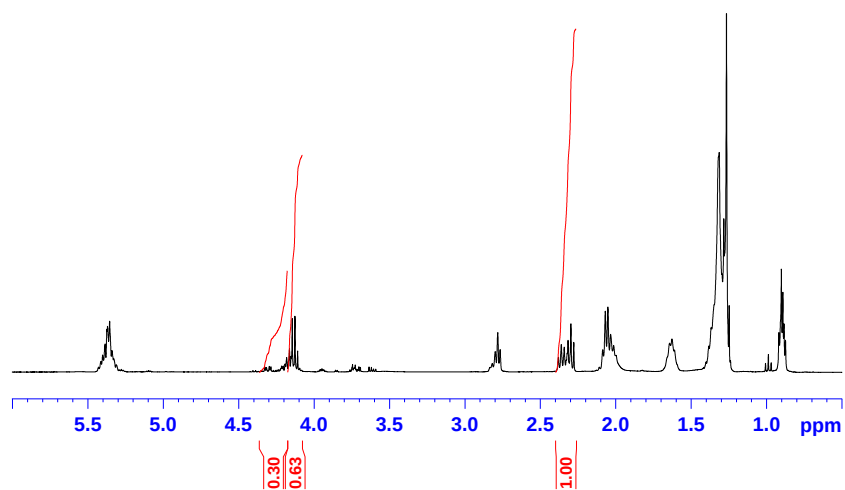
## ▪ 5E



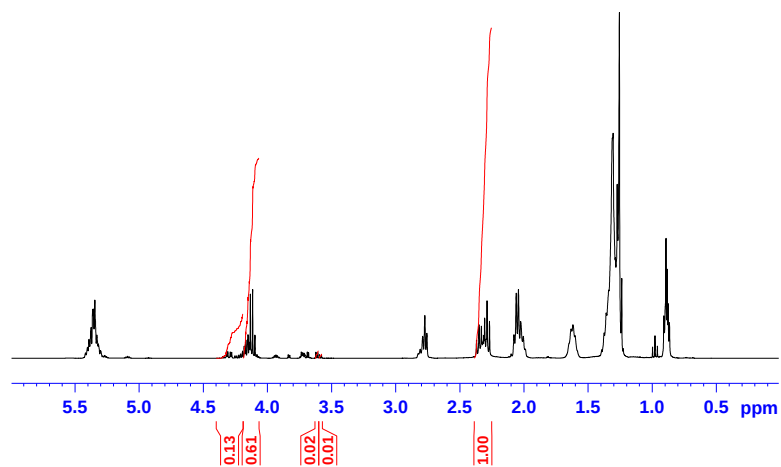
## ▪ 6E



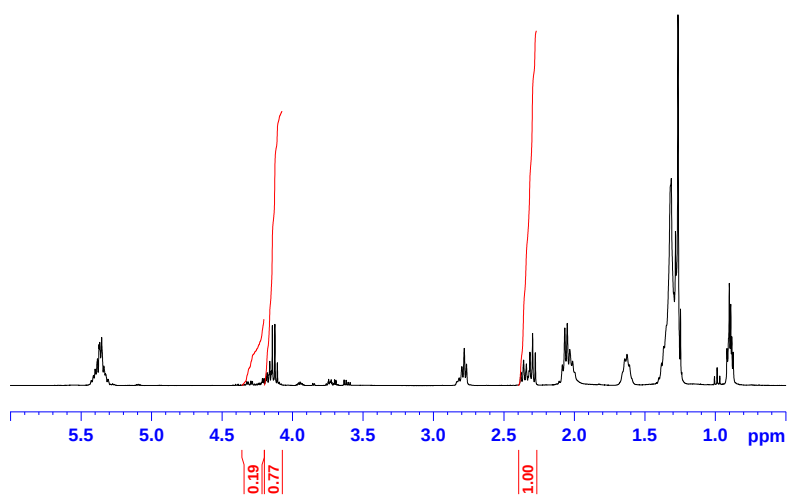
## ▪ 7E



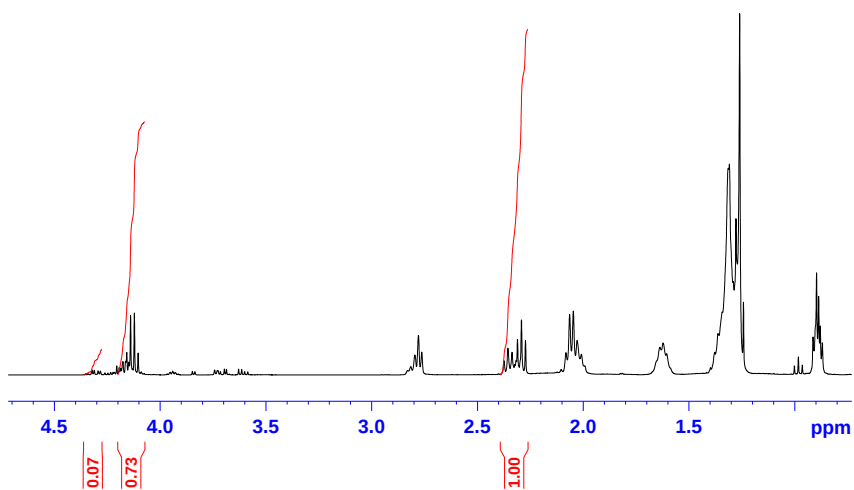
## ■ 8E



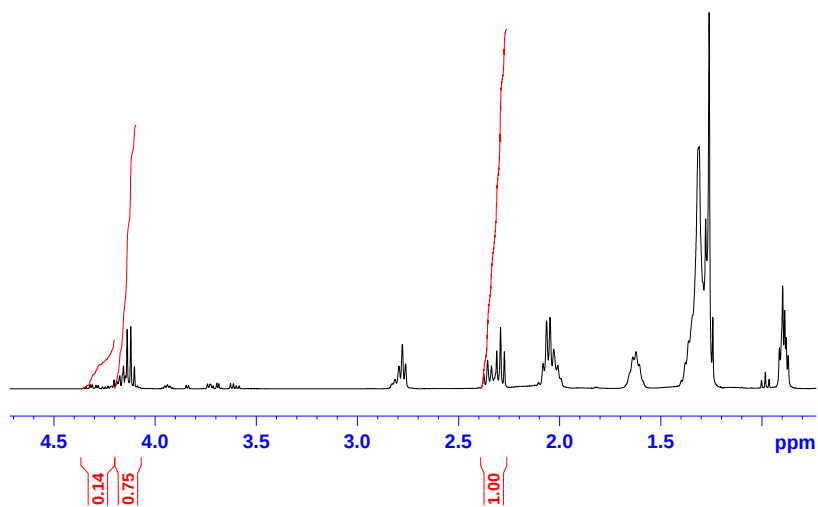
## ■ 9E



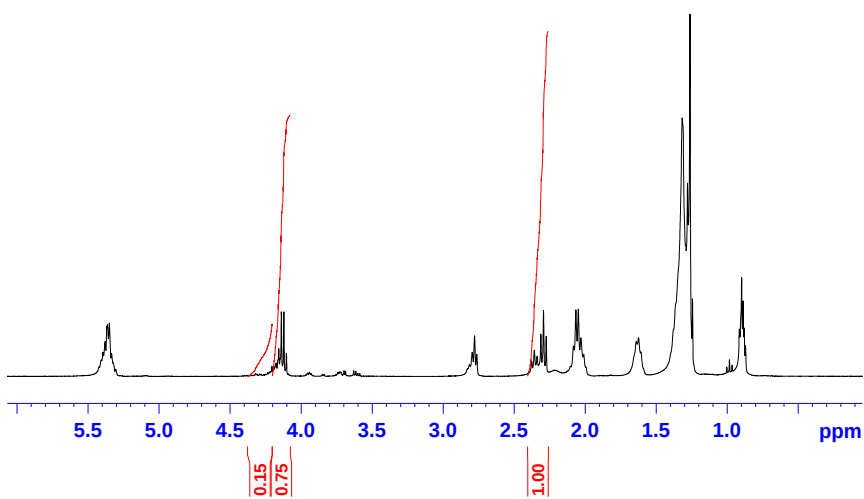
## ■ 10E



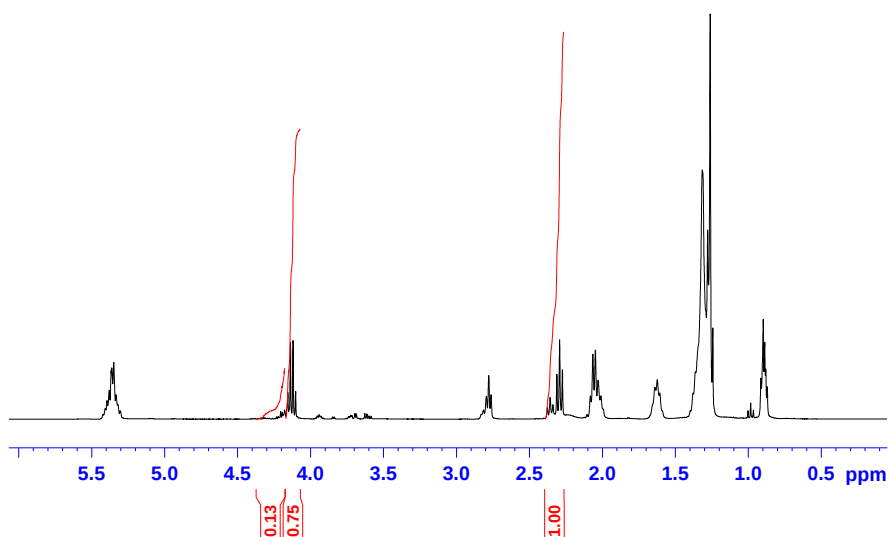
## ■ 11E



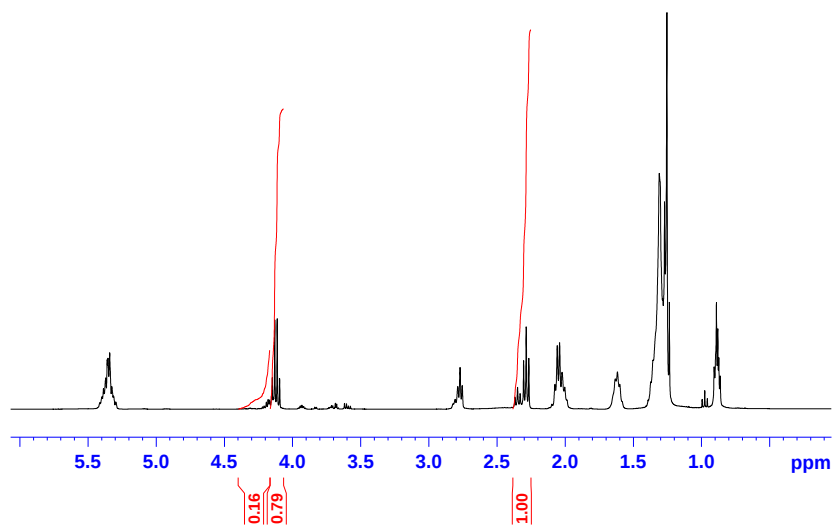
## ■ 12E



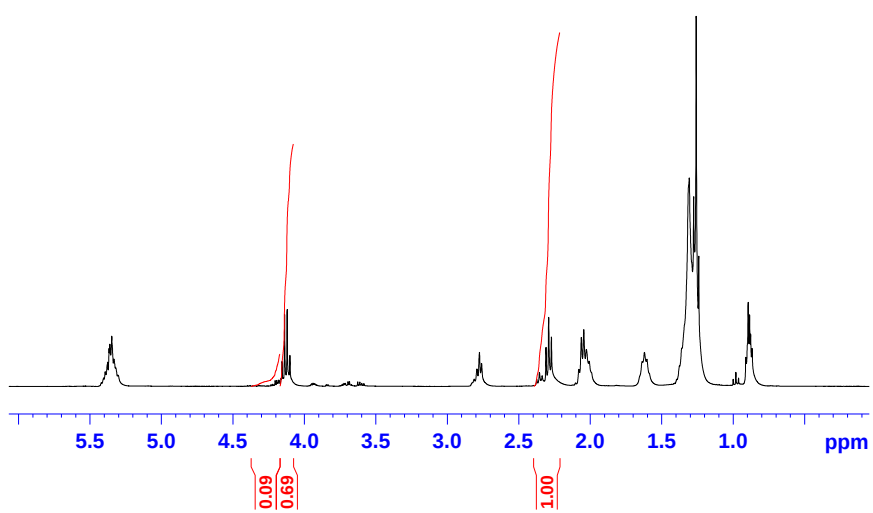
## ■ 13E



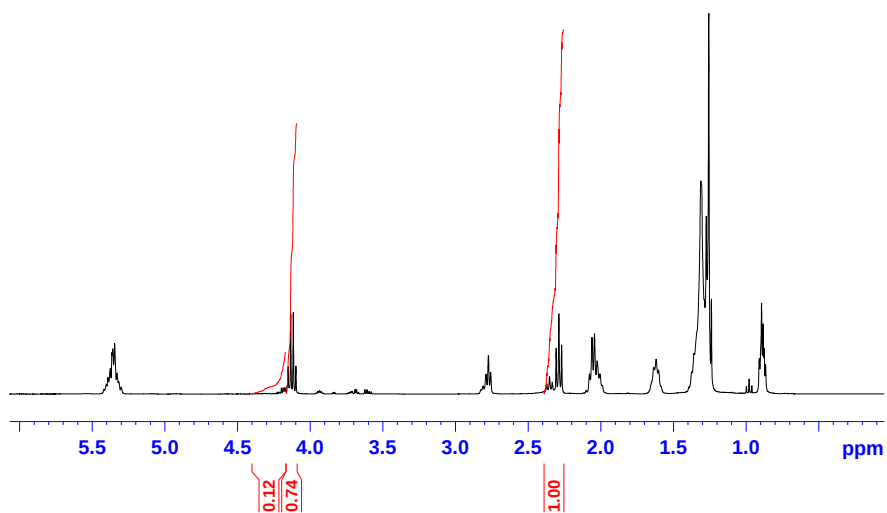
## ■ 14E



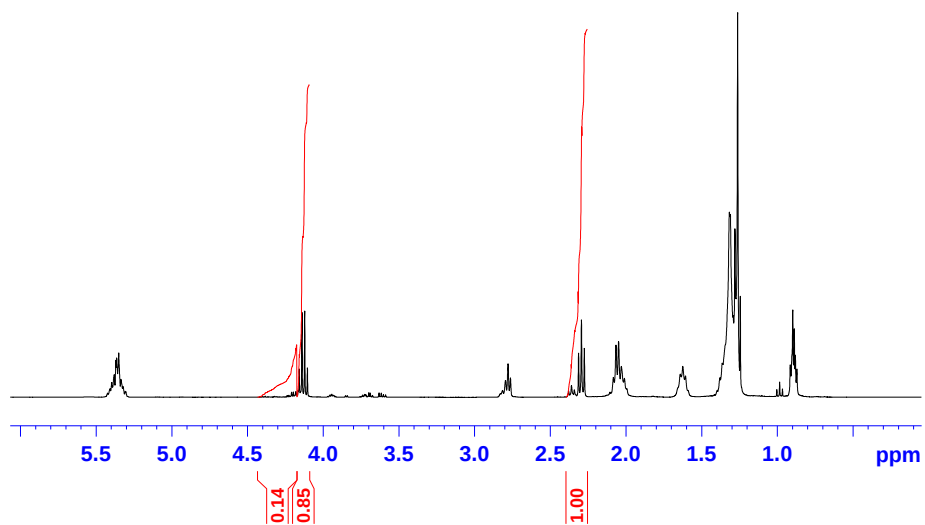
## ■ 15E



## ■ 16E



## ■ 17E



## ■ 18E

18E

