

# Desenvolvimento de método de cromatografia líquida para identificação e quantificação simultânea dos principais produtos da transesterificação de óleo de soja

Diogo Keiji Nakai<sup>1</sup> (diogo.nakai@embrapa.br), Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa<sup>1</sup> (patricia.costa@embrapa.br), José Antônio de Aquino Ribeiro<sup>1</sup> (jose.ribeiro@embrapa.br), Itânia Pinheiro Soares<sup>1</sup> (itania.soares@embrapa.br), Thaís Fabiana Chan Salum<sup>1</sup> (thais.salum@embrapa.br). <sup>1</sup> Embrapa Agroenergia

**Palavras Chave:** *Cromatografia líquida, transesterificação, biodiesel.*

## 1 - Introdução

O biodiesel é o segundo biocombustível mais utilizado no mundo (419,9 x 10<sup>3</sup> barris por dia), atrás somente do etanol combustível (1446,2 x 10<sup>3</sup> barris por dia) (INDEXMUNDI, 2012).

Durante o processo de produção do biodiesel, além dos ésteres (etílicos EE ou metílicos EM) de interesse, diversos intermediários são formados, como ácidos graxos livres (AGL), monoglicerídeos (MAG) e diglicerídeos (DAG). Além disso, residuais de triglicerídeos (TAG) podem também ser encontrados nos produtos finais. Para todos esses compostos existem valores limites que a legislação vigente permite. O parâmetro mais comum da análise de qualidade de biodiesel é o teor de éster. No Brasil o teor mínimo de ésteres (metílicos ou etílicos) é de 96,5% (BRASIL, 2014). O método usual para a determinação desse teor é a cromatografia gasosa. Porém essa metodologia apresenta algumas desvantagens como a necessidade de derivatização de amostras não voláteis. Além disso, amostras com baixos teores de ésteres oferecem riscos às colunas cromatográficas utilizadas (PACHECO *et al.*, 2014; PRADOS *et al.*, 2012). Essas desvantagens são eliminadas ao se utilizar a cromatografia líquida.

O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento inicial de uma metodologia de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) com detector de espalhamento de luz (ELSD) para o monitoramento de reações de transesterificação com baixos rendimentos de ésteres ou com velocidades de reação mais lentas que a catálise homogênea padrão. E que assim seja possível quantificar de maneira prática, rápida e simultânea os principais produtos formados durante a reação. Para isso foram utilizados 22 analitos, dentre eles 5 ACG, 4 MAG, 5 EM, 5 EE e 4 DAG, além do próprio óleo de soja.

## 2 - Material e Métodos

Foram utilizados padrões e solventes comerciais da marca Sigma-Aldrich. Para a cromatografia líquida foram utilizados os seguintes solventes: 2-propanol (650447), hexano (650552), acetona (34998) e ácido trifluoroacético (TFA) (302031). E foram utilizados os seguintes padrões: ácido palmítico (76119), ácido esteárico (85679), ácido oleico (75090), ácido linoleico (62230), ácido linolênico (L2376), monopalmitina (M7890), monoestearina (M2015), monooleína (M7755), monolinoleína (M7640), 1,2/1,3-dipalmitina (D2636), 1,3-diesterina (D8269), 1,3-dilinoleína (D9508), palmitato de

etila (67107), estearato de etila (18337), oleato de etila (55441), linoleato de etila (73539), linoleato de etila (L2601), palmitato de metila (P5177), estearato de metila (S5376), oleato de metila (311111), linoleato de etila (L1876), linolenato de metila (L2626) e óleo de soja refinado (Soya, Bünge).

Para o desenvolvimento deste método foi utilizado um sistema de cromatografia líquida ACQUITY UPLC® H-class da Waters composto de um Gerenciador Quaternário de Solvente, Gerenciador de Amostras, Gerenciador de Coluna com uma coluna UPLC® HSS C18, e um Detector Evaporativo de Espalhamento de Luz (ELSD), todos controlados pelo software Empower® 2.

Foram determinados, em triplicata, os seguintes parâmetros para cada analito: tempo de retenção (TR), linearidade (R<sup>2</sup>), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão (RSD) e exatidão. Para a linearidade foram utilizadas 7 concentrações diferentes, para cada analito, sendo que a menor concentração foi o LQ e a maior cerca de 3 mg/ml. Para o limite de detecção e quantificação determinou-se concentrações de cada analito em que a relação sinal/ruído (S/N) estivessem entre 3 e 10 para o LD e maior que 10 para o LQ. Já a precisão e a exatidão foram determinadas em 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto).

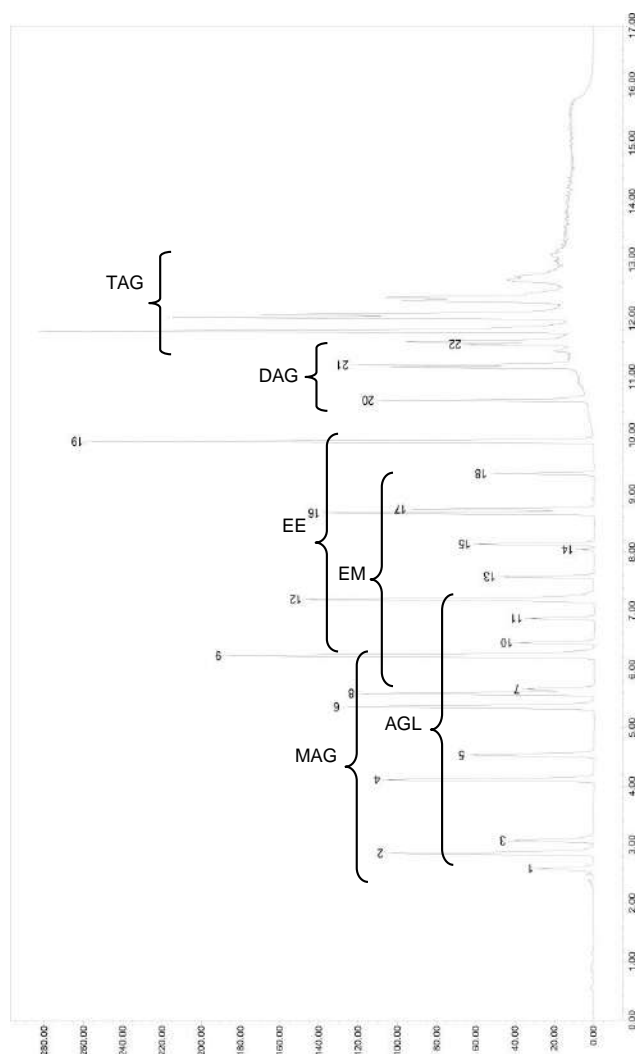
## 3 - Resultados e Discussão

Os resultados preliminares mostram que foi obtida uma boa separação de todos os 22 analitos e o óleo de soja num tempo total de 17 min como mostra a figura 1. Em especial, foi obtida com sucesso a separação de MAGs e AGLs que, em muitos métodos, há coeluição.

A tabela 1, por sua vez, complementa a figura 1 identificando os picos com seus respectivos tempos de retenção (TR) e ordem de eluição (OE).

A linearidade (R<sup>2</sup>) de todos os 22 analitos foi superior a 0,99, o que é satisfatório tratando-se do detector utilizado. Os limites de detecção se mostraram entre 29 e 307 ng, enquanto os limites de quantificação entre 48 e 614 ng. Já a precisão (RSD) se mostrou satisfatória para todos os 22 analitos ficando entre 0,3 e 6,58% e a exatidão entre 81,6 a 119,9%. Os extremos de precisão e exatidão do método se encontraram em concentrações próximas ao LQ.

Neste estudo preliminar, o óleo de soja refinado (TAG) somente teve seu tempo de retenção determinado. Para a determinação dos demais parâmetros é necessário utilizar padrões analíticos de cada triglicerídeo contido no óleo de soja refinado, o que foga do objetivo deste estudo.



**Figura 1.** Perfil de eluição dos 22 analitos e óleo de soja refinado (TAG) submetidos ao método desenvolvido.

**Tabela 1.** Ordem e tempo de eluição (OE e TR) dos analitos e do óleo de soja refinado (TAG).

OE	Nome	TR (min)
1	Monopalmitina	2,592
2	Ácido Linolênico	2,851
3	Monolinoleína	3,069
4	Ácido Linoleico	4,109
5	Monoleína	4,535
6	Ácido palmítico	5,354
7	Linolenato de metila	5,584
8	Ácido oleico	5,660
9	Monoestearina	6,233
10	Linolenato de etila	6,453
11	Linoleato de metila	6,870
12	Ácido esteárico	7,194
13	Linoleato de etila	7,580
14	Palmitato de metila	8,044
15	Oleato de metila	8,139

16	Palmitato de etila	8,670
17	Oleato de etila	8,734
18	Estearato de metila	9,340
19	Estearato de etila	9,895
20	1.3-dioleína	10,596
21	1.2/1.3-dipalmitina	11,202
22	1.3-diestearina	11,553
Óleo de soja refinado (TAG)		> 11,553

#### 4 – Conclusões

O desenvolvimento inicial deste método de cromatografia líquida para a identificação e quantificação simultânea dos principais produtos da transesterificação de óleo de soja, seja a partir de etanol ou metanol, foi concluído com sucesso.

O método mostrou-se sensível, rápido, simples e robusto, sendo viável para o monitoramento em uma única análise de reações de transesterificação sem a necessidade etapas preliminares complexas de preparo de amostra ou múltiplas análises. Há de se salientar que o método em questão possui um limitador, que é a necessidade de uma nova curva de calibração para cada analito após cada batelada de análises. Isso se deve ao detector utilizado, que possui grandes variações de intensidade de resposta após ser desligado e ligado novamente. Tal desvantagem poderia ser contornada utilizando-se um detector alternativo como o de Arranjo de Fotodiodo (PDA), porém os compostos sem insaturações não seriam detectados.

De maneira geral, existem oportunidades para otimizações do método que poderão ser realizadas em trabalhos futuros para redução de tempo de análise, melhoria na resolução e diminuição do gasto de solventes.

#### 5 – Agradecimentos

Embrapa, FINEP e FAPDF.

#### 6 - Bibliografia

- BRASIL. RESOLUÇÃO ANP Nº 45, DE 25 de agosto de 2014. Disponível em: <<http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2014/agosto&item=rnp-45-2014>>. Acesso em: 07 ago. 2019.
- INDEX MUNDI (2012). Disponível em: <<https://www.indexmundi.com/>>. Acesso em: 07 ago. 2019.
- PACHECO, C.; PALLA, C. A.; CRAPISTE, G.; CARRÍN, M.; *Simultaneous Quantitation of FFA, MAG, DAG, and TAG in Enzymatically Modified Vegetable Oils and Fats. Food Analytical Methods* **2014**, 7, 2013–2022
- PRADOS, C. P.; REZENDE, D. R.; BATISTA, L. R.; ALVES, M. I.; FILHO, N. R. A.; *Simultaneous gas chromatographic analysis of total esters, mono-, di- and triacylglycerides and free and total glycerol in methyl or ethyl biodiesel. Fuel* **2012**, 96, 476–481.