

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

Programa de Engenharia de Processos Químicos e
Bioquímicos

**TRANSPOSIÇÃO DE ESCALA DA CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA SEMIPREPARATIVA NA OBTENÇÃO DE
FRAÇÕES DE ACILGLICERÓIS**

DANIELLE IGNÁCIO MANÇANO DE MATTOS

RIO DE JANEIRO
Setembro de 2019

DANIELLE IGNÁCIO MANÇANO DE MATTOS

TRANSPOSIÇÃO DE ESCALA DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
SEMIPREPARATIVA NA OBTENÇÃO DE FRAÇÕES DE
ACILGLICERÓIS

Dissertação submetida ao Corpo Docente
do Curso de Pós-Graduação em
Engenharia de Processos Químicos e
Bioquímicos da Escola de Química da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários para
a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

ORIENTADORES: Dr. Luiz Antonio d'Avila (EQ/UFRJ)

Dr. José Luiz Mazzei da Costa (Farmanguinhos/FIOCRUZ)

RIO DE JANEIRO
Setembro de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

M444t Mattos, Danielle Ignácio Mançano de
Transposição de escala da cromatografia líquida
semipreparativa na obtenção de frações de
acilgliceróis / Danielle Ignácio Mançano de Mattos. -
Rio de Janeiro, 2019.
97 f.

Orientador: Luiz Antonio d' Avila.
Coorientador: José Luiz Mazzei da Costa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Processos Químicos e
Bioquímicos, 2019.

1. Acilgliceróis. 2. Glicerólise. 3. Cromatografia
Líquida Semipreparativa. 4. Transposição de Escala.
I. d' Avila, Luiz Antonio, orient. II. Costa, José
Luiz Mazzei da, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

DANIELLE IGNÁCIO MANÇANO DE MATTOS

**TRANSPOSIÇÃO DE ESCALA DA CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA SEMIPREPARATIVA NA OBTENÇÃO DE FRAÇÕES
DE ACILGLICERÓIS**

Dissertação submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em ____ de _____ de 2019 por:

Luiz Antonio d'Avila, D. Sc., EQ/UFRJ (Orientador - presidente da banca)

José Luiz Mazzei da Costa, D. Sc., Farmanguinhos/FIOCRUZ
(Coorientador)

Débora França de Andrade, D. Sc., IQ/UFRJ

Amaro Gomes Barreto Júnior, D. Sc., EQ/UFRJ

Dedicatória

Aos meus pais, Márcia e Silvio (*in memoriam*), e aos meus irmãos, Bruno e Junior; sem vocês eu não teria conseguido alcançar essa etapa.

“There is no greater weapon than
knowledge and no greater source of
knowledge than the written word.”

Malala Yousafzai

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Marcia e Silvio (*in memoriam*) e aos meus irmãos Bruno e Silvio Junior que nos momentos de conquistas e dificuldades, em todas etapas da minha vida, estiveram sempre presentes me incentivando com palavras de conforto e carinho.

Aos meus familiares Camila, Fernanda, Rafaela, José Eduardo, Luiz e Sandra, que me apoiaram e me incentivaram desde o início dessa jornada pela UFRJ e me ajudaram a alcançar mais um objetivo.

Aos amigos Amanda, Camila, Gabriel, Gutierri, Rodrigo e Thamara, que me apoiaram durante o mestrado. Agradeço pelos momentos de risos e alegrias que tornaram essa jornada pela UFRJ ainda mais agradável e especial.

Ao meu orientador Professor d'Avila, pelos momentos de ensinamento, apoio, paciência, atenção, dedicação e, sobretudo, pela oportunidade de me permitir alcançar mais um importante objetivo.

Ao meu coorientador, José Luiz Mazzei da Costa, agradeço pelas ideias, dedicação e ensinamentos, que contribuíram significativamente para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Combustíveis e Derivados de Petróleo - LABCOM/EQ/UFRJ pela disponibilização de toda infraestrutura necessária.

Aos amigos do LABCOM, em especial à Gisele Borges e Kissya Kropf pelas análises de cromatografia a gás.

Aos colegas do LABCOM Subsolo, em especial à Cristiane Gimenes, Rafael Cavalcante, Pamella Nazareth, Renato Carvalho, Renan Muniz, Juliane Natalizi, Daniel Cozendey e Sheila Martins pelas conversas, apoio, ideias, cafés e ensinamentos, sem os quais esse trabalho não teria sido possível.

Aos colegas de trabalho da ICONIC Lubrificantes – todos os membros da Supervisão de Controle de Qualidade, da Supervisão de Pesquisa e Desenvolvimento de Produto e da Coordenadoria de Serviços Técnicos – e a tantos outros que tornaram a experiência do mestrado mais agradável por estarem sempre dispostos a ajudar, desde as caronas até em transmitir o conhecimento e experiência de que dispõem, solidariedade, aprendizado e amizade.

Aos membros da banca examinadora, por participarem da avaliação deste trabalho.

E por fim, a todos que direta e indiretamente colaboraram na condução e realização do presente trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

MATTOS, Danielle Ignácio Mançano de. **Transposição de escala da cromatografia líquida semipreparativa na obtenção de frações de acilgliceróis.** Rio de Janeiro, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A partir da inserção do biodiesel na matriz energética brasileira, se fez necessário assegurar sua qualidade ao longo de toda a cadeia produtiva. O biodiesel é produzido por meio da reação de transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais.

A transesterificação ocorre por meio de reações sucessivas, tendo monoacilgliceróis (MAG) e diacilgliceróis (DAG) como produtos intermediários e a glicerina (GL) como subproduto. A quantificação desses constituintes e de triacilgliceróis (TAG) não reagido no controle de qualidade de biodiesel é realizada pela técnica de cromatografia a gás (CG). Essa análise de CG faz uso de padrões dessas classes de acilgliceróis que, por conta de sua elevada pureza implicam em um alto custo de aquisição.

O presente trabalho visou desenvolver um processo de produção de frações ricas de MAG e DAG, a partir da reação de glicerólise do óleo de soja, seguida da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na qual modelos matemáticos foram aplicados na simulação de separações para previsão e planejamento de transposição de escala visando o isolamento das classes de acilgliceróis. Nesse trabalho foram aplicados dois tipos de transposição (dimensão da coluna e volume de injeção). No primeiro caso foi aplicada a transposição direta e no segundo caso foi aplicado o modelo de momento estatístico de Stenberg. Para o segundo tipo de transposição, os parâmetros (tempo de retenção e largura dos picos à meia altura) foram estimados a partir da deconvolução dos picos pelo programa MagicPlot e os parâmetros foram verificados por meio da expressão de momento estatístico de Van Deemter.

Nesse trabalho, a mistura bruta de MAG e DAG foi preparada pela reação de glicerólise do óleo de soja. Para o isolamento das classes de acilgliceróis (MAG e DAG) se utilizou a fase móvel em programação gradiente na coluna Kinetex em temperatura ambiente. A caracterização das frações recolhidas foi avaliada por um método de CG desenvolvido especificamente para a matriz trabalhada, uma vez que o método de referência (ASTM D6584, 2017) é aplicável para análise de matrizes com baixas concentrações de MAG e DAG. Também foi possível separar a classe de monoacilgliceróis sem contaminação com outras classes, utilizando fase móvel isocrática (55% metanol + 45% *i*-propanol:*n*-hexano 5:4, em volume) e caracterizar essas frações recolhidas pelo método de CG e CLAE. Com isso, foi possível obter sucesso na transposição de escala pela metodologia aplicada.

Palavras-chaves: Acilgliceróis, Glicerólise, Cromatografia Líquida Semipreparativa, Transposição de Escala.

ABSTRACT

MATTOS, Danielle Ignácio Mançano de. **Scale up of semipreparative liquid chromatography in obtaining acylglycerol fractions.** Rio de Janeiro, 2019. Dissertation (Master of Sciences) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

From the insertion of biodiesel in the Brazilian energy matrix, it was necessary to ensure its quality throughout the entire production chain. Biodiesel is produced by the transesterification reaction of vegetable or animal fats.

Transesterification occurs through successive reactions having monoacylglycerols (MAG) and diacylglycerols (DAG) as intermediates products and glycerin (GL) as a byproduct. The quantification of these constituents and of unreacted triglycerides (TAG) in biodiesel quality control is performed by gas chromatography (GC) technique. This GC analysis employs standards of these classes of acylglycerols implying a high cost of acquisition due to their high purity.

The present work aimed to develop a process producing MAG and DAG-rich fractions from the reaction of glycerolysis of soybean oil, followed by high performance liquid chromatography (HPLC), in which mathematical models were applied in the simulation of separations to predict and to plan scale up at the isolation of the acylglycerol classes. In this work, two types of transposition were applied (column size and injection volume). In the first case, the direct transposition was applied and in the second case the Stenberg statistical moment model was done. For the second type of transposition, the parameters (retention time and peak width at half height) were estimated from the deconvolution of the peaks by the MagicPlot program and the parameters were verified using the Van Deemter statistical moment expression.

In this work, the crude mixture of MAG and DAG was prepared by the glycerolysis reaction of soybean oil. For the isolation of the acylglycerol classes (MAG and DAG), a gradient of the mobile phase was programmed in the Kinetex column at room temperature. The characterization of the collected fractions was performed by a GC method developed specifically for the worked matrix, since the reference method (ASTM D6584, 2017) is applicable for analysis of matrices with low MAG and DAG concentrations. It was also possible to isolate the monoacylglycerol class without contamination with other classes using isocratic programming of mobile phase (55% methanol + 45% *i*-propanol: *n*-hexane 5:4 by volume) and characterize these fractions collected by GC and CLAE. Thus, the transposition of scale by the applied methodology was successful.

Keywords: Glycerolysis, Acylglycerols, Semipreparative Liquid Chromatograph, Scale up.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reações consecutivas reversíveis para transesterificação dos triacilgliceróis (TAG). Os grupos R', R'' e R''' representam as cadeias hidrocarbônicas do ácido graxo saturado ou insaturado, podendo ser iguais ou diferentes (reproduzido de SANTOS, 2015).....	1
Figura 2: Representação das reações envolvidas na glicerólise de triacilgliceróis (adaptado de CARVALHO, 2018).	6
Figura 3: Isotermas de adsorção da concentração de um componente entre as fases móvel e estacionária: (a) convexa e (b) côncava (reproduzido de COSTA, 2004).	10
Figura 4: Perfis de injeção estudados para a função $f(t_a)$ da expressão genérica (Eq. 4) dos modelos de momentos estatísticos: a. pulso imediato (item 3.5.3) e b. pulso retangular (item 3.5.4) (reproduzido de COSTA, 2004).....	14
Figura 5: Fluxograma simplificado do estudo realizado.	22
Figura 6: Diagrama de fluxo da metodologia simplificada de transposição de escala usando modelos utilizados neste trabalho (adaptado de COSTA, 2004).....	24
Figura 7: Cromatograma do produto da reação de glicerólise analisado por CG em condições estabelecidas no item 4.8, sendo MAG (monoacilgliceróis), DAG (diacilgliceróis) e TAG (triacilgliceróis). O assinalamento seguiu a ASTM D6584 (2017).	27
Figura 8: Cromatograma típico no CG do produto da reação de glicerólise com diluição de 2 mg em 100 μ L de piridina. O assinalamento seguiu a ASTM D6584 (2017).	28
Figura 9: Cromatograma do produto da reação de glicerólise analisado por CLAE-UV em condições descritas no item 4.4.1, sendo MAG (monoacilgliceróis), DAG (diacilgliceróis) e TAG (triacilgliceróis). Assinalamentos seguindo Carvalho (2018).....	30
Figura 10: Cromatograma experimental, obtido por CLAE-UV, da separação das classes (Coluna 2) - Fase móvel gradiente – V_{inj} : 30 μ L.	32
Figura 11: Deconvolução dos picos do cromatograma da separação das classes de acilgliceróis (Coluna 2) – Fase móvel gradiente.....	33
Figura 12: Cromatograma simulado pelo modelo de Van Deemter e colaboradores para a separação das classes (Coluna 2) – Fase móvel gradiente.	34
Figura 13: Cromatogramas simulados com fase móvel gradiente - Coluna 2. Com os volumes de injeção de 80 μ L (A) e 150 μ L (B).	35
Figura 14: Cromatogramas experimentais com fase móvel gradiente - Coluna 2. Sendo os volumes de injeção de 80 μ L (A) e 150 μ L (B) respectivamente. Barras abaixo do cromatograma se referem às janelas de coleta das frações FG.1 e FG.2.	37
Figura 15: Cromatogramas de CG das frações coletadas na eluição cromatográfica representada na Figura 14. Tricaprina é um padrão Interno.....	38
Figura 16: Ampliação na região de eluição dos MAG nos cromatogramas da Figura 15.	38
Figura 17: Ampliação na região de eluição dos DAG nos cromatogramas da Figura 15.....	39
Figura 18: Ampliação na região de eluição dos TAG nos cromatogramas da Figura 15. Trioleína é um padrão de TAG somente para observação do tempo de retenção dessa classe.	39
Figura 19: Cromatogramas experimentais da separação das classes de acilgliceróis empregando as colunas 1 (A) e 2 (B) - Fase móvel isocrática 1.	41
Figura 20: Deconvolução dos picos dos cromatogramas da separação das classes de acilgliceróis (A - coluna 1 e B - coluna 2) – Fase móvel isocrática 1.....	43
Figura 21: Cromatogramas simulados pelo modelo de Van Deemter e colaboradores para a separação das classes (sendo A - Coluna 1 e B – Coluna 2) – Fase móvel isocrática 1.....	45

Figura 22: Cromatogramas simulados na condição da fase móvel isocrática 1 - Coluna 1 (sendo A - $V_{inj} = 50 \mu\text{L}$ e B - $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$).....	46
Figura 23: Cromatogramas simulados na condição da fase móvel isocrática 1 - Coluna 1 (sendo A - $V_{inj} = 200 \mu\text{L}$, B - $V_{inj} = 300 \mu\text{L}$ e C - $V_{inj} = 500 \mu\text{L}$).....	47
Figura 24: Cromatogramas experimentais na condição de fase móvel isocrática 1 - Coluna 1 (sendo A - $V_{inj} = 50 \mu\text{L}$ e B - $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$).....	48
Figura 25: Cromatogramas experimentais na condição de fase móvel isocrática 1 - Coluna 1 (sendo A - $V_{inj} = 200 \mu\text{L}$, B - $V_{inj} = 300 \mu\text{L}$ e C - $V_{inj} = 500 \mu\text{L}$).....	49
Figura 26: Cromatogramas simulados na condição da fase móvel isocrática 1 - Coluna 2 (sendo A - $V_{inj} = 50 \mu\text{L}$, B - $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ e C - $V_{inj} = 200 \mu\text{L}$).....	51
Figura 27: Cromatogramas simulados na condição da fase móvel isocrática 1 - Coluna 2 (sendo A - $V_{inj} = 500 \mu\text{L}$, B - $V_{inj} = 1000 \mu\text{L}$ e C - $V_{inj} = 2000 \mu\text{L}$).....	52
Figura 28: Cromatogramas experimentais com fase móvel isocrática 1 - Coluna 2 (sendo A - $V_{inj} = 50 \mu\text{L}$, B - $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ e C - $V_{inj} = 200 \mu\text{L}$).....	54
Figura 29: Cromatogramas experimentais com fase móvel isocrática 1 - Coluna 2 (sendo A - $V_{inj} = 500 \mu\text{L}$, B - $V_{inj} = 1000 \mu\text{L}$ e C - $V_{inj} = 2000 \mu\text{L}$).....	55
Figura 30: Caracterização da fração coletada por CLAE – em condições descritas no item 4.2, assinalamento seguindo Carvalho (2018).....	56
Figura 31: Cromatograma experimental representativo da sequência de injeções com fase móvel isocrática 1 - Coluna 2 ($V_{inj} = 150 \mu\text{L}$).....	57
Figura 32: Cromatogramas obtidos por CG das frações 1 e 2 coletadas na eluição cromatográfica representada na Figura 31. Tricaprina é um padrão interno.....	58
Figura 33: Ampliação na região de eluição dos MAG nos cromatogramas da Figura 32.....	58
Figura 34: Ampliação na região de eluição dos DAG nos cromatogramas da Figura 32.....	59
Figura 35: Ampliação na região de eluição dos TAG nos cromatogramas da Figura 32. Trioleína é um padrão de TAG somente para observação do tempo de retenção dessa classe.....	59
Figura 36: Cromatogramas obtidos por CG das frações 3 e 4 coletadas na eluição cromatográfica representada na Figura 31. Tricaprina é um padrão interno.....	60
Figura 37: Ampliação na região de eluição dos MAG nos cromatogramas da Figura 36.....	60
Figura 38: Ampliação na região de eluição dos DAG nos cromatogramas da Figura 36.....	61
Figura 39: Ampliação na região de eluição dos TAG nos cromatogramas da Figura 36. Trioleína é um padrão de TAG somente para observação do tempo de retenção dessa classe.....	61
Figura 40: Cromatograma experimental da separação das classes (Coluna 2), obtido por CLAE-UV - Fase móvel isocrática 2.....	62
Figura 41: Deconvolução dos picos do cromatograma da separação das classes (Coluna 2) – Fase móvel isocrática 2.....	63
Figura 42: Cromatograma simulado pelo modelo de Van Deemter e colaboradores (Coluna 2) – Fase móvel isocrática 2.....	64
Figura 43: Cromatogramas simulados (A e B) com fase móvel isocrática 2 - Coluna 2. Sendo os volumes de injeção de $50 \mu\text{L}$ e $150 \mu\text{L}$, respectivamente.....	65
Figura 44: Cromatogramas experimentais (A e B) com fase móvel isocrática 2 - Coluna 2. Sendo os volumes de injeção de $50 \mu\text{L}$ e $150 \mu\text{L}$, respectivamente.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das colunas cromatográficas de fase C18 aplicadas no presente estudo. ..	21
Tabela 2: Teor de acilgliceróis por CG para o produto de glicerólise do óleo de soja, nas diferentes diluições no ensaio analítico.....	28
Tabela 3: Dados operacionais obtidos por transposição direta.....	31
Tabela 4: Dados cromatográficos da separação das classes pela Coluna 2 – Fase móvel gradiente .	33
Tabela 5: Dados cromatográficos na Coluna 1 – Fase móvel isocrática 1 dos componentes do produto de glicerólise	44
Tabela 6: Dados cromatográficos na Coluna 2 – Fase móvel isocrática 1 dos componentes do produto de glicerólise	44
Tabela 7: Listagem de cromatogramas para separação das classes (Coluna 1) – Fase móvel isocrática 1	46
Tabela 8: Relação de cromatogramas para separação das classes (Coluna 2) – Fase móvel isocrática 1	50
Tabela 9: Resultados de teor das classes acilgliceróis nas frações coletadas - Fase móvel isocrática 1	62
Tabela 10: Dados cromatográficos da separação das classes pela Coluna 2 – Fase móvel isocrática 2	63

LISTA DE SÍMBOLOS

A_c	Área seccional da coluna
C_{inj}	Concentração de injeção
C_M	Concentração de soluto na fase móvel
C_s	Concentração de soluto adsorvido em volume de fase estacionária
d_p	Diâmetro da partícula da fase estacionária
erf	Função erro
F	Vazão da fase móvel
FG.n	Fração n na fase móvel Gradiente
FI1.n	Fração n na fase móvel Isocrática 1
FI2.n	Fração n na fase móvel Isocrática 2
H	Altura do prato teórico da coluna
K	Coefficiente de partição
k	Fator de retenção
K_C	Constante de distribuição linear
L	Comprimento da coluna
N	Número de pratos da coluna
NC_{eq}	Número equivalente de carbonos
NC_t	Número de carbonos totais do acilglicerol
ND_C	Número de ligações duplas
t_{inj}	Tempo de injeção
t_M	Tempo de volume morto
t_R	Tempo de retenção
v	Velocidade da fase móvel
V_{inj}	Volume de injeção

w_b	Largura da base do pico
w_h	Largura do pico a meia altura
p	Preparativa
a	Analítica
β	Razão da fase
ε	Porosidade da coluna
ε_p	Porosidade da partícula
ε_l	Porosidade do leito
ε	Porosidade total da fase estacionária
σ^2	Variância

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
CG	Cromatografia a gás
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada com espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAG	Diacilgliceróis
EN	<i>European Norm</i>
EsMAG	Ésteres metílicos de ácidos graxos
FID	<i>Flame ionization detector</i>
GL	Glicerina
IV	Infravermelho
MAG	Monoacilgliceróis
MME	Ministério de Minas e Energia
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MSTFA	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -trimetilsilil-trifluoroacetamida
PNPB	Programa Nacional de Produção de Biodiesel
TAG	Triacilgliceróis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. A Produção de Monoacilgliceróis e Diacilgliceróis	5
3.2. A Reação de Glicerólise de Triacilgliceróis	6
3.3. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Definições, Vantagens e Conceitos	7
3.3.1. Porosidade	8
3.3.2. Tempo de volume morto.....	8
3.3.3. Tempo de retenção.....	8
3.3.4. Programação de composição da fase móvel	9
3.4. Equilíbrio de Distribuição em Cromatografia Líquida	10
3.5. A Transposição de Escala no Desenvolvimento de Processo por CLAE	11
3.5.1. Transposição direta.....	12
3.5.2. Transposição por modelos de momentos estatísticos	13
3.5.3. O modelo de Van Deemter e colaboradores	14
3.5.4. O modelo descritivo de Stenberg.....	15
3.6. A Separação das Classes de Acilgliceróis por CLAE	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. A Reação de Glicerólise de Triacilgliceróis	20
4.2. As Análises por CLAE	21
4.3. Fluxograma do Estudo	22
4.4. A Separação das Classes de Acilgliceróis	22
4.4.1. Fase móvel gradiente	22
4.4.2. Fase móvel isocrática 1.....	23
4.4.3. Fase móvel isocrática 2.....	23
4.5. Deconvolução dos Sinais	23
4.6. Método Computacional de Simulação da Transposição	23

4.7. Recolhimento das Frações	25
4.8. As Análises do Produto de Reação de Glicerólise e das Frações Isoladas por Cromatografia a Gás	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. Caracterização do Produto da Reação de Glicerólise	26
5.2. A Separação das Classes de Acilgliceróis	31
5.2.1. Fase móvel gradiente	31
5.2.2. Fase móvel isocrática 1.....	41
5.2.3. Fase móvel isocrática 2.....	62
6. CONCLUSÕES	68
7. PERSPECTIVAS	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
9. APÊNDICE	76
10. ANEXO	79

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) o biodiesel é definido como um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de matérias graxas, de gorduras animais de origem vegetal ou animal, que atendam às especificações contidas no Regulamento Técnico de sua Resolução (Resolução ANP N° 45, 2014).

Na **Figura 1** são apresentadas as reações envolvidas na transesterificação, por meio da qual normalmente o biodiesel tem sido produzido no Brasil (MEHER; SAGAR; NAIK, 2006; SUAREZ, 2016).

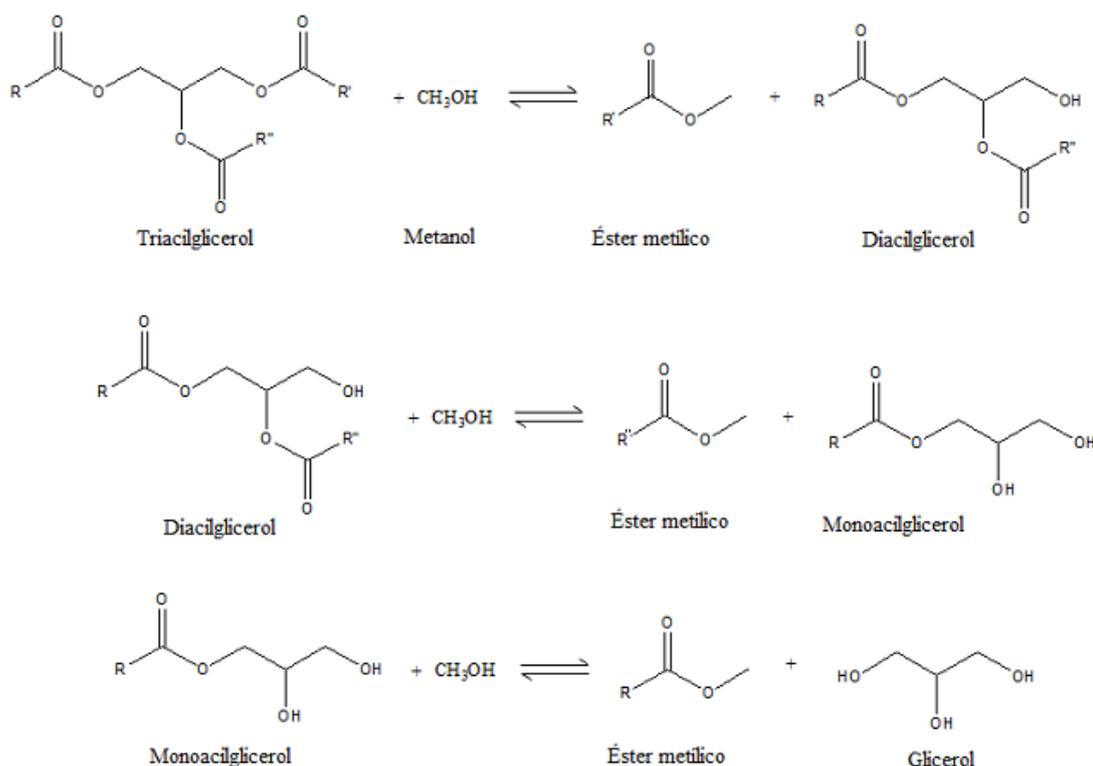


Figura 1: Reações consecutivas reversíveis para transesterificação dos triacilgliceróis (TAG). Os grupos R', R'' e R''' representam as cadeias hidrocarbônicas do ácido graxo saturado ou insaturado, podendo ser iguais ou diferentes (reproduzido de SANTOS, 2015).

Como é possível observar na **Figura 1**, a transesterificação ocorre por meio de reações sucessivas, tendo diacilgliceróis (DAG) e monoacilgliceróis (MAG) como produtos intermediários e a glicerina (GL) como subproduto, além de triacilgliceróis (TAG) não reagido. Por isso, quando a reação de transesterificação é incompleta, observa-se a presença de MAG, DAG e TAG no biodiesel. Os acilgliceróis residuais podem levar a problemas operacionais severos quando o biodiesel é utilizado nos motores, incluindo a formação de depósitos, entupimento de filtro e deterioração do combustível (HOLČAPEK *et al.*, 1999; MITTELBAACH *et al.*, 1983; PLANK; LORBEER, 1995). Desta forma, a necessidade de monitorar a qualidade do biodiesel adicionado ao óleo diesel é de extrema importância.

A ANP estabelece, por meio da resolução ANP Nº 45, de 25/08/2014, os parâmetros de qualidade do biodiesel, entre estes os teores máximos para glicerol livre, MAG, DAG e TAG. Os métodos regulamentados para a determinação desses parâmetros são os descritos pela *American Society for Testing and Materials* (ASTM) D6584 e/ou pela Norma Europeia (EN) 14105, que aplicam a cromatografia a gás (CG) (ANP, 2014).

Essas metodologias de CG possuem uma etapa de derivatização com o reagente silanizante MSTFA (*N*-metil-*N*-trimetilsilil-trifluoroacetamida) e a quantificação dos MAG, DAG e TAG é feita por padronização interna com tricaprina. Além disso, para obter os tempos de retenção da região do cromatograma de cada classe de acilglicerol são utilizados padrões de monooleína, dioleína e trioleína. Por sua elevada pureza ($\geq 99\%$), esses padrões possuem um alto custo de aquisição (ASTM, 2017).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) oferece algumas vantagens quando comparadas a CG, como a não necessidade da etapa de derivatização e a possibilidade de analisar MAG, DAG, TAG e os ésteres em uma mesma análise por padronização externa, também com vantagem econômica, e de menor propagação de erros, sobre a padronização interna (ANDRADE, 2011).

A CLAE também pode ser aplicada na separação e isolamento de materiais químicos de referência, principalmente nas escalas semi-preparativa e preparativa (COLLINS, 2007; LETTER, 1992; TOSTES; SILVA; KUSTER, 2019).

Visto que a obtenção de frações ricas nas principais classes presentes no biodiesel é de fundamental importância para o controle de qualidade do biodiesel, a técnica de CLAE semipreparativa pode ser uma ferramenta útil para obtê-los em escala laboratorial, principalmente para os laboratórios de controle de qualidade de biodiesel.

Para a obtenção de material rico em acilgliceróis, Blatt (2014) desenvolveu uma metodologia partindo do biodiesel de baixa conversão e empregou a cromatografia líquida em coluna aberta para a separação/isolamento das classes, porém esse produto possui baixo teor das classes de acilgliceróis. Já Carvalho (2018) realizou essa separação partindo do produto de reação de glicerólise otimizada, a qual possui um maior teor dessas classes.

Em um planejamento de *scale up* em CLAE os parâmetros são estimados em escala reduzida de concentração e volume na injeção, caracterizando condição de cromatografia linear e, após isso, é realizada a transposição de escala. A transposição direta é recomendada pelos fabricantes de colunas cromatográficas e é o planejamento mais simples e rápido de transposição, mas sem previsão para otimização da maioria das variáveis do processo. Para o desenvolvimento de processos cromatográficos, a aplicação de modelos matemáticos vem sendo utilizada para otimizar as condições cromatográficas e estimar os parâmetros, de forma a prever os resultados da transposição de escala com maior abrangência de parâmetros a serem otimizados (COSTA, 2004; GUIOCHON, 2002).

Com isso, o presente trabalho propõe estudar a transposição de escala por modelos matemáticos na obtenção de frações ricas em MAG e DAG por CLAE semipreparativa da mistura produzida pela reação de glicerólise do óleo de soja.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver processo de produção de frações de monoacilgliceróis e diacilgliceróis a partir da reação de glicerólise seguida de cromatografia líquida semipreparativa de alta eficiência aplicando a transposição de escala por modelos matemáticos.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Produzir material rico em monoacilgliceróis e diacilgliceróis por meio da reação de glicerólise de óleo de soja;
- 2) Estimar os parâmetros cromatográficos: o tempo de retenção e a largura a meia altura dos componentes individuais;
- 3) Aplicar a simulação de separações em CLAE na previsibilidade e planejamento de transposição de escala visando o isolamento dos acilgliceróis;
- 4) Isolar as classes de MAG e DAG, por meio da cromatografia líquida semipreparativa e
- 5) Analisar por CLAE e/ou CG o produto da reação de glicerólise e as frações isoladas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A Produção de Monoacilgliceróis e Diacilgliceróis

Os MAG e DAG são moléculas anfifílicas, biodegradáveis, não tóxicas e biocompatíveis. Essas classes de lipídeos são amplamente utilizadas nas indústrias de cosméticos para melhorar a consistência de cremes e loções e nas indústrias de alimentos, como emulsificantes em margarinas, derivados de leite, doces e molhos ou como suplemento dietético, a exemplo da monolaurina (ITABAIANA JUNIOR, 2013).

A importância dos MAG tem aumentado nos últimos anos devido a eles serem uma das principais derivações do glicerol, coproduto gerado pela indústria do biodiesel, indústria essa que vem aumentando a sua produção no território nacional (ITABAIANA JUNIOR, 2013).

Essas classes de acilgliceróis (MAG e DAG) podem ser obtidas via catálise enzimática ou via catálise química. Neste último caso, os processos mais utilizados para a produção são: esterificação de ácidos graxos com o glicerol, hidrólise de triacilgliceróis e glicerólise de triacilgliceróis (SANTOS; REZENDE, 2012).

A esterificação de ácidos graxos parte de matéria prima de alto custo de aquisição quando comparados aos TAG, das reações de hidrólise e glicerólise, que são provenientes dos óleos vegetais. A hidrólise apresenta baixo rendimento de MAG, pois esses são solúveis em água facilitando a reação até ácidos graxos e, além disso, as reações com a água apresentam maior resistência nas primeiras duas etapas (primeiramente com TAG, depois DAG) devido a problemas de solubilidade entre os reagentes (SANTOS; REZENDE, 2012). Ou seja, a reação de glicerólise possui maior rendimento para obtenção das frações de MAG e DAG (CORMA *et al.*, 1997; NEGI *et al.*, 2007; NOUREDDINI; HARKEY; GUTSMAN, 2004; NOUREDDINI; MEDIKONDURU, 1997; POUILLOUX *et al.*, 1999).

3.2. A Reação de Glicerólise de Triacilgliceróis

Em escala industrial, a produção de MAG ocorre por meio da reação de glicerólise de triacilgliceróis (TAG), que consiste na transesterificação do glicerol com o óleo vegetal na presença de catalisador químico, normalmente alcalino, tais como NaOH, KOH e Ca(OH)₂ (SANTOS; REZENDE, 2012). A **Figura 2** representa as equações envolvidas na reação de glicerólise de óleos.

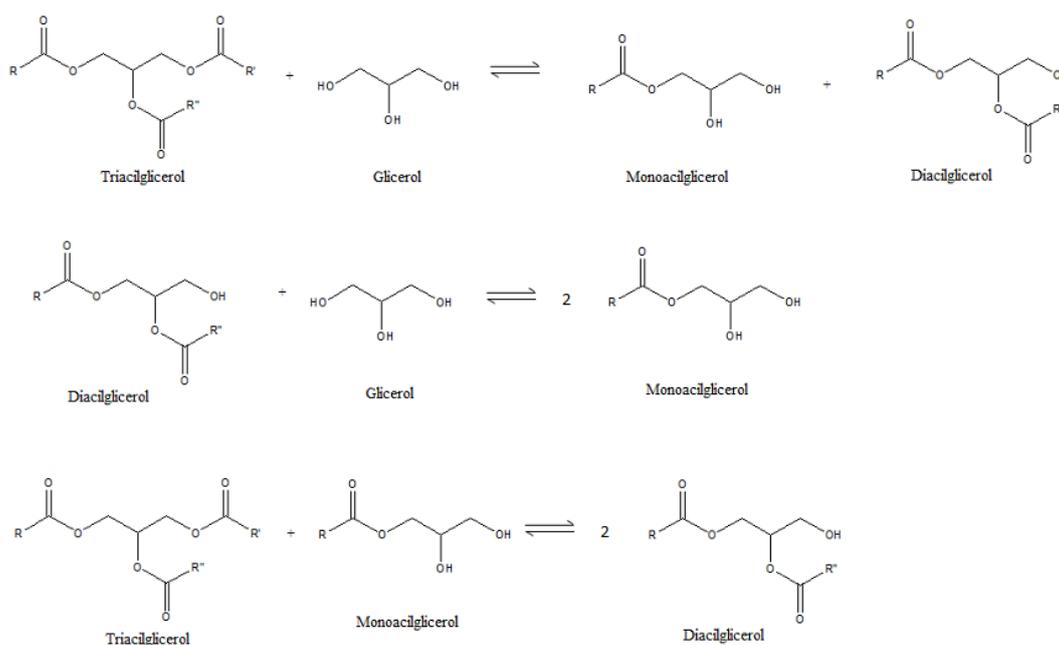


Figura 2: Representação das reações envolvidas na glicerólise de triacilgliceróis (adaptado de CARVALHO, 2018).

Para realizar essa reação, são necessárias altas temperaturas e agitação vigorosa e constante, já que os seus reagentes (glicerol e óleo vegetal) não são miscíveis (CARVALHO, 2018).

Ao final do tempo reacional o sistema é resfriado rapidamente e o catalisador é neutralizado. Os MAG e DAG produzidos estarão localizados na fase orgânica, além de TAG não reagido, separados do glicerol residual. Os rendimentos usuais de MAG e DAG variam entre 45-55% e 38-45%, respectivamente (DAMSTRUP *et al.*, 2005; SANTOS; REZENDE, 2012).

Carvalho (2018) estudou a otimização das condições da reação de glicerólise do óleo de soja usando NaOH como catalisador por meio de um planejamento fatorial a 2 níveis e 3 variáveis, com triplicata do ponto central. Foram estudadas as seguintes variáveis: (i) temperatura (180 °C e 230 °C), (ii) tempo de reação (30 min e 60 min) e (iii) razão molar glicerol:óleo (2:1 e 3:1). As condições que apresentaram rendimentos mais satisfatórios para MAG (46,20%) foram: temperatura de 230 °C, tempo reacional de 30 min e razão molar glicerol:óleo de 3:1.

3.3. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Definições, Vantagens e Conceitos

A cromatografia consiste na separação de componentes de uma mistura quando presente em uma fase móvel fluida em uma fase estacionária (coluna cromatográfica). A separação é governada pela diferença de velocidade de cada componente na fase fluida, decorrente de forças físicas e interações químicas entre os componentes e as duas fases. A cromatografia pode ter algumas classificações, baseando-se na fase estacionária, tipo de fase móvel e mecanismo efetivo de separação (COLLINS, 2007).

A CLAE, no inglês HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), tem sido utilizada para separar e isolar componentes de misturas, quando se requer pureza, rendimento e produtividade. A separação dos componentes na cromatografia se baseia nas diferentes interações físicas e químicas desses com as fases móvel e estacionária (COLLINS, 2007).

Apesar dos métodos padrões para análise de biodiesel serem por CG, a CLAE apresenta as vantagens de menor tempo de preparo da amostra, já que no CG é necessária a derivatização dela. Essa característica está relacionada à pouca volatilidade da amostra não ser um limitante na CLAE (AQUINO NETO; NUNES, 2003). Outra vantagem da CLAE é a baixa temperatura durante a análise, o que reduz o risco de isomerização das ligações duplas das cadeias carbônicas (CZAUDERNA; KOWALCZYK, 2001; LI *et al.*, 2009).

Se faz necessária a revisão de determinados conceitos, que se seguem, relacionados a separação cromatográfica (SEIDEL-MORGENSTERN; SCHULTE; EPPING, 2012) para a melhor compreensão dos termos utilizados ao longo deste trabalho.

3.3.1. Porosidade

A porosidade é a fração de volumes vazios em um determinado sólido. No caso de uma fase estacionária, que preenche uma coluna cromatográfica, podem ser mencionados três tipos de porosidade: das partículas, do leito e total.

A porosidade das partículas (ϵ_p) é calculada como a fração entre o volume de vazios no interior de uma partícula e o volume da partícula inteira.

A porosidade do leito (ϵ_l) se refere ao volume existente entre as partículas em relação ao volume de coluna.

A porosidade total (ϵ), ou porosidade da coluna quando for o caso, é calculada a partir das porosidades das partículas e do leito, conforme **Equação 1**.

$$\epsilon = \epsilon_l + (1 - \epsilon_l)\epsilon_p \quad (1)$$

3.3.2. Tempo de volume morto

O tempo de volume morto (t_M) é definido como o tempo necessário para o deslocamento entre o ponto de injeção e o ponto de detecção de uma substância não retida. Ele é definido pela **Equação 2**, em que L é o comprimento da coluna e v é a velocidade da fase móvel.

$$t_M = \frac{L}{v \times \epsilon} \quad (2)$$

3.3.3. Tempo de retenção

O tempo de retenção (t_R) é definido como o tempo necessário para um determinado componente se deslocar pelo sistema cromatográfico entre o ponto de injeção e o ponto

de detecção, levando em consideração que seu movimento, impulsionado pela fase móvel, é retardado por sua interação seletiva entre as fases estacionária e móvel.

O tempo de retenção é determinado pelo tempo em que a intensidade do sinal seja máxima em condições lineares de cromatografia, tais como em escala analítica.

3.3.4. Programação de composição da fase móvel

Existem três formas de programação de composição da fase móvel: isocrática, gradiente e por etapas.

A programação isocrática consiste em alimentar o sistema cromatográfico com uma composição constante de fase móvel (único ou mistura) ao longo de todo o processo de separação dos componentes da mistura injetada. Essa é a programação preferida em escala preparativa, já que é possível uma reciclagem do solvente utilizado, o que é dificultado na programação gradiente, além de se depender de uma única bomba, em alguns casos, diminuindo investimento inicial e de manutenção. Além disso, é o mais indicado para separar substâncias de estrutura similar (THERMO FISHER, 2018).

A programação por gradiente consiste na alteração da composição do eluente ao longo do processo cromatográfico, o que permite um tempo total menos extenso, implicando em frações mais concentradas à saída da coluna, e uma adequada separação de componentes da mistura com propriedades muito diferentes de interação com a fase estacionária em menos tempo e com menor uso de solvente para eluição (RATHORE; VELAYUDHAN, 2003).

A programação por etapas inicia-se como a isocrática, mas variando a composição da fase móvel em pulsos imediatos, preferencialmente aplicada na separação de proteínas de diferentes pontos isoelétricos e pka. Tanto programação em gradiente quanto por etapas exigem equipamentos mais sofisticados de bombeamento/programação para controlar a variação de composição de fase móvel ao longo do tempo de eluição.

3.4. Equilíbrio de Distribuição em Cromatografia Líquida

As teorias de equilíbrio assumem uma distribuição de uma substância entre a fase móvel e a fase estacionária. Essas teorias predizem de forma efetiva a retenção ao máximo de concentração das substâncias a qualquer volume de injeção, mas não prediz a variância da concentração da substância ao longo da coluna (SEIDEL-MORGENSTERN; SCHULTE; EPPING, 2012).

As equações mais estudadas em cromatografia líquida em fase normal são as de Langmuir, quadrática, de Freundlich e de Levan-Vermeulen. Essas isotermas de distribuição podem ser classificadas como convexas ou côncavas (**Figura 3**) e se aproximam ao comportamento linear a baixas concentrações (SEIDEL-MORGENSTERN; SCHULTE; EPPING, 2012). Para a distribuição em fase reversa, que envolve preferencialmente fenômenos de partição, estudos têm demonstrado que as isotermas são lineares e que a expressão de Langmuir dá um bom ajuste aos dados observados com o aumento da concentração (POPPE, 1993).

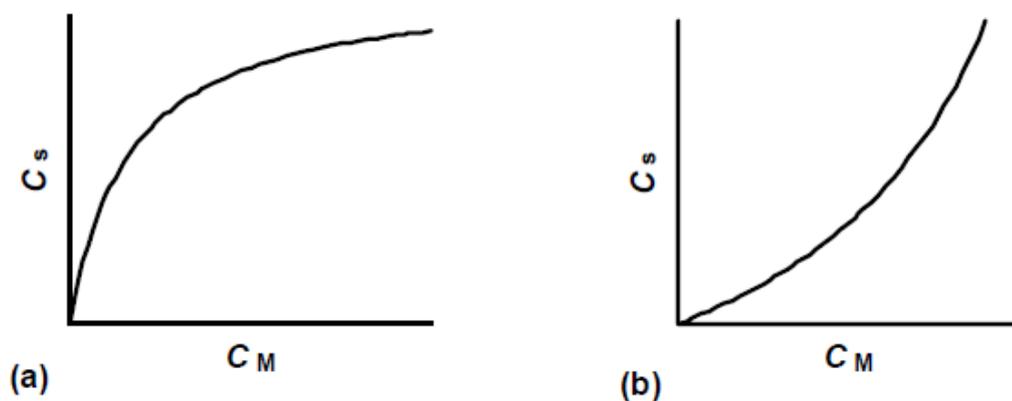


Figura 3: Isotermas de adsorção da concentração de um componente entre as fases móvel e estacionária: (a) convexa e (b) côncava (reproduzido de COSTA, 2004).

O comportamento linear, em concentrações muito baixas (diluição infinita), e expresso pela **Equação 3**, leva em consideração que a razão entre a concentração de soluto interagido com o volume de fase estacionária (C_s) e a concentração do mesmo soluto na fase móvel (C_M) é uma constante de equilíbrio (SEIDEL-MORGENSTERN; SCHULTE; EPPING, 2012). Tal constante de proporcionalidade (K ou K_{eq}) é também chamada de coeficiente de partição ou de distribuição na fase reversa (ETTRE, 1993).

$$K \cdot C_M = C_S \quad (3)$$

No processo cromatográfico caso a retenção seja regida por esse comportamento linear ele é classificado como cromatografia linear. Para esta classificação, alterações na concentração não afetam a altura de prato teórico e a retenção da substância. A constante de distribuição linear (K_C) está relacionada à razão de fase (β) e ao fator de retenção das substâncias (k), segundo as **Equações 4, 5 e 6** (ETTRE, 1993):

$$K_C = \frac{k}{\beta} \quad (4)$$

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad (5)$$

$$\beta = \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \quad (6)$$

3.5. A Transposição de Escala no Desenvolvimento de Processo por CLAE

A separação cromatográfica em escala preparativa envolve custo elevado, principalmente em relação à fase móvel e fase estacionária (coluna). Por isso, as condições ótimas, no que se refere à seletividade e à produtividade, são estabelecidas previamente, em escala analítica, por meio de um estudo de condições de resolução e quantidade de amostra, para que depois seja executada a transposição de escala. Na escala analítica, estima-se mais facilmente os parâmetros importantes e são selecionadas as composições das fases e a temperatura, que, preferencialmente são invariáveis na transposição de escala (GU, 1995; GUIOCHON, 2002).

Dependendo da escala final pretendida, bancada ou industrial, o processo é otimizado com diferentes objetivos. Em escala de bancada, produção de pequenas quantidades em poucos ciclos, essa otimização tem como objetivo a pureza das substâncias isoladas e a produtividade. Já na escala industrial, a otimização econômica pode ser alcançada, mesmo com picos mal resolvidos (GU, 1995; GUIOCHON, 2002).

3.5.1. Transposição direta

A transposição direta (ou “linear”, ou “matemática direta”) é comum a trabalhos de separação semi-preparativa, e recomendada pelos fabricantes de colunas cromatográficas para CLAE. Esse tipo de transposição tem como principal vantagem a simplicidade, por se basear em apenas um fator de cálculo a partir de um cromatograma (MAZZEI; D’AVILA, 2003).

Na transposição direta de escala, primeiramente são ajustadas a seletividade e a resolução, em temperatura (T) fixa, nas condições iniciais em escala analítica. Depois disso, um fator é calculado (**Equação 7**) a partir da relação entre os comprimentos (L) e as áreas seccionais (A_c) da coluna preparativa (p) e analítica (a) de modo a manter os tempos de retenção após a transposição.

$$\mathbf{Fator\ de\ Transposição\ Direta} = \frac{L_{(p)} \cdot A_{c(p)}}{L_{(a)} \cdot A_{c(a)}} \quad (7)$$

Nesta transposição, variáveis operacionais, como vazão de fase móvel (F) e volume de injeção (V_{inj}), podem ser ajustadas nas condições preparativas a partir desse fator. Além disso, também podem ser calculados o volume morto, consumo de fase móvel e a produtividade. É o planejamento mais simples e rápido de transposição (GU, 1995; MAZZEI; D’AVILA, 2003).

Esse tipo de transposição é utilizado pelos fabricantes de colunas cromatográficas para demonstrar a repetibilidade da composição e do recheio da fase estacionária entre as colunas analíticas, semi-preparativas e preparativas. A retenção, a intensidade relativa e a largura dos sinais cromatográficos em larga escala tornam-se idênticos aos dos ensaios em pequena escala (COSTA, 2004; MAZZEI; D’AVILA, 2003).

Apesar disso, essa similaridade do perfil cromatográfico entre as duas escalas é obtida apenas quando se executa a transposição das áreas seccionais e se preserva a proporcionalidade do fator. Já quando deseja-se melhorar a separação após a transposição, alterando o volume de injeção (V_{inj}), concentração de injeção (C_{inj}), ou comprimento de coluna (L) se recorre usualmente ao empirismo para otimizar a separação (COSTA, 2004).

3.5.2. Transposição por modelos de momentos estatísticos

O desenvolvimento de processos cromatográficos também pode ter como objetivo otimizar as condições cromatográficas por meio de aplicação de modelos matemáticos sobre os fenômenos que o constituem, que podem ajudar nos procedimentos de transposição em CLAE e nas simulações de perfis (GUIOCHON, 2002).

Os modelos cromatográficos são diferenciados principalmente pelos parâmetros e fenômenos que são considerados e, também, pela dificuldade de sua resolução matemática, que utiliza desde expressões algébricas até métodos iterativos, integração numérica ou sistemas de equações diferenciais (COSTA, 2004).

Os modelos de momentos estatísticos são baseados na hipótese de que cada elemento (concentração de substância) do perfil de entrada (injeção) é disperso, numa distribuição gaussiana, ao se propagar na coluna (VAN DEEMTER; ZUIDERWEG; KLINKENBERG, 1956).

Pelo balanço global de massa de cada componente, o momento de ordem zero da distribuição gaussiana é representado pela área total do perfil de concentração de saída que corresponde à área de concentração de entrada (relacionada à massa injetada). O momento de primeira ordem corresponde ao tempo/volume de retenção (t_R ou V_R) do centro de massa do material injetado. Já o momento de segunda ordem (σ^2) - variância do perfil no fim da coluna - corresponde ao espalhamento do perfil de massa, durante a propagação ao longo da coluna, que é provocado pelos efeitos dispersivos, como de difusão, de distribuição nos espaços vazios (de volumes aleatórios) e de transferência de massa inerente ao sistema particulado (KALTENBRUNNER; JUNGBAUER; YAMAMOTO, 1997; STENBERG, 1966; VAN DEEMTER; ZUIDERWEG; KLINKENBERG, 1956).

Esses modelos de momentos estatísticos representam perfis para quando a cromatografia é regida pela isoterma de distribuição linear (cromatografia linear), ou seja, para baixa concentração total de amostra, sendo o perfil de concentração na saída da coluna (C_M) calculado pela **Equação 8**, baseada na distribuição gaussiana (STENBERG, 1966).

$$C_M(t) = \frac{(C_{inj} \cdot V_{inj})}{F \cdot (2\pi \cdot \sigma^2)^{1/2}} \cdot \int_{t_{a,min}}^{t_{a,max}} f(t_a) \cdot e^{-\frac{(t-t_a)^2}{2\sigma^2}} dt_a \quad (8)$$

Sendo F a vazão de fase móvel, V_{inj} o volume de injeção, C_{inj} a concentração na injeção e σ^2 a variância do pico.

Onde o perfil de injeção (entrada) ao longo do tempo é descrito, matematicamente, pela função $f(t_a)$, e t_a representa o tempo em que o centro de massa do pico sai da coluna, com contribuição do tempo de retenção, do tempo de injeção (t_{inj}) e do perfil de entrada. A integral resultante acima tem sido resolvida pelo método de transformada de Laplace para diferentes perfis de injeção (**Figura 4**), como descrito a seguir:

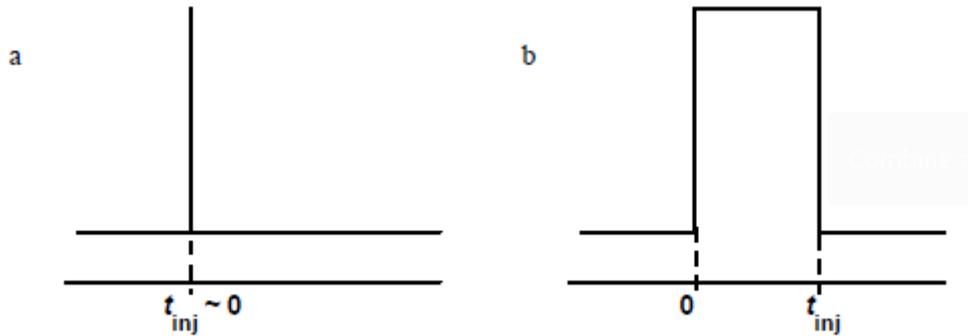


Figura 4: Perfis de injeção estudados para a função $f(t_a)$ da expressão genérica (Eq. 4) dos modelos de momentos estatísticos: a. pulso imediato (item 3.5.3) e b. pulso retangular (item 3.5.4) (reproduzido de COSTA, 2004).

Apesar das potenciais vantagens da aplicação dos modelos nas separações por CLAE de qualquer mistura multi-componente de baixo peso molecular, essas metodologias não vêm sendo utilizadas para o fim de isolamento de acilgliceróis, recorrendo-se ao empirismo para otimizar a separação (Item 3.6).

3.5.3. O modelo de Van Deemter e colaboradores

A resolução algébrica para pulso imediato (**Figura 4.a**) de perfil de injeção ($f(t_a)$) de tempo aproximado a zero de Van Deemter, Zuiderweg e Klinkenberg (1956) é considerado o modelo mais simples de momento estatístico, em que a sua função

matemática da distribuição de probabilidade (**Equação 9**) representa os perfis, simétricos, dos componentes da amostra na fase móvel ao fim da coluna:

$$C_M(t) = \frac{(C_{inj} \cdot V_{inj})}{F \cdot (2\pi \cdot \sigma^2)^{1/2}} \cdot e^{-\frac{(t-t_R)^2}{2 \cdot \sigma^2}} \quad (9)$$

A variância do pico (σ^2) pode ser estimada a partir da largura a meia altura (w_h) quando possível de ser determinada, ou, com menos precisão a partir da largura da base do pico (w_b), por meio das equações abaixo:

$$\sigma^2 = (8 \cdot \ln 2)^{-1} \cdot (w_h)^2 = \left(\frac{w_b}{4}\right)^2 \quad (10)$$

$$N = \frac{(t_R)^2}{\sigma^2} \quad (11)$$

$$h = \frac{L}{(N \cdot d_p)} = \frac{L}{H} \quad (12)$$

sendo N o número de pratos da coluna, d_p o diâmetro de partícula da fase estacionária e H a altura do prato teórico da coluna para determinado componente.

3.5.4. O modelo descritivo de Stenberg

Por transformada de Laplace, Stenberg (1966) resolveu a equação genérica (**Equação 8**) para outros perfis teóricos de injeção, chegando à equação algébrica para pulso retangular (**Figura 4.b**) para qualquer tempo de injeção. A equação que representa o perfil dos picos (**Equação 13**), apresenta a função erro (erf), que representa uma integral com resolução numérica por aproximações racionais ou polinomiais, de acordo com as equações 14 e 15:

$$C_M(t) = \frac{1}{2} \cdot \frac{C_{inj} \cdot V_{inj}}{F} \cdot \left\{ erf \left[\frac{(t-t_R)}{\sqrt{2 \cdot \sigma^2}} \right] - erf \left[\frac{(t-t_R-t_{inj})}{\sqrt{2 \cdot \sigma^2}} \right] \right\} \quad (13)$$

$$erf(x) = 1 - (a_1 \cdot u + a_2 \cdot u^2 + a_3 \cdot u^3 + a_4 \cdot u^4 + a_5 \cdot u^5) \cdot e^{-x^2} \quad (14)$$

$$\mathbf{u} = [\mathbf{1} + (\mathbf{p} \cdot \mathbf{x})]^{-1} \quad (15)$$

Sendo os seguintes valores dos coeficientes: $p = 0,3275911$; $a_1 = 0,254829592$; $a_2 = -0,284496736$; $a_3 = 1,421413741$; $a_4 = -1,453152027$; e $a_5 = 1,061405429$ (ABRAMOWITZ; STEGUN, 1965).

3.6. A Separação das Classes de Acilgliceróis por CLAE

Maruyama e Yonese (1986) estudaram três diferentes colunas de fase reversa (LiChrosorb RP-2, RP-8 e RP-18) para separar e determinar quantitativamente monoacilgliceróis. Eles utilizaram uma eluição isocrática da mistura acetonitrila-água (7:3, em volume) como fase móvel, detecção de UV em 210 nm e padronização interna com monoctilglicerol (C8). O desvio padrão e o coeficiente de variação indicaram resultados precisos e reprodutíveis para a coluna RP-8.

Takano e Kondoh (1987) desenvolveram um método para analisar monoacilgliceróis presentes em diferentes margarinas. Para isso, utilizaram eluição isocrática da mistura de acetonitrila-água (58:42, em volume) como fase móvel, coluna de octilsilano (C8) e detecção seletiva para acilgliceróis pela derivatização, em reator *post-column*, sequencialmente com soluções de hidróxido de potássio, ácido periódico e acetilacetona (KONDOH; TAKANO, 1986), a fim de aumentar a sensibilidade da detecção desses componentes no UV.

Semporé e Bézard (1992) realizaram um estudo da separação de monoacilgliceróis por CLAE. Para isso, testaram, em eluição isocrática, diferentes proporções de mistura de acetonitrila e água, utilizando uma coluna de octadecilsilano (C18) e detector de índice de refração a diferentes temperaturas e vazão de fase móvel. Nesse estudo foi observada alteração de ordem de eluição dos componentes com avariação de temperatura e composição de fase móvel.

Holčapek *et al.* (1999) determinaram compostos de monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis, bem como os ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG) formados

durante o processo de produção de biodiesel a partir da transesterificação do óleo de canola com metanol. Utilizaram uma coluna de octadecilsilano (C18) e dois métodos de gradiente de fase móvel foram desenvolvidos: (i) um gradiente linear da mistura 70% de acetonitrila + 30% de água em 0 min até 100% de acetonitrila em 10 min, em seguida 50% de acetonitrila + 50% de *i*-propanol:*n*-hexano (5:4, em volume) em 20 min, sendo mantida esta concentração por mais 5 min; (ii) gradiente linear de fase móvel 100% de metanol a 50% de metanol + 50% de *i*-propanol:*n*-hexano (5:4, em volume) em 15 min. O gradiente (ii) foi utilizado para monitorar rapidamente a conversão de triacilgliceróis em ésteres metílicos e quantificar os triacilgliceróis residuais. Foi utilizado o detector de espectrometria de massas com ionização química a pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* - APCI).

Nesse estudo se confirmou a ordem de eluição da separação entre diferentes monoacilgliceróis em função do comprimento da cadeia, insaturação, isomerismo posicional, temperatura de análise e seguindo o número equivalente de carbonos (NC_{eq}), que já se havia caracterizado com o uso de propionitrila na fase móvel, e que pode ser calculado por meio da **Equação 16**:

$$NC_{eq} = NC_T - 2 \cdot ND_L \quad (16)$$

Onde:

NC_{eq} é o número equivalente de carbonos;

NC_T é o número de carbonos totais do acilglicerol;

ND_L é o número de ligações duplas.

Cheng e Wu (2003) aplicaram o método da CLAE, adaptado de Holčapek e colaboradores (1999) para a determinação do teor de EsMAG, em misturas reacionais obtidas pela metanólise do óleo de soja. Além disso, desenvolveram um método para separação de EsMAG, MAG, DAG e TAG utilizando metanol e *i*-propanol:*n*-hexano (5:4, % volumétrico) como fase móvel.

García *et al.* (2011) utilizaram uma coluna quiral Chiralpak IC e diferentes proporções de fase móvel *i*-propanol:*n*-hexano para desenvolver uma metodologia de separação de

enantiômeros de monoacilgliceróis, sem derivatização prévia das amostras. Obtiveram uma resolução excelente e uma eficácia independente do comprimento da cadeia e do grau de insaturação dos ácidos graxos do MAG.

Andrade (2011) separou as classes de MAG, DAG e TAG, bem como os ésteres metílicos de ácidos graxos, utilizando coluna de octadecilsilano (C18), fase móvel composta de metanol (solvente A) e *i*-propanol:*n*-hexano, 5:4 em volume (solvente B), com um gradiente binário em duas rampas lineares e detector de UV em 205 nm. Nesse trabalho foi possível separar as classes, porém não foi possível detectar compostos saturados.

Carvalho *et al.* (2012) determinaram, simultaneamente, as quantidades totais de MAG, DAG, TAG e EsMAG em alcoólise de diferentes amostras de óleo. Para isso, utilizaram um gradiente de eluição de metanol (A) e *i*-propanol/hexano 5:4 (% volumétrico) (B), sendo 100% de A em 0 min, 50% de A e 50% de B em 10 min mantendo por 10 min. Também determinaram a composição de ácidos graxos dos óleos analisando seus ésteres metílicos derivados utilizando eluição isocrática com acetonitrila como fase móvel durante 34 min. Os métodos apresentaram satisfatória repetibilidade (desvio padrão relativo < 3%) e linearidade ($R^2 > 0,99$).

Blatt (2014) desenvolveu uma metodologia para a separação e isolamento de material rico de MAG, DAG e TAG, bem como os ésteres metílicos de ácidos graxos empregando a cromatografia líquida preparativa em coluna aberta (20 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro). Foi utilizada fase estacionária octadecilsilano (LiChroprep RP-18, com tamanho de partícula de 25-40 μm) e uma eluição em gradiente da fase móvel metanol e *i*-propanol:*n*-hexano (5:4, em volume). Os resultados mostraram que foram obtidas separadamente frações ricas de MAG, DAG, TAG e EsMAG. Para acompanhamento dessa separação, foi utilizada cromatografia em camada delgada e a CLAE.

Santos (2015) desenvolveu uma metodologia de identificação e quantificação do teor de acilgliceróis (MAG, DAG e TAG), assim como do teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG) presentes no biodiesel por CLAE com detector de índice de refração (CLAE-IR). Para isso, empregou eluições isocráticas, utilizando como fase móvel misturas de metanol e *i*-propanol:*n*-hexano (5:4, em volume) em diferentes proporções.

As análises foram realizadas a 40 °C e a coluna foi com fase octadecilsilano (C18) de 5 µm de tamanho de partícula e com 120 Å de diâmetro de poro. As amostras de biodiesel analisadas pelo método proposto apresentaram resultados satisfatórios quando comparados aos resultados obtidos pelo método de referência (CG), particularmente quando estes resultados se encontravam dentro das faixas de aplicação dos métodos de referência.

Carvalho (2018) realizou a separação dos MAG, DAG e TAG (do produto da reação de glicerólise) otimizada pela técnica de cromatografia líquida em coluna, utilizando uma coluna de vidro com fase octadecilsilano (C18 - LiChroprep RP-18, com tamanho de partícula de 25-40 µm) e um gradiente de metanol e uma mistura de i-propanol:n-hexano (5:4 em volume). A partir das frações de MAG, foi realizado um estudo de separação dos derivados de monooleína (C18:1), monolinoleína (C18:2) e monolinolenina (C18:3) em CLAE, em escala analítica. Foi realizada eluição isocrática com acetonitrila-água (7:3, em volume) como fase móvel em coluna de sílica modificada com octadecilsilano (C18) e detecção de UV para o isolamento de cada um desses componentes. Os produtos isolados foram analisados por cromatografia a gás acoplada com espectrometria de massas (CG-EM) e foi possível identificar impurezas de componentes saturados em cada fração isolada de MAG.

Neste contexto o objetivo desse trabalho foi desenvolver um processo de produção de frações de MAG e DAG a partir da reação de glicerólise seguida de CLAE aplicando a transposição de escala por modelos matemáticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. A Reação de Glicerólise de Triacilgliceróis

As reações de glicerólise foram realizadas com razão molar glicerol:óleo de 3:1, temperatura de 230 °C e tempo reacional de 30 min, conforme descrito por Carvalho (2018), por ser uma condição otimizada com maior rendimento de MAG, mas também tem alto rendimento em DAG.

A massa molar média do óleo de soja foi estimada em 876 g/mol, conforme descrito por Andrade (2011).

Em um balão de fundo redondo com capacidade de 250 mL foram adicionados 30 gramas de óleo de soja refinado da marca Liza, glicerol (> 99%, Sigma-Aldrich) em proporção estequiométrica glicerol/óleo 3:1 e o catalisador hidróxido de sódio (Vetec, Brasil) a 0,18% em massa em relação ao óleo de soja.

Conectou-se ao balão um condensador de refluxo de bolas e o balão foi aquecido em banho de silicone, previamente aquecido na temperatura de 230 °C. A reação foi mantida sob forte agitação durante 30 minutos, com agitador magnético.

Após o período de reação, o balão reacional foi resfriado em banho de gelo por aproximadamente 20 minutos e ácido clorídrico (PA, obtido da Vetec) foi adicionado ao balão em proporção estequiométrica à base a fim de neutralizar o catalisador.

Em seguida, o meio reacional neutralizado foi transferido para um funil de separação para separar as fases orgânica (onde se encontram os produtos) e de glicerol. Adicionaram-se cerca de 30 mL de acetato de etila (Vetec) para extração dos produtos. A fase orgânica foi lavada sucessivamente com água destilada até pH neutro. Em seguida, a fase orgânica foi recolhida sobre sulfato de sódio anidro (Vetec), um agente dessecante e foi deixado o sistema secar por aproximadamente 24 h. Após isso, a fase orgânica foi filtrada em papel de filtro para retirada do agente dessecante. Por fim, o acetato de etila foi evaporado em rotaevaporador e o resíduo foi reservado.

4.2. As Análises por CLAE

Empregou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência Ultimate 3000 Dionex (Thermo Fisher Scientific, EUA), equipado com duas bombas HPG-3200BX, detector UV-VIS monocanal VWD-3400RS, coletor de frações AFC-3000, válvula para injeção manual modelo 8125, Rheodyne e alça (*loop*) de injeção de 2 mL. O equipamento foi operado a partir de um terminal PC Optiplex-5000, plataforma Microsoft Windows 7. O software utilizado para operação e configuração do equipamento foi o Chromeleon 7.0 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

As fases móveis utilizadas (item 4.4, pág. 22) foram previamente filtradas em membrana politetrafluoretileno (PTFE) da Millipore com 0,5 µm de poro. Já as amostras foram igualmente filtradas em filtro tipo membrana PTFE da Millipore (Bedford, EUA) com 0,45 µm de poro antes da injeção e detecção por UV no comprimento de onda de 205 nm. Os cromatogramas foram analisados e integrados de forma manual usando o software Chromeleon versão 6.80 SR11 (Thermo Scientific Acclaim, EUA).

Os dados das colunas com fase estacionária C18 utilizadas estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1: Características das colunas cromatográficas de fase estacionária C18 aplicadas no presente estudo.

Dados operacionais	Coluna 1	Coluna 2
	Microsorb MV	Kinetex
Comprimento (cm)	25	15
Diâmetro (cm)	0,46	1
Área seccional (cm ²)	0,1662	0,7854
Volume de leito (mL)	4,15	11,78
Diâmetro da partícula (µm)	5	5

Para a análise do produto da reação de glicerólise e de algumas frações isoladas, utilizou-se a metodologia de CLAE descrita por Andrade (2011) e por Andrade *et al.* (2011), com fase móvel composta de metanol (A) e uma mistura de *i*-propanol:*n*-hexano (5:4, em volume) (B). Um gradiente binário com duas rampas lineares foi empregado: 0% a 50% B de 0 a 15 min, seguido de 50% a 100% B até 25 min de eluição, mantendo a eluição com 100% B por mais 5 min.

Foi utilizada a coluna 1 (**Tabela 1**) e as análises foram realizadas com uma vazão constante de 1 mL/min e o volume de injeção das amostras foi de 10 µL em uma concentração de 5% v/v diluídas em metanol.

4.3. Fluxograma do Estudo

Um fluxograma simplificado (**Figura 5**) do estudo realizado é apresentado a seguir:

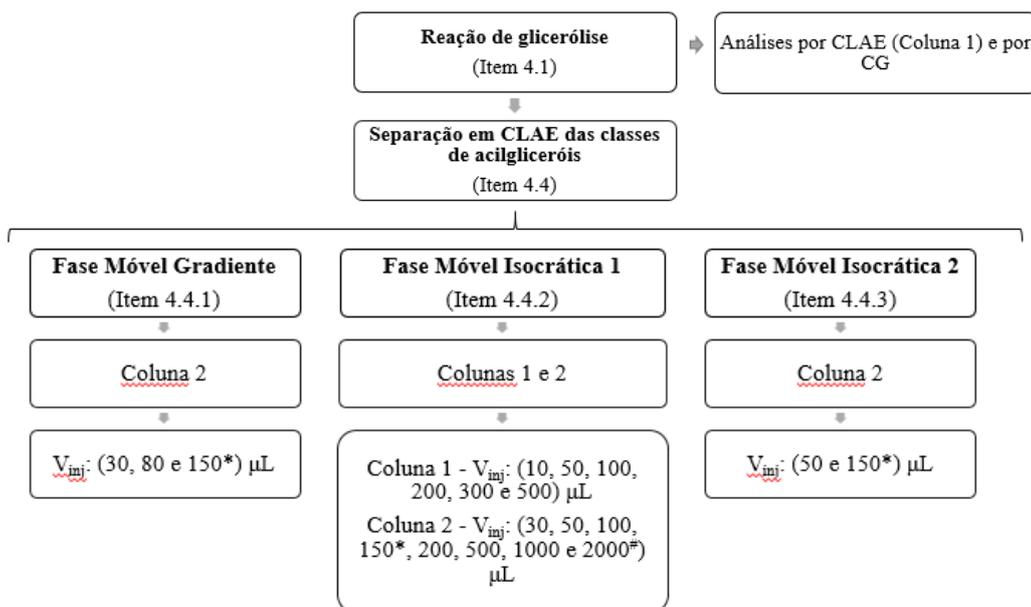


Figura 5: Fluxograma simplificado do estudo realizado. Frações destinadas às análises em (*) CG e em (#) CLAE.

As fases móveis escolhidas para serem utilizadas nesse estudo foram baseadas nos trabalhos de Andrade (2011) e Santos (2015).

4.4. A Separação das Classes de Acilgliceróis

4.4.1. Fase móvel gradiente

Primeiramente foi realizada a separação das classes do produto da reação de glicerólise, utilizando uma fase móvel gradiente baseada na metodologia de CLAE descrita por Andrade (2011), descrita ao fim da seção 4.2, mas usando a coluna 2 (**Tabela 1**), com uma vazão constante de 2,85 mL/min e o volume de injeção das amostras de 30 µL em uma concentração de 5% v/v diluída em metanol.

4.4.2. Fase móvel isocrática 1

O produto reacional da glicerólise foi injetado em escala analítica, baseando-se em uma das metodologias de análise descrita por Santos (2015), utilizando uma eluição isocrática de 55% metanol (A):45% de uma mistura de *i*-propanol:*n*-hexano (5:4, em volume) (B) como fase móvel.

Para a coluna 1 (**Tabela 1**) as eluições foram realizadas com uma vazão constante de 1 mL/min. O volume de injeção das amostras em escala analítica foi de 10 µL em uma concentração de 3% v/v diluída na própria fase móvel.

Para a coluna 2 (**Tabela 1**) as eluições foram realizadas com uma vazão constante de 2,85 mL/min. O volume de injeção das amostras em escala analítica foi de 30 µL em uma concentração de 3% v/v diluída na própria fase móvel.

4.4.3. Fase móvel isocrática 2

O produto reacional da glicerólise foi injetado na coluna 2 (**Tabela 1**), baseando-se em uma das metodologias descritas por Santos (2015), utilizando como fase móvel uma eluição isocrática de 65% A:35% B na vazão constante de 2,85 mL/min. O volume de injeção das amostras em escala analítica foi de 30 µL em uma concentração de 3% v/v diluída na própria fase móvel.

Todas as separações foram realizadas com a coluna na temperatura ambiente do laboratório (aproximadamente 25 °C).

4.5. Deconvolução dos Sinais

Foi utilizado o programa MagicPlot Student versão 2.7.2 (MagicPlot Systems LLC) com a função gaussiana para deconvolução de picos dos cromatogramas resultantes para estimar o tempo de retenção e a largura a meia altura dos componentes individuais.

4.6. Método Computacional de Simulação da Transposição

O programa computacional Microsoft Excel versão 2016 foi utilizado para executar uma planilha eletrônica, preparada seguindo o algoritmo descrito por Costa (2004) e encontrado no **Anexo I**, para simular os perfis cromatográficos nas escalas ensaiadas e

pretendidas, a partir dos dados cromatográficos em pequena escala, como dimensões de coluna, vazão e tempo de retenção e largura a meia altura de cada pico. Os cálculos foram executados em computadores pessoais.

Um fluxograma da metodologia simplificada de transposição de escala usando modelos utilizados neste trabalho é apresentado na **Figura 6**. A transposição de escala entre as duas colunas foi realizada seguindo a transposição direta (item 3.5.1). Após a obtenção dos parâmetros de tempo de retenção e largura dos picos à meia altura pelos cromatogramas analíticos (condições lineares), foram simulados os cromatogramas pelo método de Van Deemter e colaboradores (item 3.5.3) para verificação desses parâmetros na condição analítica e pelo modelo de Stenberg (item 3.5.4) com aumento de volume na injeção. Os resultados dos ensaios experimentais foram comparados aos cromatogramas simulados.

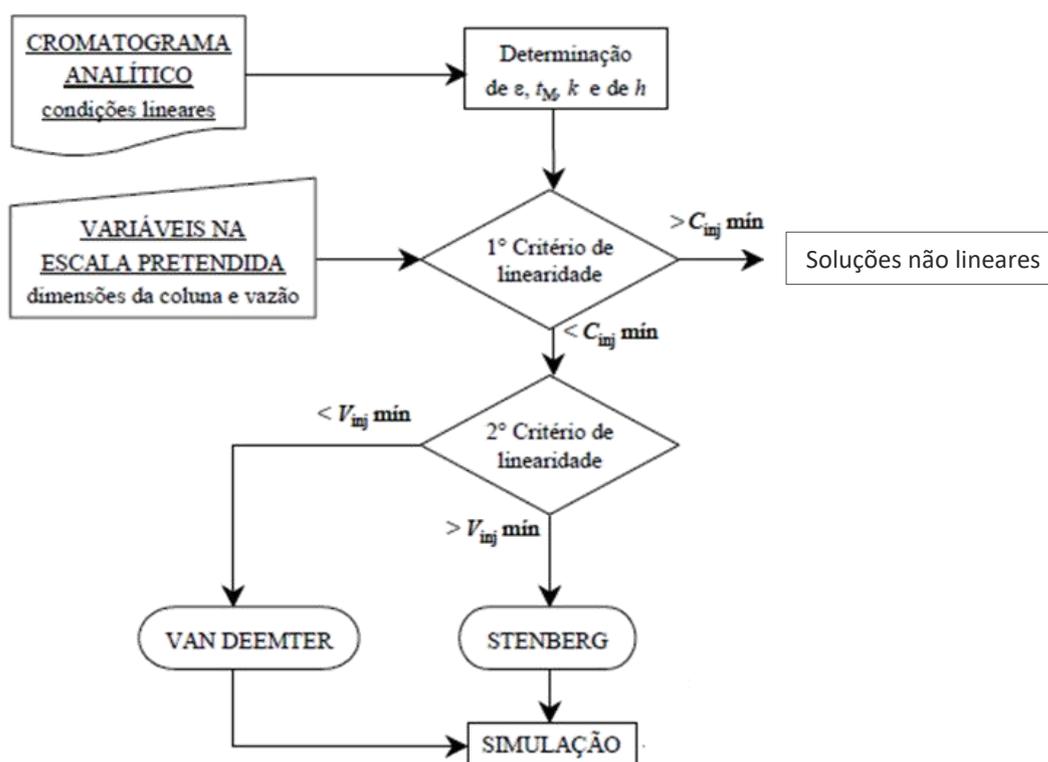


Figura 6: Diagrama de fluxo da metodologia simplificada de transposição de escala usando modelos utilizados neste trabalho (adaptado de COSTA, 2004). Sendo: ϵ – porosidade; t_M – tempo de volume morto; k – fator de retenção; h – altura do prato teórico da coluna; C_{inj} – Concentração injetada e V_{inj} – Volume injetado.

4.7. Recolhimento das Frações

Foi realizado o aumento de volume de injeção e os produtos da separação cromatográfica foram recolhidos experimentalmente por um coletor de frações (AFC-3000 – Thermo Scientific), programado para coletar os componentes de acordo com os seus respectivos tempos de retenção. Após isso, os solventes das alíquotas foram evaporados com nitrogênio e o resíduo seco foi analisado por CLAE ou CG.

4.8. As Análises do Produto de Reação de Glicerólise e das Frações Isoladas por Cromatografia a Gás

O produto de reação foi analisado em um cromatógrafo a gás modelo 7890A da Agilent Technologies equipado com injetor *on-column* utilizando o método de referência ASTM D6584 (2017).

Em um frasco âmbar de 10 mL, a amostra ou uma solução desta em piridina, foi pesada (100 mg) e foram adicionados 100 µL das soluções em piridina dos padrões internos butanotriol 1006,5 µg/mL (Restek) e tricaprina 8040 µg/mL (Sigma). A massa de amostra e volume de piridina foram variadas para o desenvolvimento do método. Em seguida, foram adicionados 100 µL do agente derivatizante *N*-metil-*N*-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA - Sigma) e aguardaram-se 15 minutos. Passado o tempo de silanização, foram adicionados 8 mL de *n*-heptano (Sigma).

As análises foram realizadas em coluna capilar ZB-5HT 30 m x 0,32 mm x 0,1 µm, (Phenomenex) com fase estacionária de 5%-fenil-95%-metilpolisiloxano. O gás de arraste foi o hidrogênio 4.5, em uma vazão constante de 3,0 mL/min e velocidade linear de 54 cm/s, com volume de injeção de 1 µL. A programação do injetor foi: temperatura inicial de 80 °C mantendo por 1 minuto e depois uma taxa de aquecimento de 25 °C/min até 380 °C, mantendo por 18,81 minutos.

A programação de temperatura do forno foi a da ASTM D6584, com a temperatura inicial de 50 °C, mantida por 1 minuto, depois elevada até 180 °C, a uma taxa de 15 °C/min, em seguida elevada até 230 °C, a uma taxa de 7 °C/min e depois elevada para

380 °C a uma taxa de 30 °C/min e mantida durante 10 minutos. O tempo total de análise foi de 31 minutos.

O detector foi o de ionização de chama (*flame ionization detector* - FID) a 380 °C. Os gases utilizados no FID foram o hidrogênio 4.5 com vazão de 30 mL/min, ar sintético SS com vazão de 300 mL/min e nitrogênio 6.0 com vazão de 30 mL/min.

Foi necessário desenvolver um método baseado na norma de referência ASTM D6584 (2017), específico para a matriz analisada já que essa possui um teor de acilgliceróis acima da faixa de calibração da norma para esses compostos. Para isso foram testadas diferentes diluições: alíquotas do produto da reação de glicerólise (massas: 1 mg, 2 mg e 4 mg) foram diluídas com 100 e 200 µL de piridina. Para determinar o teor da classe de acilgliceróis (%Acil), quando houve a diluição com piridina, foi realizado um cálculo conforme equação 17:

$$\%Acil = \frac{V_{Piridina} \times 100 \times \%Acil_{Mistura}}{m_{aliquota} \times m_{mistura}} \quad (17)$$

Sendo:

$V_{Piridina}$ – Volume de piridina em µL;

$m_{aliquota}$ – Massa da alíquota em mg;

$m_{mistura}$ – Massa da mistura após a diluição em mg;

$\%Acil_{mistura}$ – Teor de acilgliceróis determinado pelo método na mistura após a diluição

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do Produto da Reação de Glicerólise

As reações de glicerólise foram realizadas nas condições de maior rendimento de MAG, item 4.1 (CARVALHO, 2018). Além disso, foi utilizado o óleo de soja por ser um óleo de fácil aquisição e possuir alto teor teórico de ácidos graxos linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) em sua composição (ANDRADE, 2011; ANDRADE; MAZZEI; D'AVILA, 2011). Essa reação foi realizada com os propósitos de produzir um material rico em MAG e DAG e estudar sua separação e/ou purificação.

Foi realizada a análise por CG, para observar o perfil obtido para as classes de acilgliceróis, obtendo-se o cromatograma apresentado na **Figura 7**.

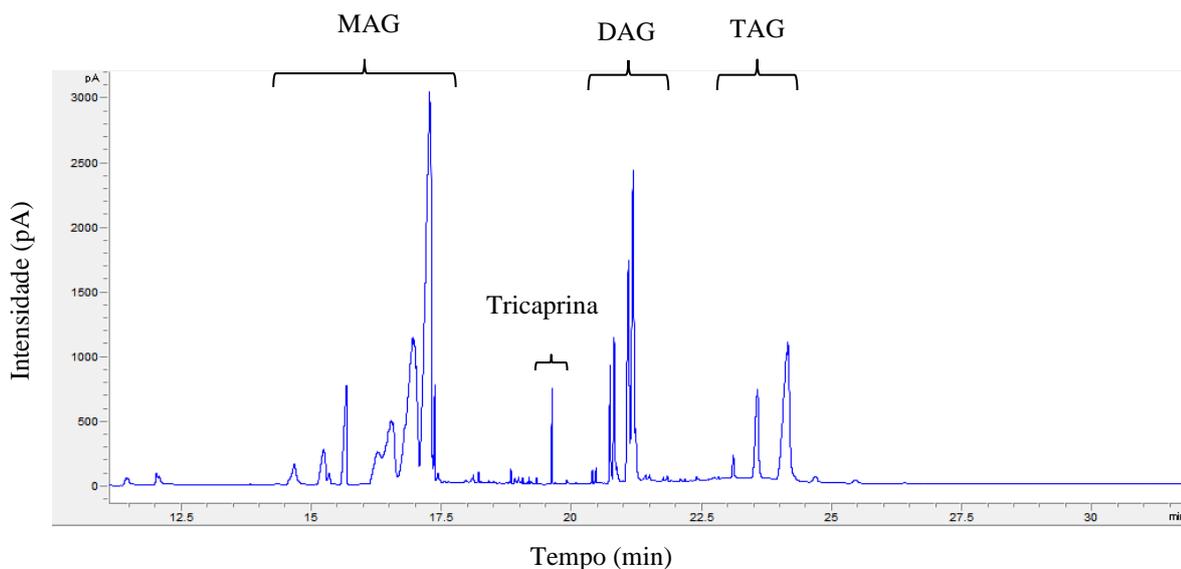


Figura 7: Cromatograma do produto da reação de glicerólise analisado por CG em condições estabelecidas no item 4.8, sendo MAG (monoacilgliceróis), DAG (diacilgliceróis) e TAG (triacilgliceróis). O assinalamento seguiu a ASTM D6584 (2017).

Pelo cromatograma obtido no CG pode ser observado o perfil para cada classe de acilgliceróis e confirmar a presença de uma maior quantidade de MAG, seguida por DAG e uma menor quantidade de TAG. Porém não foi possível realizar a quantificação desses constituintes já que a amostra se encontra fora da faixa de calibração do ensaio. Isso ocorreu pois o método aplicado é utilizado para a matriz biodiesel, ou seja, para quantificar MAG, DAG e TAG em níveis de contaminantes; pela resolução nº 45 os limites máximos dessas classes de componentes são, respectivamente: 0,7% m/m, 0,2% m/m e 0,2% m/m (ANP, 2014).

Com isso, provavelmente o derivatizante utilizado pode não ter sido suficiente para derivatizar todo o conteúdo de acilgliceróis do produto de reação de glicerólise. Por isso, foi desenvolvido um método de preparo de amostra para quantificação de MAG, DAG e TAG em reação de glicerólise de óleos vegetais por uma modificação do método da ASTM D6584 (2017) baseando-se em uma pré-diluição. Alíquotas do produto de reação foram diluídas com 100 e 200 μL de piridina (Sigma), para depois seguir o procedimento descrito pela norma, ou seja, pesando-se cerca de 100 mg da mistura diluída e adicionando-se os padrões internos (tricaprina e butanotriol), o derivatizante (MSTFA) e o solvente *n*-heptano.

Um cromatograma típico no CG, obtido diluindo a amostra, é apresentado na **Figura 8**:

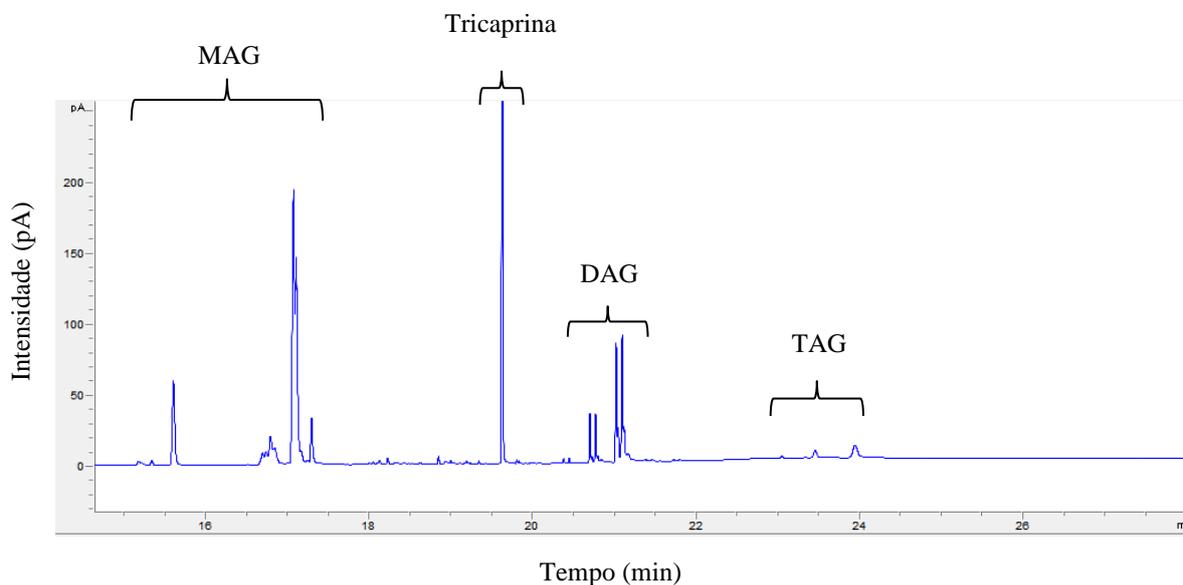


Figura 8: Cromatograma típico no CG do produto da reação de glicerólise com diluição de 2 mg em 100 μ L de piridina. O assinalamento seguiu a ASTM D6584 (2017).

Os teores de acilgliceróis para o produto de glicerólise, determinado com as diferentes diluições, estão apresentados na **Tabela 2**:

Tabela 2: Teor de acilgliceróis por CG para o produto de glicerólise do óleo de soja, nas diferentes diluições no ensaio analítico

	Massa da amostra (mg) / Volume de diluição (μ L)					
	1,07/100	2,08/100	4,17/100	1,15/200	2,13/200	4,14/200
Massa da mistura (mg)	80,00	98,60	97,36	98,50	100,42	100,28
MAG (%m/m)	34,3	33,2	34,5	36,4	38,6	34,8
DAG (%m/m)	11,9	10,7	12,0	11,3	17,8	16,9
TAG (%m/m)	9,8	3,4	5,1	4,2	3,0	2,0

MAG: monoacilgliceróis; DAG: diacilgliceróis e TAG: triacilgliceróis.

A diluição com piridina foi escolhida pois esse solvente já é o utilizado no preparo das soluções padrões do método de referência, ou seja, ele não interfere na reação de derivatização. Para cada classe foi realizado o teste de normalidade pelo método de Shapiro-Wilk, e todos os valores de p encontrados foram acima de 0,05 ($p > 0,05$) indicando que a normalidade é assegurada e não se pode admitir valores diferenciados. Além disso, foi possível observar que, para a diluição com 200 μ L de

piridina, os valores de TAG encontrados ficaram muito próximos do limite inferior da curva de calibração e com isso, essa diluição não foi escolhida para seguir com o desenvolvimento da metodologia de análise de acilgliceróis.

Assim a diluição com 100 μL de piridina e 2 mg de massa da amostra inicial foi escolhida, pois os valores encontrados estavam dentro das faixas de calibração do método de referência (4 mg estava fora da faixa para MAG) e o erro de pesagem é menor do que com 1 mg.

Além disso, vale ressaltar a importância do desenvolvimento dessa metodologia, para a matriz de acilgliceróis pois não há método de quantificação por cromatografia a gás disponível na literatura, quando seus respectivos teores estão fora da faixa de calibração do ensaio ASTM D6584 (2017).

Com isso, para a amostra do produto de reação de glicerólise (2 mg) com diluição de 100 μL foram obtidos os seguintes resultados pela técnica de cálculo de diluição: 33,2% de MAG, 10,7% de DAG e 3,4% de TAG.

A partir do cromatograma obtido por CLAE-UV (**Figura 8**), foi realizada uma quantificação por normalização de área, para estimar o percentual de cada classe de acilglicerol presente no produto da reação de glicerólise parcial do óleo de soja.

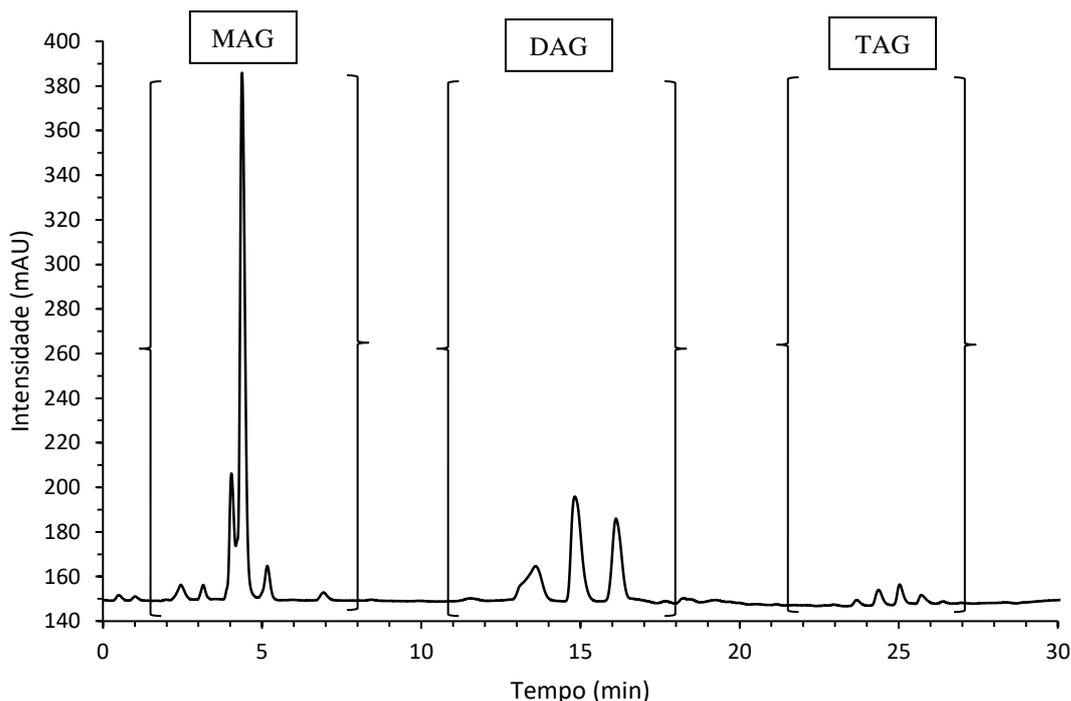


Figura 9: Cromatograma do produto da reação de glicerólise analisado por CLAE-UV em condições descritas no item 4.4.1, sendo MAG (monoacilgliceróis), DAG (diacilgliceróis) e TAG (triacilgliceróis). Assinalamentos seguindo Carvalho (2018).

Pode-se observar na **Figura 9** que o produto da reação de glicerólise é constituído preferencialmente por MAG (tempos de retenção aproximados de 2 a 7,5 min), por DAG (tempos de 11 a 17 min) e por TAG (tempos de 23 a 27 min).

O rendimento da reação em termos percentuais de área na CLAE foi de 58% de MAG, 37% de DAG e 5% de TAG não reagido, o que comprova que a reação ocorreu de forma efetiva para produzir MAG e DAG suficientes para as etapas posteriores de separação e caracterização. Além disso, o rendimento observado está bem parecido com o encontrado por Carvalho (2018) que foi de 7% de TAG não reagido para as mesmas condições de reação, o que indica que a reação pode ser de boa reprodutibilidade.

A técnica de CLAE possui um preparo de amostra mais simples que a técnica de CG (somente a diluição com a própria fase móvel), porém não é possível observar a presença de compostos saturados com a detecção por UV. Já a técnica de CG possui um preparo de amostra mais complexo, com adição de agente derivatizante e de padrões internos; mas ela quantifica as classes separadamente pela utilização de curva de calibração com

padrões específicos de cada classe. Comparando as técnicas utilizadas, apesar das diferenças já citadas, ambas se mostraram promissoras para o objetivo de identificar e quantificar as diferentes classes de acilgliceróis para o produto da reação de glicerólise a partir de óleos vegetais.

5.2. A Separação das Classes de Acilgliceróis

Para ensaiar a separação das classes de acilgliceróis foi utilizada uma coluna semipreparativa (coluna 2) e para planejar o volume de injeção e da vazão dessa coluna realizou-se a transposição direta de acordo com a **Equação 7** (pág. 11) e o fator calculado foi utilizado para planejar o *scale up*, de forma a obter o perfil de cromatograma aproximado ao de escala analítica para as diferentes fases móveis (**Tabela 3** – apresentação dos dados operacionais obtidos por transposição direta).

Tabela 3: Dados operacionais obtidos por transposição direta

Dados operacionais	Coluna inicial 1	Coluna transposta 2
	Microsorb MV	Kinetex
Fator de transposição direta	1	2,85
Volume de Injeção (μL)	10	28,5*
Vazão (mL/min)	1	2,85

*Ajustado experimentalmente a 30 μL para simplicidade.

5.2.1. Fase móvel gradiente

O cromatograma obtido para as condições estabelecidas na **Tabela 3** para a coluna 2 e descritas no item 4.4.1 (pág. 22) está apresentado na **Figura 10**.

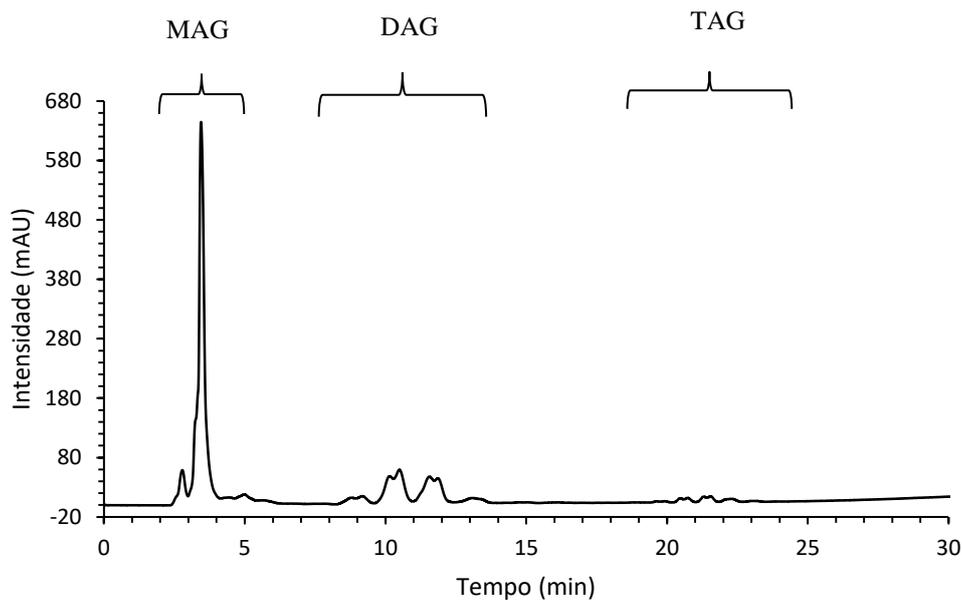


Figura 10: Cromatograma experimental, obtido por CLAE-UV, da separação das classes (Coluna 2) - Fase móvel gradiente – V_{inj} : 30 μ L.

Comparando o cromatograma da **Figura 10** com o obtido para a coluna 1 em escala analítica (**Figura 9**) pode ser observado uma similaridade entre a distribuição das classes ao longo da eluição cromatográfica. Ou seja, mesmo com a diferença entre os tempos de retenção, a distância entre as classes se manteve suficiente para ser realizado o aumento do volume de injeção. Com isso, foi possível obter sucesso na transposição direta mesmo com a diferença das fases estacionárias nas colunas.

O cromatograma obtido em escala analítica, para a coluna 2 (**Figuras 10**), foi projetado no programa MagicPlot (**Figura 11**) com o objetivo de realizar a deconvolução dos picos, para determinar os parâmetros individuais de tempo de retenção e de largura a meia altura dos componentes coeluídos.

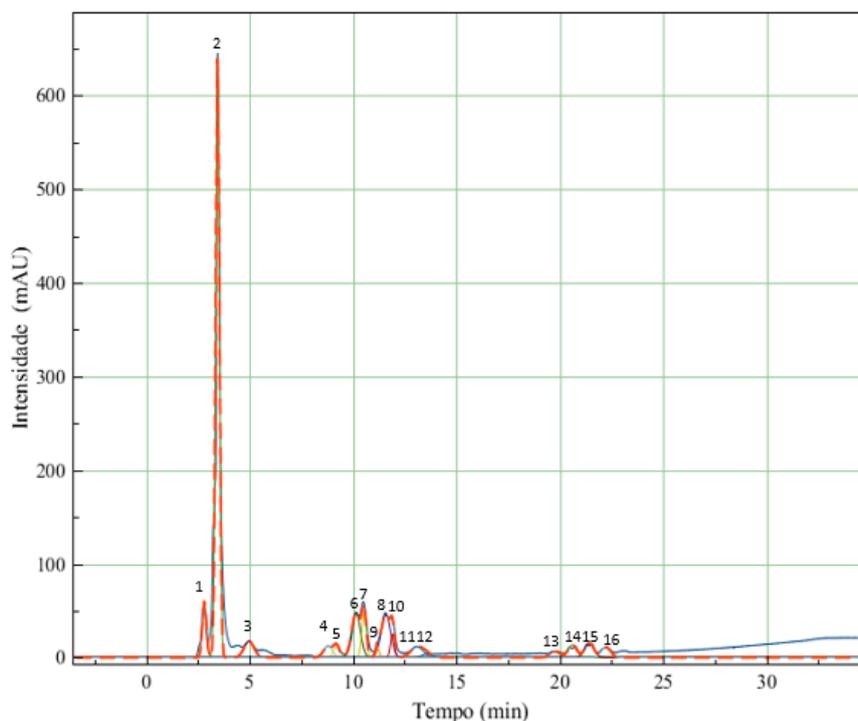


Figura 11: Deconvolução dos picos do cromatograma da separação das classes de acilgliceróis (Coluna 2) – Fase móvel gradiente.

A deconvolução dos picos (**Figura 11**) possibilitou observar a presença de um total mínimo de 16 componentes, dos quais foram obtidos seus dados cromatográficos (**Tabela 4**).

Tabela 4: Dados cromatográficos da separação das classes pela Coluna 2 – Fase móvel gradiente

Classes	Picos	Tempo de retenção (min)	Largura a meia altura (min)	Área (mAU x min)
MAG	Pico 1	2,810	0,224	14,255
MAG	Pico 2	3,447	0,214	146,907
MAG	Pico 3	4,968	0,556	10,367
DAG	Pico 4	8,790	0,493	6,534
DAG	Pico 5	9,202	0,321	4,410
DAG	Pico 6	10,144	0,493	25,020
DAG	Pico 7	10,529	0,253	13,178
DAG	Pico 8	11,583	0,527	26,024
DAG	Pico 9	11,189	0,184	2,013
DAG	Pico 10	11,909	0,218	6,053
DAG	Pico 11	13,091	0,698	8,611
DAG	Pico 12	13,571	0,527	2,199
TAG	Pico 13	19,785	0,559	3,893
TAG	Pico 14	20,611	0,483	7,007
TAG	Pico 15	21,426	0,507	8,347
TAG	Pico 16	22,247	0,508	5,920

Comparando os cromatogramas obtidos para a coluna 2, experimentalmente (**Figura 10**) e simulado pelo modelo de Van Deemter e colaboradores (**Figura 12**), foi possível observar a exatidão das estimativas dos parâmetros de retenção, da **Tabela 4**, o que permitiu estimar a separação com outros volumes de injeção.

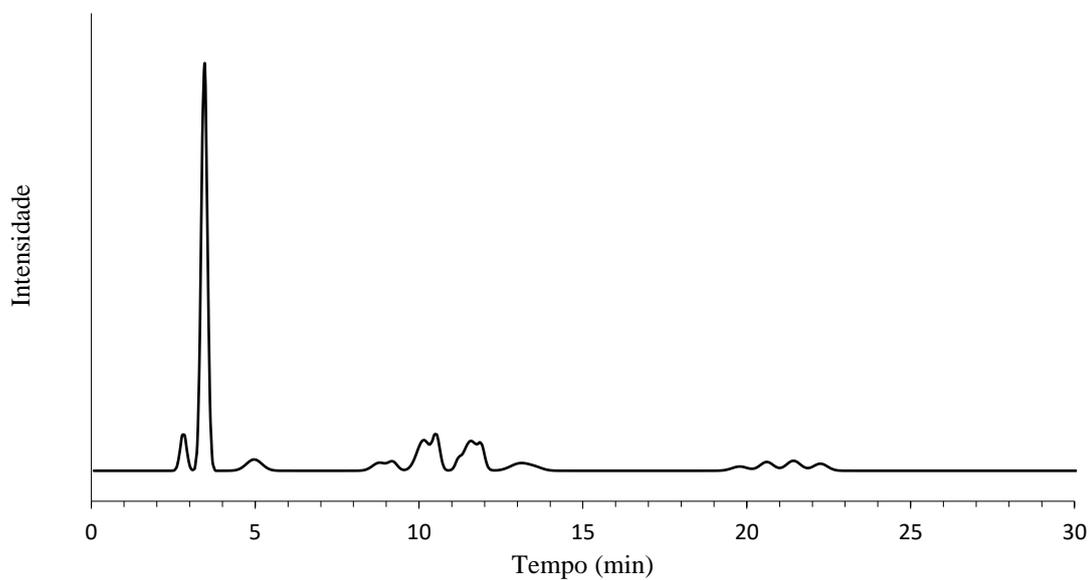


Figura 12: Cromatograma simulado pelo modelo de Van Deemter e colaboradores para a separação das classes (Coluna 2) – Fase móvel gradiente.

Foram simulados cromatogramas com volumes de injeção de 80 e 150 μL pelo método de Stenberg para a coluna 2 (**Figura 13**).

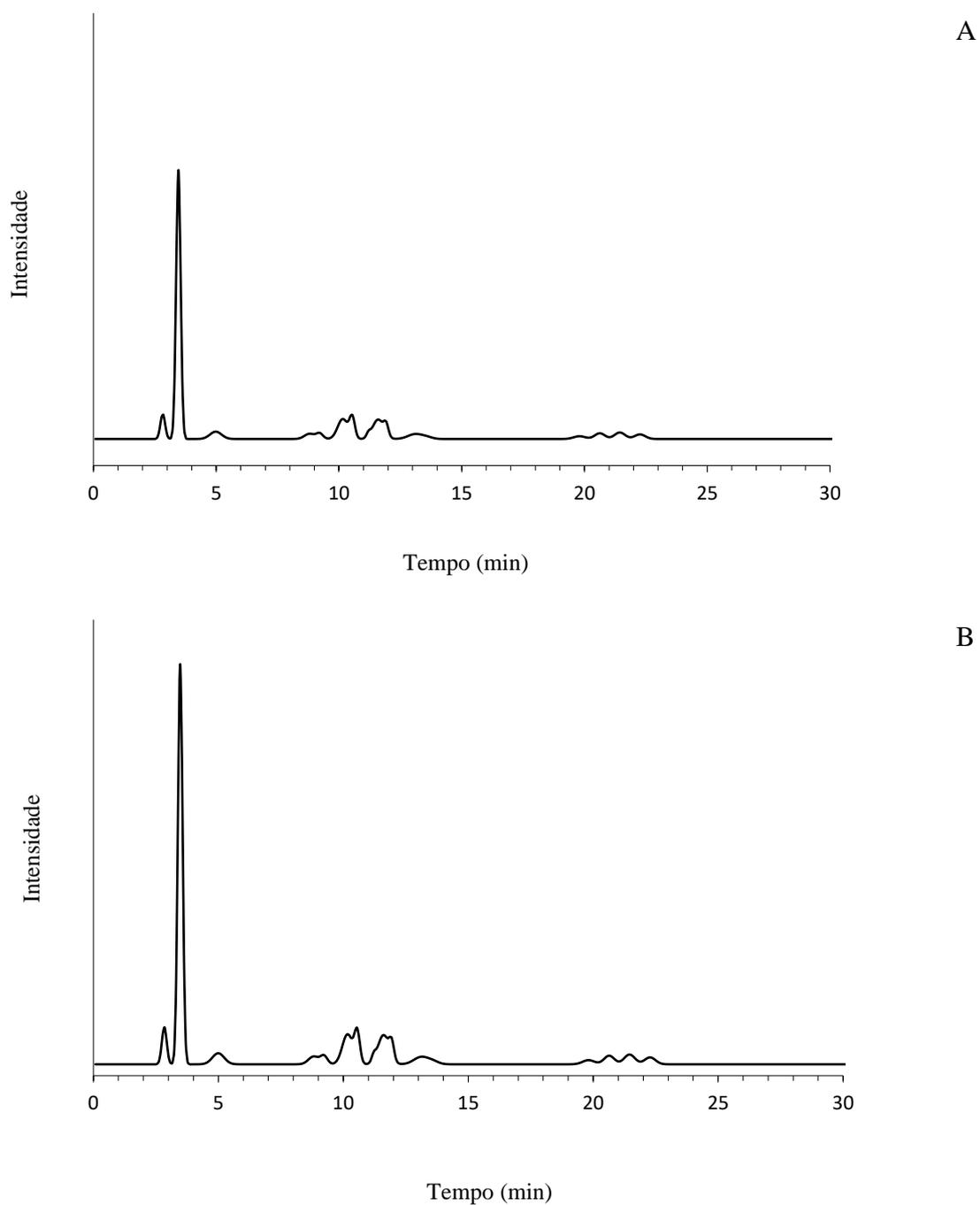


Figura 13: Cromatogramas simulados com fase móvel gradiente - Coluna 2. Com os volumes de injeção de 80 μL (A) e 150 μL (B).

Como pode ser observado, os perfis das classes de acilgliceróis nos cromatogramas se mantiveram, mesmo com o aumento do volume de injeção. Esses volumes foram

escolhidos para simular um pequeno aumento de volume de injeção (até 5 vezes) e que não afetasse a separação entre as classes.

Assim, foram realizadas eluições cromatográficas com os volumes de 80 e de 150 μL (**Figura 14**). Para realizar a coleta das alíquotas das frações de MAG e DAG, foi utilizado o sistema de janela de tempo ao injetar 150 μL e as duas janelas foram 3 a 6 min (Fração 1 na fase móvel Gradiente - FG.1) e de 10 a 14 min (FG.2), janelas essas assinaladas na **Figura 13B** e escolhidas de forma a evitar contaminação entre as classes.

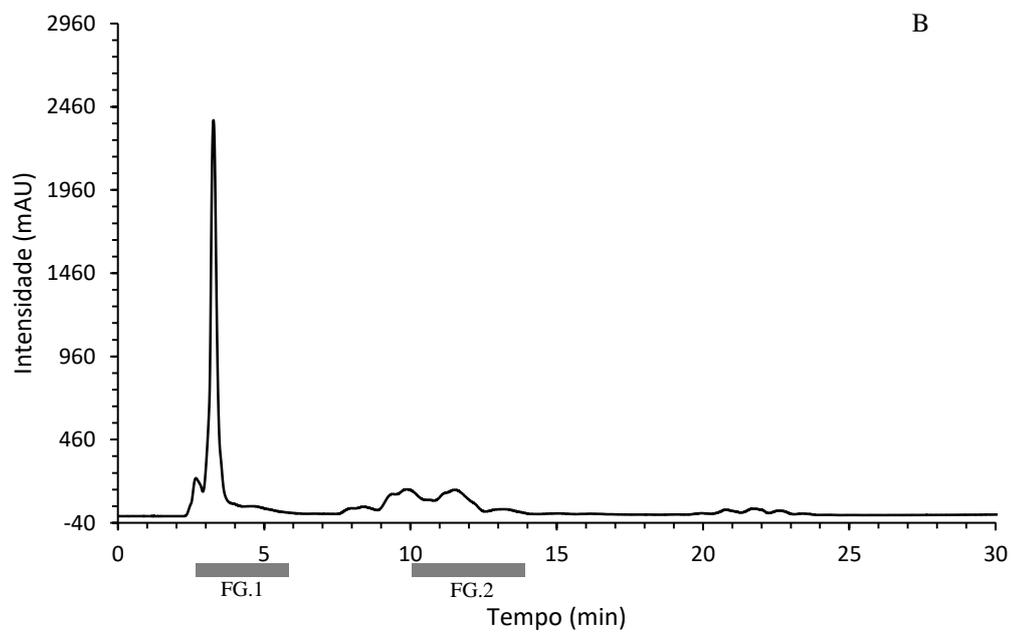
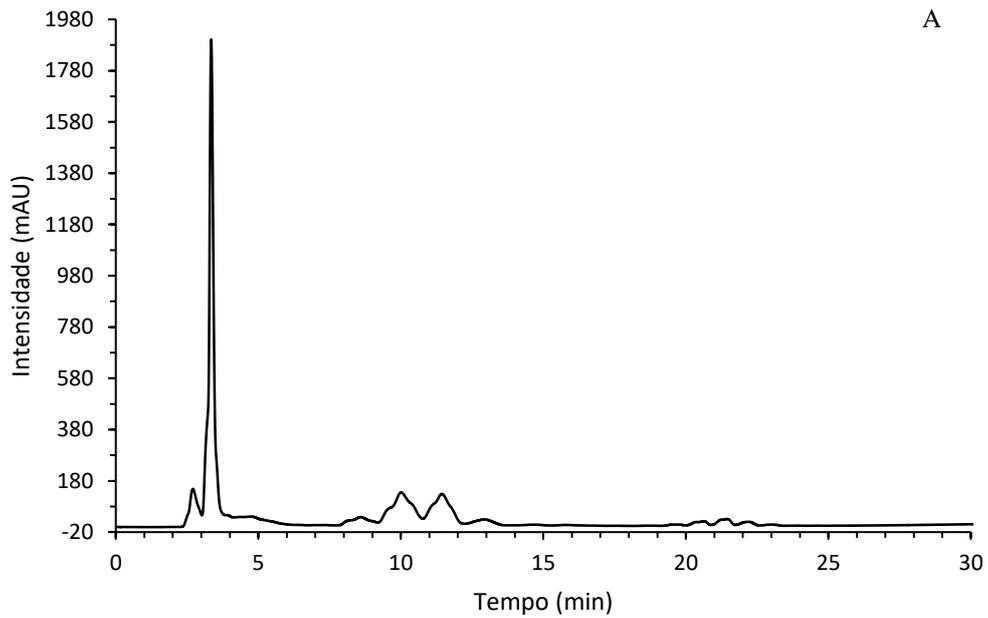


Figura 14: Cromatogramas experimentais com fase móvel gradiente - Coluna 2. Sendo os volumes de injeção de 80 μL (A) e 150 μL (B) respectivamente. Barras abaixo do cromatograma se referem às janelas de coleta das frações FG.1 e FG.2.

Os tempos utilizados na coleta foram escolhidos de forma a ganhar na pureza das frações mesmo perdendo em produtividade. Foi possível observar uma diferença entre os cromatogramas experimentais e simulados na região de 10,7 min já que aparentemente tem mais um pico nessa região que não foi previsto em escala analítica.

As frações coletadas foram analisadas por cromatografia a gás (**Figuras 15, 16, 17 e 18**) segundo a metodologia desenvolvida, descrita no item 4.8 (pág. 25).

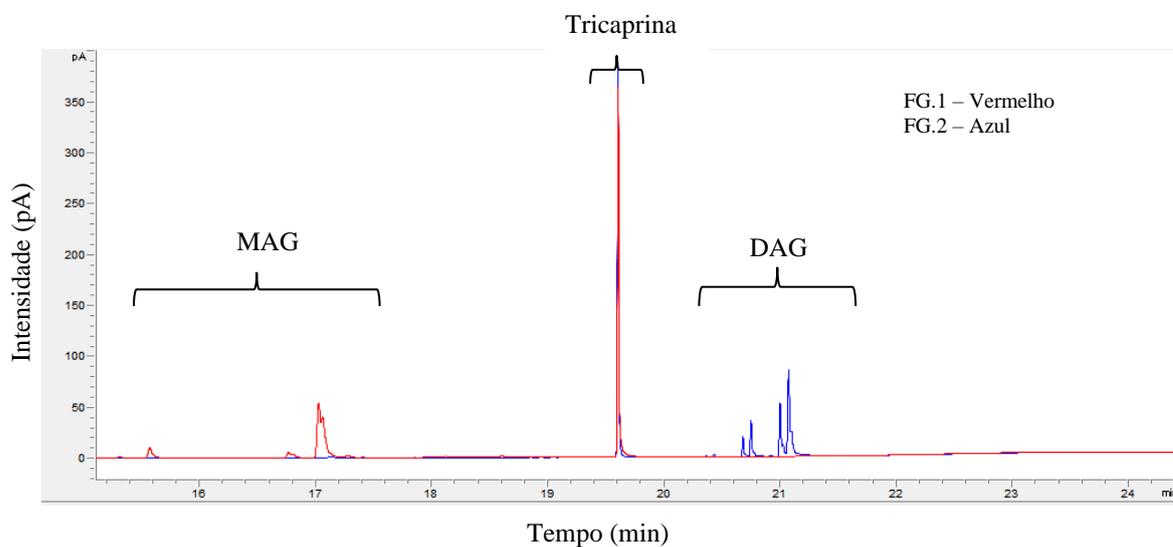


Figura 15: Cromatogramas de CG das frações coletadas na eluição cromatográfica representada na Figura 14. Tricaprina é um padrão Interno.

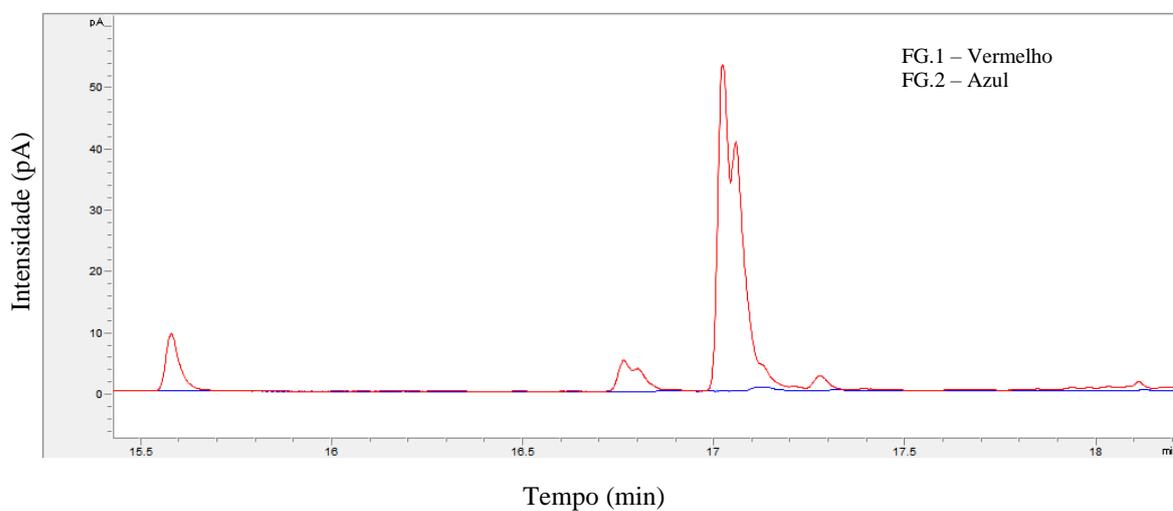


Figura 16: Ampliação na região de eluição dos MAG nos cromatogramas da Figura 15.

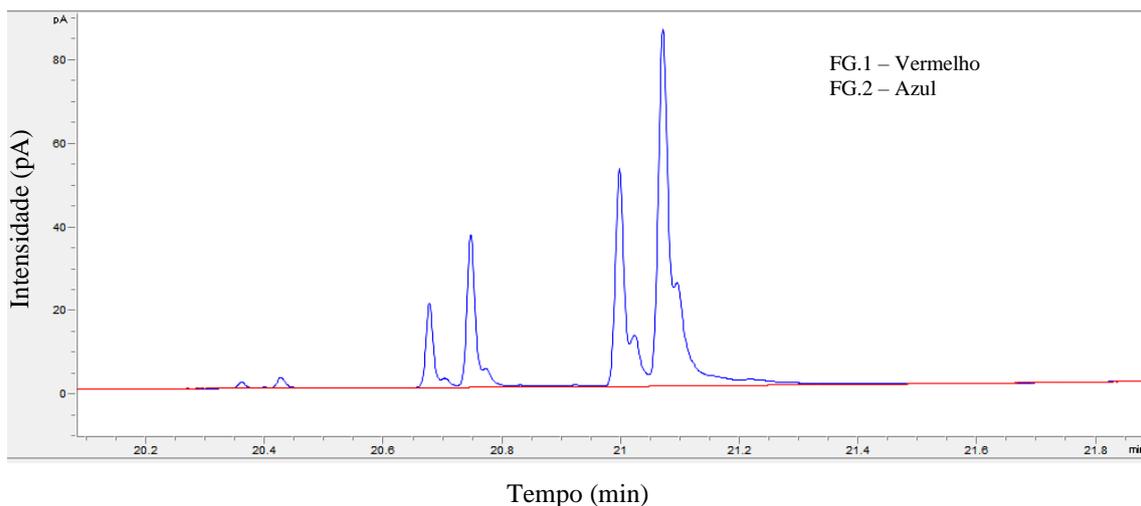


Figura 17: Ampliação na região de eluição dos DAG nos cromatogramas da Figura 15.

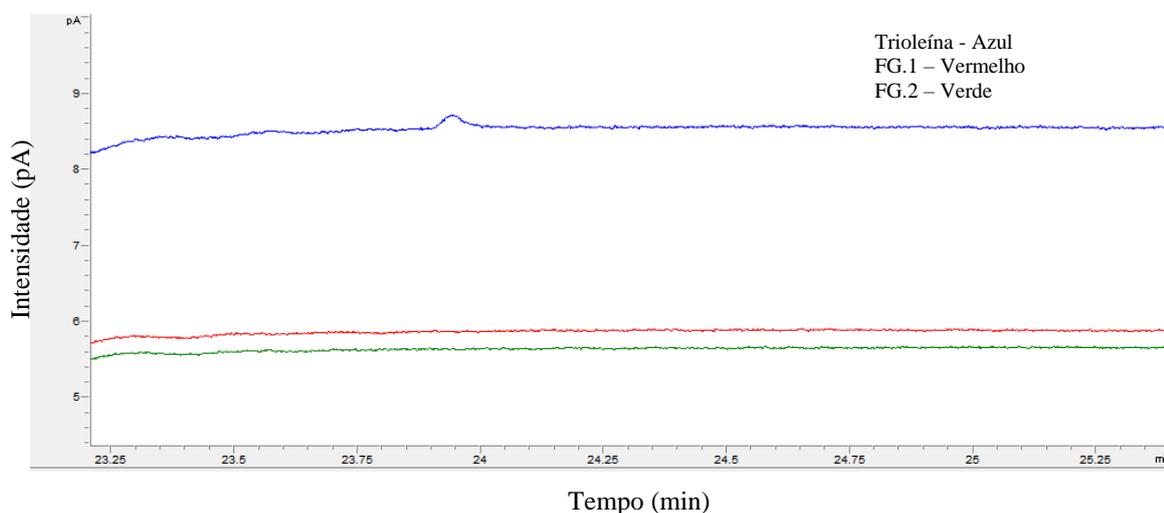


Figura 18: Ampliação na região de eluição dos TAG nos cromatogramas da Figura 15. Trioleína é um padrão de TAG somente para observação do tempo de retenção dessa classe.

Pelas **Figuras 15 a 18** foi possível observar que a metodologia de CLAE semipreparativa em gradiente de fase móvel cumpriu com o objetivo de isolar as frações de MAG e DAG de forma eficiente. Para a fração FG.1 (2 mg) com diluição de 100 μL foram obtidos os seguintes resultados pela técnica de cálculo de diluição: 45,2% m/m de MAG, 0,0% m/m de DAG e 0,0% m/m de TAG. Já para a fração FG.2 os resultados foram: 0,4% m/m de MAG, 52,2% m/m de DAG e 0,0% m/m de TAG.

Mesmo com sucesso na separação das classes com gradiente de fase móvel, resolveu-se realizar separações com programação isocrática de fase móvel de forma a encontrar condições mais viáveis para a separação, em equipamentos semipreparativos e

preparativos com apenas uma bomba e facilitar a recuperação do solvente ao final da análise.

5.2.2. Fase móvel isocrática 1

As fases móveis isocráticas que foram escolhidas para o trabalho possuem uma boa capacidade de separação entre as classes de acilgliceróis em um tempo de eluição relativamente curto, cerca de 15 minutos (SANTOS, 2015).

Os cromatogramas experimentais obtidos para as condições estabelecidas no item 4.4.2 com 55% (metanol) + 45% (*i*-propanol:*n*-hexano (5:4, em volume) e na **Tabela 3** estão apresentados nas **Figuras 19A e 19B**, respectivamente para as colunas 1 e 2.

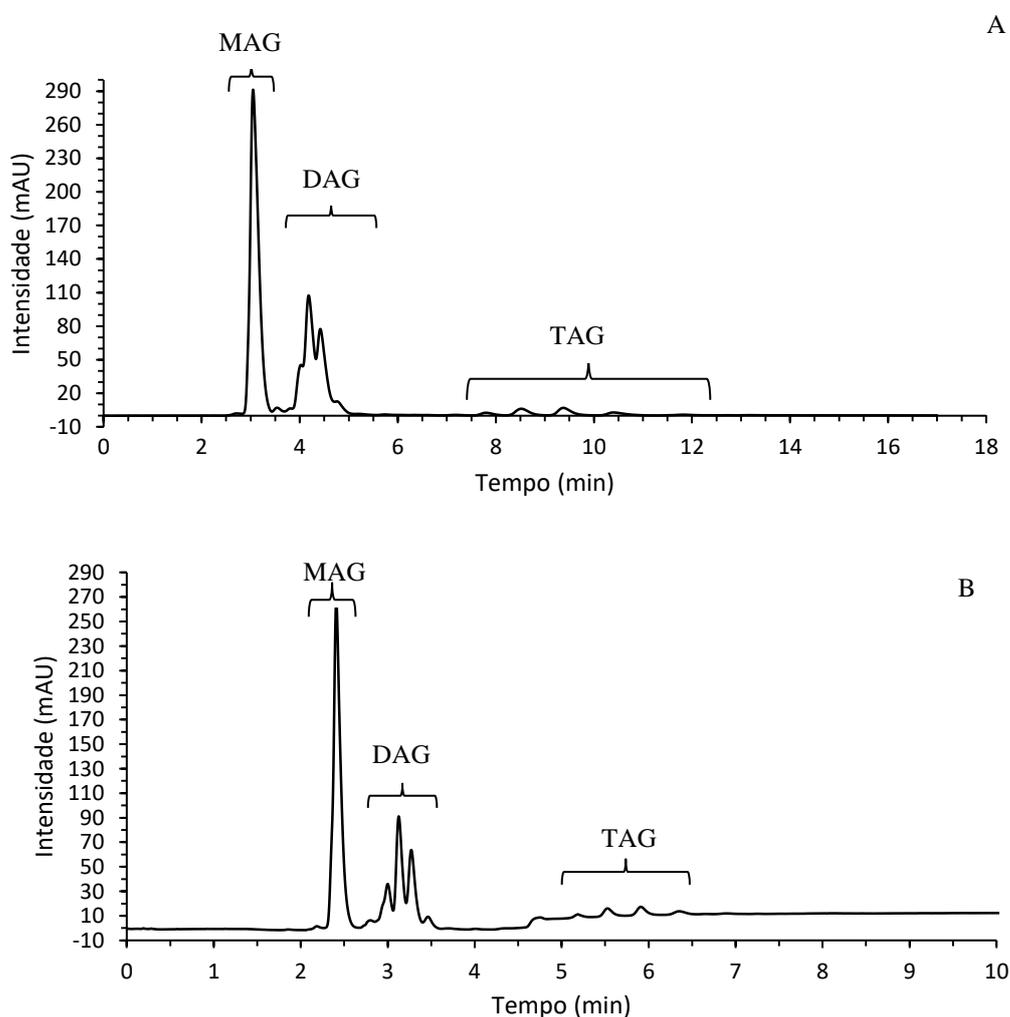


Figura 19: Cromatogramas experimentais da separação das classes de acilgliceróis empregando as colunas 1 (A) e 2 (B) - Fase móvel isocrática 1.

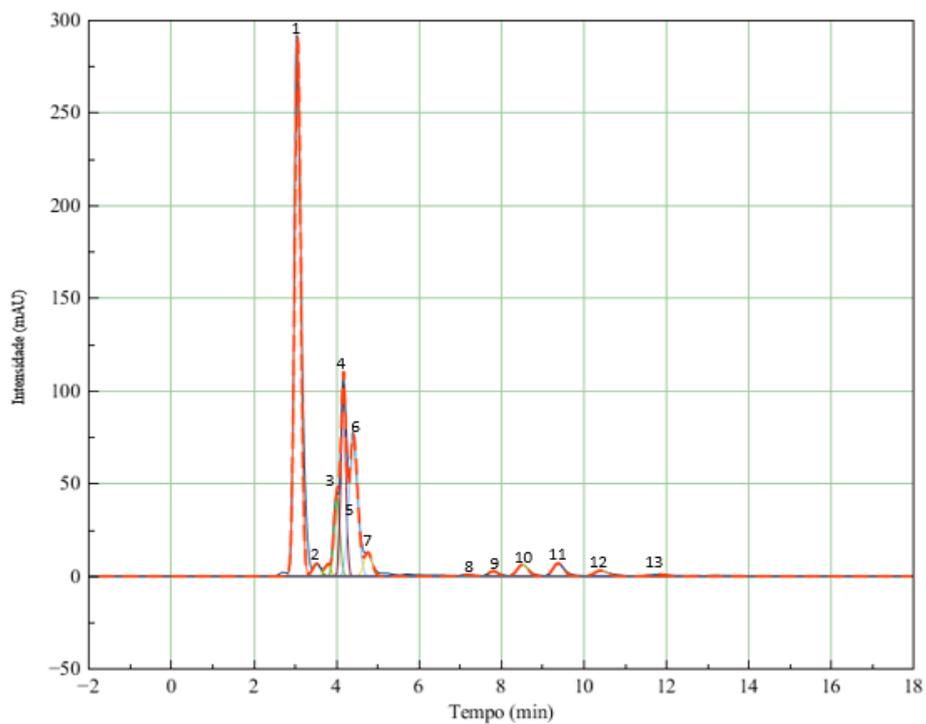
Pode-se observar para a coluna 1 (**Figura 19A**) a separação dos TAG nos tempos de 7 min a 12 min, enquanto para a coluna 2 (**Figura 19B**) essa separação ocorreu entre 5 e

7 minutos. Apesar da diferença dos tempos de retenção de mesmos componentes entre as colunas, os perfis encontrados para ambas as colunas foram parecidos. A diferença encontrada de tempos de retenção entre colunas de diferentes fabricantes seria esperada devido à diferença de propriedades de fases estacionárias (carga de carbono, polaridade, acidez, área superficial entre outros) (DOLAN *et al.*, 2004).

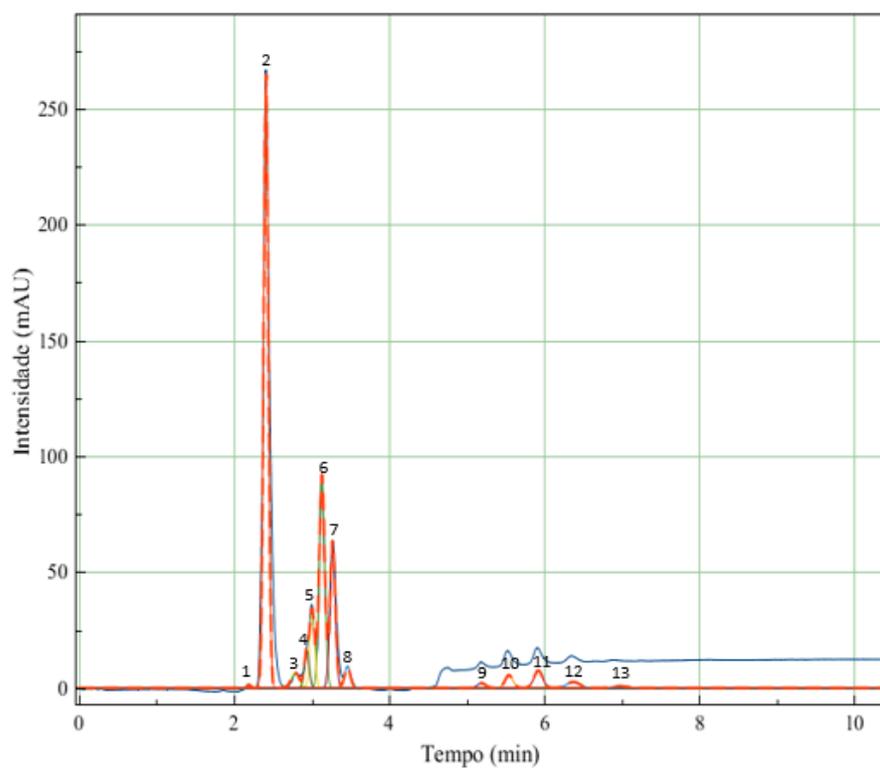
Os perfis cromatográficos para as colunas 1 e 2 seriam similares uma vez que a razão entre os volumes de fases estacionárias foi considerada na transposição direta de escala com o fator 2,85 (**Tabela 3**). No entanto, se observou uma retenção maior das classes de acilgliceróis na coluna 1 (**Figura 19A**) do que na coluna 2 (**Figura 19B**). Esta lipofilicidade pouco maior na coluna 1 pode estar associada à maior carga de carbono da sua fase (13% em Microsorb-MV) (LORENZ, 1991) do que na fase da coluna 2 (12% em Kinetex) (PHENOMENEX, 2013). Quanto maior a carga de carbono maior a quantidade de grupamentos octadecilsilanos ligados ao suporte. Apesar dessa diferença, ambas as colunas apresentam uma boa separação entre os DAG e TAG.

Essa metodologia isocrática de CLAE apresenta uma ótima resolução entre o último pico de DAG e o primeiro de TAG (aproximadamente 2 min) e um tempo de eluição relativamente curto (15 minutos).

Os dados de intensidade de sinal ao longo do tempo dos cromatogramas obtidos em escala analítica, para a coluna 1 (**Figura 19A**) e para a 2 (**Figura 19B**), foram inseridos no programa MagicPlot (**Figuras 20A e 20B**, respectivamente) com o objetivo de realizar a deconvolução dos picos e, assim, determinar os parâmetros individuais de tempo de retenção e de largura a meia altura dos componentes coeluídos e, com isso, posteriormente simular o *scale up* do aumento de volume pelos modelos previamente citados.



A



B

Figura 20: Deconvolução dos picos dos cromatogramas da separação das classes de acilgliceróis (A - coluna 1 e B - coluna 2) – Fase móvel isocrática 1

A deconvolução (**Figuras 20A e 20B**) possibilitou estimar a presença de um total de 13 picos em ambos cromatogramas cujos dados cromatográficos estão apresentados respectivamente nas **Tabelas 5 e 6**.

Tabela 5: Dados cromatográficos na Coluna 1 – Fase móvel isocrática 1 dos componentes do produto de glicerólise

Classes	Picos	Tempo de retenção (min)	Largura a meia altura (min)	Área (mAU x min)
MAG	Pico 1	3,076	0,168	51,922
DAG	Pico 2	3,536	0,222	1,577
DAG	Pico 3	3,802	0,159	1,048
DAG	Pico 4	4,024	0,156	7,519
DAG	Pico 5	4,184	0,133	14,618
DAG	Pico 6	4,424	0,235	19,173
DAG	Pico 7	4,783	0,224	3,045
TAG	Pico 8	7,162	0,390	0,288
TAG	Pico 9	7,819	0,265	0,762
TAG	Pico 10	8,531	0,294	1,987
TAG	Pico 11	9,394	0,294	2,177
TAG	Pico 12	10,430	0,351	1,125
TAG	Pico 13	11,826	0,405	0,453

Tabela 6: Dados cromatográficos na Coluna 2 – Fase móvel isocrática 1 dos componentes do produto de glicerólise

Classes	Picos	Tempo de retenção (min)	Largura a meia altura (min)	Área (mAU x min)
MAG	Pico 1	2,191	0,050	0,0724
MAG	Pico 2	2,412	0,068	19,2823
DAG	Pico 3	2,790	0,121	0,8426
DAG	Pico 4	2,937	0,070	1,2195
DAG	Pico 5	3,008	0,070	2,5231
DAG	Pico 6	3,133	0,082	7,9812
DAG	Pico 7	3,271	0,078	5,2936
DAG	Pico 8	3,463	0,086	0,8059
TAG	Pico 9	5,191	0,114	0,2536
TAG	Pico 10	5,545	0,114	0,6737
TAG	Pico 11	5,924	0,127	1,0113
TAG	Pico 12	6,375	0,188	0,5144
TAG	Pico 13	6,977	0,204	0,161

Comparando os cromatogramas obtidos experimentalmente para as colunas 1 e 2 (**Figura 19A e 19B**, respectivamente) e os cromatogramas simulados pelo modelo de Van Deemter e colaboradores (**Figura 21A e 21B**, respectivamente), foi possível observar a exatidão das estimativas dos parâmetros de retenção, das **Tabelas 5 e 6**, o que permitiu estimar a separação com outros volumes de injeção.

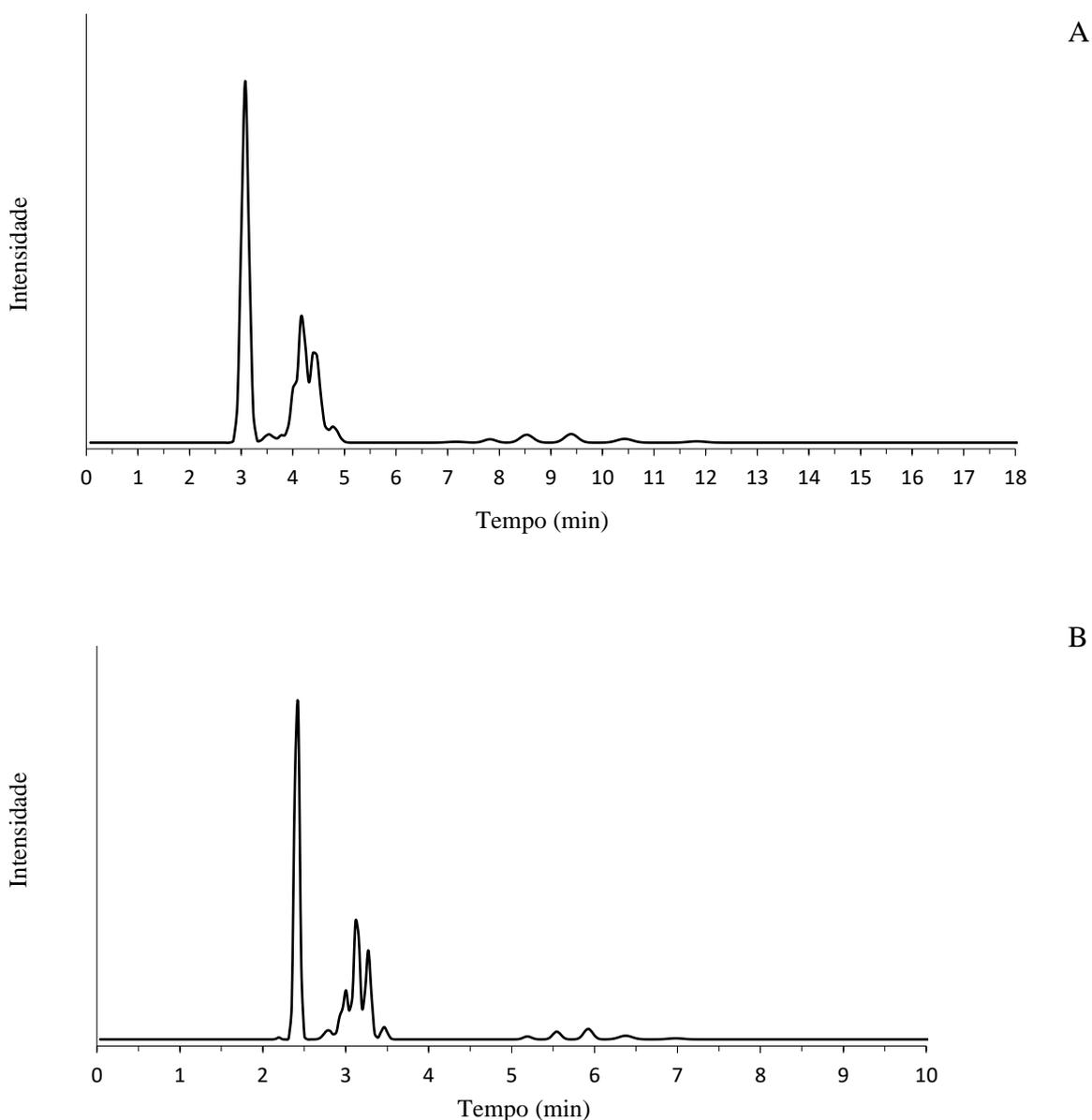


Figura 21: Cromatogramas simulados pelo modelo de Van Deemter e colaboradores para a separação das classes (sendo A - Coluna 1 e B – Coluna 2) – Fase móvel isocrática 1.

Para planejamento dessa separação de classes, foram simulados cromatogramas com aumento de volume de injeção pelo método de Stenberg para a coluna 1. Os diferentes

volumes de injeção e a descrição das figuras onde se encontram os seus respectivos cromatogramas para a coluna 1 (simulado e experimental) estão descritos na **Tabela 7**.

Tabela 7: Listagem de cromatogramas para separação das classes (Coluna 1) – Fase móvel isocrática 1

Volume de injeção (μL)	Cromatograma Simulado	Cromatograma Experimental
50	Figura 22A	Figura 24A
100	Figura 22B	Figura 24B
200	Figura 23A	Figura 25A
300	Figura 23B	Figura 25B
500	Figura 23C	Figura 25C

Os cromatogramas simulados listados na **Tabela 7** são apresentados a seguir:

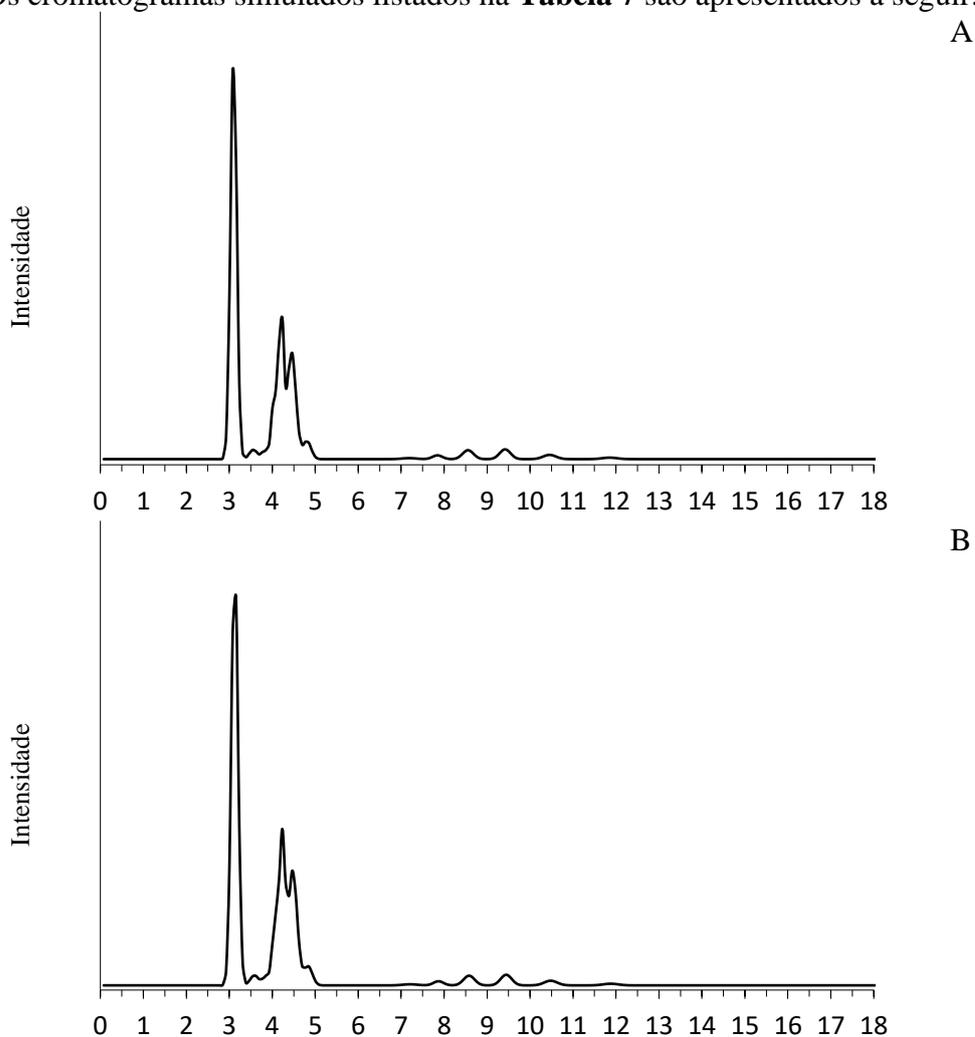


Figura 22: Cromatogramas simulados na condição da fase móvel isocrática 1 - Coluna 1 (sendo A - $V_{inj} = 50 \mu\text{L}$ e B - $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$).

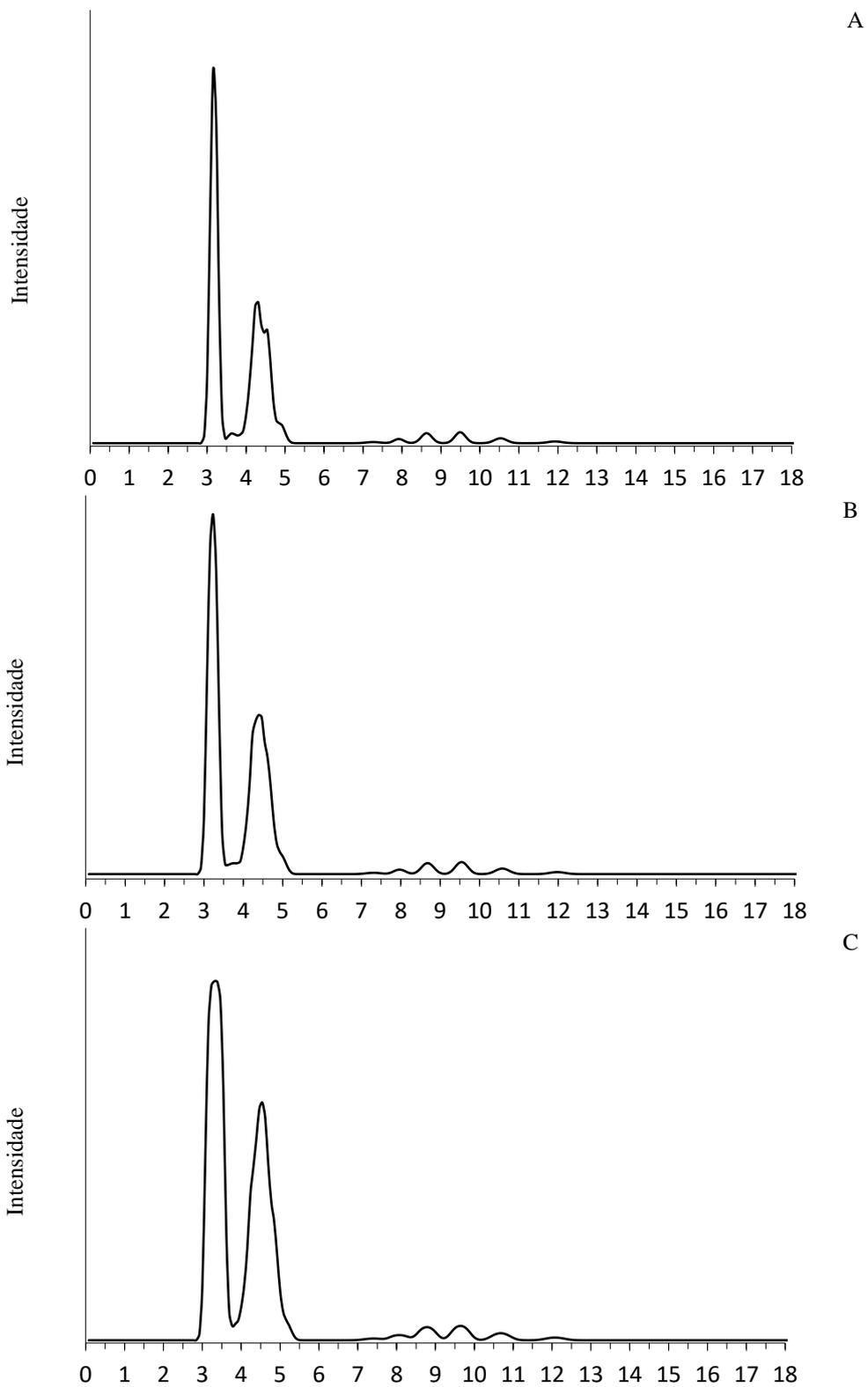


Figura 23: Cromatogramas simulados na condição da fase móvel isocrática 1 - Coluna 1 (sendo A - $V_{inj} = 200 \mu\text{L}$, B - $V_{inj} = 300 \mu\text{L}$ e C - $V_{inj} = 500 \mu\text{L}$).

A simulação dos cromatogramas com o aumento do volume de injeção possibilitou observar alterações do perfil cromatográfico como, por exemplo, a perda de resolução de sinal: entre os picos 4 e 5 (DAG) com o aumento de 50 μL para 100 μL , entre os picos 5 e 6 (DAG) com o aumento de 100 μL para 200 μL e entre os picos 6 e 7 (DAG) com o aumento de 200 μL para 300 μL .

Os cromatogramas experimentais listados na **Tabela 7** são apresentados a seguir:

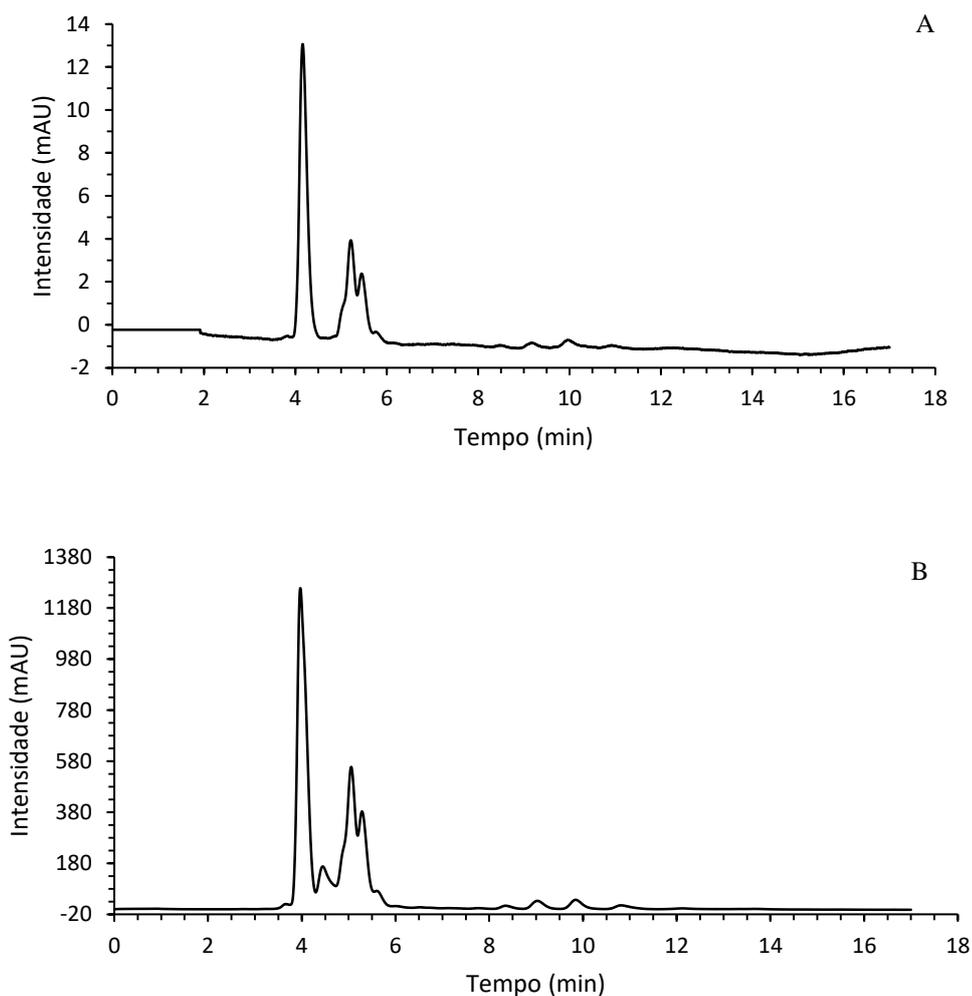


Figura 24: Cromatogramas experimentais na condição de fase móvel isocrática 1 - Coluna 1 (sendo A - $V_{inj} = 50 \mu\text{L}$ e B - $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$).

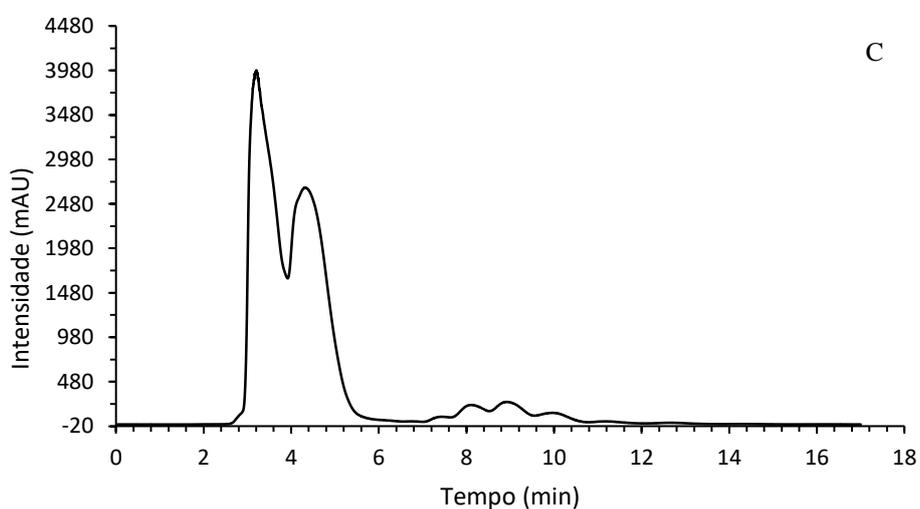
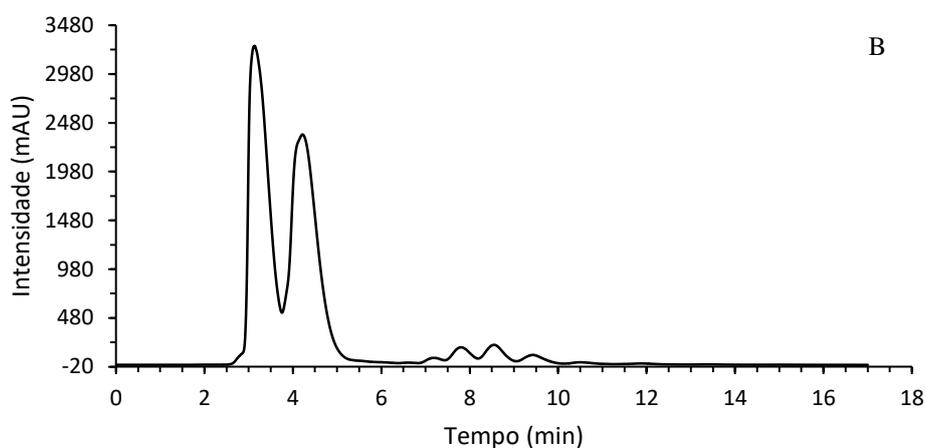
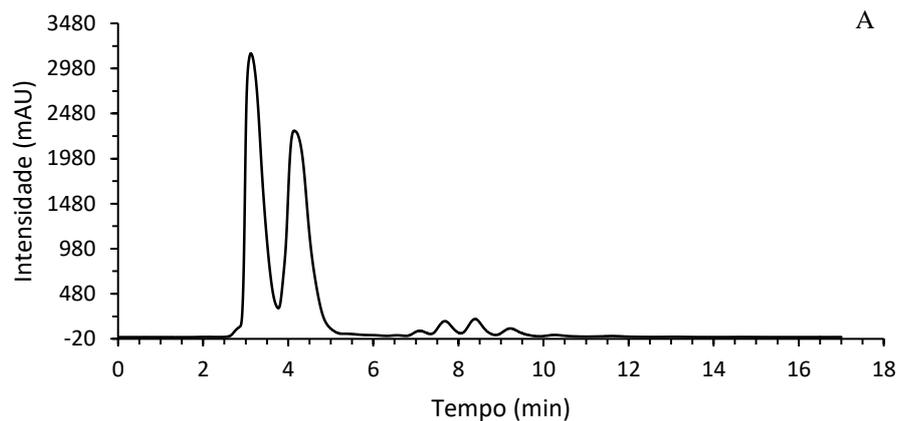


Figura 25: Cromatogramas experimentais na condição de fase móvel isocrática 1 - Coluna 1 (sendo A - $V_{inj} = 200 \mu\text{L}$, B - $V_{inj} = 300 \mu\text{L}$ e C - $V_{inj} = 500 \mu\text{L}$).

Foi observado que os cromatogramas simulados para pequenos volumes de injeção (**Figura 22**) foram bem preditivos do perfil dos obtidos experimentalmente, destacando a previsão da perda de resolução entre os picos 4 e 5 (DAG). Porém, verificou-se que

esses cromatogramas estão deslocados de 0,5 min a 1,0 min no tempo. Isso ocorreu devido a uma falha no equipamento com queda na pressão no ato da injeção levando de 0,5 a 1,0 min para estabilizar e, conseqüentemente causando atraso no cromatograma.

Nas condições de maiores volumes de injeção (a partir de 200 µL), os tempos de retenção de MAG e o tempo final de MAG e DAG foram bem representados pela simulação. A menor retenção apenas dos TAG, relativamente ao previsto, indica um equilíbrio competitivo desta classe com as demais, sobre a interação com a fase estacionária (GOLSHAN-SHIRAZI; HUANG; GUIOCHON, 1991).

No cromatograma de volume de injeção de 500 µL a diferença no perfil dos picos de MAG e DAG (≈ 4 min de eluição) entre os cromatogramas simulado e experimental é provavelmente devido ao fato da concentração exceder o limite linear de detecção do detector no cromatograma experimental, o que não é estimado pela simulação enquanto não se conheça a curva resposta do detector para altas concentrações.

Para planejamento dessa separação de classes, foram simulados cromatogramas com aumento de volume de injeção pelo modelo de Stenberg para coluna 2. A listagem dos diferentes volumes de injeção e a descrição das figuras onde se encontram seus respectivos cromatogramas para a coluna 2 (simulado e experimental) estão descritos na **Tabela 8**. Os volumes planejados foram maiores que para a coluna 1 pois a coluna 2 apresenta maiores dimensões por se tratar de uma coluna de escala semi preparativa.

Tabela 8: Relação de cromatogramas para separação das classes (Coluna 2) – Fase móvel isocrática 1

Volume de injeção (µL)	Cromatograma Simulado	Cromatograma Experimental
50	Figura 26A	Figura 28A
100	Figura 26B	Figura 28B
200	Figura 26C	Figura 28C
500	Figura 27A	Figura 29A
1000	Figura 27B	Figura 29B
2000	Figura 27C	Figura 29C

Os cromatogramas simulados listados na **Tabela 8** são apresentados a seguir:

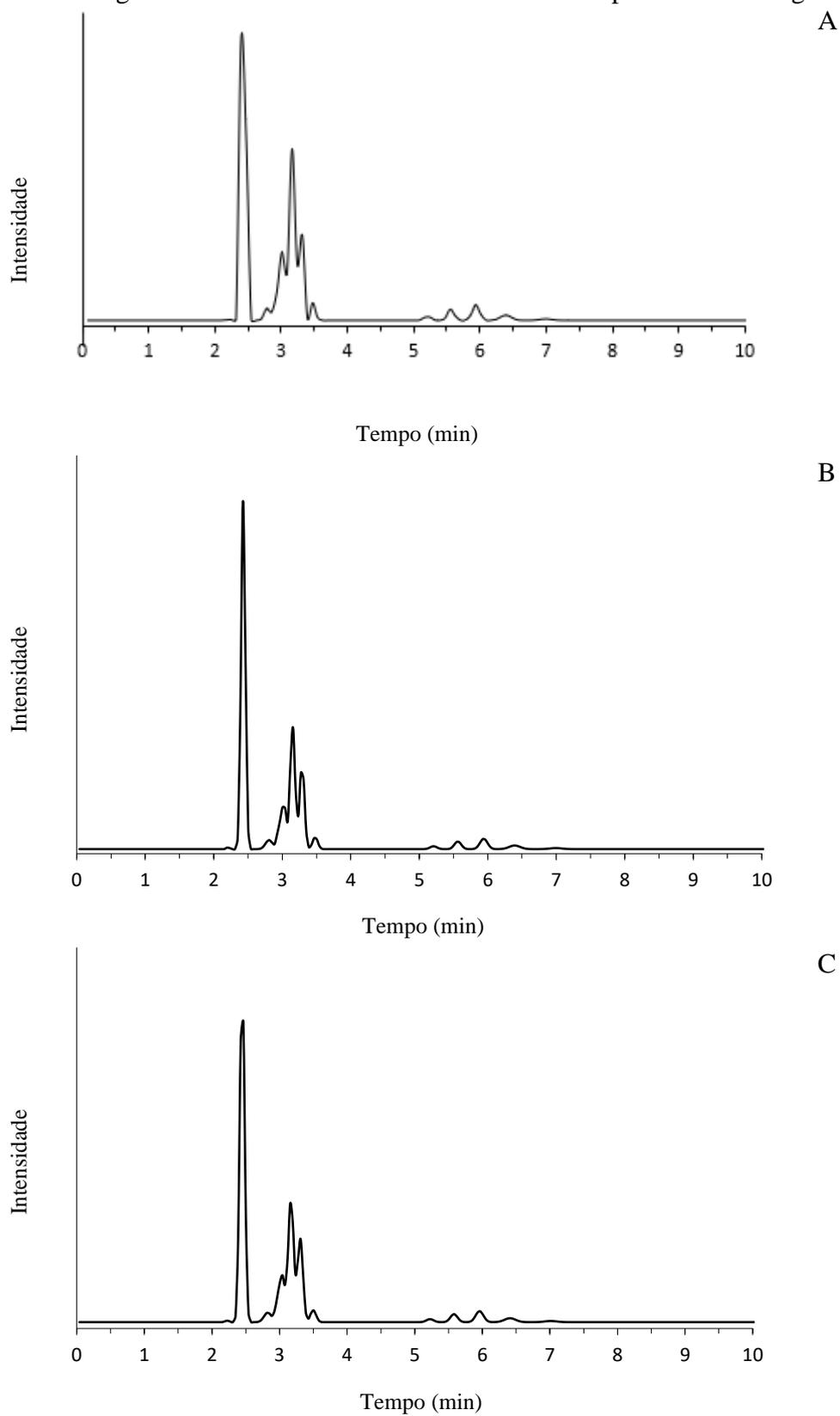
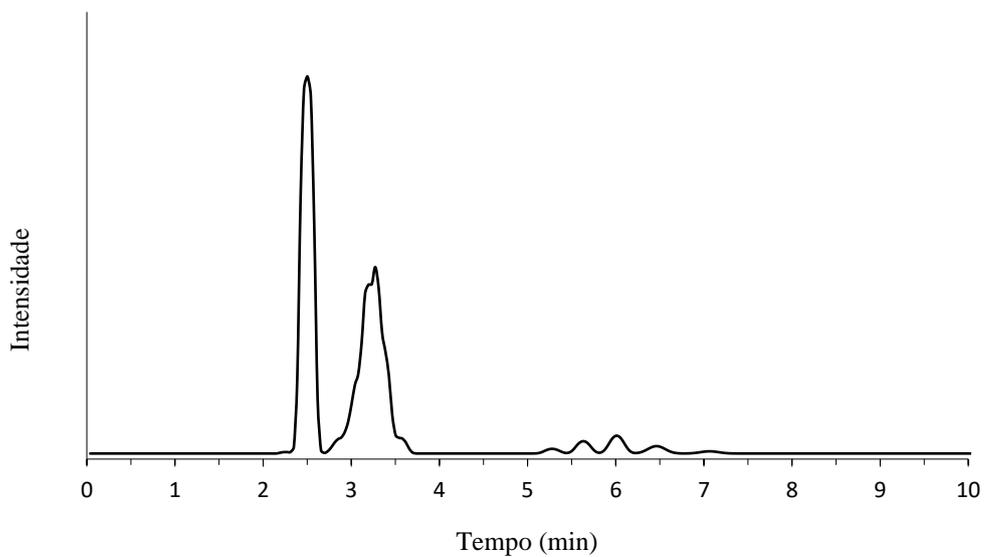
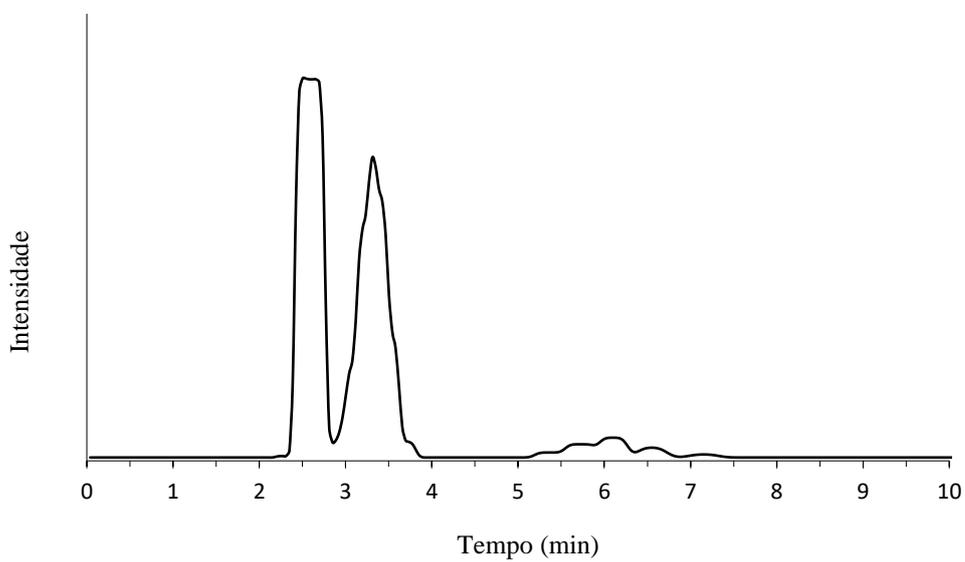


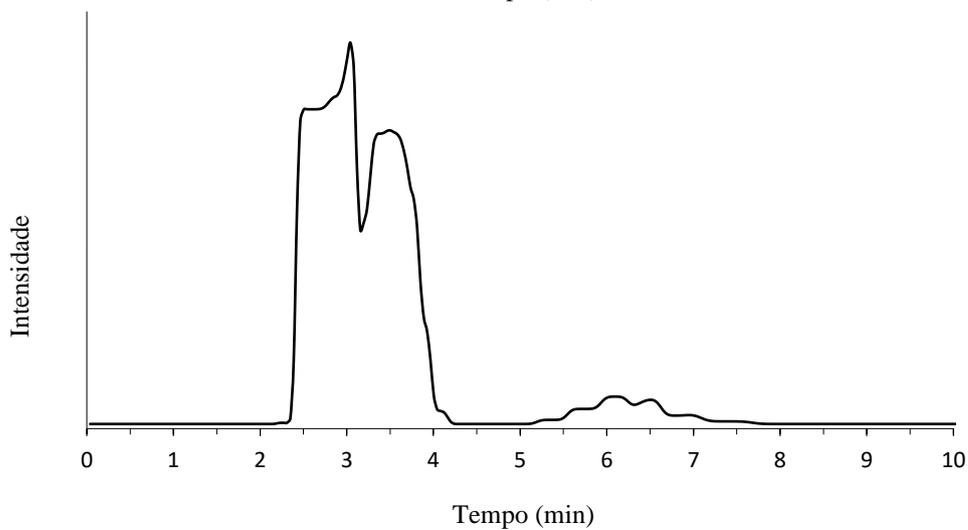
Figura 26: Cromatogramas simulados na condição da fase móvel isocrática 1 - Coluna 2 (sendo A - $V_{inj} = 50 \mu\text{L}$, B - $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ e C - $V_{inj} = 200 \mu\text{L}$).



A



B



C

Figura 27: Cromatogramas simulados na condição da fase móvel isocrática 1 - Coluna 2 (sendo A - $V_{inj} = 500 \mu\text{L}$, B - $V_{inj} = 1000 \mu\text{L}$ e C - $V_{inj} = 2000 \mu\text{L}$).

A simulação dos cromatogramas com o aumento do volume de injeção possibilitou observar o mesmo perfil entre as injeções com volumes de 50 μL e 100 μL (**Figura 26A** e **26B**), uma perda de resolução entre os picos 5 e 6 (DAG) entre as injeções com volume de 100 μL e 200 μL mas ainda mantendo a separação entre os MAG e DAG.

Já com o aumento para 500 μL (**Figura 27A**) possibilitou observar a perda de resolução entre os picos de DAG mas ainda mantendo a separação entre os MAG e DAG.

O cromatograma com o volume de injeção 1000 μL (**Figura 27B**) apresentou o perfil com as bandas de MAG e DAG “se tocando” (“*touching bands*”).

Já com o aumento para 2000 μL (**Figura 27C**) foi possível observar um perfil de sobreposição de sinais, quando o perfil do primeiro sinal passa a ser retangular (MAG) e sobrepõe com o início do pico de DAG.

Os cromatogramas experimentais listados na **Tabela 8** são apresentados a seguir:

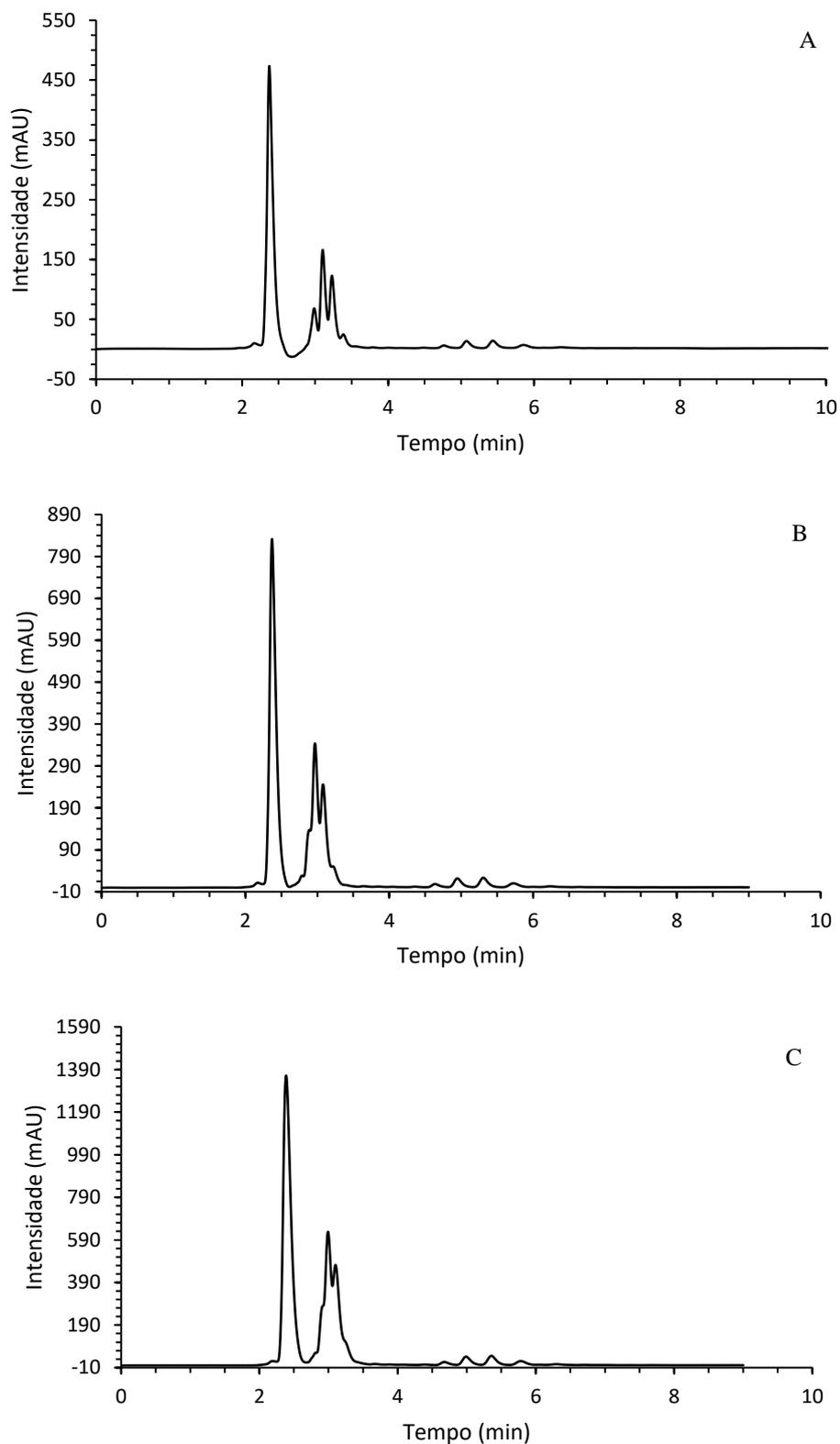


Figura 28: Cromatogramas experimentais com fase móvel isocrática 1 - Coluna 2 (sendo A - $V_{inj} = 50 \mu\text{L}$, B - $V_{inj} = 100 \mu\text{L}$ e C - $V_{inj} = 200 \mu\text{L}$).

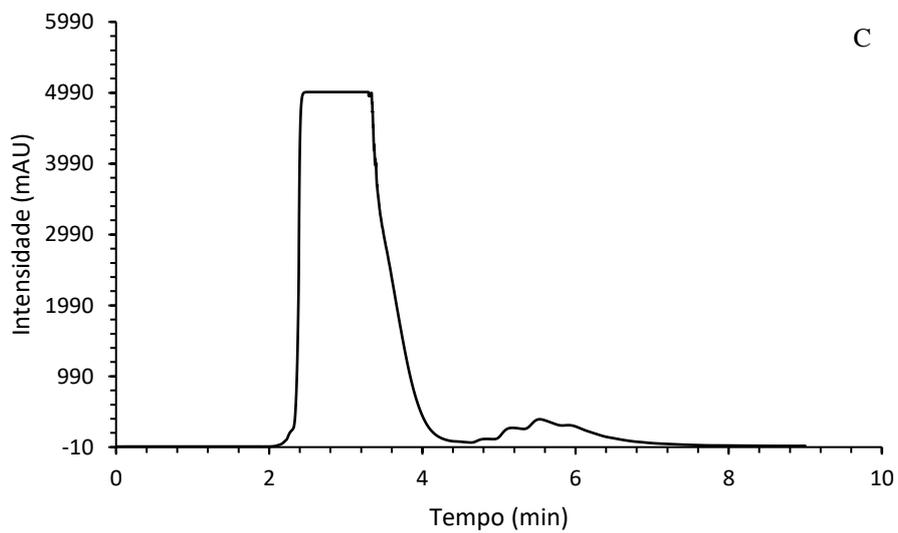
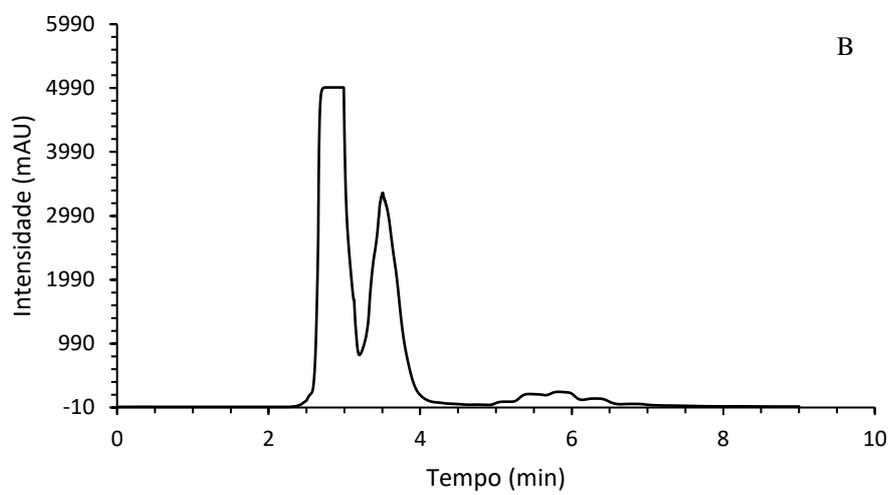
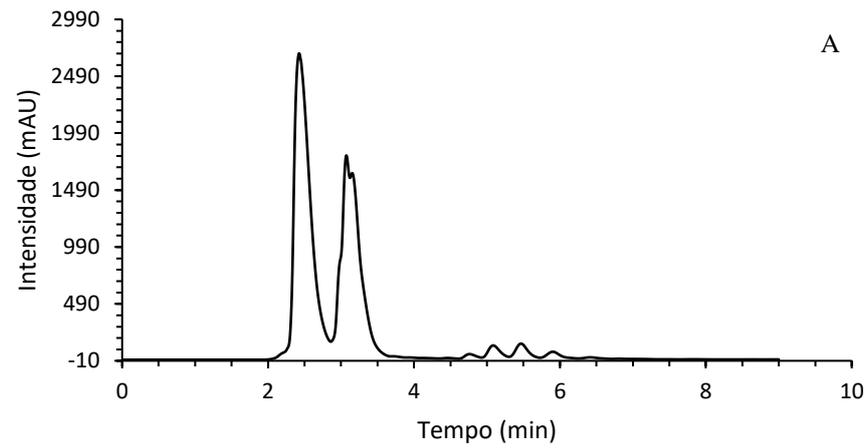


Figura 29: Cromatogramas experimentais com fase móvel isocrática 1 - Coluna 2 (sendo A - $V_{inj} = 500 \mu\text{L}$, B - $V_{inj} = 1000 \mu\text{L}$ e C - $V_{inj} = 2000 \mu\text{L}$).

Foi observado que os cromatogramas simulados para volumes de injeção (**Figura 26**) de 50 e 200 μL foram bem preditivos do perfil dos obtidos experimentalmente destacando a previsão da perda de resolução entre os picos 5 e 6 (DAG) no cromatograma com volume de injeção de 200 μL (**Figura 26C e 28C**).

Nas condições a partir de 200 μL , os tempos de retenção de MAG e o tempo final de MAG e DAG foram bem representados pela simulação (**Figuras 28C e 29**).

Foi observado também que os cromatogramas experimentais para volumes maiores (1000 μL - **Figura 29B** e 2000 μL - **Figura 29C**) apresentaram saturação do sinal pelo detector e com isso, os picos apresentaram a forma de trapézio. Vale destacar a previsão da perda de resolução entre as classes para o volume de injeção de 1000 μL (**Figura 27B e 29B**).

No cromatograma de volume de injeção de 2000 μL (**Figura 29C**) a diferença no perfil entre os picos de MAG e DAG é devido ao limite linear de detecção do detector.

Para realizar a etapa de coleta dos acilgliceróis, foi utilizado o sistema de janela de tempo e a coleta foi realizada até o tempo de eluição de 3 minutos (ao injetar 1000 μL e 2000 μL). Nessa etapa optou-se por coletar somente a classe de MAG, que foi caracterizada pela metodologia de CLAE descrita por Andrade (2011), conforme cromatograma apresentado na **Figura 30**.

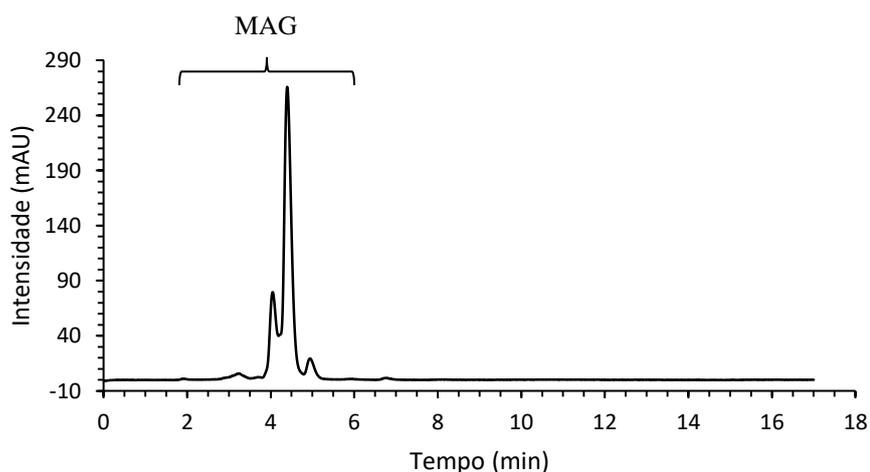


Figura 30: Caracterização da fração coletada por CLAE – em condições descritas no item 4.2, assinalamento seguindo Carvalho (2018).

Vale ressaltar que a metodologia por cromatografia a gás, citada anteriormente, foi desenvolvida após essa etapa do trabalho.

Após essa etapa do trabalho, a coluna 2 perdeu eficiência de separação e, com isso, novas frações foram coletadas, porém com um volume de injeção de apenas 150 μL . A **Figura 31** a seguir apresenta o cromatograma representativo da sequência de 3 injeções com o volume de injeção de 150 μL .

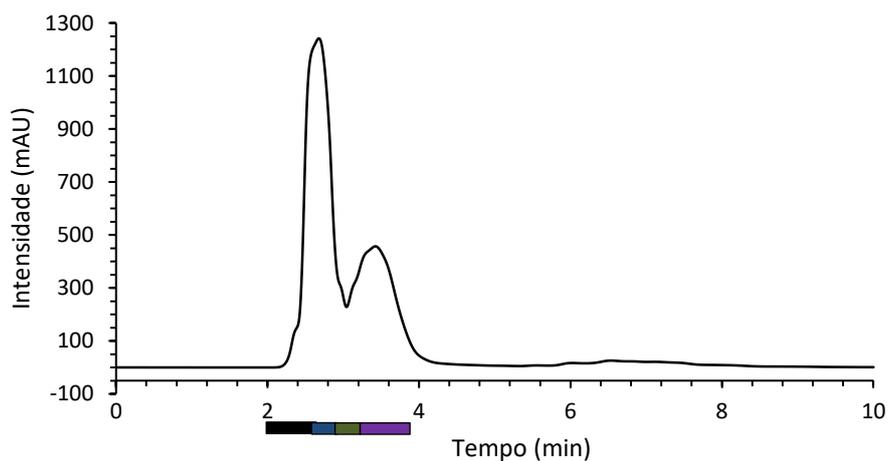


Figura 31: Cromatograma experimental representativo da sequência de injeções com fase móvel isocrática 1 - Coluna 2 ($V_{inj} = 150 \mu\text{L}$)

Foram recolhidas 4 frações (assinaladas no cromatograma) segundo os seguintes tempos: 2 até 2,6 min (FI1.1 - preto), 2,6 até 2,9 min (FI1.2 - azul), 2,9 até 3,2 min (FI1.3 - verde) e 3,2 até 4,0 min (FI1.4 - roxo).

Essas frações foram analisadas por cromatografia a gás (**Figuras 32 a 39**) de acordo com a metodologia desenvolvida descrita no item 4.8.

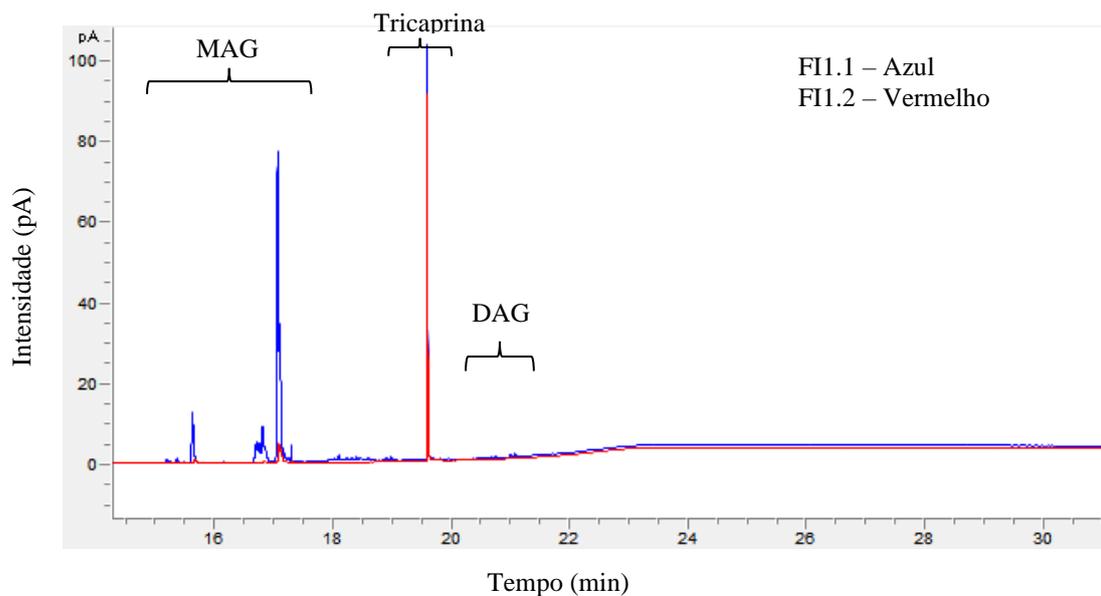


Figura 32: Cromatogramas obtidos por CG das frações 1 e 2 coletadas na eluição cromatográfica representada na Figura 31. Tricaprina é um padrão interno.

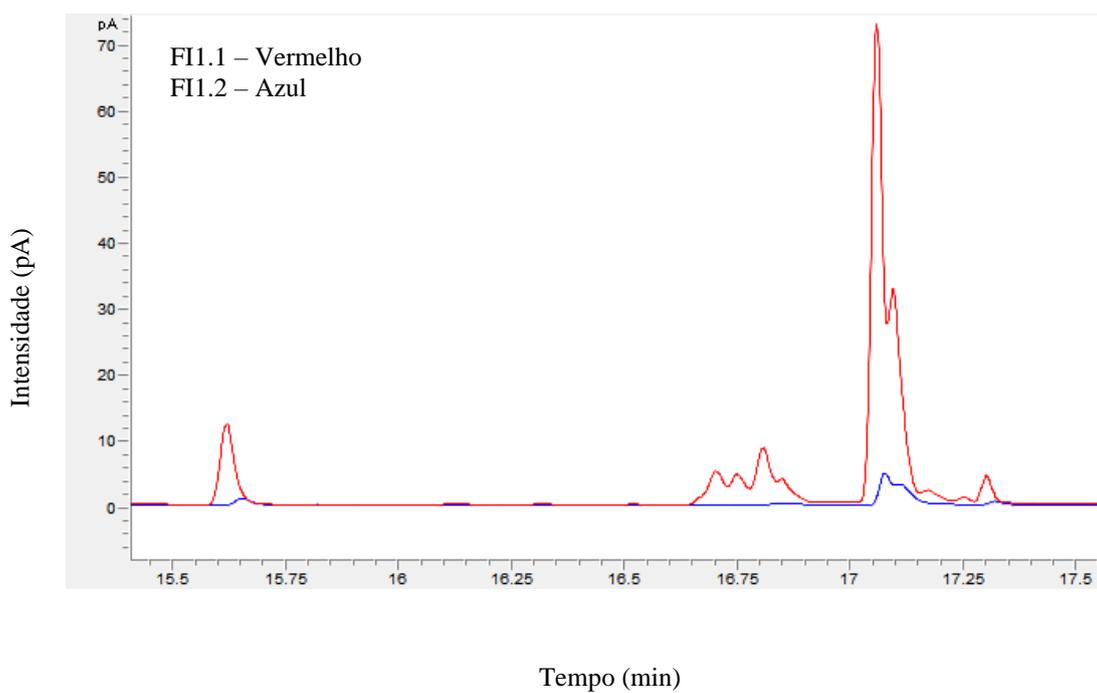


Figura 33: Ampliação na região de eluição dos MAG nos cromatogramas da Figura 32.

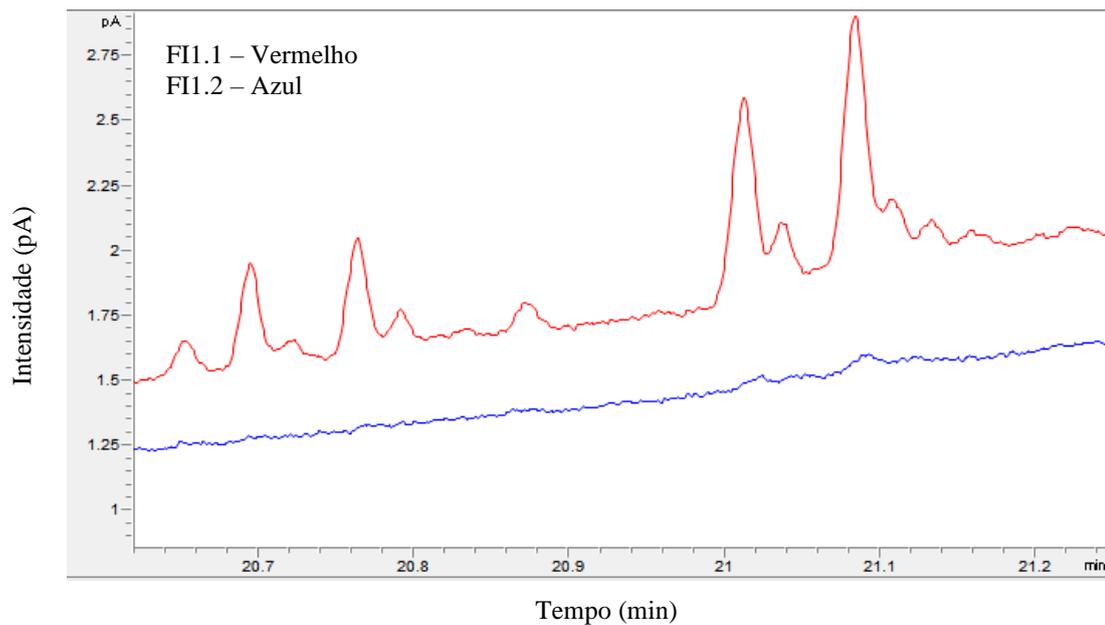


Figura 34: Ampliação na região de eluição dos DAG nos cromatogramas da Figura 32.

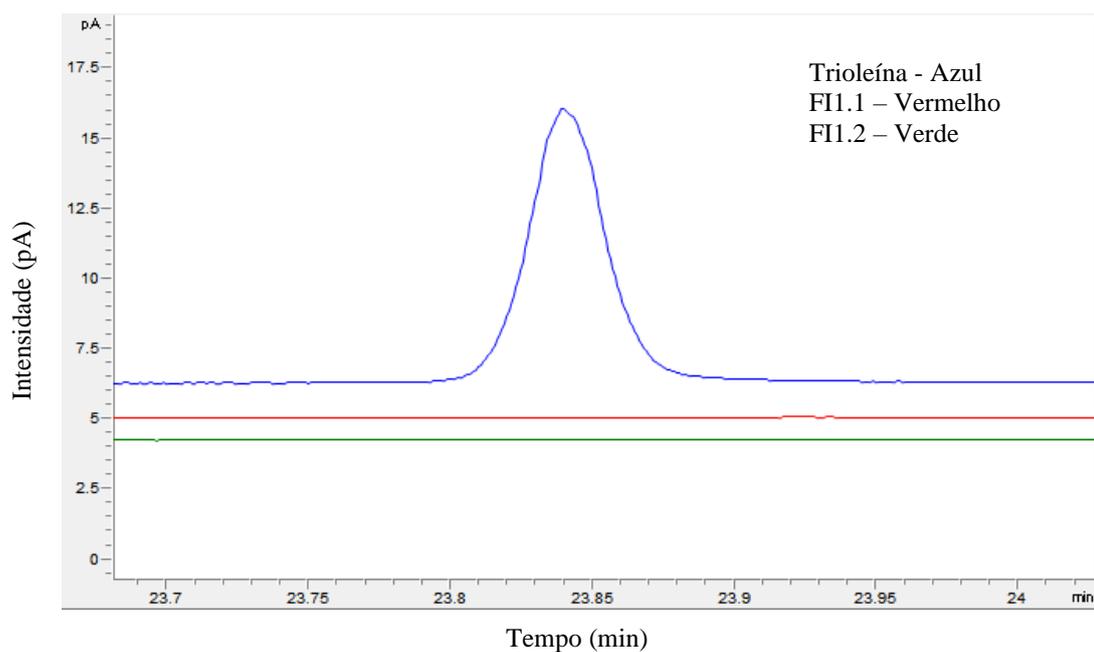


Figura 35: Ampliação na região de eluição dos TAG nos cromatogramas da Figura 32. Trioleína é um padrão de TAG somente para observação do tempo de retenção dessa classe.

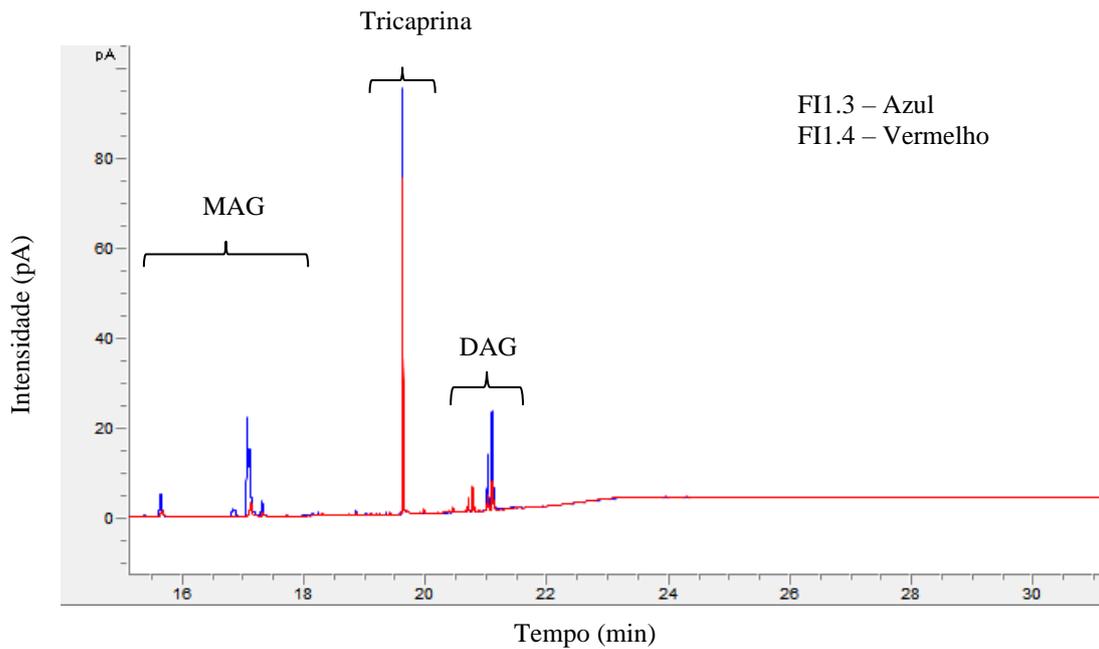


Figura 36: Cromatogramas obtidos por CG das frações 3 e 4 coletadas na eluição cromatográfica representada na Figura 31. Tricaprina é um padrão interno.

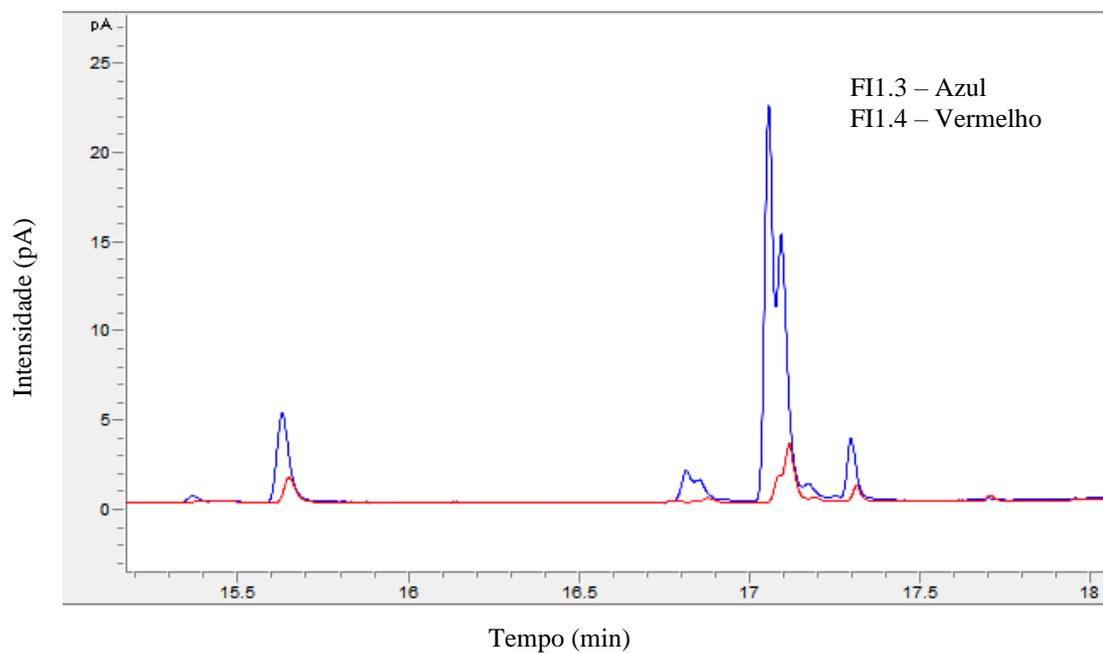


Figura 37: Ampliação na região de eluição dos MAG nos cromatogramas da Figura 36.

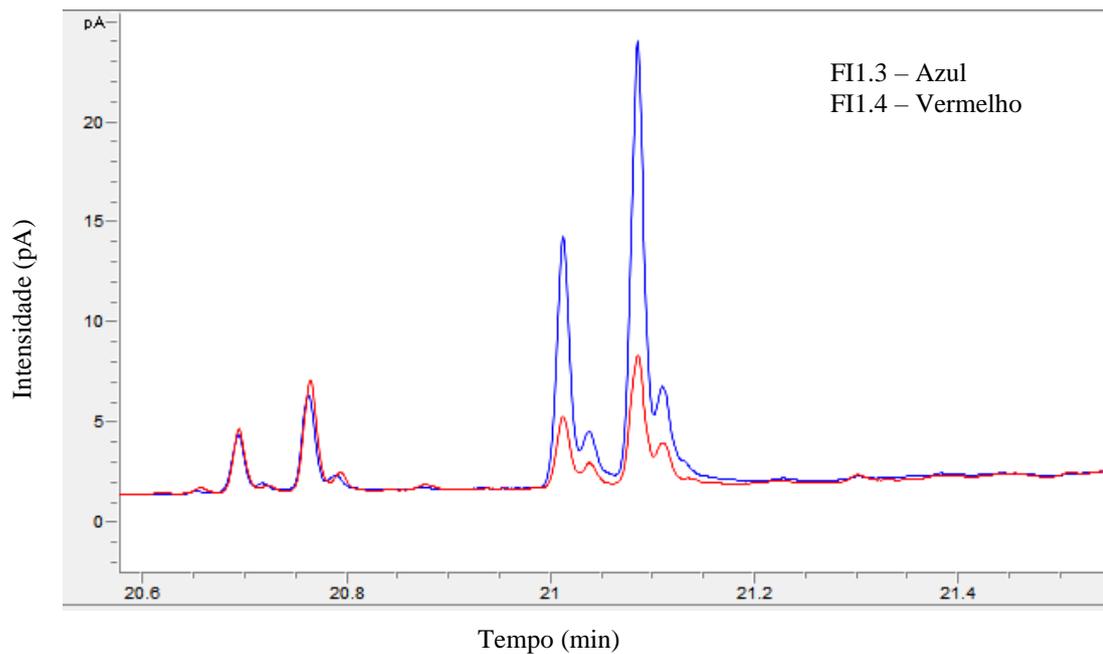


Figura 38: Ampliação na região de eluição dos DAG nos cromatogramas da Figura 36.

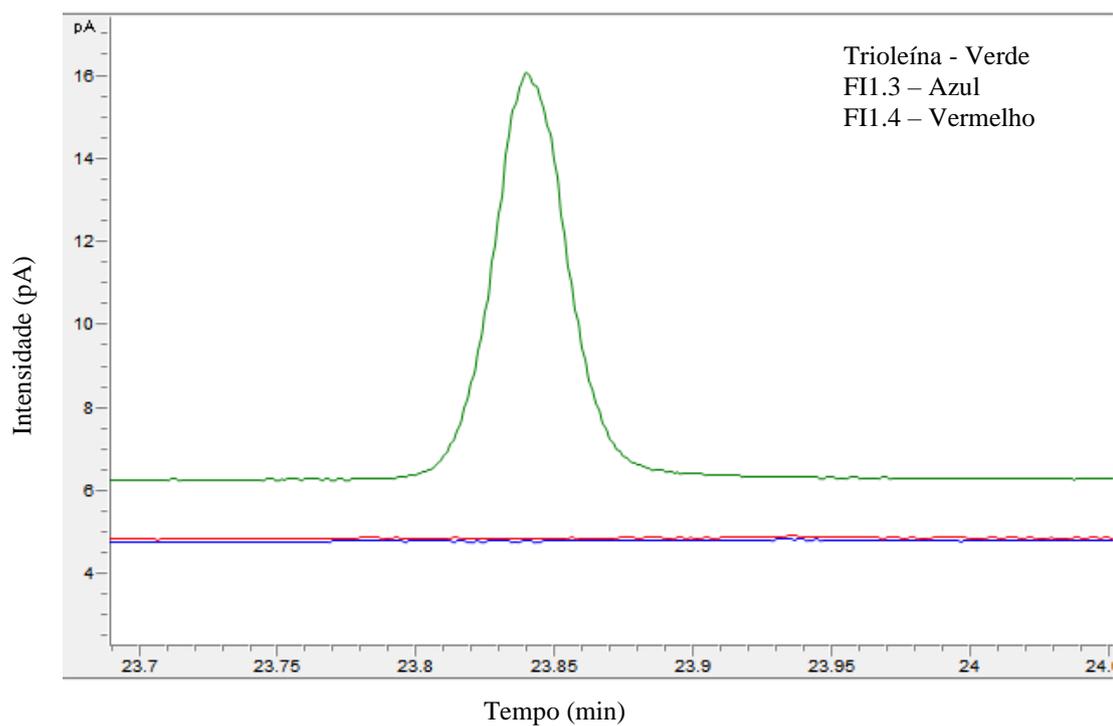


Figura 39: Ampliação na região de eluição dos TAG nos cromatogramas da Figura 36. Trioleína é um padrão de TAG somente para observação do tempo de retenção dessa classe.

Os teores percentuais em massa encontrados para cada fração, por CG, usando a técnica de diluição estão descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9: Resultados de teor das classes acilgliceróis nas frações coletadas por CG - Fase móvel isocrática 1

	FI1.1	FI1.2	FI1.3	FI1.4
MAG (%m/m)	91,3	10,6	47,8	9,2
DAG (%m/m)	1,5	0,0	26,8	10,8
TAG (%m/m)	0,0	0,0	0,0	0,0

MAG: monoacilgliceróis; DAG: diacilgliceróis e TAG: Triacilgliceróis

Com isso, foi possível observar que, com essa fase móvel, só foi possível coletar frações ricas em MAG (FI1.1 e FI1.2), porém as frações que deveriam ser ricas em DAG (FI1.3 e FI1.4) possuíram contaminação com MAG.

Vale ressaltar a ausência de TAG em todas as frações coletadas, o que sugere que a fase móvel testada pode ser considerada adequada caso o objetivo for o de realizar o *clean-up* dessa classe.

5.2.3. Fase móvel isocrática 2

Essa composição de fase móvel foi escolhida por permitir uma melhor separação entre as classes de MAG e DAG e não possuir um tempo de eluição longo.

O cromatograma obtido para as condições estabelecidas no item 4.4.3 com 65% (metanol) + 35% (*i*-propanol:*n*-hexano (5:4, em volume) e na **Tabela 3** está apresentado na **Figura 40**, para a coluna 2.

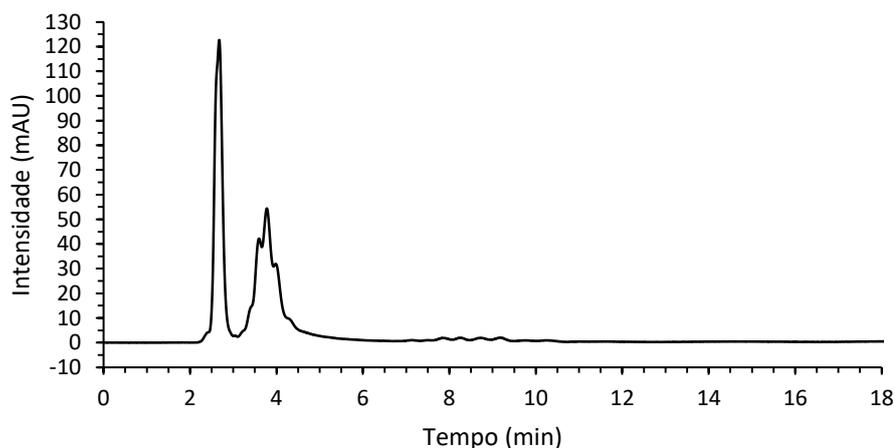


Figura 40: Cromatograma experimental da separação das classes (Coluna 2), obtido por CLAE-UV - Fase móvel isocrática 2.

O cromatograma obtido em escala analítica, para a coluna 2 (**Figuras 40**), foi projetado no programa MagicPlot (**Figura 41**) com o objetivo de realizar a deconvolução dos picos, para determinar os parâmetros individuais de tempo de retenção e de largura a meia altura dos componentes coeluídos e, com isso, posteriormente simular o *scale up* do aumento de volume pelos modelos previamente citados.

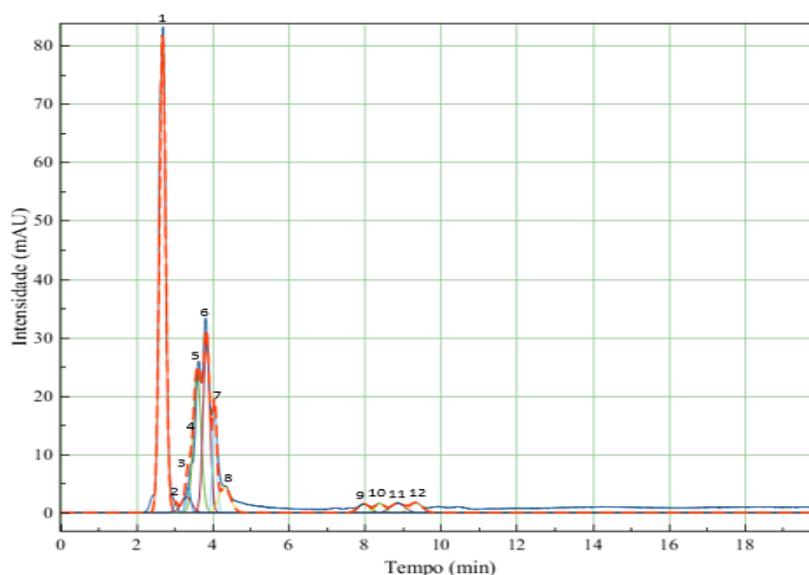


Figura 41: Deconvolução dos picos do cromatograma da separação das classes (Coluna 2) – Fase móvel isocrática 2.

A deconvolução (**Figura 41**) possibilitou observar a presença de um total de 12 picos, dos quais foram obtidos seus dados cromatográficos (**Tabela 10**).

Tabela 10: Dados cromatográficos, obtidos por CLAE-UV, da separação das classes pela Coluna 2 – Fase móvel isocrática 2

Classes	Picos	Tempo de retenção (min)	Largura a meia altura (min)	Área (mAU x min)
MAG	Pico 1	2,689	0,186	16,474
MAG	Pico 2	3,032	0,111	0,190
DAG	Pico 3	3,325	0,316	0,885
DAG	Pico 4	3,367	0,135	0,646
DAG	Pico 5	3,600	0,236	6,168
DAG	Pico 6	3,847	0,199	6,410
DAG	Pico 7	4,063	0,125	2,326
DAG	Pico 8	4,322	0,347	1,614
TAG	Pico 9	7,986	0,336	0,519
TAG	Pico 10	8,400	0,283	0,458
TAG	Pico 11	8,874	0,422	0,709
TAG	Pico 12	9,356	0,368	0,650

Comparando os cromatogramas obtidos para a coluna 2, experimentalmente (**Figura 40**) e simulado pelo modelo de Van Deemter e colaboradores (**Figura 42**), foi possível observar a exatidão das estimativas dos parâmetros de retenção, da **Tabela 10**, o que permitiu estimar a separação com outros volumes de injeção.

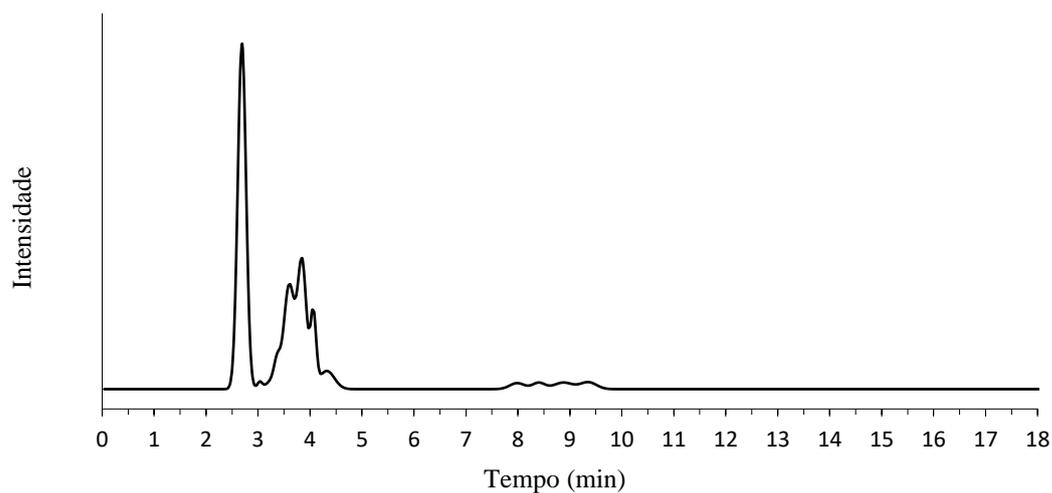


Figura 42: Cromatograma simulado pelo modelo de Van Deemter e colaboradores (Coluna 2) – Fase móvel isocrática 2.

Foram simulados cromatogramas com o aumento de volume de injeção pelo método de Stenberg para a coluna 2.

Os cromatogramas simulados e experimentais para os volumes de injeção de 50 e 150 μL são apresentados a seguir.

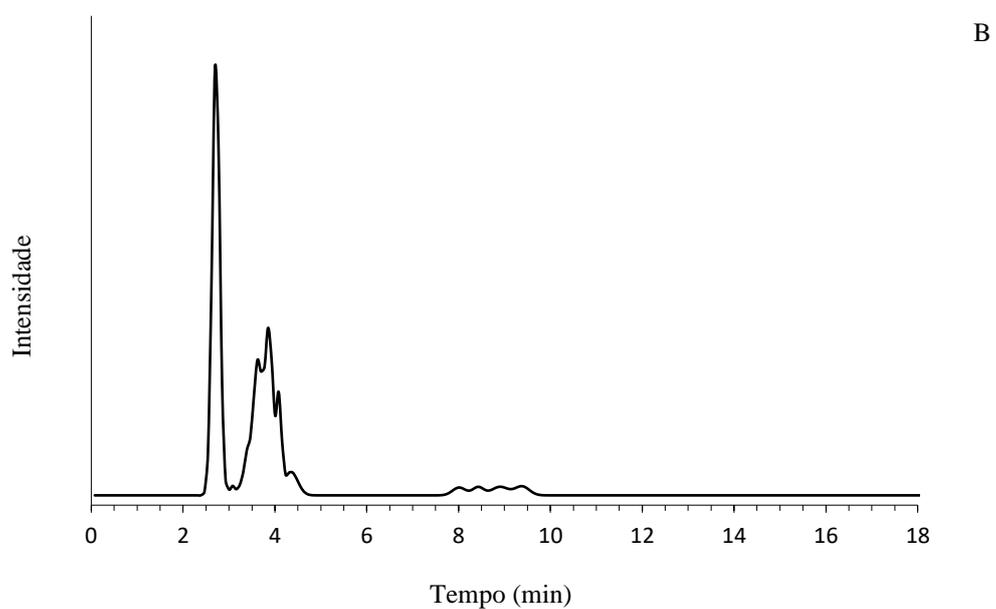
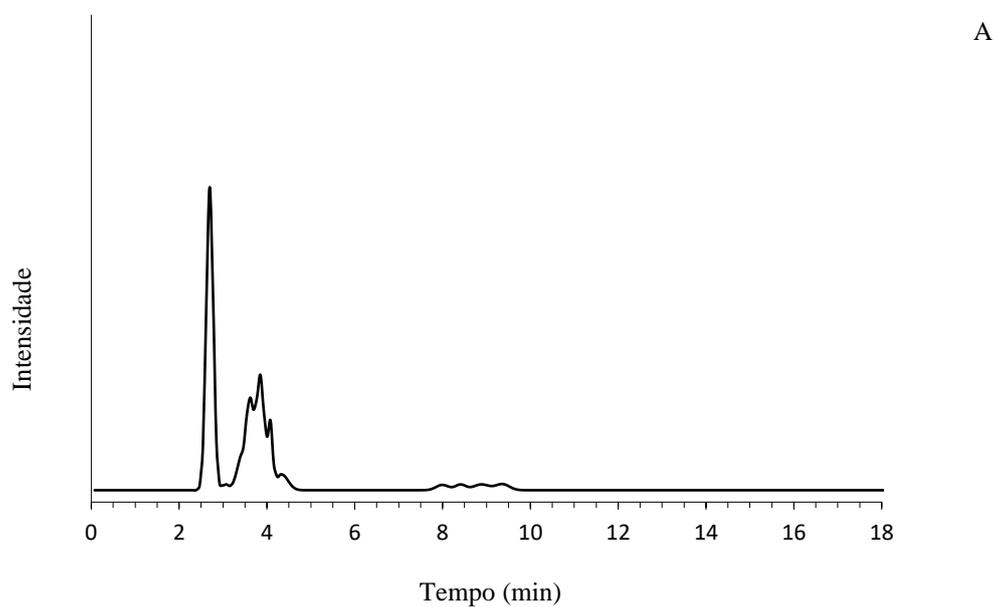


Figura 43: Cromatogramas simulados (A e B) com fase móvel isocrática 2 - Coluna 2. Sendo os volumes de injeção de 50 μL e 150 μL , respectivamente.

Foi possível observar o mesmo perfil dos componentes apesar do aumento do volume de injeção.

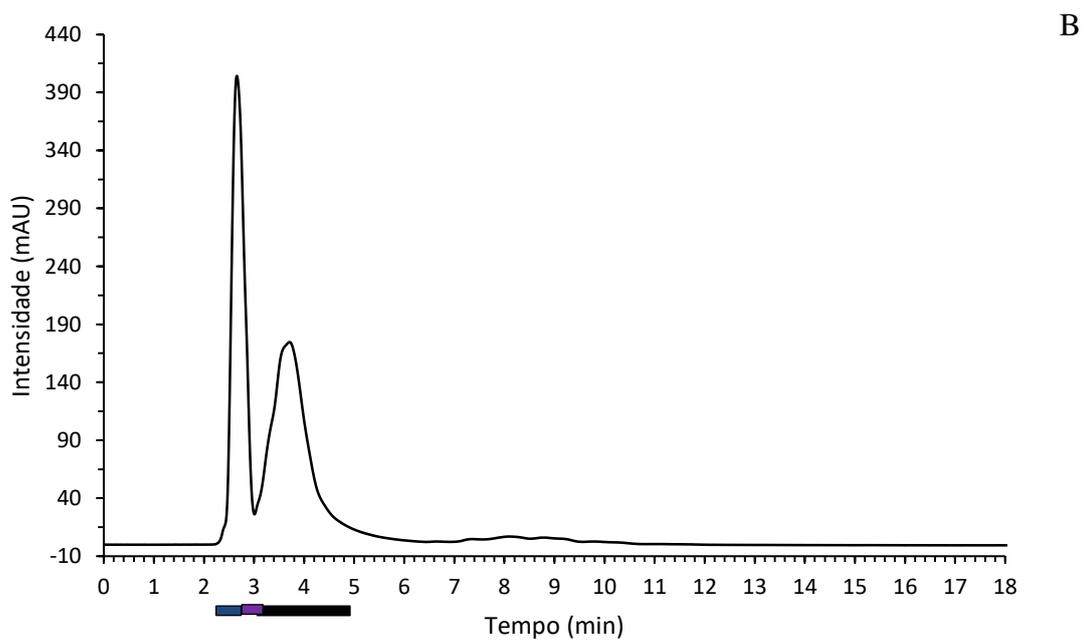
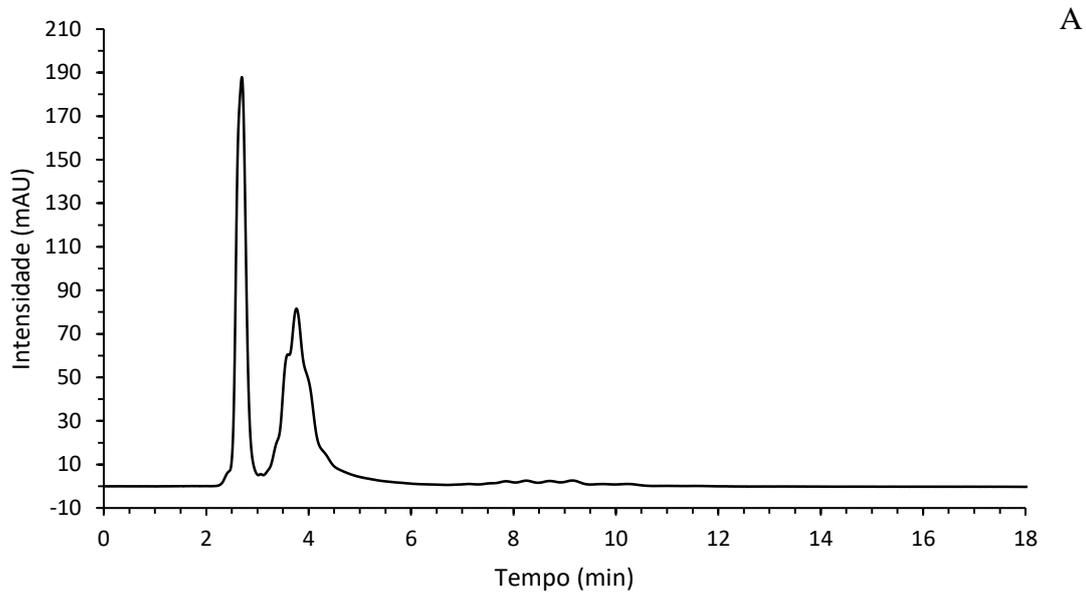


Figura 44: Cromatogramas experimentais (A e B) com fase móvel isocrática 2 - Coluna 2. Sendo os volumes de injeção de 50 μL e 150 μL , respectivamente.

Foi possível observar nos cromatogramas experimentais uma perda de resolução entre os picos de DAG já na injeção de 50 μL e entre as classes de MAG e DAG na injeção de

150 μL . Isso pode ser explicado devido à perda de eficiência de separação da coluna 2 no decorrer do aumento do volume de injeção para essa fase móvel.

Apesar da diferença entre os cromatogramas simulados e experimentais, foi realizada a coleta das alíquotas das frações de MAG e DAG. Para isso, foi utilizado o sistema de janela de tempo nas eluições com injeção de 150 μL (assinalamento das frações na **Figura 44B**). Os cromatogramas e as três frações coletadas foram: FI2.1 de 2,3 a 2,8 min (azul); FI2.2 de 2,8 a 3,2 min (roxo) e FI2.3 de 3,2 a 5,0 min (preto). Essas frações foram analisadas por CG de acordo com a metodologia desenvolvida e os resultados encontrados não foram conclusivos.

Foi possível observar que todas as frações possuíam as três classes em sua composição. Esse erro durante a separação pode ter ocorrido devido à perda de eficiência de separação da coluna 2 e/ou a um erro experimental na realização da coleta das frações. No entanto, réplicas deste processo em ambas colunas deverão ser realizadas para separar os componentes com o uso dessa fase móvel, aplicando o método de CG sugerido no presente trabalho.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizada a reação de glicerólise do óleo de soja com razão molar glicerol:óleo de 3:1, temperatura de 230 °C e tempo reacional de 30 min, conforme descrito por Carvalho (2018) a fim de obter um produto rico em MAG e DAG. A reação foi caracterizada por CLAE obtendo os resultados de 58% de MAG, 37% de DAG e 5% de TAG não reagidos, o que está bem próximo ao encontrado por Carvalho (2018) que foi de 7% de TAG não reagidos para as mesmas condições de reação, o que indica que a reação pode ser de boa reprodutibilidade. Além disso, o produto da reação de glicerólise foi caracterizado por CG, porém o método de referência (ASTM) é aplicado para a matriz biodiesel, ou seja, para quantificar MAG, DAG e TAG em níveis de contaminantes. Por isso, foi desenvolvido um método de preparo de amostra, baseado em uma pré-diluição, para quantificação de MAG, DAG e TAG em reação de glicerólise de óleos vegetais. Alíquotas do produto de reação foram diluídas com 100 e 200 µL de piridina, para depois seguir o procedimento descrito pela norma, ou seja, pesagem de 100 mg da mistura diluída e adição dos padrões internos (tricaprina e butanotriol), do derivatizante (MSTFA) e do solvente *n*-Heptano. Assim a diluição com 100 µL de piridina e 2 mg de massa da amostra inicial foi escolhida para dar prosseguimento ao estudo e foram obtidos os seguintes resultados pela técnica de cálculo de diluição: 33,2% m/m de MAG, 10,7% m/m de DAG e 3,4% m/m de TAG. Vale ressaltar a importância do desenvolvimento dessa metodologia, para a matriz de acilgliceróis para alcançar um procedimento factível nos laboratórios de controle de qualidade de biodiesel.

Além disso, foi realizado um estudo da aplicação dos modelos matemáticos de momentos estatísticos de Van Deemter e colaboradores (1956) e de Stenberg (1966) na previsibilidade e planejamento de transposição de escala de separações por CLAE no isolamento das classes de acilgliceróis seguindo a metodologia proposta por Costa (2004).

Primeiramente foram determinados os parâmetros em escala analítica para as 3 fases móveis utilizadas: programação gradiente, isocrática 1 (55% metanol + 45% *i*-propanol:*n*-hexano - 5:4, em volume) e isocrática 2 (65% metanol + 35% *i*-propanol:*n*-hexano - 5:4, em volume). Foram utilizadas 2 colunas para CLAE em fase reversa, com fase C18, partículas de 5µm, durante o trabalho: Microsorb MV (250 x 4,6 mm) e Kinetex

(150 x 10 mm). Após isso, foram realizadas a deconvolução dos picos usando o programa Magic Plot e a aplicação do modelo de Van Deemter e colaboradores na simulação desses cromatogramas, onde foi observado a exatidão das estimativas dos parâmetros de retenção (tempo de retenção e largura a meia altura). Esses parâmetros foram utilizados para simular cromatogramas com maiores volumes de injeção pelo modelo de Stenberg, os quais foram comparados com os obtidos experimentalmente. Por meio dos cromatogramas com maiores volumes, foram determinadas as faixas de coleta das frações visando a obter o isolamento dos acilgliceróis.

Nesse trabalho, foram realizados efetivamente o isolamento das classes de acilgliceróis (MAG e DAG) utilizando a fase móvel em programação gradiente na coluna Kinetex em temperatura aproximada de 25 °C e a caracterização dessas frações recolhidas. Para a caracterização, adotou-se método de CG desenvolvido especificamente para a matriz trabalhada.

Com a utilização da metodologia proposta também foi possível separar a classe de monoacilgliceróis sem contaminação com outras classes, utilizando fase móvel isocrática (55% metanol + 45% *i*-propanol:*n*-hexano - 5:4, em volume) e caracterizar essas frações recolhidas pelo método de CG desenvolvido e pelo método de CLAE desenvolvido por Andrade (2011).

Já a utilização da fase móvel isocrática 2 - 65% (metanol) + 35% (*i*-propanol:*n*-hexano (5:4, em volume) - não foi conclusiva devido a presença de TAG nas primeiras frações. Esse problema durante a separação pode ter ocorrido devido à perda de eficiência de separação da coluna 2 e/ou a um erro experimental na realização da coleta das frações. No entanto, réplicas deste processo em ambas colunas deverão ser realizadas para separar os componentes com o uso dessa fase móvel.

7. PERSPECTIVAS

Pode-se sugerir os próximos passos desse trabalho:

- Validação do método de cromatografia gasosa para quantificar as classes de acilgliceróis provenientes de uma reação de glicerólise de óleos vegetais.
- Desenvolvimento de uma metodologia por detecção com espectrômetro de massa para caracterização dos constituintes saturados e insaturados na cromatografia gasosa, para caracterizar os diferentes constituintes da mesma classe.
- Desenvolvimento de metodologia de isolamento dos constituintes individuais de monoacilgliceróis e de diacilgliceróis – utilizando outras fases móveis e/ou outro detector, como por exemplo o de índice de refração (capaz de detectar compostos saturados).
- Transposição do isolamento em CLAE para escala preparativa e/ou semi-preparativa, por meio da metodologia proposta, para separação dos constituintes individuais de monoacilgliceróis e de diacilgliceróis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOWITZ, Milton; STEGUN, Irene A. **Handbook of mathematical functions**. New York: Dover Publications, 1965. p. 299.
- ANP - Agência Nacional de Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis. **Resolução ANP N°45 de 25 de agosto de 2014 (DOU de 26/08/2014)**. Disponível em <http://www.anp.gov.br>. Acesso em 02 de junho de 2018.
- ANP - Agência Nacional de Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis. **Resolução ANP N°51 de 25 de novembro de 2015**. Disponível em <http://www.anp.gov.br>. Acesso em 02 de junho de 2018.
- ANDRADE, Débora França de. **Caracterização de biodiesel através da separação dos constituintes por cromatografia líquida**. 144 f. Tese de Doutorado – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- ANDRADE, D. F.; MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A. **Separation of acylglycerols from biodiesel by high performance liquid chromatography and solid-phase extraction**. Revista Virtual de Química, v. 3, n. 6, p. 452-466, 2011.
- AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Editora Interciência; Rio de Janeiro, 1. ed., 2003.
- ASTM. **ASTM D6584 - Standard test method for determination of total monoglycerides, total diglycerides, total triglycerides, and free and total glycerin in B-100 biodiesel methyl esters by gas chromatography**, West Conshohocken, 2017.
- BLATT, Gabriela Gonçalves. **Utilização da cromatografia em coluna e da cromatografia líquida de alta eficiência na separação, isolamento e identificação das principais classes constituintes do biodiesel**. 115 f. Dissertação de Mestrado – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- CARVALHO, M. S.; MENDONÇA, M. A.; PINHO, D. M. M.; RESCKC, I. S.; SUAREZ, P. A. Z. **Chromatographic analyses of fatty acid methyl esters by HPLC-UV and GC-FID**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 23, n. 4, p. 763-769, 2012.
- CARVALHO, Renato Carneiro de. **Obtenção de frações enriquecidas e/ou componentes individuais de monoacilgliceróis e diacilgliceróis a fim de obter padrões em escala laboratorial pela reação de glicerólise**. 90 f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.
- CHENG, J. W.; WU, W. T. **Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification**. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 95, p. 466-469, 2003.
- COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. *In*: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (orgs.) **Fundamentos de Cromatografia**, 456 p., Campinas: Editora Unicamp, 2007.

CORMA, A.; IBORRA, S.; MIQUEL, S.; PRIMO, J. **Catalysts for the production of fine chemicals: Production of food emulsifiers, monoglycerides, by glycerolysis of fats with solid base catalysts.** Journal of Catalysis, v. 173, n. 2, p. 215-321, 1997.

COSTA, J. L. M. **Transposição em escala por modelos na produção de substâncias naturais por cromatografia líquida de alta eficiência.** 227 f. Tese de Doutorado - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

CZAUADERNA, M.; KOWALCZYK, J. **Separation of some mono-, di- and tri-unsaturated fatty acids containing 18 carbon atoms by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection.** Journal of Chromatography B, v. 760, p. 165-178, 2001.

DAMSTRUP, M. L.; JENSEN, T.; SPARSO, F. V.; KIIL, S. Z.; JENSEN, A. D.; XU, X. **Solvent optimization for efficient enzymatic monoacylglycerol production based on a glycerolysis reaction.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 82, n. 8, p. 559-564, 2005.

DOLAN, J. W. *et al.* **Choosing an equivalent replacement column for a reversed-phase liquid chromatographic assay procedure.** Journal of Chromatography A, v. 1057, n. 1-2, p.59-74, nov. 2004. Elsevier BV.

ETTRE, L.S. (org.) **Nomenclature for chromatography. IUPAC recommendations.** Pure & Applied Chemistry, v. 65, n. 4, p. 819 - 872, 1993.

GARCÍA, P.; FRANCO, P.; ÁLVAREZ, R.; DE LERA, A. R. **Separation of regioisomers and enantiomers of underivatized saturated and unsaturated fatty acid monoacylglycerols using enantioselective HPLC.** Journal of Separation Science, v. 34, p. 999-1003, 2011.

GOLSHAN-SHIRAZI, S.; HUANG, J.; GUIOCHON, G. A. **Comparison of an experimental competitive isotherm and the LeVan-Vermeulen model and prediction of band profiles in a case of selectivity reversal.** Analytical Chemistry, v. 63, n. 11, p. 1147-1154, 1991.

GU, Tingyue. **Mathematical modeling and scale up of liquid chromatography.** Berlin: Springer-Verlag Telos, 1995. 123 p.

GUIOCHON, G. **Preparative liquid chromatography.** Journal of Chromatography A, v. 965, n. 1-2, p. 129-161, 2002.

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

ITABAIANA JUNIOR, I. **Rotas biotecnológicas para a síntese de monoacilgliceróis.** 155 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

KALTENBRUNNER, O.; JUNGBAUER, A.; YAMAMOTO, S. **Prediction of the preparative chromatography performance with a very small column.** Journal of Chromatography A, v. 760, n. 1, p. 41 - 53, 1997.

KONDOH, Y.; TAKANO, S. **Determination of triglycerides by high-performance liquid chromatography with post column derivatization.** Analytical Chemistry, v. 58, n. 12, p. 2380-2383, 1986.

LETTER, W. S. **Preparative isolation of vitamin-D2 from previtamin-D2 by recycle high-performance liquid-chromatography.** Journal of Chromatography, v. 590, n. 1, p. 169-173, 1992.

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

LORENZ, L. J. High performance liquid chromatography. *In*: SCHIRMER, R. E. (ed) **Modern methods of pharmaceutical analysis.** vol. 2. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. cap. 4. p. 278.

MARUYAMA, K.; YONESE, C. **Separation and quantitative determination of monoacylglycerol mixtures by reversed phase HPLC.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 63, n. 7, p. 902-905, 1986.

MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A. **Chromatographic models as tools for scale-up of isolation of natural products by semi-preparative HPLC.** Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 26, p. 177-193, 2003.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. **Technical aspects of biodiesel production by transesterification – A review.** Renewable & Sustainable Energy Reviews, v. 10, p. 248-268, 2006.

MITTELBACH, M.; WOERGETTER, M.; PERNKOPF, J.; JUNEK, H. **Diesel fuel derived from vegetable oils: Preparation and use of rape oil methyl ester.** Energy & Agriculture, v. 2, p. 369-384, 1983.

NEGI, D. S.; SOBOTKA, F.; KIMMEL, T.; WOZNY, G.; SCHOMÄCKER, R. **Glycerolysis of fatty acid methyl esters: 1. Investigations in a batch reactor.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 84, n. 1, p. 83-90, 2007.

NOUREDDINI, H.; HARKEY, D. W.; GUTSMAN, M. R. **A continuous process for the glycerolysis of soybean oil.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 81, n. 2, p. 203-207, 2004.

NOUREDDINI, H.; MEDIKONDURU, V. **Glycerolysis of fats and methyl esters.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 74, n. 4, p. 419-425, 1997.

PHENOMENEX. The ultimate guide to HPLC/UHPLC reversed phase selectivity. Phenomenex, 2013. Disponível em: <https://www.phenomenex.com/Info/WebDocumentServe/reversedguide.pdf>. Acesso em: 10 maio de 2019.

PLANK, C.; LORBEER, E. **Simultaneous determination of glycerol and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography.** Journal of Chromatography A, v. 697, p. 461-468, 1995.

POPPE, H. **Distribution isotherms in reversed-phase systems.** Journal of Chromatography A, v. 656, p. 19-36, 1993.

POUILLOUX, Y.; ABRO, S.; VANHOVE, C.; BARRAULT, J. **Reaction of glycerol with fatty acids in the presence of ion-exchange resins: Preparation of monoglycerides.** Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, v. 149, n. 1-2, p. 243-254, 1999.

RATHORE, A.; VELAYUDHAN A. **Guidelines for optimization and scale-up in preparative chromatography.** Biopharm International, n. 16, p.34-42, 2003.

SANTOS, Bruno Lima dos. **Análise simultânea dos ésteres e acilgliceróis do biodiesel por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (CLAE-IR).** 92 f. Dissertação - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

SANTOS, N. B. L.; REZENDE, M. J. C. **Produção de monoacilgliceróis: rotas e catalisadores.** Revista Virtual de Química, v. 4, n. 2, p. 118-129, 2012.

SANTOS, Rafael Cavalcante dos. **Estudo do equilíbrio de adsorção entre os enantiômeros do praziquantel e a fase sólida celulose tris 3-cloro, 4-metil fenilcarbamato por meio de regressão não linear de modelos de isotermas.** 241 f. Dissertação - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

SEIDEL-MORGENSTERN, A.; SCHULTE, M.; EPPING, A. Fundamentals and General Terminology. *In*: SCHMIDT-TRAUB, H.; SCHULTE, M.; SEIDEL-MORGENSTERN, A. (ed.) **Preparative Chromatography.** Cap. 2. Weinheim: Wiley-VCH, 2012.

SEMPORÉ, B. G.; BÉZARD, J. A. **Separation of monoacylglycerols by reversed-phase high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography, v. 596, n. 2, p. 185-195, 1992.

STENBERG, James C. Extracolumn contributions to chromatographic band broadening. *In*: GIDDINGS, J. Calvin; KELLER, Roy A. (ed.). **Advances in Chromatography.** Marcel Dekker, p. 205-270, New York, 1966.

SUAREZ, P. A. Z. Produção e uso de biodiesel: definições e aspectos tecnológicos. *In*: MIRANDA, J. L.; MOURA, L. C. (orgs). **Biodiesel: obtenção e análise de qualidade.** Publité Soluções Editoriais, Rio de Janeiro, 2016.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Doubling the throughput of long chromatographic methods by using a novel dual LC workflow, Application Note 72601.** Disponível em: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/an-72601-dual-lc-doubling-throughput-an72601-en.pdf>. Acesso em: 26 de julho de 2019.

TAKANO, S.; KONDOH, Y. **Monoglyceride analysis with reversed phase HPLC**. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 64, n. 7, p. 1001-1003, 1987.

TOSTES, J. B. F.; SILVA, A. J. R.; KUSTER, R. M. **Isolation and characterization of polyphenols from *Euphorbia heterophylla* L. (Euphorbiaceae) leaves**. Revista Fitos, v. 13, n. 1, p. 49-60, 2019.

VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J.; KLINKENBERG, A. **Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as cases of nonideality in chromatography**. Chemical Engineering Sciences, v. 5, p. 271-289, 1956.

9. APÊNDICE

APÊNDICE A - Certificado e trabalho intitulado “**Scale up of semipreparative liquid chromatography in isolating acylglycerol-rich fractions**”, apresentado no VII Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia e Inovação de Biodiesel, no período de 04 a 07 de novembro de 2019, em Florianópolis, Santa Catarina.



Scale up of semipreparative liquid chromatography in isolating acylglycerol-rich fractions

Danielle Ignácio Mançano de Mattos (UFRJ, daniellemnacio@eq.ufrj.br), Pamella Cristina Gonzaga Nascimento Nazareth (UFRJ, pamellacgn@gmail.com), Renan de Oliveira Muniz (UFRJ, rendo.muniz@gmail.com), Cristiane Gimenes de Souza (UFRJ, cristianegimenes@yahoo.com.br), Rafael Cavalcante dos Santos (UFRJ, rafaelcavalcante.santos@hotmail.com), José Luiz Mazzei (FIOCRUZ, mazzei@pq.cnpq.br), Luiz Antonio d'Avila (UFRJ, davila@eq.ufrj.br)

Keywords: *Acylglycerols, Glycerolysis, Semipreparative, Liquid Chromatography, Scale up.*

1 - Introduction

Residual acylglycerols in biodiesel can lead to severe operational problems in engines, including deposit formation, filter plugging and fuel deterioration. Thus, the need to monitor the quality of biodiesel added to diesel oil is important (Holcapek *et al.*, 1999). Regulatory agencies in fuels establish the quality parameters of biodiesel, in which the maximum levels of free glycerol (GL), monoacylglycerols (MAG), diacylglycerols (DAG), and triacylglycerols (TAG) are restricted. The methods for determining these parameters (ASTM D6584 and European Standard 14105) apply gas chromatography (GC) (ANP, 2014). These methodologies have a derivatization step with a silylation reagent and MAG, DAG and TAG contents are calculated against the internal standard tricaprine. In addition, to identify the region of the chromatogram of elution of each acylglycerol class, monoolein, diolein and triolein standards are also included. Due to their high purity ($\geq 99\%$) (ANP, 2014), the requirement of these standards implies a high cost of acquisition.

Liquid chromatography (LC) and high performance LC (HPLC) have been applied to separate and isolate chemical reference materials, especially at semipreparative and preparative scales (Mazzei & d'Avila, 2003). In fact, Blatt (2014) developed a LC method for obtaining acylglycerol-rich materials from transesterification of biodiesel at low yield and conversion employing an open column chromatography. Moreover, Carvalho (2018) performed this separation starting from an optimized glycerolysis product that has yielded a higher content of main acylglycerol classes.

Compounds that are representative of the main biodiesel classes are fundamentally important for biodiesel quality control. Thus, the present study proposes to apply the scale up for semipreparative HPLC applying mathematical models as a tool to isolate rich fractions of MAG and DAG from a glycerolysis product from vegetable oil on a laboratory scale, especially applicable by quality control laboratories of biodiesel.

2 - Material and Methods

A glycerolysis reaction involving soybean oil and glycerol under reflux by 30 min at optimal conditions was performed for producing the acylglycerol mixture (Carvalho, 2018).

A Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000 HPLC chromatograph, equipped with two HPG-3200BX pumps,

VWD-3400RS single channel UV-VIS detector, AFC-3000 fraction collector, and Rheodyne 8125 manual injection valve with a 2 mL-loop was used. Chromeleon 7.0 (Thermo Fisher Scientific, USA) software was applied for operation and to set the equipment. The column was a Kinetex C18 ($150 \times 10 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$). HPLC methodology described by Andrade *et al.* (2011) was employed with mobile phase composed of methanol (A) and *i*-propanol:*n*-hexane (5:4 v/v, B) at gradient elution: 0-50%B, 0-15 min; 50-100%B, 15-25 min; 100%B, 25-30 min. Chromatograms at 205 nm were analyzed and manually integrated using Chromeleon software v.6.80 SR11 (Thermo Scientific Acclaim, USA). Samples were diluted at 5% in methanol.

Resulting chromatograms were analyzed through the MagicPlot Student v. 2.7.2 (MagicPlot Systems LLC) using the Gaussian peak deconvolution function to estimate the retention time and half-height width of the individual components.

Microsoft Excel version 2016 was applied to execute a spreadsheet, prepared following the described by Mazzei & d'Avila (2013), to simulate the chromatographic profiles in the analyzed and intended scales, from the estimated parameters, column dimensions and flow-rate. The spreadsheet is based on equations proposed by Van Deemter *et al.* (1956) and by Stenberg (1966) that considers large injection volumes.

HPLC fractions were collected by an AFC-3000 equipment and their solvents were evaporated under nitrogen. After proper dilution, the dry residue was submitted for GC analysis using the reference method ASTM D6584 on an Agilent Technologies model 7890A equipped with an on-column injector and a ZB-5HT ($30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm} \times 0.1 \mu\text{m}$) column (Phenomenex).

3 - Results and Discussion

The semipreparative separations were performed at flow-rate of 2.85 mL/min and with 30 μL -injection (Figure 1a), based on a direct transposition of conditions established by Andrade *et al.* (2011). The parameters (t_R and w_h) of 16 peaks (3 of MAG, 9 of DAG and 4 of TAG) were estimated by the MagicPlot software (Figure 1b) and these values were applied on the simulation of the analytical chromatogram (Figure 1c) using the equation of Van Deemter *et al.* (1956) to verify them.

Chromatograms with large volumes of injections were simulated by Stenberg model (Figure 2a) to plan semipreparative fractionating. Runs of 150 μL were performed (Figure 2b) and fractions at run times of 3-6 min and 10-14 min were separately collected. Fractions of same retention were pooled and further analyzed by GC. The

fractions were composed only of MAG and of DAG contained only 0.8% MAG, respectively. TAG was not detected in both isolated fractions.

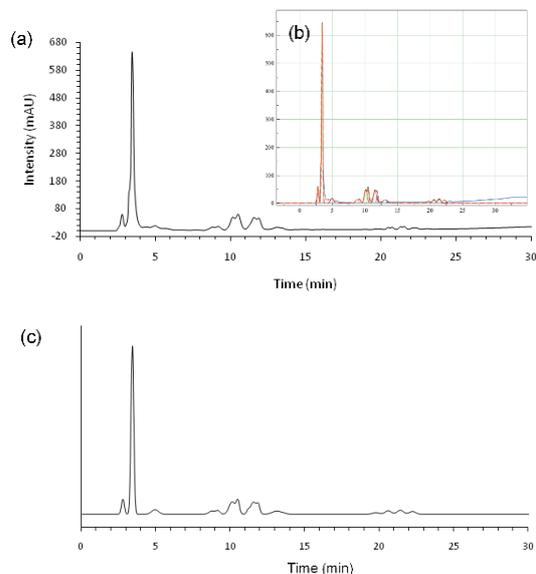


Figure 1. Experimental chromatogram at analytical scale (a), deconvolution using MagicPlot (b) and simulated chromatogram by Van Deemter *et al.* equation (c).

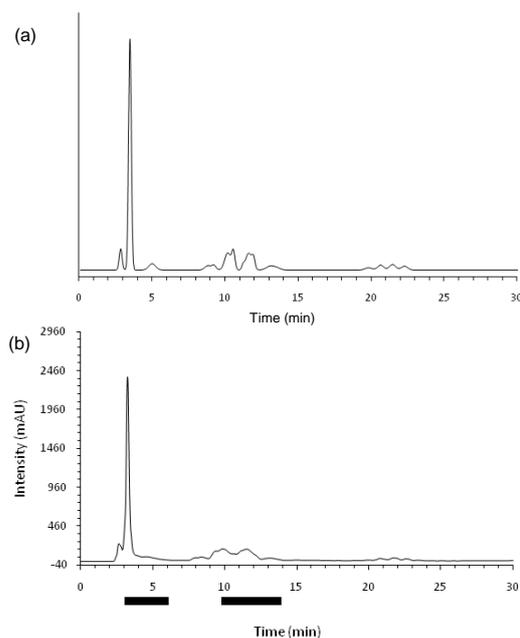


Figure 2. Chromatograms with 150 μ L-injection: simulated using Stenberg model (a) and obtained experimentally (b). Horizontal bars indicate time windows for collection.

4 – Conclusion

In a scale up planning of HPLC separation of acylglycerols-rich fractions, the chromatographic conditions were firstly performed by a direct transposition from analytical runs found in the literature. In semipreparative scale, retention and efficiency parameters were estimated at reduced volume of injection and, then, large injection volume (150 μ L) was planned with helping of mathematical models. Further, semipreparative runs were successfully performed, with profile identical to the simulated chromatogram, allowing to obtain two fractions that were rich in different acylglycerol classes: MAG and DAG.

5 – Acknowledgement

EPQB/UFRJ and LABCOM/UFRJ

6 - References

- ANDRADE, D. F.; MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A. Separation of acylglycerols from biodiesel by high performance liquid chromatography and solid-phase extraction. *Revista Virtual de Química* **2011**, 3, 452-466.
- ANP - Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução N°45/2014. Available in <http://www.anp.gov.br>. Access on 02 jun 2018.
- BLATT, G. G. Utilização da cromatografia em coluna e da cromatografia líquida de alta eficiência na separação, isolamento e identificação das principais classes constituintes do biodiesel. Dissertação de Mestrado – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, **2014**. 115f.
- CARVALHO, R. C. Obtenção de frações enriquecidas e/ou componentes individuais de monoacilgliceróis e diacilgliceróis a fim de obter padrões em escala laboratorial pela reação de glicerólise. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, **2018**. 90f.
- HOLČAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER J.; PROKEŠ, B. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. *Journal of Chromatography A* **1999**, 858, 13-31.
- MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A. Chromatographic models as tools for scale-up of isolation of natural products by semi-preparative HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* **2003**, 26, 177-193.
- STENBERG, J. C. Extracolumn contributions to chromatographic band broadening. In: GIDDINGS, J. C.; KELLER, R. A. (ed.). *Advances in Chromatography*. New York: Marcel Dekker, **1966**, 205-270.
- VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J.; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as cases of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Sciences* **1956**, 5, 271-289.

10. ANEXO

Anexo I - Algoritmo da Estimativa de Parâmetros de Retenção e Eficiência em Pequena Escala e Simulação do Perfil Cromatográfico na Escala Pretendida para Transposição (reproduzido de COSTA, 2004)

Início do Programa

(entrada de dados dos cromatogramas em ambas escalas)

$L_{(a, p)}$ = comprimento da coluna (cm).

$D_{(a, p)}$ = diâmetro interno da coluna (cm).

$F_{(a, p)}$ = vazão da fase móvel (mL/min).

$d_{P(a, p)}$ = diâmetro da partícula da fase estacionária (μm).

$V_{inj(a, p)}$ = volume de injeção (mL).

$t_{d(a, p)}$ = tempo estimado de decaimento exponencial na injeção (min).

$C_{inj(i, a, p)}$ = concentração do componente i na injeção (molar).

(entrada de dados em pequena escala)

$t_{M(a)}$ = tempo de substância não retida (min).

$t_{R(i)}$ = tempo de retenção do componente i a diluição infinita (min).

$w_{h(i)}$ = largura do pico do componente i a meia altura (min).

$t_{e(i)}$ = tempo final do pico do componente i em casos de sobrecarga (min).

$t_{R(INL)(i)}$ = tempo da frente de massa do componente i em casos de sobrecarga (min).

(cálculos de processo)

$A_{C(a, p)}$ = áreas seccionais das colunas (cm^2).

ε = porosidade intra - partícula.

β = razão de fase.

$t_{inj(a, p)}$ = tempo de injeção (min).

(cálculos dos parâmetros para cada componente a partir dos dados em pequena escala)

$k_{(i)}$ = fator de retenção.

$K_{C(i)}$ = constante de distribuição linear (somente com fase normal).

$h_{(i)}$ = altura reduzida do prato.

if critérios de Rosset confirmam sobrecarga

$L_{f(i)}$ = fator de carga.

$q_{S(i)}$ = capacidade de saturação da fase estacionária (g/mL).

end if

(cálculo dos dados estimados para a escala pretendida)

$t_{M(p)} = f(\varepsilon, L_{(p)}, D_{(p)}, F_{(p)})$

$t_{R(i, p)} = f(t_{M(p)}, k_{(i)})$

$w_{h(i, p)} = f(t_{R(i, p)}, h_{(i)}, d_{P(p)}, L_{(p)})$

$t_{e(i, p)} = f(t_{M(p)}, t_{R(i, p)})$

$t_{R(INL)(i, p)} = f(V_{inj(p)}, C_{inj(i, p)}, q_{S(i)}, \varepsilon, A_{C(p)}, L_{(p)})$

(cálculo dos perfis cromatográficos em ambas escalas – pequena e pretendida)

if critérios de Rosset confirmam linearidade

$C_{(i)}(t)$ = cálculo pelo modelo de momentos estatísticos de VAN DEEMTER

$C'_{(i)}(t)$ = cálculo pelo modelo de momentos estatísticos de STENBERG.

else if

while $t < t_{R(INL)(i)}$

$C''_{(i)}(t) = 0$

end while

while $t < t_{e(i)}$

$C''_{(i)}(t)$ = cálculo pelo modelo ideal de taxas.

end while

$C_{(i)}(t) = 0$

end if

$C = \sum C_{(i)}$

$C' = \sum C'_{(i)}$

$C'' = \sum C''_{(i)}$

(saídas gráficas das intensidades finais ao longo do tempo $C \times t$, $C' \times t$ e $C'' \times t$)

Fim do Programa