



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
TESE DE DOUTORADO

**Emprego da cromatografia
bidimensional e análise multivariada no
desenvolvimento de metodologias
analíticas aplicáveis a caracterização
completa de bio-óleos**

ELIANE LAZZARI

Porto Alegre, novembro 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ELIANE LAZZARI

Emprego da cromatografia bidimensional e
análise multivariada no desenvolvimento de
metodologias analíticas aplicáveis a
caracterização completa de bio-óleos

*Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do
grau de doutor em química*

Prof^a. Dr^a. Elina Bastos Caramão
Orientadora

Porto Alegre, novembro 2019

A presente tese foi inteiramente desenvolvida pela autora, exceto as colaborações as quais serão devidamente descritas nos agradecimentos, no período entre 10/2014 a 09/2019, no Instituto de Química da Universidade do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil) no Instituto de Tecnologia e Pesquisa na Universidade de Tiradentes (Aracaju, Brasil) sob orientação da Prof^a. Dr^a. Eline Bastos Caramão, no *Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) da Universidad Autonoma de Madrid* (Madrid, Espanha) sob orientação do Prof. Dr. Miguel Herrero e na *Faculté de Sciences da Universté de Liège* sob orientação do Prof. Dr. Jean-François Focant e Dr. Flavio A. Franchina.

A presente tese foi adequadamente julgada para a obtenção do título de Doutora em Química;

Prof^a. Dr^a. Elina Bastos Caramão
Orientadora

Eliane Lazzari
Doutoranda

*Somos um breve pulsar
Em um silêncio antigo
Com a idade do céu;*

Jorge Drexler

AGRADECIMENTOS

Deste trabalho agora concluído quero agradecer a muitas pessoas, pois se não fosse por elas, certamente não teria tanto orgulho do que aqui apresenta-se.

A minha professora e querida orientadora, Elina Bastos Caramão, a quem dedico um enorme carinho, obrigada por acreditar em mim, por todo teu apoio e conselhos, saiba que com você pude crescer muito profissionalmente e principalmente pessoalmente.

A mi maestro y asesor Miguel Herrero, muchas gracias por hacer de mi experiencia en Madrid una de las mejores de mi vida, gracias por su confianza, paciencia, orientaciones enseñanzas en LC x LC.

To my advisor in Belgium, Professor Jean-François Focant, I thank you for the great opportunity to work in your research group, thanks for trust in me and offered everything that I needed for a new experience in Liege.

Sobre meus amigos, a UFRGS, me proporcionou conhecer pessoas especiais as quais me auxiliaram muito e a quem quero agradecer do fundo do coração. Allan, Tiago, Aline Nunes, Bruna, Débora, Carmem, Elisabete, Gabriela, Daiane, Anai, Érica e Lucas. Aline, minha IC dedicada, obrigada por todo auxílio e amizade. Alan, como saberia algo de estatística sem você? Tiago obrigada pela amizade, risadas, viagens e ansiedades compartilhadas. Érica, que teve grande participação nesse trabalho, obrigada pelas ideias, paciência, conhecimento e muitas correções. Ao grande engenheiro Lucas, agradeço pelas portas que me abriste e por todos ensinamentos que sempre disponibilmente me acrescenta.

Da Unit, agradeço a todos que me auxiliaram com o desenvolvimento do trabalho, com a amizade, carinho e acolhida, Nathalia, Anne, Laíza, Mozart e especialmente Thiago que sempre esteve tão disponível.

Do Cial, em Madrid, guardo em meu coração pessoas que tive a oportunidade de conhecer e criar enorme laço. Andrea, obrigada pela paciência de me traduzir o espanhol de Miguel e começarmos juntas a entrar no mundo do LCxLC. Jessy, minha cubana favorita, obrigada por toda a alegria que compartilhamos, vou lembrar de todas as risadas e mojitos. Zully, que me acolheu desde o início, obrigada por abrir as portas de tua casa e sempre estar do meu lado. Kátia, até uma nova língua criamos para entendermos uma a outra, obrigada por toda a ajuda no trabalho, se não fosse por você não teria conseguido, és uma pessoa incrível. E a todos outros que fizeram parte

do CIAL e que me acolheram de uma forma mágica, vou guarda-los sempre em meu coração. Sabeis que os extraño muchoo!

De Liège, Flavio agradeço sua amizade, paciência e todo o conhecimento que sempre esteve disposto a compartilhar. Es uma pessoa extremamente simples e ao mesmo tempo um dos melhores profissionais que já conheci. Aos amigos, que fizeram dessa experiência algo inesquecível. Delphine, agradeço pela disponibilidade e todo carinho que me trataste. Jane, como esquecer todas as noites de quinta no Mad Murphy, obrigada por ser essa pessoa especial. Isadora, obrigada por me auxiliar tanto em Liège, as nossas viagens de fim de semana e seu enorme companheirismo. Chloe, minha amiga de pensão, obrigada pelos ensinamentos em francês e todas as conversas em nossas jantãs. Aos demais amigos e também aos companheiros do grupo de pesquisa Obiachem, espanhóis, franceses e belgas que tive a oportunidade de conhecer!

Por fim, agradeço em especial a minha família, meus pais Vital e Fátima, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis, sempre me incentivaram e nunca mediram esforços para que pudesse continuar. As minhas queridas irmãs Elisangela e Edinéia, todas temos muito em comum, muito obrigada por todas as palavras de carinho!

Ao meu namorado, Alan por toda a paciência, amor, dedicação que teve comigo desde o início dessa jornada. Sempre fostes meu porto seguro.

Aos meus demais amigos, Letícia, Célia, Luana e Ana, por uma amizade de mais de 10 anos!!

As agências de fomento, CAPES, CNPQ e JEOL/Japan que auxiliaram com o aporte financeiro para a realização de todo esse trabalho.

As instituições de ensino Universidad Autónoma de Madrid (UAM),
Université de Liège (ULg), Universidade Tiradentes (UNIT) e especialmente a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) a qual tenho muito orgulho de poder fazer parte.

SUMÁRIO

DECLARAÇÃO DE AUTORIA	Pag. ii
BANCA EXAMINADORA	iii
AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1 INTRODUÇÃO	5
1.2 OBJETIVOS	5
1.2.1 Objetivos Gerais	5
1.2.2 Objetivos Específicos	6
CAPÍTULO II: REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 BIOMASSA E MEIO AMBIENTE	7
2.1.1 Fontes de biomassa: casca de arroz e outras biomassas	7
2.1.2 Composição da biomassa	9
2.2 FTIR - PCA APLICADAS A BIOMASSAS	10
2.3 PIRÓLISE	12
2.3.1 Pirólise dos constituintes da biomassa	14
2.4 BIO-ÓLEO: COMPOSIÇÃO E POSSÍVEIS APLICAÇÕES	16
2.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS BIO-ÓLEOS	17
2.5.1 Caracterização da fase aquosa: cromatografia líquida	18
2.5.2 Cromatografia líquida bidimensional abrangente	19
2.5.3 Caracterização da fase orgânica: cromatografia gasosa bidimensional abrangente	22
2.5.3.1 Métodos de quantificação do bio-óleo por cromatografia gasosa bidimensional abrangente	24
2.5.4 Efeito de matriz e calibração combinada com matriz na análise do bio-óleo por GC	29
2.6. MOTIVAÇÃO E PLANO DE TRABALHO	30
2.6.1 Inovações	32
CAPÍTULO III: DIFERENCIAÇÃO DE BIOMASSAS E BIO-ÓLEOS USANDO FTIR e PCA	38
3.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	39
3.1.1 Materiais e reagentes	39
3.1.2 Amostras de biomassa	39
3.1.3 Análise das amostras de biomassa por FTIR	40
3.1.4 Processo de pirólise	41
3.1.5 Análises cromatográficas	42
3.1.6 Abordagem multivariada	43
3.1.7 Fluxograma do procedimento experimental	43
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
3.2.1 Análise das biomassas por FTIR	44
3.2.3 Processo de pirólise: rendimento dos produtos	46
3.2.3 Análise cromatográfica dos bio-óleos	48
3.2.3.1 Análise semi-quantitativa dos bio-óleos	50
3.2.4 Análise multivariada dos espectros de infravermelho	52
3.2.5 Correlação entre os dados cromatográficos, espectroscópicos e análise multivariada	55
3.3 CONCLUSÕES PARCIAIS	57
3.3.1 Produção científica gerada deste capítulo	58
CAPÍTULO IV: DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA QUANTITATIVA PARA A ANÁLISE DE FASES AQUOSAS DE BIO-ÓLEOS USANDO LCxLC	59
4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	60
4.1.1 Materiais e reagentes	60
4.1.2 Biomassas e fases aquosas dos bio-óleos	60
4.1.3 LCxLC instrumentação	61
	vii

4.1.4 LC×LC condições	62
4.1.5 Validação do método quantitativo	62
4.1.6 Demais cálculos	63
4.1.6.1 Capacidade de pico	63
4.1.6.2 Ortogonalidade	64
4.1.7 Fluxograma do procedimento experimental	65
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
4.2.1 Otimização do método de separação LC×LC	65
4.2.2 Otimização do método MS	72
4.2.3 Desenvolvimento e validação do método quantitativo	72
4.2.4 Análise (qualitativa e quantitativa) das fases aquosas dos bio-óleos	75
4.2.5 Composição química das fases aquosas	77
4.3 CONCLUSÕES PARCIAIS	79
4.3.1 Produção científica gerada deste capítulo	79
CAPÍTULO V: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO BIO-ÓLEO DA PIRÓLISE DA CASCA DE ARROZ POR HPLC/DAD E GC×GC/qMS	80
5.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	81
5.1.1 Materiais e reagentes	81
5.1.2 Amostra de biomassa	81
5.1.3 Processo de pirólise	82
5.1.3.1 Delineamento experimental	82
5.1.4 Caracterização cromatográfica do bio-óleo	84
5.1.4.1 Análise por cromatografia líquida monodimensional	84
5.1.4.1.1 Análise quantitativa por LC	85
5.1.4.2. Análise por cromatografia gasosa bidimensional abrangente	85
5.1.4.2.1 Análise quantitativa por GC×GC	86
5.1.5 Fluxograma do procedimento experimental	87
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES	88
5.2.1 Análise termogravimétrica da biomassa	88
5.2.2. Processo de pirólise: avaliação dos parâmetros por RSM	88
5.2.3 Caracterização do bio-óleo	93
5.2.3.1 Análise por cromatografia líquida monodimensional	93
5.2.3.1.1 Análise qualitativa e quantitativa	93
5.2.3.1.2 Composição química fase aquosa	95
5.2.3.2 Análise por cromatografia gasosa bidimensional abrangente	96
5.2.3.2.1 Análise qualitativa	96
5.2.3.2.2 Análise quantitativa	99
5.2.3.2.3 Composição química fase orgânica	100
5.3 CONCLUSÕES PARCIAIS	103
5.3.1 Produção científica gerada deste capítulo	103
CAPÍTULO VI: COMPENSAÇÃO DE EFEITOS DA MATRIZ NA ANÁLISE QUANTITATIVA DE BIO-ÓLEO	104
6.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	105
6.1.1 Amostra de biomassa e padrões	105
6.1.2 Processo de pirólise e amostra de bio-óleo	105
6.1.3 Preparação da matriz de bio-óleo	105
6.1.4 GC/qMS instrumentação	106
6.1.5 Curvas de calibração	106
6.1.6 Avaliação do efeito de matriz	107
6.1.7 GC×GC/qMS instrumentação	107
6.1.7.1 Análise por GC×GC/qMS	108
6.1.7.1.1 Figuras de mérito do método quantitativo	108
6.1.8 Fluxograma do procedimento experimental	109
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES	109
6.2.1 Obtenção da matriz de bio-óleo	109
6.2.1.1 Análise do extrato de matriz por GC/qMS	113
6.2.2 Avaliação do efeito de matriz	115
6.2.2.1 Efeito de matriz mediante normalização pelos padrões internos	117
	viii

6.2.3 Análise por GC×GC/TOFMS	121
6.2.3.1 Figuras de mérito do método quantitativo	121
6.2.3.2 Análise quantitativa	123
6.2.4 Composição química do bio-óleo	124
6.3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	126
6.3.1 Produção científica gerada deste capítulo	126
CAPÍTULO VII: CONCLUSÕES GERAIS	127
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
ANEXOS	138
ANEXO 1: MATERIAL RELACIONADO AO CAPÍTULO III	139
ANEXO 2: MATERIAL RELACIONADO AO CAPÍTULO IV	144
ANEXO 3: MATERIAL RELACIONADO AO CAPÍTULO V	152
ANEXO 4: MATERIAL RELACIONADO AO CAPÍTULO VI	157
ANEXO 5: MATERIAL RELACIONADO AO ESTÁGIO NA UNIVERSIDADE DE LIÈGE	161
ANEXO 6: DEMAIS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS	175

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Fig. 1 Região de elevado depósito de casca de arroz situada no município de Itaqui/RS.	9
Fig. 2 Estruturas químicas formadoras da biomassa lignocelulósica: (a) estrutura química da celulose, (b) principais monômeros da hemicelulose, (c) precursores da lignina.	10
Fig. 3 Principais produtos gerados a partir da pirólise dos constituintes da biomassa (celulose, hemicelulose, lignina, triglicerídeos e proteínas).	15
Fig. 4 Diagrama de um sistema típico de LC×LC destacando a interface, válvula entre o detector da ¹ D e a coluna da ² D.	20
Fig. 5 Esquema dos métodos quantitativos por GC×GC estudados na literatura para a análise de de bio-óleo.	28
Fig. 6 Esquema do efeito de matriz em análise por GC, com aprimoramento do sinal analítico.	30
Fig. 7 Fluxograma do plano de trabalho seguido na presente tese.	32
Fig. 8 Diagrama esquemático do reator de pirólise	41
Fig. 9 Fluxograma do procedimento experimental empregado no capítulo III	44
Fig. 10 Espectros de FTIR obtidos para as amostras de biomassas com as principais bandas de absorção destacadas	45
Fig. 11 Rendimento dos produtos de pirólise: (a) distribuição dos rendimentos (%) dos produtos gerados na pirólise das quinze amostras de biomassa; (b) gráfico biplot (PC1 versus PC2) da análise de PCA dos respectivos dados de rendimento	47
Fig. 12 (a) distribuição das classes químicas nas amostras de bio-óleo, considerando-se as áreas cromatográficas percentuais obtidas por GC/qMS de compostos dessas classes e (b) gráfico biplot (PC1 versus PC4) da análise de PCA dos respectivos dados de composição.	51
Fig. 13 PCA dos espectros de FTIR (região entre 4000-700 cm ⁻¹) das quinze amostras de biomassa.	54
Fig. 14 Correlação entre a análise de PCA dos espectros de FTIR das biomassas e as respectivas composições do bio-óleo obtidas por GC / qMS	55
Fig. 15 Fluxograma do procedimento experimental empregado neste capítulo	65
Fig. 16 Cromatogramas (280 nm) obtidos para a separação da fase aquosa do bio-óleo de casca de arroz por RP utilizando colunas (a) PEG e (b) amida.	68
Fig. 17 Cromatogramas (280 nm) obtidos sob condições otimizadas para a ¹ D para as fases aquosas de: (a) casca de arroz, (b) casca de amendoim, (c) borra de café, (d) caroço de pêssego e (e) serragem de Eucalipto.	68

Fig. 18	Cromatogramas (280 nm) obtidos para a separação da fase aquosa da casca de arroz por modo RP empregando três diferentes colunas parcialmente porosas: C18 e PFP	69
Fig. 19	Cromatogramas (280 nm) obtidos sob condições otimizadas para a 2D para as fases aquosas da pirólise de: (a) casca de arroz, (b) casca de amendoim, (c) borra de café, (d) caroço de pêssigo e (e) serragem de Eucalipto.	68
Fig. 20	Diagrama de cores (280nm) usando a metodologia otimizada por RPLC × RPLC das amostras de fases aquosas oriundas da pirólise de 13 biomassas	71
Fig. 21	Distribuição em termos de concentração (mg L ⁻¹) das classes químicas nas fases aquosas das 13 biomassas quantificadas por LC×LC.	77
Fig. 22	Fluxograma do procedimento experimental empregado no capítulo V	87
Fig. 23	Resultados do TGA e DTG da casca de arroz.	88
Fig. 24	Gráfico da superfície de resposta da interação das variáveis independentes (temperatura e fluxo de N ₂) no rendimento de bio-óleo.	91
Fig. 25	Análise por HPLC / DAD ($\lambda = 280 \text{ nm}$) da fase aquosa oriunda do bio-óleo da casca de arroz. As estruturas químicas dos compostos identificados são destacadas.	94
Fig. 26	Diagramas de cores da análise por GC×GC/qMS. (a) mistura de calibração e (b) amostra da fase orgânica com os compostos majoritários destacados	97
Fig. 27	Gráficos de dispersão das classes químicas identificadas na fase orgânica (a) amostra total, (b) fenóis e (c) cetonas cíclicas	98
Fig. 28	Fluxograma representativo do procedimento experimental empregado no capítulo VI	109
Fig. 29	Fluxograma representativo da metodologia de extração, empregando LLE, seguida para a obtenção da matriz do bio-óleo. As reações que ocorrem em cada uma das etapas também estão detalhadas	114
Fig. 30	Cromatogramas obtidos por GC/qMS: (a) bio-óleo de casca de arroz e do (b) extrato da matriz.	115
Fig. 31	Cromatogramas obtidos por GC/qMS da mistura de calibração: (a) preparada em solvente (DCM) e (b) preparada em extrato da matriz.	116
Fig. 32	Comparação das curvas em matriz e em solvente anterior e posterior normalização por padrões internos	120
Fig. 33	Diagramas de cores (GC×GC/qMS): (a) do extrato de matriz e (b) da solução de calibração preparada no extrato da matriz.	123
Fig. 34	Diagrama de cores da análise por GC × GC/qMS do bio-óleo de casca de arroz.	125
ANEXOS		
Fig. A1	Diagramas bidimensionais obtidos por LC×LC das fases aquosas provenientes da pirólise das 13 biomassas estudadas neste trabalho.	144
Fig. A2	Estruturas químicas dos padrões comerciais empregados na análise qualitativa /quantitativa por LC×LC.	151
Fig. A3	Curvas analíticas empregadas para a quantificação dos compostos da fase aquosa da casca de arroz através da HPLC/DAD.	152
Fig. A4	Lista dos espectros de UV-Vis dos compostos identificados na fase aquosa do bio-óleo de casca de arroz em comparação aos respectivos padrões.	153
Fig. A5	Estruturas químicas dos compostos padrões empregados na solução de calibração na análise quantitativa por GC×GC/qMS	160

LISTA DE TABELAS

		Pag.
Tab. I	Detalhes das quinze biomassas investigadas	40
Tab. II	Principais bandas de absorção dos espectros de FTIR das biomassas	46
Tab. III	Cinco compostos majoritários em cada uma das quinze amostras de bio-óleo	49
Tab. IV	Colunas empregadas na otimização das separações na ¹ D e ² D	66
Tab. V	Capacidade de pico e ortogonalidade para as análises por RPLC×RPLC	70
Tab. VI	Resultados das análises pelo sistema MS-ESI para os padrões comerciais	72
Tab. VII	Dados de calibração para a quantificação das fases aquosas e figuras de mérito para o método quantitativo por RPLC × RPLC	74
Tab. VIII	Resultados qualitativos/quantitativos das treze amostras de fases aquosas analisadas por LC×LC	76
Tab. IX	Variáveis independentes e níveis utilizados para o CCD	83
Tab. X	Variáveis e níveis utilizados para o CCD, bem como os valores experimentais observados para a resposta (rendimento de bio-óleo)	89
Tab. XI	Resultados da pirólise em termos de rendimento em bio-óleo. (a) Rendimento de bio-óleo observados experimentalmente e preditos pelo modelo e (b) Análise de variância para o modelo quadrático.	90
Tab. XII	Figuras de mérito do método desenvolvido por HPLC/DAD e análise quantitativa dos compostos identificados	94
Tab. XIII	Valores dos RFs calculados para cada composto presente na mistura de calibração	100
Tab. XIV	Resultados quantitativos da análise da fase orgânica, em termos de classes químicas detectadas (A) e dez compostos majoritários (B)	101
Tab. XV	Compostos tentativamente identificados no bio-óleo de casca de arroz por GC/qMS, com valores de pka, solubilidade em água e em solventes orgânicos	111
Tab. XVI	Parâmetros da curva analítica e resultados do efeito de matriz	117
Tab. XVII	Parâmetros das curvas de calibração e <i>p</i> -valores obtidos (A) anterior e (B) posterior normalização com os padrões internos	119
Tab. XVIII	Figuras de mérito do método quantitativo desenvolvido empregando calibração combinada com matriz e analisado por GC×GC/qMS	122

ANEXO

Tab. AI	Compostos tentativamente identificados nos bio-óleos oriundos de 15 biomassas através da GC/qMS	139
Tab. AII	Lista de compostos tentativamente identificados e quantificados usando RF e abordagem semi-quantitativa na fase orgânica do bio-óleo de casca de arroz por GC×GC/qMS	154
Tab. AIII	Compostos identificados e quantificados usando curva de calibração combinada com a matriz na amostra de bio-óleo de casca de arroz através da GC×GC/qMS	157

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

A₀: grau de ortogonalidade

ATR: reflexão total atenuada universal (do inglês, *attenuated total reflection*)

APCI: ionização química a pressão atmosférica (do inglês, *atmospher pressure chemical ionization mass spectrometry*)

EM%: efeito de matriz

CM: curva construída em matriz

CS: curva construída em solvente

CCD: delineamento composto central (do inglês, *central composite desing*)

DAD: detector de arranjo de diodo (do inglês, *diode array detection*)

DTG: derivada termogravimétrica (do inglês, *thermogravimetric derivate*)

¹D: primeira dimensão
²D: segunda dimensão
ESI: ionização por eletrospray (do inglês, *electrospray ionization*)
FTIR: espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (do inglês, *fourier transform infrared spectroscopy*)
FID: detectores de ionização de chama (do inglês, *flame ionization detector*)
GC: cromatografia em fase gasosa (do inglês, *gas chromatography*)
GC×GC: cromatografia gasosa bidimensional abrangente (do inglês, *comprehensive two-dimensional gas chromatography*)
HILIC: cromatografia de interação hidrofílica (do inglês, *hydrophilic-interaction chromatography*)
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)
IEC: cromatografia de troca iônica (do inglês, *ion exchange chromatography*)
IS: padrão interno (do inglês, *internal standard*)
LLE: extração líquido-líquido (do inglês, *liquid-liquid extraction*)
LTPRI: índice de retenção por programação linear de temperatura (do inglês, *linear temperature programmed retention index*)
LC: cromatografia líquida (do inglês *liquid chromatography*)
LC×LC: técnica de cromatografia líquida bidimensional abrangente (do inglês, *comprehensive two-dimensional liquid chromatography*)
LC×SFC: cromatografia líquida bidimensional abrangente acoplada cromatografia com fluido supercrítico (do inglês, *comprehensive two-dimensional liquid chromatography x supercritical fluid chromatography*)
LC-LC: cromatografia líquida bidimensional de *heart-cutting* (do inglês, *two dimensional heart-cutting liquid chromatography*)
LOD: limite de detecção
LOQ: limite de quantificação
LAAO: laboratório de química analítica, ambiental e oleoquímica
MS: espectrometria de massas (do inglês, *mass spectrometry*)
NCD: detector de quimioluminescência de nitrogênio (do inglês, *nitrogen chemiluminescence detector*)
NIST: national institute of standards and technology
NIR: infravermelho próximo (do inglês, *near-infrared*)
NPLC: cromatografia líquida de fase normal (do inglês, *normal phase liquid chromatography*)
NIST: national institute of standards and technology
n_c: capacidade de pico individual
n_{c practical}: capacidade de pico efetiva
n_{c corrected}: capacidade de pico corrigida
PC: componentes principais (do inglês, *principal components*)
PLS: método dos mínimos quadrados parciais (do inglês, *partial least squares*)
PNRS: política nacional de resíduos sólidos
PCA: análise dos componentes principais (do inglês, *principal component analysis*)
qMS: espectrometria de massas com analisadores quadrupolares (do inglês, *quadrupole mass spectrometry*)
R²: coeficiente de determinação
RSM: metodologia de superfície de resposta (do inglês, *response surface methodology*)
RID: detector de índice de refração (do inglês, *refractive index detector*)
RF: fator de resposta (do inglês, *response factor*)
RSD: desvio padrão relativo (do inglês, *relative standard deviation*)
RPLC: cromatografia líquida de fase reversa (do inglês, *reversed phase liquid chromatography*)
SD: desvio padrão (do inglês, *standard deviation*)
SCD: detector de quimioluminescência de enxofre (do inglês, *sulfur chemiluminescence detector*)
SNV: variação normal padrão (do inglês, *standard normal variate*)
SEC: cromatografia de exclusão por tamanho (do inglês, *steric exclusion chromatography*)
SPE: processo de extração em fase sólida (do inglês, *solid phase extraction*)
TOFMS: espectrometria de massas por tempo de voo (do inglês, *time of flight mass spectrometry*)
TGA: análise termogravimétrica (do inglês, *thermogravimetric analysis*)
Uv-Vis: espectrometria de ultravioleta visível (do inglês, *ultraviolet-visible spectrophotometry*)
wt% - fração em massa

RESUMO

Ao mesmo tempo que a tecnologia de pirólise se consolida como forma de agregar valor à grande quantidade de resíduos agroindustriais gerados no Brasil, metodologias analíticas que permitam elucidar a completa composição do produto bio-óleo, bem como sua aplicabilidade, ainda carecem de investigação. Neste sentido, na presente tese propõem-se o desenvolvimento de métodos analíticos através da cromatografia bidimensional abrangente e da análise multivariada para a caracterização completa das amostras de bio-óleos. Inicialmente, desenvolve-se um método simples e rápido utilizando espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier e PCA para a pré-definição da composição dos bio-óleos anteriormente ao processo de pirólise, facilitando assim, o estudo da viabilidade do emprego de diferentes biomassas para a obtenção de bio-óleo. Nessa etapa, a composição da fase orgânica do bio-óleo gerado para quinze diferentes biomassas brasileiras é observada por cromatografia gasosa monodimensional. Ao mesmo tempo, para a caracterizar a fase aquosa dessas amostras otimiza-se e valida-se, pela primeira vez, uma metodologia quantitativa por LC×LC. Uma vez que, esse método apresenta elevada capacidade de pico e excelentes figuras de mérito, pode-se elucidar a composição das amostras de fases aquosas. Em uma segunda etapa, avalia-se o potencial de utilização da casca de arroz, definida como um problema ambiental no estado do Rio Grande do Sul. Métodos quantitativos empregando a GC×GC são desenvolvidos, um dos quais empregando calibração interna através do fator de resposta e outro usando curva de calibração combinada com matriz. Ambos métodos apresentam aceitáveis figuras de mérito e o desenvolvimento de um procedimento para obter o branco de matriz, bem como seu emprego para a quantificação, pela primeira vez, demonstra a influência do efeito de matriz na análise quantitativa dessa amostra. Por fim, as metodologias analíticas aqui desenvolvidas foram capazes de elucidar a composição de amostras de bio-óleo bem como, permitiram avaliar o potencial de utilização das diferentes biomassas para obtenção de bio-óleo, abrindo portas para a implementação de normativas para essa matriz, visando o emprego dos métodos aqui expostos em laboratórios de rotina para análises de bio-óleos oriundos de diferentes biomassas lignocelulósicas.

ABSTRACT

At the same time as pyrolysis technology is consolidating as a way to add value to the large amount of agroindustrial residues generated in Brazil, analytical methodologies that allow to elucidate the complete composition of the bio-oil product, and its applicability, still need investigation. In this way, the present thesis proposes the development of analytical methods through comprehensive two-dimensional chromatography and multivariate analysis for the complete characterization of bio-oil samples. Initially, a simple and fast method using spectroscopy and PCA is developed to pre-define the composition of bio-oils prior to the pyrolysis process, thus facilitating the study of the viability of using different biomasses to obtain bio-oil. For this, the composition of the organic phase of the bio-oil generated for fifteen different Brazilian biomasses is observed by one-dimensional gas chromatography. At the same time, to characterize the aqueous phase of these samples, a quantitative LCxLC methodology is optimized and validated for the first time. Since this method showed high peak capacity and excellent merit figures, the composition of the aqueous phase samples can be elucidated. In a second step, the potential of rice husk utilization, defined as an environmental problem in the state of Rio Grande do Sul, was evaluated. Quantitative methods using GCxGC were developed, one of which employing internal calibration through the response factor and another using matrix-matched calibration curve. Both methods presented acceptable figures of merit and the development of a procedure for the extraction of the bio-oil matrix, and its use for the quantification of this sample, for the first time, demonstrated the influence of the matrix effect on the quantitative analysis of the bio-oil. oil. Finally, the analytical methodologies developed here were able to elucidate the complete composition of bio-oil samples as well as to evaluate the viability of using different biomasses to obtain bio-oil, thus opening doors for the implementation of standards methods for this matrix, allowing the use of these methods in routine laboratories that will implement bio-oil analysis from any lignocellulosic biomasses.

CAPÍTULO I:

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, anualmente são geradas toneladas de resíduos agroindustriais que representam um grave problema ambiental.¹ Somente para a casca de arroz, resíduo proveniente do beneficiamento do grão, são produzidos no estado do Rio Grande do Sul cerca de 2 milhões de toneladas.^{2,3} Desse montante de casca, uma grande parte é ainda queimado em ar aberto ou descartado no meio ambiente.^{4,5} Além da casca de arroz, o Brasil, é responsável por milhões de toneladas de outros resíduos agroindústrias, tais como o bagaço e palha da cana-de-açúcar (aprox. 170 milhões), fibra do coco (aprox. 1,2 milhões) e resíduos da cultura de mandioca (aprox. 9 milhões).^{3,6,7}

Com a implantação da Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) em 2010, resíduos que se enquadram na classe 2-B (resíduos inertes, que não sofrem alteração em suas características em temperatura ambiente e ao entrarem em contato com água) como as biomassas, devem ter, obrigatoriamente, uma destinação sustentável, não sendo permitida sua disposição em aterros e no meio ambiente.⁸

A pirólise é uma forma promissora e viável de converter biomassa em produtos de elevado valor agregado. Com a transformação dos resíduos através da pirólise, tem-se uma redução considerável da quantidade produzida e a geração de bio-óleo, o qual apresenta potencial para uso como biocombustível e aplicação como material de partida para inúmeros produtos químicos na indústria.^{9,10}

Devido à grande variedade de resíduos agroindústrias e outras fontes de biomassa disponíveis no Brasil, são necessários estudos que avaliem a potencialidade de utilização dessas biomassas para a produção de bio-óleo, via pirólise. Nesse contexto, a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) é uma técnica instrumental não-destrutiva, simples, rápida e de baixo custo que vem sendo utilizada com sucesso na análise da composição química de várias biomassa.¹¹⁻¹⁴

Os espectros gerados por FTIR podem ser facilmente combinados com técnicas de análise multivariada, tal como a Análise dos Componentes Principais (PCA, do inglês, *principal component analysis*) a qual é capaz de identificar pequenas diferenças entre os espectros das amostras que não podem ser distinguidas visualmente.¹³ O emprego da FTIR juntamente com a PCA apresenta-se como uma opção as técnicas cromatográficas mais onerosas e laboriosas para fins exploratórios na produção de bio-óleo.

Referente à composição química do bio-óleo, esse se apresenta como uma mistura complexa de água e centenas de compostos orgânicos divididos em duas fases, de acordo com a sua solubilidade em água. A fase insolúvel em água, geralmente denominada fase orgânica, é mais viscosa e mais densa do que a fase aquosa e é constituída por uma mistura complexa de compostos oxigenados de baixa polaridade e elevada volatilidade.¹⁵ Por outro lado, a fase aquosa, consiste de água e grande variedade de compostos de maior polaridade, tais como benzenodióis e outros compostos fenólicos, furfurais, aldeídos, cetonas e ácidos de baixo peso molecular.^{10,15} Em ambas as fases do bio-óleo, inúmeros compostos, se isolados, podem ser uma fonte viável de matéria-prima alternativa para indústria. Como exemplo, cetonas em síntese química, fenóis em resinas fenólicas, hidroxiacetaldeído como agente dourado de carne, levoglucosano em produtos farmacêuticos, surfactantes e polímeros biodegradáveis.^{10,16}

Para avaliar os potenciais usos do bio-óleo, é necessário um conhecimento aprofundado de sua composição química tanto qualitativa quanto quantitativa. Geralmente a caracterização do bio-óleo é realizada por técnicas de cromatografia em fase gasosa (GC, do inglês, *gas chromatography*) acopladas a espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*). O emprego da GC é útil quando se objetiva uma visão geral da composição do bio-óleo, em termos de classe de compostos e alguns compostos majoritários.¹⁷

No entanto, tendo em conta a complexidade dos bio-óleos, as diferenças entre as suas duas fases (aquosas e orgânicas) e a importância de informações quantitativas, esses métodos apresentam limitações na caracterização detalhada e abrangente dessa amostra.¹⁸ Para a fase aquosa, as técnicas de GC requerem um passo de extração (geralmente realizado com diclorometano) devido à inadequação das amostras de água nesse sistema. Esse passo de extração pode afetar a caracterização química detalhada do bio-óleo, devido à diferente afinidade do solvente com cada classe química presente na amostra.^{18,19}

Nesse contexto, o uso de cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*) permite a análise direta da fase aquosa sem etapas de extração, como em GC.¹⁹ Na literatura, dos trabalhos que utilizam LC para a caracterização da fase aquosa, pode-se destacar o emprego da cromatografia líquida bidimensional abrangente (LCxLC, do inglês *comprehensive two-dimensional liquid chromatography*). A LCxLC é uma técnica recente na caracterização desse tipo de amostra, mas já

demonstrou resultados bastantes satisfatórios. Através do emprego da LC×LC, a separação e capacidade de pico são substancialmente aumentadas comparada a separações monodimensionais convencionais. Embora a separação de fases aquosas de bio-óleos tenha já sido explorada por LC×LC, os estudos limitam-se a poucos tipos de biomassas e são focados na análise qualitativa.^{18,19} De fato, há poucos artigos que tratam da quantificação, de pelo menos, parte dos compostos separados no campo de análises de LC×LC.²⁰⁻²⁵ Dessa forma, novos desenvolvimentos para demonstrar as capacidades quantitativas da LC×LC são necessários, ainda mais se análise de rotina for direcionada.²⁶

No caso da fase orgânica, a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC, do inglês *comprehensive two-dimensional gas chromatography*)²⁷ torna-se a escolha mais eficiente para sua caracterização. Esta técnica possui alta capacidade de pico, aumento na detectabilidade, maior resolução e eficiência com o mesmo tempo de análise que no GC.²⁸ Quando a GC×GC é acoplada a detector de MS, o qual fornece informações estruturais dos analitos, a identificação e separação de compostos é drasticamente melhorada.²⁹ A espectrometria de massas por tempo de voo (TOFMS, do inglês *time of flight mass spectrometry*) é o analisador de massa mais usado em GC×GC, devido à sua alta velocidade de aquisição de dados.²⁸ No entanto, atualmente, os analisadores quadrupolares (qMS, do inglês *quadrupole mass spectrometry*) consolidaram sua aplicação no campo GC×GC, devido ao desenvolvimento de sistemas que permitem altas taxas de aquisição (valores de até 50 Hz) necessárias aos sistemas bidimensionais, além de ser mais robusto e menos oneroso do que TOFMS.³⁰ Na literatura inúmeras publicações descrevem o uso da GC×GC na análise de bio-óleos apresentando a adequação dessa técnica na caracterização de misturas tão complexas.³¹⁻⁴³

No entanto nesse campo, ainda é necessário o estabelecimento de um método de quantificação exato, preciso e facilmente aplicável.³⁸ Destaca-se que todos métodos de quantificação descritos na literatura para essa matriz fazem uso de curvas analíticas e/ou misturas de calibração preparadas a partir da diluição de padrões diretamente em solvente, sendo diclorometano, o solvente mais utilizado. Entretanto, o bio-óleo é altamente complexo e consiste em numerosos compostos com propriedades químicas e físicas diferentes, incluindo compostos com alta polaridade, acidez e compostos não voláteis, muitos dos quais são constituintes da matriz.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver metodologias analíticas para o estudo do bio-óleo obtido pela pirólise de diferentes biomassas residuais, em especial a casca de arroz, usando FTIR e métodos cromatográficos avançados (GC, LC, GC×GC e LC×LC) associados a técnicas quimiométricas que permitam identificar compostos de interesse tecnológico entre os constituintes do bio-óleo.

1.2.2 Objetivos Específicos

- (I) Desenvolver um método simples, rápido e de baixo custo usando FTIR juntamente com PCA que permita avaliar a composição da biomassa para prever a composição do bio-óleo obtido por essa biomassa anteriormente ao processo de pirólise.
- (II) Desenvolver e implementar um novo método quantitativo por LC×LC visando a separação, identificação e quantificação dos compostos presentes na fase aquosa oriundas da pirólise de diversas biomassas brasileiras.
- (III) Estudar o potencial de utilização da casca de arroz para produção de bio-óleo através de pirólise, avaliando as condições do processo, e usar a GC×GC/qMS e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) para caracterizar (qualitativamente e quantitativamente) a fase orgânica e aquosa da amostra.
- (IV) Desenvolver metodologia para a obtenção do branco de matriz do bio-óleo, avaliando a extensão do efeito de matriz nessa amostra. Validar e implementar, pela primeira vez, método quantitativo, por GC×GC/qMS, usando calibração compatibilizada com matriz (do inglês, *matrix-matched calibration*) para elucidação da composição do bio-óleo de casca de arroz.

CAPÍTULO II:

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOMASSA E MEIO AMBIENTE

A utilização de recursos de biomassa será um dos fatores mais importantes para a proteção do meio ambiente, aproveitamento energético e geração de insumos químicos, no século XXI. Em contrapartida aos combustíveis fósseis, a utilização da biomassa como fonte de energia aponta algumas vantagens: a biomassa apresenta-se como um recurso energético renovável, despontando entre as fontes de energia de menor custo; os combustíveis gerados a partir da biomassa possuem baixos conteúdos de enxofre e nitrogênio; se for mantido o equilíbrio entre a utilização da biomassa e sua produção é possível reduzir significativamente os gases do efeito estufa.^{44,45} Além disso, a possibilidade de emprego de resíduos agroindustriais é um dos maiores ganhos na utilização da biomassa como energia, pois reduzem-se os custos com a disposição final desse material e também o impacto ambiental gerado pelo descarte inadequado dos mesmos.^{1,45}

O Brasil é um país de economia altamente voltada para a agricultura e, por consequência, é gerador de vasta quantidade de resíduos agroindustriais. As cadeias produtivas da cana-de-açúcar, madeira, arroz, milho, trigo e café são os maiores geradores de resíduos em massa, dos quais grande parte é descartada no meio ambiente.⁴⁶ Com a implantação da PNRS, resíduos que se enquadram na classe 2-B como as biomassas, devem ter, obrigatoriamente, uma destinação sustentável, não mais sendo permitida sua disposição em aterros e no meio ambiente.⁸

Caso, toda a quantidade de biomassa residual produzida no Brasil pudesse ser completamente aproveitada, poderia se assegurar a produção local de aquecimento, eletricidade, combustível e substituir as matérias-primas petroquímicas por fontes renováveis nas indústrias químicas.⁴⁵ Até 2017, encontravam-se em operação no Brasil 518 usinas de geração de energia a partir da biomassa, com potência total de aproximadamente 13.270 MW, tais usinas utilizam principalmente resíduos como bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de madeira, carvão vegetal e casca de arroz.⁴⁷ Esse segmento pode ser muito mais explorado mediante a utilização de outras fontes de biomassa, bem como o emprego de processos que geram produtos de elevado valor agregado, não somente eletricidade.

2.1.1 Fontes de biomassa: casca de arroz e outras biomassas

No Brasil e no mundo, a casca de arroz é uma fonte promissora de biomassa devido à grande quantidade produzida por ano. O arroz é o terceiro produto agrícola

mais produzido no mundo, com uma produção anual que chega a 740 milhões de toneladas, dos quais o Brasil é responsável por mais de 11 milhões de toneladas.^{6,48} Os resíduos do beneficiamento do arroz representam aproximadamente 25% do peso inicial do grão e são constituídos principalmente pela casca. De cada 4 toneladas de arroz, após o processo de beneficiamento é gerado uma tonelada de casca.³ A casca de arroz equivale a 134 milhões de toneladas por ano no mundo, dos quais mais de 90% são queimados ao ar livre ou descartados no ambiente.⁴⁹ No entanto, devido ao alto teor de sílica da casca de arroz, a combustão descontrolada produz partículas de sílica cristalina que podem causar problemas de saúde além do impacto ambiental.⁵⁰

No estado do Rio Grande do Sul, a casca de arroz também se configura como um problema ambiental, ao mesmo tempo que apresenta um elevado potencial para utilização como fonte energética.⁴ Estima-se, para o estado, uma produção anual de 2 milhões de toneladas de casca de arroz (ano de 2018), equivalendo a 65% do total da produção nacional, a qual, em grande parte é estocada ao ar livre.^{2,6} A **Figura 1** apresenta uma região de depósito de casca de arroz situada no município de Itaqui/RS, o segundo maior gerador de casca de arroz do estado, estando atrás somente do município de Uruguaiana.² Nessa região estão dispostos cerca de 10 milhões de toneladas do resíduo, ocupando uma área de 20 hectares, na qual diariamente são dispostas mais de 200 toneladas. Uma parte da casca de arroz gerada também está sendo empregada para geração de energia elétrica e calor, utilizados tanto para a secagem do próprio grão quanto para a manutenção de usinas da manufatura do arroz. Atualmente, no país estão instaladas 12 unidades de geração de energia elétrica a partir da casca de arroz, com uma potência outorgada total de 45,3 MW.⁵¹

O Brasil, além da elevada produção de arroz, é responsável por milhões de toneladas de outras culturas agrícolas e conseqüentemente pela geração de elevada quantidade de resíduos agroindustriais. No ano de 2018, somente para a cultura de cana-de-açúcar, mandioca e café, o país foi responsável por mais de 675, 20 e 2,6 milhões de toneladas, respectivamente.⁶ Para cada tonelada de cana-de-açúcar produzidos, são gerados aproximadamente 250 kg de resíduo e para a mandioca são gerados 490 kg de resíduos.^{3,7} Alguns dos outros resíduos agroindustriais gerados em grande quantidade no Brasil são resíduos do beneficiamento do café, casca de amendoim, resíduos de manga, sementes de algodão, caroço de pêssego, serragem de madeira, etc.⁶

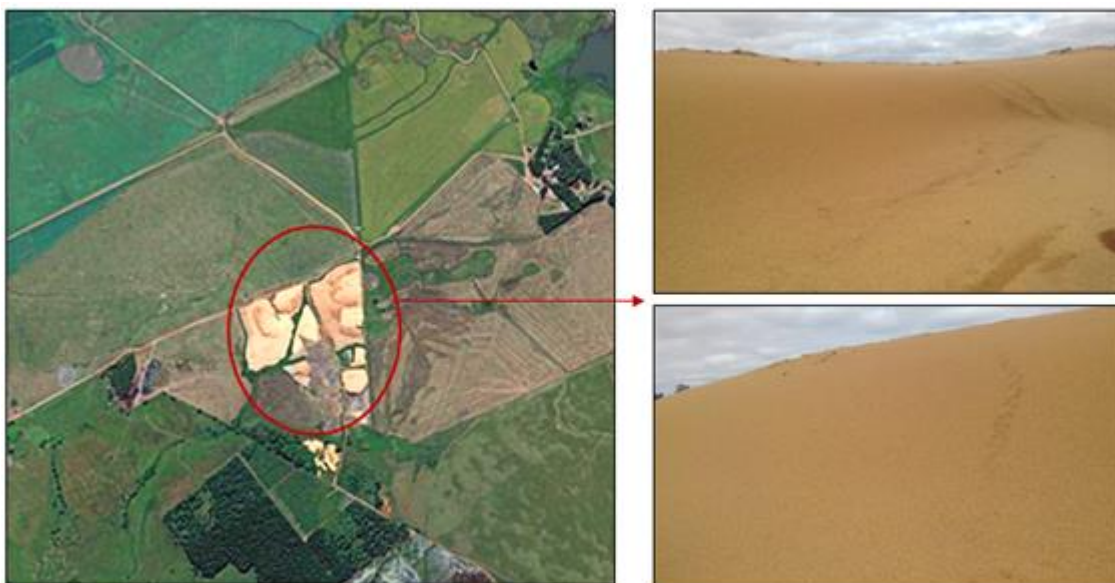


Figura 1. Região de elevado depósito de casca de arroz situada no município de Itaqui/RS (Fonte_Google_Earth_30_09_2017).

Em um país onde são geradas toneladas de resíduos agroindústrias anualmente, é imprescindível que estes sejam vistos não apenas como um problema a ser tratado, mas como um importante recurso para manter a matriz energética do país sustentável, seja através da transformação em energia ou conversão em produtos não-energéticos.⁴

2.1.2 Composição da biomassa

A biomassa de origem vegetal é composta majoritariamente por três biopolímeros naturais: a hemicelulose, a celulose e a lignina, além de quantidades de outros componentes, tais como taninos, ácido graxos, proteínas, resinas e sais inorgânicos.⁵² O teor de cada constituinte se diferencia em cada biomassa. Referente à casca de arroz, esta é constituída por 31% de celulose, 24% de hemicelulose⁵³ e 24% lignina³. Além desses constituintes, a casca de arroz apresenta 16% de carbono fixo e 12% de cinzas³, as quais são constituídas em até 98% de sílica, SiO_2 , o que torna a casca de arroz dura e abrasiva.⁵⁰

Dentre os três principais biopolímeros constituintes da biomassa, a celulose consiste em um homopolímero natural e cristalino, cuja unidade de repetição básica consiste em duas unidades de anidroglicose, ligadas mediante ligações β -1,4-glicosídicas, formando a chamada unidade de celobiose (**Fig. 2a**). Diferentemente, a hemicelulose é um polissacarídeo ramificado, formado por polímeros

de pentoses, geralmente D-xilose e a L-arabinose, e em menor quantidade, por hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose) e ácido glicorônico (**Fig. 2b**). Por fim, a lignina é um copolímero natural composto por um conjunto irregular de diversos grupos polifenólicos ligados via unidades hidróxi e metóxi substituídas. Os três precursores monoméricos da lignina são o álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico (guaiacila) e álcool sinapílico (siringila) que diferem entre si devido ao número de grupamentos metoxil ligados ao anel fenólico (**Fig. 2c**).^{54,55}

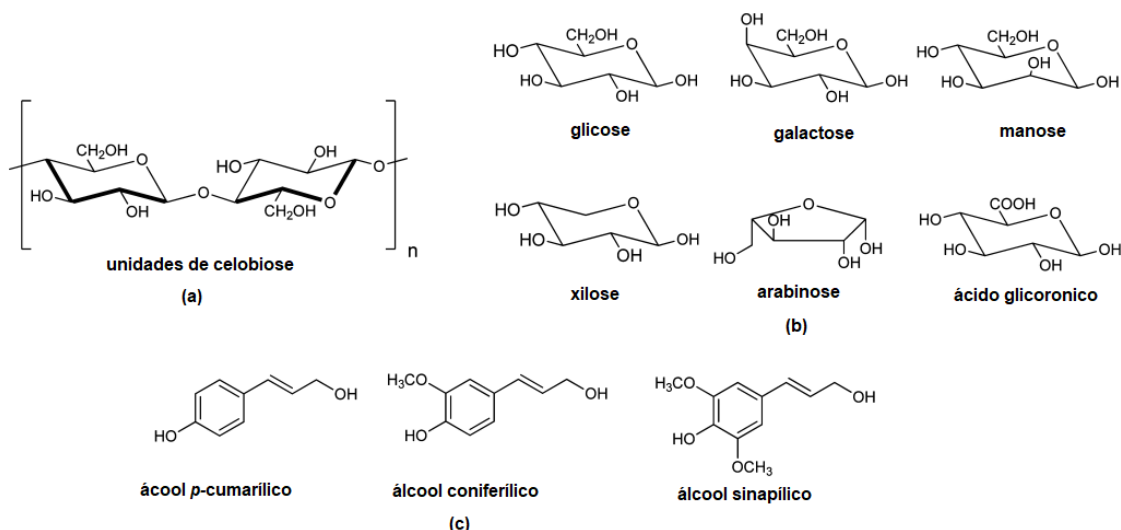


Figura 2. Estruturas químicas formadoras da biomassa lignocelulósica: (a) estrutura química da celulose, (b) principais monômeros da hemicelulose, (c) precursores da lignina. Adaptado de Stas *et al.*⁵⁴

2.2 FTIR E PCA APLICADAS A BIOMASSAS

A espectroscopia no infravermelho vem sendo empregada com sucesso na análise da composição química de várias biomassas. É uma técnica instrumental não-destrutiva, simples, rápida e de baixo custo, aliada ao fato de permitir a análise inteira da amostra, fornecendo, assim, dados importantes sobre sua composição. Na análise por espectroscopia no infravermelho, as bandas de absorção revelam a presença de vários grupos funcionais nas moléculas, além de informação referente à impressão digital da amostra. Quando se emprega a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, ao invés de coletar os dados variando-se a frequência da radiação infravermelha, como ocorre nas técnicas convencionais de infravermelho (dispersivas), a radiação infravermelha é guiada através de um interferômetro, que após passar pela amostra, o sinal medido é o interferograma. A este, realizando-se uma

transformada de Fourier obtém-se um espectro idêntico ao infravermelho convencional (técnica dispersiva).

A região do espectro de infravermelho utilizada compreende os números de onda de 700 a 4000 cm^{-1} enquanto que a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR, do inglês *near-infrared*), outro método baseado em técnica de espectroscopia de infravermelho e bastante utilizado, compreende a região espectral de 4000 a 13000 cm^{-1} .¹ Dentre estas, a NIRS é mais aplicada para estimar parâmetros fenótipos (parede celular e lignina total) das biomassas, já a FTIR tem aplicação mais ampla, devido à sua resolução espectral superior e por fornecer informações importantes sobre vibrações moleculares fundamentais, o que permite melhor interpretação estrutural e a discriminação de estruturas e composições que seriam difíceis de serem alcançadas pela NIR.^{11,12,14}

Os espectros gerados por FTIR podem ser facilmente combinados com técnicas de análise multivariada, tal como a PCA, a qual é capaz de identificar pequenas diferenças entre os espectros das amostras que não podem ser distinguidas visualmente.¹³ A PCA se encontra entre as mais importantes ferramentas da análise multivariada, inclusive por constituir a base onde se fundamentam a maioria dos outros métodos multivariados de análise de dados. Como uma ferramenta de análise exploratória, a PCA permite revelar a existência ou não de amostras anômalas, de relações entre as variáveis medidas e de relações ou agrupamentos entre amostras.¹⁴ De modo resumido, a PCA usa princípios da álgebra linear para redistribuir a variação observada nos eixos originais de forma a se obter um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados denominados componentes principais (PC, do inglês *principal components*). Na PCA associa-se a ideia de redução do número total de dados, com menor perda possível da informação.⁵⁶

Em diversos estudos, dados de espectros de infravermelho foram associados a técnicas multivariadas para a caracterização rápida e eficaz de amostras de biomassa de fins energéticos. Fagan *et al.*⁵⁷ descreve a aplicação da NIR associada ao método dos mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *partial least squares*) para prever o poder calorífico, a umidade, o teor de carbono e de cinzas de duas culturas energéticas. Nos resultados obtidos por Everard *et al.*⁵⁸, a espectroscopia visível e a NIR em conjunto com o PLS, demonstrou potencial para caracterização de biomassas de acordo com seus valores de poder calorífico. Allison *et al.*¹⁴ relata vários modelos de PLS os quais permitiram a predição dos níveis de lignina em forragens e gramíneas usando seus

espectros de FTIR. Chen *et al.*⁵⁹ relata resultados satisfatórios para a predição dos teores de lignina, celulose e hemicelulose em amostras de madeira, usando os dados espectrais de FTIR em conjunto com o PLS. Nesse mesmo estudo, a combinação dos dados de FTIR com a PCA, possibilitou a discriminação das amostras de *hardwood* e *softwood*, além disso, amostras com e sem tratamentos químicos também puderam ser diferenciadas. Em estudo, Liu *et al.*¹³ descreve a caracterização por FTIR das diferentes partes da planta de algodão coletadas nos diferentes períodos de crescimento. Através da PCA dos espectros de FTIR foi possível separar as amostras em dois grupos, os quais apresentaram diferenças no acúmulo de carboidratos.

2.3 PIRÓLISE

A biomassa pode ser convertida em energia através de processos físicos, biológicos e termoquímicos. Dentre os processos termoquímicos (que consistem na conversão da biomassa pela ação do calor) tem-se a combustão, gaseificação e pirólise. Na combustão direta da biomassa, o produto primário é a energia térmica, e é adequada apenas para aplicações estacionárias, como as usinas de energia. A gaseificação fornece o chamado gás de síntese, uma mistura de monóxido de carbono e hidrogênio que pode ser empregado para geração de eletricidade.⁶⁰⁻⁶²

Já a pirólise é um dos processos termoquímicos primários de conversão da biomassa, e consiste na degradação térmica dos constituintes da biomassa em temperatura entre 400 e 700 °C e na ausência de oxigênio. Um dos benefícios significativos da pirólise frente aos demais processos termoquímicos é poder ser realizada em temperaturas mais baixas do que aquelas necessárias na gaseificação (> 700 °C) e na combustão (> 900 °C). Além disso, na pirólise, a biomassa é convertida em três produtos de elevado valor agregado: sólido (*biochar* ou biocarvão), líquido (bio-óleo) e gasoso, diferentemente da combustão e gaseificação.^{60,61}

A fase gasosa obtida na pirólise é constituída predominantemente de hidrogênio, monóxido de carbono, gás carbônico e metano e possui elevado poder calorífico, suficiente para suprir as necessidades de energia da própria planta de pirólise, ou ser empregada em motores de combustão, turbinas a gás e dispositivos operacionais.^{60,61} O produto sólido, conhecido como *biochar*, caracteriza-se pelo elevado teor de carbono fixo, podendo também apresentar teores variados de cinzas e sílica e ser utilizado diretamente como combustível, como precursor para a produção de carvão ativado e aplicações no seqüestro de carbono.^{9,61,63}

A fase líquida que tem grande destaque é conhecida como bio-óleo, e caracteriza-se como uma mistura complexa de compostos orgânicos de coloração marrom escuro, altamente oxigenado.^{60,64} Do ponto de vista do uso final, o bio-óleo apresenta maior conteúdo de energia do que a biomassa original e contém uma ampla gama de importantes compostos, alguns dos quais são matérias-primas promissoras para a indústria química.

A pirólise pode ser classificada principalmente em lenta e rápida. O principal produto da pirólise lenta é o *biochar*. Nesse processo, emprega-se temperaturas em torno de 400 °C e o tempo de reação pode variar de algumas horas até dias.^{9,60} Já, a pirólise rápida maximiza a produção de bio-óleo em relação aos demais produtos. Nesse tipo de pirólise utiliza-se temperaturas em torno de 500 °C, elevadas taxas de aquecimento e os tempos de residência dos vapores de pirólise são reduzidos, permanecendo entre 1 s e 500 ms.^{9,64}

Outro parâmetro a considerar no processo de pirólise é o tipo de reator. Dentre os reatores já desenvolvidos pode-se citar o reator de leito fluidizado e o reator de leito fixo que apresentam ampla utilização nos estudos referentes à pirólise de biomassa. De forma geral, o reator de leito fluidizado é ideal para a técnica de pirólise rápida e possui como características bom contato gás-sólido, transferência de calor, controle de temperatura e capacidade de armazenamento de calor apreciáveis.^{9,16,52,60} Entretanto, o reator de leito fluidizado torna-se difícil de ser projetado e empregado em pequena escala, devido principalmente a trabalhar sobre pressões elevadas. Por outro, o reator de leito fixo, é proveniente de tecnologia simples, fácil de projetar em comparação com outros modelos de reatores. Esse reator é composto por uma unidade de alimentação de biomassa, remoção de cinzas e saída de gases e opera com maiores tempos de residência dos sólidos e baixas velocidades de gás de arraste, sendo apropriado para pequena escala e pirólise realizada em batelada.^{16,52} Três produtos sempre são gerados na pirólise da biomassa: *biochar*, bio-óleo e gases, entretanto a proporção e composição desses produtos depende diretamente das condições utilizadas no processo de pirólise (temperatura, fluxo de gás de arraste, taxa de aquecimento e granulometria da amostra), do tipo de reator empregado e principalmente da composição da biomassa inicial.^{52,61}

As condições utilizadas no processo de pirólise necessitam ser otimizadas de acordo com o produto desejado, sendo a metodologia de superfície de resposta (RSM, do inglês, *response surface methodology*) uma técnica estatística útil para otimizar as variáveis deste processo. Tal técnica tem sido empregada com sucesso na otimização

das condições de pirólise para diferentes biomassas^{42,65} incluindo a otimização da pirólise da casca de arroz, visando maior rendimento de bio-óleo, por Isa *et al.*⁶⁶ Os aspectos teóricos fundamentais referentes a RSM foram detalhadamente revisados por Montgomery *et al.*⁶⁷

2.3.1 Pirólise dos constituintes da biomassa

Muito autores vem estudando as reações químicas envolvidas nesse processo, as quais são complexas e dependentes da transferência de calor e massa.^{61,68,69} Dentre os principais biopolímeros constituintes da biomassa, os polissacarídeos celulose e hemicelulose são mais facilmente degradados termicamente, enquanto que a lignina, por ser estruturalmente rica em anéis aromáticos, possui maior estabilidade térmica.^{68,69} Na **Figura 3** tem-se a estrutura dos principais produtos gerados a partir da pirólise dos constituintes da biomassa.

A pirólise da celulose pode ser dividida nos seguintes estágios: (I) desidratação, em temperaturas abaixo de 350 °C, gerando principalmente água; (II) despolimerização, em temperaturas entre 300 e 450 °C gerando levoglucosano e outros anidro-açúcares monoméricos; (III) fragmentação, em temperaturas de aproximadamente 600 °C, gerando hidroxiacetaldeído, além de compostos carbonilados (furfurais e furanonas), ácidos e álcoois. Assim como a celulose, a hemicelulose é formada por polissacarídeos, portanto suas reações durante a pirólise são análogas. A pirólise das hexoses presentes na hemicelulose gera produtos semelhantes aos da pirólise da celulose, entretanto a pirólise do xilano, gera maior teor de carvão e menor teor de voláteis.^{61,68,69}

Para a lignina, a pirólise gera predominantemente fenóis, dentre os quais catecóis, guaiacóis e alquilfenóis. Dada a variedade das funções químicas que diferem em estabilidade térmica na estrutura da lignina, o passo de conversão principal desse polímero ocorre em uma grande faixa de temperatura de 200 a 450 °C, com uma maior taxa de decomposição geralmente entre 360 e 400 °C. As reações responsáveis pela liberação de compostos voláteis na lignina são principalmente devidas à instabilidade das cadeias propil de ligações entre as unidades de monômeros e das unidades de metóxi substituintes dos anéis aromáticos. Vale ainda ressaltar, que a lignina é o principal componente responsável pela formação do carvão residual do processo.^{61,69,70}

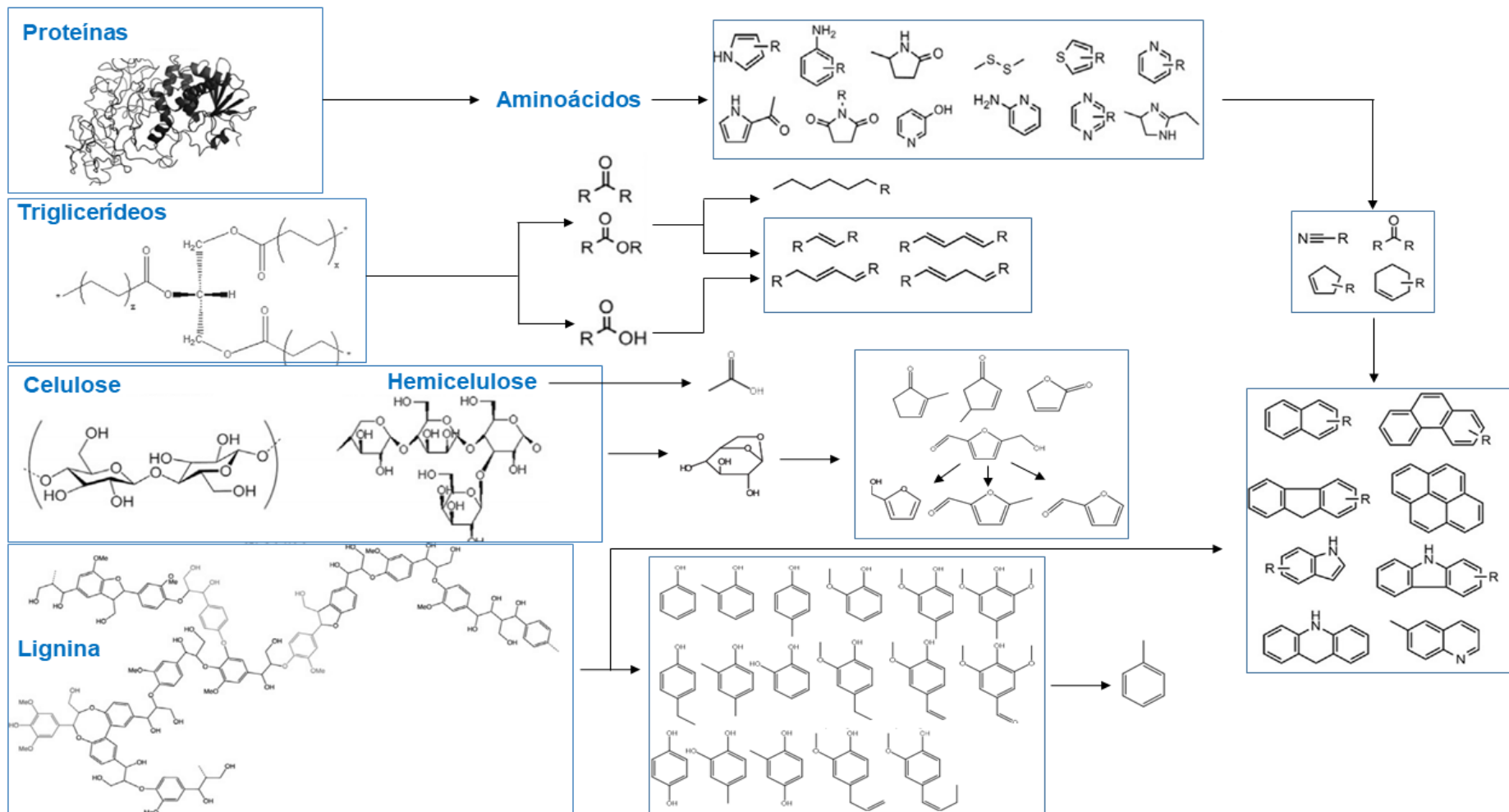


Figura 3. Principais produtos gerados a partir da pirólise dos constituintes da biomassa (celulose, hemicelulose, lignina, triglicerídeos e proteínas). Adaptado das referências: Silva, *et al.*³⁴, Sharma, *et al.*⁶¹ e Polidoro⁷¹.

Além da celulose, hemicelulose e lignina, pode-se encontrar na biomassa teores variáveis de triglicerídeos e proteínas. A pirólise dos triglicerídeos resulta em ácidos graxos, cetonas e acroleína, os quais, via mecanismos de descarbonilação e de descarboxilação, geram hidrocarbonetos e liberação de monóxido de carbono, dióxido de carbono e água. Já a pirólise dos aminoácidos, que constituem as proteínas, produz inicialmente compostos mononucleares N-heterocíclicos os quais são susceptíveis de se fragmentar em moléculas menores e por reações secundárias formam nitrilas, olefinas e outros compostos insaturados que, por fim, originam os compostos polinucleares aromáticos N-heterocíclicos.³⁴

2.4 BIO-ÓLEO: COMPOSIÇÃO E POSSÍVEIS APLICAÇÕES

O bio-óleo, produto líquido gerado na pirólise, tem coloração marrom escura com odor característico e composto por uma mistura complexa de água e centenas de compostos orgânicos, divididos em duas fases de acordo com a sua solubilidade em água.^{15,60} A fase insolúvel em água, geralmente denominada fase orgânica, é mais viscosa e mais densa do que a fase aquosa e é constituída por uma mistura complexa de compostos oxigenados de baixa polaridade e elevada volatilidade. Por outro lado, a fase aquosa, consiste de água e grande variedade de compostos de elevada polaridade.^{10,15}

Os compostos orgânicos encontrados no bio-óleo pertencem a classe química dos fenóis, cetonas, ácidos, ésteres, éteres, aldeídos, álcoois, furanos, açúcares, compostos nitrogenados e hidrocarbonetos e derivam das reações de despolimerização e fragmentação dos constituintes da biomassa.⁵² O percentual de cada classe química encontrada no bio-óleo varia de acordo com a biomassa em estudo, além de diversos outros parâmetros.

A utilização do bio-óleo está diretamente atrelada às suas propriedades físico-químicas e principalmente à sua composição química. Dependendo da composição química do bio-óleo gerado, este poderá ser empregado para diferentes fins. De modo geral, o bio-óleo pode ser empregado diretamente como combustível em caldeiras industriais e turbinas a gás, visando a geração de calor e eletricidade.^{60,64} Entretanto, devido ao seu elevado teor de oxigênio, baixo poder calorífico, baixa viscosidade, corrosividade, instabilidade e incompatibilidade com combustíveis convencionais, seu uso direto como combustível de transporte é inviável. Para esse fim, são necessários processos de *upgrade* que objetivam a desoxigenação do bio-óleo, removendo o oxigênio e aumentando do teor de hidrocarbonetos (maior relação C/O).^{16,60}

Por outro lado, em ambas as fases do bio-óleo, vários compostos, se isolados, podem ser uma fonte viável de matéria-prima alternativa para indústria.¹⁶ Essa possibilidade é muito atrativa, pois muitos produtos derivados do bio-óleo e que podem ser extraídos possuem maior valor agregado quando comparado com combustíveis ou produtos energéticos. Por exemplo, os fenóis presentes na composição do bio-óleo podem ser empregados como substitutos dos fenóis de origem fóssil.^{60,72} Anidro-açúcares podem ser empregados para obtenção de biocombustíveis de segunda geração, através de processos fermentativos. Compostos específicos tais como o 2,6-dimetóxi-fenol apresentam importância como agente douradouro e flavorizante na indústria alimentícia.⁷³ Levoglucosano tem aplicações em fármacos, surfactantes e polímeros biodegradáveis.⁶⁰

2.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS BIO-ÓLEOS

Em todo o estudo que visa à obtenção de bio-óleo é necessário proceder a sua caracterização química. Somente a partir da caracterização química detalhada do bio-óleo pode-se propor a melhor utilização para o mesmo, além de determinar a presença de possíveis compostos nocivos que possam vir a ser formados no processo de pirólise.

O bio-óleo derivado da biomassa lignocelulósica é constituído por cerca de 40% de compostos de média polaridade detectáveis por GC, 12% de compostos de maior polaridade detectáveis diretamente por LC ou, após derivatização, por GC, 28% de água e 20% de material oligomérico.⁷⁴ Essa diferença na volatilidade e polaridade dos compostos aliada à complexidade do bio-óleo, tornam sua caracterização química um desafio analítico.

Geralmente, a caracterização química do bio-óleo é realizada através da GC/qMS. Tal técnica apresenta uma visão geral da composição do bio-óleo, em termos de classe de compostos e alguns compostos majoritários, sendo uma importante ferramenta para que se tenha uma visão mais global referente às características dos bio-óleos. No entanto, considerando-se a complexidade da amostra de bio-óleo e as diferenças na composição e volatilidade entre suas duas fases (aquosa e orgânica), a GC apresenta limitações para uma caracterização detalhada e abrangente dessa amostra.^{17,18}

As limitações no uso da GC são fortemente atreladas à presença de co-eluições entre os analitos e a impossibilidade de injeção direta da fase aquosa no sistema, sendo assim necessárias etapas de extração.^{17,19}

2.5.1 Caracterização fase aquosa: cromatografia líquida

A LC permite a análise direta da fase aquosa, diferentemente da GC, na qual etapa de extração, geralmente operada com diclorometano, faz-se necessária. Espera-se que a LC seja complementar à técnica de GC, na análise dos compostos de baixa volatilidade, alta polaridade e baixa estabilidade térmica também presentes no bio-óleo.¹⁸ Os resultados obtidos por LC são independentes de rendimentos de extração, afinidade do solvente com cada classe química presente na amostra e contaminações.¹⁹

A LC, especificamente a HPLC, é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis. O uso de detectores, tais como o detector de arranjo de diodo (DAD, do inglês *diodo array detector*) e MS, fornecem dados qualitativos sobre a amostra, pois permitem a obtenção, respectivamente, de espectros completos de ultravioleta-visível (UV-Vis, do inglês *Ultraviolet-Visible*) e de espectro de massas, de cada pico cromatográfico.⁷⁵ Estudos que empregam a HPLC, acoplada a diferentes detectores, para a análise do bio-óleo vem sendo realizados.

Johnston & Brown⁷⁶ desenvolveram método de quantificação dos açúcares totais em amostras de bio-óleo, por HPLC acoplado ao detector de índice de refração (RID, do inglês *refractive index detector*). Tal método baseia-se na hidrólise ácida dos açúcares presentes na amostra até suas respectivas unidades monoméricas (celobiose, glicose, xilose e sorbitol).

Tessini *et al.*⁷⁷ propuseram um método para análise e quantificação de aldeídos em amostra de bio-óleo por HPLC acoplado ao detector de UV-Vis. Para tanto, os autores fizeram a derivatização da amostra com o composto 2,4-dinitrofenilhidrazina. O processo de derivatização permitiu a separação e detecção dos aldeídos nas amostras de bio-óleo, entretanto afetou a estabilidade do bio-óleo.

Por outro viés, Masle *et al.*¹⁸ e Tomasini *et al.*¹⁹ foram inovadoras nessa área, empregando a técnica de LCxLC para a caracterização das fases aquosas de bio-óleos. Os autores reportam que a utilização da LCxLC permitiu resolver problemas de coeluições conduzindo a detecção de maior número de compostos na amostra, isto devido ao aumento da capacidade de pico que essa técnica possui quando comparada com métodos monodimensionais. Tomasini *et al.*¹⁹ descreveram a aplicação da LCxLC acoplada ao detector DAD e MS na análise das fases aquosas dos bio-óleos de fibra de coco, bagaço e palha de cana-de-açúcar. As amostras foram analisadas diretamente, sem pré-etapas de extração. Os autores identificaram 23 compostos nas amostras,

sendo a maioria de elevada polaridade, pertencentes as classes dos fenóis, cetonas, furanos, álcoois e aldeídos. Malse *et al.*¹⁸ também apresentam resultados satisfatórios referente a capacidade de pico e ortogonalidade de diferentes conjuntos de colunas para a separação de solução padrão contendo 38 compostos representativos de bio-óleo por LC×LC acoplada ao detector DAD. Observa-se, assim, que a fase aquosa do bio-óleo é uma amostra complexa justificando o uso da LC×LC para sua caracterização.

Demais estudos que vêm sendo desenvolvidos no campo de cromatografia líquida bidimensional para a caracterização de amostras de fase aquosa, destacam o emprego da LC acoplada a separação com fluidos supercríticos (LC×SFC, do inglês *comprehensive two-dimensional liquid chromatography × supercritical fluid chromatography*).^{78,79} Os autores descrevem o uso da LC×SFC como alternativa para a separação de amostras complexas com inúmeros compostos neutros.

2.5.2 Cromatografia líquida bidimensional abrangente

O elevado poder de separação promovido pelas técnicas multidimensionais de cromatografia líquida é resultado do emprego de dois ou mais sistemas independentes de separação (dimensões).⁸⁰ Particularmente, na cromatografia líquida bidimensional (²D LC), uma separação é realizada na primeira dimensão (¹D) e posteriormente as frações do eluente são submetidas a uma separação na segunda dimensão (²D).⁸¹

Dependendo da forma com que o eluato da primeira coluna é transferido para a segunda coluna, pode-se classificar a cromatografia líquida bidimensional em *off-line* e *on-line* ²D LC. Na *off-line* as frações do eluato são coletadas manualmente ou através de um coletor de frações e, após, são reinjetadas na ²D. Nesse modo de ²D LC, podem-se empregar sistemas convencionais de LC, no entanto, são necessários longos tempos de análise e tem-se a chance de introduzir erros de reprodutividade aos resultados, devido a maior manipulação da amostra.⁸⁰ Alternativamente, no modo *on-line* ²D LC o efluente da ¹D é continuamente e automaticamente injetado na ²D, através de uma interface adequada, esse modo apresenta menor tempo de análise e maior reprodutibilidade dos resultados, quando comparado ao modo *off-line*.⁸²

Os sistemas *on-line* ²D LC são divididos em cromatografia líquida bidimensional de *heart-cutting* (LC-LC, do inglês *two dimensional heart-cutting liquid chromatography*) e cromatografia líquida bidimensional abrangente (LC×LC), dependendo do número de frações provenientes da separação ¹D, que são transferidas para a separação na ²D. No modo *heart-cutting* apenas frações relevantes do efluente, as quais contenham compostos de interesse, são submetidas à separação na ²D, enquanto que a LC×LC

permite a separação de toda a amostra em ambas as dimensões.^{80,83} Um sistema típico de LCxLC, como pode ser observado na **Figura 4**, consiste de três seções: **(1)** ¹D - injetor, bomba e coluna cromatográfica; **(2)** ²D - bomba de alta pressão, coluna e detector; **(3)** Interface.⁸⁰ A interface, também conhecida como modulador, é considerada um dos pontos centrais de um sistema de LCxLC, pois permite o acoplamento entre as duas dimensões. A vasta maioria de interfaces empregadas em LCxLC condiz com sistemas de duas válvulas de comutação controladas eletronicamente com mesmas 6, 8, 10 e 12 portas.^{82,84}

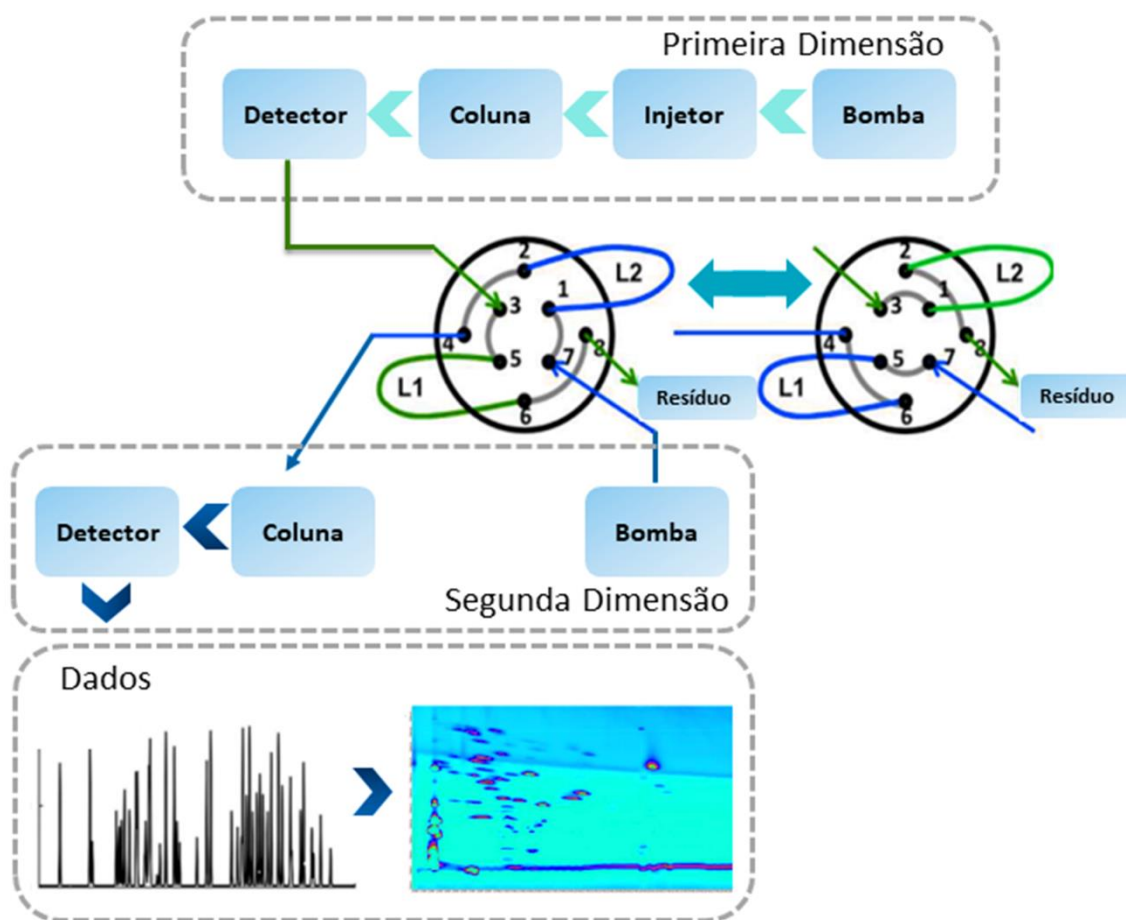


Figura 4. Diagrama de um sistema típico de LCxLC destacando a interface, válvula entre o detector da ¹D e a coluna da ²D. A seta azul, entre os esquemas das interfaces, descreve a alternância entre a coleta do efluente da ¹D e a injeção na coluna da ²D. (Adaptada de Cacciola *et al.*⁸⁰)

Em geral, essas válvulas (**Fig. 4**) são equipadas com dois *loops* (alças) de volume interno idêntico e tem como proposta coletar o efluente da ¹D, armazenar e transferir para a coluna da ²D, onde ocorre a segunda separação.⁸² Neste sentido, o efluente elui da coluna 1 e segue para um dos *loops*. Enquanto o *loop* 1 coleta o efluente

que sai da coluna 1 (tempo que a válvula é mantida nessa posição denomina-se período de modulação), a fração no *loop* 2 é enviada para a separação na coluna 2. Após esta separação, a válvula é então modificada e a fração no *loop* 1 é transferida para a coluna 2, enquanto a próxima fração é coletada no *loop* 2. O tempo necessário para a separação na ²D (incluindo gradiente e tempo de reequilíbrio) deve ser igual ao período de modulação.⁸⁵

Um dos desafios que a técnica de LCxLC apresenta é a otimização das condições do método cromatográfico, a fim de se obter a melhor separação possível.⁸⁶ Como requisitos em métodos de LCxLC, a separação na ¹D deve empregar fluxos de fase móvel relativamente baixos, uma vez que, o fluxo da ¹D juntamente com o período de modulação é um dos parâmetros que diretamente determinam o volume de fração que será transferido para a ²D, o qual deve ser o mínimo possível. Ao contrário, na ²D necessita-se o emprego de fluxos elevados de fase móvel, colunas de menores comprimentos e maiores diâmetros internos, para obter uma rápida separação, que deve coincidir com o período de modulação.⁸¹

No método de ²D LC procura-se encontrar o maior grau de ortogonalidade e assim a máxima capacidade de pico. A ortogonalidade refere-se à combinação de mecanismos de retenção que oferecem diferentes seletividades para a separação da amostra, enquanto, que a capacidade de pico descreve o número máximo de compostos separados em uma única coluna analítica.⁸⁰ Máxima ortogonalidade e capacidade de pico são encontradas quando todos os componentes da amostra são submetidos a dois diferentes métodos de separação totalmente não correlacionados, entretanto, tais sistemas são raramente encontrados na prática.⁸⁶

Em geral, o modo de separação mais empregado em ²D LC é a combinação de duas separações por cromatografia líquida de fase reversa (RPLC x RPLC, do inglês *Reversed Phase Liquid Chromatography*). A priori, tal combinação pode parecer não apresentar diferentes mecanismos de retenção para ser considerada ortogonal, entretanto, uma vez que diferentes grupos funcionais ligantes (C18, fenil, ciano, amino entre outros) e fases móveis, em ambas dimensões, são cuidadosamente selecionados, essa combinação pode oferecer um bom grau de ortogonalidade. Além do mais, a maioria das demais combinações, tais como, cromatografia líquida de fase normal (do inglês *Normal Phase Liquid Chromatography*) NPLC x RPLC, cromatografia líquida de troca iônica (do inglês *Ion Exchange Chromatography*) IEC x RPLC, cromatografia de exclusão por tamanho (do inglês *Steric Exclusion Chromatography*) SEC x RPLC, sofrem problemas de incompatibilidade entre as fases móveis.^{82,84,86,87,86,88,82}

A ortogonalidade e capacidade de pico para diferentes conjuntos de coluna em análise de compostos presentes em bio-óleo por LC×LC, foram detalhadamente discutidas por Masle *et al.*¹⁸ Os resultados apontam para maior ortogonalidade e capacidade de pico, com valores de 3,2 e 1002, respectivamente, para a combinação de colunas RPLC x RPLC (*hypercarb kinetex* na ¹D e fenil hexil na ²D). Tomazini *et al.*¹⁹ também empregam a combinação RPLC x RPLC (Ascentis RP-Amide na ¹D e Ascentis Express C8 na ²D) para a separação de amostras de fase aquosa, obtendo 4,7 e 347 para a ortogonalidade e capacidade de pico, respectivamente.

Referente aos detectores, a LC×LC é facilmente combinada com detectores convencionais empregados em LC monodimensional, incluindo o DAD e MS, os quais oferecem informações adicionais dos compostos presentes na amostra. Entretanto, devido a rápida velocidade de análise na ²D, os detectores usados em LC×LC, devem possuir elevada taxa de aquisição de dados, uma vez que, perdas na resolução podem ser ocasionadas pelo baixo número de dados coletados.⁸³

Embora a separação dos compostos de fase aquosa de bio-óleo tenha sido explorada nos últimos anos por LC×LC, tais estudos são limitados à caracterização de biomassas lignocelulosicas e à análise qualitativa. De fato, existem poucos artigos no campo de LC×LC que exploram a quantificação, de pelo menos, parte dos compostos separados.²⁰⁻²⁵ Dessa forma, é amplamente aceito que novos desenvolvimentos são necessários para demonstrar as capacidades quantitativas da LC×LC, ainda mais se a análise de rotina for direcionada.²⁶

Na presente tese de doutorado utilizou-se a RPLC×RPLC combinada com o DAD e MS com ionização por eletrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*), a fim de se obter a máxima informação da composição da amostra, além de desenvolver e validar, pela primeira vez, um método quantitativo para análise da fase aquosa de bio-óleo.

2.5.3 Caracterização fase orgânica: cromatografia gasosa bidimensional abrangente

Para a caracterização da fase orgânica do bio-óleo (fração volátil) a técnica de GC×GC²⁷ torna-se a escolha mais eficiente. A GC×GC é uma poderosa técnica analítica para a análise da composição de amostras com elevada complexidade, por apresentar excelente poder de separação, devido à grande capacidade de pico, ou seja, número máximo de compostos que podem ser separados em uma mesma análise.²⁸ Várias revisões sobre a técnica de GC×GC têm sido publicadas na literatura, descrevendo

detalhadamente os princípios, instrumentação e vantagens dessa técnica para análise de amostras complexas.^{28,29,89,90}

Resumidamente, a GC×GC caracteriza-se pela utilização sequencial de duas colunas cromatográficas, uma com dimensões similares às colunas capilares convencionais e outra com tamanho e dimensões menores, de forma que todo o efluente da primeira coluna ou parte representativa do mesmo seja reinjetado na segunda coluna, através da utilização de um modulador. O modulador faz a conexão entre as duas colunas e representa o componente principal em GC×GC. O modulador possui a função de coletar continuamente pequenas frações do eluato da coluna da primeira dimensão, reconcentrá-las em bandas estreitas, focalizá-las e em seguida injetá-las rapidamente na segunda dimensão.^{28,89,90,91}

Os detectores utilizados em GC×GC igualam-se aos utilizados na cromatografia monodimensional. No entanto, quando o sistema de GC×GC é acoplado a um detector de espectrometria de massa, que fornece informações estruturais dos analitos, a identificação dos compostos é drasticamente aumentada.²⁹ O TOFMS é o analisador de massa mais usado em GC×GC, devido à sua alta velocidade de aquisição de dados.²⁸ Atualmente, o analisador qMS consolidou sua aplicação no campo de GC×GC, devido ao desenvolvimento de sistemas que permitem altas taxas de aquisição de dados (valores em torno de 50 Hz) necessárias aos sistemas bidimensionais, além de ser mais robusto e menos oneroso quando comparado ao TOFMS.³⁰

A técnica de GC×GC tem sido amplamente utilizada para a análise de bio-óleos oriundos da pirólise de diferentes biomassas. Os trabalhos publicados na literatura usando GC×GC demonstram a elevada capacidade analítica da técnica para a caracterização desse tipo de amostra. Para o bio-óleo obtido da pirólise de resíduos de caroço de manga, Lazzari *et al.*³⁹ identificaram tentativamente 106 compostos para o endocarpo (parte externa do caroço) e 104 para a amêndoa (parte interna do caroço) usando a GC×GC/TOFMS. Pela mesma técnica, Moraes *et al.*³¹ tentativamente identificaram 123 compostos no bio-óleo oriundo da pirólise de palha de cana-de-açúcar. Em outro estudo, Moraes *et al.*³² analisaram o bio-óleo oriundo de casca de arroz e caroço de pêssego a utilização da GC×GC/TOFMS permitiu a identificação tentativa de 106 e 223 compostos em cada amostra, respectivamente. Silva *et al.*³⁴ procederam à caracterização de amostras de bio-óleos oriundas da pirólise lenta da torta de semente de mamona, usando a GC×GC/TOFMS quando foram tentativamente identificados 408 compostos.

Referente à GC×GC/qMS, estudos do grupo de pesquisa do Laboratório de Química Analítica, ambiental e oleoquímica (LAAO) apresentam a caracterização com sucesso de amostras de bio-óleos por essa técnica. Cunha *et al.*³³ descreveram a aplicação da GC×GC/qMS para a caracterização de bio-óleo oriundo da pirólise da palha de cana-de-açúcar, identificando tentativamente 166 compostos. Schneider *et al.*³⁶ também usaram o mesmo sistema para caracterização da fração proveniente da extração alcalina do bio-óleo de Lignocel (serragem de madeira), tentativamente identificando 130 compostos. Polidoro *et al.*⁴² recentemente caracterizaram qualitativamente e semi-quantitativamente amostra de bio-óleo oriundo da pirólise de resíduo do torrador de café (*silverskin*), tentativamente identificando 228 compostos.

As várias publicações que descrevem o uso da GC×GC para a análise do bio-óleos apresentam a adequação dessa técnica na caracterização de misturas complexas. No entanto, nesse campo, ainda é necessário o estabelecimento de uma metodologia de quantificação precisa, exata e facilmente aplicável. A quantificação precisa dos compostos individuais presentes nas amostras de bio-óleo é de suma importância, especialmente se esse for destinado para uso como fonte de compostos químicos.³⁸

2.5.3.1 Métodos de quantificação do bio-óleo por cromatografia gasosa bidimensional abrangente

Na literatura, estudos que empregam a GC×GC para a quantificação de amostras de bio-óleo, baseiam-se no método de calibração interna, valor do fator de resposta (RF, do inglês *response fator*) no método de calibração externa (curva de calibração) e no método de normalização externa.

Dentre esses, o método de normalização externa é empregado para obter uma abordagem semi-quantitativa da amostra de bio-óleo. Esse método trabalha com relação percentual de áreas, toma-se a área do composto de interesse em relação ao somatório total das áreas do cromatogramas, multiplicado por 100 ($\text{área}\% = \frac{\text{área}_{\text{interesse}}}{\text{área}_{\text{total}}} \times 100$). Quando se utiliza uma substância como padrão interno (IS, do inglês *internal standard*), a qual é adicionada à amostra, esse método passa a denominar-se normalização interna, no qual, para a relação de áreas, leva-se em conta a área do padrão interno; $\frac{\text{área}_{\text{analito}}}{\text{área}_{\text{IS}}}$. A normalização externa é o método mais difundido na literatura para a análise de amostras de bio-óleo. Tal método torna-se importante principalmente quando se deseja obter uma comparação em termos de concentração entre amostras, entretanto, não nos permite obter um valor exato da

concentração real dos analitos no bio-óleo, motivo pelo qual, quando se emprega o método de normalização externa denomina-se análise semi-quantitativa. Polidoro *et al.*⁴² empregaram o método de normalização externa para avaliar a composição do bio-óleo oriundo da pirólise de resíduos do torrador de café (*silverskin*) por GC×GC/qMS. Através dessa análise semi-quantitativa, verificou-se que os fenóis foram a classe química majoritária (26,70%) seguidos pela classe dos compostos nitrogenados (18,51%). Lazzari *et al.*³⁹ utilizaram-se de mesmo método semi-quantitativo e da técnica de GC×GC/TOFMS para avaliar as diferenças na composição de bio-óleos oriundos da pirólise do endocarpo e da amêndoa do caroço de manga. Os resultados mostraram que fenóis e cetonas foram majoritários no bio-óleo do endocarpo, enquanto que cetonas, ácidos carboxílicos e hidrocarbonetos foram majoritários no bio-óleo da amêndoa. Torri *et al.*⁴⁰ avaliaram qualitativamente e semi-quantitativamente as diferenças entre as composições de bio-óleos oriundos da pirólise intermediária, rápida e catalítica de duas diferentes biomassas, através do método de normalização externa e da técnica de GC×GC/TOFMS. Recentemente, Barros *et al.*⁴³ também empregaram o método de normalização externa em dados de GC×GC/qMS para diferenciar bio-óleos oriundos da pirólise do bagaço e da palha de cana-de-açúcar de quatro diferentes genótipos de *Saccharum complex*.

Dentre os métodos de análise quantitativa, o método de calibração externa é recomendado quando se objetiva a quantificação de compostos alvo na amostra de bio-óleo.³⁷ Esse método baseia-se na preparação de uma série de soluções-padrões de concentração crescentes e que compreendam a concentração do analito na amostra. Os cromatogramas dos padrões são então obtidos e o área dos picos são usadas em um gráfico em função da concentração (A_{pad} vs C_{pad}). Idealmente a curva obtida deve ser uma reta que passa pela origem e a concentração dos compostos na amostra é então obtida através da equação da reta e expressa em termos de massa/massa (como exemplo mg g^{-1}). As fontes mais pronunciadas de erros analíticos, nesse método de quantificação, devem-se principalmente as incertezas na preparação dos padrões, no volume da amostra, bem como, problemas durante o processo de injeção.⁹²

O método de quantificação por padronização externa tem sido empregado em amostras de bio-óleo por Stefsas *et al.*¹⁷, Tessarolo *et al.*³⁵ e Cardoso *et al.*³⁷ No estudo de Stefsas *et al.*¹⁷ os autores analisaram a composição química de três diferentes bio-óleos através da GC×GC/TOFMS. Cerca de 300 componentes foram detectados e tentativamente identificados nas amostras, dentre esse total, foram quantificados somente onze, pelo método de padronização externa. Nesse estudo, os autores provam

a eficiência do TOFMS para a quantificação de amostras de bio-óleo, entretanto, o método quantitativo por padronização externa não permitiu a quantificação de um grande número de compostos. Tessarolo *et al.*³⁵ também descrevem a caracterização e quantificação de duas amostras de bio-óleo por GC×GC/TOFMS. Por esta técnica foram detectados 857 compostos, dos quais 13 compostos foram quantificados pelo método de padronização externa. Tal método de quantificação foi devidamente validado através de figuras de mérito, entretanto, devido ao baixo número de compostos quantificados não se obteve uma compreensão abrangente da amostra em termos de concentração. Em estudo de Cardoso *et al.*³⁷ bio-óleos oriundos da pirólise do endocarpo, casca e da fibra de resíduo de bocaiúva, foram caracterizados e quantificados por GC×GC/TOFMS. Os resultados apontam para a maior complexidade do bio-óleo do endocarpo, sendo tentativamente identificados 151 compostos, para os bio-óleos de casca e fibra foram tentativamente identificados 111 e 78 compostos, respectivamente. Desse total de compostos, foram quantificados somente sete, empregando o método de calibração externa

Por outro lado, a calibração interna, é um método de quantificação mais versátil, especialmente para amostras complexas, pois permite a quantificação de maior número de compostos e minimiza as incertezas introduzidas na injeção da amostra.^{38,92} O método de calibração interna requer uso de composto padrão interno que, preferencialmente, seja similar aos compostos a serem quantificados e deve ainda estar bem resolvido dos demais componentes, eluir próximo ao sinal analítico e não reagir com nenhum dos componentes da amostra. O padrão interno é introduzido em cada mistura de calibração, bem como na amostra, e a razão entre os volumes ou áreas do pico do analito ($\text{área}_{\text{analito}}/\text{área}_{\text{IS}}$) e do padrão interno funcionam como parâmetro analítico.⁹²

A quantificação através do método de calibração interna baseia-se no cálculo do valor do RF, para cada analito ou na construção de curvas analíticas. Referente ao valor do RF, este é obtido segundo **Equação 1**,³⁸ e quando empregado, a concentração dos analitos na amostra é dada em fração de massa (m/m %).

$$\text{RF} = \frac{V_{\text{pad}} \times C_{\text{IS}}}{C_{\text{pad}} \times V_{\text{IS}}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: **C** é a concentração, **V** é o volume do pico, **pad** é o padrão presente na mistura de calibração e **IS** representa o padrão interno.

O RF é o número que correlaciona a concentração e o sinal produzidos (volume de pico) de cada composto com referência aos respectivos valores do padrão interno. Os valores de RF levam em consideração as diferentes ionizações e respostas do detector de massa para cada composto.⁹³ Quando os detectores de ionização em chama (FID, do inglês *flame ionization detector*)⁹⁴, de quimioluminescência de enxofre (SCD, do inglês *sulfur chemiluminescence detector*) e de quimioluminescência de nitrogênio (NCD, do inglês *nitrogen chemiluminescence detector*)⁹⁵ são empregados para a quantificação por GCxGC, os valores de RF podem ser calculados teoricamente, com precisão satisfatória, através do cálculo do número efetivo de carbonos da molécula.^{37,94} Djokic *et al.*⁹⁴ descreveram a quantificação de duas amostras de bio-óleo, por GCxGC/FID, utilizando valores de RF calculados teoricamente. Esse método permitiu a quantificação de aproximadamente 150 compostos nas amostras de bio-óleo (80% do volume total de picos cromatográficos). Utilizando-se do sistema GCxGC/NCD e valores de RF calculados teoricamente, Toraman *et al.*⁹⁵ quantificaram compostos nitrogenados na fase aquosa e orgânica do bio-óleo oriundo da pirólise de algas. O uso do detector NCD deve-se a sua maior sensibilidade aos compostos nitrogenados. Tal abordagem permitiu a quantificação de 13 classes de compostos nitrogenados, sendo a fase aquosa composta majoritariamente (80 m/m%) de amidas e imidazóis, enquanto que, a fase orgânica era composta, majoritariamente, por amidas, indóis, aminas e imidas (65 m/m%).

Entretanto, no caso dos detectores de MS, o cálculo teórico do RF não é tão simples, pois requer uma hipótese válida da porcentagem de moléculas de cada composto que está realmente ionizado.⁹⁶ Recentemente, o software CODESSA⁹⁷ foi apresentado com potencial para o cálculo do RF para vários compostos utilizando-se o detector MS, no entanto, o valor de RF calculado experimentalmente ainda permanece mais confiável. Michailof *et al.*⁹³ apresentam método de quantificação de amostras de bio-óleo, por GCxGC/TOFMS, usando os valores de RF calculados experimentalmente, segundo **Equação 1**, para 39 compostos padrões. Os autores utilizaram como padrão interno o fenol-d6. Os valores de RF calculados experimentalmente foram expandidos para demais compostos presentes na amostra, para os quais, não havia padrões. Tal abordagem possibilitou a quantificação de até 38% da massa das amostras de bio-óleo. O mesmo método foi aplicado com sucesso por Kalogiannis *et al.*⁹⁸ para amostras de bio-óleos provenientes da pirólise de lignina, chegando-se à quantificação de até 99,8% da fração orgânica das amostras.

Como já mencionado, o método de calibração interna também pode ser empregado através da construção de curvas de calibração, as quais são plotadas em um gráfico da área ou volume ($V_{\text{pad}}/V_{\text{IS}}$) em função da concentração (C_{pad}), sendo a concentração do analito na amostra calculada através da equação da reta e expressa em termos de massa/massa (como exemplo, mg g^{-1}). Recentemente, Silva *et al.*⁴¹ utilizaram o método de calibração interna, através de curvas analíticas, para quantificação de bio-óleos por GC×GC/TOFMS. Os autores construíram curvas analíticas para padrões de hidrocarbonetos e compostos oxigenados, utilizando hidrocarboneto deuterado como padrão interno, tais curvas foram empregadas para cálculo da concentração dos compostos presentes em três bio-óleos de biomassa lignocelulósica, oriundos da pirólise térmica, catalítica e posterior processo de desidrogenação, esse método de quantificação, devidamente validado através de figuras de mérito, apresentou açúcares, furanos e álcoois como compostos majoritários, nos três bio-óleos, respectivamente.

A **Figura 5**, apresenta um esquema dos métodos quantitativos por GC×GC estudados na literatura para a análise de amostras de bio-óleo.

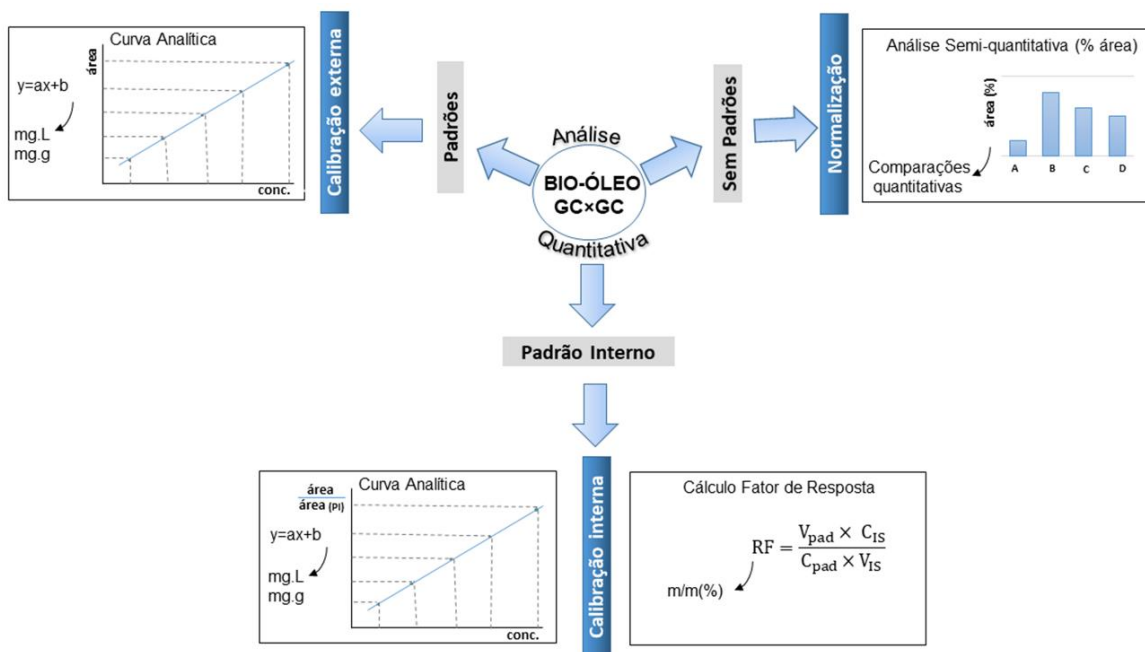


Figura 5. Esquemas dos métodos quantitativos por GC×GC estudados na literatura para a quantificação do bio-óleo.

Cabe destacar que, todos os métodos de quantificação utilizados para amostras de bio-óleo descritos na literatura científica fazem uso de curvas analíticas e/ou misturas de calibração preparadas a partir da diluição de padrões diretamente em solvente, sendo diclorometano, o solvente mais utilizado. No entanto, o bio-óleo é altamente complexo e consiste em numerosos compostos com propriedades químicas e físicas diferentes, incluindo compostos com alta polaridade, acidez e compostos não voláteis, os quais são constituintes da matriz.

2.5.4 Efeito de matriz e calibração combinada com matriz na análise do bio-óleo por GC

Os componentes da matriz em uma análise por cromatografia gasosa podem aumentar ou suprimir a resposta analítica, resultando em imprecisão dos resultados quantitativos, fenômeno conhecido como efeito de matriz.^{99,100} A origem do efeito matriz na análise por cromatografia gasosa tem sido atribuída principalmente ao bloqueio dos sítios ativos por componentes da matriz durante o transporte de analitos do injetor ao detector. Quando soluções de calibração preparadas em solvente são utilizadas, os padrões podem vir a se ligar aos sítios ativos, principalmente grupos silanóis livres. Em contraste, durante a análise da amostra, os componentes da matriz que coexistem com os analitos geralmente se acumulam no *liner* do injetor e/ou na parte frontal da coluna, impedindo a interação entre os sítios ativos e os analitos. Tal redução no número de sítios ativos, devido à presença da matriz, acarreta no aumento do sinal analítico quando comparado à análise de padrões dissolvidos diretamente em solvente.¹⁰¹ A **Figura 6**, apresenta esquema do efeito de matriz na análise por GC, com resultante aprimoramento do sinal analítico.

A estratégia mais eficaz para reduzir o efeito de matriz em análises quantitativas é sua compensação através do método de calibração compatibilizada com a matriz, o qual equaliza o sinal dos compostos padrões com o da amostra. Tal método de calibração baseia-se no preparo das misturas de calibração através da adição dos padrões em extrato da matriz, ao invés de solvente, fazendo-se assim, necessário uma matriz em branco para cada tipo de amostra.^{102,103} Adicionalmente, a calibração compatibilizada com a matriz pode-se realizar na presença de um composto padrão interno, sendo, assim, denominada calibração interna.

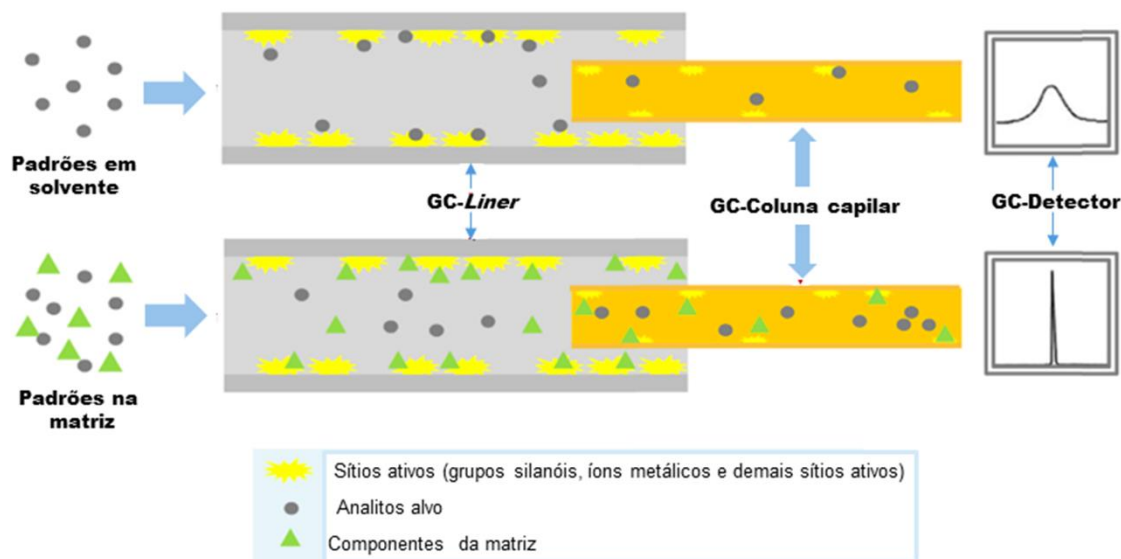


Figura 6. Esquema do efeito de matriz em análise por GC, com aprimoramento do sinal analítico. Adaptado da fonte Rahmana *et al.*¹⁰²

No campo da análise do bio-óleo, apesar dos avanços consideráveis na elucidação de sua composição que ocorreram nos últimos anos, não há estudos de nosso conhecimento, que mostrem a preparação de uma matriz em branco, bem como a calibração compatibilizada com a matriz para a quantificação dessa amostra.

2.6 MOTIVAÇÃO E PLANO DE TRABALHO

Considerando-se o exposto, este trabalho teve como motivação a importância da utilização da grande variedade de biomassas disponíveis no Brasil, para obtenção de bio-óleo via pirólise, destacando a utilização da casca de arroz, a qual representa um grave problema ambiental no nosso estado. Nesse contexto, apresenta-se a relevância de métodos simples e rápidos que permitam avaliar o potencial de utilização dessas biomassas, para obtenção de bio-óleo, aliado ao fato da necessidade de métodos cromatográficos qualitativos e quantitativos que apresentem a caracterização detalhada e confiável das amostras de bio-óleo, visando normativas para essa matriz.

Para melhor entendimento, o plano de trabalho da presente tese foi dividido em em quatro capítulos.

Capítulo III: Diferenciação de biomassas através da sua composição de bio-óleo usando análise por FTIR em conjunto com PCA;

Capítulo IV: Análise quantitativa de fases aquosas de bio-óleos por cromatografia líquida bidimensional abrangente;

Capítulo V: Produção de bio-óleo oriundo da pirólise da casca de arroz e sua caracterização cromatográfica detalhada por HPLC/DAD e GC×GC/qMS;

Capítulo VI: Compensação de efeitos da matriz na análise quantitativa de bio-óleo.

Cada um dos referidos capítulos compreende a apresentação da metodologia proposta, a discussão dos principais resultados e finalmente as conclusões, destacando os aspectos relevantes de cada trabalho.

Nos **Capítulos III e IV** estuda-se a pirólise de quinze amostras de diferentes biomassas brasileiras e procura-se diferenciá-las através de métodos de análise multivariada e de técnicas analíticas de elevada resolução, tal como a LC×LC. O **Capítulo III** descreve o desenvolvimento de método simples, rápido e de baixo custo utilizando FTIR e PCA que permita avaliar a composição da biomassa e assim prever a composição do bio-óleo obtido da pirólise dessa biomassa anteriormente ao processo de pirólise. Nessa etapa, a composição do bio-óleo gerado nas quinze diferentes biomassas brasileiras é analisada por GC/qMS. No **Capítulo IV** otimiza-se método de separação e desenvolve-se pela primeira vez um método quantitativo por LC×LC a fim de obter-se a detalhada caracterização das fases aquosas dos bio-óleos.

Nos **Capítulo V e VI**, estuda-se detalhadamente a pirólise da casca de arroz e desenvolve-se métodos analíticos quantitativos para a análise do bio-óleo empregando a técnica de GC×GC/qMS. No **Capítulo V** determina-se as melhores condições do processo de pirólise em relação ao rendimento de bio-óleo da casca de arroz e desenvolve-se métodos cromatográficos utilizando-se a HPLC/DAD e GC×GC/qMS para a caracterização abrangente (qualitativa e quantitativa) do bio-óleo obtido. Nesse capítulo a análise quantitativa, através da GC×GC, baseia-se no cálculo do RF. No **Capítulo VI** avalia-se a extensão do efeito de matriz na análise quantitativa do bio-óleo, bem como, apresenta-se um método de obtenção do branco de matriz do bio-óleo. Finalmente, a fim de compensar o efeito de matrix na análise quantitativa do bio-óleo, emprega-se, pela primeira vez, curva de calibração compatibilizada com a matriz.

A **Figura 7**, descreve um fluxograma geral do plano de trabalho seguido na presente tese.

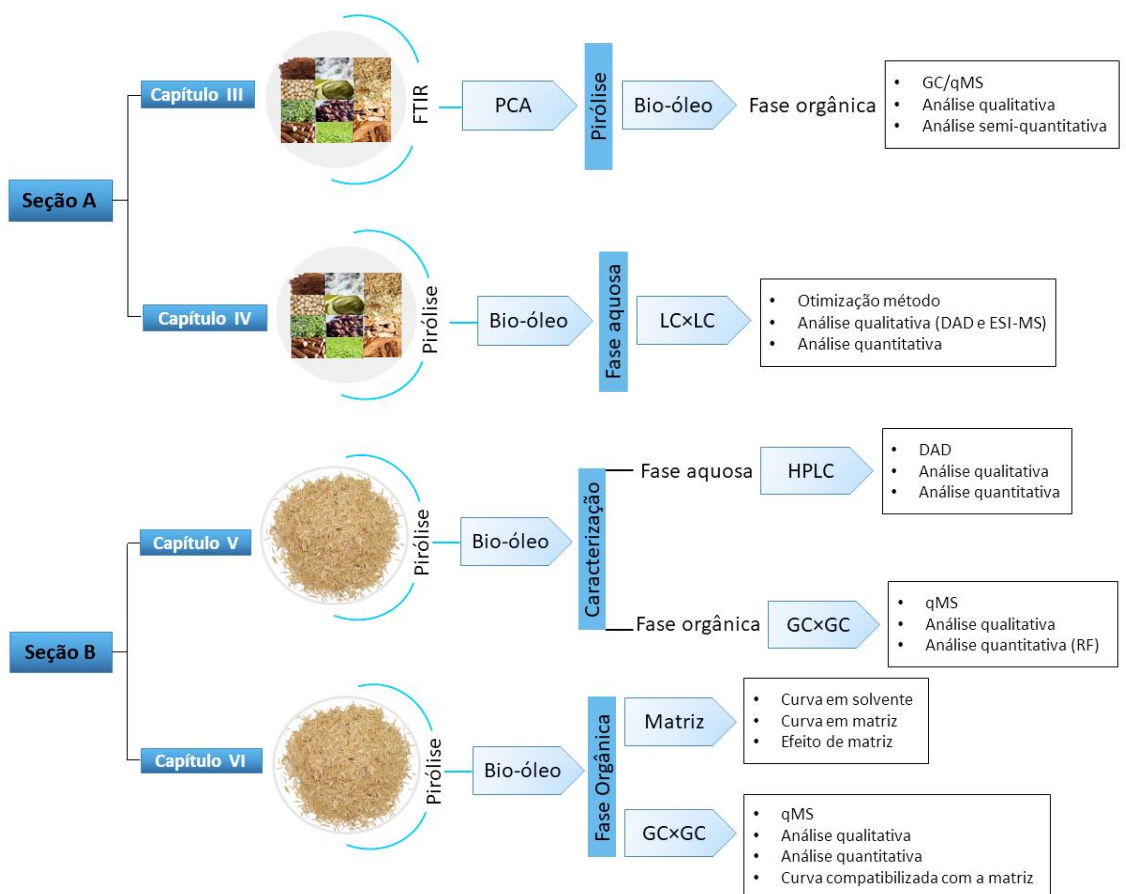


Figura 7. Fluxograma do plano de trabalho seguido na presente tese.

2.6.1 Trabalhos realizados até o momento

O Laboratório de Química Analítica, Ambiental e Oleoquímica (LAAO) no qual esta tese foi desenvolvida é referencia em caracterização de amostras de bio-óleo no Brasil. Técnicas de cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional têm sido empregadas para a caracterização detalhada de amostras de bio-óleo oriundas da pirólise de diversas fontes de biomassas brasileiras.

Almeida¹⁰⁴ e Georges¹⁰⁵ desenvolveram os primeiros trabalhos no âmbito de produção e caracterização de amostras de bio-óleo. Almeida¹⁰⁴ estudou a casca de arroz, otimizando o processo de pirólise para gerar o maior rendimento de bio-óleo, e caracterizou por GC/qMS o material volátil e o bio-óleo gerados no processo.

Ambas as amostras apresentaram elevada quantidade de compostos oxigenados, dentre os quais, fenóis, cetonas e ácidos carboxílicos. Georges¹⁰⁵ otimizou o processo de pirólise para a cana-de-açúcar, caracterizando o material volátil e o bio-óleo através da GC/qMS e GCxGC/TOFMS. A composição química de ambas as amostras foi similar, as quais apresentaram principalmente compostos oxigenados e alguns hidrocarbonetos.

Moraes¹⁰⁶ desenvolveu metodologias analíticas empregando a GCxGC acoplada ao detector TOFMS e FID visando a caracterização detalhada de amostras de bio-óleo oriundas da pirólise de resíduos agroindustriais gerados no estado do Rio Grande do Sul (bagaço de laranja, serragem de eucalipto, casca de arroz, palha de cana-de-açúcar, caroço de pêssigo) e resíduo de capim elefante. Neste trabalho, o potencial da GCxGC frente GC monodimensional também foi demonstrado. Os compostos caracterizados nas amostras de bio-óleo corresponderam principalmente a fenóis e cetonas. Faccini¹⁰⁷ estudou os resíduos gerados por uma indústria de processamento de celulose. O produto gasoso (gases não condensáveis) e o produto líquido (bio-óleo) foram caracterizados mediante as técnicas de GC/qMS e GCxGC/TOFMS. As amostras de bio-óleo demonstraram diferenças em suas composições, entretanto, todas as amostras apresentaram compostos de elevado valor agregado, tais como fenóis e hidrocarbonetos. Onorevoli¹⁰⁸, avaliou as potencialidades da torta residual gerada das extrações da semente de crambe como fonte de biomassa para obtenção de bio-óleo via pirólise. A caracterização do bio-óleo deu-se mediante a técnica de GCxGC/TOFMS, apresentando ácidos graxos, hidrocarbonetos, compostos oxigenados e compostos nitrogenados. Migliorini¹⁰⁹ baseou seu estudo na caracterização da fase orgânica e aquosa de bio-óleos oriundos de palha de cana-de-açúcar e caroço de pêssigo. Elevado percentual de compostos fenólicos, cetonas, aldeídos foram observados nas amostras através da análise por GCxGC/TOFMS.

Maciel¹¹⁰ e Barbará¹¹¹ dedicaram-se à caracterização da fase aquosa do bio-óleo oriundo da palha de cana-de-açúcar por GCxGC/TOFMS e GC/qMS. Devido ao uso da cromatografia em fase gasosa, as autoras necessitaram empregar o processo de extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) e a extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) anterior a análise. Em termos da análise semi-quantitativa, as amostras apresentaram elevado percentual de compostos fenólicos.

Nos trabalhos acima citados, procedeu-se a análise qualitativa das amostras mediante comparação espectral e estruturação cromatográfica.

Por sua vez, Lazzari¹¹², Schena¹¹³, Torri¹¹⁴, Primaz¹¹⁵ e Dal molin¹¹⁶, empregaram o sistema de índice de retenção por programação de temperatura (LTPRI, do inglês *linear temperature programmed retention index*), para a análise qualitativa por GC×GC/TOFMS de amostras de bio-óleo. Tal sistema proporcionou maior confiabilidade na identificação tentativa dos compostos. Lazzari¹¹² produziu e caracterizou bio-óleos oriundos do endocarpo e da amêndoa do caroço de manga, tentativamente identificando 108 e 120 compostos, respectivamente, sendo o bio-óleo do endocarpo caracterizado por elevada quantidade de fenóis, enquanto que o bio-óleo de amêndoa caracterizado por elevada quantidade de ácidos carboxílicos. Schena¹¹³ estudou o bio-óleo bruto da casca do coco, bem como frações oriundas de extrações ácidas. Por GC×GC/TOFMS, observou elevada quantidade de fenóis no bio-óleo bruto da fibra de coco. Torri¹¹⁴ diferenciou por GC×GC/TOFMS bio-óleos oriundos de pirólise rápida e intermediária de *Eucalyptus sp.* e *Picea abies* e avaliou a influência de catalisador na composição dos bio-óleos. Fenóis e cetonas foram os compostos majoritários nos bio-óleos, e elevado percentual de hidrocarbonetos poliaromáticos foram observados quando se utilizou catalisador no processo de pirólise. Primaz¹¹⁵ avaliou a influência da temperatura no rendimento e na composição do bio-óleo oriundo da borra de café. Através da análise por GC×GC/TOFMS, puderam ser tentativamente identificados pelo sistema de LTPRI 190 compostos, sendo o ácido palmítico (19%), ácido oleico (11%) e o ácido octadecanóico (10%) os compostos majoritários. Dal molin¹¹⁶ caracterizou a composição química de bio-óleos oriundos da pirólise rápida de serragem de lignocel e de bagaço de palha de cana-de-açúcar e avaliou a influência de catalisador sobre a composição dos produtos de pirólise do bagaço de cana-de-açúcar. O uso da GC×GC/TOFMS aliado ao sistema de LTPRI e gráficos de dispersão permitiu uma caracterização abrangente das amostras de bio-óleo. Ambos bio-óleos apresentaram uma grande variedade de compostos, principalmente hidrocarbonetos e compostos oxigenados como fenóis e cetonas. Além disso, verificou-se a eficiência do uso do catalisador, o qual proporcionou aumento do teor de hidrocarbonetos e diminuição no teor de compostos oxigenados.

Da Cunha¹¹⁷, descreveu pela primeira vez a aplicação da técnica de GC×GC/qMS para a caracterização de amostra de bio-óleo. Nesse trabalho, a autora, estudou bio-óleo de palha de cana-de-açúcar, além disso, empregou método de fracionamento pressurizado visando diminuir a complexidade da amostra de bio-óleo. Foram tentativamente identificados 166 compostos no bio-óleo de palha de cana-de-açúcar, com o auxílio do sistema de LTPRI, sendo a classe química dos fenóis e cetonas

as majoritárias. Schneider¹¹⁸ também reportou o uso da GC×GC/qMS para a caracterização do bio-óleo de serragem, tentativamente identificando 130 compostos. Recentemente, Polidoro¹¹⁹ empregou a GC×GC/qMS para a caracterização do bio-óleo oriundo da pirólise do resíduo do torrador de café (*silverskin*). Através da análise cromatográfica, foram tentativamente identificados 228 compostos, sendo as classes majoritárias em termos de volume percentual, os fenóis seguidos pelos compostos nitrogenados. Nesse trabalho, o autor também propôs a otimização do processo de pirólise através da RSM.

Como observado, diversas fontes de biomassas já foram estudadas visando a obtenção de bio-óleo, e, através da caracterização dessas amostras observa-se diferenças entre suas composições, as quais derivam principalmente da composição da biomassa original. Tal fato, impulsionou o estudo descrito no **Capítulo III** desta tese - desenvolvimento de um método rápido e de baixo custo, através do FTIR em conjunto com a análise multivariada, que permita avaliar a composição da biomassa para prever a composição do bio-óleo obtido por pirólise dessa biomassa, facilitando o estudo da viabilidade de diferentes fontes de biomassa para obtenção de bio-óleo, bem como, a escolha de processos de *upgrade* os quais se façam necessários. Estudos anteriores, os quais estão detalhados na **seção 2.2**, também demonstraram a aplicação do PCA em dados de FTIR para distinguir amostras de biomassa, entretanto, este é o primeiro estudo de nosso conhecimento no qual espectros de FTIR associados ao PCA foram empregados para classificar a biomassa através de sua composição de bio-óleo.^{13,14,57,58,59}

Outro ponto a destacar é a adequação da técnica de GC×GC para a caracterização da fase orgânica do bio-óleo. Além dos trabalhos desenvolvidos no LAAO-UFRGS, a literatura apresenta diversos estudos bem-sucedidos empregando técnicas de GC×GC para a caracterização de bio-óleos. No entanto, o estado da arte para a completa caracterização de amostras de bio-óleo encontra-se no desenvolvimento de métodos quantitativos facilmente aplicáveis e de elevada confiabilidade para a quantificação precisa dessa matriz.³⁸ Todos os trabalhos já desenvolvidos no LAAO-UFRGS, empregaram uma abordagem semi-quantitativa através do método de normalização externa para a análise das amostras de bio-óleo. Neste contexto, na presente tese (**Cap. V e VI**) desenvolvem-se, por GC×GC/qMS, métodos quantitativos de análise de amostra de bio-óleo. Duas abordagens quantitativas foram utilizadas: uma empregando fator de resposta e outra a curva de calibração compatibilizada com a matriz, ambas baseadas no método de calibração

interna. Esta é a primeira vez na qual a quantificação de amostras de bio-óleo é estudada por GC×GC/qMS, bem como, o método de calibração compatibilizada com a matriz para compensar o efeito de matriz em amostras de bio-óleo.

Técnicas de cromatografia líquida também tem sido empregada para a caracterização da fase aquosa de bio-óleos. Tomazzini⁸⁵ descreve a aplicação da LC×LC/DAD-MS e nano-LC para a caracterização de amostras de fase aquosa oriundas de três diferentes biomassas (fibra de coco, bagaço e palha de cana-de-açúcar). O emprego da técnica de LC permitiu a injeção direta das amostras, sem processos de extrações. Foram tentativamente identificados 23 compostos nas amostras, sendo a maioria de elevada polaridade, fenóis, cetonas, furanos, álcoois e aldeídos. Recentemente, Scapin¹²⁰ também empregou a técnica de LC (especificamente a HPLC-DAD) para caracterizar amostra de fase aquosa oriunda da pirólise de casca de arroz. O método proposto permitiu identificar 11 compostos, principalmente aldeídos e cetonas.

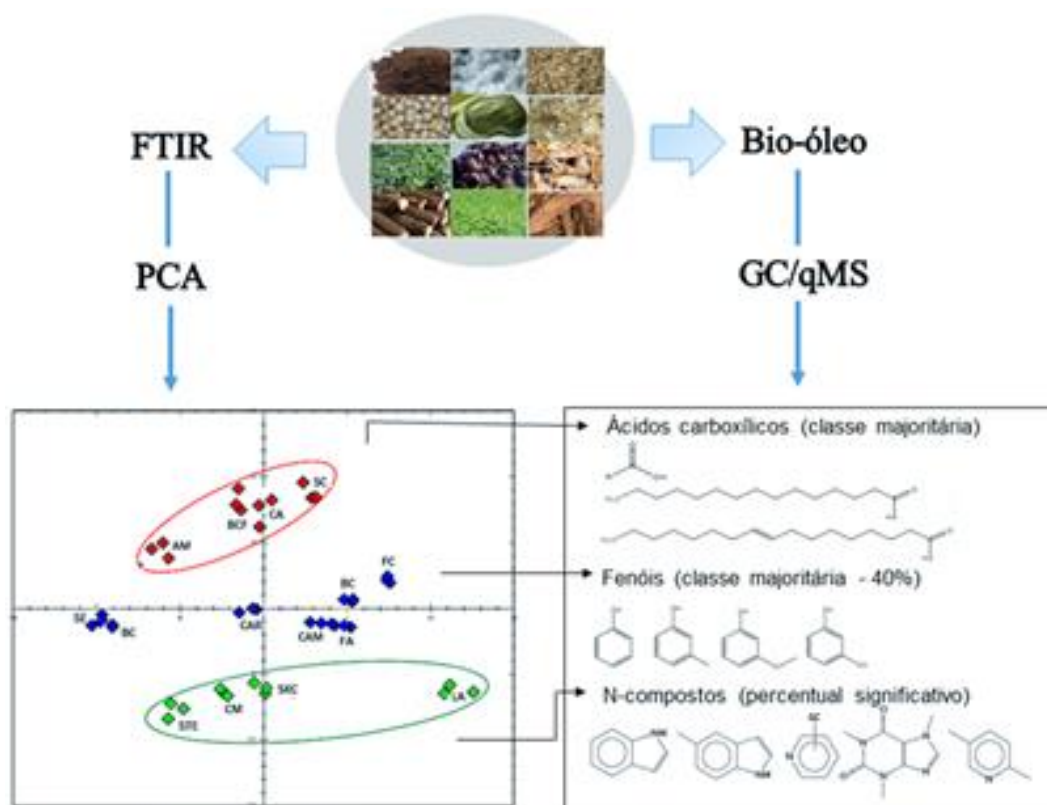
O emprego da LC×LC é um avanço para a caracterização de amostras de fase aquosa, pois na literatura, até o momento, poucos estudos apresentam essa abordagem, sendo que, são baseados somente na caracterização qualitativa de bio-óleos oriundos de biomassas lignocelulósicas. Neste contexto, a LC×LC é empregada no **Capítulo IV** da presente tese, para a caracterização de treze amostras de fase aquosa, e pela primeira vez, desenvolve-se método quantitativo de análise para esse tipo de matriz.

A partir dos resultados obtidos na presente tese quatro artigos foram publicados/submetidos em periódicos internacionais de elevado fator de impacto, incluindo o *Analytical Chemistry* e *Journal of Chromatography A*, os quais são devidamente apresentados no decorrer da tese. Além dos artigos publicados, parte deste trabalho foi agraciado com o prêmio de melhor pôster na *XVIII Reunión de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas afines - SECyTA, 2018*, realizado de 2 a 4 de Outubro em Granada (Espanha), com o trabalho intitulado – *Production and comprehensive characterization by LC×LC/DAD-MS of aqueous phases from pyrolysis of different biomasses* de autoria de Eliane Lazzari, Kátia Arena, Elina Bastos Caramão e Miguel Herrero.

Dois estágios no exterior, ambos com duração de seis meses, foram realizados durante o período de doutorado. O primeiro realizado na Espanha no *Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) da Universidad Autónoma de Madrid* (Madrid, Espanha) sob orientação do Prof. Dr. Miguel Herrero, no qual trabalhou-

se com técnica de LCxLC em amostras de bio-óleo, tais resultados estão descritos no **Capítulo IV**. O segundo estágio foi realizado no *Organic and Biological Analytical Chemistry Group* (OBiAChem) na *Université de Liège* (Wallonia, Bélgica) sob orientação do Prof. Dr. Jean-François Focant e Dr. Flavio A. Franchina, no qual trabalhou-se com um novo sistema de GC-QQQ/MS para a medição confirmatória de PCDD/Fs and (N)DL-PCBs em alimentos seguindo Regulamento da União Européia. Os artigos resultantes deste estágio no exterior estão descritos no **Anexo 5**.

CAPÍTULO III



DIFERENCIAÇÃO DE BIOMASSAS ATRAVÉS DA SUA COMPOSIÇÃO DE BIO-ÓLEO USANDO ANÁLISE POR FTIR EM CONJUNTO COM PCA

3.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1.1 Materiais e reagentes

Os reagentes utilizados foram diclorometano (previamente destilados) e sulfato de sódio anidro (p.a) adquiridos da JT Baker (Radnor, Pensilvania, EUA) e da Merck (Darmstadt, Hessen, Alemanha), respectivamente. Os gases, He (99,999%) utilizado nas análises cromatográficas e N₂ (99,95%) utilizado no processo de pirólise foram adquiridos da Linde Gases (Canoas, RS, Brasil). A coluna cromatográfica capilar utilizada na análise por GC/qMS foi adquirida da Agilent Technologies J & W Scientific (Palo Alto, CA, EUA)

3.1.2 Amostras de biomassa

Quinze amostras de biomassa foram investigadas nesta parte do estudo. Dentre as biomassas avaliadas, doze são resíduos agroindustriais: amêndoa do caroço de manga (AM); fibra de coco (FC); folhas (coroa) de abacaxi (FA); bagaço de cana-de-açúcar (BC); caroço de algodão (CA); *silverskin* de café (SKC); casca de arroz (CAR); serragem de eucalipto (SE); caroço de pêssago (CP); borra de café (BCF); casca de amendoim (CAM) e casca de mandioca (CM). Esses resíduos representam um considerável problema ambiental no Brasil, devido às grandes quantidades geradas anualmente, conforme já mencionado. Demais biomassas avaliadas foram: biomassa aquática (comumente conhecida como lentilha d'água) (LA), semente de crambe (SC) e torta residual de sementes de tabaco energético (STE). Algumas vantagens da utilização dessas biomassas para obtenção de bio-óleo são: lentilha d'água não compete com a agricultura para o uso da terra, a semente de crambe é uma interessante fonte de óleo para obtenção de biodiesel e a torta da semente do tabaco energético é um resíduo gerado posteriormente ao processo de obtenção de biodiesel, o qual não tem uso nobre.^{121,122} Detalhes das biomassas investigadas estão descritos na **Tabela I**.

A grande diversidade de biomassas avaliadas permite a representação das diferentes fontes de biomassa disponíveis no Brasil, as quais apresentam composição química distinta e exibem potencial para produção de bio-óleo via pirólise. A maioria dessas biomassas já foram estudadas em nosso grupo de pesquisa, um dos motivos também, da escolha das respectivas biomassas, como é o caso da AM¹¹², SC¹⁰⁸, FC¹¹³, BCF¹¹⁵, CP^{106,109}, CAR^{104,120}, SE^{107,114}, STE¹²³, SKC¹¹⁹ e BC^{117,118}.

Tabela I. Detalhes das quinze biomassas investigadas.

Biomassas	Amostras (ID)	Adquirido por local / indústria^a
Amêndoa do caroço de manga	AM	Indústria de alimentos, Dourados, MS.
Bagaço de cana-de-açúcar	BC	Indústria de alimentos, Porto Alegre, RS.
Borra de café	BCF	Mercado local, Porto Alegre, RS.
Caroço de algodão	CA	Fazenda Planalto, Costa Rica, MS.
Casca de amendoim	CAM	Mercado local, Porto Alegre, RS.
Casca de arroz	CAR	Indústria alimentar, Pelotas, RS.
Casca de mandioca	CM	Indústria de alimentos, Dourados, MS.
Caroço de pêssego	CP	Schrann Industria de alimentos, Pelotas, RS.
Folhas de abacaxi (coroa)	FA	Mercado local, Porto Alegre, RS.
Fibra de coco	FC	Embrapa, Aracaju, SE.
Biomassa aquática (lentilha d'água)	LA	Pelotas, RS.
Semente de Crambe	SC	UERGS, Porto Alegre, RS.
Serragem de Eucalipto	SE	Indústria de Celulose CMPC, Guaíba, RS.
<i>Silverskin</i> do café	SKC	Indústria Marata, Itaporanga D'Ajuda, SE.
Torta residual da semente do tabaco energético ^b	STE	UNISC, Vale do Rio Pardo, RS.

(a) diferentes regiões Brasileiras as quais demonstram elevada produção; (b) torta residual obtida pela extração das sementes do tabaco energético.

As amostras de biomassa foram moídas em moinhos de facas (MA340MF, Marconi, São Paulo) e através de peneiras, separadas em uma fração com tamanho de partícula entre 28-60 *mesh*. Posteriormente as amostras foram secas em estufa na temperatura de 105 °C durante 24 horas, para remoção da umidade.

3.1.3 Análise das amostras de biomassa por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de infravermelho das amostras de biomassa foram obtidos em um espectrômetro 400 IR (PerkinElmer, EUA) usando um acessório de amostragem de reflexão total atenuada universal (ATR, do inglês *attenuated total reflection*). A absorvância foi medida na faixa espectral de 700 a 4000 cm^{-1} . As amostras de biomassa trituradas e previamente secas foram analisadas diretamente no equipamento, sem a necessidade de etapa de preparação convencionais as técnicas de espectroscopia no infravermelho. Os espectros foram adquiridos em ordem aleatória, em triplicata, com 24 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

3.1.4 Processo de pirólise

As quinze amostras de biomassa foram submetidas ao processo de pirólise em um forno vertical contendo um reator de leito fixo de quartzo, ambos feitos no Instituto de Física da UFRGS. O reator de quartzo foi aquecido por um forno elétrico e utilizou-se N_2 como gás de arraste dos vapores de pirólise. Os vapores de pirólise foram resfriados através de condensador, utilizando-se uma mistura de etilenoglicol e água (1:1) a $-10\text{ }^\circ\text{C}$. Após cada pirólise, o aparelho foi limpo com diclorometano e seco com uma corrente de ar quente. Um diagrama esquemático do sistema de pirólise utilizado está detalhadamente descrito em estudo prévio⁷³ e ilustrado na **Figura 8**.

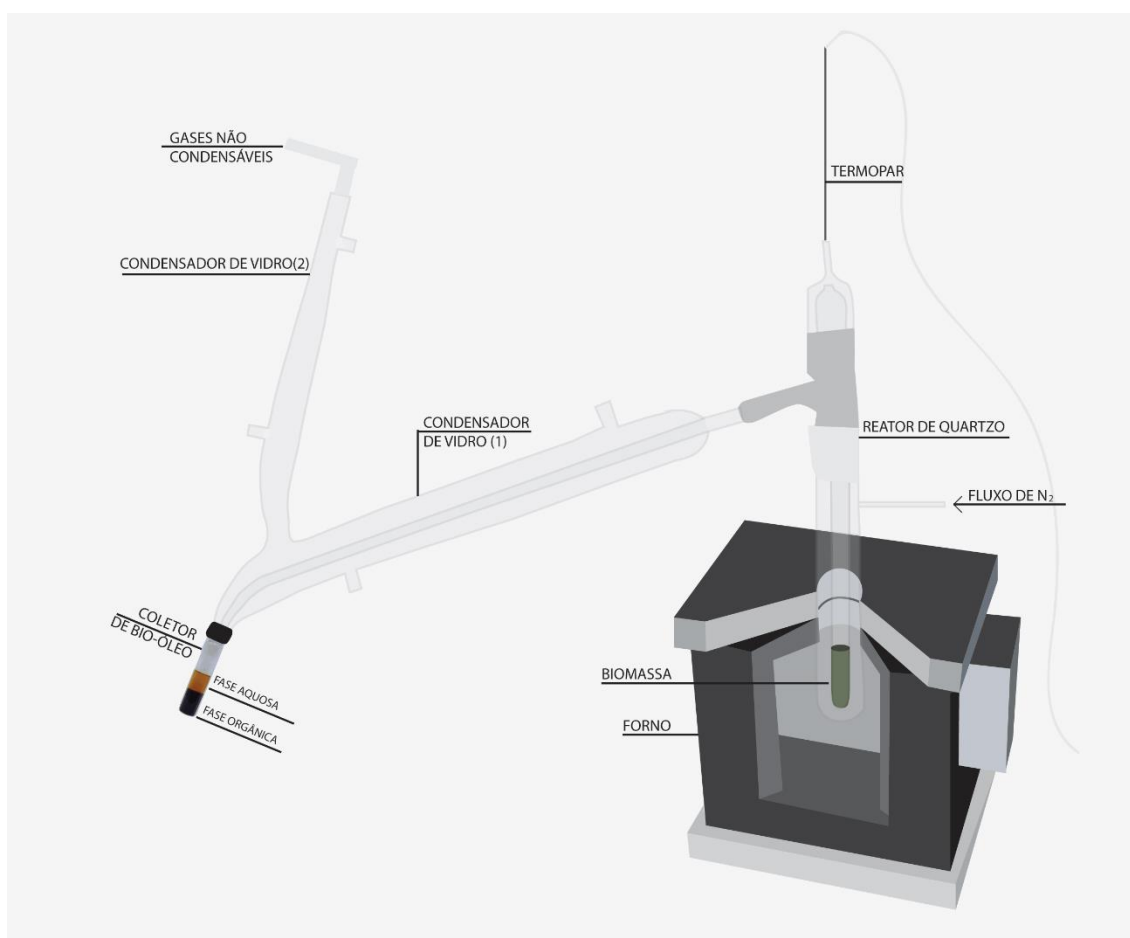


Figura 8. Diagrama esquemático do reator de pirólise.

As condições do processo de pirólise foram baseadas em estudos prévios e são como seguem^{31,39,73,122,124,125}: 7 g de amostra (28-60 *mesh*), taxa de aquecimento de $100\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, fluxo de N_2 de 100 mL min^{-1} , temperatura final de $700\text{ }^\circ\text{C}$ e tempo de residência na temperatura final de 10 min (controlado pelo término dos vapores de

pirólise). A elevada temperatura final de pirólise (700 °C) foi definida visando garantir a degradação de todos constituintes da biomassa (lignina, celulose, hemicelulose e ácidos graxos).

O rendimento em massa dos produtos de pirólise foi determinado pela pesagem dos produtos sólidos (*biochar*) e dos produtos líquidos (bio-óleo bruto) com referência ao peso inicial das amostras de biomassa. O rendimento dos produtos não condensáveis (gases + perdas) foi calculado pela diferença entre o peso inicial da biomassa e a soma dos produtos líquidos (bio-óleo bruto) e produtos sólidos.

A fração orgânica foi separada da água presente no bio-óleo bruto através de LLE usando 5 porções de 2 mL de diclorometano.

3.1.5 Análises cromatográficas

As amostras de bio-óleo (após o processo de remoção da água por LLE) foram dissolvidas em diclorometano a uma concentração de 10 000 mg L⁻¹ e analisadas por GC/qMS.

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema GC/qMS (Shimadzu QP 2010 plus, Shimadzu, Japão), equipado com um injetor automático AOC20 (*split/splitless*). A separação cromatográfica procedeu-se em coluna analítica de baixa polaridade DB-5 com as dimensões de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase estacionária. As condições utilizadas no GC seguem: temperatura do injetor (*split/splitless*) 280 °C; temperatura inicial do forno em 50 °C permanecendo por 4 min e aquecimento com uma taxa de 4 °C min⁻¹ até 280 °C, permanecendo por 10 min; injeção de 1 µL da solução de 10 000 mg L⁻¹ em diclorometano das amostras de bio-óleo, usando o modo *splitless*. Hélio foi utilizado como gás de arraste com um fluxo de 1 mL min⁻¹. As condições utilizadas para o qMS foram: temperatura de interface e fonte de íons mantidas a 280 °C, modo varredura *full scan* com faixa de massas de 45 a 400 Da. Todos os dados foram processados pelo software GCMS *solution* 2.6.1 (Shimadzu, Japão).

Para a identificação tentativa dos compostos utilizou-se: comparação entre os espectros de massa obtidos experimentalmente com os do banco de dados da biblioteca NIST-05 e Wiley (assumindo um mínimo de 70% de similaridade espectral), ordem de eluição e índices de retenção calculados segundo Van den Dool & Kratz¹²⁶. Para o cálculo de LTPRI (realizado diretamente pelo software do equipamento), utilizou-se uma mistura padrão de *n*-alcanos (C₆-C₃₀) analisada nas mesmas condições empregadas para as amostras. Os valores obtidos foram comparados aos índices encontrados na

base de dados da NIST (<http://webbook.nist.gov/>). Diferença máxima de 15 unidades, entre os valores do LTPRI experimental e da literatura, foi considerada para a identificação tentativa dos compostos.

Procedeu-se à análise semi-quantitativa utilizando-se o método de normalização externa desconsiderando-se fatores de resposta. Essa não é uma análise quantitativa completa, mas pode indicar uma distribuição comparativa da quantidade de cada composto em cada amostra. Para esta análise semi-quantitativa utilizou-se a **Equação 2** abaixo.

$$\text{área (\%)} = \frac{a_i}{a_t} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: a_i corresponde a área do composto tentativamente identificado e a_t corresponde à área total dos picos cromatográficos.

3.1.6 Abordagem multivariada

A análise de PCA foi realizada nos dados contínuos e discretos objetivando investigar as semelhanças e diferenças entre as amostras de biomassa. Os softwares Chemostat¹²⁷ e Matlab (Mathworks Inc, EUA) foram utilizados para análise multivariada.

Para os dados contínuos (dados de FTIR) a correção da variação normal padrão (SNV, do inglês *standard normal variate*) foi aplicada aos espectros para remoção de variações verticais, antes da análise multivariada. Posteriormente os espectros foram centrados na média (pré-processamento utilizado para dados contínuos caso dos dados de FTIR) e submetidos ao PCA. A análise de PCA foi realizada nos espectros pré-processados, empregando o espectro total 700 - 4000 cm^{-1} .

Para os dados discretos (dados de rendimento dos produtos de pirólise e área percentual - análise semi-quantitativa) procedeu-se o pré-processamento dos dados através do autoescalamamento (pré-processamento utilizado para dados discretos), e posteriormente a análise de PCA.

3.1.7 Fluxograma do procedimento experimental

A **Figura 9** apresenta um fluxograma do procedimento experimental empregado neste capítulo.

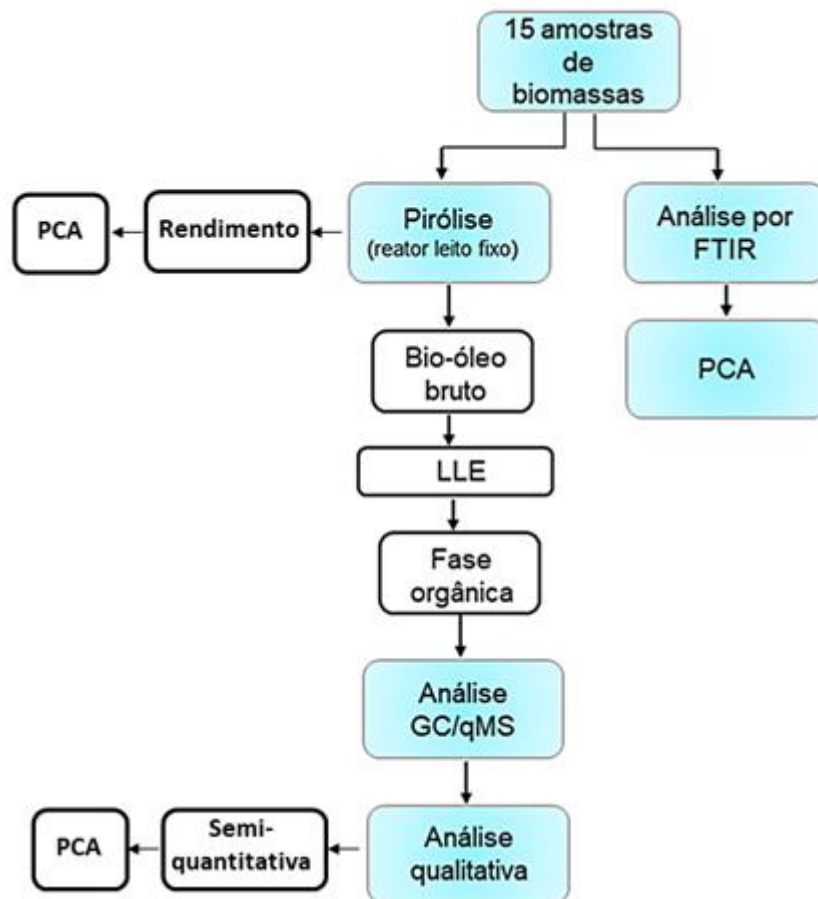


Figura 9. Fluxograma do procedimento experimental empregado no **Capítulo III**.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.2.1 Análise das biomassas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A **Figura 10** apresenta os espectros de FTIR obtidos para as quinze amostras de biomassa. Nesta figura, são destacadas as principais bandas de absorção e na **Tabela II** estão descritos os grupos funcionais atribuídos a cada uma das bandas.^{11,13,59}

Como observado na **Figura 10**, a maioria das bandas de absorção foram encontradas na região da "impressão digital da amostra" faixa entre 700 a 1800 cm^{-1} . Em geral, a vibração em 1745 cm^{-1} deve-se aos modos de estiramento C=O de ésteres livres. A banda larga em 1620 cm^{-1} é principalmente atribuída a amida (C=O).¹³ A banda de vibração em 1682 cm^{-1} deve-se ao estiramento do grupo C=O e tem sido associada à lignina.⁵⁹ As bandas em 1608, 1500 e 1313 cm^{-1} são atribuídas a vibrações dos anéis aromáticos presentes nas subunidades de lignina, e a banda em 1327 cm^{-1} (C-O) também está associada às absorções das subunidades da lignina. A vibração em 1235

cm^{-1} resulta dos modos de deformação OH/NH em proteínas.¹³ A banda em 1160 cm^{-1} é resultante do modo de vibração de estiramento assimétrico do grupo C-O-C atribuída a celulose e hemicelulose e a forte banda em 1032 cm^{-1} é atribuída a vibração de alongamento dos grupos C-O, C=C e C-C-O e tem sido associada a celulose, hemicelulose e lignina.¹¹ Tais bandas de absorção associadas a lignina já têm sido utilizadas com sucesso por Chen *et al.*⁵⁹ a fim de diferenciar amostras de madeira em *hardwood* e *softwood*, considerando seus distintos conteúdos de lignina.

Observa-se também na **Figura 10** algumas bandas na região de $2000\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$, dentre as quais, a banda larga em $3000\text{-}3600 \text{ cm}^{-1}$ indica vibração de alongamento do grupo OH e é relacionada a materiais celulósicos. As bandas estreitas em 2850 e 2924 cm^{-1} são relacionadas a vibração de estiramento do grupo CH_2 , simétrica e assimétrica, respectivamente.¹³

Em relação ao perfil espectral, embora algumas diferenças têm sido observadas, como o caso das pronunciadas bandas de absorção em 1745 , 2850 e 2924 cm^{-1} nas biomassas SC, CA e BCF, os espectros de FTIR contêm pequenas diferenças, entre as amostras, as quais não podem ser distinguidas visualmente e, portanto, uma abordagem quimiométrica torna-se necessária para a diferenciação dos dados de FTIR.

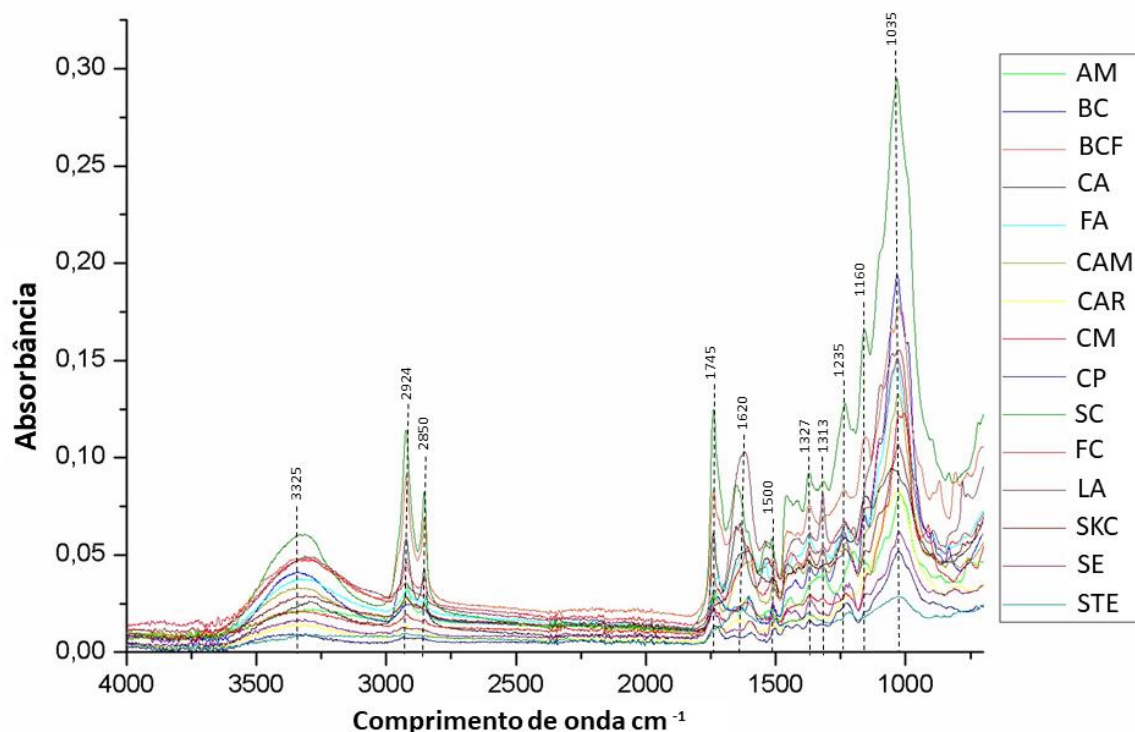


Figura 10. Espectros de FTIR obtidos para as amostras de biomassas com as principais bandas de absorção destacadas.

Tabela II. Principais bandas de absorção dos espectros de FTIR das biomassas.^{11,13,59}

Absorção	Bandas	Origem
1745 cm ⁻¹	C=O estiramento	Ésteres
1620 cm ⁻¹	HOH + amida (C=O)	água e amidas em proteínas
1682 cm ⁻¹	C=O estiramento	bandas da lignina
1608 - 1500 cm ⁻¹	C=C aromático	subunidades da lignina
1327 cm ⁻¹	(C-O)	subunidades da lignina
1235 cm ⁻¹	OH/NH deformação	proteínas
1160 cm ⁻¹	C-O-C estiramento	celulose e hemicelulose
1032 cm ⁻¹ (forte)	C-O, C-C-O alongamento	celulose, hemicelulose e lignina
3000 - 3600 cm ⁻¹	OH alongamento	materiais celulósicos e/ou água
2850 e 2924 cm ⁻¹	CH ₂ estiramento	bandas alifáticas

3.2.2 Processo de pirólise: rendimento dos produtos

A **Figura 11** apresenta em **(a)** os rendimentos dos produtos (*biochar*, bio-óleo bruto e gases) gerados na pirólise das quinze amostras de biomassa e **(b)** o gráfico da análise de PCA (PC1 *versus* PC2) dos respectivos dados de rendimento (dados discretos).

A fim de melhor visualizar as similaridades e diferenças entre as amostras de biomassas, de acordo com rendimento dos produtos de pirólise, procedeu-se a análise multivariada dos dados (PCA), utilizando-se para isso o software Chemostat. Como observado na **Figura 11b** o gráfico *biplot* (escores e pesos) da primeira e da segunda componentes principais, as quais em conjunto representam 100% da variabilidade total dos dados, proporciona diferenciar as amostras de biomassa, de acordo com o rendimento dos produtos de pirólise, em três grupos distintos (G1, G2 e G3).

Através da PC1, podemos observar a separação do grupo 1 (pontos em vermelho) do grupo 2 (pontos em azul). O G1 é formado pelas biomassas (BC, SE, BCF, CP e CA) e apresenta escore positivo na PC1, enquanto o G2 é formado pelas biomassas (FC, SC, AM, CM, FA, CAM, SKC, STE e LA) e apresenta escore negativo na PC1. Por outro lado, através da PC2 podemos observar a separação do grupo 3 (pontos em verde) dos demais grupos (G1 e G2). O G3 é formado somente por uma amostra de biomassa (CAR) e apresenta elevado escore negativo na PC2, enquanto o G2 e G3 apresentam escores próximo a zero na PC2. Além disso, nota-se pela PC2, uma tendência de separação das biomassas pertencentes ao G2, as biomassas SC,

FC, AM, CM e FA apresentam escore mais positivo, enquanto as biomassas CAM, SKC, STE e LA apresentam escore mais negativo, nessa componente principal.

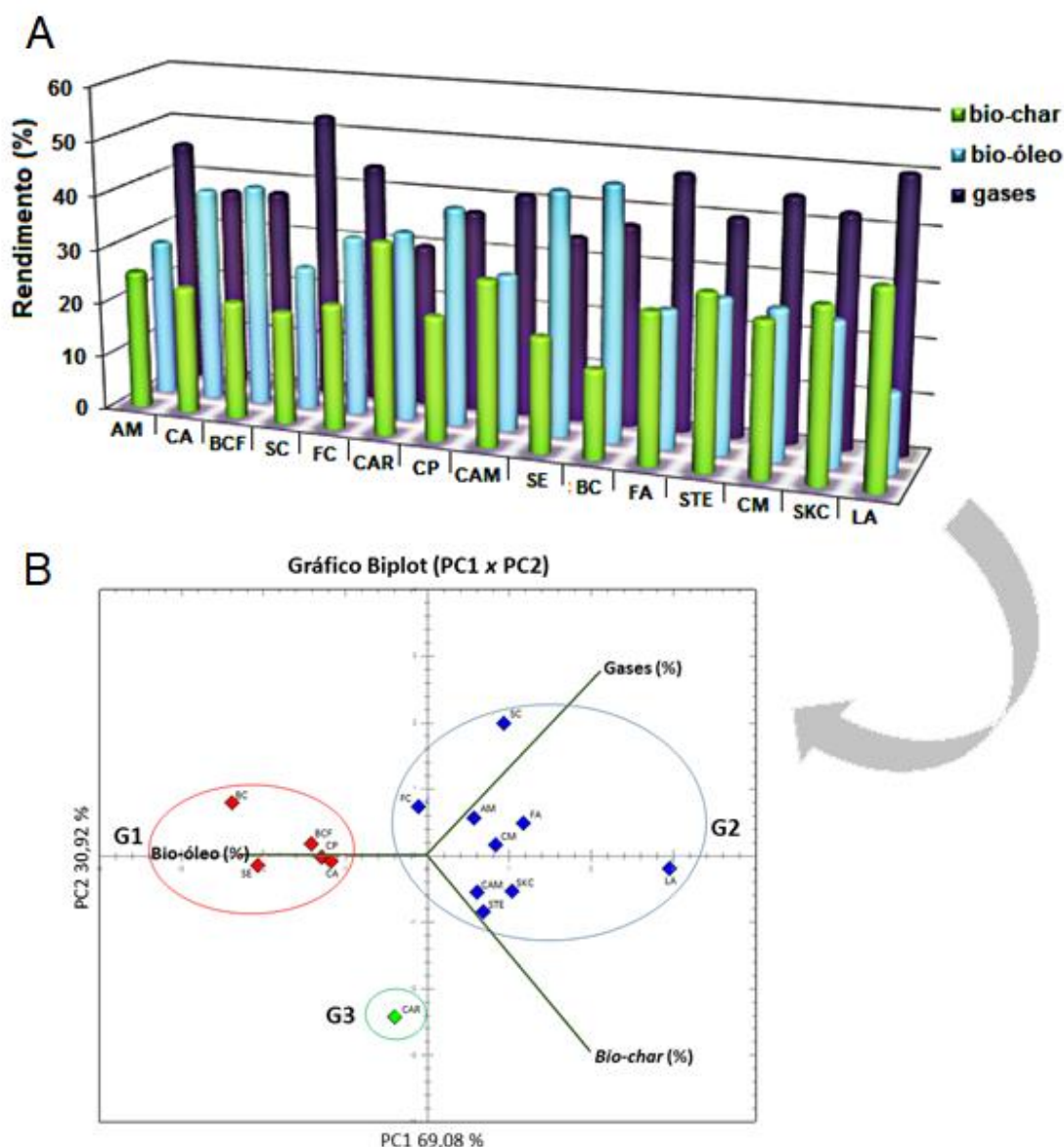


Figura 11. Rendimento dos produtos de pirólise: (a) distribuição dos rendimentos (%) dos produtos gerados na pirólise das quinze amostras de biomassa (b) gráfico biplot (PC1 versus PC2) da análise de PCA dos respectivos dados de rendimento.

Correlacionando-se os dados de rendimento dos produtos de pirólise com a análise de PCA, podemos observar que as biomassas pertencentes ao G1 apresentam elevado rendimento de bio-óleo, sendo a BC e SE as biomassas que demonstram o mais alto rendimento, valores de 45 e 47%, respectivamente. Tal resultados está de acordo com o escore mais positivo na PC2 dessas biomassas, dentro do G1. Demais autores também descrevem elevados rendimentos de bio-óleo para a biomassa SE,

Torri *et al.*⁴⁰ rendimento de 49 % e Faccini *et al.*⁷³ rendimento de 50%. Para as amostras de FC, CAR e CAM, os rendimentos do bio-óleo bruto foram 33%, 35% e 30%, respectivamente. Demais biomassas apresentaram rendimentos de bio-óleo bruto entre 25 e 29%. Somente a LA, dentre as biomassas estudadas, apresentou rendimento do produto líquido inferior a 20%, concordando com o elevado escore negativo, dessa biomassa, na PC1. Os valores de rendimento de bio-óleo apresentados em nosso estudo demonstram-se compatíveis com valores reportados para o bio-óleo de AM (28,1% Lazzari *et al.*³⁹), CP (32,4% Moraes *et al.*³¹) e CAR (27,3% Moraes *et al.*³¹), os quais foram gerados em mesmo reator de leito fixo.

Por outro lado, a biomassa pertencente ao G3, a CAR, apresentou o maior rendimento de *biochar* (aproximadamente 35%), concordando com sua separação na PC2 (elevado escore negativo). O valor de rendimento de *biochar* obtido para a CAR está de acordo com estudo de Almeida¹⁰⁴ (rendimento obtido de *bio-char* de 33,6%) no qual utiliza-se reator de leito fixo. Demais biomassas apresentaram rendimentos de *biochar* entre 21 e 32%.

Referente às biomassas pertencentes ao G2, essas apresentam o maior rendimento de gases, sendo a SC a biomassa que demonstrou o mais alto rendimento, valor de 52%. Além disso, dentre as biomassas desse grupo, a CAM, SKC, STE e LA demonstraram o maior rendimento de carvão, como descrito na **Figura 11a**, tal resultado está de acordo com a tendência de separação dessas biomassas na PC2 (escore mais negativo).

3.2.3 Análise cromatográfica dos bio-óleos

Aproximadamente 200 diferentes compostos foram tentativamente identificados nas quinze amostras de bio-óleo, usando o procedimento discutido na **seção 3.1.5**. Desse total, 166 compostos foram confirmados pelo sistema de LTPRI. Os compostos que não apresentaram valores de LTPRI no banco de dados da NIST, foram identificados de forma geral, sem uma definição clara das posições isoméricas de acordo com Onorevoli *et al.*¹²². Cada composto tentativamente identificado foi classificado nas seguintes categorias: fenóis, cetonas, aldeídos, furanos, compostos nitrogenados, álcoois, éteres, ésteres, ácidos carboxílicos e hidrocarbonetos. A lista detalhada dos compostos tentativamente identificados nas quinze amostras de bio-óleo com respectivos valores de LTPRI, áreas percentuais e classes químicas é apresentada no **Anexo 1 (Tab. A1)**.

Para fins comparativos, a lista dos cinco compostos majoritários em cada uma das quinze amostras de bio-óleo é apresentada na **Tabela III**.

Tabela III. Cinco compostos majoritários em cada uma das quinze amostras de bio-óleo

Amostras		Cinco compostos majoritários (área %) em cada amostra				
LA	Compostos	Ácido Palmítico	4-Metil-Fenol	Fenol	Indol	3-Etil-Fenol
	área%	15,70%	11,43%	11,38%	3,71%	3,44%
AM	Compostos	Ácido oleico	Fenol	Ácido Palmítico	4-Metil-Fenol	Ácido eláidico
	área%	21,80%	7,60%	5,92%	4,78%	3,42%
FC	Compostos	Fenol	Ácido Láurico	4-Metil-Fenol	Guaiacol	Catecol
	área%	23,13%	8,29%	6,07%	4,64%	4,39%
CM	Compostos	Ácido Palmítico	Fenol	4-Metil-Fenol	4-Etil-Fenol	Indol
	área%	8,17%	8,02%	7,21%	3,86%	3,31%
SC	Compostos	Ácido Docosenóico	Ácido Oleico	Ácido Araquídico	Ácido Eláidico	Ácido Palmítico
	área%	13,79%	9,88%	4,97%	4,54%	3,23%
SKC	Compostos	Cafeína	Fenol	Ácido Palmítico	Guaiacol	Indol
	área%	15,12%	7,50%	5,85%	4,04%	3,04%
CA	Compostos	Ácido Palmítico	Ácido Oleico	Ácido Eláidico	Ácido Esteárico	Hexadecanamida
	área%	45,29%	16,48%	4,36%	2,74%	2,36%
SE	Compostos	4-Metil-Fenol	5-Metil-Guaiacol	Fenol	Guaiacol	4-Metil-Catecol
	área%	9,11%	7,16%	6,32%	5,02%	4,99%
STE	Compostos	4-Metil-Fenol	Fenol	3-Etil-Fenol	2,3-Dihidrobenzofurano	Indol
	área%	17,44%	12,22%	10,25%	6,09%	5,76%
CP	Compostos	5-Metil-Guaiacol	Guaiacol	Catecol	Propenil Guaiacol	4-Metil-Fenol
	área%	7,60%	7,50%	7,42%	5,43%	4,54%
FA	Compostos	2,3-Dihidrobenzofurano	Fenol	4-Etil-Fenol	2-Hidróxi-5-Metil - Acetofenona	4-Metil-Fenol
	área%	9,67%	7,20%	7,09%	4,88%	4,39%
CAM	Compostos	Guaiacol	5-Metil-Guaiacol	2-Hidróxi-5-Metil - Acetofenona	Propenil Guaiacol	4-Etil-Guaiacol
	área%	15,96%	8,50%	8,24%	7,04%	6,38%
CAR	Compostos	2,3-Dihidrobenzofurano	Fenol	4-Metil-Fenol	4-Etil-Fenol	Guaiacol
	área%	8,74%	8,41%	7,23%	6,64%	6,61%
BC	Compostos	2,3-Dihidrobenzofurano	5-(Hidróximetil)-furfural	4-Etil-Fenol	C2-Imidazolidinona	4-Metil-Fenol
	área%	14,00%	11,27%	6,26%	5,60%	5,09%
BCF	Compostos	Ácido Palmítico	Ácido Esteárico	Ácido Oleico	Fenol	Ácido Eláidico
	área%	47,13%	7,93%	3,15%	3,71%	2,80%

Como esperado, observou-se diferença nas composições dos bio-óleos, devido à composição química distinta das biomassas empregadas no processo de pirólise. Somente quatro compostos pertencentes à subclasse dos aquilfenóis foram identificados em todas as quinze amostras de bio-óleo, são eles: fenol, orto e para-cresol e ortoetilfenol. Esses compostos estão presentes nos bio-óleos independentemente da composição da biomassa original. Outros compostos como o guaiacol, dimetilfenol, hidróxi-metil-ciclopentenona, dimetil-ciclopentenona e ácido hexadecanóico também foram identificados na maioria das amostras (quatorze das quinze amostras de bio-óleo).

3.2.3.1 Análise semi-quantitativa dos bio-óleos

Em relação à análise semi-quantitativa, a **Figura 12a** apresenta a distribuição das classes químicas identificadas nas amostras de bio-óleo por GC/qMS e a **12b** o gráfico biplot (escores e pesos) da análise de PCA (PC1 *versus* PC4) dos respectivos dados de composição.

Pode ser observado através da análise semi-quantitativa algumas semelhanças entre as composições dos diferentes bio-óleos. Na **Figura 12a**, o gráfico biplot (escores e pesos) da primeira e da quarta componentes principais, as quais em conjunto representam 47,5 % da variabilidade total dos dados, permitiu classificar as amostras de biomassa, de acordo com suas composições de bio-óleo, em três grupos principais (G1, G2 e G3).

Através da PC1 podemos observar a separação do grupo 1 (pontos em azul) do grupo 2 (pontos em vermelho) e grupo 3 (pontos em verde). O G1 é formado pelas biomassas (BC, CAR, SE, FC, STE, FA, CP, STE e CAM) e apresenta escore negativo na PC1, enquanto o G2 formado pelas biomassas (CA, AM, BCF e SC) e o G3 formado pelas biomassas (LA, CM e SKC) apresentam, ambos, escores positivo na PC1. Avaliando-se o gráfico de pesos para a PC1, observa-se que essa apresenta elevada influência positiva principalmente da classe dos fenóis e cetonas.

Por outro lado, através da PC4, pode-se observar a separação do G2 (com escore positivo) do G3 (com escore negativo). Além disso, nesta componente principal, observa-se uma tendência de separação das biomassas pertencentes ao G1. As biomassas BC, CAR, SE e FC apresentam escore mais positivo, enquanto as biomassas CP, CAM, STE e FA apresentam escore mais negativo na PC4. Avaliando-se o gráfico de pesos da PC4, observa-se elevada influência positiva da classe dos ácidos carboxílicos e influência negativa principalmente dos compostos nitrogenados.

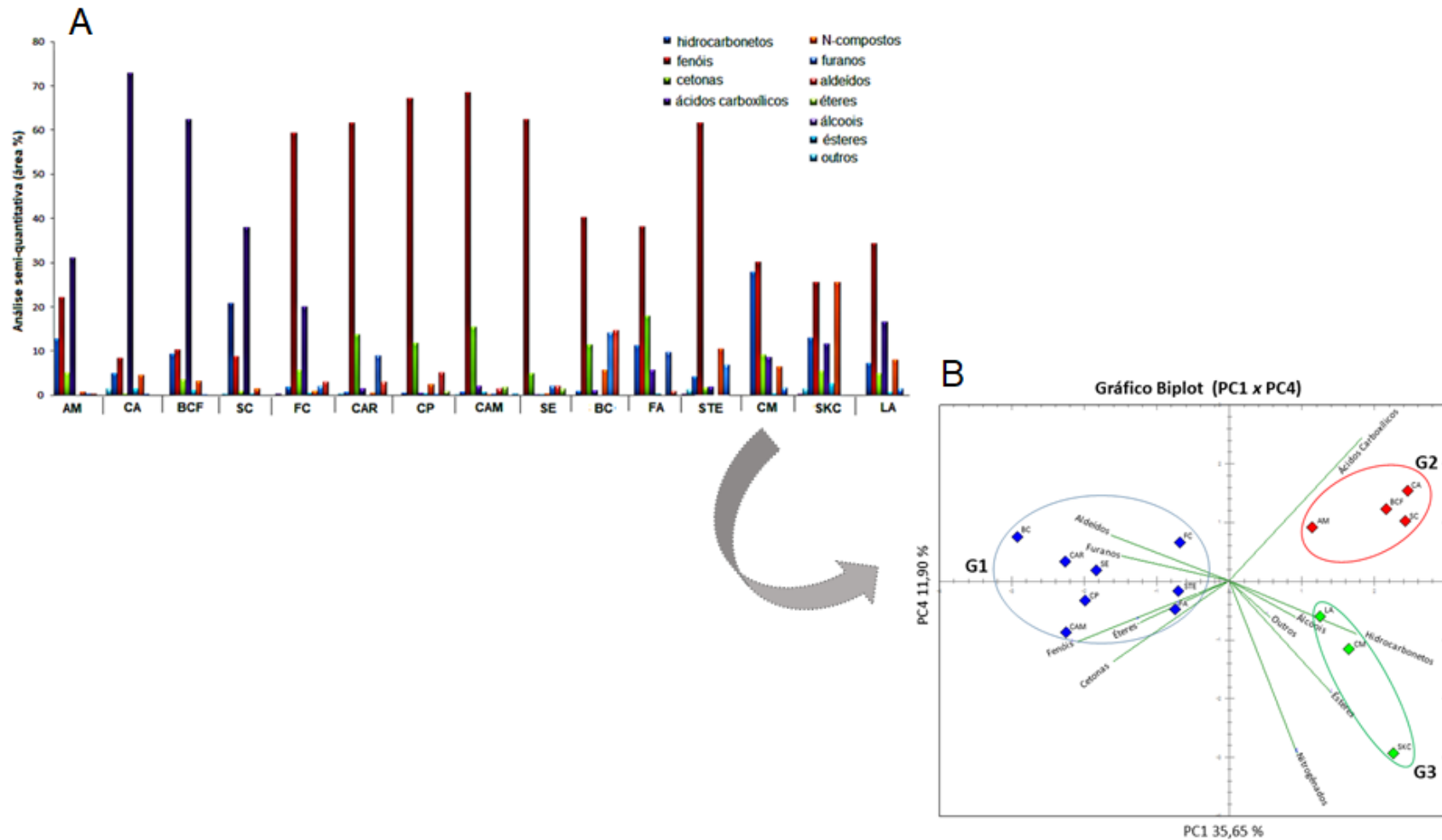


Figura 12. (a) distribuição das classes químicas nas amostras de bio-óleo, considerando-se as áreas cromatográficas percentuais obtidas por GC/qMS de compostos dessas classes e (b) gráfico biplot (PC1 versus PC4) da análise de PCA dos respectivos dados de composição.

Correlacionando-se os dados de composição (área%) dos bio-óleos com a análise de PCA pode-se observar que as biomassas pertencentes ao G1 apresentam composição de bio-óleo predominantemente fenólica (incluindo alquil fenóis, guaiacóis e catecóis), os quais representam no mínimo 40% do total da amostra. Tal resultado está de acordo com o escore positivo na PC1 dessas biomassas. Além disso, a tendência de separação no G1, das biomassas BC, CAR, SE e FC, as quais apresentam escore mais positivo na PC4, deve-se principalmente aos seus teores de aldeídos e furanos, ambas as classes químicas, foram somente identificadas juntas nessas biomassas. A biomassa BC foi a que apresentou maior teor de aldeídos e furanos (14,1 e 14,6%, respectivamente), concordando com seu distanciamento das demais amostras no G1.

Em contrapartida, as biomassas pertencentes ao G2 geraram bio-óleos com elevado teor de ácidos carboxílicos, os quais representam de 30 a 70% do total das amostras (**Fig. 12a**). Tal resultado concorda com o escore positivo na PC4 dessas biomassas. Também é interessante notar que dentre as biomassas do G2, a AM apresentou o menor teor de ácidos carboxílicos e maior de fenóis, quando comparada as demais biomassas do G2, concordando com o distanciamento da AM dentro do G2.

No caso das biomassas do G3 (SKC, CM e LA) a aparente distinção na composição dos bio-óleos comparado com as demais, está no significativo conteúdo de compostos nitrogenados (de 6,4 a 25,4% do total da amostra), esse resultado está de acordo com o escore negativo dessas amostras na PC4.

Os resultados aqui descritos, concordam com estudos prévios da literatura. Onorevoli *et al.*¹²², Li *et al.*¹²⁸ e Lazzari *et al.*³⁹ também descreveram elevada quantidade de ácidos carboxílicos nos bio-óleos derivados das biomassas SC, BCF e AM, respectivamente. Os fenóis também foram considerados a classe majoritária nos bio-óleos oriundas da CAR³¹, FC^{113,124,125}, SE⁷³ e CP³¹ e a elevada quantidade de N-compostos identificados nos bio-óleos da LA e CM está de acordo com estudos de outros grupos Muradov *et al.*¹²¹ e Pattiya *et al.*⁷

3.2.4 Análise multivariada dos espectros de infravermelho

Como observado acima, os dados de composição dos bio-óleos originados através da análise por GC/qMS, demonstram o agrupamento das biomassas em grupos que apresentam composição semelhante de bio-óleos. Entretanto, isso somente foi observado após a produção do bio-óleo e exploração de sua composição por técnica cromatográfica, o que demanda gasto de tempo e uso de técnicas relativamente custosas. Nesse contexto, propôs-se o emprego do FTIR (técnica simples, rápida e de baixo custo) em conjunto com o PCA a fim de explorar a composição do bio-óleo anterior

ao processo de pirólise, permitindo assim, avaliar qual tipo de bio-óleo é gerado a partir das diferentes fontes de biomassa. Tal abordagem é uma boa opção as técnicas cromatográficas para fins exploratórios na produção de bio-óleo.

Dessa forma, utilizando-se dos dados dos espectros de FTIR (**seção 3.2.1**), procedeu-se o PCA a fim de diferenciar as amostras de biomassa de acordo com sua composição de bio-óleo A **Figura 13a** apresenta o gráfico de escores da segunda e da terceira componentes principais, as quais em conjunto representam 32,3% da variabilidade total dos dados e a **Figura 13b** apresenta o gráfico de pesos usando a PC3 e a PC2 *versus* as variáveis (bandas de absorção do FTIR). No gráfico de escores claramente verifica-se a reprodutibilidade dos dados, no qual as triplicatas de análise aparecem lado a lado no gráfico, enquanto, o gráfico de pesos fornece informações sobre as principais bandas de absorção (número de onda) que contribuíram para a separação das amostras de biomassa de acordo com a PC2 e PC3.

Conforme observado na **Figura 13a**, o gráfico de escores da PC3 *versus* PC2 proporciona uma visualização da separação das amostras, permitindo classificá-las em três grupos distintos. Claramente, a PC3 com 14,21% da variância total, identifica três grupos de amostras: G1 (representado pelos pontos vermelhos), G2 (representado pelos pontos verdes) e G3 (representados pelos pontos azuis). O primeiro grupo (G1), formado pelas biomassas AM, CA, SC e BCF, possui elevado escore positivo na PC3. Dentre as biomassas pertencem ao G1, a AM apresentou o menor escore positivo na PC3. O segundo grupo (G2) apresentou escores próximo a zero na PC3 e é formado pelas biomassas FC, BC, CAM, FA, CAR, SE e BC. Também é interessante notar que a biomassa FC apresentou escore positivo na PC3 dentro desse grupo. Finalmente, o terceiro grupo (G3) apresenta escores negativo na PC3 e é formado pelas biomassas LA, SKC, CM e STE.

O gráfico de pesos da PC3 (**Fig. 13b** (linha vermelha) apresenta elevada influência positiva das bandas em 2850 e 2924 cm^{-1} associadas ao estiramento simétrico e assimétrico do grupo CH_2 e da banda em 1745 cm^{-1} associada ao grupo $\text{C}=\text{O}$. Tais bandas são atribuídas a absorção dos ácidos graxos nas amostras de biomassa. O lado negativo da PC3 tem elevada influência da banda em 1620 cm^{-1} , a qual pode ser relacionada a absorção das amidas em proteínas.¹³

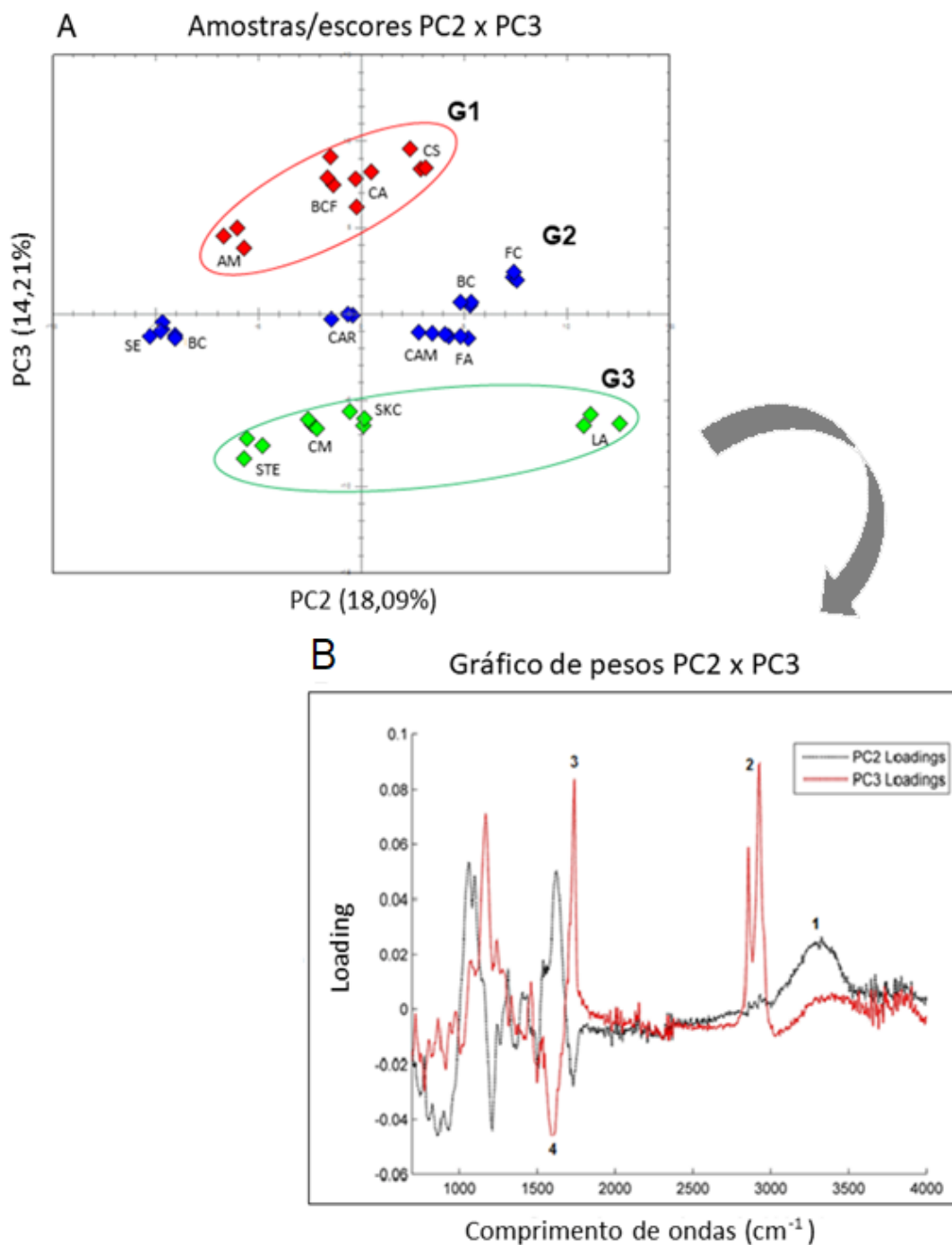


Figura 13. PCA dos espectros de FTIR (região entre 4000-700 cm^{-1}) das quinze amostras de biomassa: (a) gráfico de escores da PC2 (18,09%) versus PC3 (14,21%) e (b) gráfico de pesos da PC2 (linha preta) e PC3 (linha vermelha) com as principais bandas destacadas.

(1) 3300 cm^{-1} proveniente do estiramento do grupo OH, (2) 2850 e 2924 cm^{-1} associadas ao estiramento do grupo CH_2 , (3) 1745 cm^{-1} relacionada ao estiramento do grupo C = O e (4) 1620 cm^{-1} relacionada as amidas presentes em proteínas.

A PC2 com 18,09% da variância total explicada, apresentou tendência de separação entre estes grupos: G1 em torno de zero, G2 lado positivo e G3 lado negativo.

No entanto, algumas amostras têm diferentes escores nessa PC relacionadas ao seu próprio grupo: SE e BC no G2 e LA no G3.

Os pesos da PC2 (**Fig. 13b** (linha preta)) apresentaram principalmente elevada influência positiva da banda larga em 3300 cm^{-1} atribuída à vibração de alongamento do grupo OH, da banda em 1620 cm^{-1} atribuída às amidas em proteínas e da banda em 1032 cm^{-1} resultante da vibração de alongamento dos grupos CO, C=C e C-C-O. E o lado negativo da PC2 apresenta elevada influência da banda em 1160 cm^{-1} relacionada ao estiramento assimétrico do grupo C-O-C.

3.2.5 Correlação entre os dados cromatográficos, espectroscópicos e análise multivariada

Usando-se as informações cromatográficas e os dados de FTIR juntamente com o PCA é possível propor algumas correlações. A **Figura 14** relaciona a separação das amostras da biomassa no PCA com sua respectiva composição de bio-óleo obtida pela análise de GC/qMS.

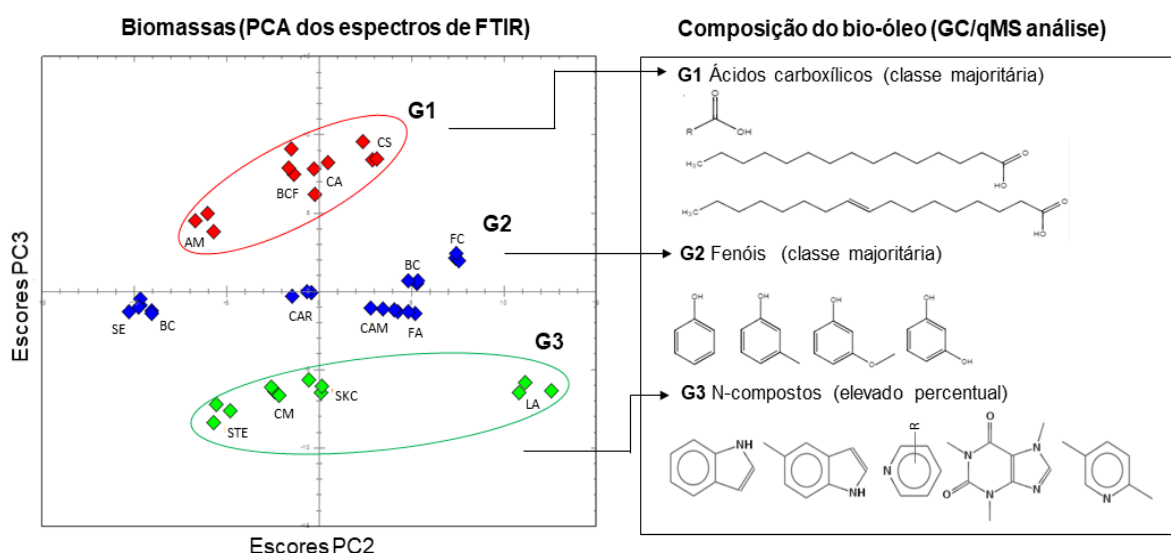


Figura 14. Correlação entre a análise de PCA dos espectros de FTIR das biomassas e as respectivas composições do bio-óleo obtidas por GC/qMS.

Como pode ser observado, as biomassas pertencentes ao G1 geraram bio-óleos ricos em ácidos carboxílicos e hidrocarbonetos (resultado obtido pela análise por GC/qMS). Os ácidos carboxílicos são derivados da degradação térmica dos triglicerídeos da biomassa, os quais por descarboxilação produzem hidrocarbonetos mais CO, CO₂ e H₂O.³⁴ A elevada quantidade de ácidos carboxílicos nos bio-óleos gerados pelas biomassas pertencentes ao G1 está de acordo com as bandas de absorção (1745 , 2850 e 2924 cm^{-1}) relacionadas aos ácidos graxos e associadas ao escore positivo na PC3 das biomassas do G1. Também é interessante notar que a biomassa AM apresentou menor teor de ácidos carboxílicos e maior de fenóis e cetonas

quando comparada as demais biomassas do G1. Esse resultado está de acordo com o escore menos positivo na PC3 da AM dentro do G1.

Em contrapartida, as biomassas pertencentes ao G2 geraram bio-óleos com composições predominantemente de fenóis (ao menos 40% da amostra) e teor significativo de cetonas. Os compostos fenólicos e as cetonas são derivados da degradação térmica da lignina e hemicelulose, respectivamente.⁷² Dentre as biomassas pertencentes ao G2, a FC gerou bio-óleo com o maior teor de ácidos carboxílicos (20%), o que está de acordo com o escore mais positivo na PC3 da biomassa FC dentro do G2.

No caso das biomassas pertencentes ao G3, os bio-óleos gerados apresentaram elevada diversidade de classes químicas e significativo teor de compostos nitrogenados, os quais são derivados da degradação térmica de aminoácidos.³⁴ O significativo teor de N-compostos está de acordo com a banda de absorção em 1620 cm^{-1} atribuída as proteínas e associada ao escore negativo na PC3 das amostras do G3.

Em relação a separação na PC2, observa-se principalmente valor de escore negativo para as biomassas SE e BC, e positivo para a biomassa LA. O escore positivo na PC2 está associado a banda em 3300 cm^{-1} (vibrações de alongamento do grupo OH) relacionada a materiais celulósicos e/ou à água adsorvida. Sugere-se, que dentre as biomassas pertencentes ao G2 a LA separou-se das demais na PC2 provavelmente por ser uma biomassa aquática podendo, assim, apresentar maior teor de material celulósico em sua composição. Essa separação na PC2 também pode ser relacionada ao baixo rendimento de bio-óleo observado para a biomassa LA (**Fig. 11**), tal biomassa apresentou o menor rendimento de bio-óleo dentre as quinze avaliadas.

A grande diferença na composição dos bio-óleos deve-se principalmente as diferentes proporções de lignina, celulose, hemicelulose e triglicerídeos na biomassa original.⁶¹ Tais proporções podem ser observadas através de bandas de absorção obtidas pela análise por FTIR, como demonstrado na **Figura 10**. Tal fato permite que o FTIR, combinado às ferramentas quimiométricas, possa ser usado para investigar a composição das biomassas e desta forma dar *insights* da composição do bio-óleo que será originado.

A composição predominantemente fenólica dos bio-óleos de FC, CAR, CP, CAM, SE, BC, FA e STE deve-se ao conteúdo de lignina nessas biomassas. Lignina, a qual é composta de três unidades de fenilpropano, por despolimerização gera grande quantidade de fenóis, caso dos benzenodióis, metoxifenóis e alquilfenóis.⁶² Em contraste, o elevado percentual de ácidos carboxílicos de cadeia longa nos bio-óleos oriundo das biomassas AM, CA, BCF e SC, deve-se ao elevado conteúdo de triglicerídeos nessas biomassas. A degradação térmica dos triglicerídeos gera ácidos carboxílicos, os quais via descarboxilação produzem hidrocarbonetos (alcanos e

alcenos) mais CO, CO₂ and H₂O. Finalmente, o significativo percentual de N-compostos nos bio-óleos oriundos das biomassas CM, SKC e LA, além da SKC, possivelmente deriva da presença de proteínas nessas biomassas. A degradação térmica de aminoácidos, os quais constituem as proteínas, geram compostos N-heterocíclicos no bio-óleo.³⁴

Referente aos potenciais usos, os bio-óleos ricos em fenóis gerados das biomassas pertencentes ao G2, podem ser empregados como fonte alternativa para os fenóis de origem fóssil, por exemplo, em resinas fenólicas amplamente empregadas na indústria.^{10,72} Enquanto os bio-óleos com elevado teor de ácidos carboxílicos e hidrocarbonetos gerados das biomassas pertencentes ao G1 são mais interessantes para uso como biocombustível após processos de *upgrando*.^{10,72,129} Por outro lado, os bio-óleos com significativo teor de N-compostos, gerados das biomassas pertencentes ao G3, têm potencial para serem empregados como fontes alternativas para compostos químicos de elevado valor agregado.¹³⁰

Por fim foi possível identificar as semelhanças entre as amostras de biomassas e segregá-las em três grupos através do PCA dos dados de FTIR. Os resultados da interpretação dos espectros de FTIR associados à análise multivariada estão de acordo com os resultados obtidos por GC/qMS, dos bio-óleos gerados a partir das biomassas estudadas, o que permite inferir que do método aqui proposto, FTIR em conjunto ao PCA, possa ser usado para análise exploratória da composição do bio-óleo anterior ao processo de pirólise.

3.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste capítulo do trabalho demonstrou-se a produção e caracterização por GC/qMS de bio-óleos oriundos da pirólise de quinze biomassas brasileiras e o uso do FTIR juntamente com o PCA para segregar as biomassas em grupos de acordo com a composição de seus bio-óleos pirolíticos. Além disso, a análise por PCA foi utilizada para diferenciar as biomassas de acordo com o rendimento dos produtos de pirólise e composição dos bio-óleos. O emprego da técnica de GC/qMS em combinação com o sistema de LTPRI permitiu a identificação tentativa de um elevado número de compostos (197) nas amostras de bio-óleos.

Os bio-óleos apresentaram composições distintas e apenas quatro compostos pertencentes à classe dos fenóis foram identificados em todas as amostras. Através do PCA do rendimento e da composição foi sempre possível separar as biomassas em três grupos principais, os quais apresentavam diferentes rendimentos dos produtos de pirólise e composições de bio-óleo, respectivamente. Referente ao PCA dos dados de FTIR, as biomassas foram segregadas nos grupos G1, G2 e G3. Ácidos carboxílicos

foram majoritários nos bio-óleos gerados pelas biomassas pertencentes ao G1, os fenóis foram os compostos majoritários no G2 e significativo teor de N-compostos foram identificados no G3. A separação dos grupos por PCA dos dados de FTIR concordam com a análise por GC/qMS, demonstrando o potencial de uso de técnicas simples e rápidas como o caso do FTIR e PCA para a pré-definição da composição do bio-óleo anterior o processo de pirólise, facilitando assim, o estudo da viabilidade do emprego de diferentes biomassas para a obtenção de bio-óleo. Dessa forma, o uso de espectroscopia juntamente com a análise multivariada provou ser uma boa opção para as técnicas cromatográficas para fins exploratórios na produção de bio-óleo.

3.3.1 Produção científica gerada deste capítulo:

Revista: *Industrial Crops and Products*

Fator de impacto: 3.849 Qualis: A2

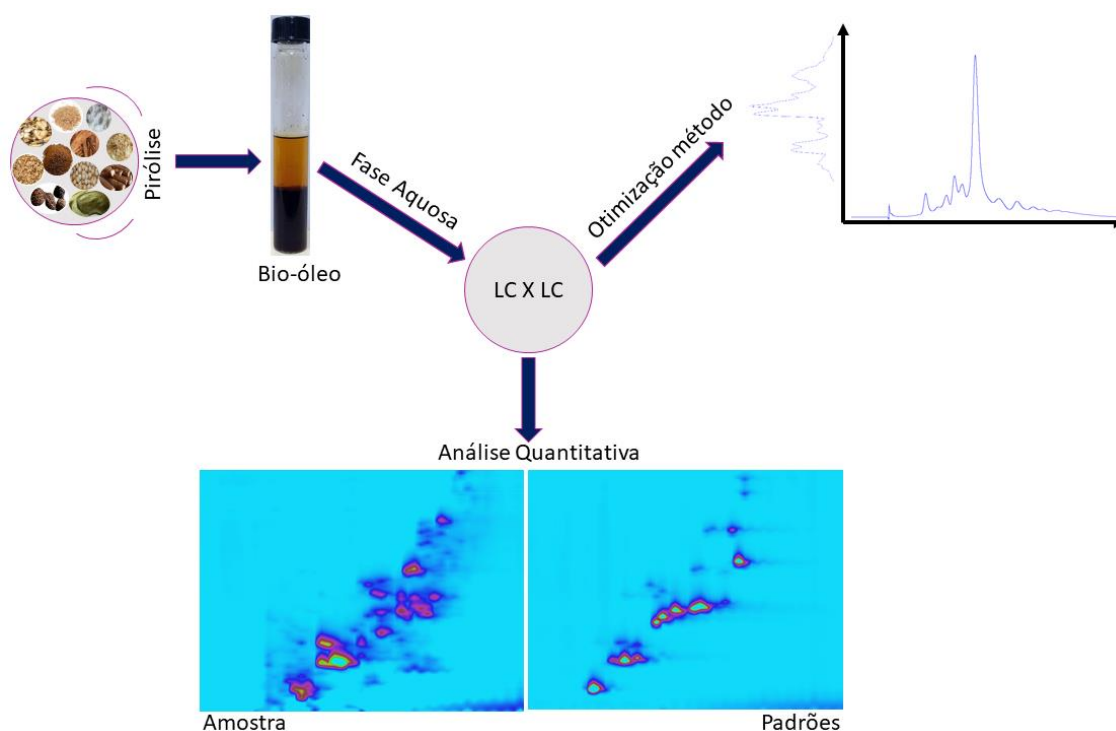
Volume: 11, páginas: 856 a 864, ano: 2018

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.005>

Título: *Classification of biomass through their pyrolytic bio-oil composition using FTIR and PCA analysis*

Autores: **Eliane Lazzari**, Tiago Schena, Marcelo Caetano Alexandre, Carmem Prizma, Aline Nunes Silva, Marco Flôres Ferrão, Thiago Bjerk, Elina Bastos Caramão.

CAPÍTULO IV



DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA QUANTITATIVA PARA ANÁLISE DE FASES AQUOSAS DE BIO-ÓLEOS USANDO LCxLC

4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1.1 Materiais e reagentes

Os solventes acetonitrila e metanol (de grau HPLC) e o ácido fórmico (p.a) foram adquiridos da VWR Chemicals (Barcelona, Espanha). Água ultrapura foi obtida a partir de um aparelho Milli-Q (sistema Millipore, Billerica, MA, EUA) e utilizada para a preparação das soluções e fases móveis.

Padrões de referência com pureza $\geq 98\%$ foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). Uma solução estoque (1000 mg L^{-1}) foi preparada em metanol contendo 21 compostos padrões: 3 cetonas (3-metil-1,2-ciclopentanodiona, 4-hidróxi-3-metóxiacetofenona, 4-hidróxiacetofenona), 2 álcoois (álcool homovanilílico, 3-p-hidróxifenilpropanol), 9 fenóis (1,2-benzenodiol, fenol, 4-metil-1,2-benzenodiol, 2-metóxi-fenol (guaiacol), 4-metilfenol, 2,6-dimetóxi-fenol, 4-etilfenol, 3,4-dimetilfenol, 2-acetil-resorcinol), 6 aldeídos (5-(hidróximetil)furfural, furfural, 4-hidroxibenzaldeído, 5-metilfurfural, 4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina), 4-hidróxi-3,5-dimetoxibenzaldeído (siringaldeído) e um alcalóide (cafeína). A solução estoque foi armazenada a 5°C .

4.1.2 Biomassas e fases aquosas dos bio-óleos

Nesta parte do trabalho estudou-se as fases aquosas oriundas da pirólise das biomassas investigadas no **Capítulo III**, exceto a biomassa lentilha d'água e a torta residual da semente do tabaco energético. A primeira não foi empregada devido ao seu baixo rendimento de bio-óleo, e conseqüentemente de fase aquosa, o que inviabiliza a sua utilização, enquanto que para o tabaco, o método desenvolvido por LC \times LC/DAD-MS não possibilitou a separação/identificação dos componentes da sua fase aquosa, pois esta apresentou perfil bastante diferente das demais amostras. Detalhes sobre potencial de utilização, local/indústria de fornecimento e preparo das amostras de biomassas estão descritos na **seção 3.1.2 do Capítulo III**.

Dessa forma, 13 amostras de biomassa: amêndoa do caroço de manga; fibra de coco; folhas (coroa) de abacaxi; bagaço de cana-de-açúcar; caroço de algodão; *silverskin* de café; casca de arroz; serragem de eucalipto; caroço de pêsego; borra de café; casca de amendoim e casca de mandioca e semente de crambe, foram submetidas a pirólise empregando mesmo reator e semelhantes condições às já descritas no capítulo anterior (**seção 3.1.4**). Como segue, empregou-se 7 g de biomassa (28-60 *mesh*), fluxo de N_2 de 100 mL min^{-1} , taxa de aquecimento de $100^\circ\text{C min}^{-1}$ e temperatura final de 700°C , sendo o sistema mantido por 10 min nesta temperatura (controlado pelo término dos vapores de pirólise).

Os bio-óleos brutos gerados durante a pirólise das diferentes biomassas consistiram em duas fases imiscíveis: (1) fase orgânica e (2) fase aquosa, as quais foram separadas por decantação simples e a fase aquosa coletada sem qualquer pré-tratamento ou processo de extração.

As fases aquosas dos bio-óleos assim obtidas, foram diluídas em água, usando fator de diluição de 1:30 (v/v) e 1:40 (v/v) de acordo com a concentração dos constituintes em cada amostra, submetidas a filtração através de uma membrana de PTFE Chromafil de 0,20 μM e, posteriormente, analisadas qualitativamente e quantitativamente por LCxLC/DAD-MS.

4.1.3 LCxLC instrumentação

No sistema de LCxLC, a primeira dimensão foi operada usando um cromatógrafo líquido da série Agilent 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) equipado com um amostrador automático e um detector DAD que foi conectado à saída da segunda dimensão, a qual foi operada usando uma bomba LC adicional (Agilent 1290 Infinity). Uma válvula de comutação 2-posições-10-portas (Rheodyne, Rohnert Park, CA, EUA) controlada eletronicamente foi usada para conectar ambas as dimensões e a interface, usando dois *loops* de amostragem de volume interno idêntico (30 μL). Os compostos presentes nas amostras foram analisados a 280 nm, embora, os espectros Uv-Vis tenham sido coletados de 200 a 400 nm a uma taxa de amostragem de 20 Hz no DAD. O comprimento de onda (280 nm) foi selecionado considerando o máximo de absorção das famílias químicas dos compostos presentes nas fases aquosas, e já tem sido empregado para esse tipo de matriz.¹⁹

Um espectrômetro de massas com analisador ion trap Agilent 6320 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) e fonte ESI foi empregado para a obtenção dos espectros de massas dos compostos. A fim de diminuir o fluxo do eluente da segunda dimensão (2,5 mL) e possibilitar a entrada no sistema MS, empregou-se um divisor de fluxo em forma de T, a qual direcionou a entrada no MS com um fluxo final de cerca de 600 $\mu\text{L min}^{-1}$. O MS foi operado em ambos os modos: ESI negativo e ESI positivo, sob as seguintes condições: espectros registrados de 50 a 200 m/z, faixa definida com base no peso molecular dos compostos esperados na amostra; tensão capilar de - 3500 V; descarga de corona em + 4000 nA (positivo) e -10000 nA (negativo); pressão do nebulizador igual a 60psi; fluxo de gás secante, N_2 a 5 L min^{-1} e temperatura de vaporização de 400 °C. O analisador ion trap foi controlado através do software 6300 series trap control (Bruker Daltonik GmbH, V. 6.2).

4.1.4 LCxLC condições

As condições de separação no sistema LCxLC foram otimizadas para cada uma das duas dimensões separadamente. Tamanhos de colunas, características de fases estacionárias, gradiente, fluxo, temperatura, tipo de ácido e solventes empregados nas fases móveis foram devidamente otimizados, sendo os dados discutidos na seção dos resultados.

Após a otimização, o método de separação final baseou-se no acoplamento de duas separações em fase reversa, empregando as seguintes condições:

Separação ¹D: coluna X-Bridge amida (150 mm x 2,1 mm x 3,5 µm d.p., 141 Å, Waters, Milford, MA, EUA), eluição com água acidificada (0,1% de ácido fórmico, solvente A) e acetronitrila (0,1% de ácido fórmico, solvente B). Definiu-se como gradiente linear em condições ótimas: 0 min, 2% B; 3 min, 10% B; 50 min, 60% B; 61 min, 100% B. O fluxo de fase móvel foi estabelecido em 25 µL min⁻¹, temperatura da coluna mantida em 30 °C e volume de injeção de 10 µL. O fluxo na ¹D (25 µL min⁻¹) foi mensurado com auxílio de uma proveta graduada anterior a cada *batch* de análise, devido ao seu baixo valor, o que dificulta a medida precisa direta através das bombas de LC.

Separação ²D: coluna C18, parcialmente porosa (Poroshell EC-C18 30 mm x 4,6 mm x 2.7 µm, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Esta coluna apresenta menor comprimento e maior diâmetro comparada as colunas empregadas na ¹D, permitindo, assim, a rápida separação necessária na ²D. Condições ótimas de separação foram obtidas utilizando água acidificada (0,1 % de ácido fórmico, solvente A) e acetronitrila (0,1 % de ácido fórmico, solvente B) empregando o gradiente linear: 0 min, 10% B; 0,85 min, 90% de B; 0,86 min, 100% de B; 0,9 min, 100% de B; 0,91 min, 10% B e reequilíbrio com as condições iniciais até 1 min. O fluxo de eluente na ²D foi otimizado em 2,5 mL min⁻¹.

O acoplamento entre as duas dimensões foi realizado empregando-se período de modulação de 1 min, o qual condiz com o tempo de separação na ²D.

4.1.5 Validação do método quantitativo

Pela primeira vez, um método de análise quantitativo usando LCxLC foi desenvolvido e implementado na análise de fase aquosa de bio-óleos. O desempenho do método quantitativo foi avaliado segundo as figuras de mérito: linearidade, limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*), limite de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*), precisão (intra e inter-dia) e exatidão. O protocolo de validação seguiu as diretrizes estabelecidas pela ANVISA.¹³¹

A linearidade foi estimada no intervalo de concentração entre 1 e 250 mg L⁻¹, de acordo com os valores dos coeficientes de determinação (R²). Oito níveis de calibração,

injetados em triplicata, foram empregados na construção das curvas analíticas, os quais foram preparados a partir da diluição da solução estoque (1000 mg L⁻¹) em água.

Os valores de LODs e LOQs foram calculados com base nos parâmetros da curva analítica: valores de desvio padrão do coeficiente linear (b) divididos pela média dos valores do coeficiente angular (a), multiplicados por 3,3 e 10, respectivamente, sendo as curvas analíticas injetadas em triplicata. A precisão do método foi avaliada através da precisão intra-dia e inter-dia. A primeira, expressa como o desvio padrão relativo (RSD%, do inglês *relative standard deviation*) do volume dos picos de três injeções (n=3), do nível intermediário da curva analítica (50 mg mL⁻¹), realizadas no mesmo dia, enquanto a precisão inter-dia foi calculada repetindo-se as mesmas injeções em três dias consecutivos (n=9).

A exatidão foi estimada através de valores de recuperação do método. Para tanto, uma amostra de fase aquosa (da pirólise da casca de arroz) diluída a um fator de 1:100 (v/v) e previamente quantificada, foi fortificada à uma concentração final de 100 mg L⁻¹, com os 21 padrões estudados e analisada em triplicata no sistema de LCxLC. Os valores de recuperação em percentual foram obtidos através da comparação das concentrações calculadas e teóricas diminuídas da concentração inicial previamente determinada na amostra diluída, conforme a **Equação 3** abaixo.

$$R (\%) = \frac{\text{Conc. calculada} - \text{Conc. inicial}}{\text{Conc. teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde: Conc._{calculada} refere-se à concentração calculada para a amostra fortificada usando a curva analítica, a Conc._{inicial} refere-se a concentração previamente calculada para a amostra diluída e a Conc._{teórica} refere-se a concentração utilizada para fortificação da amostra (100 mg L⁻¹).

4.1.6 Demais cálculos

4.1.6.1 Capacidade de pico

A capacidade de pico individual para cada dimensão foi calculada de acordo com a **Equação 4**:

$$n_c = 1 + \frac{t_G}{W} \quad \text{Equação 4}$$

Onde: t_G é o tempo do gradiente e W é a largura média do pico.

Para cada configuração bidimensional foram estimados diferentes valores da capacidade de pico, partindo da capacidade de pico teórica, sendo essa calculada seguindo a chamada regra do produto, conforme **Equação 5**.

$${}^{2D}n_c = {}^1n_c \times {}^2n_c \quad \text{Equação 5}$$

Devido a equação acima não levar em consideração os efeitos deletérios provindos do processo de modulação, bem como a possível *undersampling* na 1D ; um valor de capacidade de pico mais realista foi obtido a partir da equação proposta por Li *et al.*¹³² denominada capacidade de pico efetiva (**Eq. 6**). O efeito de *undersampling* em LCxLC é atribuído ao possível agrupamento, no *loop* do modulador, dos picos previamente separados na coluna da 1D , acarretando em perda da capacidade de pico do método.

$${}^{2D}n_{c,efetiva} = \frac{{}^1n_c \times {}^2n_c}{\sqrt{1 + 3.35 \times \left(\frac{{}^2t_c {}^1n_c}{{}^1t_G}\right)^2}} \quad \text{Equação 6}$$

Onde: 2t_c refere-se ao tempo de separação na 2D , o qual se iguala ao período de modulação.

Esta última equação inclui o parâmetro $\langle \beta \rangle$ responsável pelo *undersampling*. Além disso, para uma comparação mais precisa entre configurações de colunas e para avaliar possíveis grupamentos de picos ao longo da análise na 2D e, assim, estimar o total espaço 2D , o grau de ortogonalidade (A_0) foi considerado para oferecer a denominada capacidade de pico corrigida, como segue na **Equação 7**.

$${}^{2D}n_{c,corrigida} = {}^{2D}n_{c,efetiva} \times A_0 \quad \text{Equação 7}$$

4.1.6.2 Ortogonalidade

A ortogonalidade do sistema (A_0) para cada amostra foi calculada de acordo com o método proposto por Camenzuli & Schoenmakers¹³³, levando em consideração a propagação de cada pico ao longo das quatro linhas imaginárias que cruzam o espaço 2D formando um asterisco, ou seja Z_1 , Z_2 (linhas verticais e horizontais) e Z_- , Z_+ (linhas diagonais do asterisco). Os parâmetros Z descrevem a utilização do espaço de

separação em relação à linha Z correspondente, permitindo diagnosticar semi-quantitativamente áreas do espaço de separação onde os componentes da amostra estão agrupados, assim, reduzindo em prática a ortogonalidade. Para a determinação de cada parâmetro Z, foi calculado o valor de S_{Zx} , como medida de espalhamento ao redor da linha Zx , utilizando os tempos de retenção de todos os picos separados em cada análise ²D.

4.1.7 Fluxograma do procedimento experimental

A **Figura 15** apresenta o fluxograma do procedimento experimental empregado neste capítulo.

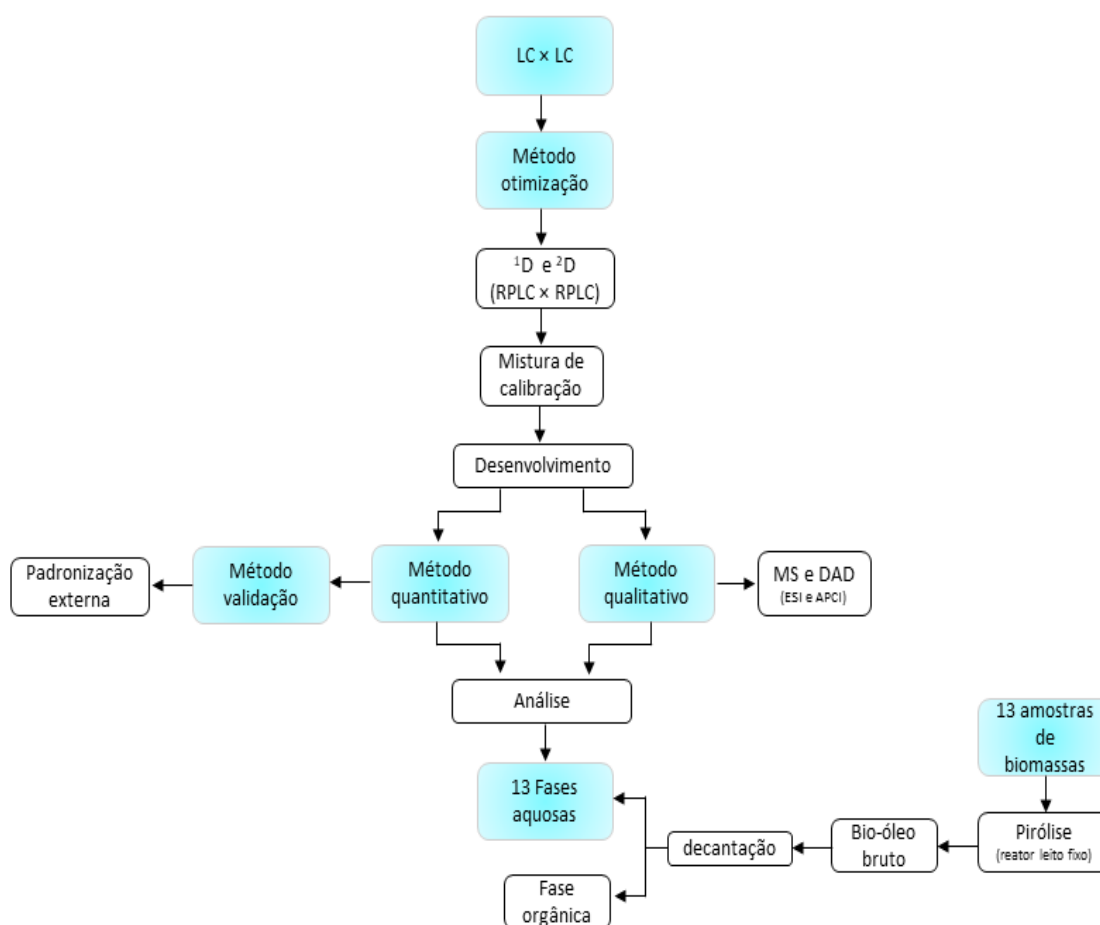


Figura 15. Fluxograma do procedimento experimental empregado no **Capítulo IV**.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.2.1 Otimização do método de separação LCxLC

Considerando-se que o objetivo deste capítulo é direcionado a quantificação de compostos de interesse em amostras de fases aquosas, a otimização de uma

metodologia de LC×LC capaz de fornecer elevada capacidade de separação é a primeira etapa crítica.

Desta forma, como primeira abordagem, testou-se o potencial de separação, na ¹D, de várias fases estacionárias sob condições de cromatografia de interação hidrofílica (HILIC, do inglês *hydrophilic-interaction chromatography*) e RP: Ciano, PEG, Amino, ZIC-HILIC, Diol e Amida, combinadas com fases móveis típicas. A fase aquosa do bio-óleo de casca de arroz foi selecionada como matriz modelo para realizar tais experimentos. Na **Tabela IV** apresenta-se um resumo das características físicas das colunas estudadas para separação na ¹D e ²D.

Tabela IV. Colunas empregadas na otimização das separações na ¹D e ²D.

	Fase estacionária	Dimensões (mm)	Tamanho de partícula (µm)	Tamanho do poro (Å)	Marca comercial
¹ D sep.	Amida	150 × 1,0 mm	3,5	141	Waters Corporation
	Amina	150 × 1,0 mm	3	175	Thermo Fisher Scientific
	Ciano	150 × 1,0 mm	3	175	Thermo Fisher Scientific
	Diol	150 × 1,0 mm	5	100	Hichrom
	PEG	150 × 2,1 mm	5	120	Supelco
	ZIC-HILIC	150 × 1,0 mm	3,5	100	Merck
² D sep.	C18	50 × 4,6 mm	2,7	90	Supelco
	C18	30 × 4,6 mm	2,7	120	Agilent Technologies
	PFP	50 × 4,6 mm	26	100	Phenomenex

Em qualquer um dos modos o emprego de condições HILIC na ¹D não produziu uma separação adequada dos componentes da amostra, enquanto que, as condições RP apresentaram-se como as mais adequadas para algumas das colunas testadas. Combinando-se tais informações e levando em consideração a possível seletividade diferencial com as colunas que serão empregadas na ²D, PEG e amida foram selecionadas como as fases estacionárias mais promissoras para a separação de fases aquosas na ¹D.

A **Figura 16** demonstra os cromatogramas em modo RP que foram obtidos usando-se colunas PEG e amida. Como observado, as separações de ambas as colunas foram comparáveis, embora, a coluna amida tenha fornecido picos ligeiramente mais separados, motivo o qual, foi selecionada para otimização adicional.

Uma vez que a coluna para o sistema ¹D foi definida, as condições de separação foram re-otimizadas, ajustando-se um fluxo de fase móvel mais lento. Tendo em vista as dimensões da coluna amida (150 × 1,0 mm), 25 µL min⁻¹ foi considerado um fluxo

de fase móvel adequado para produzir frações passíveis de separações na ²D. Assim, mantendo esse fluxo constante, adaptou-se o gradiente de fase móvel a fim de se obter picos largos, os quais poderiam ser adequadamente amostrados para o sistema ²D.

A **Figura 17** demonstra as separações obtidas para cinco amostras representativas de fases aquosas sob condições ótimas na ¹D. Tais condições envolveram o uso de uma coluna amida em combinação com as fases móveis água (0,1% de ácido fórmico, solvente A) e acetonitrila (0,1% de ácido fórmico, solvente B), eluindo sob condições RP e a um fluxo de 25 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Tendo-se definido as condições de separação na ¹D, iniciou-se a otimização das condições para o sistema ²D. Novamente, selecionou-se o bio-óleo da casca de arroz, como matriz teste, o qual foi injetado diretamente nas colunas definidas para o estudo (**Tab. IV**). Neste caso, selecionou-se diretamente o modo de separação RP, por ter demonstrado repetidamente ser o mecanismo mais apropriado para fornecer separações rápidas e eficientes (<2 min) e com curtos tempos de reequilíbrio da coluna, características as quais essenciais para separação na ²D em LCxLC.²⁶

Visando obter uma seletividade diferente em comparação com a coluna previamente definida para a ¹D (amida); C18 (30 e 50 mm \times 4,6 mm, 2,7 μm) e PFP (50 mm \times 4,6 mm, 2,7 μm) foram as colunas selecionadas para testes na ²D, estabelecendo-se para isso, um tempo total de ciclo de 1 min. Esse tempo de ciclo seria definido como o período de modulação e, portanto, deveria incluir o tempo de gradiente de separação e de reequilíbrio da coluna. A otimização das condições de separação na ²D foram conduzidas procurando-se manter um fluxo de fase móvel o mais baixo possível, a fim de minimizar a diluição da amostra. Neste sentido, 2,5 mL min^{-1} foi o menor fluxo que permitiu a separação adequada dos compostos e o reequilíbrio de coluna respeitando o ciclo de tempo de 1 min. A **Figura 18** apresenta uma comparação entre as três colunas testadas na ²D, sob condições de separação idênticas (gradiente otimizado e fluxo).

Como pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 18**, apesar da apreciável separação dos componentes da amostra alcançada usando ambas as fases estacionárias, as colunas C18 proporcionaram melhores formas de pico. Além disso, usando a coluna de menor comprimento (**Fig. 18c**) obteve-se uma separação mais rápida e picos melhor resolvidos. Desta forma, a coluna de 30 mm de comprimento foi selecionada para a ²D no sistema de LCxLC. Novamente as cinco amostras representativas de fases aquosas foram injetadas na ²D, sem prévia separação na ¹D, confirmando assim, o potencial de emprego das condições otimizadas para a separação dos componentes das amostras (**Fig. 19**).

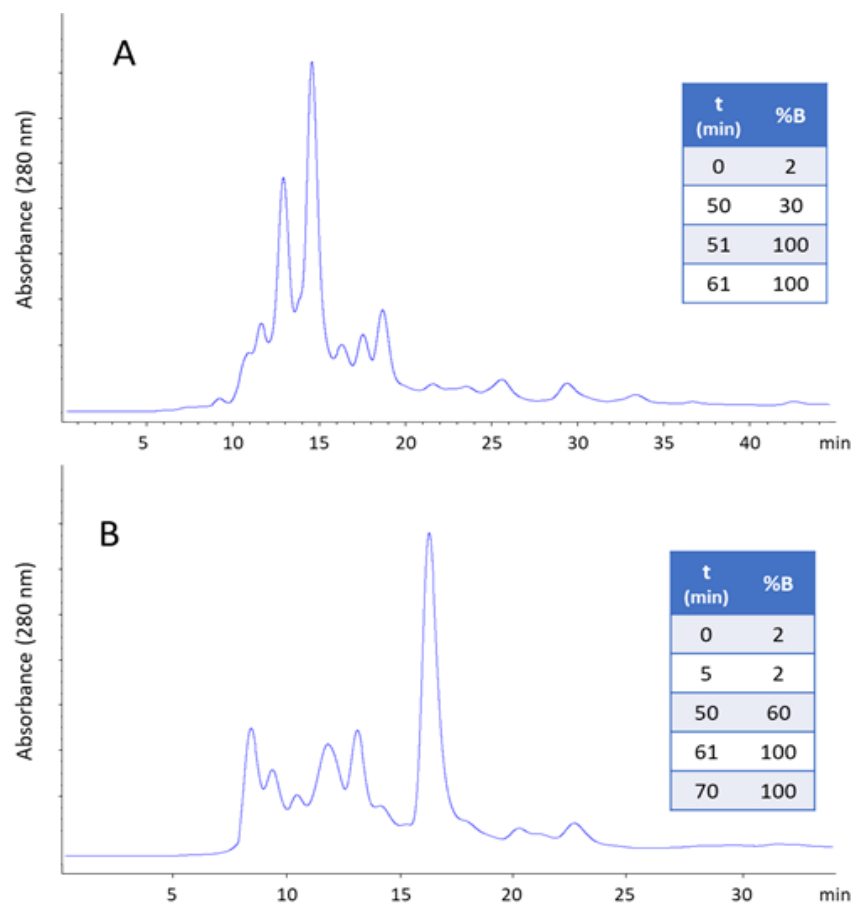


Figura 16. Cromatogramas (280 nm) obtidos para a separação da fase aquosa do bio-óleo de casca de arroz por RP utilizando colunas (a) PEG e (b) amida. Os quadros indicam os perfis de gradientes, em um fluxo de $50 \mu\text{L min}^{-1}$, empregando água (0,1% de ácido fórmico, solvente A) e acetonitrila (0,1% de ácido fórmico, solvente B).

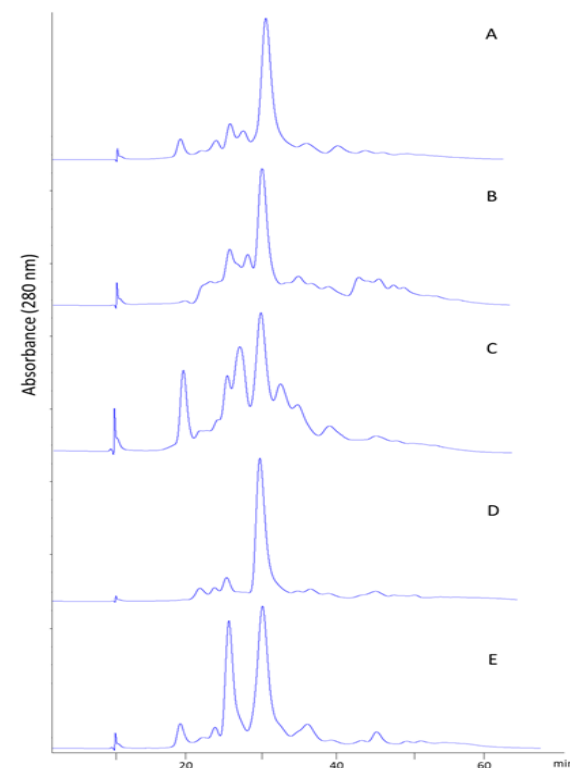


Figura 17. Cromatogramas (280 nm) obtidos sob condições otimizadas para a ¹D para as fases aquosas da pirólise de: (a) casca de arroz, (b) casca de amendoim, (c) borra de café, (d) caroço de pêsego e (e) serragem de Eucalipto. Coluna amida com fluxo de fase móvel de $25 \mu\text{L min}^{-1}$. Eluição usando água (0,1% de ácido fórmico, solvente A) e acetonitrila (0,1% de ácido fórmico, solvente B) seguindo gradiente: 0 min, 2% B; 3 min, 10% de B; 50 min, 60% de B; 61 min, 100% de B; 76 min, 100% B.

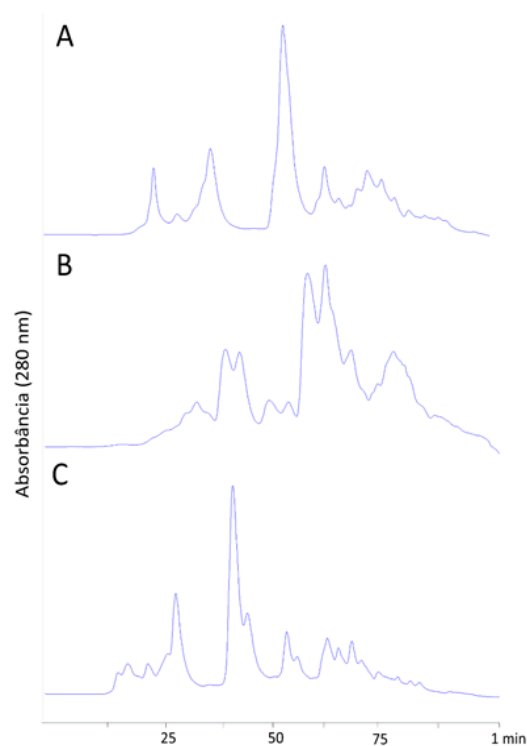


Figura 18. Cromatogramas (280 nm) obtidos para a separação da fase aquosa da pirólise da casca de arroz por modo RP empregando três diferentes colunas parcialmente porosas: (a) C18 (50 mm x 4,6 mm, 2,7 μ m), (b) PFP (50 mm x 4,6 mm, 2,6 μ m) e (c) C18 (30 mm x 4,6 mm, 2,7 μ m). Fluxo de fase móvel 2,5 mL min⁻¹. Eluição empregando água (0,1% de ácido fórmico, solvente A) e acetonitrila (0,1% de ácido fórmico, solvente B) seguindo gradiente: 0 min, 10% B; 0,85 min, 90% de B; 0,86 min, 100% de B; 0,9 min, 100% de B; 0,91 min, 10% B.

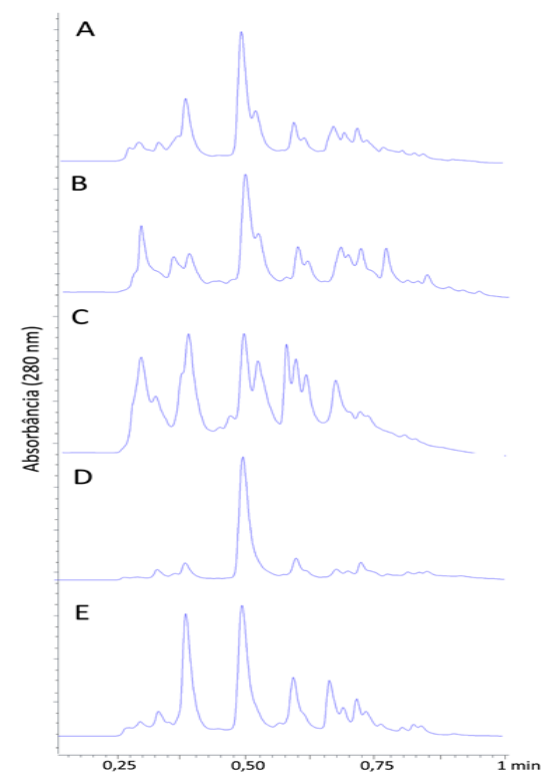


Figura 19. Cromatogramas (280 nm) obtidos sob condições otimizadas para a ²D para as fases aquosas da pirólise de: (a) casca de arroz, (b) casca de amendoim, (c) borra de café, (d) caroço de pêsego e (e) serragem de Eucalipto. Coluna C18 com fluxo de fase móvel de 2,5 mL.min⁻¹. Eluição usando água (0,1% de ácido fórmico, solvente A) e acetonitrila (0,1% de ácido fórmico, solvente B) seguindo o gradiente: 0 min, 10% B; 0,85 min, 90% de B; 0,86 min, 100% de B; 0,9 min, 100% de B; 0,91 min, 10% B.

Após a otimização individual de cada uma das dimensões, as condições finais foram empregadas no novo método RPLC × RPLC, definindo-se o tempo de 1 min como período de modulação. Os diagramas de cores (280 nm) de todas as amostras de fases aquosas estudadas no presente capítulo estão apresentados na **Figura 20** também, de forma aumentada, no **Anexo 2 (Fig. A1)**. Como observado, as amostras foram caracterizadas pela presença de elevado número de componentes, os quais, embora, empregando-se separação em ambas dimensões no modo RP, apresentaram boa distribuição no espaço bidimensional. A **Tabela V** resume as figuras de mérito do método qualitativo, para as cinco amostras representativas de fase aquosa (**Fig. 20b,c,d,e e f**), as quais apresentam perfil de separação semelhante a quase totalidade das amostras e um menor uso do espaço bidimensional quando comparada às fases aquosas de semente de crambe, caroço de pêsego e *silverskin* do café, (**Fig. 20k, l e m**, respectivamente). Assim, se encontrados bons resultados do método qualitativo para as cinco amostras representativas, conseqüentemente as demais também o terão.

Como observado na **Tabela V**, o grau de ortogonalidade variou de 33%, para a fase aquosa da borra de café, a 50%, para as fases aquosas da casca de amendoim e serragem de Eucalipto. Os resultados de ortogonalidade baseiam-se no uso do espaço ²D, como esse é ocupado pela distribuição dos componentes da amostra.¹³³ Desta forma, esses valores podem ser considerados bons apesar do uso de mesmo mecanismo de separação (RP) em ambas dimensões. Tal tendência também foi observada para os valores da capacidade de pico corrigida (calculado pela **Eq. 7**), a qual considera o grau de ortogonalidade para fornecer valores mais realistas. Como observado, os valores obtidos foram elevados, atingindo-se capacidades de pico corrigidas superiores a 500 para a fase aquosa do bio-óleo de serragem de Eucalipto, demonstrando, assim, a capacidade analítica de separação do método desenvolvido.

Tabela V. Capacidade de pico e ortogonalidade para as análises por RPLC × RPLC

Parâmetro	Casca de arroz	Casca de amendoim	Borra de café	Caroço de pêsego	Serragem de Eucalipto
¹ D capacidade de pico, 1n_c	33	37	32	37	36
² D capacidade de pico, 2n_c	35	43	38	40	48
Capacidade de pico teórica, $^{2D}n_c$	1155	1591	1216	1480	1728
Capacidade de pico efetiva, $^{2D}n'_c$	675	924	735	858	1013
Ortogonalidade, A_0	47%	50%	33%	44%	50%
Capacidade de pico corrigida, $^{2D}n_{c,corr}$	318	461	244	374	505

Valores calculados de acordo com as equações 4,5,6 e 7.

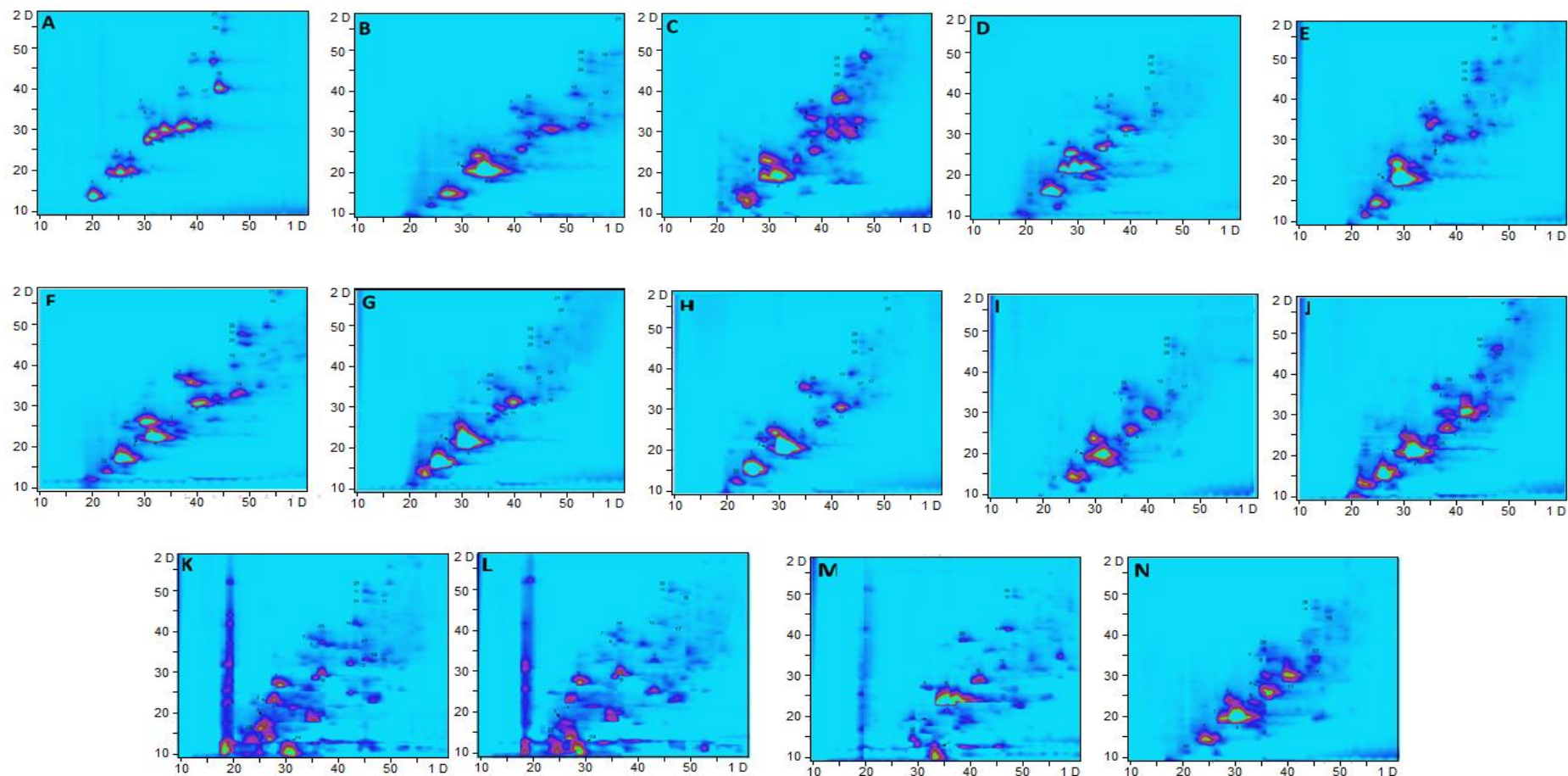


Figura 20. Diagrama de cores (280nm) usando a metodologia otimizada por RPLC \times RPLC das amostras de fases aquosas oriundas da pirólise das biomassas: (b) casca de arroz, (c) casca de amendoim, (d) borra de café, (e) caroço de pêsego, (f) serragem de Eucalipto, (g) bagaço de cana-de-açúcar, (h) fibra de coco, (i) amêndoa do caroço de manga, (j) folhas de abacaxi, (k) semente de crambe, (l) caroço de algodão, (m) *silverskin* do café e (n) casca de mandioca. No cromatograma (a) apresenta-se a separação obtida para a solução de calibração ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada) dos 21 padrões comerciais. A identificação dos picos está descrita na **Tabela VIII**.

4.2.2 Otimização do método MS

Um dos desafios na caracterização das amostras de fases aquosas de bio-óleos por técnicas de LC é a identificação dos compostos através do sistema MS. Tal dificuldade deve-se ao baixo peso molecular comumente associado aos compostos presentes nas amostras de fases aquosas, dificultando a ionização por fontes características de sistemas LC-MS.

Testaram-se duas fontes de ionização na otimização do sistema MS: ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês, *Atmospher Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry*) e ESI, para as quais, os parâmetros de análise foram otimizados usando injeção direta da mistura de calibração. Dentre essas, a fonte ESI foi a que apresentou os melhores resultados, em termos de detecção/intensidade dos íons moleculares. Compostos de maior peso molecular e com a presença de grupos hidroxila, amina e carboxila foram positivamente identificados por quando a ESI foi utilizada, na maioria, em ambos modos: protonado $[M + H]^+$ e desprotonado $[M - H]^-$. Por outro lado, a identificação de moléculas menores, tais como o fenol, os etilfenóis e o furfural não foi possível em nenhuma das fontes de ionização testadas. Para tais compostos, a identificação deu-se através dos espectros de Uv-Vis obtidos pelo detector DAD e tempos de retenção em ambas dimensões 1D e 2D . A **Tabela VI** resume as informações qualitativas obtidas através do sistema ESI-MS para os padrões comerciais.

Tabela VI. Íons (m/z) dos compostos padrão comerciais avaliados por meio da ESI-MS.

ID	Padrões	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$	ID	Padrões	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$
1	5-(hidróximetil)furfural	127	125	12	4-hidróxiacetofenona	137	135
2	3-metil-1,2-ciclopentanodiona	114	-	13	2-metóxi-fenol (guaiacol)	125	123
3	1,2-benzenodiol	-	109	14	Vanilina	153	151
4	Furfural	-	-	15	4-metilfenol	-	-
5	Álcool homovanílico	151	-	16	Siringaldeído	183	181
6	Cafeína	195	-	17	2,6-dimetóxi-fenol	155	-
7	Fenol	-	-	18	4-hidróxi-3-metóxiacetofenona	153	151
8	4-metil-1,2-benzenodiol	125	123	19	2-acetil-resorcinol	151	149
9	3-p-hidróxi-fenilpropanol	153	151	20	4-etilfenol	-	-
10	4-hidroxibenzaldeído	123	121	21	3,4-dimetilfenol	-	-
11	5-metilfurfural	111	-				

4.2.3 Desenvolvimento e validação do método quantitativo

Empregando o método RPLC×RPLC otimizado, analisou-se a solução de calibração contendo amplo grupo de compostos (21 padrões), os quais já previamente identificados em amostras de fases aquosas.^{18,19} Cetonas, álcoois, fenóis, aldeídos e

um alcalóide estavam incluídos na solução, para os quais suas estruturas químicas são encontradas no **Anexo 2 (Fig. A2)**.

Retomando-se a **Figura 20a**, como observado, obteve-se boa separação dos padrões presentes na mistura de calibração. Para esses, curvas analíticas foram construídas mensurando-se o volume correspondente a cada pico (cromatogramas extraídos a 280 nm) em oito diferentes níveis de concentração, injetados em triplicata, no sistema LCxLC. Coeficientes de determinação superiores a 0,98 foram obtidos para todos os padrões testados. Referente as demais figuras de mérito, os valores de LODs variaram de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cafeína e $2,08 \mu\text{g mL}^{-1}$ para fenol, enquanto os valores de LOQs foram menores que $6,29 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Para a precisão instrumental os valores de RSD% foram inferiores a 10% para 18, dos 21 compostos estudados. A precisão intra-dia apresentou valores de RSD% entre 0,30 e 9,14%, enquanto a precisão inter-dia apresentou valores de RSD% entre 0,30 a 14,56%. Para o cálculo da precisão instrumental, considerou-se os valores dos volumes de pico de uma mistura ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada) dos 21 padrões injetados três vezes no mesmo dia ($n = 3$) e em três dias consecutivos ($n = 9$), respectivamente para a precisão intra e inter-dia. A exatidão do método foi avaliada mediante valores de recuperação, sendo que a maioria dos compostos apresentou excelentes resultados, recuperações entre 90% e 115%, exceto o furfural e o 2,6-dimetóxifenol os quais apresentaram valores de 85,2% e 88,5%, respectivamente. Cabe ressaltar que, os ensaios de exatidão foram realizados através da fortificação de uma amostra real ao invés da direta diluição de padrões em solvente, evitando assim, possíveis erros atrelados ao efeito de matriz. Em relação à precisão dos dados de recuperação, todos os padrões estudados apresentaram valores de RSD% inferiores a 15. Tomando-se os resultados de exatidão e precisão do método, estes são considerados satisfatórios de acordo com normas estabelecidas pela ANVISA.¹³¹

Em conjunto, os resultados das figuras de mérito demonstram a capacidade analítica do método quantitativo desenvolvido por LCxLC, ainda mais, se considerarmos os desafios analíticos comumente associados a essa técnica, tais como: baixa sensibilidade e reprodutibilidade na ¹D, devido aos diferentes cortes realizados pela modulação, e dificuldades na determinação precisa dos volumes dos picos.^{20,23,134} A **Tabela VII** resume as informações relacionadas ao método analítico desenvolvido, incluindo as figuras de mérito.

Tabela VII. Dados de calibração para a quantificação das fases aquosas e figuras de mérito para o método quantitativo por RPLC×RPLC.

Pico	Padrões	t _R ^{1D} (min)	t _R ^{2D} (s)	Coef. angular	Coef. linear	R ²	Faixa linear (µg mL ⁻¹)	LOD (µg mL ⁻¹)	LOQ (µg mL ⁻¹)	Intra -dia(%)	Inter -dia(%)	Recup. %
1	5-(hidróximetil)furfural	24	16,40	879,84	558,40	1,0000	1-250	0,17	0,51	0,30	0,30	97,2
2	3-metil-1,2-ciclopentanodiona	28	21,50	85,88	359,99	0,9816	5-150	1,30	3,92	7,93	8,18	103,0
3	1,2-benzenodiol	29	25,95	99,39	56,29	0,9985	5-250	1,19	3,62	1,48	9,93	99,2
4	Furfural	30	21,90	916,53	4618,3	0,9937	1-250	0,08	0,25	5,70	3,59	85,2
5	Álcool homovanílico	33	25,15	136,73	311,46	0,9957	1-150	0,16	0,48	1,96	12,14	106,6
6	Cafeína	33	22,60	169,43	223,30	0,9976	1-150	0,05	0,16	5,05	8,72	92,4
7	Fenol	33	36,85	53,43	128,14	0,9972	25-250	2,08	6,29	1,71	5,09	93,8
8	4-metil-1,2-benzenodiol	35	37,95	85,07	463,38	0,9909	1-150	0,10	0,30	2,73	1,72	93,7
9	3-p-hidróxifenilpropanol	38	30,35	271,96	680,22	0,9989	1-150	0,18	0,54	2,53	3,66	93,7
10	4-hidroxibenzaldeído	37	30,75	485,49	441,18	0,9936	1-150	0,05	0,15	5,38	10,27	92,7
11	5-metilfurfural	40	31,75	607,44	1147,4	0,9957	1-150	0,18	0,54	1,78	7,61	100,7
12	4-hidróxiacetofenona	43	32,85	516,58	41,262	0,9990	1-150	0,16	0,49	9,14	3,82	90,5
13	2-metóxifenol (guaiacol)	43	40,55	71,19	89,862	0,9996	1-150	0,17	0,52	0,96	0,42	113,6
14	Vanilina	43	33,00	696,80	2129,4	0,9972	1-150	0,16	0,50	2,24	3,98	105,8
15	4-metilfenol	45	48,15	64,69	71,253	0,9995	1-150	0,35	1,07	1,58	1,50	106,2
16	Siringaldeído	47	33,70	17,89	76,638	0,9855	1-150	0,11	0,34	7,03	8,13	98,6
17	2,6-dimetóxifenol	47	39,60	130,84	481,87	0,9925	5-150	1,01	3,05	3,68	1,44	88,5
18	4-hidróxi-3-metóxiacetofenona	48	48,00	170,32	952,36	0,9948	5-150	0,75	2,28	6,56	14,56	100,3
19	2-acetil-resorcinol	49	41,70	595,41	356,58	1,0000	1-150	0,20	0,62	0,77	0,81	104,3
20	4-etilfenol	49	55,40	59,24	77,089	0,9997	5-150	0,87	2,64	1,51	5,38	113,8
21	3,4-dimetilfenol	49	58,20	69,47	252,35	0,9982	5-150	0,14	0,42	1,83	1,84	107,2

4.2.4 Análise (qualitativa e quantitativa) das fases aquosas dos bio-óleos

O método desenvolvido por LCxLC foi então aplicado na caracterização das amostras de fases aquosas das treze fontes de biomassa, diagramas de cores apresentados na **Figura 20**. Diversos estudos trazem a caracterização da fase orgânica desses bio-óleos através da técnica de GCxGC os quais identificam inúmeros compostos de valor agregado nas amostras.^{31,36,39,40,42,43} Entretanto, com foco na fase aquosa, o uso da *on-line* LCxLC tem sido ainda pouco explorado. Essa técnica pode ser considerada uma boa escolha complementar a GCxGC, visando uma caracterização abrangente das amostras de bio-óleo.¹⁸

Neste sentido, cada uma das treze amostras das fases aquosas foi analisada por LCxLC em triplicata e identificada devido ao uso dos detectores DAD e ESI-MS, conectados em série. Isso possibilitou algumas identificações tentativas, além das obtidas através da comparação com padrões comerciais. Vinte e oito compostos, incluindo os compostos majoritários, foram identificados e quantificados nas amostras de fase aquosa. Dentre esses, vinte e um foram positivamente identificados através da injeção de padrões, enquanto que, sete foram tentativamente identificados com base em seus espectros de ESI-MS e UV-Vis. A quantificação dos compostos majoritários nas amostras é de suma importância quando procura-se definir o potencial uso da fase aquosa do bio-óleo, desta forma, a concentração dos compostos tentativamente identificados, para os quais não estavam disponíveis padrões comerciais, foi estimada usando-se curvas analíticas dos padrões com estruturas químicas similares aos compostos alvo. A **Tabela VIII** descreve os resultados qualitativos e quantitativos para as treze amostras de fases aquosas estudadas.

Como observado nessa tabela, o composto 1,2-benzenodiol foi majoritário em todas as amostras estudadas, com exceção da biomassa casca de amendoim para a qual apresentou-se como segundo majoritário. Em termos de concentração, obteve-se para o 1,2 benzenodiol concentrações variando de 2,07 a 7,86 mg mL⁻¹, seguido pelo furfural e 4-metilbenzenodiol (4,44 mg mL⁻¹ e 3,61 mg mL⁻¹ no caroço de pêssego, respectivamente), guaiacol (2,99 mg mL⁻¹ na casca de amendoim), 2-hidróxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona (1,98 mg mL⁻¹ na serragem de Eucalipto) e cafeína (1,58 mg mL⁻¹ na borra de café). Através das análises por LCxLC evidenciou-se elevada concentração de compostos polares nas amostras de fases aquosas, caso dos benzenodióis e derivados do furfural. De fato, se a técnica de GC fosse empregada para a análise dessas amostras, na qual faz-se necessária uma etapa de LLE normalmente operada com diclorometano, os componentes mais polares dificilmente teriam sido totalmente extraídos.

Tabela VIII. Resultados qualitativos/quantitativos das treze amostras de fases aquosas analisadas por LCxLC-DAD/ESI-MS.

pico	Compostos	Classe química	Íon Molecular ESI(+)/ESI(-)	Concentração em mg mL ⁻¹												
				CAR	CAM	BCF	CP	SE	BC	FC	AM	FA	SC	CA	SKC	CM
1	5-(hidróximetil)furfural ^a	Aldeído	127 / 125	0,76	0,35	0,56	0,81	1,78	7,54	2,86	0,45	1,67	0,13	0,04	0,01	0,29
2	3-metil-1,2-ciclopentanodiona ^a	Cetona	114 / -	1,94	1,33	1,61	0,55	0,80	1,73	0,49	1,15	2,77	0,19	-	-	1,01
3	1,2-benzenodiol ^a	Fenol	- / 109	3,55	2,68	2,07	7,86	7,41	5,36	4,66	2,49	2,42	0,73	0,56	0,04	1,32
4	Furfural ^a	Aldeído	-	2,88	1,04	0,68	4,44	1,83	7,91	5,31	1,14	4,02	0,11	0,10	-	1,35
5	Álcool homovanilílico ^a	Álcool	151 / -	0,34	-	0,31	0,83	0,60	-	0,60	0,44	0,57	-	-	-	0,50
6	Cafeína ^a	Nitrogena.	195 / -	-	-	1,58	-	-	-	-	-	-	-	-	2,30	-
7	Fenol ^a	Fenol	-	1,33	0,64	0,54	1,37	1,92	1,21	4,70	<LOQ	1,03	0,20	0,14	-	<LOQ
8	4-metil-1,2-benzenodiol ^a	Fenol	- / 123	1,09	0,99	0,41	3,61	3,22	1,87	1,07	0,54	0,43	0,33	0,14	-	0,46
9	3-p-hidróxifenilpropanol ^a	Álcool	153 / 151	0,24	0,11	0,25	0,17	0,47	0,40	0,63	0,87	1,08	0,17	0,19	0,37	0,65
10	4-hidroxibenzaldeído ^a	Aldeído	123 / 121	0,25	0,15	-	0,13	0,84	0,46	0,08	0,11	0,17	-	-	-	0,16
11	5-metilfurfural ^a	Aldeído	111 / -	0,48	0,23	0,22	0,36	0,22	1,13	0,93	0,43	1,07	0,06	0,04	0,09	0,45
12	4-hidróxiacetofenona ^a	Cetona	137 / 135	-	0,13	-	-	0,29	-	-	-	-	0,01	<LOQ	-	-
13	2-metóxi-fenol (guaiacol) ^a	Fenol	125 / 123	1,15	2,99	0,14	0,81	0,78	1,17	1,08	0,10	1,13	0,32	0,10	0,13	0,19
14	Vanilina ^a	Aldeído	153 / 151	0,29	0,25	0,05	0,32	0,21	0,31	0,22	0,12	0,23	0,05	-	-	0,10
15	4-metilfenol ^a	Fenol	-	0,38	0,42	0,10	0,91	1,80	0,48	0,42	0,25	0,13	0,11	0,07	0,04	0,13
16	Siringaldeído ^a	Aldeído	- / 181	-	-	-	0,25	-	0,34	-	-	0,41	0,12	-	-	-
17	2,6-dimetóxi-fenol ^a	Fenol	-	1,11	0,51	-	0,65	1,13	3,17	1,03	0,28	2,31	0,14	0,14	-	-
18	4-hidróxi-3-metóxiacetofenona ^a	Cetona	- / 149	0,33	0,25	-	-	-	0,35	0,21	0,19	0,96	0,07	0,07	-	0,23
20	4-etilfenol ^a	Fenol	-	0,35	0,15	-	0,23	<LOQ	0,85	<LOQ	-	0,48	0,04	<LOQ	-	-
21	3,4-dimetilfenol ^a	Fenol	-	-	0,30	-	0,47	0,52	0,44	0,22	-	0,90	0,04	-	-	-
22	2-hidróxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona ^{b,c}	Cetona	114 / 111	1,00	0,34	0,66	1,96	1,98	6,68	3,02	0,34	4,26	0,91	0,28	0,30	0,30
23	3-etil-2-hidróxi-5-dimetilciclopenten-1-ona ^{b,c}	Cetona	- / 137	-	-	-	-	0,68	-	1,26	-	-	-	-	-	-
24	3-metil-2-ciclopenten-1-ona ^b	Cetona	96/-	-	-	-	-	-	1,73	-	-	-	2,35	1,73	0,84	-
25	Álcool homovanilílico, isômero ^{b,d}	Álcool	151 / -	0,24	-	-	0,33	0,60	-	-	0,15	0,38	-	-	-	0,14
26	Metil benzenodiol, isômero ^{b,e}	Fenol	- / 123	-	0,55	0,31	0,67	1,20	0,80	0,82	0,75	0,54	0,15	0,12	0,14	0,50
27	Hidróxiacetofenona, isômero ^{b,f}	Cetona	137 / 135	0,06	0,10	0,09	0,09	-	0,07	0,05	0,08	0,13	0,01	0,04	-	0,10
28	Metilfenol, isômero ^{b,g}	Fenol	-	0,50	0,48	0,15	1,67	0,96	0,49	0,36	0,11	-	0,08	0,03	-	-
29	Metilfenol, isômero ^{b,g}	Fenol	-	0,13	0,12	0,19	0,03	0,03	0,02	0,13	0,12	0,19	0,03	0,03	0,02	0,06

(a) identificado e quantificado com padrões comerciais; (b) identificados usando espectros ESI-MS, UV-Vis e referências; (c) quantificado usando curva de calibração do 3-metil-1,2-ciclopentenodiona; (d) quantificado usando curva de calibração do Álcool homovanilílico; (e) quantificado usando curva de calibração do 4-metil-1,2-benzenodiol; (f) quantificado usando curva de calibração do 4-hidróxiacetofenona; (g) quantificado usando curva de calibração do 4-metilfenol.

Identificação das biomassas de acordo com o **Capítulo III, Tabela I.**

4.2.5 Composição química das fases aquosas

A **Figura 21** apresenta a contribuição de cada classe em termos de valores de concentração total (mg mL^{-1}) nas 13 fases aquosas analisadas.

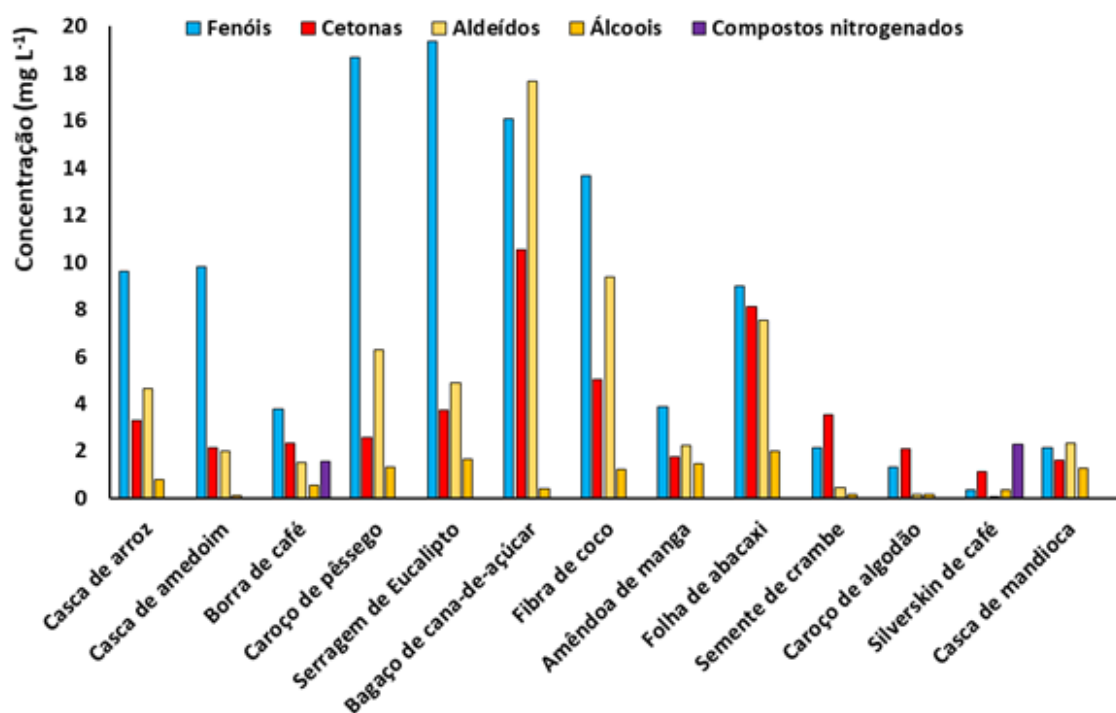


Figura 21. Distribuição em termos de concentração (mg L^{-1}) das classes químicas nas fases aquosas das 13 biomassas quantificadas por LCxLC.

Como observado nesta figura os fenóis foram majoritários em sete das treze amostras, correspondendo a um total de 65% dos compostos quantificados nas amostras oriundas do caroço de pêsego e serragem de eucalipto. Dentre os fenóis, benzenodióis foi a subclasse mais abundante em todas as amostras, com valores na faixa de 0,82 a 12,14 mg mL^{-1} para a fase aquosa do *silverskin* do café e serragem de eucalipto, respectivamente. Aldeídos, principalmente os furfurais, também estão presentes com elevada concentração nas fases aquosas do bagaço de cana-de-açúcar (17,69 mg mL^{-1} , sendo majoritários nesse bio-óleo), fibra de coco (9,4 mg mL^{-1}) e folhas de abacaxi (7,57 mg mL^{-1}). A elevada quantidade de benzenodióis e furfurais, identificada nas amostras de fases aquosas, está de acordo com estudo da literatura, no qual caracterizou-se fases aquosas de fibra de coco, palha e bagaço de cana-de-açúcar, embora neste estudo não está incluída informações quantitativas.¹⁹

No caso das cetonas, todos os componentes identificados foram cetonas cíclicas; sendo que as fases aquosas mais ricas nesses compostos foram a do bagaço

de cana-de-açúcar e da folha de abacaxi (10,56 e 8,12 mg mL⁻¹, respectivamente). Compostos nitrogenados, constituídos exclusivamente pela cafeína, somente foram identificados nas fases aquosas oriundas da borra e *silverkin* do café, sendo a última caracterizada por elevada quantidade de cafeína, a qual representou 56% do total dos compostos quantificados na amostra. Por outro lado, os álcoois apresentaram concentrações totais entre 0,11 e 2,03 mg mL⁻¹, sendo a fase aquosa da casca de amendoim a que apresentou menor concentração, enquanto a fase aquosa das folhas de abacaxi foi a amostra mais rica em álcoois.

Como anteriormente mencionado, as diferenças nas composições das fases aquosas dos bio-óleos estão atreladas às distintas composições químicas das biomassas processadas por pirólise. Celulose, hemicelulose e lignina, juntamente com outros componentes, aparecem em diferentes proporções nas biomassas; as quais influenciam a composição final do bio-óleo/fase aquosa gerados por pirólise.⁶¹ Em relação a lignina, esta é composta por três unidades de fenilpropano que, por despolimerização levam a uma variedade de fenóis, como benzenodióis, metóxifenóis e alquilfenóis. Os benzenodióis, devido a sua maior polaridade, permanecem principalmente na fase aquosa, enquanto os metoxifenóis e alquilfenóis são comumente encontrados em maior concentração na fase orgânica do bio-óleo. Por outro lado, a quantidade de aldeídos nas amostras de fases aquosas é devida ao teor de celulose na biomassa original. Os aldeídos são derivados da despolimerização da celulose, levando a elevada quantidade de anidrossacarídeos e anidro-oligossacarídeos, os quais por diferentes reações geram os aldeídos: 5- (hidroximetil) furfural, o 5-metilfurfural e o furfural.⁶² Estes três compostos foram identificados em todas as amostras de fases aquosas. Em relação às cetonas, ciclopentenonas e outras cetonas cíclicas são derivadas principalmente da degradação da hemicelulose e celulose.⁴¹ Finalmente, a quantidade significativa de cafeína na fase aquosa de subprodutos do processamento do café deve-se a sua presença na biomassa original. A cafeína possivelmente não sofre em grande extensão termodegradação durante a pirólise, possibilitando sua identificação nas fases aquosas da borra e *silverskin* do café.¹³⁵

De modo geral, levando-se em consideração a composição química das fases aquosas, percebe-se que estas têm um grande potencial para ser uma alternativa viável de compostos químicos para a indústria, uma vez que, apresentam menor complexidade e matriz formada por água, quando comparada a fase orgânica dos bio-óleos, facilitando a extração dos compostos que foram separados e quantificados por LC×LC-DAD. Como exemplo, os benzenodióis apresentam importantes aplicações como antivirais e

antioxidantes com aplicação em produtos de clareamento da pele. Outros fenóis (compostos alquil e metóxi) poderiam ser usados como substitutos dos fenóis em resinas fenólicas. Furfurais têm potencial como biocombustíveis líquidos e na produção de biopolímeros, enquanto as cetonas podem ser aplicadas na síntese química.¹⁰

4.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste capítulo relata-se o desenvolvimento de uma nova metodologia baseada em RPLC×RPLC para avaliar qualitativamente e quantitativamente a composição de fases aquosas de treze diferentes bio-óleos produzidos por pirólise a partir de potenciais biomassas. As fases aquosas apresentaram diferentes composições, entretanto em todas as amostras foram identificados e quantificados compostos de elevado valor agregado, tais como benzenodiolis e furfurais. Embora estudos prévios^{18,19} também descrevam a aplicação bem-sucedida de uma abordagem ²DLC para caracterização de fases aquosas, esta é a primeira vez na qual uma metodologia quantitativa é implementada. O método quantitativo desenvolvido, RPLC×RPLC, apresentou excelente linearidade, precisão, reprodutibilidade além de valores de LODs e LOQs tão baixos quanto 0,05 µg mL⁻¹ e 0,16 µg mL⁻¹, respectivamente. Através desta metodologia, 28 compostos separados e detectados nas fases aquosas estudadas foram quantificados. O desenvolvimento deste trabalho abre possibilidades para a implementação da técnica de o LC×LC para a análise das fases aquosas de bio-óleos, já que a complexidade e matriz dessas amostras torna a técnica de LC abrangente uma ótima alternativa para suas caracterizações completas.

4.3.1 Produção científica gerada deste capítulo:

Revista: *Journal of Chromatography A*

Fator de impacto: 3.858 Qualis: A2

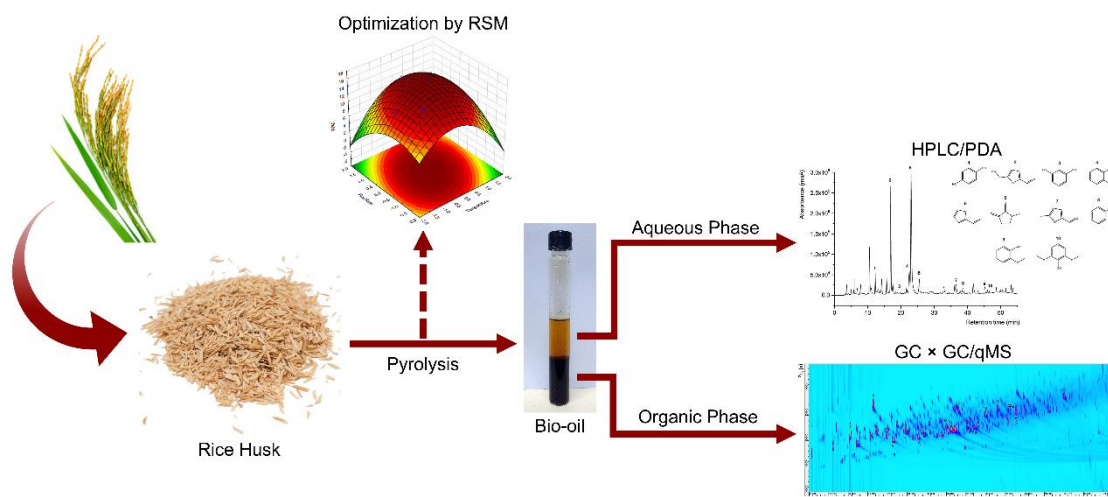
Volume: 1602, páginas: 359 a 367, ano: 2019

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.005>

Título: *Quantitative analysis of aqueous phases of bio-oils resulting from pyrolysis of different biomasses by two-dimensional comprehensive liquid chromatography*

Autores: **Eliane Lazzari**, Katia Arena, Elina Bastos Caramão e Miguel Herrero

CAPÍTULO V



PRODUÇÃO DE BIO-ÓLEO ORIUNDO DA PIRÓLISE DA CASCA DE ARROZ E SUA CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DETALHADA POR HPLC/DAD E GC×GC/qMS

5.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1.1 Materiais e reagentes

Todos os padrões utilizados foram de grau cromatográfico e obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

Para análises por HPLC, utilizou-se água deionizada (18,2 M Ω) e metanol (grau HPLC) obtido da J.T Baker (Radnor, Pensilvania, EUA). Uma solução estoque (500 mg L⁻¹) foi preparada contendo os seguintes padrões de referência: fenol, 2-metóxi-fenol (guaiacol), 2,6-dimetóxi-fenol (siringol), 1,2-benzenodiol (catecol), 1,3-benzenodiol (resorcinol), 1,4-benzenodiol (hidroquinona), furfural, 5-(hidróximetil)furfural (5HMF), 5-metilfurfural e 3-metil-1,2-ciclopentanodiona.

Para análises por GCxGC/qMS, preparou-se uma solução estoque (500 mg L⁻¹) contendo 19 padrões: 4 cetonas (2-ciclopenten-1-ona, 3-metil-1,2-ciclopentanodiona, 2(5H)-furanona, 4-hidróxi-3-metóxi-acetofenona), 1 álcool (2-furanometanol), 7 fenóis (fenol, 4-metilfenol, 3-etilfenol, 3,4-dimetilfenol, guaiacol, siringol, 4-metil-catecol), 1 furano (2,3-dihidrobenzofurano), 1 hidrocarboneto (dodecano), 1 ácido (ácido nonanóico) e 4 aldeídos (5-metilfurfural, 4-hidroxibenzaldeído, 4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina), 4-hidróxi-3,5-dimetoxibenzaldeído (siringaldeído)). Dois hidrocarbonetos poliaromáticos deuterados (naftaleno-d8 e acenafteno-d10) foram utilizados como padrões internos e uma mistura de *n*-alcano lineares C₆-C₃₀ (200 mg L⁻¹) foi empregada para cálculo do LTPRI.

As soluções estoque foram preparadas em metanol (para análise por HPLC) e em diclorometano (para análise em GCxGC) e foram armazenadas em refrigerador na temperatura de 5 °C.

Para análises por GCxGC/qMS, o gás He (pureza superior a 99,999%) e o N₂ líquido, utilizado no processo de modulação, foram adquiridos da White Martins (Salvador, BA, Brasil).

5.1.2 Amostra de biomassa

A casca de arroz (resíduo do processamento do arroz) foi fornecida pela empresa Adib Peixoto Ltda, localizada na cidade de Pelotas, RS, Brasil. A amostra de biomassa foi moída em moinhos de facas (MA340MF, Marconi, São Paulo) e através de peneiras, separada em uma fração com tamanho de partícula entre 40 e 60 *mesh*. Posteriormente a amostra foi seca em estufa na temperatura de 105 °C durante 24 horas, para remoção da umidade.

A fim de verificar em quais temperaturas ocorrem as maiores perdas de massa para a casca de arroz, procedeu-se à análise termogravimétrica (TGA, do inglês, *termogravimetric analysis*). Essa análise foi realizada em um equipamento TGA STA 449F3 (NETZSCH, Alemanha), utilizando-se 4,8 mg de amostra, temperatura inicial de 30 °C com taxa de aquecimento de 20 °C até temperatura final de 1000 °C. Todo o processo foi realizado sob atmosfera inerte (N₂).

5.1.3 Processo de pirólise

A pirólise da casca de arroz foi realizada no mesmo reator já descrito na **seção 3.1.4 do Capítulo III**. Entretanto nesta etapa do trabalho, procedeu-se à avaliação das condições do processo de pirólise. Duas variáveis principais (temperatura e fluxo de N₂) foram selecionadas para avaliar o processo. A seleção das variáveis baseou-se em estudos anteriores que também utilizaram um reator de leito fixo.^{39,42,70,136} Demais condições de pirólise foram mantidas constantes como seguem: 6,5 g de amostra, tamanho de partícula (40-60 *mesh*), taxa de aquecimento de 100 °C min⁻¹ e tempo de residência de 10 min na temperatura final (no qual não se observou mais geração de vapores de pirólise).

O rendimento em massa dos produtos de pirólise foi determinado pela pesagem dos produtos sólidos (*biochar*) e dos produtos líquidos (bio-óleo bruto) com referência ao peso inicial da amostra de biomassa. A água foi removida do bio-óleo bruto utilizando-se sulfato de sódio anidro p.a obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha) e o resíduo, pesado como bio-óleo anidro. Todos os rendimentos de bio-óleo foram calculados em base seca. O rendimento dos produtos não condensáveis (gases + perdas) foi calculado pela diferença entre o peso inicial da biomassa e a soma dos produtos líquidos (bio-óleo bruto) e produtos sólidos.

5.1.3.1 Delineamento experimental

A avaliação do processo de pirólise da casca de arroz foi baseada em estudo recente do grupo de pesquisa do LAAO, o qual empregou o mesmo reator utilizado no presente trabalho.¹¹⁹ Dessa forma, o delineamento composto central (CCD, do inglês *central composite desing*) foi empregado para determinar as melhores condições do processo de pirólise em relação ao rendimento de bio-óleo anidro e os resultados foram avaliados mediante a aplicação da RSM e análise de variância (ANOVA). A CCD consistiu em um planejamento fatorial 2² com 4 ensaios (2 x 2) mais 4 pontos axiais e 3

repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos. As repetições no ponto central fornecem uma estimativa do erro experimental e a repetibilidade dos dados.

Os experimentos foram realizados utilizando-se o rendimento de bio-óleo seco (anidro) como resposta na CCD e, como mencionado anteriormente, a temperatura (x_1) e fluxo de N_2 (x_2) foram escolhidos como variáveis independentes. As variáveis independentes foram codificadas para dois níveis fatoriais: +1 e -1 e os pontos axiais foram fixados em +1,41 (+ α) e -1,41 (- α). Todos os experimentos foram conduzidos em ordem aleatória. Os valores codificados e decodificados dos níveis selecionados das variáveis independentes, podem ser vistos na **Tabela IX**.

Tabela IX. Variáveis independentes e níveis utilizados para o CCD.

Variáveis independentes	símbolo	níveis				
		axial -1,41	-1	0	+1	axial 1,41
Temperatura de pirólise	x_1	579	600	650	700	720
Fluxo de N_2 (mL min ⁻¹)	x_2	29	50	100	150	170

Para análise dos dados foi usado o *software* STATISTICA versão 10.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, EUA). O modelo matemático (**Eq. 8**) foi ajustado para prever a resposta frente as variáveis avaliadas através de um polinômio de segunda ordem incluindo todos os termos bem como suas interações.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad \text{Equação 8}$$

Onde: Y é a resposta prevista, β_1 , β_2 , β_{11} e β_{12} são os coeficientes lineares, de interação e quadrático, respectivamente, e x_1 e x_2 são os valores codificados das duas variáveis independentes.

Verificou-se a significância do ajuste do modelo através da análise de variância (ANOVA), calculando o R^2 e o teste F foi empregado para avaliar a significância da regressão. Gerou-se a superfície de resposta e mediante as derivadas parciais da função obtida, definiu-se as condições operacionais ótimas de cada variável na produção de bio-óleo anidro, a partir da pirólise da casca de arroz.

5.1.4 Caracterização cromatográfica do bio-óleo

O bio-óleo bruto da casca de arroz gerado nas condições ótimas de pirólise foi caracterizado no presente estudo. Essa amostra consiste de duas fases imiscíveis: fase orgânica e fase aquosa, as quais foram separadas por simples decantação e a fase aquosa coletada sem qualquer pré-tratamento ou extração. Neste estudo ambas as fases foram caracterizadas qualitativamente e quantitativamente.

A amostra da fase aquosa foi diluída em água na proporção de 1:20 (v/v), submetida a filtração através de filtro de membrana de PTFE Chromafil de 0,20 µM e analisada por HPLC/DAD.

A amostra da fase orgânica (restante do bio-óleo bruto, após a remoção da fase aquosa) foi dissolvida em diclorometano a uma concentração de 10 000 mg L⁻¹ e analisada por GCxGC/qMS. Os dois ISs (naftaleno-d8 e acenafteno-d10) foram adicionados à solução da fase orgânica na concentração de 20 mg L⁻¹.

5.1.4.1 Análise por cromatografia líquida monodimensional

A análise cromatográfica da fase aquosa foi realizada em um sistema de HPLC (Shimadzu, Milão, Itália), constituído por uma bomba binária (equipada com um degaseificador DGU-20A), amostrador automático SIL-20A, forno CTO-20A e detector de arranjo de diodo SPD-M-20.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna Synergi Hydro-RP com as dimensões de 25 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 4 µm de diâmetro de partícula adquirida da Allcrom (São Paulo, RS), utilizando-se fluxo de fase móvel de 1 mL min⁻¹. A coluna Hydro-RP é caracterizada por elevada retenção de compostos polares e apolares e boa estabilidade em fase móvel aquosa. Como fase móvel utilizou-se (A) água e (B) metanol, eluídos com o seguinte gradiente: 0-5 min a 5% (B); 5-40 min de 5% a 35% (B); 35-55 min de 35% a 70% (B) gradiente mantido durante 5 min com posterior retomada da condição inicial. Volume de injeção de amostra foi de 10 µL e a temperatura do forno de 30 °C.

Os dados foram coletados na faixa de comprimento de onda de 200 a 700 nm e para a identificação e quantificação dos compostos, os cromatogramas foram extraídos a 280 nm. Todos os dados foram adquiridos e processados pelo software LC-Solution 1,25 (Shimadzu, Japão). A identificação dos compostos baseou-se na comparação entre o espectro de UV-Vis e o tempo de retenção dos picos dos compostos da amostra com os da mistura padrão. A mistura padrão para a análise qualitativa foi preparada por diluição da solução estoque (**seção 5.1.1**) na concentração final de 200 mg L⁻¹ em

metanol. Todos os compostos identificados foram devidamente quantificados através do método de padronização externa e suas concentrações foram expressas em mg L⁻¹.

5.1.4.1.1 Análise quantitativa por LC

O método utilizado na análise quantitativa (padronização externa através de curva de calibração) foi validado de acordo com os parâmetros de linearidade, LOD, LOQ e precisão (inter-dia e intra-dia). Novamente o protocolo de validação seguiu o procedimento adotado pela ANVISA.¹³¹

A linearidade foi avaliada no intervalo de concentrações entre 1 e 250 mg L⁻¹ e expressa através dos valores de R² obtidos para as curvas analíticas. A curva analítica foi construída adicionando-se alíquotas da solução estoque (500 mg L⁻¹) em diferentes concentrações em metanol. Todos níveis de concentrações da curva analítica (de 1 a 250 mg.L⁻¹) foram analisados em triplicata. O LOD e LOQ foram calculados usando os parâmetros da curva analítica: valores de desvio padrão do coeficiente linear (b) divididos pela média dos valores do coeficiente angular (a), multiplicados por 3,3 e 10, respectivamente. A precisão do método foi avaliada através da precisão intra-dia e da precisão inter-dia. A primeira, calculada através do valor do RSD% da área de seis injeções, do nível intermediário da curva analítica, realizadas no mesmo dia. A precisão intra-dia foi avaliada através do valor do RSD% da área de seis injeções, do nível intermediário da curva analítica, realizadas em três dias consecutivos.

5.1.4.2 Análise por cromatografia gasosa bidimensional abrangente

A análise cromatográfica da fase orgânica foi realizada em um sistema de GCxGC/qMS (Shimadzu QP2010 Ultra Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com um modulador criogênico ZX1- GCxGC (Zoex, Houston, TX, EUA) resfriado com N₂ líquido. A separação dos compostos foi realizada em um conjunto convencional de colunas: apolar na primeira dimensão DB-5 (60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de diâmetro de filme) e de polaridade intermediária na segunda dimensão DB-17ms (2,15 mm de comprimento, 0,18 mm de diâmetro interno e 0,18 µm de diâmetro de filme). A escolha do conjunto convencional de colunas foi baseada em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa que utilizaram o mesmo sistema de GCxGC em amostras similares às aqui estudadas.^{33,36}

As condições utilizadas no sistema de GCxGC foram: injetor (*split/splitless*) mantido a 280 °C, temperatura inicial do forno em 40 °C permanecendo por 5 min após a taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹ até 280 °C. O modo sem divisão de fluxo foi

utilizado na injeção de 1 µL da solução de 10 000 mg L⁻¹ da amostra da fase orgânica. Hélio foi utilizado como gás de arraste no fluxo de 1 mL min⁻¹. As condições cromatográficas utilizadas para o qMS foram: temperatura de interface e fonte de íons mantidas a 280 °C, modo varredura *full scan* com intervalo de massas de 45 a 280 Da, frequência de aquisição de 0,02 s correspondente à frequência de aquisição de dados de 50 Hz. Tal valor de aquisição de dados possibilitou a obtenção de mais de cinco modulações/pico, que é considerado um bom resultado para análise em GC×GC. Período de modulação foi de 5 s com tempo de jato quente de 0,3 s.

Todos os dados foram processados usando o software GC Image versão 2.2b1 (ZOEX Corporation, Houston, Texas, EUA). Para a identificação dos compostos utilizou-se: padrões, comparação entre os espectros de massa obtidos experimentalmente com os do banco de dados da biblioteca NIST-05 (assumindo um mínimo de 70% de similaridade espectral) e o índice de retenção segundo Van den Dool & Kratz, o qual foi calculado diretamente pelo software do equipamento. Diferença máxima de 20 unidades, entre os valores do LTPRI experimental e da literatura, foi considerada para a identificação tentativa dos compostos.³⁹ Em adição, procedeu-se à plotagem de gráficos de dispersão, utilizando-se o software *Microsoft Excel* (versão 2010), através dos dados de tempo de retenção dos compostos tentativamente identificados. Tal abordagem foi utilizada para avaliar a distribuição espacial das classes e subclasses químicas identificadas na fase orgânica, auxiliando, assim, na identificação tentativa dos compostos.

5.1.4.2.1 Análise quantitativa por GC×GC

Conforme apresentado previamente por Michailof *et al.*⁹³ a quantificação dos compostos presentes no bio-óleo pode ser realizada através dos valores do RF determinados experimentalmente a partir de uma mistura de calibração. Para os compostos identificados na amostra que não foram incluídos nessa mistura, suas concentrações podem ser calculadas usando o RF de um padrão presente na mistura e que apresente estrutura química semelhante ao composto alvo. Recentemente, Silva *et al.*⁴¹ também realizaram a quantificação de bio-óleos por semelhanças estruturais, usando o método de padronização interna.

Dessa forma, naftaleno-d8 e acenafteneno-d10 foram estabelecidos como ISs e adicionados à concentração constante de 20 mg L⁻¹ na mistura de calibração composta pelos 19 padrões, os quais estão descritos na **seção 5.1.1**, deste capítulo. Os padrões utilizados para a cálculo do RF são compostos comumente encontrados no bio-óleo e

são representativos das classes e subclasses presentes na amostra. Os RFs foram calculados para cada padrão de acordo com a **Equação 1 (seção 2.5.3.1)**. Os valores dos RF foram definidos para no mínimo cinco níveis dentro do intervalo de concentração de 5 a 200 mg L⁻¹ e a repetibilidade foi expressa como RSD% dos valores de RF dos cinco níveis. Avaliou-se a faixa linear do detector para cada composto, construindo-se curvas analíticas ($V_{\text{padrão}}/V_{\text{IS}}$ vs $C_{\text{padrão}}$) e a linearidade foi expressa através do R². Os dados de volume de pico, utilizados para os cálculos dos RFs e da curva analítica foram obtidos com base no modo de varredura *full scan*.

A fração em massa (m/m%) dos compostos tentativamente identificados foi então calculada com base nos resultados dos RFs e na massa utilizada na análise da amostra da fase orgânica (10 mg em 1 mL). A fim de estender a presente abordagem quantitativa, para compostos os quais não estavam disponíveis padrões autênticos utilizou-se os valores de RF de padrões relacionados estruturalmente. Abordagem similar, tem sido empregada com sucesso na literatura.^{41,93}

5.1.5 Fluxograma do procedimento experimental

A **Figura 22** apresenta o fluxograma representativo do procedimento experimental deste capítulo.

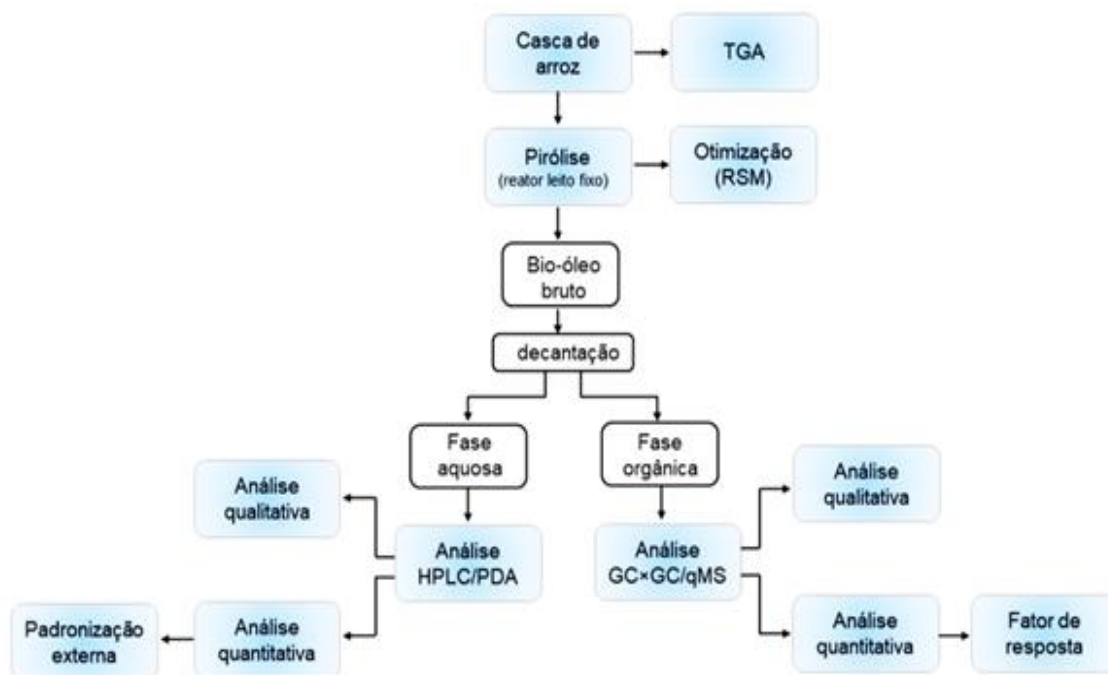


Figura 22. Fluxograma representativo do procedimento experimental empregado no Capítulo V.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.2.1 Análise termogravimétrica da biomassa

A **Figura 23** apresenta os dados de perda de massa *versus* temperatura da casca de arroz.

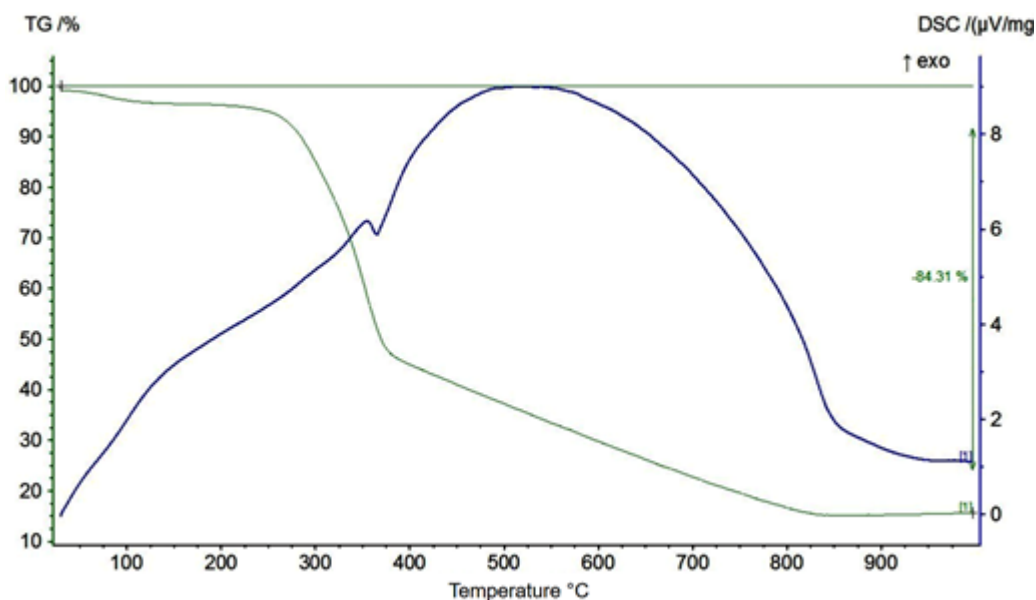


Figura 23. Resultados do TGA e da derivada termogravimétrica (DTG, do inglês *thermogravimetric derivate*) da casca de arroz.

A partir da análise de TGA, foram observados três estágios de perda de massa (%) para a amostra de casca de arroz. O primeiro estágio (até 110 °C) pode ser atribuído a perdas de CO₂ e água e os demais estágios são atribuídos a degradação dos componentes da biomassa (hemicelulose, celulose e lignina).⁵² Os estágios de maior perda de massa da casca de arroz ocorreram entre as temperaturas de 200 e 350 °C (cerca de 45%) e entre as temperaturas de 350 e 800 °C (cerca de 40%). Observa-se que até a temperatura de 700 °C cerca de 80% da massa inicial da amostra foi degradada. Através do resultado do TGA, definiu-se a faixa de testes para as temperaturas finais de pirólise, para o segundo planejamento, em 600 °C, 650 °C e 700 °C, temperaturas nas quais observa-se elevada perda de massa para a casca de arroz.

5.2.2 Processo de pirólise: avaliação dos parâmetros por RSM

A metodologia de avaliação através da superfície de resposta é uma técnica que explora a relação entre variáveis independentes e respostas.⁶⁷ A RSM baseada no CCD foi empregada para determinar as melhores condições de pirólise de duas variáveis

independentes (temperatura (x_1) e fluxo de N_2 (x_2)) na resposta y (rendimento de bio-óleo de casca de arroz). Os valores experimentais obtidos para o rendimento de bio-óleo conforme variáveis e níveis utilizados na CCD estão descritos na **Tabela X**.

Tabela X. Variáveis e níveis utilizados para o CCD, bem como os valores experimentais observados para a resposta (rendimento de bio-óleo %).

Experimento	variáveis independentes				variável dependente (resposta)
	x_1 (Temperatura (°C))		x_2 (Fluxo de N_2 (mL min ⁻¹))		
	valor	código	valor	código	Y (observado)
1	600	-1	50	-1	14,6
2	700	1	50	-1	12,9
3	600	-1	150	1	10,9
4	700	1	150	1	13,1
5	579	-1,41	100	0	11,9
6	720	1,41	100	0	11,1
7	650	0	29	-1,41	12,4
8	650	0	170	1,41	13,6
9	650	0	100	0	15,8
10	650	0	100	0	16,6
11	650	0	100	0	15,9

Empregando-se os valores do rendimento de bio-óleo no *software* STATISTICA obteve-se a equação polinomial de segunda ordem (**Eq. 9**) para o modelo quadrático, a qual representa a resposta predita pelo modelo (\hat{y}) como uma função das variáveis independentes (x_1 e x_2).

$$\hat{y} = (16.10) - (2.14)x_1^2 - (1.39)x_2^2 \quad \text{Equação 9}$$

A **Tabela XI** apresenta os valores do rendimento de bio-óleo preditos pelo modelo (utilizando a equação supracitada) comparados aos valores obtidos experimentalmente e os resultados da análise de variância, que foi usada para verificar o ajuste dos dados ao modelo quadrático e a significância estatística de cada termo na equação. A significância estatística foi verificada pelo teste F, considerou-se valores de F ao nível de 95% de confiabilidade e valores de p menores que 0,05.

Boa concordância foi observada entre os valores da resposta preditos pelo modelo e os valores obtidos experimentalmente (**Tab. XIa**). Além disso, os resultados da análise de variância (**Tab. XIb**) demonstram que o uso do modelo quadrático ajustado foi adequado ($F = 6,95$ e $p = 0,026$). A adequação do modelo ajustado também é confirmada pelo coeficiente de determinação ($R^2 = 87,28\%$) e pelo valor de F para a falta de ajuste.

Tabela XI. Resultados da pirólise em termos de rendimento em bio-óleo. (a) Rendimento de bio-óleo observados experimentalmente e preditos pelo modelo para todos níveis das variáveis independentes e (b) Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático.

(a) Rendimento de bio-óleo				(b) Análise de variância (ANOVA)					
variáveis independentes		variável dependente (resposta) rendimento em bio-óleo (%)		Fonte de variação	Graus de liberdade	SQ	MQ	F	p
Temperatura	Fluxo de N ₂	Observado ^a	Predito ^b						
(°C)	(mL min ⁻¹)	(y)	(\hat{y})						
600	50	14,6	13,83	Modelo	5	33,4799	6,7589	6,95	0,026
700	50	12,9	11,72	x ₁	1	-0,0452	0,0452	0,05	0,838
600	150	10,9	11,46	x ₂	1	-0,3929	0,3929	0,4	0,553
700	150	13,13	13,24	x ₁ ²	1	18,5551	25,9066	26,64	0,004
579	100	11,9	11,93	x ₂ ²	1	10,9401	10,9401	11,25	0,02
720	100	11,1	11,72	x ₁ x ₂ ²	1	3,8612	3,8612	3,97	0,103
650	29	12,4	13,64	Resíduos	5	4,8624	0,9725		
650	170	13,6	13,01	Falta de ajuste	3	4,4824	1,941	7,86	0,115
650	100	15,8	16,09	Erro puro	2	0,38	0,19		
650	100	16,6	16,09	Total	10	38,657			
650	100	15,9	16,09	R ² = 87,28%					

(a) Valores experimentais observados para a variável resposta; (b) Valores preditos pelo modelo para a variável resposta.

O valor de R² indicou que a variação total no rendimento de bio-óleo foi atribuído as variáveis independentes estudadas e a falta de ajuste foi considerada insignificante, valor de p superior a 0,05. Esses resultados comprovam que não há variação não explicada pelo modelo bem como o bom ajuste do modelo aos dados.

Em relação à significância estatística das duas variáveis independentes, os resultados da ANOVA indicam que apenas os termos quadráticos associados a ambas as variáveis, temperatura (x₁²) e fluxo de N₂ (x₂²) são significativos no rendimento de bio-óleo, os quais apresentaram valores de p igual a 0,004 e 0,020, respectivamente.

Devido ao menor valor de p para o termo quadrático (x_1^2), a temperatura foi selecionada como a variável de maior influência no rendimento de bio-óleo da casca de arroz. Morali *et al.*¹³⁶ e Matilla *et al.*¹³⁷ também observaram que a temperatura é a variável que mais afeta o rendimento de bio-óleo, seguida pelo fluxo de gás de arraste.

Uma vez que, o modelo quadrático se apresenta adequado para a predição do rendimento de bio-óleo da casca de arroz em função das variáveis independentes estudadas, a equação polinomial ajustada (**Eq. 9**) foi utilizada para a construção de uma superfície de resposta. A **Figura 24** apresenta o gráfico da superfície de resposta no qual se observa a interação de ambas variáveis independentes no rendimento de bio-óleo.

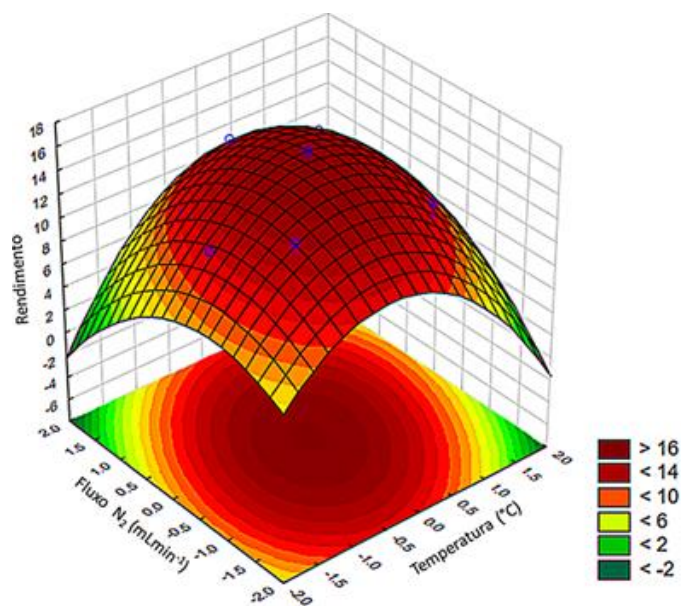


Figura 24. Gráfico da superfície de resposta da interação das variáveis independentes (temperatura e fluxo de N_2) no rendimento de bio-óleo.

A partir do modelo validado (**Fig. 24**) foi possível definir a combinação dos parâmetros ótimos para obter o máximo rendimento de bio-óleo. Para tanto, a função associada ao modelo ajustado foi derivada, para cada variável, e a expressão obtida igualada a zero. Logo, o rendimento máximo de bio-óleo é alcançado na temperatura de 650 °C e no fluxo de N_2 de 100 mL min^{-1} , sendo o rendimento de bio-óleo predito pelo modelo nessas condições de 16,9%. A fim de confirmar a veracidade do valor predito procedeu-se pirólises em triplicata nas condições ótimas e os resultados dos rendimentos de bio-óleo gerados foram de 16,1%, 15,8% e 17,1%.

Esses valores apresentaram um RSD% inferior a 4,2, indicando que o valor experimental está de acordo com o valor predito pelo modelo. Referente ao rendimento dos demais produtos de pirólise nas condições descritas como ótimas, obteve-se 36,1% e 30,2% de *biochar* e gases não condensáveis, respectivamente.

Analisando-se a temperatura encontrada como ótima (650 °C) pelo modelo para obter o maior rendimento de bio-óleo, observa-se que essa concorda com os resultados da análise de TGA. Elevada perda de massa da casca de arroz (75% da massa inicial) é observada até a temperatura de 650 °C. Tal resultado também está de acordo com estudo prévio de Moraes *et al.*³¹ no qual foi empregado mesmo reator de leito fixo, obtendo rendimento máximo de bio-óleo bruto (água + bio-óleo) de 27,3% a 700 °C. Após 650 °C, o rendimento de bio-óleo apresenta diminuição, tal comportamento ocorre principalmente devido a reações secundárias (quebra e rearranjo) dos vapores de pirólise em altas temperaturas, o que contribui para o aumento do produto gasoso e possível diminuição dos demais produtos.

No caso da variável fluxo de N₂, o valor descrito como ótimo (100 mL min⁻¹) concorda com estudos da literatura, nos quais também se empregou reator de leito fixo para produção de bio-óleo para diferentes biomassas.^{70,136}

Diversos estudos têm sido descritos na literatura referente a pirólise da casca de arroz usando diferentes tecnologias e condições de pirólise. Betemps *et al.*¹³⁸ empregando reator de leito fixo obteve rendimento de 38,9% de bio-óleo de casca de arroz, na temperatura de 500 °C. Usando um reator de leito fluidizado, um máximo de rendimento de bio-óleo de 56% a 465 °C foi reportado por Zheng *et al.*¹³⁹. Alvarez *et al.*⁵⁰ produziram bio-óleo de casca de arroz através de reator conico, obtendo máximo rendimento de bio-óleo de 70% na temperatura de 450 °C. Em pesquisa recente de Cai *et al.*¹⁴⁰ a pirólise de casca de arroz foi estudada usando uma planta de escala comercial com reator de leito fluidizado circulante; nas condições adequadas de pirólise (550 °C) o máximo rendimento de bio-óleo foi de 47,7%. Raymundo⁴, desenvolveu uma planta de pirólise rápida em reator de leito fluidizado. Para a biomassa casca de arroz, obteve um rendimento de produto líquido (água + bio-óleo) de 46 % na maior temperatura avaliada (600 °C), sendo o rendimento de bio-óleo posterior remoção de água de 26%.

Deve-se levar em conta que, geralmente, os resultados dos estudos da literatura são baseados no rendimento do bio-óleo bruto (água + bio-óleo), não há separação da fase aquosa, descrevendo assim, um rendimento maior de bio-óleo do que na presente tese. Entretanto, se tomarmos o rendimento incluindo todo o produto líquido (bio-óleo + água), obteve-se 38,5% a 650 °C e 100 mL min⁻¹ de N₂, o qual é um valor mais semelhante aos estudos da literatura, porém não é adequado, pois incluem-se valores elevados de água.

5.2.3 Caracterização do bio-óleo

5.2.3.1 Análise por cromatografia líquida monodimensional

A amostra da fase aquosa derivada do bio-óleo bruto da casca de arroz foi analisada por HPLC/DAD, como descrito na **seção 5.1.4.1**. A principal vantagem do uso do sistema de HPLC para análise da fase aquosa é a possibilidade de injeção direta da amostra evitando qualquer passo de extração preliminar que é necessário para a análise no sistema de GC. Além disso, o uso do detector DAD permite a detecção de um espectro inteiro simultaneamente, fornecendo informações qualitativas sobre a amostra.

5.2.3.1.1 Análise qualitativa e quantitativa

A **Figura 25** apresenta o cromatograma, extraído a 280 nm, resultante da análise da fase aquosa por HPLC/DAD. As estruturas químicas dos compostos identificados também são apresentadas. O comprimento de onda (280 nm) mostrou-se adequado para a identificação e quantificação das famílias químicas dos compostos sob investigação.

Como pode ser visto na **Figura 25**, foi possível identificar dez compostos na amostra da fase aquosa, incluindo os picos que apresentam as maiores áreas. Todos os picos identificados foram confirmados por injeção de padrão e quantificados usando padronização externa. No **Anexo 3 (Fig. A4)** tem-se os espectros de Uv-Vis dos compostos identificados em comparação com os respectivos espectros dos compostos padrões.

No que diz respeito à análise quantitativa, na **Tabela XII** observa-se as figuras de mérito do método quantitativo desenvolvido, bem como as concentrações dos compostos identificados na fase aquosa. As curvas relativas a cada um dos padrões acrescentados na mistura de calibração e usadas na análise quantitativa estão descritas no **Anexo 3 (Fig. A3)**.

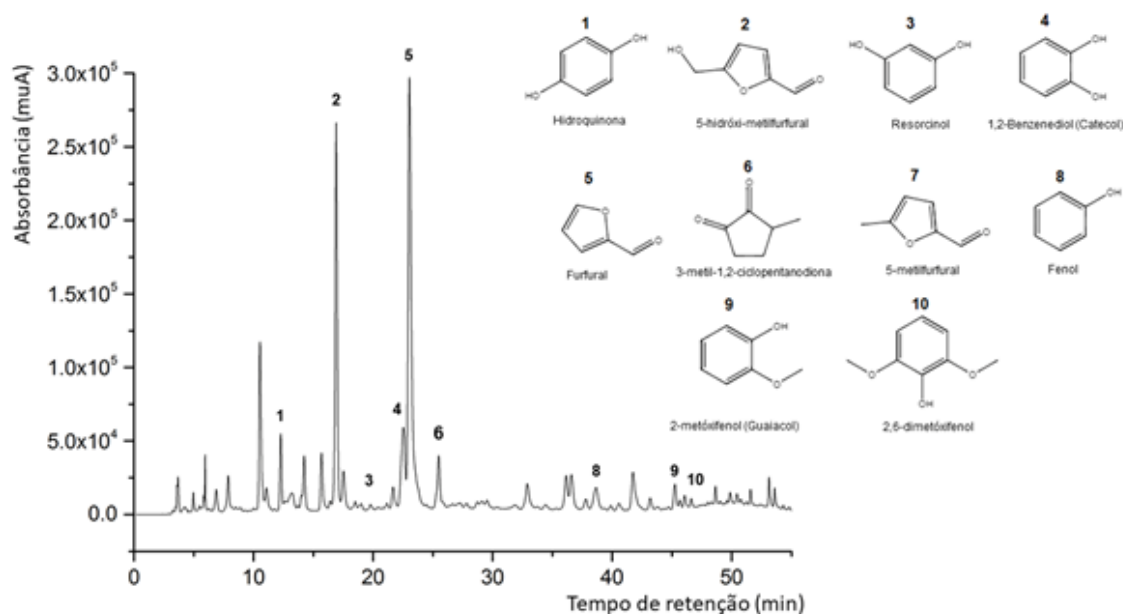


Figura 25. Análise por HPLC/DAD ($\lambda = 280$ nm) da fase aquosa oriunda do bio-óleo da casca de arroz. As estruturas químicas dos compostos identificados são destacadas.

Tabela XII. Figuras de mérito do método desenvolvido por HPLC/DAD e análise quantitativa dos compostos identificados.

Composto	Intervalo de validação (mg L ⁻¹) ^a	R ²	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	Precisão		Concentração (mg L ⁻¹) \pm SD ^b
					intra-dia RSD (%)	inter-dia RSD (%)	
1 Hidroquinona	10-250	0,998	0,01	0,02	5,31	5,24	899,30 \pm 0,01
2 5-(hidróximetil)furfural	1-150	0,999	0,17	0,53	5,41	5,05	676,36 \pm 0,03
3 Resorcinol	1-250	0,999	0,46	1,39	5,51	2,99	101,75 \pm 0,12
4 1,2-benzenodiol (catecol)	10-250	0,998	0,37	1,15	0,65	3,12	2063,65 \pm 1,9
5 Furfural	1-100	0,998	0,19	0,58	0,09	0,44	997,55 \pm 0,39
6 3-metil-1,2-ciclopentanodiona	10-250	0,999	0,89	2,71	5,45	3,23	720,57 \pm 0,16
7 5-metilfural	5-75	0,998	0,97	2,96	4,92	3,56	113,13 \pm 0,13
8 Fenol	5-150	0,999	0,23	0,71	5,27	5,06	551,60 \pm 0,04
9 2-metóxi-fenol (guaiacol)	1-150	0,999	0,02	0,07	5,17	3,16	457,16 \pm 0,19
10 2,6-dimetóxi-fenol	1-60	0,998	0,31	0,95	6,12	5,10	874,33 \pm 0,94

(a) Curva de calibração construída contendo, no mínimo, 6 níveis de concentração; (b) SD obtido para n=3.

Conforme visto na **Tabela XII**, o método quantitativo apresentou boa linearidade, para o intervalo de concentração estudado, com valores de R² de 0,998 e 0,999. Quanto a precisão, valores de RSD% para a precisão intra-dia não excederam 5,51, exceto para o composto 2,6-dimetóxi-fenol (siringol), o qual apresentou valor de RSD% igual a 6,12. Para a precisão inter-dia os valores de RSD% não excederam 5,24. Logo, os resultados de RSD% para a precisão do método estão ligeiramente acima dos valores aceitos (RSD% de 5) para métodos de elevada qualidade pela ANVISA.¹³¹

O LOD do método variou de 0,01 mg L⁻¹ para a hidroquinona a 0,97 mg L⁻¹ para o 5-metilfurfural enquanto o LOQ variou de 0,02 mg L⁻¹ a 2,96 mg L⁻¹ para os mesmos compostos mencionados. Considerando-se os resultados de linearidade, precisão, LOD, LOQ o método desenvolvido pode ser empregado para a quantificação da fase aquosa oriunda do bio-óleo de casca de arroz.

5.2.3.1.2 Composição química fase aquosa

Através da análise por HPLC/DAD foi evidenciado elevada concentração de compostos pertencentes às classes químicas dos aldeídos, cetonas e benzenodióis na amostra da fase aquosa. Como pode ser observado na **Tabela XII**, o 1,2-benzenodiol (catecol) foi o composto majoritário (2063 mg L⁻¹) seguido pelo furfural (997 mg L⁻¹), hidroquinona (899 mg L⁻¹), 2,6-dimetóxfenol (874 mg L⁻¹), 3-metil-1,2-ciclopentanodiona (720 mg L⁻¹) e 5-(hidróximetil)furfural (676 mg L⁻¹). Demais compostos identificados apresentaram concentrações entre 101 e 551 mg L⁻¹. Observa-se que, para o furfural foram identificados os três compostos, furfural (997 mg L⁻¹), 5-(hidróximetil)furfural (676 mg L⁻¹) e 5-metilfurfural (113 mg L⁻¹).

Tomando-se em conta os dados obtidos aqui, pela análise por 1D-LC, e comparando-os com os resultados das análises por LC×LC, apresentadas no **Capítulo IV**, como esperado, verifica-se a maior capacidade de pico da técnica 2D. Através da LC×LC identificaram-se na fase aquosa de casca de arroz 21 compostos enquanto por 1D-LC, para essa mesma amostra, foram identificados 10 compostos. O maior número de compostos identificados na 2D-LC, deve-se também ao emprego do detector MS, o qual proporcionou, além da identificação com padrões comerciais, informações qualitativas importantes para a identificação tentativa dos compostos.

No que diz respeito a análise quantitativa, em ambas técnicas, o composto 1,2-benzenodiol foi majoritário na amostra, seguido pelo furfural. Os compostos 5-(hidróximetil)furfural, 3-metil-1,2-ciclopentanodiona e 2,6-dimetóxfenol também apresentaram elevada concentração. Entretanto, torna-se difícil uma comparação entre os valores absolutos de concentração obtidos para cada uma das técnicas, devido ao emprego de diferentes condições de pirólise, colunas e sistemas de LC.

De um modo geral, considerando-se os resultados obtidos pelo método 1D-LC/DAD para a análise da fase aquosa da casca de arroz, observa-se que este método pode ser empregado visando informações qualitativas/quantitativas em termos de compostos majoritários na amostra, devido a rápida otimização do método, fácil operação e resultados satisfatórios obtidos. Por outro lado, objetivando-se uma caracterização detalhada da amostra, a técnica de 2D-LC torna-se a melhor escolha, pois possui uma maior capacidade de pico. Além disso, essa técnica apresentou

excelentes separações para outras amostras de fases aquosas com diferentes perfis cromatográficos, as quais: sementes de crambe, casca de mandioca e *silverskin* de café (**Fig. 20x,k,l e m, Capítulo IV**), para essas amostras o emprego da separação em somente uma dimensão não possibilitaria a identificação dos compostos sem possíveis coeluições.

5.2.3.2 Análise por cromatografia gasosa bidimensional abrangente

A **Figura 26** apresenta os diagramas de cores da análise por GC×GC/qMS resultantes da **(a)** mistura de calibração e da **(b)** amostra da fase orgânica. Conforme observado nas **Figura 26a e b**, a escolha do período de modulação e do conjunto convencional de colunas permitiu o eficiente uso do espaço cromatográfico. Além disso, os dois ISs escolhidos (naftaleno-d8 e acenafteno-d10) não se sobrepuseram com nenhum dos picos presentes na amostra. Os ISs foram selecionados com base na natureza aromática dos bio-óleos e assumindo que os compostos deuterados não estão presentes na composição do bio-óleo.

Analisando-se os diagramas de cores da GC×GC/qMS, observa-se uma elevada complexidade da amostra da fase orgânica e uma clara visão do grande número de picos separados na segunda dimensão, os quais aparecem co-eluídos na primeira dimensão. Alguns picos de elevada intensidade somente foram separados na ²D como é o caso dos picos 3 e 4, picos 15 e 16 e picos 22 com o pico do IS.

5.2.3.2.1 Análise qualitativa

O número de compostos tentativamente identificados na amostra da fase orgânica foi 98 dos quais 15 foram confirmados com injeção de padrões e 48 foram tentativamente identificados pelo sistema de LTPRI. Uma das vantagens da análise por GC×GC é a distribuição espacial ordenada das classes químicas presentes na amostra, uma vez que, compostos com estruturas similares eluem em áreas específicas do espaço bidimensional. A análise da distribuição espacial é útil para relatar a composição global do bio-óleo, além de auxiliar na análise qualitativa. O uso de gráficos de dispersão facilita a análise da distribuição espacial conforme relatado em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa.^{36,39} Assim, gráficos de dispersão (**Fig. 27**) foram plotadas utilizando-se os tempos de retenção dos compostos tentativamente identificados através do software *Excel*TM. A informação contida nesses gráficos é somente qualitativa. A **Figura 27a** apresenta a distribuição espacial de todas as classes químicas identificadas na amostra da fase orgânica.

Conforme observado nessa figura, as cetonas e os fenóis (pontos em vermelho e amarelo) são majoritários na fase orgânica, seguidos pelos açúcares (pontos azuis),

ácidos (pontos verdes) e aldeídos (pontos cinza). Demais classes identificadas apresentaram número de compostos menor que cinco.

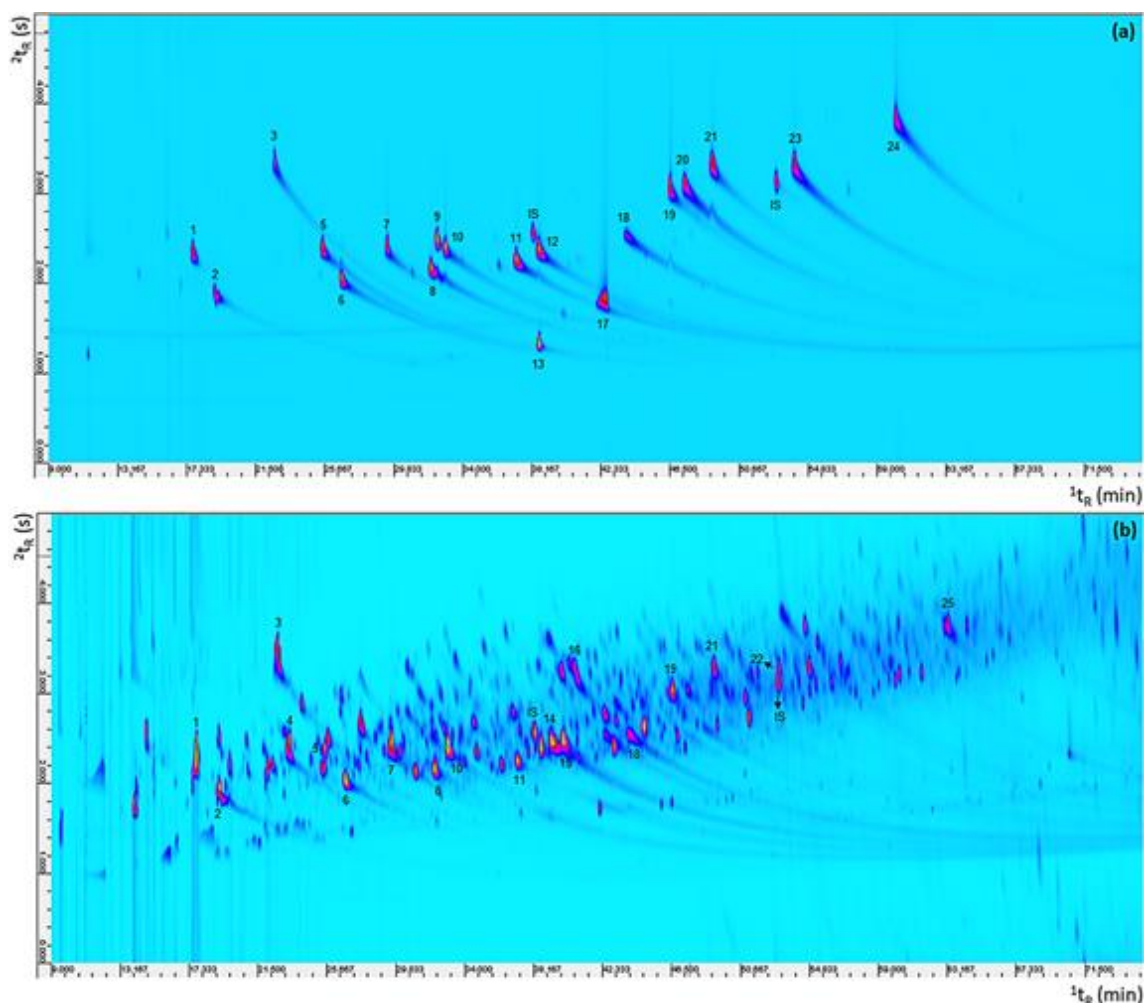


Figura 26. Diagramas de cores da análise por GCxGC/qMS. (a) mistura de calibração e (b) amostra da fase orgânica com os compostos majoritários destacados.

(1) 2-ciclopenten-1-ona; (2) 2-furanmetanol; (3) 2(5H)-furanona; (4) 1,2-ciclopentanodiona; (5) 5-metilfurfural; (6) fenol; (7) 3-metil-1,2-ciclopentanodiona; (8) 4-metilfenol; (9) 2,3-dihidrobenzofurano; (10) 2-metóxi-fenol; (11) 3-etilfenol; (12) 3,4-dimetilfenol; (13) dodecano; (14) benzofurano; (15) 1,2-benzenediol; (16) 5-(hidróximetil)furfural; (17) ácido nonanóico; (18) 4-metil-1,2-benzenediol; (19) 2,6-dimetóxi-fenol; (20) 4-hidroxibenzaldeído; (21) 4-hidróxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina); (22) hidróxi-metóxiacetofenona; (23) 4-hidróxi-3-metóxiacetofenona; (24) 4-hidróxi-3,5-dimetoxibenzaldeído (siringaldeído); (25) hidróxi-metóxi-fenilpropenal.

A distribuição detalhada dos fenóis (aquil, metóxi e benzenodióis) e das cetonas (cetonas cíclicas) demonstra que as diferentes subclasses químicas são estruturalmente organizadas, como pode ser observado na **Figura 27b** e **c**. É claro a partir da **Figura 27b** que os fenóis são eluídos de acordo com o número de carbonos da cadeia lateral. Metóxi fenóis (derivados do guaiacol) e benzenodióis (derivados do catecol) aparecem em maior tempo de retenção na 2D , devido a maior polaridade desses compostos quando comparados aos alquil fenóis. Os dimetóxi fenóis (derivados do

siringol) apresentam os maiores tempos de retenção na 2D (2,5 a 2,6 s) dentre a classe dos fenóis.

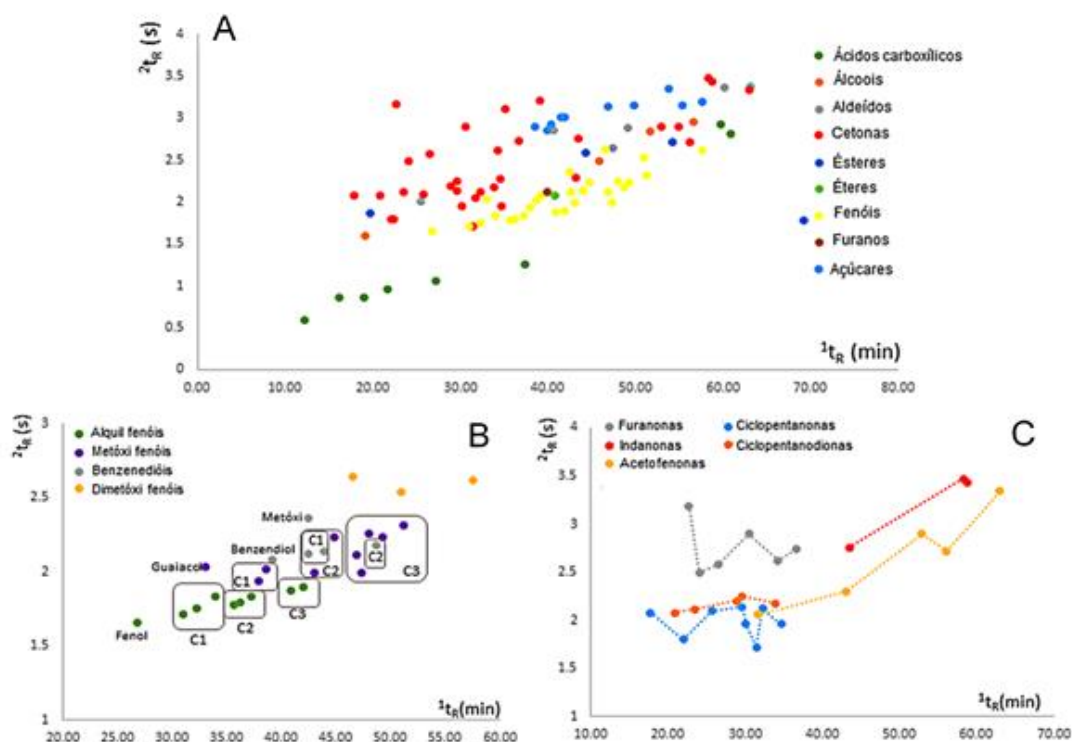


Figura 27. Gráficos de dispersão das classes químicas identificadas na fase orgânica (a) amostra total, (b) fenóis e (c) cetonas cíclicas.

No que diz respeito à distribuição das cetonas cíclicas (**Fig. 27c**), as ciclopentenonas e as ciclopentanodionas eluem em mesma região do espaço bidimensional, enquanto as furanonas e indanonas (lactonas) eluem em tempo de retenção maior na 2D , quando comparadas as demais cetonas cíclicas. No caso de açúcares (pontos em azul), o uso de gráficos de dispersão auxiliou em sua identificação, pois esses compostos apresentarem agrupamento no espaço bidimensional, a grande maioria dos açúcares não possui valor de LTPRI no banco de dados da NIST, o que dificulta a sua identificação (<http://webbook.nist.gov/>).

A composição do bio-óleo de casca de arroz tem já sido estudada usando GC/qMS e GCxGC/TOFMS. Através da GC/qMS, Tsai *et al.*¹⁴¹ tentativamente identificaram 23 compostos (principalmente ácidos carboxílicos, fenóis e cetonas) no bio-óleo de casca de arroz. Alvarez *et al.*⁵⁰ investigaram o bio-óleo de casca de arroz oriundo da pirólise rápida em reator cônico, tentativamente identificando mais de 60 compostos (principalmente fenóis e cetonas). Recentemente, Cai *et al.*¹⁴⁰ também usando a GC/qMS estudaram a composição química do bio-óleo da pirólise rápida da casca de arroz, fenóis foram a classe mais abundante seguido pelas cetonas.

Por outro lado, através da GC×GC/TOFMS, Moraes *et al.*³¹ tentativamente identificaram 106 compostos no bio-óleo de casca de arroz. Como classes majoritárias, identificaram os fenóis (29 compostos) e cetonas (38 compostos). Esses resultados estão de acordo com os encontrados no presente estudo. O elevado número de compostos identificados por GC×GC mostram a superioridade analítica desta técnica quando comparada a técnicas monodimensionais, em termos de separação, seletividade e sensibilidade.

5.2.3.2.2. Análise quantitativa

A **Tabela XIII** apresenta os valores dos RFs para cada padrão incluído na mistura de calibração. Os resultados de RSD% e do R^2 da curva analítica também são apresentados. Como pode ser observado na **Tabela XIII**, os valores do RF variaram entre 0,32 para o 2-furanmetanol a 1,20 para o 3,4-dimetilfenol. Os compostos pertencentes à mesma classe química apresentaram valores de RF semelhantes, como é o caso das cetonas cíclicas, aquil fenóis, metóxi fenóis e hidróxi metoxibenzaldeídos.

Quanto à repetibilidade do RF, os valores do RSD% foram satisfatórios mostrando-se inferiores a 10%.¹³¹ A linearidade foi evidenciada pelos valores de R^2 os quais encontram-se entre 0,9838 - 0,9981. Essa abordagem é útil, uma vez que o valor do RF é avaliado para diferentes relações $V_{pad}C_{IS} / C_{pad}V_{IS}$ e a linearidade do detector também é checada. Neste estudo, apenas os compostos identificados na amostra que apresentaram área dentro da região linear foram quantificados.

Todos os padrões incluídos na mistura de calibração foram identificados e quantificados na fase orgânica, exceto quatro (ácido nonanóico, dodecano, 2,3-dihidrobenzofurano e 3,4-dimetilfenol). Tais padrões foram mantidos na mistura de calibração pois são representativos de classes químicas presentes no bio-óleo. A elevada complexidade do bio-óleo torna difícil realizar a quantificação de todos os analitos presentes na amostra com padrões autênticos. Assim, os compostos identificados na amostra, para os quais não se tinha padrões, foram quantificados através do RF de padrões com semelhanças estruturais e pertencentes à mesma subclasse química. Essa abordagem permitiu a quantificação de 62 compostos dos 98 compostos identificados. É importante conseguir uma boa quantificação dos compostos mais importantes na amostra para poder definir o potencial uso do bio-óleo.

Michailof *et al.*⁹³ apresentaram método de quantificação de bio-óleo por GC×GC/TOFMS usando os RF calculados para 39 padrões. A análise quantitativa foi aplicada para amostras de bio-óleos oriundas da pirólise térmica e catalítica da celulose, lignina, xilano e suas misturas. Empregando o método desenvolvido, os autores quantificaram entre 11 e 38% do bio-óleo total.

Tabela XIII. Valores dos RFs calculados para cada composto presente na mistura de calibração.

PADRÕES	RF ^a	Intervalo de validação (mg L ⁻¹) ^b	R ²	RF Repetibilidade (RSD%) ^b	Parâmetros curva analítica (coef.angular/coef.linear)
2-ciclopenten-1-ona	0,47	20-100	0,994	3,92	0,571/-0,458
3-metil-1,2-ciclopentanodiona	0,48	20-100	0,996	5,52	0,594/-0,454
2(5H)-furanona	0,46	40-120	0,99	9,74	0,582/-0,530
4-hidróxi-3-metóxiacetofenona	1,05	5-100	0,997	6,96	0,993/0,204
2-furanmetanol	0,32	20-120	0,997	6,38	0,365/-0,223
Fenol	0,50	20-150	0,984	4,46	0,553/-0,286
4-metilfenol	0,90	5-80	0,992	2,49	0,970/-0,201
3-etilfenol	0,96	5-80	0,992	2,16	0,945/0,055
3,4-dimetilfenol	1,20	5-80	0,988	9,17	1,279/-0,112
2-metóxi-fenol (guaiacol)	0,52	5-120	0,996	1,22	0,522/-0,004
2,6-dimetóxi-fenol	0,60	5-80	0,992	2,04	0,512/0,302
4-metil-1,2-benzenodiol	0,90	20-120	0,998	2,49	0,618/-0,451
2,3-dihidrobenzofurano	0,37	60-200	0,994	9,90	0,219/0,982
ácido nonanóico	0,96	5-100	0,998	9,02	0,985/-0,111
5-metilfurfural	0,44	20-150	0,990	2,73	0,466/-0,162
4-hidróxi-benzaldeído	0,96	5-80	0,997	3,20	1,049/-0,092
4-hidróxi-3-metóxi-benzaldeído (vanilina)	0,79	20-120	0,989	9,57	0,421/1,254
Benzaldeído, 4-hidróxi-3,5-dimetóxi-(siringaldeído)	0,82	5-100	0,990	8,34	0,770/0,198

(a) Média dos RFs obtidos para no mínimo 5 níveis de concentração; (b) Curva de calibração construída contendo, no mínimo, 5 níveis de concentração; (c) RSD calculado a partir dos valores dos RFs

5.2.3.2.3 Composição química fase orgânica

A relação detalhada dos compostos tentativamente identificados na amostra, bem como os padrões e valores de RF utilizados para a quantificação de cada composto está descrita no **Anexo 3 (Tab. AII)**. Na Tabela presente nesse anexo também se apresenta uma comparação entre o método de normalização interna considerando-se o valor do RF (área percentual de cada composto multiplicado pelo RF correspondente) e o mesmo método desconsiderando o valor de RF. Observa-se através dessa comparação, pequena diferença entre os valores das áreas percentuais, calculadas pelos dois métodos para as classes químicas presentes no bio-óleo. A maior diferença foi encontrada na classe dos fenóis, valores de 43,5% (considerando-se os valores de RF) e 49,3% (desconsiderando-se os valores de RF) e dos ácidos lineares para os quais o valor de área % quase dobrou quando calculada desconsiderando-se o RF.

As concentrações (% em massa) dos dez compostos majoritários e das classes químicas identificadas na fase orgânica são apresentadas na **Tabela XIV**.

O composto benzofurano foi quantificado a partir do RF do padrão 2,3-dihidrobenzofurano, e corresponde ao composto majoritário na amostra da fase

orgânica (1,37%). O 1,2-benzenodiol (catecol) e o 2-furanometanol também apresentaram concentração superior a 1%. Demais compostos majoritários apresentaram concentrações entre 0,99 - 0,74%. Dos dez compostos majoritários, seis foram quantificados usando padrões autênticos.

Tabela XIV. Resultados quantitativos da análise da fase orgânica, em termos de (a) classes químicas detectadas e (b) dez compostos majoritários.

(a) Classes químicas	Concentração (% em massa)	(b) Compostos	Concentração (% em massa)
Ácidos carboxílicos	0,2	Benzofurano	1,37
Álcoois	1,21	1,2-benzenodiol	1,27
Aldeídos	1,47	2-furanmetanol	1,21
Furanos	1,37	2-ciclopenten-1-ona	0,99
Açúcares	nq*	2(5H)-furanona	0,93
Ciclopentanonas	3,02	4-metil-1,2-benzenodiol	0,86
Ciclopentanodionas	1,19	2-metóxiifenol (guaiacol)	0,81
Furanonas	1,41	1,2-ciclopentanodiona	0,76
Acetofenonas	0,28	Fenol	0,76
Total Cetonas	5,9	5-(hidróximetil)furfural	0,74
Alquil fenóis	1,77		
Metóxi fenóis	3,53		
Benzenodióis	2,9		
Total Fenóis	8,21		

n.q. não quantificados no presente estudo

Fenóis e cetonas são maioria na fase orgânica com 8,21 e 5,90%, respectivamente. Todas as cetonas tentativamente identificadas e quantificadas corresponderam a cetonas cíclicas ou aromáticas, pertencentes às subclasses das ciclopentanonas, ciclopentanodionas, furanonas e acetofenonas. Dentre estas, as ciclopentanonas (51%) são a subclasse majoritária na fase orgânica enquanto as acetofenonas (4%) a minoritária. As ciclopentanodionas e as furanonas mostram-se próximo a 44% das cetonas. As ciclopentanonas e as demais cetonas cíclicas são derivadas principalmente da degradação da hemicelulose e da celulose presentes na biomassa, as quais na casca de arroz estão presente de 28,6% a 41,5% (celulose) e de 14,0% a 28,6% (hemicelulose).^{34,49}

Referente à distribuição dos compostos fenólicos quantificados, observa-se que 42% são metóxi fenóis (derivados do guaiacol), 35% benzenodióis (derivados do Catecol e hidroquinona) e 21% alquil fenóis. Assim, os compostos fenólicos são principalmente metoxilados, tendo o 2-metóxiifenol (guaiacol) como composto majoritário. Compostos fenólicos são derivados da degradação da lignina presente na casca de arroz.^{34,49} O elevado teor de compostos fenólicos encontrados no bio-óleo de casca de arroz concorda com resultados prévios da literatura.^{31,50,140}

A classe dos aldeídos foi constituída por furfurais e hidróxi-benzaldeídos. Os furfurais são majoritários (71%) e foram quantificadas utilizando o composto 5-metilfurfural devido à sua estrutura química similar. Os hidróxi-benzaldeídos (28% do total dos aldeídos) são formados principalmente pelo composto vanilina. Na classe dos álcoois e furanos, o 2-furanometanol e o benzofurano foram os compostos majoritários, respectivamente, os quais quantificados através de padrões autênticos. Os ácidos lineares foram a classe com menor concentração na fase orgânica (0,20%) e foram quantificados utilizando-se o RF do ácido nonanóico. Compostos pertencentes aos açúcares não foram quantificados no presente estudo, devido ao fato de açúcares não serem quantificados adequadamente pela técnica de GC sem pré etapa de derivatização, conforme descrito por Michailof *et al.*⁹³. Para a quantificação de tais compostos, a técnica de HPLC acoplada a detector de índice refrativo diferencial é uma alternativa.

Dos estudos na literatura com abordagem quantitativa do bio-óleo de casca de arroz, podemos citar, Moraes *et al.*³¹ que reportam a análise semi-quantitativa no bio-óleo, por GCxGC, através do método de normalização externa, observando elevado teor de fenóis (44,10%) e cetonas (14,98%) na amostra. Recentemente, Betemp *et al.*¹³⁸ descreveram a quantificação do bio-óleo de casca de arroz por GC/qMS usando o método de calibração externa através de curvas analíticas. Onze compostos (fenóis e benzofurano) foram quantificados. Empregando o método desenvolvido, os autores observaram a concentração de 80 g kg⁻¹ para alquil fenóis e fenóis, e de 30 g kg⁻¹ para metóxi fenóis. Entretanto, de acordo com o nosso conhecimento, esta é a primeira vez na qual um método quantitativo por GCxGC tem sido empregado para a quantificação do bio-óleo de casca de arroz, o qual permitiu a quantificação de elevado número de compostos na amostra (mais de 60 compostos).

Em ambas as fases do bio-óleo da casca de arroz, muitos compostos, se isolados, podem ser uma alternativa viável na obtenção de produtos químicos para a indústria. Como exemplos, os benzenodióis (catecóis) têm muitas aplicações como antivírus, antioxidantes, aplicação no branqueamento da pele.¹⁴² Os aldeídos derivados do furfural encontram aplicação como adesivos, lubrificantes, plásticos e nylons. As cetonas podem ser aplicadas em sínteses químicas e os demais fenóis (alquilados e metóxilados) podem ser usados como substitutos dos fenóis de origem fóssil em resinas fenólicas.^{10,16}

5.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

Nesta parte do trabalho demonstrou-se a possibilidade de produção de bio-óleo a partir dos resíduos do processamento do arroz (casca) além da caracterização abrangente (qualitativa e quantitativa) do bio-óleo produzido, usando a técnica de HPLC-DAD (fração mais solúvel em água) e de GCxGC/qMS (fração orgânica). A RSM foi empregada com sucesso para determinar as melhores condições de produção de bio-óleo em reator de leito fixo, demonstrando-se que a temperatura de pirólise e o fluxo de N₂ afetaram significativamente a produção de bio-óleo. As condições ótimas foram encontradas a 650 °C e fluxo de N₂ de 100 mL min⁻¹, com rendimento de bio-óleo anidro de 16,9%.

O uso do HPLC/DAD permitiu a injeção direta da fase aquosa sem qualquer passo de extração preliminar e o método proposto apresentou boa precisão, linearidade e valores de LOD e LOQ suficientes para a elucidação da composição da fase aquosa do bio-óleo. Dez compostos de elevada polaridade, foram identificados e quantificados com precisão na amostra. No caso da fase orgânica, foram tentativamente identificados 98 compostos através da GCxGC/qMS. O método de quantificação proposto utilizando dois padrões internos e fatores de resposta calculados usando 19 padrões foi adequado para a quantificação de considerável número dos compostos presentes na fase orgânica. Esse método demonstrou linearidade e repetibilidade dos valores dos RFs. A fase orgânica e aquosa do bio-óleo da casca de arroz apresentaram diferentes composições. Cetonas cíclicas, metóxi e alquil fenóis, furanos e álcoois são majoritários na fase orgânica, enquanto os benzenodióis e os furfurais aparecem em maior concentração na fase aquosa.

5.3.1 Produção científica gerada deste capítulo:

Revista: *Renewable Energy*

Fator de impacto: 4,900 Qualis: A2

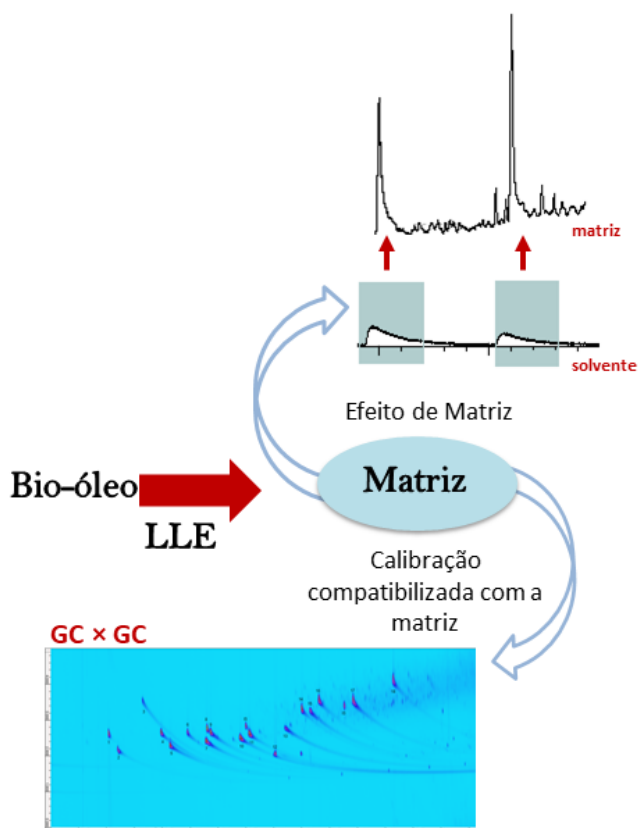
Volume: 135, páginas: 359 a 367, ano: 2019

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.12.053>

Título: *Production of rice husk bio-oil and comprehensive characterization (qualitative and quantitative) by HPLC/PDA and GCxGC/qMS*

Autores: **Eliane Lazzari**, Allan dos Santos Polidoro, Bruna Onorevoli, Tiago Schena, Aline Nunes Silva, Enelise Scapin, Rosangela Assis Jacques e Elina Bastos Caramão.

CAPÍTULO VI



COMPENSAÇÃO DE EFEITOS DA MATRIZ NA ANÁLISE QUANTITATIVA DE BIO-ÓLEO

6.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

6.1.1 Amostra de biomassa e padrões

A casca de arroz, biomassa empregada nessa parte do estudo, foi obtida e preparada nas mesmas condições descritas na **seção 5.1.2 do Capítulo V**. Os reagentes e solventes empregados foram diclorometano (DCM), hexano, hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany). O gás He com pureza superior a 99,999%, o N₂ gasoso (pureza 99,9%) e o N₂ líquido, empregado no processo de modulação, foram adquiridos da White Martins (Salvador, BA, Brasil).

Uma solução estoque (500 mg L⁻¹) contendo 18 compostos padrões empregados nas análises por GCxGC/qMS no **Capítulo V**, exceto o dodecano, foi preparada em diclorometano. Novamente, os dois HPAs deuterados (naftaleno-d8 e acenafteno-d10) foram utilizados como ISs e mistura de *n*-alcanos lineares C₆-C₃₀ (200 mg L⁻¹) foi empregada para cálculo do LTPRI.

6.1.2 Processo de pirólise e amostra de bio-óleo

A pirólise da casca de arroz foi realizada em reator de leito fixo empregando as condições previamente determinadas na **seção 5.1.3 do Capítulo V**. Assim, utilizou-se 6,5 g de biomassa (40-60 *mesh*), fluxo de N₂ de 100 mL min⁻¹, taxa de aquecimento de 100 °C min⁻¹ e temperatura final de 650 °C, sendo o sistema mantido por 10 min nesta temperatura. O bio-óleo bruto obtido neste processo foi submetido a LLE usando cinco porções de 2 mL de DCM e o resíduo orgânico pesado como bio-óleo anidro. O rendimento em massa (m/m%, para triplicata de análises) foi determinado pela pesagem do bio-óleo anidro com referência ao peso inicial da biomassa.

A amostra de bio-óleo anidro gerada nas condições descritas acima foi empregada para preparação da matriz e caracterizada por GC/qMS e GCxGC/qMS. Para a preparação do branco de matriz, o bio-óleo anidro foi usado diretamente, sem etapas de pré-tratamento ou diluição. Para as análises cromatográficas, 10 mg do bio-óleo anidro foi dissolvido em DCM a uma concentração de 10000 mg L⁻¹ e os ISs foram adicionados à solução na concentração de 20 mg L⁻¹.

6.1.3 Preparação do branco de matriz de bio-óleo

A escolha do procedimento para a preparação do branco de matriz do bio-óleo foi realizada considerando-se a polaridade, pka e solubilidade dos compostos presentes no bio-óleo de casca de arroz. Dessa forma, o branco de matriz do bio-óleo foi preparado por três etapas consecutivas de LLE, uma das quais envolvendo extração com solvente

orgânico (partição) e duas envolvendo extração reativa (pH-dependente). O objetivo foi produzir um branco de matriz contendo todos os componentes não extraíveis pelas técnicas de separação dos compostos orgânicos normalmente presentes em bio-óleos.

Inicialmente, 1,5 g de bio-óleo anidro foram adicionados em um funil de separação e os compostos apolares presentes na amostra foram extraídos usando 15 porções de 2 mL de hexano. Subsequente, 10 mL de DCM foram adicionados ao bio-óleo contido no funil de separação e uma segunda etapa de LLE foi realizada, usando 20 porções de 2 mL de solução aquosa de NaOH (2,5 M). Posterior essa etapa, a fase aquosa, isto é a solução alcalina, foi removida e à fase orgânica, contida no funil de separação, foi realizada uma terceira etapa de LLE empregando 15 porções de 2 mL de solução aquosa de HCl (2,5 M). Finalmente, a fase aquosa (solução alcalina) foi removida e o resíduo (fase orgânica restante no funil de separação) foi pesado e rotulado como branco de matriz, livre dos constituintes orgânicos típicos dos bio-óleos. O rendimento em massa do branco de matriz (m/m%, para triplicata de ensaios) foi determinado com referência ao peso inicial do bio-óleo anidro.

A fim de garantir a eficiência do método proposto para preparar um branco de matriz do bio-óleo livre dos analitos de interesse, uma análise detalhada da matriz foi realizada por GC/qMS.

6.1.4 GC/qMS instrumentação

As análises por GC/qMS foram realizadas em um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas com analisador quadrupolar, modelo GCMSQP2010 Ultra, Shimadzu (Kioto, Japão). Este sistema é equipado com um injetor automático modelo AOC20 o qual foi mantido a temperatura de 280 °C. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna apolar: 5 % difenil, 95 % dimetilpolisiloxano (DB-5 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) obtida da Agilent Technologies-J & W Scientific (Palo Alto, CA, EUA). As condições empregadas na análise por ¹D-GC seguem: temperatura inicial do forno 40 °C (5 min), seguido por taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹ até 280 °C. O modo de injeção *splitless* foi utilizado na injeção de 1 µL das amostras. Hélio foi empregado como gás de arraste no fluxo de 1 mL min⁻¹. O espectrômetro de massas foi operado no modo *full scan* com range de massas de 45-280 Da. Interface e fonte de íons foram mantidas em 280 °C. Todos dados foram adquiridos e tratados pelo software GCMS *solution* 2.6.1 (Shimadzu, Japan).

6.1.5 Curvas de calibração

Dois diferentes tipos de curvas de calibração foram estudados: compatibilizada com a matriz (CM) e preparada em solvente (CS). Ambas as curvas foram estabelecidas

com o mesmo intervalo de calibração (de 10 a 150 mg L⁻¹), contendo sete níveis de concentrações. A curva de calibração compatibilizada com a matriz foi preparada através da adição de diferentes volumes da solução estoque contendo 18 compostos padrões (500 mg L⁻¹) em solução do branco de matriz, a qual preparada na concentração de 3000 mg L⁻¹ em DCM. As soluções de calibração em solvente foram preparadas da mesma forma, no entanto usando diretamente o DCM ao invés do branco da matriz. Os dois ISs (naftaleno-d8 e acenafeno d-10) foram adicionados à concentração constante de 20 mg L⁻¹ em ambas as curvas.

6.1.6 Avaliação do efeito de matriz

O efeito de matriz (EM %) foi avaliado através da comparação dos coeficientes angulares obtidos nas curvas CM e CS, conforme a **Equação 10** abaixo.¹⁰⁰

$$EM (\%) = \left[\left(\frac{\text{Coef. angular curva de calibração}_{em\ branco\ de\ matriz}}{\text{Coef. angular curva de calibração}_{em\ solvente\ (DCM)}} \right) - 1 \right] \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

Onde: um resultado zero indica que o sinal dos analitos não é influenciado pelos componentes da matriz; valores negativos indicam que o sinal do analito é suprimido pelos componentes da matriz e valores positivos indicam que o sinal do analito é aprimorado pelos componentes da matriz.¹⁰⁰

Adicionalmente, o teste *t* com nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$) foi aplicado, utilizando o software *Excel*, a fim de comparar estatisticamente os valores dos coeficientes angulares obtidos em ambas as curvas.

6.1.7 GC×GC/qMS instrumentação

As análises por 2D-GC/qMS foram realizadas no mesmo sistema e condições de separação empregados nas análises por 1D-GC/qMS. A modulação foi realizada em um modulador térmico tipo *loop* ZX1-GC × GC (ZOEX Corporation, Houston, TX, USA), usando nitrogênio líquido (jato frio) e gasoso (jato quente).

A separação foi realizada em conjunto convencional de colunas, apolar na primeira dimensão DB-5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e de polaridade intermediária na segunda dimensão DB-17ms (2,15 m x 0,18 mm x 0,18 μm). As condições foram como seguem: injetor mantido a 280 °C, temperatura inicial do forno em 40 °C permanecendo por 5 min posterior taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹ até 280 °C. O modo *splitless* foi utilizado na injeção de 1 uL das amostras. Hélio foi utilizado como gás de arraste no fluxo de 1 mL min⁻¹. Para o sistema qMS empregou-se: temperatura de interface e fonte de íons de 280 °C, modo varredura *full scan* com intervalo de massas de 45 a 280 Da e

frequência de aquisição de 0,02 s o qual corresponde à frequência de aquisição de dados de 50 Hz. Período de modulação de 5 s com tempo de jato quente de 0,3 s.

Todos os dados foram processados usando o software GC *Image* versão 2.2b1 (ZOEX Corporation, Houston, Texas, EUA) e na identificação dos compostos empregou-se comparações com padrões, espectros de massa e o sistema LTPRI. Novamente diferença máxima de 20 unidades, entre os valores do LTPRI experimental e os apresentados em base de dados da NIST (<http://webbook.nist.gov/>) foi considerada para a identificação tentativa dos compostos.³⁹

6.1.7.1 Análise por GC×GC/qMS

A curva de calibração compatibilizada com a matriz, preparada segundo o procedimento descrito na **seção 6.1.5**, foi empregada na análise quantitativa do bio-óleo de casca de arroz por GC×GC/qMS. Para tanto, procedeu-se a análise bidimensional, em triplicata, da CM e para cada um dos compostos padrões presentes na solução de calibração, a curva analítica foi construída através da plotagem ($V_{\text{pad}}/V_{\text{IS}}$ vs C_{pad}) e a concentração dos analitos presentes na amostra de bio-óleo foi estimada em mg L^{-1} e mg por Kg^{-1} de amostra de bio-óleo de casca de arroz.

A fim de aumentar o âmbito da presente abordagem quantitativa, aos analitos tentativamente identificados na amostra, para os quais não havia padrões autênticos disponíveis, procedeu-se a quantificação utilizando a curva de calibração de padrões relacionados, com base na similaridade da estrutura química, como já realizado no **Capítulo V**.

6.1.7.1.1 Figuras de mérito do método quantitativo

O desempenho do método quantitativo por GC×GC foi avaliado segundo as seguintes figuras de mérito: faixa dinâmica, linearidade, LOD, LOQ, precisão (intra e inter-dia) e exatidão.

A linearidade foi estimada no intervalo de concentração entre 10 mg L^{-1} e 150 mg L^{-1} , de acordo com os valores dos R^2 . O LOD e LOQ foram calculados com base no branco (matriz do bio-óleo) e nos coeficientes angulares das curvas analíticas. Para isso, o desvio padrão de injeções de replicatas ($n=7$) da matriz de bio-óleo foi dividido pelos coeficientes angulares das curvas analíticas, e logo, multiplicados por 3,3 e 10, para o LOD e LOQ, respectivamente. A medida do desvio padrão do branco de matriz de bio-óleo foi realizada através da análise da magnitude da resposta analítica do ruído em replicatas ($n = 7$) de injeções, dividido pela resposta do padrão interno.

A precisão foi avaliada segundo a precisão intra e inter-dia. A primeira foi expressa como o valor de RSD% obtido para seis injeções ($n=6$) realizadas em mesmo

dia de solução padrão (60 mg L^{-1} , nível intermediário da curva analítica), enquanto que a precisão inter-dia foi determinada pela repetição dessas injeções em três dias consecutivos ($n=18$). Os valores de RSD% foram calculados utilizando os volumes dos picos normalizados ($V_{\text{pad}}/V_{\text{IS}}$). A exatidão do método foi avaliada através dos valores de recuperação. Para tanto, soluções *spike* foram preparadas através da fortificação da matriz com solução padrão em concentração final de 60 mg L^{-1} e posteriormente analisadas em triplicata. A comparação dos valores de concentração estimados utilizando a curva analítica *versus* a real concentração adicionada (60 mg L^{-1}) proporcionou os valores de recuperação (%), e assim, a exatidão do método (veja **Eq. 3, Capítulo II**).

6.1.8 Fluxograma do procedimento experimental

A **Figura 28** apresenta um fluxograma detalhado do procedimento experimental empregado neste capítulo.

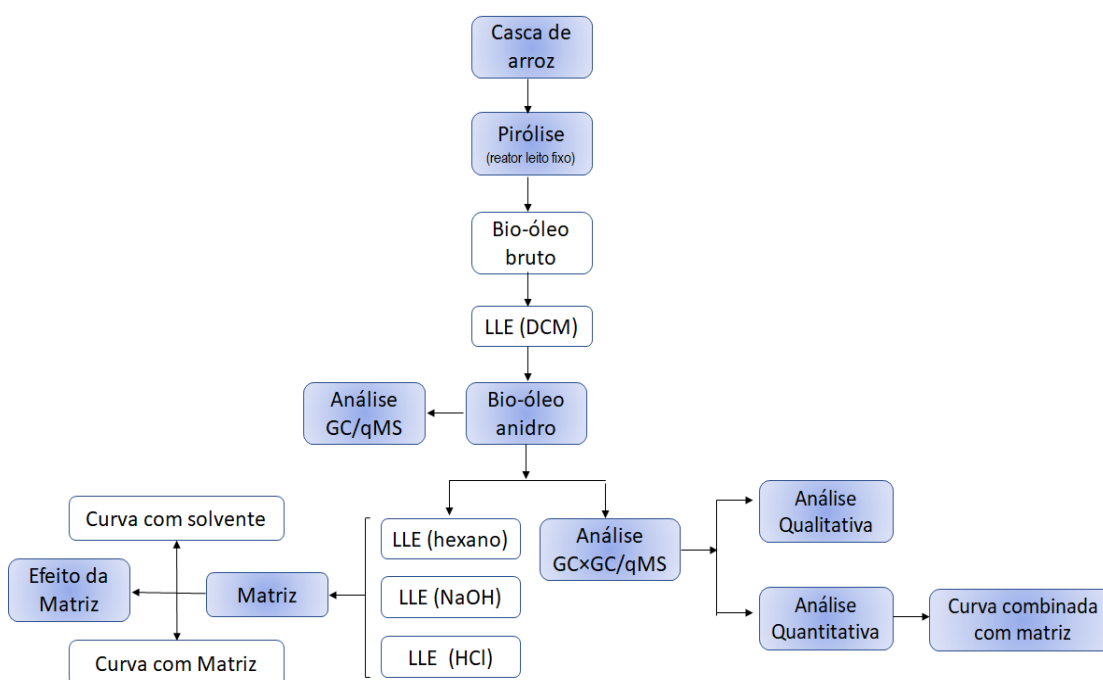


Figura 28. Fluxograma representativo do procedimento experimental empregado no **Capítulo VI**.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.2.1 Obtenção do branco de matriz do bio-óleo

Na presente tese propõe-se o emprego de método por LLE para a preparação do branco de matriz do bio-óleo. A LLE continua sendo uma metodologia de separação representativa para o bio-óleo e, como tal, tem sido empregada com sucesso na

extração de compostos importantes deste tipo de amostra. Mantilla *et al.*¹³⁷ descrevem a separação satisfatória de compostos fenólicos do bio-óleo, utilizando solução alcalina (NaOH) combinada com solventes orgânicos. Shah *et al.*¹⁴³ também utilizam da extração reativa com solução alcalina para isolar fenóis do bio-óleo de pirólise de resíduos agrícolas. Recentemente, Onorevoli¹²³ empregou a LLE utilizando HCl (pH = 2) para separar compostos nitrogenados de bio-óleo oriundo da pirólise da torta residual de sementes do tabaco energético. Entretanto, ao invés de focar na obtenção de compostos de elevado valor agregado a partir do bio-óleo, como apresentado nos estudos acima, nos propomos um fluxo de trabalho visando extrair esses compostos, mas com o objetivo final de preparar o branco de matriz de bio-óleo.

O método de preparação do branco de matriz por LLE baseou-se nas características dos compostos presentes no bio-óleo de casca de arroz. Na **Tabela XV** apresenta-se a lista dos compostos tentativamente identificados no bio-óleo de casca de arroz, através da técnica de GC/qMS, com seus respectivos valores de pKa, solubilidades em água e solubilidades em solventes orgânicos.

Como observado na **Tabela XV**, os compostos tentativamente identificados no bio-óleo da casca de arroz pertencem a diversas classes químicas, dentre estas, ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, furanos e compostos nitrogenados. A grande maioria desses compostos apresenta elevada solubilidade em solventes polares e de média polaridade, além disso, de acordo com os valores de pKa, todos os compostos fenólicos, álcoois, aldeídos e cetonas, identificados na amostra, são ionizáveis.

Dessa forma, devido à diversidade química dos compostos que compõem o bio-óleo, ou seja, ampla faixa de polaridade e reatividade, LLE sequencial foi empregada com base em duas abordagens para obter o branco de matriz do bio-óleo: **(1)** partição em solvente orgânico e **(2)** extração reativa dependente de pH.

Na primeira abordagem utilizou-se como solvente o hexano, a fim de extrair os compostos apolares e/ou de baixa polaridade. Ácidos e ésteres de cadeia carbônica longa, bem como hidrocarbonetos são as principais classes químicas que podem ser extraídas do bio-óleo através da LLE empregando hexano. Particularmente, a escolha do solvente hexano, para esta primeira etapa do procedimento, foi suportada nos dados de solubilidade descritos na **Tabela XV**, pois, se um solvente polar e/ou de polaridade média fosse utilizado neste início do protocolo, a amostra de bio-óleo seria completamente solubilizada em uma única fase, impossibilitando, assim, a separação do branco de matriz.

Tabela XV. Compostos tentativamente identificados no bio-óleo de casca de arroz por GC/qMS, com valores de pKa, solubilidade em água e em solventes orgânicos.

classe química	Nome do composto ou classificação	tR (min)	Ai/A _{IS}	LTPRI		pKa ^a	Solubilidade (g L ⁻¹)	
				exp	lit		água ^b	solvente orgânico ^c
fenóis	Fenol	26,66	1,88	989	989	10,0	46,6	álcool, clorofórmio, éter
	Fenol, 3-metil-	30,90	0,64	1062	1068	10,1	25,1	álcool, clorofórmio, éter
	Fenol, 4-metil-	32,08	1,24	1083	1077	10,4	23,1	etanol, éter, acetona
	Fenol, 2,5-dimetil-	36,10	0,26	1156	1151	10,5	6,1	álcool, clorofórmio, éter
	Fenol, 3-etil-	37,09	0,71	1174	1171	10,1	7,2	álcool, éter
	Fenol, 2-metóxi-	32,93	2,70	1097	1089	9,9	67,4	álcool, clorofórmio, éter
	Fenol, 2-metóxi-5-metil-	38,56	1,53	1201	1201	-	-	-
	Fenol, 4-etil-2-metóxi-	42,99	0,65	1289	1287	10,3	2,4	-
	Fenol, 2-metóxi-4-vinil-	44,79	0,88	1325	1317	10,0	7,4	-
	Fenol, 2-metóxi-4-(2-propenil)-	46,84	0,17	1369	1358	9,9	1,4	álcool, clorofórmio, éter
	Fenol, 2-metóxi-4-(1-propenil)-Z	49,23	0,12	1420	1428	-	-	-
	Fenol, 2-metóxi-4-(1-propenil)-E	51,16	0,57	1463	1465	10,0	1,4	álcool, éter
	Fenol, 2,6-dimetóxi-	46,53	0,62	1362	1365	9,4	17,3	-
	Fenol, C1 metóxi-	50,94	0,16	1458	n.e	-	-	-
	Fenol, dimetóxi-(propenil)-	61,63	0,12	1716	n.e	-	-	-
	1,2-Benzenodiol (catecol)	39,15	1,49	1213	1199	9,3	75,0	álcool, éter, acetato
	Benzenodiol (isomer)	39,42	0,28	1218	n.e	-	-	-
1,2-Benzenodiol, 3-metóxi-	42,36	0,37	1276	1268	-	-	-	
1,2-Benzenodiol, 4-metil-	43,78	0,29	1304	1307	9,6	37,9	-	
aldeídos	3-Furaldeído	16,40	0,21	819	815	-	-	-
	Furfural, 5-metil-	25,44	0,82	969	967	-3,7	14,9	-
	Aldeído	14,68	0,82	788	n.e	-	-	-
	Propenal, hidróxi-metóxi-fenil-	63,24	0,32	1759	n.e	-	-	-
	Benzaldeído, 4-hidróxi-3-metóxi-	49,06	0,42	1416	1422	7,8	5,1	etanol, éter, acetona
ácidos	Ácido	9,54	0,85	685	n.e	-	-	-
álcoois	Álcool	17,42	0,35	836	n.e	-	-	-
	2-Furanmetanol	19,00	1,67	862	863	13,7	34,3	etanol, éter

Continuação da Tabela XV:

classe química	Nome do composto ou classificação	tR (min)	Ai/A _{IS}	LTPRI		pK _a ^a	Solubilidade (g L ⁻¹)	
				exp	lit		água ^b	solvente orgânico ^c
cetonas	2-Ciclopentanona	15,14	0,26	797	797	-7,3	66,0	álcool, acetona, éter
	2-Ciclopentan-1-ona, 2-metil-	21,97	0,69	912	910	-	32,0	-
	2-Ciclopentan-1-ona, 3-metil-	25,62	0,52	972	973	17,3	36,2	-
	2-Ciclopentan-1-ona, 2,3-dimetil-	30,04	0,16	1047	1040	-	-	-
	2-Ciclopentan-1-ona, 3-etil-2-hidróxi-	34,63	0,33	1129	1140	9,4	45,6	-
	1,2-Ciclopentanodiona	23,33	1,41	934	n.e	-	-	-
	1,2-Ciclopentanodiona, 3-metil-	29,53	1,84	1038	1043	16,1	63,9	-
	2(5H)-Furanona	22,65	1,20	923	915	7,4	187,0	-
	2(5H)-Furanona, 5-metil-	24,05	0,23	946	938	-	-	-
	2(5H)-Furanona, 3-metil-	26,43	0,18	986	989	-	-	-
	Acetofenona, 4-hidróxi-3,5-dimetóxi-	63,05	0,13	1754	1740	-	-	-
	2-Butanone, 1-hidroxi-	13,92	0,98	773	n.e	13,9	569,0	-
	Etanona, 1-(2-furanil)-	22,27	0,32	917	914	14,4	19,1	-
2-Propanona, 1-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-	54,84	0,43	1548	1531	-	-	-	
furanos	Benzofurano	39,90	2,03	1227	n.e	-	-	-
nitrogenados	Composto contendo nitrogênio	27,61	1,05	1005	n.e	-	-	-
co-eluições	Furfural/2-Ciclopenten-1-ona	17,68	3,72	840	834	-/-	15,4/-	etanol, acetona/-
padrões internos	Naftaleno-d8	38,19	1,00	1194				
	Acenafteno-d10	52,96	1,00	1504				

LTPRI lit: índice de retenção da literatura (NIST biblioteca); LTPRI exp: índice de retenção calculado experimentalmente; (a e b) solubilidade em água a 25 °C; valores descritos na literature HMDB (<http://www.hmdb.ca/metabolites/>); (c) valores descritos na literatura Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); n.e: valores de LTPRI não encontrados na base de dados NIST.

Posterior à extração com hexano, o bio-óleo restante foi totalmente solubilizado em DCM, e procederam-se extrações reativas a fim de remover as espécies ionizáveis da amostra. Inicialmente, LLE empregando uma solução de NaOH 2,5 M foi realizada visando a extração dos compostos fenólicos, os quais são maioria no bio-óleo, aproximadamente 40% do total a amostra. A solução alcalina promove a ionização dos compostos fenólicos em seus respectivos fenolatos, os quais são mais solúveis em água, facilitando, assim, sua extração junto à fase aquosa (fração alcalina).

Além dos compostos fenólicos, o meio alcalino também favorece a conversão de outros compostos (com características ácidas), tais como, cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos, em seus respectivos sais (enolatos), os quais também possuem elevada solubilidade na fase aquosa.¹¹³

Finalmente, a fase orgânica restante, foi extraída com solução de HCl 2,5 M, visando a separação dos compostos nitrogenados. Os compostos nitrogenados presentes no bio-óleo são principalmente compostos N-heterocíclicos, de anel único, possuindo um (piridinas) ou dois (pirazina, pirazoles) átomos de nitrogênio na molécula.¹²³ Na presença de HCl tais compostos são protonados, adição de carga positiva à molécula, o que aumenta sua polaridade e solubilidade em água, favorecendo, assim, sua extração junto a fase aquosa (fração ácida).

Na **Figura 29** apresenta-se um esquema detalhado do método de obtenção do branco de matriz, incluindo todas as etapas de extração. Como, a partir do bio-óleo produziu-se aproximadamente 30% de rendimento de branco de matriz, para combinar a massa da matriz no extrato em branco com a da solução de bio-óleo (10 000 mg L⁻¹ no DCM), o extrato do branco da matriz foi preparado a 3000 mg L⁻¹ em diclorometano. Tal extrato foi subsequente analisado pela técnica de GC/qMS, a fim de avaliar a eficiência do método de preparação do branco de matriz proposto.

6.2.1.1 Análise do branco de matriz por GC/qMS

A **Figura 30** compara os cromatogramas resultantes da análise por GC/qMS do **(a)** bio-óleo de casca de arroz (10 000 mg L⁻¹ em DCM) e do **(b)** branco de matriz (3000 mg L⁻¹ em DCM).

Como pode ser observado na **Figura 30**, os compostos presentes no bio-óleo da casca de arroz foram satisfatoriamente extraídos pelo protocolo proposto de obtenção da matriz. A detalhada análise dos espectros de massa dos picos presentes na solução do branco de matriz (**Fig. 30b**) demonstra a eficiência da metodologia escolhida. Dentre os picos detectados no extrato da matriz, apenas seis foram previamente identificados no bio-óleo da casca de arroz, os quais seguem: 2-metóxifenol; 2-metóxi-5-metilfenol; 4-etil-2-metóxifenol; benzofurano; 2-metóxi-4-vinilfenol e dimetóxiipropenilfenol. Dentre estes, apenas o composto 2-metóxifenol (guaiacol), o qual apresenta relação sinal/ruído de 4,7 no extrato da matriz, foi incluído na mistura de calibração. No entanto, a análise quantitativa do bio-óleo é principalmente focada nos compostos majoritários e, assim, a baixa área do pico do guaiacol na matriz, não interfere nos resultados finais quantitativos. Quanto aos demais compostos, estes apresentaram relação sinal/ruído <14 nos extratos da matriz.

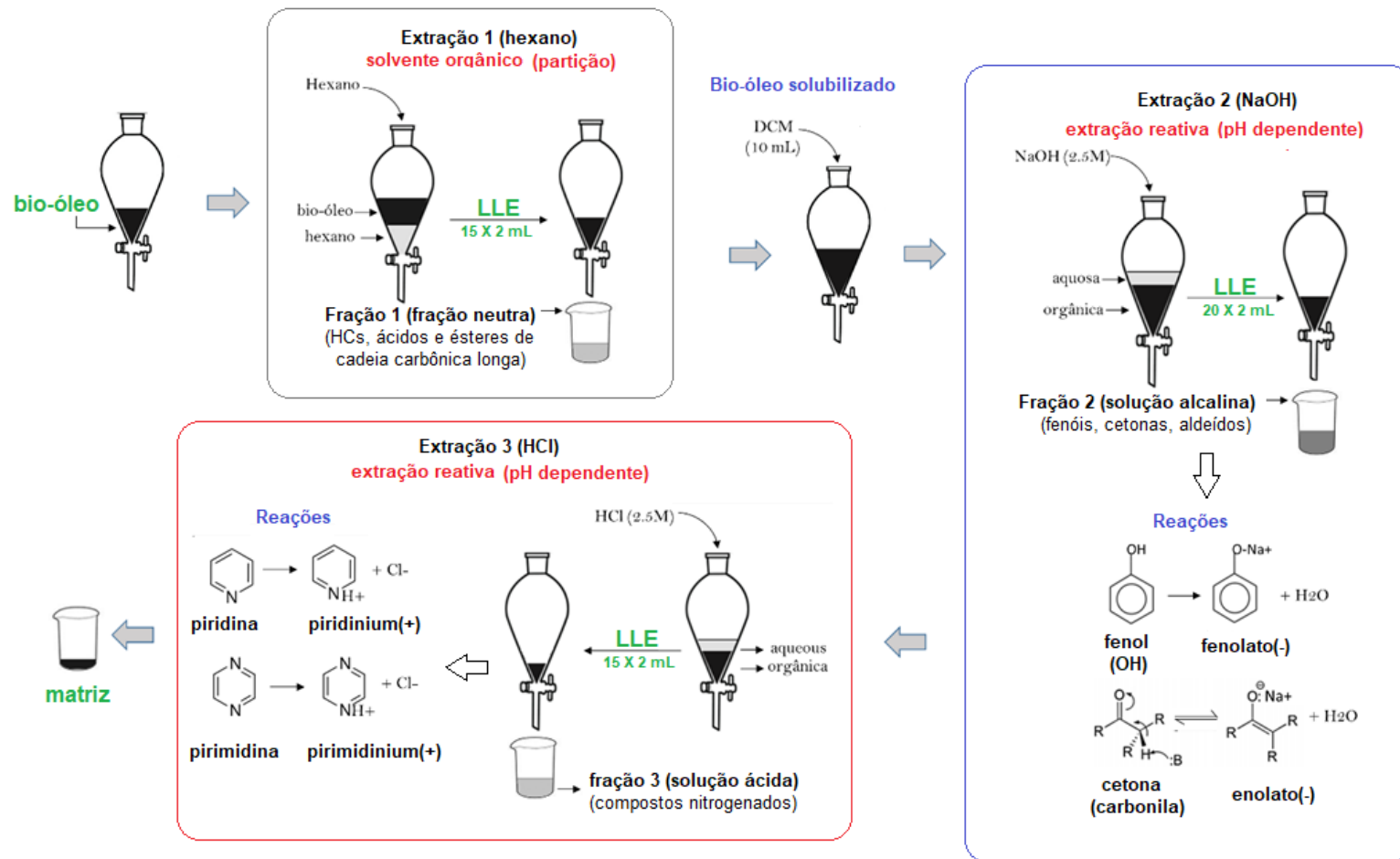


Figura 29. Fluxograma representativo da metodologia de extração, empregando LLE, para a obtenção da matriz do bio-óleo. As reações que ocorrem em cada uma das etapas também estão detalhadas.

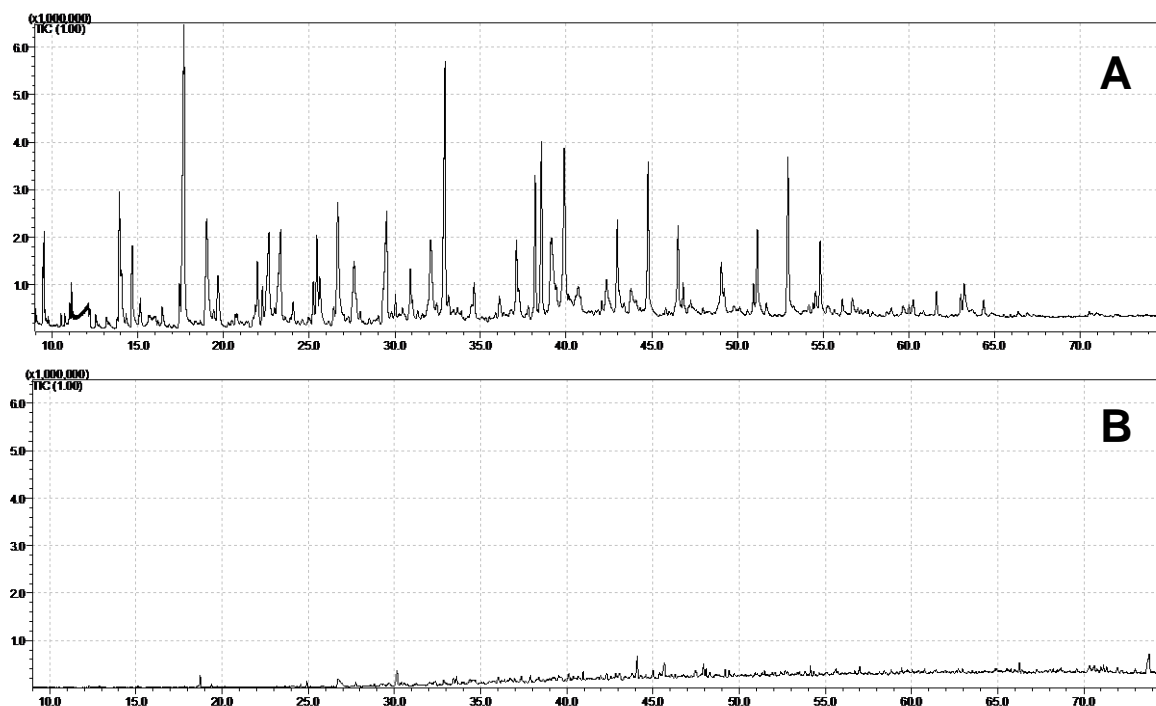


Figura 30. Cromatogramas obtidos por GC/qMS: (a) bio-óleo de casca de arroz e do (b) extrato da matriz.

6.2.2 Avaliação do efeito de matriz

A **Figura 31** apresenta os cromatogramas obtidos pela análise por GC/qMS da mistura de calibração (100 mg L^{-1}) **(a)** preparada em solvente (DCM) e **(b)** em branco de matriz. O procedimento empregado para o preparo das misturas de calibração está detalhado na **seção 6.1.5**. Os analitos incluídos na mistura de calibração são compostos comumente encontrados nos bio-óleo e representam a maioria das classes/ subclasses químicas presentes na amostra, suas estruturas químicas estão apresentadas no **Anexo 4 (Fig. A5)**.

Como pode ser observada na **Figura 31a**, a presença da matriz na mistura de calibração provocou alterações não apenas na linha de base do cromatograma, mas também na forma dos picos obtidos para os compostos padrões. Nota-se que a largura dos picos é drasticamente diminuída quando os padrões são adicionados na matriz (**Fig. 31b**) em comparação ao solvente (**Fig. 31a**), o que se traduziu em aumento do sinal causado por picos mais intensos e estreitos.

Na análise por GC, o formato não gaussiano pode ser devido a degradação térmica (acarretando em picos menos intensos) e/ou distorção no formato do pico (incluindo caldas e alargamento). Em ambos os casos, o resultado é um melhor formato de pico na matriz do que no solvente.¹⁰³ A presença da matriz provoca um aumento na transferência dos constituintes do bio-óleo do injetor à coluna, reduzindo, assim, perdas térmicas de compostos lábeis e mascarando sítios ativos (grupos silanois livre), os quais

podem causar decomposição e adsorção de compostos de elevada polaridade. Tal melhora no sinal do pico, quando na presença da matriz, tem sido amplamente relatado para demais compostos, caso dos pesticidas, como detalhadamente revisado por Rahman, *et al.*¹⁰²

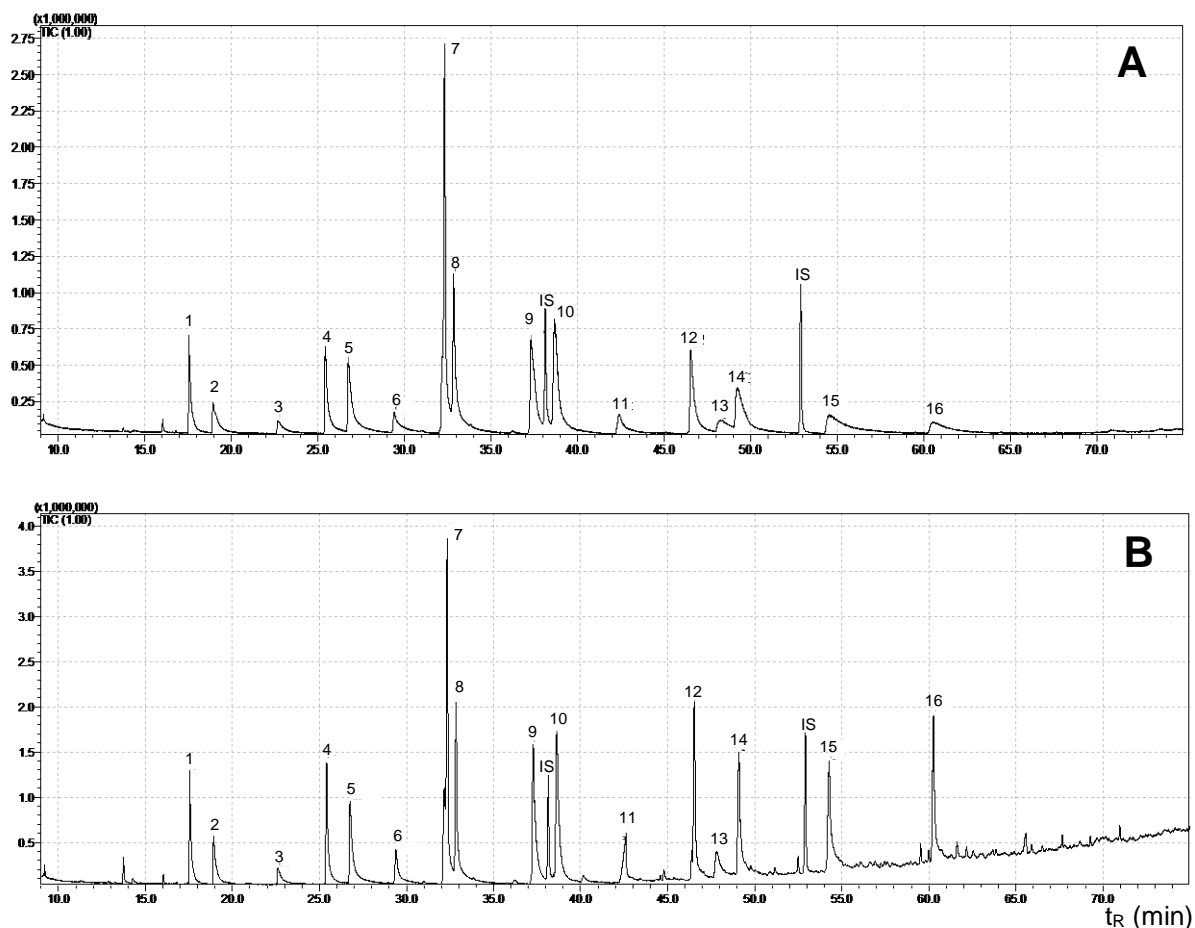


Figura 31. Cromatogramas obtidos por GC/qMS da mistura de calibração: (a) preparada em solvente (DCM) e (b) preparada em extrato da matriz. Os picos estão identificados na **Tabela XVI** e correspondem aos compostos: 1-2-ciclopenten-1-ona; 2-2-furanmetanol; 3-2(5H)-furanona; 4- 5-metilfurfural; 5- Fenol; 6-3-metil-1,2-ciclopentanodiona; 7-2,3-dihidrobenzofurano; 8-2-metóxi-fenol (guaiacol); 9-3-etilfenol; 10-3,4-dimetilfenol; 11- ácido nonanóico; 12-2,6-dimetóxi-fenol; 13-4-hidróxi-benzaldeído; 14- Vanilina; 15-4-hidróxi-3-metóxiacetofenona; 16- Siringaldeído.

O efeito de matriz foi estudado comparando-se os coeficientes angulares obtidas para ambas as curvas (CM e CS) das análises por GC/qMS, usando a **Equação 10**. Os resultados são apresentados na **Tabela XVI**.

Como pode ser observado, os valores do EM (%) sugerem forte efeito de matriz para o fenol, 2-furanometanol, 4-hidróxi-3-metóxiacetofenone (EM de 30 a 40%) e siringaldeído, para o qual o valor do EM foi superior a 50%. Seis compostos padrões apresentaram EM variando de ± 10 a $\pm 30\%$, o que demonstra um médio efeito de matriz. Em contraste, 2,6-dimetóxi-fenol, 2,3-dihidrobenzofurano e o ácido nonanóico, apresentaram negligenciável efeito de matriz (EM < 5%). Referente ao sinal analítico, a

supressão de sinal somente foi observada para a vanilina, com valores de EM negativos (-6.9 %). Enquanto que, para todos os demais compostos padrões, o sinal analítico foi aprimorado pela presença da matriz, valores de EM positivos. A influência da matrix também foi evidenciada na linearidade encontrada para as curvas analíticas. De acordo com a **Tabela XVI**, os coeficientes de determinação foram para todos os compostos, maiores na CM (de 0,96 a 0,99) quando comparados a CS (0,90 a 0,96)

Tabela XVI. Parâmetros da curva analítica e resultados do efeito de matriz

Padrões	MATRIZ (CM)		SOLVENTE (CS)		EM (%)
	Coef. angular	R ²	Coef. angular	R ²	
1 2-ciclopenten-1-ona	0,01437	0,9969	0,01202	0,9508	19,55
2 2-furanmetanol	0,01197	0,9921	0,00905	0,9480	32,26
3 2(5H)-furanona	0,00736	0,9640	0,00582	0,9031	26,46
4 5-metilfurfural	0,02237	0,9907	0,01863	0,9579	20,07
5 Fenol	0,02306	0,9803	0,01661	0,9105	38,83
6 3-metil-1,2-ciclopentanodiona	0,01003	0,9822	0,00778	0,9068	28,92
7 2,3-dihidrobenzofurano	0,04066	0,9966	0,04239	0,9606	- 4,08
8 2-metóxi-fenol (guaiacol)	0,02985	0,9991	0,02806	0,9743	6,38
9 3-etilfenol	0,03421	0,9974	0,03113	0,9575	9,89
10 3,4-dimetilfenol	0,03442	0,9922	0,03052	0,9502	12,79
11 ácido nonanóico	0,01387	0,9890	0,01459	0,9126	- 4,93
12 2,6-dimetóxi-fenol	0,02779	0,9973	0,02640	0,9273	5,26
13 4-hidróxibenzaldeído	0,01284	0,9744	0,01016	0,9012	26,38
14 Vanilina	0,02467	0,9927	0,02650	0,9593	- 6,90
15 4-hidróxi-3-metóxiacetofenona	0,03222	0,9986	0,02391	0,9171	34,75
16 Siringaldeído	0,02322	0,9896	0,01547	0,9131	50,09

6.2.2.1 Efeito de matriz mediante normalização pelos padrões internos

Outra abordagem realizada foi a avaliação do efeito de matriz anterior e posterior normalização das curvas pelos ISs (naftaleno-d8 e acenafteno d-10). A **Tabela XVII** apresenta os coeficientes angulares para ambas as curvas CM e CS, as quais plotadas com e sem normalização pelos ISs, além dos resultados do test *t* de *Student*. Enquanto a **Figura 32** demonstra a comparação entre algumas dessas curvas.

Através desta abordagem, pode se destacar que, o uso de hidrocarbonetos como padrões internos resultou em reduzida linearidade (menores valores de R²) para as curvas construídas em solvente. Isto demonstra que o emprego de padrão interno genérico, neste tipo de calibração, tem efeito contrário, dificultando a aquisição dos dados quantitativos ao invés de melhora-lós. Este fenômeno pode ser explicado dada a natureza química e funcionalidade dos padrões internos escolhidos (naftaleno-8 e

acenafteno-d10), que pertencem à classe dos hidrocarbonetos e, portanto, não apresentam grupos polares em sua estrutura, os quais levariam à adsorção nos sítios ativos do sistema GC.

Por outro lado, quando se avalia a adição dos ISs na calibração com matriz, verifica-se melhora nos valores de linearidade das curvas, uma vez que, os sítios ativos agora estão mascarados pelos constituintes da matriz, permitindo uma similar transferência dos analitos polares e não polares ao longo do sistema de GC

A comparação entre curvas com e sem normalização pelos ISs, também revelou forte efeito de matriz para todos os compostos padrões. Através do teste *t* de *Student*, foi possível observar que o EM (%) foi significativo (valores de $p < 0,0001$ a $0,0003$) para todos os padrões de referência quando empregado curvas não normalizadas por ISs. Além disso, sete compostos apresentaram efeito de matriz não significativo (valores de $p > 0,005$) quando curvas normalizadas com ISs foram empregadas (**Tab. XVII**).

Todos os resultados acima descritos, destacam a influência do efeito da matriz na análise do bio-óleo por GC. A amostra de bio-óleo, devido à sua alta polaridade e acidez, contém grande quantidade de componentes de matriz que tendem a ser retidos nos sítios ativos dos *liners* podendo atuar como protetores para os compostos de interesse durante a análise por GC. Portanto, calibração compatibilizada com matriz desempenha um papel importante na análise quantitativa de bio-óleos, uma vez que, aumenta a transferência dos analitos do injetor para o detector, diminuindo degradações térmicas e promovendo melhora na forma do pico cromatográfico, linearidade e exatidão dos resultados quantitativos.^{101,102} Além disso, deve-se considerar que, o emprego de CM permitiria métodos analíticos menos custosos comparados à CS, devido aos componentes da matriz promoverem a “desativação” de sítios ativos no sistema GC, permitindo assim, o uso de um número menor de padrões internos por análises, ao contrário do emprego de múltiplos ISs, os quais devem abranger cada uma das classes de analitos estudados.

Propos-se neste capítulo, pela primeira vez, validar e implementar um método quantitativo por GC×GC empregando calibração compatibilizada com matriz para a exata elucidação da composição do bio-óleo de casca de arroz.

Tabela XVII. Parâmetros das curvas de calibração e *p*-valores obtidos (a) anterior e (b) posterior normalização com os padrões internos.

Padrões	(a) sem normalização com padrão interno					(b) com normalização com padrão interno				
	CM		CS		<i>p</i> -valores	CM		CS		<i>p</i> -valores
	Coef. angular	R ²	Coef. angular	R ²		Coef. angular	R ²	Coef. angular	R ²	
2-ciclopenten-1-ona ^a	127416	0,9902	89562	0,9853	< 0,0001	0,01437	0,9969	0,01202	0,9508	0,0042
2-furanmetanol ^a	81744	0,9692	54261	0,9443	< 0,0001	0,01003	0,9822	0,00778	0,9068	0,0028
2(5H)-furanona ^a	64142	0,9516	41215	0,9521	0,0034	0,00736	0,9640	0,00582	0,9031	0,1016
5-metilfurfural ^a	288609	0,9965	142999	0,9831	< 0,0001	0,03222	0,9986	0,02391	0,9171	0,0001
Fenol ^a	99786	0,9781	63995	0,9782	< 0,0001	0,01197	0,9921	0,00905	0,9480	< 0,0001
3-metil-1,2-ciclopentanediona ^a	192683	0,9722	125144	0,9648	< 0,0001	0,02306	0,9803	0,01661	0,9105	0,0002
2,3-dihidrobenzofurano ^a	280782	0,9335	215216	0,9785	0,0017	0,03421	0,9974	0,03113	0,9575	< 0,0001
2-metóxi-fenol (guaiacol) ^a	314902	0,9826	233676	0,9861	< 0,0001	0,03442	0,9922	0,03052	0,9502	0,0682
3-etilfenol ^a	267661	0,9931	213729	0,9971	< 0,0001	0,02985	0,9991	0,02806	0,9743	0,1925
3,4-dimetilfenol ^a	245621	0,9942	159136	0,9628	< 0,0001	0,02779	0,9973	0,0264	0,9273	0,4544
ácido nonanóico ^b	361032	0,9943	304682	0,9831	0,0002	0,04066	0,9966	0,04239	0,9606	0,4855
2,6-dimetóxi-fenol ^b	123478	0,9833	83742	0,9416	0,0003	0,01387	0,9890	0,01459	0,9126	0,6577
4-hidroxibenzaldeído ^b	183591	0,9748	130826	0,9835	< 0,0001	0,02237	0,9907	0,01863	0,9579	0,0023
Vanilina ^b	134347	0,9854	70933	0,9393	< 0,0001	0,01284	0,9744	0,01016	0,9012	0,0118
4-hidróxi-3-metóxiacetofenona ^b	220999	0,9933	161064	0,9764	< 0,0001	0,02467	0,9927	0,0265	0,9593	0,2358
Siringaldeído ^b	208668	0,9909	94051	0,9549	< 0,0001	0,02322	0,9896	0,01547	0,9131	< 0,0001

(a) padrão interno naftaleno-d8; (b) padrão interno acenafteno-d10; (c) t-teste com nível de significância de 95% ($\alpha = 0.05$).

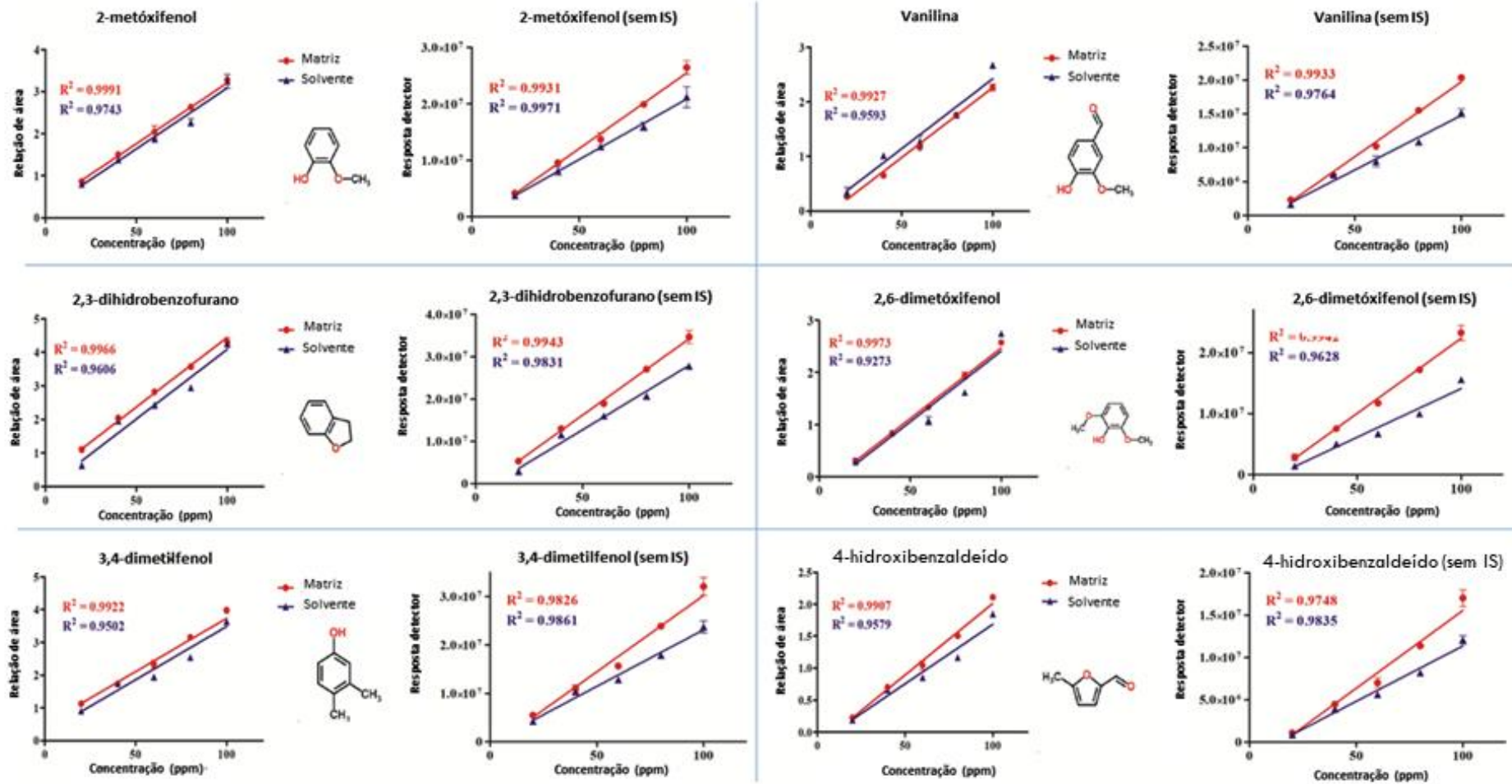


Figura 32. Comparação das curvas em matriz e solvente anterior e posterior normalização por padrões internos

6.2.3.1 Figuras de mérito do método quantitativo

O desempenho do método quantitativo foi avaliado de acordo com a ANVISA¹³¹, com relação as principais figuras de mérito, como demonstra a **Tabela XVIII**.

Como observado nesta tabela, boa linearidade foi obtida, com valores de R^2 superiores a 0,980 para todos os padrões estudados. A precisão do método demonstrou-se satisfatória, com valores de RSD% inter-dia e intra-dia menores que 10,2 e 10,9, respectivamente. Referente aos valores de LOD, esses variaram de 0,23 mg L⁻¹ para vanilina a 5,25 mg L⁻¹ para 2,6-dimetóxfenol, enquanto que os valores de LOQ variaram de 0,76 mg L⁻¹ a 17,51 mg L⁻¹ para os mesmos compostos. Cabe ressaltar que, esses limites foram calculados com base no extrato de matriz em branco e são suficientes para uma avaliação adequada da composição de um bio-óleo, uma vez que o aumento da sensibilidade não é um objetivo direto na análise desse tipo de matriz, e as concentrações são relativamente elevadas, podendo se considerar uma fonte de compostos químicos para a indústria.

Dados de recuperação foram calculados a fim de avaliar a exatidão do método. Através desses dados, observa-se que a maioria dos compostos apresentou excelente exatidão (faixa de recuperação de 90% a 119%), exceto o ácido nonanóico e o 3,4-dimetilfenol, os quais mostram recuperação de 125% e 85%, respectivamente. Considera-se que a calibração compatibilizada com a matriz resulta em maior exatidão do que a calibração com solvente.

Levando-se em consideração as figuras de mérito, o desempenho do método analítico demonstrou-se satisfatório, de acordo com as diretrizes seguidas pela ANVISA¹³¹, ainda que, estudos análogos não foram relatados anteriormente na literatura.

Tabela XVIII. Figuras de mérito do método quantitativo desenvolvido empregando calibração compatibilizada com matriz por GC×GC/qMS.

Padrões	Intervalo validação (mg L ⁻¹) ^a	R ²	LOD (mg L ⁻¹) ^b	LOQ (mg L ⁻¹) ^b	intra-dia RSD (%)	inter-dia RSD (%)	Exatidão (% ± s.d) ^c
2-ciclopenten-1-ona	20 a 150	0,980	2,18	7,27	2,79	6,20	106,73 ± 3,51
3-metil-1,2-ciclopentanodiona	20 a 150	0,990	1,09	3,62	6,36	7,24	90,67 ± 2,95
2(5H)-furanona	40 a 150	0,994	3,35	11,17	10,70	10,22	100,41 ± 4,65
4-hidróxi-3-metóxiacetofenona	10 a 80	0,997	3,07	10,24	2,95	4,92	104,00 ± 5,42
2-furanmetanol	20 a 100	0,997	2,18	7,25	10,76	8,81	96,56 ± 3,89
Fenol	10 a 150	0,999	2,26	7,55	10,91	4,49	103,89 ± 2,79
4-metilfenol	10 a 100	0,994	0,35	1,17	1,42	2,71	108,31 ± 2,54
3-etilfenol	10 a 100	0,995	0,36	1,20	1,33	3,70	106,33 ± 4,82
3,4-dimetilfenol	10 a 80	0,982	0,59	1,96	1,96	1,85	85,84 ± 7,52
2-metóxifenol (guaiacol)	10 a 100	0,997	1,03	3,44	4,24	2,40	119,79 ± 6,46
2,6-dimetóxifenol	10 a 100	0,998	5,25	17,51	3,26	4,38	113,94 ± 5,83
4-metil-1,2-benzenediol	40 a 150	0,989	4,97	16,56	3,51	7,42	118,10 ± 4,34
2,3-dihidrobenzofurano	10 a 100	0,994	1,99	6,65	2,22	4,30	106,58 ± 3,32
ácido nonanóico	10 a 150	0,995	1,98	6,60	4,54	8,38	125,79 ± 4,87
5-metilfurfural	20 a 150	0,991	2,17	7,25	7,37	5,57	101,87 ± 5,31
4-hidróxibenzaldeído	20 a 100	0,996	0,75	2,49	7,07	9,28	94,51 ± 6,02
4-hidróxi-3-metóxi-benzaldeído (vanilina)	40 a 150	0,986	0,23	0,76	5,37	3,67	97,68 ± 4,16
Benzaldeído, 4-hidróxi-3,5-dimetóxi- (siringaldeído)	10 a 100	0,999	0,80	2,66	3,57	6,31	100,94 ± 5,48

(a) curvas de calibração foram construídas com o mínimo de 5 níveis de concentração; (b) calculado baseado na matriz em branco; (c) s.d obtido para n=3

6.2.3.2 Análise quantitativa

O método quantitativo validado foi então implementado na análise de amostra de bio-óleo de casca de arroz. A **Figura 31** apresenta os diagramas de cores **(a)** da matriz e **(b)** da solução de calibração (100 mg L^{-1}), resultantes das análises por GC x GC/qMS.

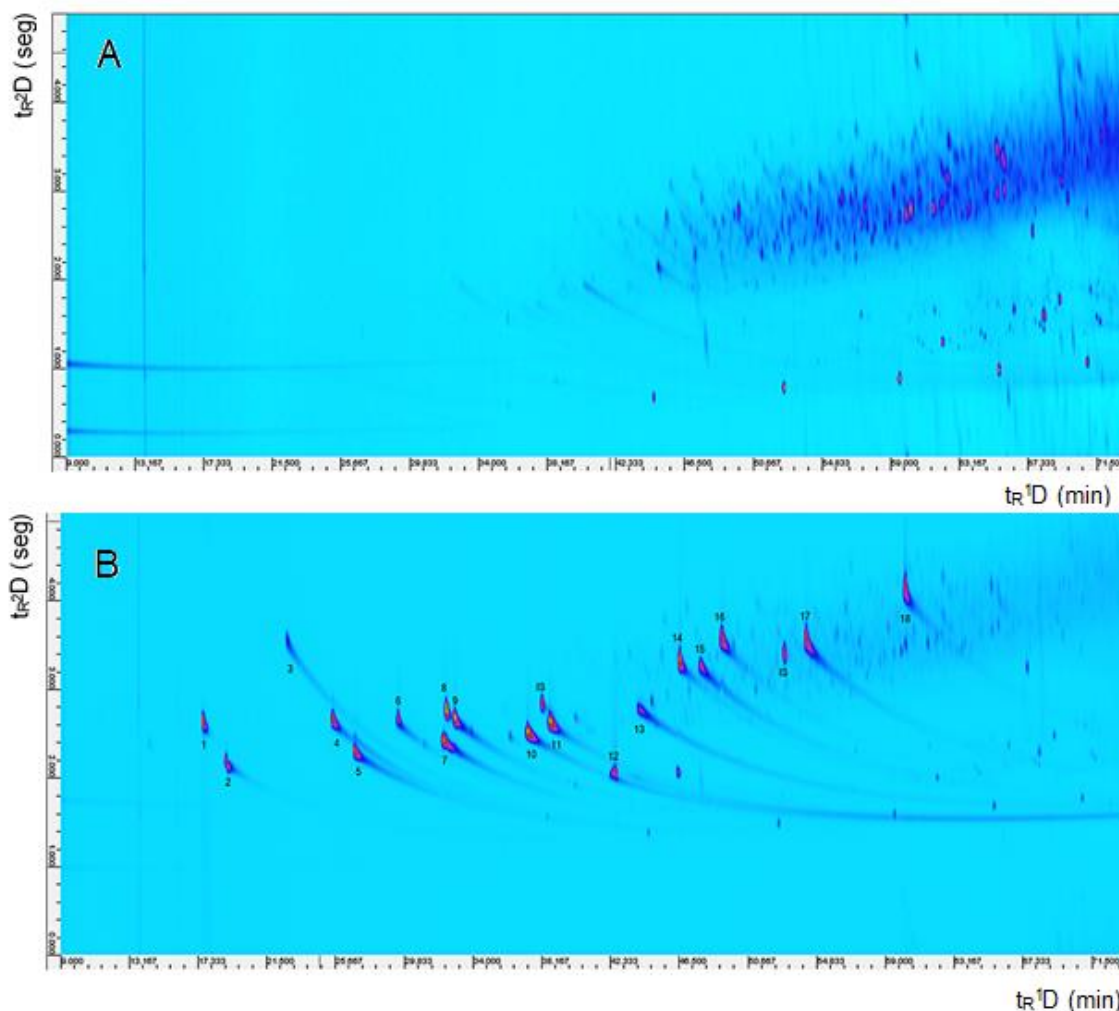


Figura 33. Diagramas de cores (GCxGC/qMS): (a) do extrato de matriz e (b) da solução de calibração preparada no extrato da matriz. Numeração dos picos segue os compostos no **Anexo 4 (Tab. AIII)**.

Para cada padrão incluído na mistura de calibração foram construídas curvas de calibração compatibilizada com a matriz, utilizando naftaleno d-8 e acenafteno d-10 como IS, conforme descrito na **seção 6.1.8**. Em sequência, procedeu-se a quantificação individual dos compostos tentativamente identificados na amostra de bio-óleo, utilizando o método de calibração interna, o qual é um método de quantificação mais versátil, especialmente para amostras complexas, tais como o bio-óleo. Além disso, as

mudanças na resposta do detector MS em combinação com a complexidade já relatada da amostra, tornam a calibração externa um método de quantificação inadequado.³⁸

Para os compostos tentativamente identificados no bio-óleo, os quais não se dispunham de padrão individual, a quantificação foi realizada através das curvas analíticas de compostos estruturalmente relacionados. Tal enfoque foi necessário devido à alta complexidade do bio-óleo, a qual dificulta a realização de avaliações quantitativas para todos os compostos presentes na amostra fazendo uso de padrões individuais. Similar abordagem foi empregada na análise quantitativa por GCxGC/qMS no **Capítulo V**.

6.2.4 Composição química do bio-óleo

A **Figura 34** apresenta o diagrama de cores resultante da análise por GCxGC/qMS do bio-óleo da casca de arroz. De fato, a partir dos dados de GCxGC, verifica-se elevada complexidade da amostra de bio-óleo de casca de arroz. Diversos compostos os quais pareciam co-eluir na primeira dimensão foram resolvidos com sucesso na segunda dimensão, como é o caso dos pares: picos 1 e 2, picos 4 e 5, picos 10 e 11 e pico IS e 24. Além disso, novamente os picos dos IS não se sobrepõem a nenhum dos picos pertencentes aos compostos do bio-óleo.

Através da análise qualitativa, 82 compostos foram tentativamente identificados no bio-óleo da casca de arroz, dos quais, 15 compostos foram positivamente identificados por injeção de padrões, e 41 foram tentativamente identificados com base em seus espectros de massa e índices de retenção. Dos 82 compostos tentativamente identificados, 52 foram quantificados através de curva de calibração compatibilizada com a matriz. A quantificação de elevado número de compostos na amostra de bio-óleo é de suma importância a fim de se definir o potencial uso do bio-óleo em questão. A quantificação de elevado número de compostos em amostra de bio-óleo também é relatada por Djock *et al.*⁹⁴, Silva *et al.*⁴¹ e Michaliouf *et al.*⁹³, entretanto, nesses estudos os autores descrevem a quantificação de bio-óleos através de valores de RF e curva de calibração preparada em solvente.

A lista detalhada dos compostos tentativamente identificados e quantificados (g Kg⁻¹ de amostra) na amostra, bem como os padrões empregados para a quantificação está descrita no **Anexo 4 (Tab. AIII)**

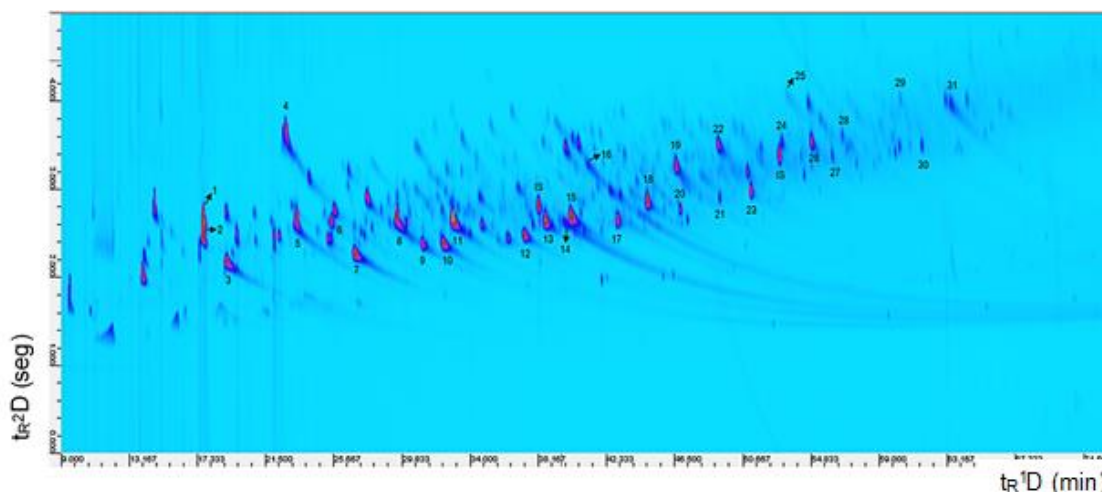


Figura 34. Diagrama de cores da análise por GCxGC/qMS do bio-óleo de casca de arroz. Numeração dos picos segue **Anexo 4 (Tab. AIII)**.

O 1,2-benzenodiol ($31,5 \text{ g.Kg}^{-1}$) corresponde ao composto majoritário na amostra de bio-óleo, seguido pelos compostos 3-metil-1,2-ciclopentanodiona ($16,8 \text{ g.Kg}^{-1}$), 1,2-ciclopentanodiona ($16,5 \text{ g.Kg}^{-1}$), 2(5H)-furanona ($16,5 \text{ g.Kg}^{-1}$) e 2-furanometanol ($13,0 \text{ g.Kg}^{-1}$). Demais compostos majoritários (furfural, fenol, benzofurano, 3-metóxi-1,2-benzenodiol e 2-metóxi-fenol) apresentaram concentração entre $11,4$ e $7,4 \text{ g.Kg}^{-1}$.

Em relação às classes químicas, cetonas ($110,1 \text{ g.Kg}^{-1}$) e fenóis ($109,2 \text{ g.Kg}^{-1}$) são majoritários, correspondendo, em conjunto, a 79% do total da amostra quantificada. Dentre os compostos fenólicos quantificados, $45,4 \text{ g.Kg}^{-1}$ correspondem a benzenodióis, $23,5 \text{ g}$ correspondem a alquilfenóis, $28,9 \text{ g}$ apresentam um grupo metóxi e $11,4 \text{ g}$ são dimetóxi-fenóis. No caso das cetonas, todas as cetonas quantificadas correspondem a cetonas cíclicas. Furanonas ($47,9 \text{ g.Kg}^{-1}$) apresentam-se como classe majoritária, seguidas pelas ciclopentanodionas ($36,4 \text{ g.Kg}^{-1}$) e ciclopentenonas ($22,2 \text{ g.Kg}^{-1}$). Acetofenonas apresentaram a menor concentração na amostra de bio-óleo, $3,5 \text{ g}$. Aldeídos também apresentaram elevada concentração ($29,4 \text{ g.Kg}^{-1}$) na amostra de bio-óleo, sendo esta classe química, formada principalmente por furfurais ($21,3 \text{ g.Kg}^{-1}$) e benzaldeídos ($8,1 \text{ g.Kg}^{-1}$). Demais classes químicas quantificadas no bio-óleo (álcoois, furanos e ácidos carboxílicos) apresentaram concentração entre $7,5$ e $13,0 \text{ g.Kg}^{-1}$, sendo, os ácidos carboxílicos a classe química de menor concentração no bio-óleo.

Cabe-se ressaltar que, importantes compostos quantificados no bio-óleo da casca de arroz apresentam efeito de matriz. Destacam-se o fenol e o 2-furanometanol, identificados como compostos majoritários no bio-óleo. Tais compostos apresentaram pronunciado efeito de matriz, com valores de EM% de 32 e 38, respectivamente. Adicionalmente, todos os benzaldeídos quantificados na amostra apresentaram

aprimoramento do sinal analítico, devido ao efeito matricial. De fato, se a curva de calibração preparada em solvente fosse empregada para análise da amostra de bio-óleo, os resultados quantitativos não seriam exatos, superestimando a concentração real dos compostos na amostra.

6.3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste capítulo demonstra-se o efeito de matriz na análise de bio-óleo e aplica-se, pela primeira vez, a curva de calibração compatibilizada com a matriz para a quantificação desta amostra. O procedimento desenvolvido por LLE, baseado na partição em solvente orgânico e na extração reativa dependente do pH, demonstrou-se eficiente para extração das classes químicas alvo do bio-óleo, obtendo-se, assim, a matriz em branco da amostra. Utilizando-se dois diferentes métodos de calibração, curva preparada em solvente e curva compatibilizada com a matriz, observou-se a dependência do efeito da matriz na análise do bio-óleo por GC. O sinal analítico foi aumentado pela presença de matriz na maioria dos padrões avaliados, sendo o siringaldeído e o fenol os compostos com o sinal analítico mais pronunciado. O método de calibração compatibilizado com a matriz desenvolvido e implementado para quantificação do bio-óleo por GCxGC/qMS, apresentou aceitável desempenho analítico podendo ser empregado para compensar o efeito de matriz na análise de bio-óleo e, assim, fornecer exatidão na elucidação da composição dessa amostra. Adicionalmente, o extrato da matriz em branco do bio-óleo obtida neste estudo, poderá ser empregada no preparo de um material de referência para o bio-óleo, o qual é de suma importância para o desenvolvimento de métodos analíticos e o futuro emprego em laboratórios de rotina que venham a implementar análises de bio-óleos oriundos de biomassa lignocelulósica.

6.3.1 Produção científica gerada deste capítulo

Revista: *Analytical Chemistry*

Fator de impacto: 6,320 Qualis: A1

Volume: *submetido*, agosto de 2019

DOI: *a ser definido*

Título: *Overcoming Matrix Effects in Quantitative Screening of Bio-oils*

Autores: **Eliane Lazzari**, Érica A. Souza-Silva, Thiago Bjerck, Jaderson K. Schneider, Elina Bastos Caramão.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÕES GERAIS

7. CONCLUSÕES GERAIS

Nesta presente tese desenvolveu-se metodologias analíticas empregando a cromatografia bidimensional abrangente e a análise multivariada para a elucidação da total composição de amostras de bio-óleos. Tais métodos tornam-se de suma importância ao passo que a pirólise vem se consolidando como tecnologia para a transformação de resíduos agroindustriais no Brasil. O emprego da FTIR juntamente com a PCA apresentou-se como uma opção as técnicas cromatográficas mais onerosas e laboriosas para fins exploratórios na produção de bio-óleo. Através do método desenvolvido pode-se pré-definir a composição e os possíveis usos dos bio-óleos anterior ao processo de pirólise, permitindo assim, através de um método simples e rápido, o estudo da viabilidade do emprego de diferentes biomassas para obtenção de bio-óleo. Em outro viés, para a elucidação da composição das fases aquosas dos bio-óleos, implementou-se pela primeira vez uma metodologia quantitativa usando LCxLC, a qual apresentou excelentes linearidade, precisão e reprodutibilidade além de elevados valores de capacidade de pico. O desenvolvimento desta metodologia abre possibilidades para o estudo quantitativo de bio-óleos por LCxLC, uma vez que, essa amostra apresenta elevada complexidade e sua injeção direta em GC não se torna possível. Em uma segunda etapa, métodos quantitativos por GCxGC e HPLC foram desenvolvidos visando a detalhada composição do bio-óleo oriundo da casca de arroz. Dos métodos por GCxGC, empregou-se a calibração interna usando fator de resposta e a curva de calibração compatibilizada com a matriz, ambos apresentando resultados satisfatórios. Adicionalmente, esta é a primeira vez, na qual implementa-se curva de calibração compatibilizada com matriz para a quantificação de amostras de bio-óleo, bem como, uma metodologia capaz de obter o branco de matriz, as quais demonstraram a influência do efeito de matriz na análise quantitativa dessa amostra. Mediante o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de elucidar qualitativamente e quantitativamente com elevada exatidão, a composição de ambas fases dos bio-óleos, bem como métodos rápidos que permitam em um primeiro momento avaliar a viabilidade de utilização das biomassas para obtenção de bio-óleo, abrem-se possibilidades para o futuro emprego, dos métodos aqui expostos, em laboratórios de rotina que venham a implementar análises de bio-óleos oriundos de biomassa lignocelulósica, bem como, a implementação de normativas para essa matriz.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martins, A. F., Diniz, J., Stahl, J. A., Cardoso, A.L. *Quím. Nova*, **2007**, 30, 873.
2. IRGA, Instituto Rio-grandense do Arroz, Sagra arroz 2017/2018. Disponível em <http://stirga2018-admin.hml.rs.gov.br>. Acesso em 19/08/2019.
3. Rambo, M.K.D., Schimidt, F.L.S., Ferreira, M.M.C. *Talanta*, **2015**, 144, 696.
4. Raymundo, L.M. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2016**.
5. Fontoura, L. P. Potencial Econômico e Aplicações da Casca de Arroz no Estado do Rio Grande do Sul. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2015**.
6. IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Banco de dados agregados. Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br> . Acesso em 19/08/2019.
7. Pattiya, A. *Biores. Technol.* **2011**, 102, 1959.
8. PNRS, Política nacional de resíduos sólidos, Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Disponível em www.planalto.gov.br/ccivil. Acesso em 19/07/2017
9. Bridgwater, A. V. *Biom. Bioenergy*, **2012**, 38, 94.
10. Czernik, S., Bridgwater, A.V. *Energ Fuels*, **2004**, 18, 590.
11. Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., Wang, D. *J. App. Energ.* **2013**, 104, 801.
12. Chadwick, D.T., McDonnell, K.P., Brennan, L.P., Fagan, C.C., Everard, C.D. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2014**, 30, 672.
13. Liu, Y., He, Z. Shankle, M., Tewolde, H. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, 79, 283.
14. Allison, G.G., Thain, S.C., Morris, P., Morris, C., Hawkins, S., Hauck, B. *Biores. Technol.* **2009**, 100, 1252.
15. Effendi, A., Gerhauser, H., Bridgwater, A.V. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2008**, 12, 2092.
16. Boateng, A. A., Sadaka, S. Agriculture and Nature Resources. **2009**, University of Arkansas. Disponível em www.academia.edu/4469223/Pyrolysis_and_bio_oil. Acesso em 26/09/2017.
17. Sfetsas, T., Michailof, C., Lappas, A., Li, Q., Kneale, B. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 3317.
18. Masle, A.L., Angot, D., Gouin, C., D'Attoma, A., Ponthus, J., Quignard, A., Heinisch, S. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1340, 90.
19. Tomasini, D., Cacciola, F., Rigano, F., Sciarrone, D., Donato, P., Beccaria, M., Caramão, E.B., Dugo, P., Mondello, L. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 11255.
20. Cook, D.W., Burnham, M.L., Harnes, D.C., Stoll, D.R., Rutan, S.C. *Anal. Chim. Acta.* **2017**, 961, 49-58.
21. Kivilompolo, M., Hyötyläinen, T. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1145, 155-164.
22. Kivilompolo, M., Obúrka, V., Hyötyläinen, T. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391, 373-380.

23. Dugo, P., Cacciola, F., Donato, P., Airado-Rodriguez, D., Herrero, M., Mondello, L. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 7483-7487.
24. Bassanese, D. N., Conlan, X. A., Barnett, N. W., Stevenson, P. G. *J. Sep. Sci.* **2015**, 38, 1642-1648.
25. Mondello, L., Herrero, M., Kumm, T., Dugo, P., Cortes, H., Dugo, G. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 5418-5424.
26. Cacciola, F., Farnetti, S., Dugo, P., Marriott, P. J., Mondello, L. *J. Sep. Sci.* **2017**, 40, 7-24.
27. Liu, Z. Y., Phillips, J. *J. Chromatogr. Sci.* **2001**, 29, 227.
28. Adahchour, M., Beens, J., Vreuls, R.J.J., Brinkman, U. A. Th. *Trends Anal. Chem.* **2006**, 25, 438.
29. Adahchour, M., Brandt, M., Baier, H. U., Vreuls, R. J. J., Batenburg, M., Brinkman, U. T. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1067, 245.
30. Purcaro, G., Tranchida, P.Q., Ragonese, C., Conte, L., Dugo, P., Dugo, G., Mondello, L. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 8583.
31. Moraes, M.S.A., Migliorini, M.V., Damasceno, F.C., Georges, F., Almeida, S., Zini, C.A., Caramão, E.B. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2012**, 98, 64.
32. Moraes, M.S.A., Georges, F., Almeida, S.R., Damasceno, F.C., Maciel, G.P.S., Zini, C.A., Jacques, R.A., Caramão, E.B. *Fuel Process. Technol.* **2012**, 101, 35.
33. Da Cunha, M.E., Schneider, J.K., Brasil, M.C., Cardoso, C.A.L., Monteiro, L.R., Mendes, F.L., Pinho, A.R., Jacques, R.A., Machado, M.E., Freitas, L.S., Caramão, E.B. *Microchem. J.* **2013**, 110, 113.
34. Silva, R.V.S., Casilli, A., Sampaio, A.L., Ávila, B.M.F., Veloso, M.C.C., Azevedo, D.A.J. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2014**, 106, 152.
35. Tessarolo, N.S., dos Santos, L.R., Silva, R.S., Azevedo, D.A. *J Chromatogr A* **2013**, 1279, 68-75.
36. Schneider, J.K., Cunha, M. E., Santos, A. L., Maciel, G. P. S., Brasil, M.C., Pinho, A. R., Mendes, F. L., Jacques, R. A., Caramão, E.B. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1356, 236.
37. Cardoso, C.A.L., Machado, M.E., Caramão, E.B. *Renew. Energy*, **2016**, 91, 21-3
38. Michailof, C.M., Kalogiannis, K.G., Sfetsas, T., Patiaka, D.T., Lappas, A. A. *Energy and Environment*, **2016**, 5, 614.
39. Lazzari, E., Schena, T., Primaz, C.T., Maciel, G.P.S., Machado, M.E., Cardoso, C.A.L., Jacques, R.A., Caramão, E.B. *Ind. Crop. Prod.* **2016**, 83, 529.
40. Torri, I. D. V., Paasikallio, V., Faccini, C. S., Huff, R., Caramão, E.B., Sacon V., Oasmaa, A., Zini, C.A. *Bioresour Technol.* **2016**, 200, 680-690.
41. Silva, R.V.S., Tessarolo, N.S., Pereira, V.B., Ximenes, V.L., Mendes, F.L., de Almeida, M.B.B., Azevedo, D.A. *Talanta*, **2017**, 164, 626-635.

42. Polidoro, A.S., Scapin, E., Lazzari, E., Silva, N.A., Santos, A.L., Caramão, E.B., Jacques, R. A. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2018**, 129, 43-52.
43. Barros, J.A.S., Krause, M.C., Lazzari, E., Bjerck, T.R., do Amaral, A.L., Caramão, E.B, Krause, L.C. *Microchem. J.* **2018**, 137, 30-36.
44. Chandra, R., Takeuchi, H., Hasegawa, T. *Renew. Sustainable Energy Rev.* **2012**, 16, 1462.
45. Goldemberg, J. *Quim. Nova*, **2009**, 32, 582.
46. Dias, J. M. C. de S., Santos, D. T. dos., Braga, M., Onoyama, M. M., Miranda, C. H. B., Barbosa, P. F. D., Rocha, J. D. **2012**. Produção de briquetes e péletes a partir de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais. Brasília, Embrapa agroenergia, DF, Brasil.
47. ANEEL Agência Nacional de Energia Elétrica, “BIG Banco de Informações de Geração”. Disponível em www.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/OperacaoGeracaoTipo. Acesso em 03.08.2019.
48. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division – FAOSTAT. Food and Agricultural commodities production. Disponível em www.fao.org/faostat/en/#data/QC. Acesso em 14/03/2017.
49. Quispe, I., Navia, R., Kahhat, R. *J. Waste Manage.* **2017**, 59, 200.
50. Alvarez, J., Lopez, G., Amutio, M., Bilbao, J., Olazar, M. *Fuel*, **2014**, 128, 169.
51. Conselho nacional de abastecimento. [file:///C:/Users/User/Downloads/Cana-de-acucar Analise_Mensal_-_maio-2017.pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/Cana-de-acucar%20Analise_Mensal_-_maio-2017.pdf). Acesso em 19.08.2019.
52. Jahirul, M.I., Rasul, M.G., Chowdhury, A.A., Ashwath, N. *Energies*, **2012**, 5, 4952.
53. Bevilaqua, D.B., Rambo, M.K.D., Rizzetti, T.M., Cardoso, A.L., Martins, A.F. *J. Clean. Prod.* **2013**, 47, 96
54. Stas, M., Kubicka, D., Chudoba, J., Pospíšil, M. *Energy & Fuels*, **2014**, 28, 385.
55. Mohan, D., Pittman, C.U., Steele, P.H. *Energy & Fuel*, **2006**, 20, 848.
56. Valderrama, L., Paiva, V.B., Março, P.H., Valderrama, P. *Quim. Nova*, **2016**, 39, 245.
57. Fagan, C.C., Everard, C.D., McDonnell, K. *Biores. Technol.* **2011**, 102, 5200.
58. Everard, C.D., McDonnell, K.P., Fagan, C.C. *Biomass. Bioenerg.* **2012**, 45, 203.
59. Chen, H., Ferrari, C. Angiuli, M., Yao, J., Raspi, C., Bramanti, E. *Carb. Polym.* **2010**, 82, 772.
60. Bridgwater, A. V. *Thermal Science*, **2004**, 8, 21.
61. Sharma, A., Pareek, V., Zhang, D. *Renew. Sustainable Energy Rev.* **2015**, 50, 1081.
62. Collard, F.X., Blin, J. *Renew. Sustainable Energy Rev.* **2014**, 38, 594–608.
63. Bridgwater, A.V. *Chemical Engineer. J.* **2003**, 91, 87.
64. Meier, D., van de Beld, B., Bridgwater, A.V., Elliott, D.C., Oasmaa, A., Preto, F. *Renew. Sustainable Energy Rev.* **2013**, 20, 611.
65. Oramahi, H. A., Wahdina, Diba, F., Nurhaida, Yoshimura, T. *Procedia Environ. Sci.* **2015**, 28, 769.

66. Isa, K. M., Daud, S., Hamidina, N., Ismail, K., Saada, S. A., Kasima, F. H. *Ind. Crop. Prod.* **2011**, 33, 481.
67. Montgomery, D.C. Design and analysis of experiments, Wiley, 8th edição, **2012**.
68. Granada, E., Míguez, J. L., Febrero, L., Collazo, J., Eguía, P. *Renew. Energy*, **2013**, 60, 179.
69. Shen, D., Jin, W., Hu, J., Xiao, R., Luo, K. *Renew. Sustainable Energy Rev.* **2015**, 51, 761.
70. Demiral, I., Ayan, E. A. *Bioresour. Technol.* **2011**, 102, 3946.
71. Santos, A.P. dos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, **2016**.
72. Kim, J. *Bioresour. Technol.* **2015**, 178, 90.
73. Faccini, S.C., Dalla Vecchia, I., Ribeiro, D., Zini, C.A., Caramão, E.B. *J. Brazil. Chem. Soc.* **2013**, 24, 1085.
74. Bayerbach, R., Meier, D. *J. Anal. Appl. Pyrol.* **2009**, 85, 98.
75. Lanças, F.M. *Scientia Chromatogr.* **2009**, 1, 35.
76. Johnston, P.A., Brow, R. C. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 8129.
77. Tessini, C., Müller, N., Mardones, C., Meier, D., Berg, A., von Baer, D. *J. Chromatogr. A.* **2012**, 1219, 154.
78. Sarrut, M., Corgier, A., Crétier, G., Le Masle, A., Dubant, S., Heinisch, S. *J. Chromatogr. A.* **2015**, 1402, 124-133.
79. Crepier, J., Le Masle, A., Charon, N., Albrieux, F., Heinisch, S. *J. Chromatogr. A.* **2017**, 1510, 73-81
80. Cacciola, F., Dugo, P., Mondello, L. *Trend. Anal. Chem.* 96, **2017**, 116-123.
81. Monteiro, L.M.G. Development of advanced analytical methods for the analysis of food complex matrices by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC × LC-MS). Tese de doutorado. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, Madrid, Espanha, **2017**.
82. Herrero, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A., Bernal, J. *J. Chromatogr. A.* **2009**, 1216, 7110-7129.
83. Stoll, D.R., Carr. P.W. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 519-531.
84. Iguiniz, M., Heinisch, S. *J. Pharmaceut Biomed*, **2017**, 145, 482-503.
85. Tomazini, D. Caracterização dos produtos líquidos obtidos por pirólise de biomassas utilizando técnicas cromatográficas bidimensionais abrangentes. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2015**.
86. Montero, L., Ibáñez, E., Russo, M.T., Rastrelli, L., Cifuentes, A., Herrero, M. *Anal Chim. Acta*, 985, **2017**, 202-212.
87. François, I., Sandra, K., Sandra, P. *Anal Chim. Acta*, **2009**, 641, 14-31
88. Sun, M., Sandahl, M., Turner, C. *J. Chromatogr. A.* **2018**, 1541, 21-30.
89. Adahchour, M., Beens. J., Brinkman, U.A.Th. *J. Chromatogr. A.* **2008**, 1186, 67.

90. Muhlen, C. Von., Zini, C.A., Caramão, E.B. *Quím. Nova*, **2006**, 29, 765.
91. Pedroso, M.P., de Godoy, L.A.F., Fidélis, C.H.V., Ferreira, E.C., Poppi, R.J., Augusto, F., *Quim. Nova*, **2009**, 32, 421.
92. Ligiero, C.B.P., Reis, L.A. dos., Parrilha, G.L., Filho, M.P., Canela, M.C. *Quím. Nova*, **2009**, 32.
93. Michailof, C., Sfetsas, T., Stefanidis, S., Kalogiannis, K., Theodoridis, G., Lappas, A. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1369, 147.
94. Djokic, M. R., Dijkmans, T., Yildiz, G., Prins, W., Van Geema, K. M., *J. Chromatogr. A*. **2012**, 1257, 131.
95. Toraman, H.E., Franz, K., Ronsse, F., Van Geema, K.M., Marina, G.B. *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1460, 135.
96. Lundgren, K., Rappe, C., Tysklind, M. *Chemosphere*, **2004**, 55, 983.
97. Arha, G., Klasinc, L., Vebera, M., Pompea, M. *J. Chromatogr. A*. **2011**, 1543, 1218.
98. Kalogiannis, K., Stefanidis, S., Michailof, C., Lappas, A., Sjöholm, E. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2015**, 418, 115.
99. Erney, D.R., Gillespie, A.M., Gilvydis, D.M., Poole, C.F. *J. Chromatogr. A*. **1993**, 638, 57.
100. González, D.M., Durána, J.A., López, B.G., Reyes, J.G., Díaz, A.M. *J. Chromatogr. A*. **2017**, 1519, 110–120.
101. Mastovská, K., Lehotay, S.J., Anastassiades, M. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 8129-8137.
102. Rahmana, M.M., El-Atya, A.M.A., Shima, J.H. *Anal. Chim. Acta*, **2013**, 801 14-21.
103. Poole, C.F. *J. Chromatogr. A*. **2007**, 1158, 241–250.
104. Almeida, S.R. Pirólise rápida de casca de arroz, estudo de parâmetros e caracterização de produtos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2010**.
105. Georges, F., Caracterização da palha de cana de açúcar do Rio grande do Sul e de seus produtos de pirólise. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2011**.
106. Moraes, M.S.A. Avaliação da composição química de bio-óleos de pirólise de diferentes biomassas utilizando a cromatografia gasosa monodimensional e a bidimensional abrangente. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2012**.
107. Faccini, C.S. Obtenção de bio-óleos por pirólise de resíduos da indústria de celulose e sua caracterização por cromatografia gasosa. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2012**.
108. Onorevoli, B. Estudo do crambe abyssinica como fonte de matérias primas oleaginosas: óleo vegetal, ésteres metílicos e bio-óleo. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2012**.

- 109.** Migliorini, M.V. Aplicação da cromatografia gasosa bidimensional abrangente e espectrometria de massas por tempo de voo no estudo dos bio-óleos obtidos pela pirólise da palha de cana de açúcar e caroço de pêssego. Tese de doutorado, Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2015**.
- 110.** Maciel, G.P da S. Estudo da Fração aquosa proveniente da pirólise da palha de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2010**.
- 111.** Barbara, J.A. Emprego de diferentes técnicas de extração e da GCXGC para o estudo da fase aquosa gerada durante a produção do bio-óleo de palha de cana de açúcar. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2012**.
- 112.** Lazzari, E. Pirólise de resíduos industriais de manga: análise cromatográfica do bio-óleo. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2014**.
- 113.** Schena, T. Pirólise da fibra da casca de coco: caracterização do bio-óleo antes e após a aplicação de dois processos de melhoramento. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2015**.
- 114.** Torri, I.D.V. Caracterização de bio-óleos obtidos por pirólise da serragem de *Eucalyptus sp.* (*hardwood*) e *Picea Abies* (*softwood*) utilizando as técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2013**.
- 115.** Primaz, C.T. Valorização de resíduos agroindustriais de café e algodão para produção de bio-óleo e biochar. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2018**.
- 116.** Molin, D. Dal. Caracterização de bio-óleos obtidos por pirólise rápida de serragem de lignocel e de bagaço da cana-de-açúcar e avaliação da influência do uso do catalisador nos produtos obtidos pela pirólise catalítica do bagaço da cana-de-açúcar empregando a GC×GC/TOFMS. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2015**.
- 117.** Cunha, M. E. da. Caracterização de bio-óleo da pirólise da palha de cana de açúcar usando fracionamento em sistema pressurizado e cromatografia gasosa mono e bidimensional com detector de espectrometria de massas com analisador quadrupolar. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2013**.
- 118.** Scheneider, J.K. Aplicação da cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas com analisador quadrupolar na caracterização do bio-óleo da palha de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2013**.

119. Polidoro, A. S. dos. Otimização por superfície de resposta do processo de pirólise de resíduo oriundo do torrador de café (silverskin) para a produção de bio-óleo e caracterização química por cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas quadrupolar. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2016**.
120. Scapin, E. Pirólise da casca de arroz: Ativação química do produto sólido obtido e utilização como material adsorvente em extração de fase sólida (SPE). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2016**.
121. Muradov, N., Fidalgo, B., Gujar, A.C., T-Raissi, A. *Biores. Technol.* **2010**, 101, 8424.
122. Onorevoli, B., Machado, M.E., Dariva, C., Franceschi, E., Krause, L.C., Jacques, R.A., Caramão, E.B. *Ind. Crop. Prod.* **2014**, 52, 8.
123. Onorevoli, B. Aproveitamento da torta residual obtida como subproduto da extração de óleo das sementes de tabaco energético através da pirólise: caracterização do bio-óleo e bio-char. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, **2016**.
124. Almeida, T., Bispo, M.D., Cardoso, A.R.T., Migliorini, M.V., Schena T., Campos, M.C.V., Machado, M.E., López, J.A., Krause, L.C., Caramão, E.B.J., *Agr. Food Chem.* **2013**, 61, 6812.
125. Bispo, M.D., Barros, J. A.S., Tomasini, D., Primaz, C.T., Caramão, E.B., Dariva, C., Krause, L.C. *J. Earth Sci. Eng.* **2016**, 6, 244.
126. Van den Dool, H., Kratz, P.D. *J. Chromatogr. A*, **1963**, 11, 463.
127. Helfer, G.A., Bock, F., Marder, L., Furtado, J.C., da Costa, A.B., Ferrão, M.F. *Quim. Nova*, **2015**, 38, 575.
128. Li, X., Strezov, V., Kan, T.J. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* **2014**, 110, 79.
129. Nowakowski, D.J., Bridgwater, A.V., Elliot, D.C., Meier, D., Wild, P. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2010**, 88, 53.
130. Geraldo, R.B., Bello, M.L., Dias, L.R.S., Vera Divaio, M.A., Nagashima, T., Abreu, P.A., Santos, M.B., Albuquerque, M.G., Cabral, I.M., Freitas, A.C.C., Kalil, M.V., Rodrigues, C.R., Castro, H.C.A. *J. Atheroscler Thromb.* **2010**, 17, 2.
131. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, resolução RE nº 899, de 23 de maio de 2003, disponível em redesang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf. Acesso em 2/10/2017.
132. Li, Xi., Stoll, D.R., Carr, P.W. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 845-850.
133. Camenzuli, M., Schoenmakers, P.J. *Anal. Chim. Acta*, **2014**, 838, 93-101.
134. Davis, J.M., Stoll D.R. *J. Chromatogr. A*, **2018**, 1537, 43-57.
135. Primaz, C.T., Schena, T., Lazzari, E., Caramão, E.B., Jacques, R.A. *Fuel*, **2018**, 232, 572-580.
136. Morali, U., Sensoz, S. *Fuel*. **2015**, 150, 672.
137. Mantilla, S.V., Manrique, A.M., Maradei, P.G. *Waste Biomass Valori.* **2015**, 6, 371–383

- 138.** Betemps, G.R., Silveira, L.A., Sampaio, D.M., Bispo, M.D., Krause, L.C., Caramão, E.B., Filho, P.J.S., Cunha da M.E. *Microchem. J.* **2017**, 134, 218-223.
- 139.** Zheng, J.-L. *J. Anal. Appl. Pyrol.* **2007**, 80, 30-35.
- 140.** Cai, W., Liu, R., He, Y., Chai, M., Cai, J. *Fuel Process. Technol.* **2018**, 171, 308-317.
- 141.** Tsai, W.T., Lee, M.K., Chang, Y.M. *Bioresour. Technol.* **2007**, 98, 22-28.
- 142.** Kong, Y., Chen, X., Wang, W., Chen, Z. *Anal. Chim. Acta.* **2011**, 688, 203.
- 143.** Shah, Z., Renato C.V., Marco A.C., Rosangela D.S. *Mod Chem Appl.* **2017**, 5,1-8.

ANEXOS

ANEXO 1: MATERIAL RELACIONADO AO CAPÍTULO III

Tabela A1. Compostos tentativamente identificados nos bio-óleos oriundos de 15 biomassas através da GC/qMS.

Bio-óleos (fases orgânicas)																
		CAR	CP	FC	CAM	SE	AM	CA	BCF	SC	BC	FA	CM	SKC	STE	LA
Nome do composto ou classificação	LTPRI ^(lit)	Análise semi-quantitativa (área %)														
Fenol	978	8,41	3,95	23,13	3,83	6,32	7,6	1,31	3,71	1,52	4,34	7,20	8,02	7,50	12,22	11,38
Fenol, 2-metil-	1055	3,33	2,63	2,79	2,34	2,79	2,7	0,71	0,94	0,83	1,20	3,39	3,18	2,05	3,89	2,46
Fenol, 4-metil-	1077	7,23	4,54	6,07	4,41	9,11	4,78	2,21	2,15	2,70	5,09	4,39	7,21	2,69	17,44	11,43
Fenol, 2-metoxi-	1089	6,61	7,5	4,64	15,96	5,02	-	0,28	0,22	1,06	3,65	4,33	1,45	4,04	4,74	0,91
Fenol, 2,6-dimetil-	1105	0,46	0,33	0,32	0,57	0,3	0,22	-	0,24	0,39	0,20	0,74	0,43	0,18	0,32	0,27
Fenol, 2-etil-	1138	0,39	0,32	0,4	0,43	0,37	0,54	0,38	0,38	0,35	0,27	1,68	1,23	0,39	0,42	0,65
Fenol, 2,4-dimetil-	1150	1,29	1,63	0,94	0,5	3,79	0,69	0,82	0,82	-	0,70	1,09	2,85	0,67	3,88	2,24
Fenol, 2,5-dimetil-	1152	0,88	0,65	0,57	0,58	-	0,89	-	-	-	0,33	1,32	-	0,30	-	-
Fenol, 4-etil-	1168	6,64	0,62	1,05	1,1	2,68	0,46	0,93	0,66	-	6,26	7,09	3,86	1,78	-	-
Fenol, 3-etil-	1171	0,98	0,3	0,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,25	3,44
Fenol, 3,4-dimetil-	1181	0,20	0,14	0,1	-	0,15	0,27	-	-	-	-	0,32	-	-	-	-
C1-metoxi, Fenol ^a	n.e	-	-	-	1,76	0,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenol, 2-metoxi-4-metil-	1181	0,12	0,31	0,09	0,55	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenol, 4-metoxi-3-metil-	1183	-	-	-	-	-	-	0,24	-	0,55	-	-	-	-	-	0,24
Fenol, 2-metoxi-5-metil	1191	3,84	7,6	1,54	8,5	7,16	-	-	-	-	3,21	0,50	-	0,63	1,61	-
Fenol, 2,5-dimetil-	1193	0,24	0,14	0,28	0,28	-	0,28	-	-	-	-	0,36	-	0,25	-	-
1,2-Benzenediol	1197	4,84	7,42	4,39	5,02	4,62	2,81	-	0,52	-	0,94	-	-	-	-	-
Fenol, 2,4,6-trimetil-	1202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20	-	-	-	-	-
Fenol, 3-(1-metiletil)-	1227	-	0,79	-	-	0,75	-	-	-	-	-	-	0,43	-	-	-
1,3-Benzenediol	n.e	0,97	-	-	0,23	-	-	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-
C3 Fenol ^a	n.e	1,13	1,04	0,94	-	1,39	-	-	-	-	-	1,32	-	0,34	-	-
Fenol, 2,3,6-trimetil-	1239	-	-	-	-	-	0,52	-	-	-	-	-	1,48	-	-	-
Fenol, 4-(1-metiletil)-	1247	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,58	0,61
1,2-Benzenediol, 3-metil-	1263	1,12	1,51	0,45	1,25	0,68	-	-	-	-	0,39	-	-	-	-	-
1,2-Benzenediol, 3-metoxi-	1268	0,54	0,64	0,73	-	-	-	-	-	-	0,74	-	-	-	-	-
Fenol, 4-propil-	1257	-	0,18	-	-	0,39	-	-	-	-	-	-	-	-	0,74	-
Fenol, 4-(2-propenil)-	1258	-	-	-	-	0,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3 Fenol ^a	n.e	-	-	-	0,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenol, 2,3,5-trimetil-	1276	-	-	-	-	-	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenol, 4-etil-2-metoxi-	1282	3,29	4,09	1,79	6,38	2,21	-	0,24	0,22	0,36	2,51	1,52	-	1,39	1,28	0,28
1,2-Benzenediol, 4-metil-	1295	1,31	4,26	1,53	2,03	4,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenol, 2-metoxi-4-vinil-	1311	-	-	-	-	-	-	0,28	0,39	0,44	-	-	-	-	-	-
Fenol, 2-metoxi-4-propil-	1357	0,62	0,79	0,31	-	0,8	-	-	-	-	0,35	-	-	0,23	0,95	-
Fenol, 2,6-dimetoxi-	1357	1,91	2,78	2,94	0,83	-	-	0,58	-	-	3,65	2,87	-	1,20	-	0,43
Fenol, 2-metoxi-4-(2-propenil)-	1356	0,58	1,24	0,31	1,49	0,99	-	-	-	-	0,37	-	-	-	-	-

PPGQ-UFRGS – TESE DE DOUTORADO

C2 Benzenediol ^a	n.e	-	-	-	-	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dimetoxi, Fenol, ^a	n.e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,41	-	-	-	-	-
1,2-Benzenediol, 4-etil-	1392	0,87	2,29	0,71	1,27	2,26	-	-	-	-	-	-	-	0,81	-	-
Fenol, 2-metoxi-4-(1-propenil)-	1414	0,48	0,97	0,36	1,52	0,73	-	-	-	-	0,21	-	-	-	0,34	-
Metoxi-metoximetil, Fenol-	n.e	0,58	2,58	0,96	0,13	-	-	0,14	-	-	3,19	-	-	-	-	-
Metoxi-propenil, Fenol-	n.e	2,74	5,43	1,4	7,04	2,74	-	0,18	-	0,58	1,47	-	-	1,06	1,11	-
C3 Benzenediol ^a	n.e	-	-	-	-	0,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Naftalenol	1520	-	-	-	-	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenol, 2,6-dimetoxi-4-(2-propenil)-	1602	-	0,45	0,26	-	-	-	-	-	-	0,59	-	-	-	-	-
Fenóis (total área%)		61,6	67,12	59,34	68,42	62,35	22,11	8,39	10,25	8,78	40,27	38,12	30,1	25,5	61,7	34,34
Fenóis (número de compostos)		28	30	28	25	28	13	14	11	10	23	15	11	17	15	12
2(5H)-Furanona, 5-metil-	938	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	0,18	-	-	-	-	-
2-Ciclopenten-1-ona, 3-metil-	973	1,00	0,29	-	0,75	-	0,4	-	0,36	-	-	1,08	0,87	0,81	-	0,83
2-Butanona, 1-acetoxi-	964	-	0,35	-	-	-	-	-	-	-	0,69	0,96	0,79	-	-	-
2(5H)-Furanona, 3,5-dimetil-	993	0,60	-	0,27	-	-	0,63	-	0,54	-	-	-	1,14	-	-	-
C2 Ciclopentenona ^a	n.e	0,16	0,06	0,11	0,13	-	-	-	-	-	-	0,32	0,45	0,15	-	-
2-Ciclopenten-1-ona, 2-hidroxi-3-metil-	1036	3,47	1,43	0,76	2,56	0,82	2,15	0,16	1,46	0,29	2,10	4,00	2,88	-	0,23	1,47
2-Ciclopenten-1-ona, 2,3-dimetil-	1040	0,75	0,27	0,33	0,6	0,13	0,68	0,09	0,46	-	0,42	1,78	0,97	0,77	0,27	0,57
Ciclopent-2-ene-1-ona, 2,3,4-trimetil-	1071	0,13	0,07	0,08	-	-	-	-	-	-	-	0,97	-	-	-	-
Acetofenona	1063	-	0,12	0,11	-	-	-	-	0,14	-	-	0,33	0,40	0,16	-	0,17
C3, Ciclopentenona ^a	n.e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,41	-	0,16	-	-
C3-hidroxi, Ciclopentenona ^a	n.e	-	-	-	0,78	0,14	0,49	-	0,31	-	0,29	2,02	0,72	0,49	-	0,46
1-Indanona	1292	0,45	0,18	0,18	-	-	0,32	0,08	0,14	-	0,15	0,54	0,29	0,25	-	-
Etanona, 1-(2-hidroxi-5-metilfenil)-	1316	5,11	3,28	1,73	8,24	1,87	-	-	-	-	4,83	4,88	0,63	2,51	1,25	0,98
Etanona, 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-	1491	0,49	1,25	0,16	1,11	1,36	-	-	-	-	0,17	-	-	-	-	-
Dihidroxi - metoximetil, Etanona	n.e	-	1,02	0,8	-	-	-	-	-	0,35	0,81	0,64	-	0,27	-	-
2-Propanona, 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-	1531	1,10	1,4	0,66	2,35	0,48	-	-	-	-	0,34	-	-	-	-	-
Etanona, 1-(3,4-dimetoxifenil)-	1573	-	0,75	0,57	-	0,15	-	-	-	0,27	1,04	-	-	-	-	0,50
2-Butanona, 4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-	1645	-	1,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanona, 1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-	1740	0,23	-	-	-	-	-	-	-	-	0,40	-	-	-	-	-
2-Nonadecanona	2106	-	-	-	-	-	0,38	-	0,21	-	-	-	-	-	-	-
Cetonas (total área%)		13,66	11,78	5,76	15,41	4,95	5,05	0,33	3,62	0,91	11,42	17,93	9,14	5,57	1,75	4,98
Cetonas (número de compostos)		12	14	12	8	7	7	3	8	3	12	12	10	9	3	7
2-Furancarboxaldeído, 5-metil-	963	1,04	0,47	1,6	0,24	0,16	0,24	-	-	-	2,62	0,87	-	-	-	-
Benzaldeído, 2-hidroxi-	1041	-	0,2	-	-	0,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidroxi-C1, Benzaldeído ^a	n.e	-	0,27	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Furancarboxaldeído, 5-(hidroximetil) (HMF)	1236	-	-	1,24	-	-	-	-	-	-	11,27	-	-	-	-	-
Benzaldeído, 2,4,6-trimetil-	1335	-	-	-	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzaldeído, 4-hidroxi-3-metoxi-	1400	0,98	1,93	0,25	1,26	1,06	-	-	-	-	0,42	-	-	-	-	-
Benzaldeído, 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-	1670	-	0,43	-	-	-	-	-	-	-	0,30	-	-	-	-	-
Hidroxi - metoxifenil, Propenal-	n.e	0,89	1,89	-	-	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aldeídos (total área %)		2,91	5,19	3,09	1,5	2,03	0,24	-	-	-	14,61	0,87	-	-	-	-
Aldeídos (número de compostos)		3	6	3	2	6	1	-	-	-	4	1	-	-	-	-
Benzofurano	996	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,58	-
Benzofurano, 2-metil-	1109	0,15	-	0,33	-	-	0,15	-	0,13	-	0,17	-	-	-	0,16	-
Benzofurano, 4,7-dimetil-	1220	-	-	0,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzofurano, 2,3-dihidro-	1223	8,74	0,32	0,9	0,3	2,04	0,18	0,24	-	-	14,00	9,67	1,66	-	6,09	1,48
Furanos (total área %)		8,89	0,32	1,96	0,3	2,04	0,33	0,24	0,13	-	14,17	9,67	1,66	-	6,83	1,48

Furanos (número de compostos)	2	1	3	1	1	2	1	1	-	2	1	1	-	3	1	
Piridina, 2,5-dimetil-	926	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,83	-	0,95	-	
Piridina, 2,4,6-trimetil-	993	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-	-	-	
Pirazina, 2-etil-5-metil-	1000	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C2-Imidazolidinona	n.e	0,60	2,41	0,97	-	0,38	-	-	-	5,60	-	-	-	-	-	
Pirrol, 2-acetil-	1072	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	0,08	-	0,28	-	
C1-Pirrolidinediona	n.e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,11	0,43	0,19	
3-Fenilpropionitrila	1244	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,06	1,09	
Isoquinolina	1255	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19	
Indol	1290	-	-	-	-	-	0,98	-	-	-	-	3,31	3,04	5,76	3,71	
1H-Indol, 5-metil-	1381	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,43	-	
1H-Indol, 3-metil-	1383	-	-	-	0,13	-	0,39	0,26	0,40	-	-	0,90	0,85	1,10	1,42	
C2, 1H-Indol ^a	n.e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,42	0,15	0,37	0,39	
C2, 1H-Indol ^a	n.e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,36	-	-	
Cafeína	1838	-	-	-	-	-	-	0,97	-	-	-	-	15,12	-	-	
Hexadecanamida	2182	-	-	-	-	-	0,18	2,36	0,75	0,30	-	0,64	0,52	-	1,01	
9-Octadecenamida	2375	-	-	-	-	-	0,46	0,77	0,15	0,60	-	-	-	-	-	
Eicosanamida	n.e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,05	-	-	
Compostos nitrogenado 1 ^b	n.e	-	-	-	-	-	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-	
Compostos nitrogenado 2 ^b	n.e	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14	-	-	2,65	-	-	
Compostos nitrogenado 3 ^b	n.e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,60	-	-	
Compostos nitrogenados (total área%)		0,6	2,41	0,97	0,13	0,38	0,74	4,5	3,13	1,44	5,77	-	6,4	25,45	10,38	8
Compostos nitrogenados (número de compostos)		1	1	1	1	1	3	4	5	4	2	-	7	10	8	7
Tetrahydro, Furanometanol	n.e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,28	-	-	-	-	
9-Hexadecanol	1863	-	-	-	-	-	-	-	0,13	-	-	-	-	-	-	
Hexadecanol	1877	-	-	-	-	-	-	-	0,24	-	-	-	-	-	-	
Fitol	2111	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,31	-	-	0,26	
Docosanol	2501	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22	
Álcoois (total área %)		-	-	-	-	-	-	-	-	0,37	-	0,28	0,31	-	-	0,48
Álcoois (número de compostos)		-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	1	-	-	2
Benzeno, 1-metoxi-4-metil-	1024	-	-	-	0,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Benzeno, 1,2-dimetoxi-	1149	-	-	-	0,29	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Benzeno, 1,4-dimetoxi	1170	-	0,81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Benzeno, 1,2-dimetoxi-4-metil	1246	-	-	-	1,12	0,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Benzeno, 1,2-dimetoxi-4-vinil	1367	-	-	-	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Benzeno, 1,2-dimetoxi-4-(1-propenil)-	1495	-	-	-	-	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Naftaleno, 2,3-dimetoxi-	1735	-	-	-	-	0,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Éteres (total área %)		-	0,81	-	1,84	1,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Éteres (número de compostos)		-	1	-	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido benzóico, 4-hidroxi-3-metoxi-, metil ester	1516	-	0,39	-	0,42	0,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ácido dodecanóico, metil ester	1526	-	-	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ácido tetradecanóico, metil ester	1726	-	-	0,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ácido Palmítico, metil ester	1926	-	-	-	0,11	-	0,32	0,28	0,18	-	0,28	0,38	0,71	-	-	
Ácido octadecanóico, propenil ester	n.e	-	-	-	-	-	1,11	0,89	-	-	-	-	-	-	0,63	
Ácido 9-octadecenóico, metil ester	2082	-	-	-	0,09	-	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-	
9,12-Ácido octadecanodienóico, metil ester	2092	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,29	-	-	
Ácido octadecanóico, metil ester	2128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-	

PPGQ-UFRGS – TESE DE DOUTORADO

Ácido eicosanóico, metil ester	2339	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,49	-	-
Ácido docosanóico, metil ester	2530	-	-	-	-	-	-	-	-	0,11	-	-	-	0,61	-	-
Ácido tetracosanóico, metil ester	2732	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-
Esteres (área total %)		-	0,39	0,44	0,62	0,14	-	1,43	1,17	0,29	-	0,28	0,38	2,59	-	0,63
Esteres (número de compostos)		-	1	2	3	1	-	2	2	2	-	1	1	7	-	1
Ácido hexanóico	1020	-	-	-	-	-	-	1,54	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido octanóico	1190	-	-	-	-	-	-	0,90	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido undecenóico	1484	-	-	-	-	-	-	0,69	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido dodecanóico	1578	-	-	8,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido tetradecanóico	1770	-	-	3,6	-	-	-	0,97	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Palmítico	1972	1,52	0,47	4,12	1,1	0,18	5,92	45,29	47,13	3,23	1,04	3,75	8,17	5,85	-	15,70
Ácido 9,12-octadecanodienóico	2131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,92	-	1,61	0,81	-
Ácido 9-octadecenóico, isomero	2140	-	-	2,97	0,7	-	21,80	16,48	3,15	9,88	-	-	-	1,35	1,06	-
Ácido 9-octadecenóico, isomero	2143	-	-	0,6	-	-	3,42	4,36	2,80	4,54	-	-	-	-	-	-
Ácido octadecanóico	2166	-	-	0,46	0,23	-	-	2,74	7,93	1,46	-	-	0,43	1,33	-	0,82
Ácido eicosanóico	2365	-	-	-	-	-	-	-	1,30	-	-	-	-	1,16	-	-
Ácido docosenóico	n.e	-	-	-	-	-	-	-	-	13,79	-	-	-	0,37	-	-
Ácido docosanóico	2567	-	-	-	-	-	-	-	-	4,97	-	-	-	-	-	-
Ácidos carboxílicos (área total %)		1,52	0,47	20,04	2,03	0,18	31,14	72,97	62,31	37,87	1,04	5,67	8,6	11,67	1,87	16,52
Ácidos carboxílicos (número de compostos)		1	1	6	3	1	3	8	5	6	1	2	2	6	2	2
Benzeno, propil-	958	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,24	-	-	-
Benzeno, 1-etil-3-metil-	968	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,41	-	-	-
Benzeno, 1,3,5-trimetil-	975	-	-	-	-	-	-	-	0,10	-	-	0,27	1,36	-	-	-
Benzeno, 1-etil-2-metil-	977	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,34	0,42	-	-	-
Benzeno, 1-propenil	1011	-	-	-	-	-	-	-	0,12	-	-	-	1,35	-	-	-
Benzeno, 1,2,3-trimetil-	1016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,41	-	-	-
1H-Indeno	1040	0,11	-	0,17	0,09	-	0,22	-	0,25	0,89	-	0,30	1,01	0,17	0,74	-
Benzeno, butil-	1053	-	-	-	-	-	-	-	0,17	0,15	-	-	-	-	-	-
Undeceno	1092	-	-	-	-	-	-	-	-	0,64	-	-	0,50	0,11	-	-
Undecano	1100	-	-	0,4	-	-	-	-	-	0,06	-	0,18	-	-	-	-
Indano, 4-metil-	1141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-	-
1H-Indeno, 3-metil	1155	-	-	0,18	-	-	-	-	-	1,74	-	1,64	0,68	0,07	-	-
Benzeno, pentil-	1154	-	-	-	-	-	-	-	0,20	0,40	-	-	-	-	-	-
Naftaleno	1182	0,41	0,18	0,27	0,56	-	1,1	0,13	0,24	2,03	0,13	-	0,97	0,29	1,05	0,18
Dodeceno	1192	-	-	0,12	-	-	0,55	0,24	0,48	0,94	-	0,26	0,68	0,35	-	-
Dodecano	1200	-	-	0,09	-	-	0,04	-	0,13	0,11	-	0,35	0,23	0,26	-	-
Naftaleno, 2-metil-	1290	0,20	0,25	0,2	0,17	-	0,92	-	0,35	2,23	0,13	0,69	0,76	-	-	-
Trideceno	1292	-	-	0,12	-	-	1,06	-	0,59	0,78	-	0,64	1,25	-	-	-
Tridecano	1300	-	-	0,52	-	-	0,11	-	0,22	0,13	-	0,56	0,27	0,45	-	-
Naftaleno, 1-metil	1305	-	-	-	-	-	0,53	0,10	0,27	0,99	-	0,55	0,89	-	0,35	0,13
Tetradeceno	1392	-	-	-	-	-	1,57	0,90	1,11	0,71	-	0,42	0,96	0,45	0,26	-
Naftaleno, 2,6-dimetil-	1409	-	-	-	-	-	0,14	-	-	0,25	-	-	0,51	-	-	-
Naftaleno, 1,7-dimetil-	1418	-	-	-	-	-	-	-	-	0,26	-	-	0,69	-	-	-
Acenaftaleno	1456	-	-	-	-	-	0,09	-	-	0,24	-	-	-	-	-	-
Pentadeceno	1492	-	-	-	-	-	0,85	0,52	0,60	0,53	-	0,40	1,02	0,51	0,15	0,22
Pentadecano	1500	-	-	0,36	-	-	0,81	1,13	2,12	0,44	-	0,86	0,91	0,90	0,21	0,30
Fluoreno	1579	-	-	-	-	-	-	-	-	0,54	-	-	-	-	-	-
Hexadeceno	1592	-	-	-	-	-	1,17	0,42	0,55	0,51	-	-	0,51	0,42	-	0,21

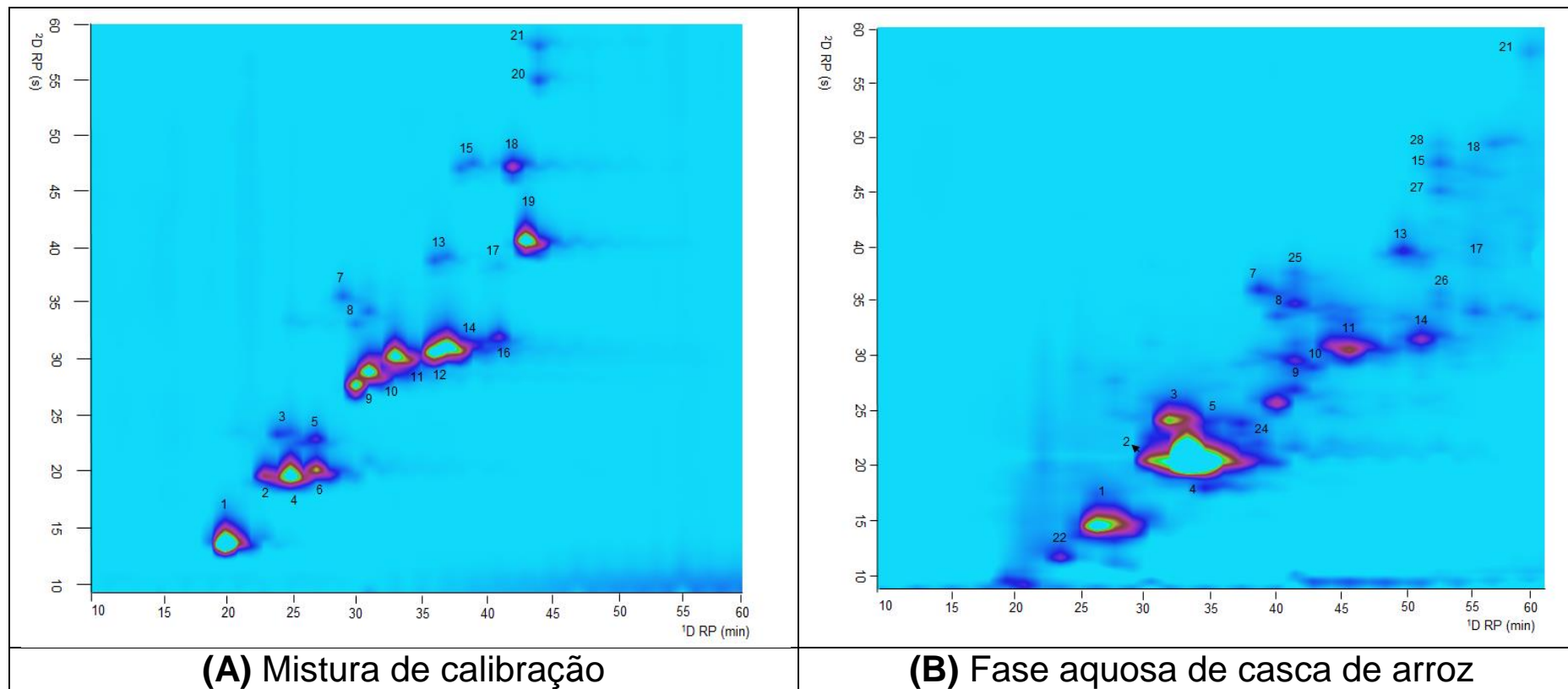
PPGQ-UFRGS – TESE DE DOUTORADO

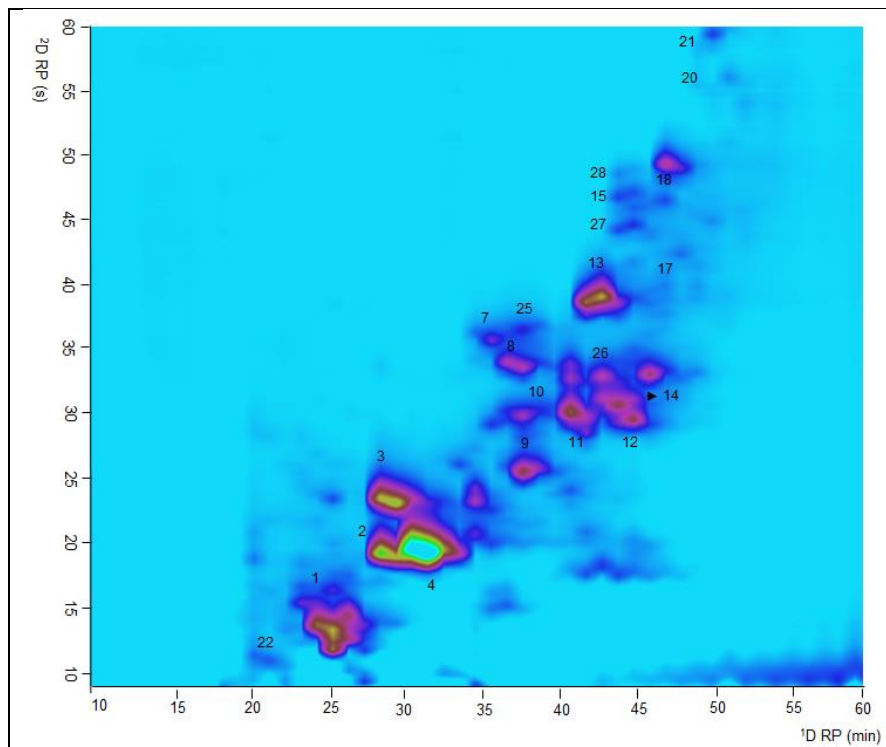
Hexadecano	1600	-	-	-	-	-	0,30	0,17	0,23	0,16	-	0,55	0,23	0,72	-	0,22
Heptadeceno	1692	-	-	-	-	-	0,56	0,31	0,32	0,65	-	-	0,74	0,82	0,75	-
Heptadecano	1700	-	-	0,09	-	-	2,30	0,18	0,67	0,24	-	0,35	0,21	0,62	0,09	0,17
Hidrocarboneto	n.e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,40	1,40	-	1,70
Octadeceno	1792	-	-	-	-	-	0,24	-	0,17	0,44	-	-	0,36	0,33	-	0,17
Octadecano	1800	-	-	-	-	-	0,14	-	0,07	0,12	-	0,27	0,10	0,59	-	0,28
Hidrocarboneto	n.e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,65	-	-	-
Nonadeceno	1892	-	-	-	-	-	-	0,60	0,07	0,26	-	-	0,28	0,37	-	0,28
Nonadecano	1900	-	-	-	-	-	-	0,19	0,19	0,24	-	0,37	0,50	0,91	-	0,73
Eicoseno	1992	-	-	-	-	-	-	-	-	0,42	-	-	0,36	0,44	-	0,27
Eicosano	2000	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	-	-	0,17	0,70	-	0,25
Hidrocarboneto	n.e	-	-	-	-	-	-	-	-	1,56	-	-	-	-	-	-
Hidrocarboneto	n.e	-	-	-	-	-	-	-	-	1,22	-	-	-	-	-	-
Heneicoseno	2092	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	-	-	0,29	0,27	-	0,24
Heneicosano	2100	-	-	-	0,04	-	-	-	-	0,39	-	0,20	0,10	0,68	-	0,20
Docoseno	2192	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14	-	0,28	0,29	0,16	-	0,32
Docosano	2200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,32	0,12	0,35	-	0,31
Tricoseno	2292	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,21	0,14	-	0,19
Tricosano	2300	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	0,30	0,16	0,36	-	0,21
Tetracoseno	2392	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,18	0,23	-	-	0,20	-
Tetracosano	2400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,21	0,14	-	-	0,13	-
Pentacoseno	2492	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16	-	-	0,16	-
Pentacosano	2500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16	0,10	-	-	0,13	-
Hexacoseno	2592	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-	-	-
Hexacosano	2600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12	-	-	-
Heptacoseno	2692	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20	-	-	0,27
Heptacosano	2700	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	0,21	-	-	0,20
Octacoseno	2792	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,30	-	-	-
Octacosano	2800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	-	-	-
Nonacoseno	2892	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-	-
Nonacosano	2900	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,31	0,14	-	-	0,13
Nonacosano	2896	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,45	-	-	-
Triacoteno	2992	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,31	-	-	-
Triacotano	3000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13	-	-	-
Hidrocarbonetos (total área%)		0,72	0,43	1,77	0,77	-	12,7	4,89	9,22	20,84	0,81	11,21	27,76	12,84	4,22	7,18
Hidrocarbonetos (número de compostos)		3	2	11	4	-	19	12	23	36	5	28	51	27	12	23
Maltol	1114	-	0,19	0,32	0,36	-	0,76	-	0,31	-	-	-	0,22	-	-	0,54
Açúcar	n.e	-	-	-	-	-	0,75	-	-	-	-	1,28	1,35	-	-	0,23
Outros (total área%)		-	0,19	0,32	0,36	-	1,51	-	0,31	-	-	1,28	1,57	-	-	0,77
Outros (número de compostos)		-	1	1	1	-	2	-	1	-	-	1	2	-	-	2
Total área identificada (%)		89,9	88	93,69	91,4	73,6	73,8	92,75	90,14	70,5	88,09	85,31	85,92	83,6	86,3	74,3
Total número de compostos identificados		50	58	67	52	49	50	44	56	63	49	62	86	76	43	57

LTPRI lit: índice de retenção da literatura (NIST biblioteca); LTPRI exp: índice de retenção calculado experimentalmente; (a) Classificação cadeia alkil x átomos de carbono; (b) Compostos tentativamente identificados apenas por comparação de espectros de massas e ordem de eluição. n.e: não encontrado na literatura NIST biblioteca. CAR- casca de arroz; CP- caroço de pêssego; FC- fibra de coco; CAM- casca de amendoim; SE-serragem de eucalipto; AM-amendoa doo caroço de manga; CA-caroço de algodão; BCF-borra de café; SC-semente de crambe; BC – bagaço de cana de açúcar; FA- folhas de abacaxi; CM-casca de mandioca; SKC- silverkin de café; STE-torta da semente do tabaco energético; LA- lentilha d'água.

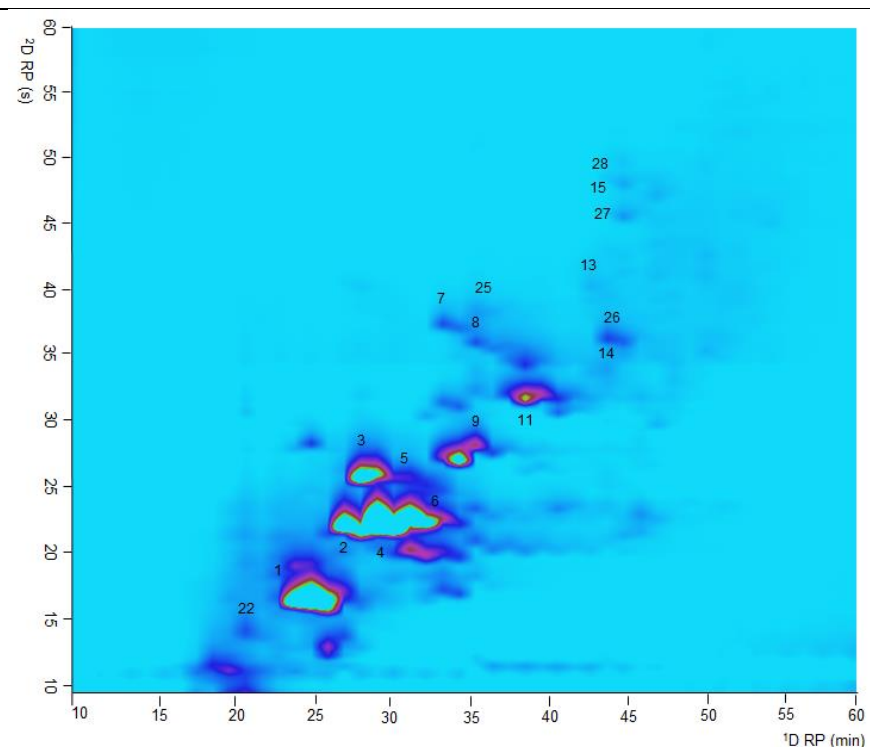
ANEXO 2: MATERIAL RELACIONADO AO CAPÍTULO IV

Figura A1. Diagramas bidimensionais obtidos por LCxLC das fases aquosas provenientes da pirólise das 13 biomassas estudadas neste trabalho.

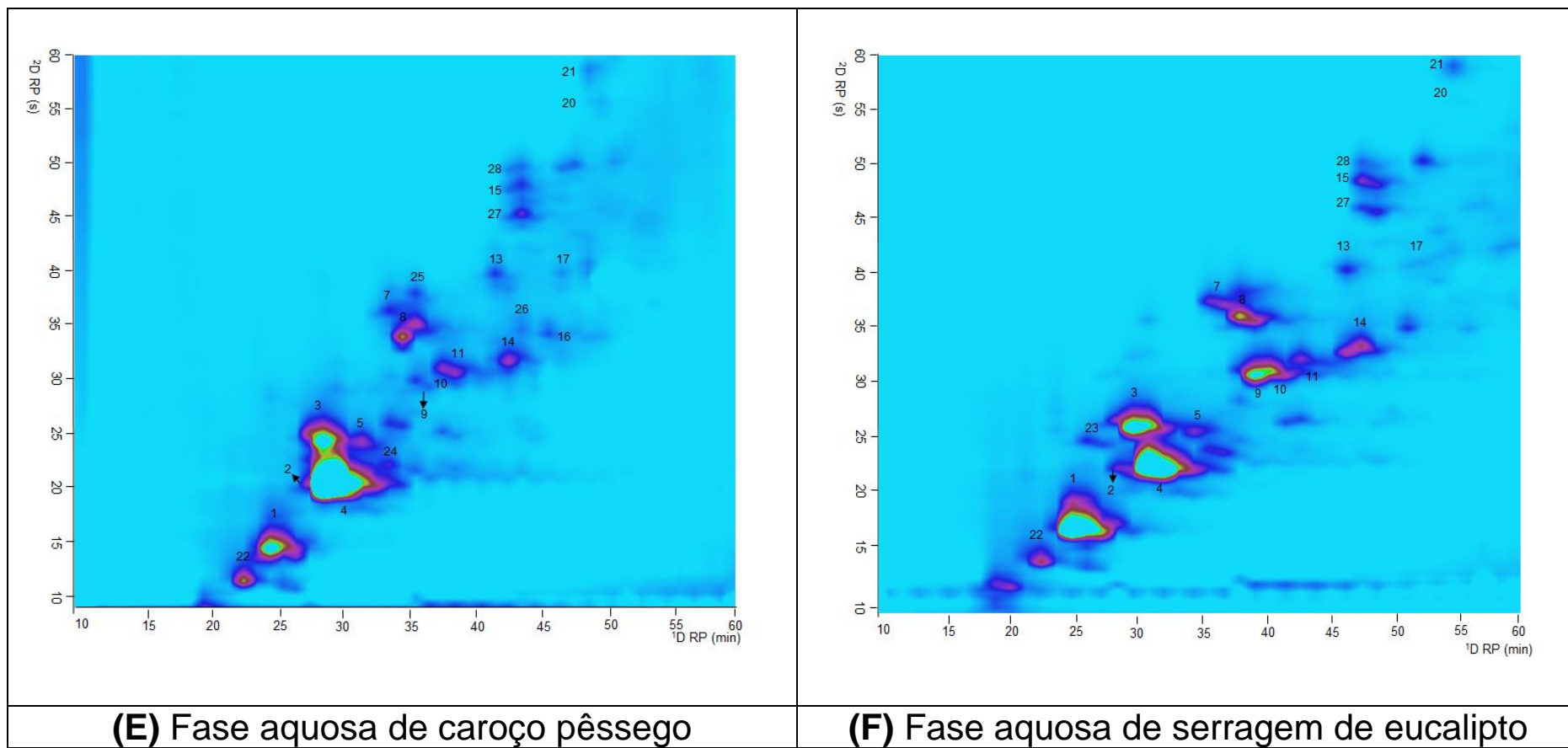


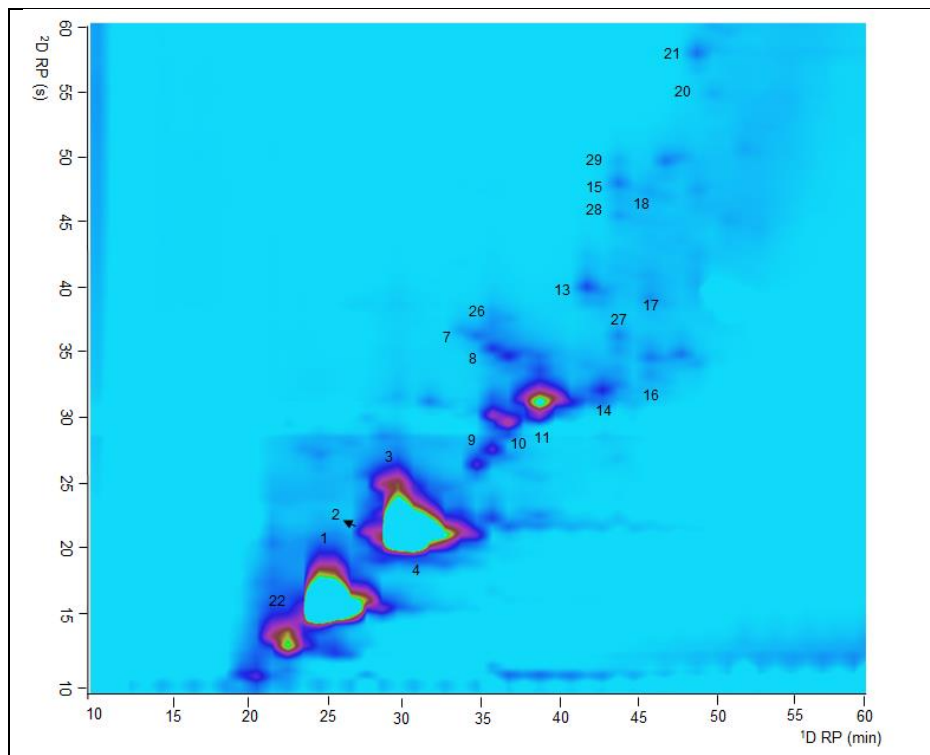


(C) Fase aquosa de casca de amendoim

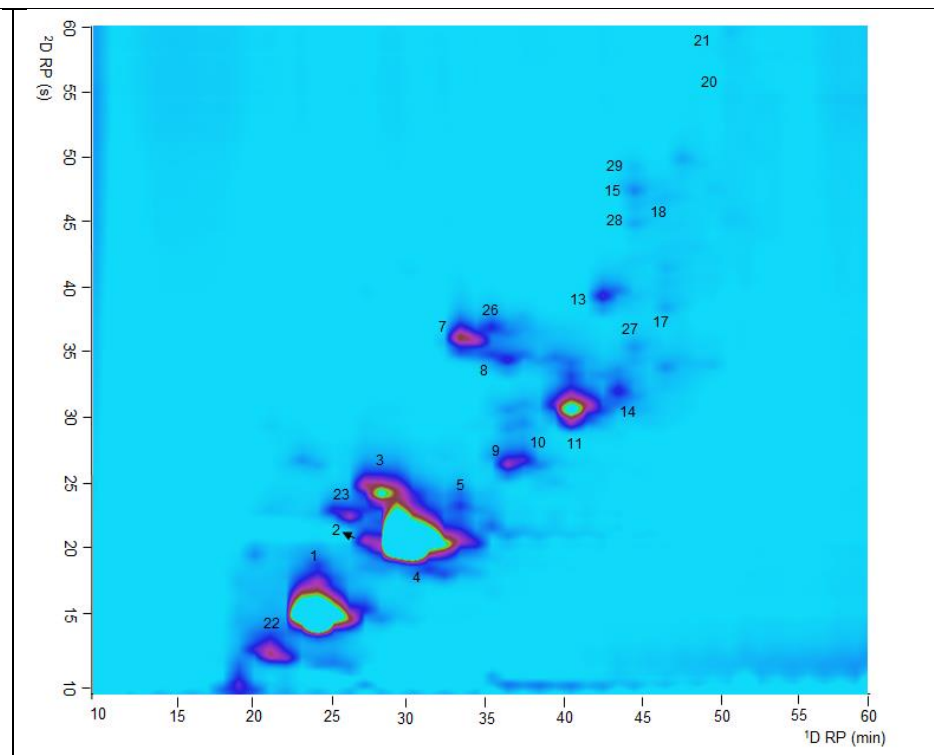


(D) Fase aquosa de borra de café

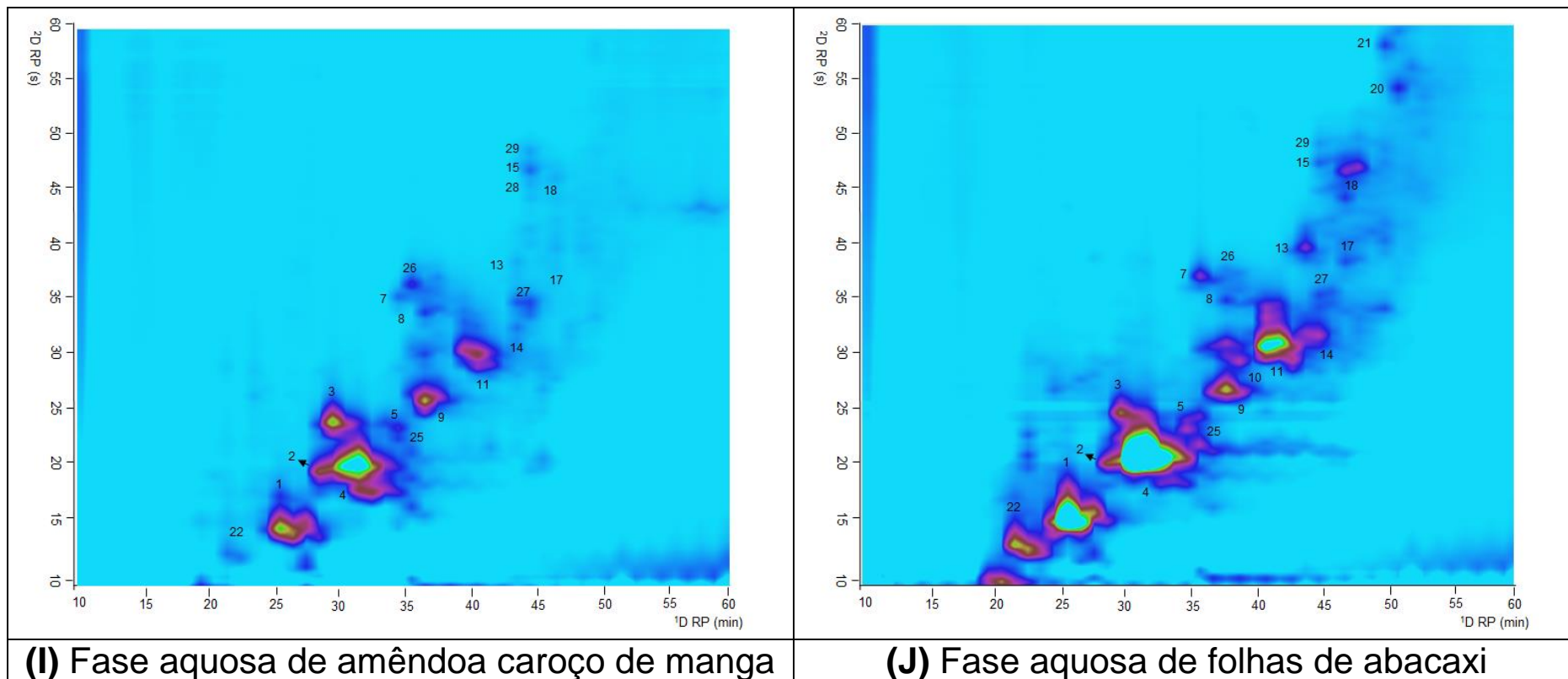


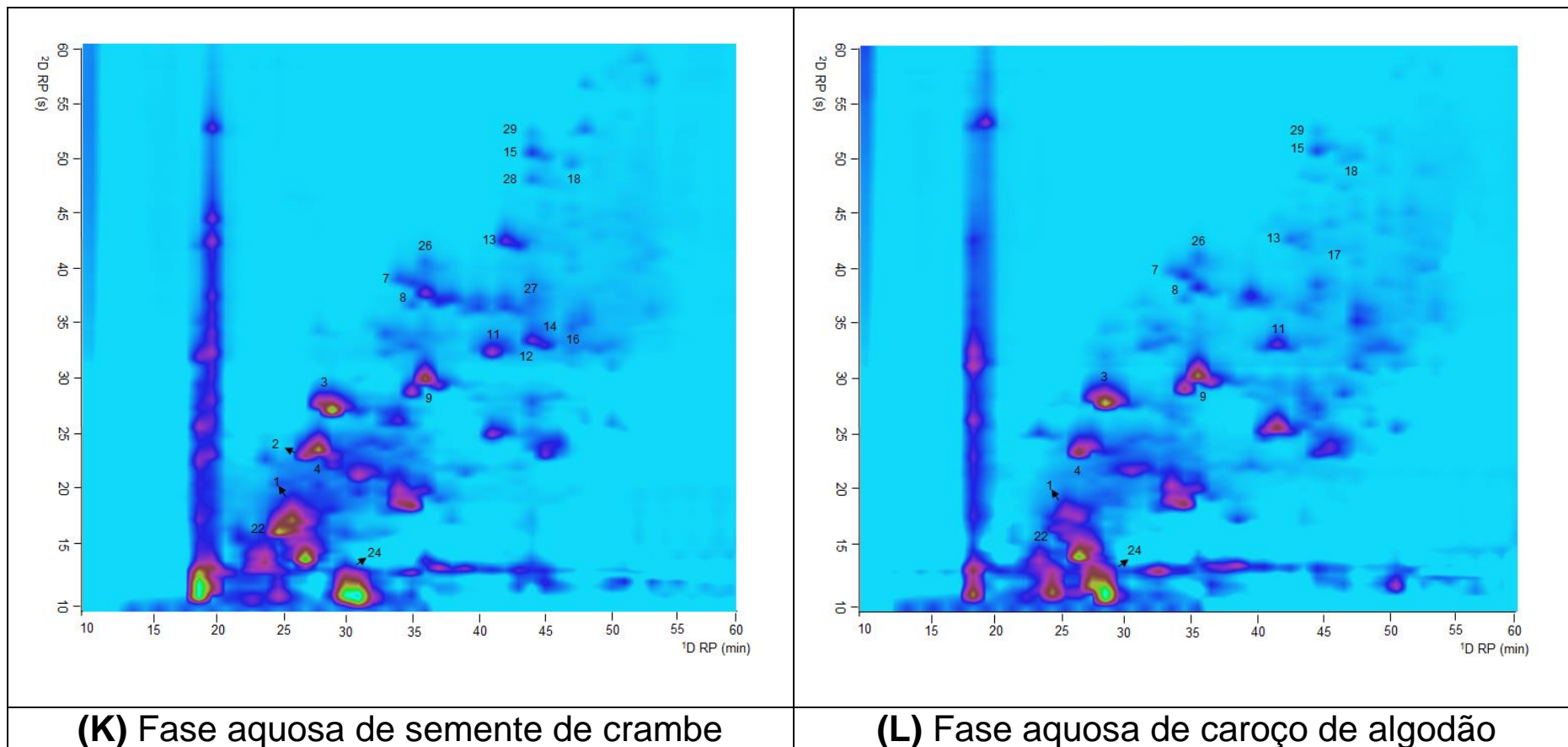


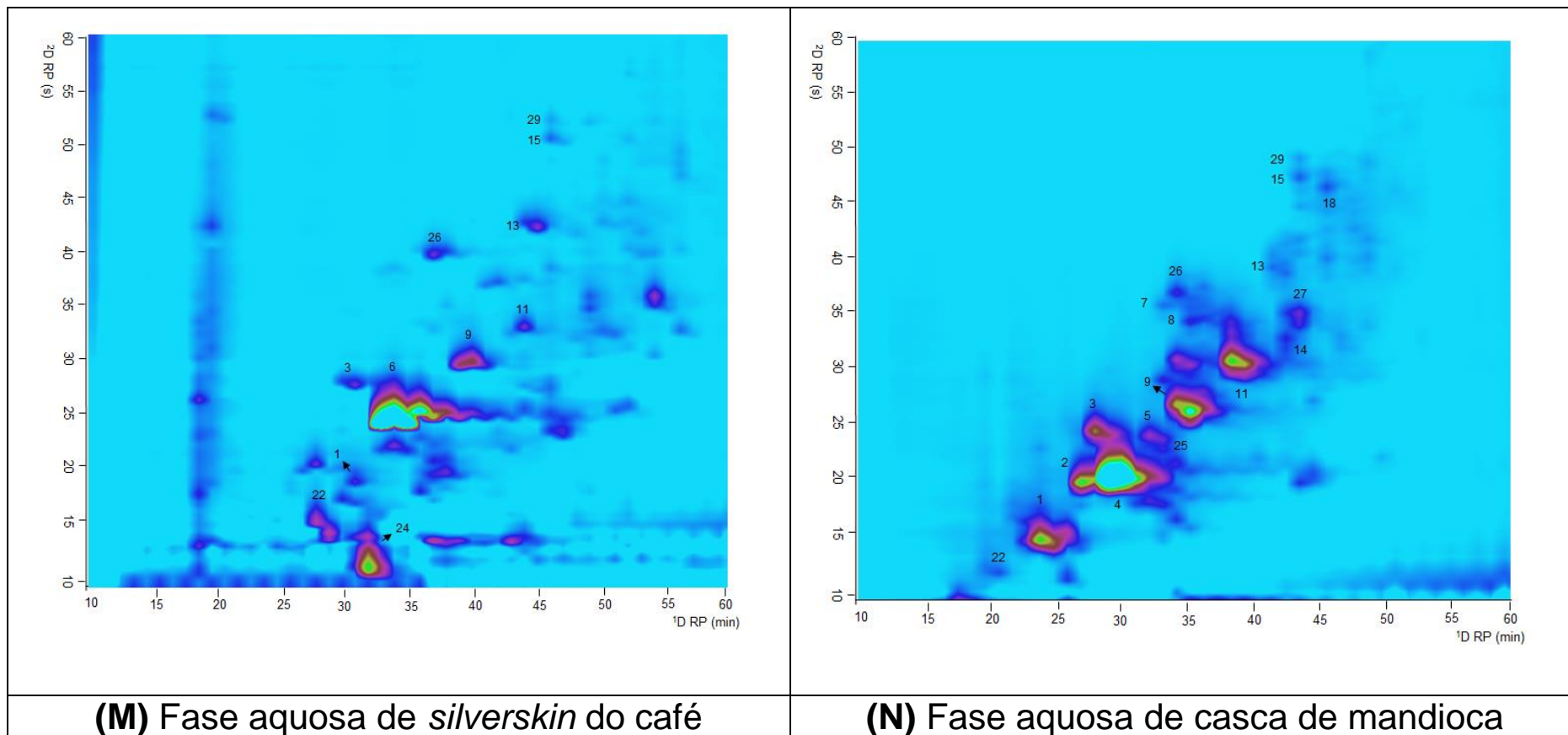
(G) Fase aquosa de bagaço de cana-de-açúcar



(H) Fase aquosa de fibra de coco verde







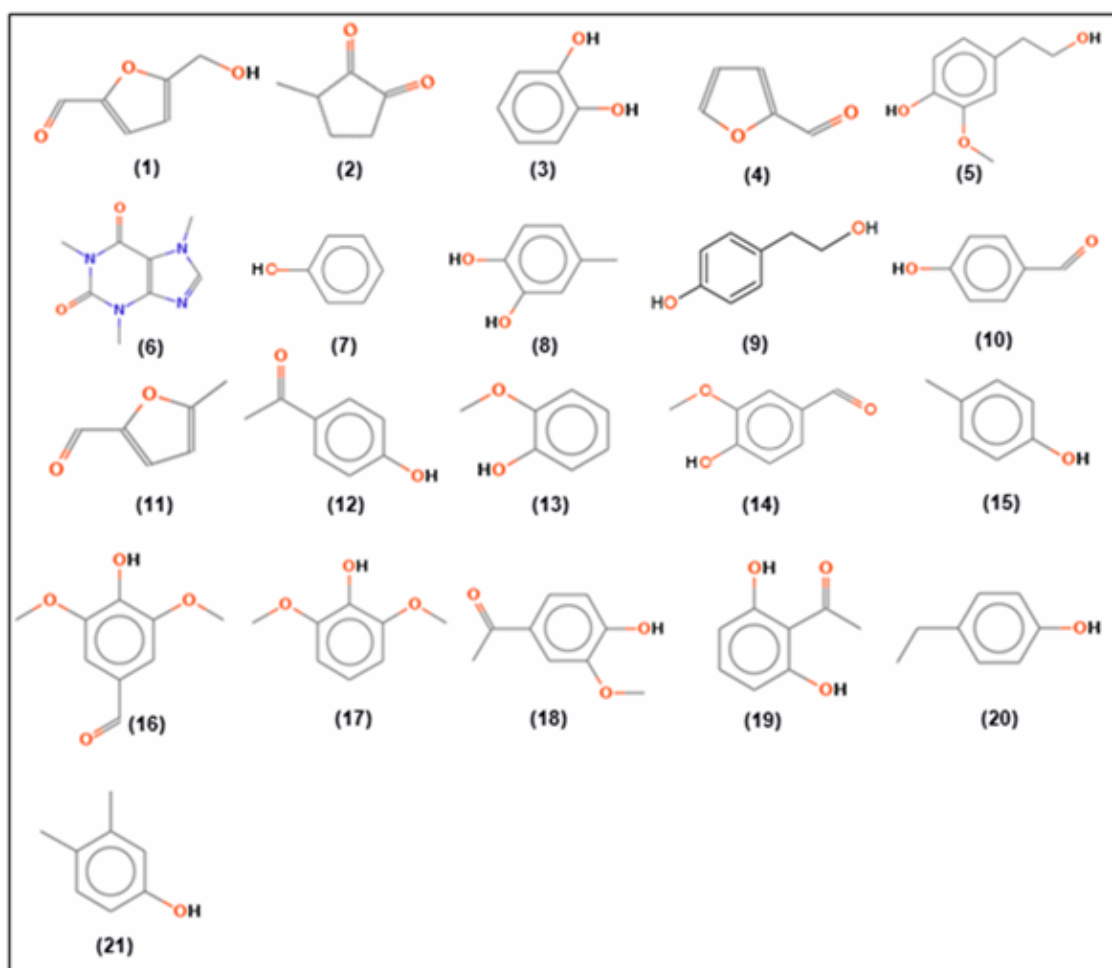


Figura A2. Estruturas químicas dos padrões comerciais empregados na análise qualitativa /quantitativa por LCxLC. Identificação dos picos descrita na **Tabela VII** (capítulo IV)

ANEXO 3: MATERIAL RELACIONADO AO CAPÍTULO V

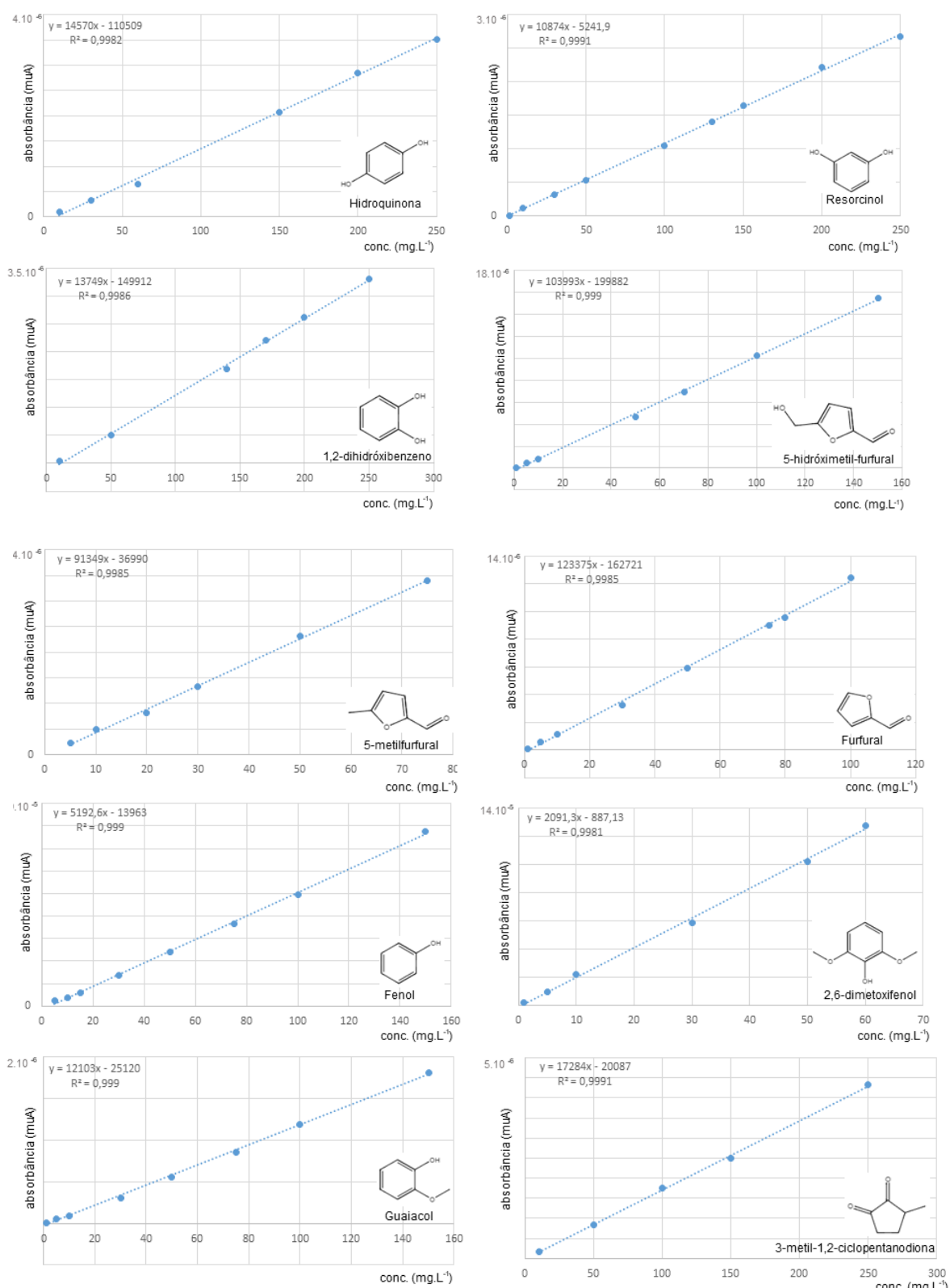


Figura A3. Curvas analíticas empregadas para a quantificação dos compostos da fase aquosa da casca de arroz através da HPLC/DAD.

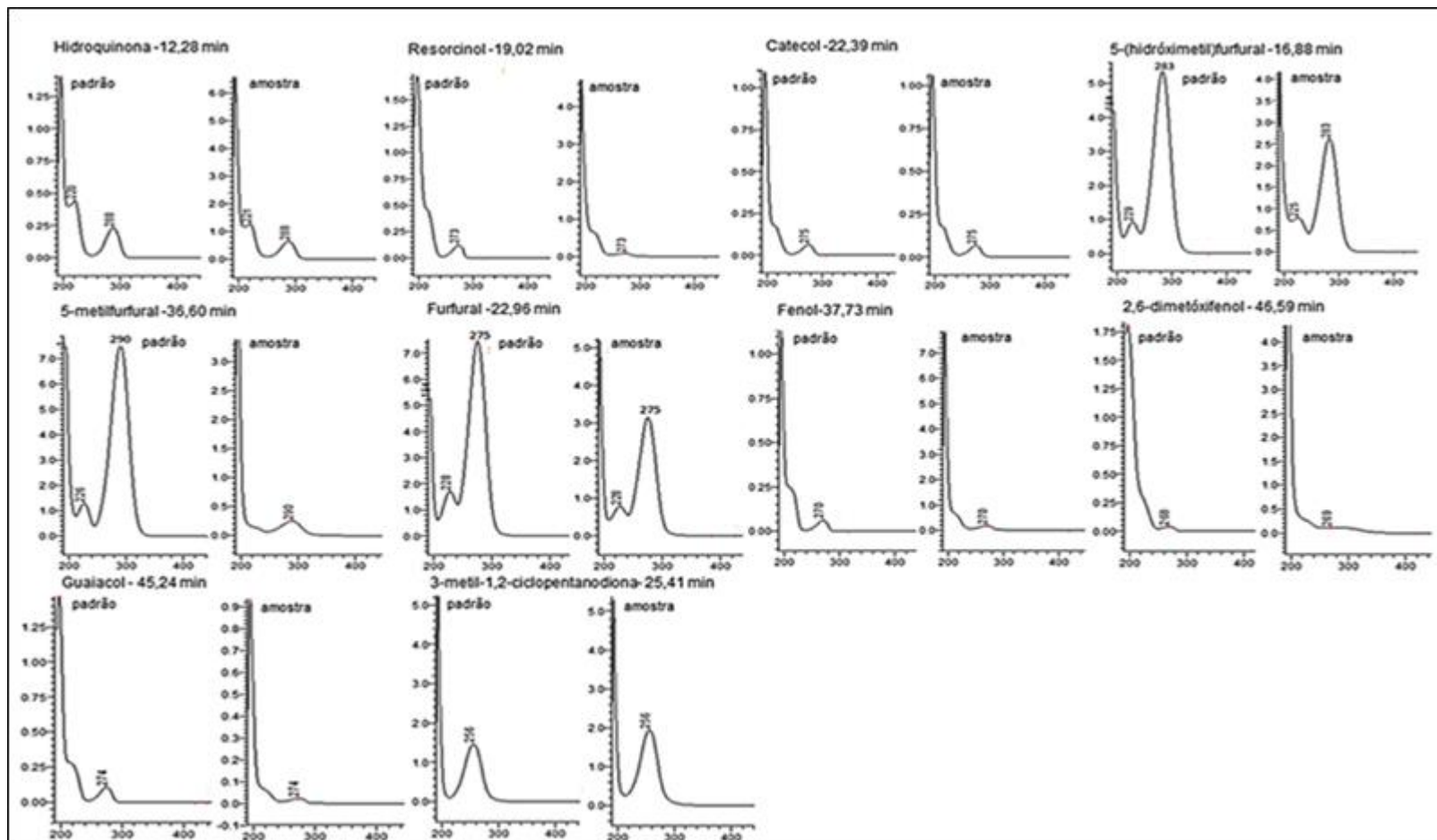


Figura A4. Lista dos espectros de UV-Vis dos compostos identificados na fase aquosa do bio-óleo de casca de arroz em comparação aos respectivos padrões.

Tabela AII. Lista de compostos tentativamente identificados e quantificados usando RF e abordagem semi-quantitativa na fase orgânica do bio-óleo de casca de arroz por GC×GC/qMS.

Nome composto ou Classificação	Classe/Subclasse	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Área/área (PI)	Padrão (quantificação)	RF	wt%	Área% ^a (com RF)	Área% ^b (sem RF)	LTPRI (exp)	LTPRI (lit)
Ácido propanóico	ácido linear	12,17	0,6	0,13	ácido nonanóico	0,96	0,027	0,15	0,27	738	741
Ácido butanóico	ácido linear	16,08	0,86	0,37	ácido nonanóico	0,96	0,076	0,42	0,77	814	820
Ácido butanóico, 3-metil-	ácido linear	19,00	0,86	0,12	ácido nonanóico	0,96	0,025	0,13	0,25	862	867
Ácido pentanóico	ácido linear	21,58	0,96	0,12	ácido nonanóico	0,96	0,025	0,14	0,25	905	908
Ácido hexanóico	ácido linear	27,17	1,06	0,15	ácido nonanóico	0,96	0,030	0,17	0,31	998	990
Ácido octanóico	ácido linear	37,33	1,26	0,09	ácido nonanóico	0,96	0,020	0,11	0,20	1178	1178
Ácido homovanílico	ácido	59,67	2,94	0,28	-	-	-	-	-	1666	1633
Ácido coniferílico	ácido	60,83	2,82	0,28	-	-	-	-	-	1696	n.e
Total ácidos							0,20	1,11	2,05		
2-Furanmetanol	álcool	19,08	1,6	1,93	2-Furanmetanol	0,32	1,208	6,58	4,04	864	863
1H-Indenol	álcool	45,83	2,48	0,10	-	-	-	-	-	1347	n.e
Álcool homovanílico	álcool	51,67	2,84	0,32	-	-	-	-	-	1475	n.e
Álcool coniferílico	álcool	56,67	2,96	0,52	-	-	-	-	-	1591	n.e
Total álcoois							1,21	6,58	4,04		
Furfural, 5-metil-	aldeído (furfural)	25,50	2	0,68	Furfural, 5-metil-	0,44	0,313	1,70	1,43	970	967
Furfural, 5-(hidróximetil)-	aldeído (furfural)	40,67	2,86	1,62	Furfural, 5-metil-	0,44	0,742	4,04	3,40	1243	1,236
Benzaldeído, 4-hidróxi-	aldeído (benzald,)	47,42	2,64	0,44	Benzaldeído, 4-hidróxi-	0,96	0,092	0,50	0,92	1381	n.e
Benzaldeído, 4-hidróxi-3-metóxi- (vanilina)	aldeído (benzald,)	49,08	2,88	1,03	Benzaldeído, 4-hidróxi-3-metóxi- (vanilina)	0,79	0,262	1,43	2,17	1417	1422
Benzaldeído, 4-hidróxi-3,5-dimetóxi- (siringaldeído)	aldeído (benzald,)	60,17	3,36	0,27	Benzaldeído, 4-hidróxi-3,5-dimetóxi- (siringaldeído)	0,82	0,065	0,35	0,56	1679	1670
Propenal, hidróxi-metóxi-fenil- ^d	aldeído	63,17	3,38	0,23	-	-	-	-	-	1757	n.e
Total aldeídos							1,47	8,02	8,48		
2-Ciclopentan-1-ona	ciclopentanone	17,75	2,08	2,32	2-Ciclopentan-1-ona	0,47	0,992	5,40	4,86	841	834
2-Ciclopentan-1-ona, 2-metil-	ciclopentanone	22,00	1,8	0,78	2-Ciclopentan-1-ona	0,47	0,335	1,82	1,64	912	910
2-Ciclopentan-1-ona, 3-metil-	ciclopentanone	25,67	2,1	0,70	2-Ciclopentan-1-ona	0,47	0,299	1,63	1,47	973	973
2-Ciclopentan-1-ona, 2-hidróxi-3-metil-	ciclopentanone	29,58	2,14	1,70	2-Ciclopentan-1-ona	0,47	0,729	3,97	3,58	1039	1043
2-Ciclopentan-1-ona, 2,3-dimetil-	ciclopentanone	30,08	1,96	0,44	2-Ciclopentan-1-ona	0,47	0,190	1,04	0,93	1048	1040
2-Ciclopentan-1-ona, 2,3,4-trimetil-	ciclopentanone	31,42	1,72	0,15	2-Ciclopentan-1-ona	0,47	0,064	0,35	0,31	1071	1071
2-Ciclopentan-1-ona, 3-etil-	ciclopentanone	32,25	2,12	0,33	2-Ciclopentan-1-ona	0,47	0,142	0,77	0,70	1086	n.e
2-Ciclopentan-1-ona, 3-etil-2-hidroxil-	ciclopentanone	34,67	1,96	0,64	2-Ciclopentan-1-ona	0,47	0,274	1,49	1,35	1129	1140
Total ciclopentanonas							3,025	16,47	14,84		
1,2-Ciclopentano-1,4-diona	ciclopentanodiona	20,75	2,08	0,22	1,2-Ciclopentanodiona, 3-metil-	0,48	0,093	0,51	0,47	891	884
1,2-Ciclopentanodiona	ciclopentanodiona	23,42	2,12	1,84	1,2-Ciclopentanodiona, 3-metil-	0,48	0,763	4,16	3,86	936	n.e
1,2-Ciclopentanodiona, 3-metil-	ciclopentanodiona	28,83	2,2	0,34	1,2-Ciclopentanodiona, 3-metil-	0,48	0,140	0,76	0,71	1026	1036
2-Ciclohexeno-1,4-diona	ciclohexanodiona	29,50	2,26	0,19	1,2-Ciclopentanodiona, 3-metil-	0,48	0,079	0,43	0,40	1038	1032
Ciclohexanodiona, C1- ^{c,d}	ciclohexanodiona	33,75	2,18	0,27	1,2-Ciclopentanodiona, 3-metil-	0,48	0,111	0,61	0,56	1112	n.e
Total ciclopentanodionas/							1,187	6,47	6,00		

Ciclohexanodionas											
2(5H)-Furanona	furanona	22,67	3,18	2,15	2(5H)-Furanona	0,46	0,927	5,05	4,51	923	915
2(5H)-Furanona, 5-metil-	furanona	24,08	2,5	0,54	2(5H)-Furanona	0,46	0,235	1,28	1,14	947	938
2(5H)-Furanona, 3-metil-	furanona	26,50	2,58	0,31	2(5H)-Furanona	0,46	0,135	0,73	0,66	987	989
2(5H)-Furanona, 4-metil-	furanona	30,50	2,9	0,27	2(5H)-Furanona	0,46	0,114	0,62	0,56	1055	n.e
2(5H)-Furanona, 3,4-dimetil-	furanona	34,25	2,62	0,21	abaixo da curva	-	-	-	-	1122	n.e
2(5H)-Furanona, 5-etil-	furanona	36,58	2,74	0,16	abaixo da curva	-	-	-	-	1165	n.e
2(3H)-Furanona, 5-acetildihidro-	furanona	35,08	3,12	0,20	-	-	-	-	-	1137	n.e
2(3H)-Furanone, 5-(hidróximetil)-dihidro-	furanona	39,00	3,22	0,61	-	-	-	-	-	1210	n.e
Total furanonas							1,411	7,68	6,86		
Acetofenona	acetofenona	31,67	2,06	0,16	abaixo da curva	-	-	-	-	1076	1075
Acetofenona, dihidróxi-	acetofenona	43,08	2,3	0,41	Acetofenona, 4-hidróxi-3-metóxi-	1,05	0,078	0,43	0,86	1290	n.e
Acetofenona, 4-hidróxi-3-metóxi-	acetofenona	52,92	2,9	0,24	Acetofenona, 4-hidróxi-3-metóxi-	1,05	0,045	0,25	0,50	1503	1491
Acetofenona, 2,4-dimetóxi-	acetofenona	56,08	2,72	0,47	Acetofenona, 4-hidróxi-3-metóxi-	1,05	0,089	0,49	0,98	1578	1593
Acetofenona, 4-hidróxi-3,5-dimetóxi-	acetofenona	63,00	3,34	0,34	Acetofenona, 4-hidróxi-3-metóxi-	1,05	0,066	0,36	0,72	1753	1740
Total acetofenonas							0,279	1,52	3,07		
Etanona, 1-(2-furanil)-	cetona	22,33	1,8	0,48	-	-	-	-	-	918	914
2-Propanona, 1-(4-hidróxi-3-metóxiifenil)-	cetona	54,83	2,9	0,80	-	-	-	-	-	1548	1531
Maltol	cetona	34,50	2,28	0,61	-	-	-	-	-	1126	1133
1-Indanona	indanona	43,42	2,76	0,32	-	-	-	-	-	1297	1292
Indanona, hidróxi ^d	indanona	58,25	3,48	0,15	-	-	-	-	-	1631	n.e
Indanona, hidróxi ^d	indanona	58,75	3,44	0,10	-	-	-	-	-	1643	n.e
Total cetonas							5,901	32,14	30,77		
2-Propanona acetato, 1-hidróxi-	éster	19,75	1,86	0,48	-	-	-	-	-	875	867
Furfural, 5-acetóximetil-	éster	44,33	2,58	0,11	-	-	-	-	-	1316	1304
Vanilato de metila	éster	54,17	2,72	0,30	-	-	-	-	-	1532	1525
Ácido Palmítico, metil éster	éster	69,25	1,78	0,04	-	-	-	-	-	1925	1926
3,4-Dimetóxitolueno	éter	40,75	2,08	0,20	-	-	-	-	-	1244	1246
Fenol	aquilfenol	26,75	1,66	1,89	Fenol	0,50	0,755	4,11	3,96	991	989
Fenol, 3-metil-	aquilfenol	31,00	1,72	0,90	Fenol, 4-metil-	0,90	0,200	1,09	1,89	1064	1068
Fenol, 4-metil-	aquilfenol	32,17	1,76	1,51	Fenol, 4-metil-	0,90	0,335	1,83	3,17	1084	1077
Fenol, 2,6-dimetil-	aquilfenol	33,92	1,84	0,33	Fenol, 3,4-dimetil-	1,20	0,055	0,30	0,68	1115	1117
Fenol, 2,5-dimetil-	aquilfenol	36,17	1,8	0,68	Fenol, 3,4-dimetil-	1,20	0,114	0,62	1,43	1157	1151
Fenol, 3-etil-	aquilfenol	37,17	1,84	1,28	Fenol, 3-etil-	0,96	0,265	1,44	2,68	1175	1171
Fenol, 2-etil-	aquilfenol	35,58	1,78	0,23	Fenol, 3-etil-	0,96	0,049	0,26	0,49	1146	1138
Fenol, C3 ^{c,d}	aquilfenol	40,83	1,88	0,32	-	-	-	-	-	1246	n.e
Fenol, C3 ^{c,d}	aquilfenol	41,92	1,9	0,17	-	-	-	-	-	1267	n.e
Total alquilfenóis							1,773	9,65	14,30		
Fenol, 2-metóxi-	metóxiifenol	33,00	2,04	2,10	Fenol, 2-metóxi-	0,52	0,807	4,39	4,41	1099	1089
Fenol, 2-metóxi-4-metil-	metóxiifenol	37,83	1,94	0,26	Fenol, 2-metóxi-	0,52	0,098	0,54	0,54	1188	1192
Fenol, 2-metóxi-5-metil-	metóxiifenol	38,58	2,02	1,43	Fenol, 2-metóxi-	0,52	0,550	3,00	3,01	1202	1201
Fenol, 4-etil-2-metóxi-	metóxiifenol	43,00	2	1,34	Fenol, 2-metóxi-	0,52	0,515	2,80	2,81	1289	1287
Fenol, 2-metóxi-4-vinil-	metóxiifenol	44,75	2,24	1,23	Fenol, 2-metóxi-	0,52	0,473	2,58	2,58	1325	1317
Fenol, 2-metóxi-4-(2-propenil)-	metóxiifenol	46,83	2,12	0,37	Fenol, 2-metóxi-	0,52	0,141	0,77	0,77	1368	1358
Fenol, 2-metóxi-4-propil-	metóxiifenol	47,25	2	0,15	Fenol, 2-metóxi-	0,52	0,056	0,31	0,31	1377	1382
Fenol, C3-metóxi- ^{c,d}	metóxiifenol	48,00	2,26	0,13	Fenol, 2-metóxi-	0,52	0,050	0,27	0,27	1393	n.e
Fenol, 2-metóxi-4-(1-propenil)-Z	metóxiifenol	49,25	2,24	0,22	Fenol, 2-metóxi-	0,52	0,086	0,47	0,47	1420	1428

Fenol, 2-metóxi-4-(1-propenil)-E	metóxi-fenol	51,17	2,32	0,64	Fenol, 2-metóxi-	0,52	0,245	1,33	1,34	1463	1465
Total metóxi-fenóis							3,022	16,46	16,51		
1,2-Benzenodiol (catecol)	benzenodiol	39,17	2,08	3,17	1,2-Benzenodiol, 4-metil-	0,50	1,267	6,90	6,65	1213	1199
1,2-Benzenodiol, 3-metóxi-	benzenodiol	42,42	2,36	0,91	1,2-Benzenodiol, 4-metil-	0,50	0,362	1,97	1,90	1277	1268
Benzenodiol, C1 ^{c,d}	benzenodiol	42,50	2,12	0,57	1,2-Benzenodiol, 4-metil-	0,50	0,227	1,24	1,20	1279	n.e
1,2-Benzenodiol, 4-metil-	benzenodiol	43,92	2,14	2,17	1,2-Benzenodiol, 4-metil-	0,50	0,863	4,70	4,55	1307	1295
Benzenodiol, C2 ^{c,d}	benzenodiol	48,67	2,18	0,48	1,2-Benzenodiol, 4-metil-	0,50	0,190	1,04	1,00	1407	n.e
Total benzenodióis							2,910	15,85	15,31		
Fenol, 2,6-dimetóxi-	dimetóxi-fenol	46,50	2,64	0,89	Fenol, 2,6-dimetóxi-	0,61	0,292	1,55	1,86	1361	1365
Fenol, metóxi-(C1 metóxi)- ^{c,d}	dimetóxi-fenol	50,92	2,54	0,38	Fenol, 2,6-dimetóxi-	0,61	0,124	0,66	0,79	1458	n.e
Fenol, 2,6-dimetóxi-4-(2-propenil)-	dimetóxi-fenol	57,58	2,62	0,27	Fenol, 2,6-dimetóxi-	0,61	0,088	0,47	0,56	1614	1615
Total dimetóxi-fenóis							0,504	2,67	3,21		
Total fenóis							8,209	43,51	49,32		
Benzofurano	furano	39,92	2,12	2,54	2,3-dihidrobenzofurano	0,37	1,368	7,25	5,33	1228	1223
Total furanos							1,368	7,25	5,28		
açúcar ^d	sugar	38,42	2,9	0,24	-	-	-	-	-	1198	n.e
açúcar ^d	sugar	39,83	2,86	0,84	-	-	-	-	-	1226	n.e
açúcar ^d	sugar	40,25	2,94	0,32	-	-	-	-	-	1235	n.e
açúcar ^d	sugar	41,42	3,02	0,13	-	-	-	-	-	1258	n.e
açúcar ^d	sugar	41,83	3,02	0,17	-	-	-	-	-	1266	n.e
açúcar ^d	sugar	46,83	3,14	0,13	-	-	-	-	-	1368	n.e
açúcar ^d	sugar	49,83	3,16	0,27	-	-	-	-	-	1434	n.e
Levoglicosano	sugar	53,75	3,36	0,81	-	-	-	-	-	1522	1491
açúcar ^d	sugar	55,25	3,16	0,27	-	-	-	-	-	1558	n.e
açúcar ^d	sugar	57,50	3,2	0,30	-	-	-	-	-	1612	n.e
Heptadecano	hidrocarboneto	61,00	1,28	0,02	abaixo da curva	-	-	-	-	1700	1700
IS 1 (Naftaleno-d8)		38,17	2,16								
IS 2 (Acenafteno-d10)		52,92	2,74								

LTPRI lit: índice de retenção da literatura (NIST biblioteca); LTPRI exp: índice de retenção calculado experimentalmente; (a) área percentual calculada através do método de normalização interna considerando o fator de resposta (apenas os compostos quantificados foram considerados no cálculo); (b) área percentual calculada através do método de normalização interna desconsiderando o fator de resposta (apenas os compostos quantificados foram considerados no cálculo); (c) Classificação cadeia alquil. x átomos de carbono; (d) Compostos tentativamente identificados por comparação de espectros de massas e ordem de eluição.

ANEXO IV: MATERIAL RELACIONADO AO CAPÍTULO VI

TABELA AIII. Compostos identificados e quantificados usando curva de calibração combinada com a matriz na amostra de bio-óleo de casca de arroz através da GCxGC/qMS.

Pico	Nome composto ou Classificação	Classe/Subclasse	Padrão (quantificação)	¹ t _R (min)	² t _R (s)	LTPRI _{exp}	LTPRI _{lit}	vol/vol _(PI)	g/kg ⁻¹
	Ácido propanóico	ácido linear	Ácido nonanóico	12,17	0,60	738	741	0,69	5,11
	Ácido butanóico, 3-metil-	ácido linear	Ácido nonanóico	19,00	0,86	862	867	0,08	1,15
	Ácido hexanóico	ácido linear	Ácido nonanóico	27,17	1,06	998	990	0,04 ^d	-
	Ácido nonanóico ^a	ácido linear	Ácido nonanóico	42,25	1,00	1274	1280	0,09	1,24
	Ácido homovanílico	ácido	-	59,67	2,94	1666	1633	0,15	-
	Ácido coniferílico ^c	ácido	-	60,83	2,82	1696	n.e	0,21	-
Total ácidos									7,50
3	2-Furanmetanol ^a	álcool	2-Furanmetanol	19,08	1,60	864	863	1,98	13,02
	Álcool homovanílico ^c	álcool	-	51,67	2,84	1475	n.e	0,57	-
28	Álcool coniferílico ^c	álcool	-	56,67	2,96	1591	n.e	0,42	-
Total álcoois									13,02
2	Furfural	aldeído (furfural)	Furfural, 5-metil-	17,67	1,64	840	834	2,09	11,44
6	Furfural, 5-metil- ^a	aldeído (furfural)	Furfural, 5-metil-	25,50	2,00	970	967	0,71	4,55
16	Furfural, 5-(hidróximetil)-	aldeído (furfural)	Furfural, 5-metil-	40,67	2,86	1243	1236	0,87	5,31
Total furfurais									21,30
	Benzaldeído, 4-hidróxi- ^a	aldeído (benzald.)	Benzaldeído, 4-hidróxi-	47,42	2,64	1381	n.e	0,51	2,89
22	Benzaldeído, 4-hidróxi-3-metóxi-(vanilina) ^a	aldeído (benzald.)	Benzaldeído, 4-hidróxi-3-metóxi-(vanilina)	49,08	2,88	1417	1422	1,05	4,05
29	Benzaldeído, 4-hidróxi-3,5-dimetóxi-(siringaldeído) ^a	aldeído (benzald.)	Benzaldeído, 4-hidróxi-3,5-dimetóxi-(siringaldeído)	60,17	3,36	1679	1670	0,32	1,14
Total benzaldeídos									8,08
31	Propenal, hidróxi-metóxiifenil- ^c	aldeído	Benzaldeído, 4-hidróxi-3,5-dimetóxi-(siringaldeído)	63,17	3,38	1757	n.e	1,00	3,90
Total aldeídos									29,38
1	2-Ciclopenten-1-ona	ciclopentanone	2-Ciclopenten-1-ona	17,75	2,08	841	834	0,61	4,16
	2-Ciclopenten-1-ona, 2-metil-	ciclopentanone	2-Ciclopenten-1-ona	22,00	1,80	912	910	0,65	4,45
	2-Ciclopenten-1-ona, 3-metil-	ciclopentanone	2-Ciclopenten-1-ona	25,67	2,10	973	973	0,78	5,35
	2-Ciclopenten-1-ona, 2,3-dimetil-	ciclopentanone	2-Ciclopenten-1-ona	30,08	1,96	1048	1040	0,33	2,19
	2-Ciclopenten-1-ona, 3-etil- ^c	ciclopentanone	2-Ciclopenten-1-ona	32,25	2,12	1086	n.e	0,32	2,13
	2-Ciclopenten-1-ona, 3-etil-2-hidroxi-	ciclopentanone	2-Ciclopenten-1-ona	34,67	1,96	1129	1140	0,58	3,94
Total ciclopentenonas									22,22
	1,2-Ciclopentano-1,4-diona	ciclopentanodiona	1,2-Ciclopentanodiona, 3-metil-	20,75	2,08	891	884	0,19	3,05
5	1,2-Ciclopentanodiona ^c	ciclopentanodiona	1,2-Ciclopentanodiona, 3-metil-	23,42	2,12	936	n.e	2,20	16,48
8	1,2-Ciclopentanodiona, 3-metil- ^a	ciclopentanodiona	1,2-Ciclopentanodiona, 3-metil-	28,83	2,20	1026	1043	2,25	16,83
	2-Ciclohexeno-1,4-diona	ciclopentanodiona	-	29,50	2,26	1038	1032	0,19	-
	Ciclohexanodiona, C1- ^{b,c}	ciclopentanodiona	-	33,75	2,18	1112	n.e	0,23	-
Total ciclopentanodionas/Ciclohexanodionas									36,36
4	2(5H)-Furanona ^a	furanona	2(5H)-Furanona	22,67	3,18	923	915	1,99	16,49

	2(5H)-Furanona, 5-metil-	furanona	2(5H)-Furanona	24,08	2,50	947	938	0,56	7,08
	2(5H)-Furanona, 3-metil-	furanona	2(5H)-Furanona	26,50	2,58	987	989	0,33	5,56
	2(5H)-Furanona, 4-metil- ^c	furanona	2(5H)-Furanona	30,50	2,90	1055	n.e	0,12	4,18
	2(5H)-Furanona, dimetil- ^c	furanona	2(5H)-Furanona	32,50	2,30	1090	n.e	0,29	5,34
	2(3H)-Furanona, 5-acetildihidro- ^c	furanona	2(5H)-Furanona	35,08	3,12	1137	n.e	0,15	4,38
	2(3H)-Furanone, 5-(hidróximetil)-dihidro- ^c	furanona	2(5H)-Furanona	39,00	3,22	1210	n.e	0,23	4,89
Total furanonas									47,92
	Acetofenona	acetofenona	Acetofenona, 4-hidróxi-3-metóxi-	31,58	3,14	1074	1075	0,12 ^d	-
	Acetofenona, dihidróxi- ^c	acetofenona	Acetofenona, 4-hidróxi-3-metóxi-	43,08	2,30	1290	n.e	0,42	1,03
24	Acetofenona, 4-hidróxi-3-metóxi- ^a	acetofenona	Acetofenona, 4-hidróxi-3-metóxi-	52,92	2,90	1503	1491	0,46	1,13
27	Acetofenona, 2,4-dimetóxi-	acetofenona	Acetofenona, 4-hidróxi-3-metóxi-	56,08	2,72	1578	1593	0,57	1,39
	Acetofenona, 4-hidróxi-3,5-dimetóxi-	acetofenona	Acetofenona, 4-hidróxi-3-metóxi-	63,00	3,34	1753	1740	0,27 ^d	-
Total acetofenonas									3,55
26	2-Propanona, 1-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)-	cetona	-	54,83	2,90	1548	1531	0,82	-
	Etanona, 1-(2-furanil)-	cetona	-	22,33	1,80	918	914	0,36	-
	Maltol	cetona	-	34,50	2,28	1126	1133	0,45	-
	1-Indanona	indanona	-	43,42	2,76	1297	1292	0,23	-
Total cetonas									110,05
7	Fenol ^a	aquilfenol	Fenol	26,75	1,66	991	989	2,21	8,79
9	Fenol, 3-metil-	aquilfenol	Fenol, 4-metil-	31,00	1,72	1064	1068	1,19	3,35
10	Fenol, 4-metil- ^a	aquilfenol	Fenol, 4-metil-	32,17	1,76	1084	1077	1,97	5,26
	Fenol, 2-etil-	aquilfenol	Fenol, 3-etil-	35,58	1,78	1146	1138	0,14 ^d	-
12	Fenol, 3-etil- ^a	aquilfenol	Fenol, 3-etil-	37,17	1,84	1175	1171	1,42	3,31
	Fenol, 2,6-dimetil-	aquilfenol	Fenol, 3,4-dimetil-	33,92	1,84	1115	1117	0,54	1,35
	Fenol, 2,5-dimetil-	aquilfenol	Fenol, 3,4-dimetil-	36,17	1,80	1157	1151	0,58	1,44
	Fenol, C3- ^{b,c}	aquilfenol	-	41,92	1,90	1267	n.e	0,14	-
Total alquilfenóis									23,50
11	Fenol, 2-metóxi- ^a	metóxi-fenol	Fenol, 2-metóxi-	33,00	2,04	1099	1089	2,54	7,42
	Fenol, 2-metóxi-4-metil-	metóxi-fenol	Fenol, 2-metóxi-	37,83	1,94	1188	1192	0,24	1,26
13	Fenol, 2-metóxi-5-metil-	metóxi-fenol	Fenol, 2-metóxi-	38,58	2,02	1202	1201	1,82	5,51
17	Fenol, 4-etil-2-metóxi-	metóxi-fenol	Fenol, 2-metóxi-	43,00	2,00	1289	1287	0,95	3,17
18	Fenol, 2-metóxi-4-vinil-	metóxi-fenol	Fenol, 2-metóxi-	44,75	2,24	1325	1317	1,42	4,43
20	Fenol, 2-metóxi-4-(2-propenil)-	metóxi-fenol	Fenol, 2-metóxi-	46,83	2,12	1368	1358	0,37	1,63
	Fenol, 2-metóxi-4-propil-	metóxi-fenol	Fenol, 2-metóxi-	47,25	2,00	1377	1382	0,21	1,20
21	Fenol, 2-metóxi-4-(1-propenil)-Z	metóxi-fenol	Fenol, 2-metóxi-	49,25	2,24	1420	1428	0,32	1,48
23	Fenol, 2-metóxi-4-(1-propenil)-E	metóxi-fenol	Fenol, 2-metóxi-	51,17	2,32	1463	1465	0,83	2,84
Total metóxi-fenóis									28,94
14	1,2-Benzenodiol (catecol)	benzenodiol	1,2-Benzenodiol, 4-metil-	39,17	2,08	1213	1199	2,38	31,5 ^e
	1,2-Benzenodiol, 3-metóxi-	benzenodiol	1,2-Benzenodiol, 4-metil-	42,42	2,36	1277	1268	0,50	8,25
	1,2-Benzenodiol, 4-metil- ^a	benzenodiol	1,2-Benzenodiol, 4-metil-	43,92	2,14	1307	1295	0,25	5,61
Total benzenodióis									45,36
19	Fenol, 2,6-dimetóxi- ^a	dimetóxi-fenol	Fenol, 2,6-dimetóxi-	46,50	2,64	1361	1365	1,72	7,30
	Fenol, metóxi-(C1 metóxi)- ^c	dimetóxi-fenol	Fenol, 2,6-dimetóxi-	50,92	2,54	1458	n.e	0,50	1,89
	Fenol, 2,6-dimetóxi-4-(2-propenil)-	dimetóxi-fenol	Fenol, 2,6-dimetóxi-	57,58	2,62	1614	1615	0,15 ^d	-
	Fenol, dimetóxi-(propenil)- ^c	dimetóxi-fenol	Fenol, 2,6-dimetóxi-	59,67	2,42	1666	n.e	0,12 ^d	-
30	Fenol, dimetóxi-(propenil)- ^c	dimetóxi-fenol	Fenol, 2,6-dimetóxi-	61,67	2,52	1717	n.e	0,56	2,19
Total dimetóxi-fenóis									11,38

Total fenóis									109,18
15	Benzofurano	furano	2,3-dihidrobenzofurano	39,92	2,12	1228	n.e	1,85	8,36
Total furanos									8,36
	Açúcar ^c	açúcar	-	34,33	3,76	1123	n.e	0,21	-
	Açúcar ^c	açúcar	-	38,42	2,90	1198	n.e	0,16	-
	Açúcar ^c	açúcar	-	39,83	2,86	1226	n.e	0,77	-
	Açúcar ^c	açúcar	-	40,25	2,94	1235	n.e	0,28	-
	Açúcar ^c	açúcar	-	40,58	3,92	1241	n.e	0,55	-
	Açúcar ^c	açúcar	-	41,42	3,02	1258	n.e	0,11	-
	Açúcar ^c	açúcar	-	41,75	3,44	1264	n.e	0,14	-
	Açúcar ^c	açúcar	-	41,83	3,02	1266	n.e	0,12	-
	Açúcar ^c	açúcar	-	55,25	3,16	1558	n.e	0,18	-
25	Levogluosano	açúcar	-	53,75	3,36	1522	1491	0,41	-
	2-Propanona acetato, 1-hidróxi-	éster	-	19,75	1,86	875	867	0,57	-
	Metil vanilato	éster	-	54,17	2,72	1532	1525	0,31	-
	3,4-Dimetóxitolueno	éter	-	40,75	2,08	1244	1246	0,14	-
	IS 1 (Naftaleno-d8)			38,17	2,16				
	IS 2 (Acenafeno-d10)			52,92	2,74				

LTPRI lit: índice de retenção da literatura (NIST biblioteca); LTPRI exp: índice de retenção calculado experimentalmente; (a) Confirmado através de padrões; (b) Classificação cadeia alquil. x átomos de carbono; (c) Tentativamente identificados através da ordem de eluição e espectros de massas; (d) volume do pico abaixo da curva analítica; (e) extrapolação da curva de calibração; n.e: valores de LTPRI não encontrados na base de dados NIST.

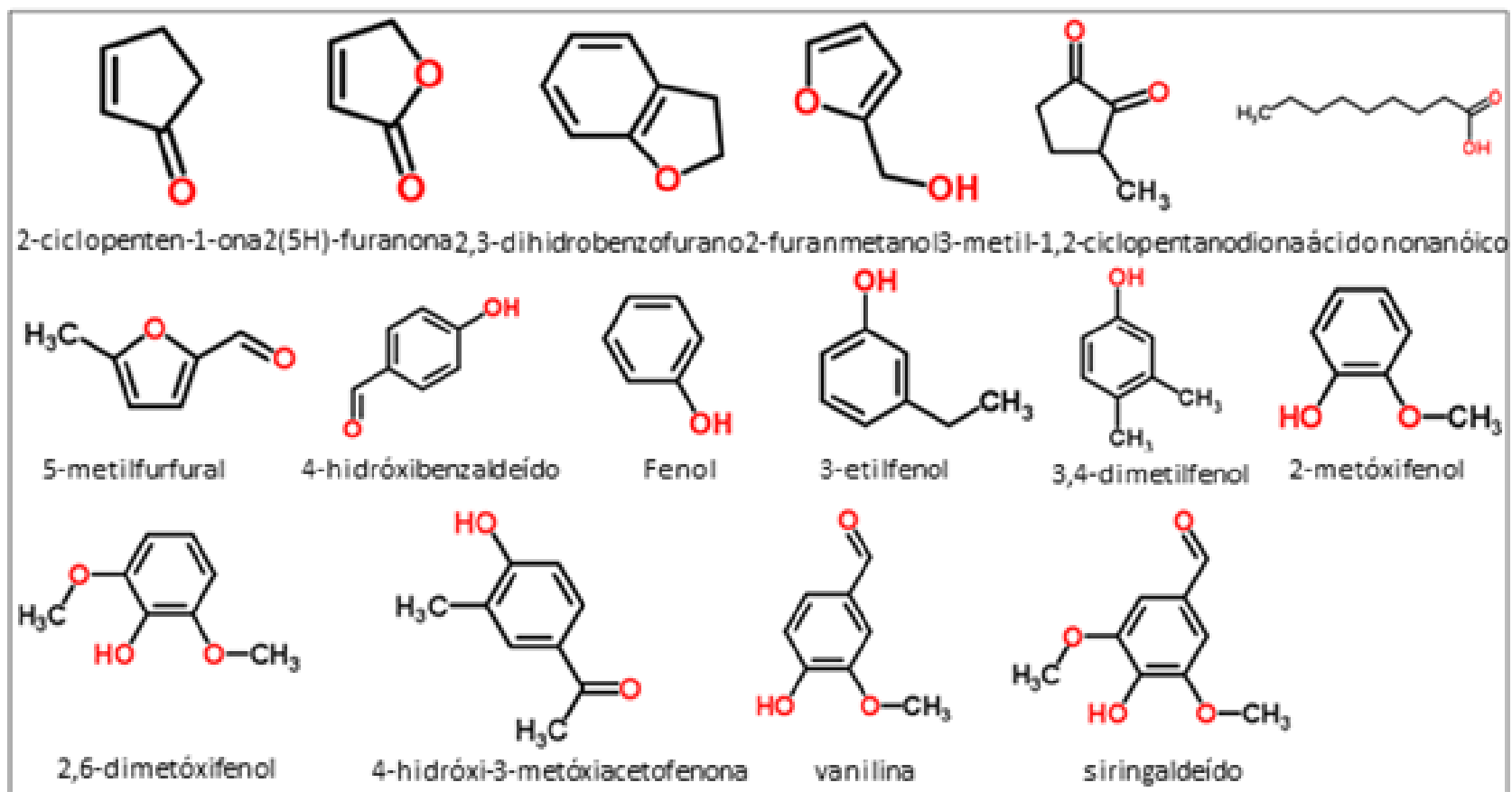


Figura A5. Estruturas químicas dos compostos padrões empregados na solução de calibração na análise quantitativa por GCxGC/qMS

ANEXO 5: MATERIAL RELACIONADOS AO ESTÁGIO REALIZADO NA UNIVERSIDADE DE LIÉGE - BÉLGICA

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Jean-François Focant
Dr. Flavio Antônio Franchina

Produção científica gerada neste Estágio:

Revista: *Foods*

Fator de impacto: 3.011

Volume: 8, páginas: 2 a 12, ano: 2019

DOI: <https://doi.org/10.3390/foods8080302>

Título: *Assessment of a New GC-MS/MS System for the Confirmatory Measurement of PCDD/Fs and (N)DL-PCBs in Food under EU Regulation*

Autores: Flavio Antonio Franchina, **Eliane Lazzari**, Georges Scholl, Jean-François Focant

Revista: *Journal of Separation Science*

Fator de impacto: 2.516 Qualis: B1

Volume: *submetido*, setembro de 2019

DOI: *a ser definido*

Título: *Investigating aroma diversity combining purge-and-trap, thermal desorption and (low)-flow modulated GCxGC-ToF MS*

Autores: Flavio Antonio Franchina, Delphine Zanella, **Eliane Lazzari**, Pierre-Hugues Stefanuto, and Jean-Francois Focant.

DETALHAMENTO DO ARTIGO PUBLICADO

Assessment of a New GC-MS/MS System for the Confirmatory Measurement of PCDD/Fs and (N)DL-PCBs in Food under EU Regulation

Flavio Antonio Franchina ^{1,†}, Eliane Lazzari ^{1,2,†}, George Scholl ¹, and Jean-François Focant ^{1,*}

¹ University of Liege, MolSys Research Unit, Liege, Belgium, B-4000; ffranchina@uliege.be (F.A.F.); eli.lazzari8@gmail.com (E.L.); gscholl@uliege.be (G.S.)

² Federal University of Rio Grande do Sul, Institute of Chemistry, Porto Alegre, RS, Brazil

[†] Contributed equally to the work

* Correspondence: jf.focant@uliege.be (J-F.F.)

Abstract: Polychlorodibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychloro-dibenzofurans (PCDFs), dioxin-like (DL) and non dioxin-like (NDL) polychlorinated biphenyls (PCBs) are currently regulated in

food and feed within the European territory (EU 2017/644-771). The confirmatory methods of analysis for checking compliance with maximum levels (MLs) for these involve either the historically-established GC-magnetic sector high-resolution mass spectrometry (GC-HRMS) and, more recently, GC-triple quadrupole mass spectrometry operating in tandem mode (GC-QQQMS/MS). In this study, the performance of a novel triple quadrupole GC-QQQMS/MS system equipped with a programmable temperature vaporization (PTV) injector was evaluated for the analysis of regulated PCDD/Fs and PCBs in food and feed. The MS analyzer was equipped with a titanium ionization chamber and a new short collision cell capable to accumulate and eject ions by means of very narrow pulses that allow to minimize the noise and to adapt accumulation times for sensitive selected reaction monitoring (SRM). The analytical capability of the system was confronted by the strict requirements (selectivity, reproducibility, linearity, quant/qual MRM transitions, accuracy, robustness) set by the EU Regulation for a range of standards, quality control (QC) and food/feed samples. In this respect, the approach showed high precision (1.9-15% RSD at low pg/ μ L) and accuracy (>80%, except for one hexa-CDD). The quantitative results were also compared to the most used GC-HRMS. In this case, comparable results in terms of single congener concentration basis and total toxic equivalent (TEQ) basis for PCDD/Fs and DL-PCBs were obtained for the QC samples analyzed.

Keywords: Targeted analysis; food contaminants; food safety; tandem mass spectrometry (MS/MS); gas chromatography (GC); method validation

1. Introduction

Polychlorodibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), polychlorodibenzofurans (PCDFs), and polychlorobiphenyls (PCBs) belong to toxic chemicals and are classified as persistent organic pollutants (POPs) [1]. Because of their lipophilicity and high chemical stability, PCDD/Fs and PCBs can remain in the environment, enter the food chain from environmental media and accumulate in adipose tissues of higher trophic level organisms including humans [2]. Dietary intake of food contaminated with dioxins and DL-PCBs is the major route of human exposure to these toxic organic pollutants [3]. Consequently, this class of compounds has been regulated in Europe [1], following the Stockholm convention for persistent organic pollutants in 2001, in order to protect human health and the environment. Nowadays, the European Commission requires any food or animal feedstuffs released on the market to be controlled and comply with maximum levels (MLs) set by precise regulatory documents.

Historically, amongst the methods of analysis, gas chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (GC-HRMS) has been recognized as the confirmatory method for POPs determination. The excellent sensitivity and selectivity of a magnetic sector HRMS meet the demand of ultra-trace level contaminants determination in complex matrices, especially if compared to other MS analyzers such as time-of-flight MS, single quadrupole MS, and quadrupole ion storage tandem-in-time MS [4]. However, because of both significant investment

and operating costs of GC-HRMS, efforts have focused on the development of alternative approaches in order to reduce dioxin analysis costs. In addition, recent technological advances in triple quadrupole MS analyzers (QQQMS) have made such analysers a viable alternative to GC-HRMS for targeted analysis at trace levels, especially when operated in tandem mode for targeted analysis [5,6]. The use of QQQMS has been also reported for both untargeted and targeted analysis, exploiting a simultaneous scan/sensitive multiple reaction monitoring (MRM) [7,8]. However, the targeted approach is by far the most commonly used.

As a direct consequence, and based on other validations studies [9,10], GC-QQQMS/MS begun to successfully show satisfactory performance as a confirmatory tool for checking compliance with maximum levels, following specific analytical criteria [11]. Starting from 2014, European Regulations laying down methods of sampling and analysis for the EU official control of levels of PCDD/Fs, and PCBs in food and feed officially started recognizing the use of GC-QQQMS/MS, in addition to the classical GC-HRMS [12,13]. The latest EU Commission Regulations 2017/644 and 2017/771 [14,15] further confirmed the use of GC-QQQMS/MS, even if the majority of the control laboratories still nowadays relies on GC-HRMS technology.

In this study, the performance of a novel triple quadrupole GC-QQQMS/MS system equipped with a programmable temperature vaporization (PTV) injector was evaluated during a validation study for PCDD/Fs and (N)DL-PCBs in food and feed. The MS analyzer was equipped with a titanium ionization chamber and a new short collision cell capable to accumulate and eject ions by means of very narrow pulses that allow to minimize the noise and to adapt accumulation times for sensitive selected reaction monitoring (SRM). The analytical capability of the system was evaluated under the strict requirements set by the EU Regulation for the 35 target analytes, on quality control (QC) and food/feed samples. Moreover, a comparison of the GC-QQQMS/MS performance with a routine GC-HRMS method is provided.

2. Materials and Methods

2.1. Standards and Chemicals

Seventeen PCDD/F congeners, four non-ortho (NO-) substituted PCBs, eight mono-ortho (MO-) substituted PCBs, grouped under the term dioxin-like (DL-) PCBs, and six non-dioxin like (NDL-) PCBs were selected for this study. For PCDD/Fs and (NO-)PCBs a six-point calibration curve (Cambridge Isotope Laboratories CIL, USA) ranging from 0.05 to 50 pg/ μ L was used. For the (MO-)PCBs and NDL-PCBs, a nine-point calibration curve (CIL) ranging from 0.4 to 500 pg/ μ L was used. Native and ^{13}C -labeled (isotope dilution method) congeners were presents in these calibration solutions. Solutions of standards and purified extracts were made of nonane (Fluka, Germany) tested to be contamination free. All the regulated target compounds include the most toxic congeners of the families of PCDD/Fs and PCBs which have a toxic equivalent factor (TEF) assigned by WHO [16].

2.2. Samples and Certified Reference Material

The samples included in this study were two quality controls, one certified reference material, and three real samples. Quality controls consisting of pork fat and animal feed matrices were fortified with levels concentration in TEQ spanned two orders of magnitude (0.17 and 2) and (0.95 and 0.70), for PCDD/Fs and DL-PCBs, respectively, while for ND-L-PCBs was used the concentration levels of 31 pg/ μ L and 19 pg/ μ L. The certified reference material (BCR 607) consisted of milk powder and was purchased from IRMM (Geel, Belgium). The real-world samples were palm fat, palm oil, and fish liver oil which were provided by the routine laboratory (CART, Liege, BE).

2.3. Sample Preparation

Samples were prepared following an accredited ISO17025 procedure. Briefly, sample extractions were performed using accelerated solvent extraction (ASETM 350, Dionex, Thermo Fisher Scientific). A multistep automated clean-up and fractionation procedure was used (PowerPrepTM system, FMS Inc, Waltham, USA) to produce two separate fractions (Fraction 1: MO/NDL-PCBs in hexane/dichloromethane 50:50; Fraction 2: PCDD/Fs and NO-PCBs in toluene). The sample preparation method has previously been described in details [17].

2.4. Instrumentation and Measurements

A Jeol (Tokyo, Japan) JMS-TQ4000GC triple quadrupole system equipped with a PTV inlet (Optic-4, GL Sciences, The Netherlands) was used. The MS analyzer was equipped with a titanium ionization chamber. The volume of injection was set at 4 μ L for PCDD/Fs and NO-PCBs standard solutions, and 2 μ L for MO and ND-L-PCBs, injection at 45 °C (5 sec), then ramp of 8 °C/sec until 325 °C. The vent time was set at 80 sec with vent flow of 100 mL/min; the transfer time was 4 min and split flow 25 mL/min until the end of the analysis. All separations were performed with a VF-5ms 50 m \times 200 μ m \times 0.33 μ m (Agilent, USA) using a temperature program starting at 60 °C (5 min), ramp at 70 °C/sec until 200 °C, 3.2 °C/sec until 235 °C (1.5 min), 3.2 °C/sec until 270 °C (10 min), 15 °C/sec until 310 °C (10 min), for a total run of 56 min. Transfer line and ion source (EI, 70 eV) temperatures were held at 250 °C. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. Quadrupoles were at 100 °C and the collision cell was held at 150 °C; nitrogen was used as the collision gas. The MS was operated in MRM mode, with collision energy and transitions optimized for native PCDD/F and PCB congeners using an AutoSRM function. Two MRM transitions (quantifier and qualifier), were extrapolated and optimized for each target. Each transition was derived from a specific precursor ions and distinct product ions. Instrument tuning was performed every fifteen days, using the EI high sensitivity autotune mode, and instrument inspection and maintenance were performed regularly. Retention time update supported by EScimeTM software assured that the MRM time windows matched with the target analytes elution, in case of column change or cut for maintenance. Comparative analysis was performed on a GC-HRMS (Autospec Ultima, Waters), using the same chromatographic conditions as in the GC-QQQMS/MS experiments. Averaged relative response factors (RRFs)

were used to calculate the concentrations of the target compounds on both GC-QQQMS/MS and GC-HRMS.

2.5. Method Validation Criteria

The criteria for the GC-QQQMS/MS method followed the requirements of the recent EU regulation 2017/664-771. Method validation was performed through the assessment of the main figures-of-merit: linearity, limit of quantification, precision, and accuracy. Quantification was performed by using the quantifier MRM transitions, once the target analytes were reliably identified, the experimental qualifier/quantifier ratio and the elution times were used for confirmatory purposes. For the ion ratio, the tolerance interval specified in the regulation ($\pm 15\%$) was set to confirm each target compound avoiding the risk of integration wrong peaks or interferences.

All congeners were quantified against their own ^{13}C -labeled internal standards using isotope dilution. Calibration curves were built for each target analyte and the quantitative values were extrapolated using weighted linear regression. Generally, a higher number of injections ($n=8$) were carried out at the lowest point of the calibration curve. For the remaining calibration points, $n=3$ and $n=4$ injections were performed for the PCDD/Fs and NO-PCBs (fraction 2) and MO-PCBs and NDL-PCBs (fraction 1), respectively.

The RRFs were calculated at each concentration level and the linearity was estimated based on the RFF consistency and in the determination coefficient (R^2). The accuracy and instrumental limit of quantification (iLOQ) were assessed for each target compound. Accuracy was expressed in terms of bias % and it was measured in standard solutions and certified reference materials. The iLOQ, which is the 'performance-LOQ' was calculated at the lowest calibration point and set by 10 times the standard deviation associated with 8 replicate injections. Finally, precision was expressed as relative standard deviation (RSD %) for the calibration curve levels ($n=8$ for the lowest calibration point).

To monitor the instrumental performance over time, QC samples (10 in total, details in section 2.2.) were analyzed and the analytical performances monitored over a continuous period of 1.5 months. In the same way, instrumental blanks were included every batch of analysis to exclude any possible source of contamination. As an additional control and to monitor the stability of the response, standard solutions were injected at different concentrations twice a week, and over a period of 2.5 months.

3. Results and Discussions

3.1. GC-QQQMS/MS Method Development

The initial part of the study was devoted to the development of the GC and MS conditions. The chromatographic parameters were adapted from the method for PCDD/Fs and PCBs used in our GC-HRMS routine method. In this context, the EU regulation requires the chromatographic separation of two hexachlorinated (Hx)CDF isomers, the 1,2,3,4,7,8-HxCDF and 1,2,3,6,7,8-HxCDF, specifying the minimum 25% separation, equivalent to a unit resolution ($R_s=1$). A multi-

ramp oven temperature gradient (details in 2.4.), with a slow ramp in the elution zones of the penta-, hexa-, and heptachlorinated PCDD/F isomers, facilitated their chromatographic separation on the 5% phenyl column.

The PTV injection parameters (solvent vent time, transfer time, initial and ramp temperature, split flow) were optimized initially using alkanes dissolved in nonane (*i.e.*, the same solvent of the samples/standards), with the aim to eliminate the solvent and efficiently transfer the target analytes to the column (data not shown). A cold injection condition (45 °C) was also applied, followed by a fast inlet heating (8°C/sec), assured at the same time the preservation of the thermo-labile compounds and the efficient elimination of the solvent [18]. Indeed, PCDD/Fs are characterized by high boiling points and no significant losses occurred at 45 °C.

With regards to the MS parameters, attention was devoted to the selectivity and sensitivity of the MRM transitions, depending on precursor/product ion combination and MS cycle time, respectively. The MRM transitions (one quantifier and one qualifier) and collision energy values were finely tuned for the 35 target compounds. For the selection of the qualifier and quantifier transition, an automated software optimization tool was used to select the best (most selective and sensitive) precursor/product ions and collision-induced dissociation (CID) energies. As expected, the loss of COCl[•] from the molecular ion was the most prominent MRM transitions for PCDD/Fs while the ion with the highest response was [M-2Cl]⁺ for PCBs [10]. The CID energies were tested in a 3 V stepwise manner from 5 to 40 V, and the final MRM transitions and energies are listed in Supplementary Table 1.

3.2. Method Validation and Regulatory EU 2017/664-771 Compliance

As mentioned before, the isotope dilution method was used. A six-point calibration curve was constructed for the target PCDD/Fs and NO-PCBs (fraction 2), over the 0.05-50 pg/μL range. For MO-PCBs and NDL-PCBs (fraction 1), a nine-point calibration curve was constructed over the 0.4-500 pg/μL range (See Table 1). Determination coefficients were in the range 0.99999 (2,3,7,8-TCDD) – 0.9906 (PCB 153).

The repeatability of PCDD/Fs and all the PCBs was evaluated at a concentration ranging from 0.05 - 0.5 pg/μL, this corresponding to the lowest calibration point (n=8). As reported in Table 1, the results exhibited good repeatability for all the target compounds, with RSD ≤ 15 % (1.9-15 % range).

The lowest acceptable calibration point was determined according to the two following criteria. First, the calculated RSDs of the lowest level for all congeners must be ≤ 15 %. Second, the relative difference between the RRF average obtained for all points (including replicates) and the RRF average obtained for only the lowest point must be ≤ 30 %, according to the regulation (this is the 'acceptable deviation to the RRF'). As can be observed in Table 1, this criterion was met and the linearity was acceptable in the calibration range. Thus, the lowest calibration level was used to determine the iLOQ, as explained before in section 2.5. The calculated iLOQs were in the range of 0.028 (2,3,7,8-TCDD) – 0.273 (OCDF) pg μL⁻¹ and 0.057 (PCB 81) – 0.774 (PCB 123) pg μL⁻¹, for PCDD/Fs and PCBs, respectively (Table 1).

Table 1. Calibration curve data and iLOQs for PCDD/Fs and PCBs

	Retention time (min)	Lowest cali. point (pg.µL ⁻¹)	Lowest cali. point RSD (%)	Highest cali. point (pg.µL ⁻¹)	Correlation coef. (R ²)	Average RRF	Difference (%) RF (lowest point)-RF (all)	iLOQ (pg.µL ⁻¹)
Native Standards								
PCDDs								
2,3,7,8-TCDD	29.41	0.05	1.9	10	0.99998	1.35	8.7	0.028
1,2,3,7,8-PeCDD	34.61	0.05	15.0	10	0.99990	1.07	4.5	0.046
1,2,3,4,7,8-HxCDD	41.11	0.10	11.6	20	0.99996	1.16	22.7	0.168
1,2,3,6,7,8-HxCDD	41.30	0.10	15.4	20	0.99930	1.18	-3.6	0.094
1,2,3,7,8,9-HxCDD	41.76	0.10	8.3	20	0.99999	1.19	6.3	0.103
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	45.50	0.10	15.1	20	0.99998	1.38	-25.5	0.060
OCDD	49.97	0.25	12.3	50	0.99990	1.04	8.3	0.164
PCDFs								
2,3,7,8-TCDF	28.81	0.05	11.4	10	0.99980	1.24	-12.7	0.032
1,2,3,7,8-PeCDF	32.99	0.05	10.9	10	0.99999	1.09	1.8	0.051
2,3,4,7,8-PeCDF	34.24	0.05	10.2	10	0.99997	1.10	6.4	0.033
1,2,3,4,7,8-HxCDF	39.33	0.10	9.9	20	0.99999	1.03	-5.2	0.090
1,2,3,6,7,8-HxCDF	39.61	0.10	10.2	20	0.99998	1.07	-3.0	0.053
2,3,4,6,7,8-HxCDF	40.84	0.10	6.0	20	0.99999	1.23	7.6	0.066
1,2,3,7,8,9-HxCDF	42.33	0.10	8.0	20	0.99900	1.03	-8.5	0.110
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	44.10	0.10	11.9	20	0.99990	1.29	3.9	0.075
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	46.30	0.10	9.5	20	0.99996	1.20	7.1	0.100
OCDF	50.33	0.25	8.2	50	0.99880	1.13	1.6	0.273
NO-PCBs								
PCB 77	24.76	0.50	4.8	20	0.99970	1.10	-5.2	0.118
PCB 81	25.33	0.50	6.5	20	0.99970	1.17	-7.5	0.057
PCB 126	29.72	0.50	4.3	20	0.99990	1.37	-0.3	0.253
PCB 169	34.41	0.50	8.0	20	0.99990	1.12	-3.2	0.397
MO-PCBs								
PCB 123	26.37	0.40	3.7	140	0.9913	1.20	14.1	0.774
PCB 118	26.57	0.40	2.5	140	0.9908	1.26	15.8	0.233
PCB114	27.16	0.40	6.3	140	0.9950	1.19	6.6	0.756
PCB 105	27.98	0.40	6.8	140	0.9976	1.25	14.6	0.226
PCB 167	30.68	0.40	5.1	140	0.9926	1.15	15.1	0.121
PCB 156	32.01	0.40	9.2	140	0.9928	1.13	15.5	0.255
PCB 157	32.31	0.40	13.7	140	0.9998	1.21	11.7	0.494
PCB 189	37.16	0.40	10.1	140	0.9998	1.14	14.1	0.119
NDL-PCBs								
PCB 28	17.95	0.40	7.5	500	0.9963	0.78	17.0	0.210
PCB 52	19.23	0.40	8.0	500	0.9914	1.21	14.3	0.176
PCB 101	23.29	0.40	7.8	500	0.9961	1.31	19.8	0.130
PCB 153	27.64	0.40	14.9	500	0.9906	1.05	-4.9	0.434
PCB 138	29.13	0.40	4.5	500	0.9908	0.98	2.5	0.235
PCB 180	32.92	0.40	12.0	500	0.9927	0.99	-12.5	0.249

An overtime monitoring of the RRFs stability was carried-out within the entire calibration range and for each target compound. Figure 1 illustrates the RRFs trend for 2 representative compounds (1,2,3,7,8-PeCDF and PCB-138) over a 2.5-month period. As can be observed, the RRF values were inside the 95% confidence range and randomly distributed.

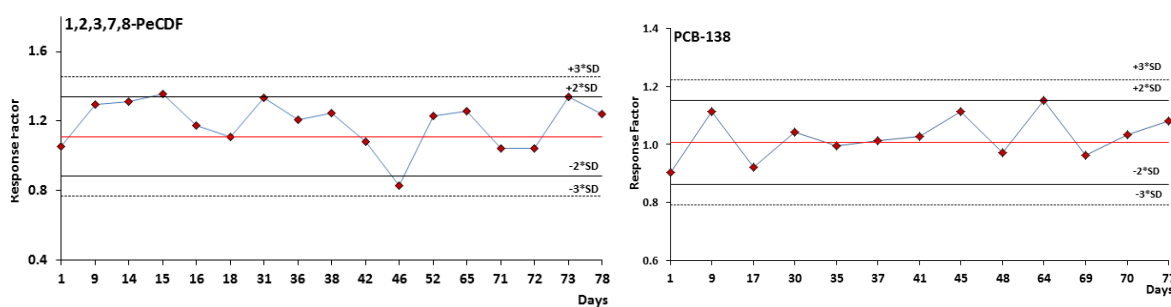


Figure 1. RRFs charts for 1,2,3,7,8-PeCDF and PCB-138 over a 2.5-month period. The lines represent the average RRF, the 99%, and the 95% confidence intervals.

In the EU regulations, the relative ion ratio needs to be within the maximum permitted tolerance ($\pm 15\%$) [14,15]. The average (qualifier/quantifier) ion ratio values, derived from the analysis of the calibration solutions and essential for confirmatory methods, are illustrated in Figure 2 (blue dots). On these values, a specific requirement is stated in the legislation, setting a maximum permitted tolerance of relative ion intensities of $\pm 15\%$ for confirmatory GC-QQQMS/MS methods. The red dotted error bars in Figure 2 represent such a 15 % RSD tolerance, and the black error bars illustrate the experimental deviation observed over the entire calibration range. As can be observed, the ion ratio variability met the requirements of the legislation, ranging from 2-15 % RSD.

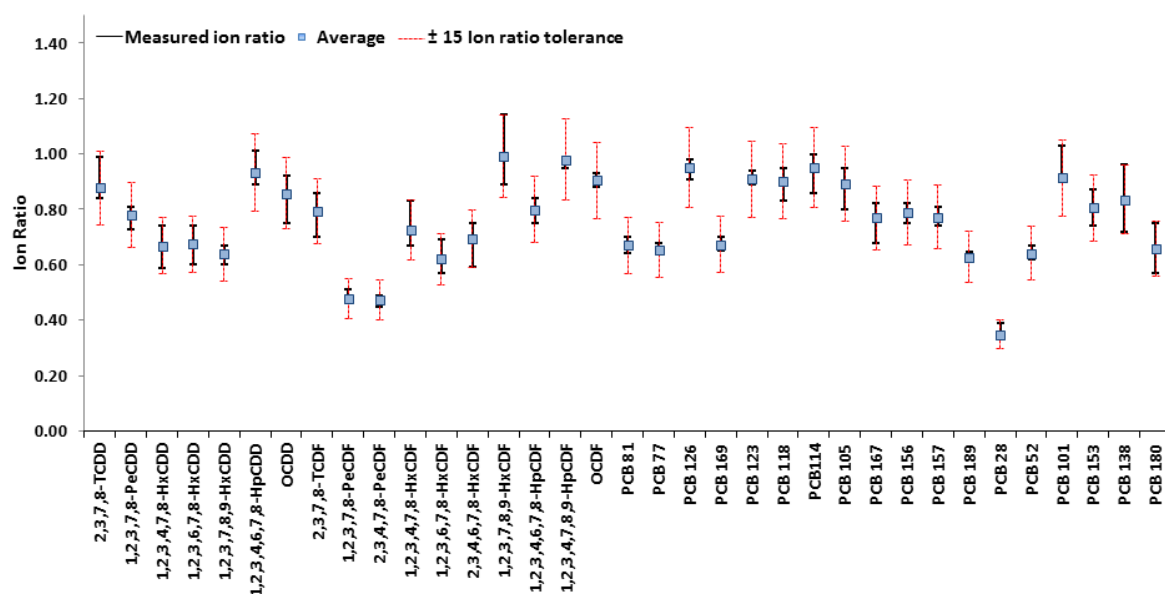


Figure 2. Ion ratio average values for native congeners for all calibration standards (one week of injections, $n=25$). Black bars: range of minimum/maximum ion ratios; Red dotted bars: 15% tolerance allowed.

As part of the validation, and in the line of EU requirements, method accuracy for PCDD/Fs and PCBs was evaluated using standard solutions at values close to the ML for animal feed of plant and animal origin (Table 2): the relative bias ranged from -2 to 7.9% among all the target analytes.

Table 2. Bias of the method for PCDD/Fs and DL-PCBs using standards solutions around ML for animal feed.

plant origins ng WHO ₂₀₀₅ TEQ/Kg							
PCDD/Fs	Regulation	Average ^a	SD	RSD %	Target	Bias %	MSE
ML	0.75	0.573	0.018	3.21	0.584	-1.88	0.00035
ML/2	0.38	0.126	0.003	2.41	0.117	7.69	0.00009
2ML	1.50	1.166	0.012	1.06	1.168	-0.15	0.00011
animal origins (fat) ng WHO ₂₀₀₅ TEQ/Kg							
PCDD/Fs	Regulation	Average ^a	SD	RSD %	Target	Bias %	MSE
ML	1.50	1.720	0.055	3.21	1.750	-1.95	0.00308
ML/2	0.75	0.378	0.009	2.41	0.350	7.87	0.00084
2ML	3.00	3.520	0.037	1.06	3.500	0.34	0.00115
plant origins ng WHO ₂₀₀₅ TEQ/Kg							
DL-PCBs and PCDD/Fs	Regulation	Average ^a	SD	RSD %	Target	Bias %	MSE
ML	1.25	1.375	0.014	1.02	1.372	0.28	0.00014
ML/2	0.625	0.654	0.019	2.85	0.665	-1.77	0.00024
2ML	2.5	6.152	0.103	1.67	6.247	-1.52	0.00714
animal origins (fat) ng WHO ₂₀₀₅ TEQ/Kg							
DL-PCBs and PCDD/Fs	Regulation	Average ^a	SD	RSD %	Target	Bias %	MSE
ML	2.00	1.961	0.056	2.846	1.996	-1.77	0.00407
ML/2	1.00	0.493	0.010	2.016	0.470	4.82	0.00048
2ML	4.00	4.126	0.042	1.017	4.115	0.28	0.00129

a) average considering three analysis replicates

In addition, a milk certified reference material was analyzed in independent triplicates to demonstrate the efficiency of the method in the presence of a complex fatty matrix. All RSD values were below 15% and the accuracy resulted higher than 80% for all the certified congeners, except for 1,2,3,6,7,8-HxCDD (Table 3). When expressed in TEQ, the accuracy reached 96% (1,99 pg TEQ/g fat measured, 2,07 pg TEQ/g fat certified).

The validation results showed good repeatability and limited bias values, further demonstrating adequate precision and accuracy at the ML values and on the certified food sample. However, long-term precision and bias studies (12-18 months) would give a better overview of the GC-QQMS/MS performance.

Table 3. Performance of the method for the certified PCDD/Fs congeners present in milk BCR-607 (pg/g fat).

Analytes	Measured values	SD	RSD (%)	Certified values	Accuracy (%)
2,3,7,8-TCDD	0.26	0.025	10	0.25(0.03)	105
1,2,3,7,8-PeCDD	0.85	0.057	7	0.79(0.04)	107
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.34	0.018	5	0.42(0.07)	81
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.65	0.071	11	0.98(0.11)	66
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.28	0.024	8	0.34(0.05)	83
2,3,7,8-TCDF	0.04	0.004	10	0.05(0.03)	82
1,2,3,7,8-PeCDF	0.06	0.005	8	0.054(0.013)	114
2,3,4,7,8-PeCDF	1.49	0.152	10	1.81(0.13)	82
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.91	0.073	8	0.94(0.04)	97
1,2,3,6,7,8-HxCDF	1.06	0.074	7	1.01(0.09)	105
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.97	0.051	5	1.07(0.05)	90

*Un certainties in brackets

3.3. Quality Controls and Performance Comparison with a Routine GC-HRMS Method

Quality controls, consisting of a pork fat and animal feed samples, were routinely extracted and injected on the GC-QQQMS/MS system. The normalized pg TEQ/g values obtained for the sum of PCDD/Fs and DL-PCBs were included in the control chart fed with GC-HRMS data, as showed in Figure 3 for the pork fat QC. As can be observed, the values obtained with the GC-QQQMS/MS method fitted nicely inside the confidence interval of the routine method.

In the second QC sample (feed), the sum of PCDD/Fs and DL-PCBs resulted with a +7.8% relative error compared to the GC-HRMS, 0.838 and 0.777 pg TEQ/g, respectively.

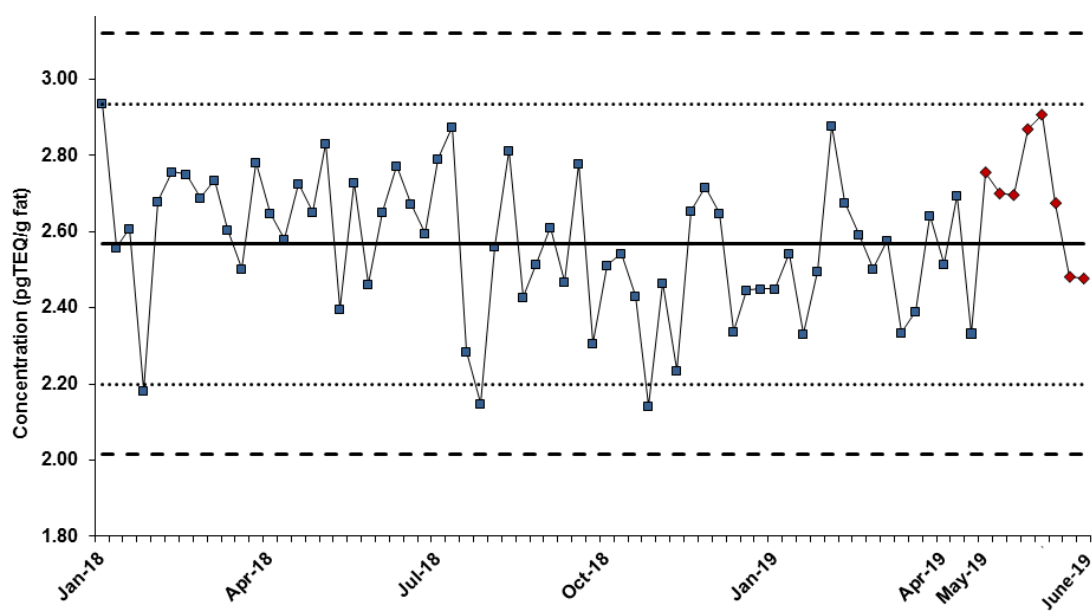


Figure 3. Quality control chart for pork fat routine QC samples (sum of PCDD/Fs and DL-PCBs expressed in TEQ). Chart made of routine GC-HRMS measurements, with GC-QQQMS/MS data for the five last points on the right (red dots). Dotted lines represent 95 and 99% confidence intervals ($\times 2$ and $\times 3$ SD).

As shown in Figure 4, concentrations and profiles of the congeners are closely related in the GC-QQQMS/MS and the GC-HRMS methods. The bar plot for each target analytes in the animal feed QC sample is reported in Supplementary Figure S2a-c.

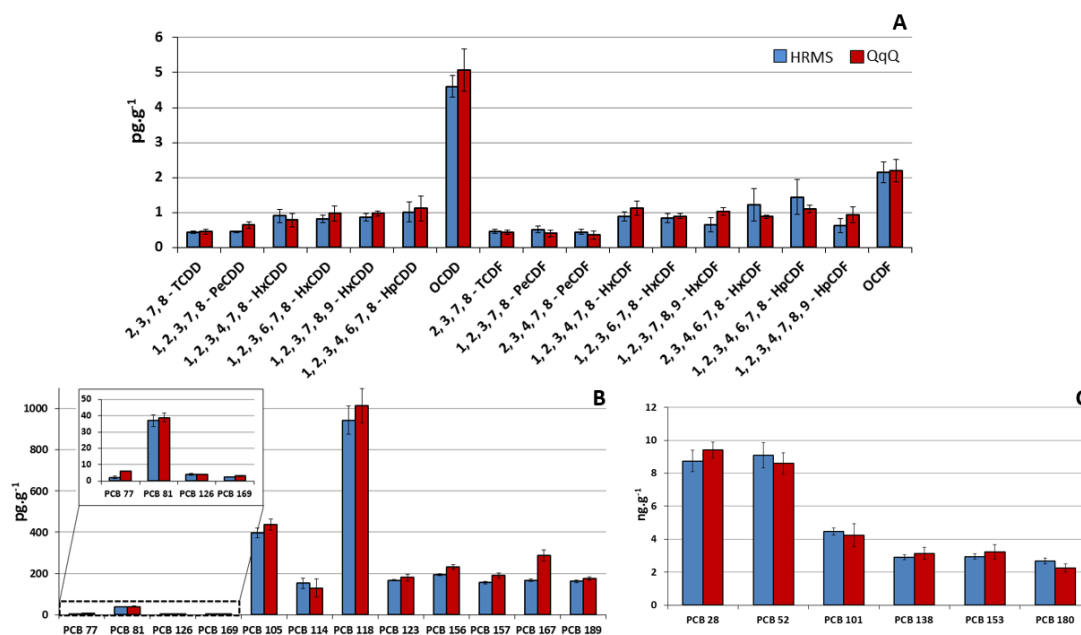


Figure 4. Concentrations and congener profiles of (A) PCDD/Fs, (B) NO-PCBs and MO-PCBs and (C) NDL-PCBs in the pork fat QC sample, by using the HRMS and the QqQ MS methods.

Also, a fish liver oil proficiency test sample (Rikilt, Wageningen, Netherlands) was analyzed, which had an assigned value was 0.67 ± 0.128 pg TEQ/g. For this sample, the GC-QQQMS/MS analysis revealed 0.69 pg TEQ/g, confirming again the good accuracy of the method, compliant with the requirements of EU Regulation.

4. Conclusion

The use of a novel triple quadrupole GC-QQQMS/MS system equipped with a programmable temperature vaporization injector for the analysis of PCDD/Fs and PCBs demonstrated to be in line with the last EU requirements for food/feed control. In a 3-months period, the system has been positively tested with standards, quality control, and food/feed samples, showing good sensitivity and repeatability in analyzing ultra-trace levels of PCDD/Fs and DL-PCBs.

The method showed good sensitivity (iLOQ range: 0.028 - 0.774 pg μL^{-1}) and repeatability (1.9-15 % range at the lowest point) in analyzing ultra-trace levels of PCDD/Fs and (N)DL-PCBs. In addition, the analysis on the quality control and on the proficiency test samples revealed the results of GC-QQQMS/MS to be comparable to those obtained from GC-HRMS. These results indicated the validity of this new short collision cell GC-QQQMS/MS as an alternative to the routine GC-HRMS method.

Author Contributions: conceptualization, J.F.F. and F.A.F.; methodology, G.S., J.F.F., and F.A.F.; validation, F.A.F. and E.L.; formal analysis, E.L. and F.A.F.; data curation, E.L. and F.A.F.; resources, J.F.F.; writing—original draft preparation, F.A.F. and E.L.; writing—review and editing, G.S., F.A.F., E.L. and J.F.F.; supervision, F.A.F. and J.F.F.; funding acquisition, J.F.F.

Funding: F.A.F. was supported by the FWO/FNRS Belgium EOS grant 30897864.

Acknowledgments: The authors thank Jeol for instrumental support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. S. Tully, UNEP: Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, 2001, Int. Doc. Corp. Responsib. 2012 (2013). doi:10.4337/9781845428297.00064.
2. G.J. Zheng, A.O.W. Leung, L.P. Jiao, M.H. Wong, Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans pollution in China: Sources, environmental levels and potential human health impacts, *Environ. Int.* (2008). doi:10.1016/j.envint.2008.02.011.
3. W. Parzefall, Risk assessment of dioxin contamination in human food, *Food Chem. Toxicol.* (2002). doi:10.1016/S0278-6915(02)00059-5.
4. J.F. Focant, C. Pirard, G. Eppe, E. De Pauw, Recent advances in mass spectrometric measurement of dioxins, *J. Chromatogr. A.* (2005). doi:10.1016/j.chroma.2004.10.095.
5. A.M. Ingelido, G. Brambilla, A. Abballe, A. Di Domenico, A.R. Fulgenzi, N. Iacovella, A.L.I.S. Valentini, E. De Felip, PCDD, PCDF, and DL-PCB analysis in food: Performance evaluation of the high-resolution gas chromatography/low-resolution tandem mass spectrometry technique using consensus-based samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2012). doi:10.1002/rcm.5324.
6. Á. García-Bermejo, M. Ábalos, J. Sauló, E. Abad, M.J. González, B. Gómara, Triple quadrupole tandem mass spectrometry: A real alternative to high resolution magnetic sector instrument for the analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, furans and dioxin-like polychlorinated biphenyls, *Anal. Chim. Acta.* (2015). doi:10.1016/j.aca.2015.07.039.
7. P.Q. Tranchida, F.A. Franchina, M. Zoccali, S. Pantò, D. Sciarrone, P. Dugo, L. Mondello, Untargeted and targeted comprehensive two-dimensional GC analysis using a novel unified high-speed triple quadrupole mass spectrometer, *J. Chromatogr. A.* 1278 (2013). doi:10.1016/j.chroma.2012.12.066.
8. F.A. Franchina, M.E. Machado, P.Q. Tranchida, C.A. Zini, E.B. Caramão, L. Mondello, Determination of aromatic sulphur compounds in heavy gas oil by using (low-)flow modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1387 (2015). doi:10.1016/j.chroma.2015.01.082.
9. B. L'Homme, G. Scholl, G. Eppe, J.F. Focant, Validation of a gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method for confirmatory analysis of dioxins and dioxin-like polychlorobiphenyls in feed following new EU Regulation 709/2014, *J. Chromatogr. A.* 1376 (2015) 149–158. doi:10.1016/j.chroma.2014.12.013.
10. P. Fürst, T. Bernsmann, D. Baumeister, Optimization of GC-MS/MS for the determination of dioxins and PCBs in feed and food and comparison of results with GC-HRMS, in: *Handb. Environ. Chem.*, 2016. doi:10.1007/698_2016_460.
11. A. Kotz, R. Malisch, J. Focant, G. Eppe, T. Cederberg, P. Rantakokko, P. Fürst, T. Bernsmann, C. Lovász, G. Scortichini, G. Diletti, A. Domenico, A. Ingelido, W. Traag, F. Smith, A. Fernandes, Analytical Criteria for Use of MS/MS for Determination of Dioxins and Dioxin-like PCBs in Feed and Food, *Organohalogen Comp.* 74 (2012) 156–159.

12. The European Commission, COMMISSION REGULATION (EU) No 709/2014 of 20 June 2014 amending Regulation (EC) No 152/2009 as regards the determination of the levels of dioxins and polychlorinated biphenyls, Off. J. Eur. Union. (2014) L 188/1-L 188/18.
13. THE EUROPEAN Commission, COMMISSION REGULATION (EU) No 589/2014 of 2 June 2014 laying down methods of sampling and analysis for the control of levels of dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in certain foodstuffs and repealing Regulation (EU) No 252/2012, Off. J. Eur. Union. 2006 (2014) 18–40.
14. European Commission, COMMISSION REGULATION (EU) 2017/644 of 5 April 2017, (2017).
15. EU 2017, COMMISSION REGULATION (EU) 2017/771 of 3 May 2017 amending Regulation (EC) No 152/2009 as regards the methods for the determination of the levels of dioxins and polychlorinated biphenyls, Off. J. Eur. Communities. L 115 (2017) 22–42.
16. M. Van den Berg, L.S. Birnbaum, M. Denison, M. De Vito, W. Farland, M. Feeley, H. Fiedler, H. Hakansson, A. Hanberg, L. Haws, M. Rose, S. Safe, D. Schrenk, C. Tohyama, A. Tritscher, J. Tuomisto, M. Tysklind, N. Walker, R.E. Peterson, The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds, *Toxicol. Sci.* (2006). doi:10.1093/toxsci/kfl055.
17. J.F. Focant, G. Eppe, A.C. Massart, G. Scholl, C. Pirard, E. De Pauw, High-throughput biomonitoring of dioxins and polychlorinated biphenyls at the sub-picogram level in human serum, *J. Chromatogr. A.* (2006). doi:10.1016/j.chroma.2006.05.098.
18. G. Eppe, J.F. Focant, C. Pirard, E. De Pauw, PTV-LV-GC/MS/MS as screening and complementary method to HRMS for the monitoring of dioxin levels in food and feed, *Talanta.* 63 (2004) 1135–1146. doi:10.1016/j.talanta.2004.05.056.

Supplementary material

Table 1. Qualitative and quantitative (MRM transitions) and energies for each congener

Congeners	Retention time	Quantifier transition		Qualifier transition	
		Precursor → Product	CE (V)	Precursor → Product	CE (V)
PCDDs					
2,3,7,8-TCDD	29.41	322→259	25	320→257	31
¹³ C-2,3,7,8-TCDD	29.42	334→270	25	332→268	31
1,2,3,7,8-PeCDD	34.62	356→293	16	354→291	16
¹³ C-1,2,3,7,8-PeCDD	34.63	368→304	16	366→302	16
1,2,3,4,7,8-HxCDD	41.11	390→328	34	388→325	25
¹³ C-1,2,3,4,7,8-HxCDD	41.12	402→338	34	404→340	25
1,2,3,6,7,8-HxCDD	41.30	390→327	22	392→329	28
¹³ C-1,2,3,6,7,8-HxCDD	41.31	402→338	22	404→340	28
1,2,3,7,8,9-HxCDD	41.76	390→327	22	392→329	22
¹³ C-1,2,3,7,8,9-HxCDD	41.76	402→338	22	404→340	22
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	45.50	424→361	16	426→363	19
¹³ C-1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	45.51			438→374	19
OCDD		436→372	16		
OCDD	49.97	460→397	19	458→395	16
¹³ C-OCDD	49.98	472→408	19	470→406	16
PCDFs					
2,3,7,8-TCDF	28.77	304→241	34	306→243	25
¹³ C-2,3,7,8-TCDF	28.78	316→252	34	318→254	25
1,2,3,7,8-PeCDF	33.01	340→277	34	342→279	34
¹³ C-1,2,3,7,8-PeCDF	33.02	352→288	34	350→286	34
2,3,4,7,8-PeCDF	34.24	340→277	34	342→279	34

¹³ C-2,3,4,7,8-PeCDF	34.25	352→288	34	350→286	31
1,2,3,4,7,8-HxCDF	39.33	374→311	37	376→313	34
¹³ C-1,2,3,4,7,8-HxCDF	39.34	386→322	37	388→324	34
1,2,3,6,7,8-HxCDF	39.61	374→311	34	376→313	31
¹³ C-1,2,3,6,7,8-HxCDF	39.62	386→322	34	388→324	31
2,3,4,6,7,8-HxCDF	40.84	374→311	28	376→313	31
¹³ C-2,3,4,6,7,8-HxCDF	40.85	386→322	28	388→324	31
1,2,3,7,8,9-HxCDF	42.33	374→311	43	376→313	31
¹³ C-1,2,3,7,8,9-HxCDF	42.34	386→322	43	388→324	31
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	44.10	408→345	34	410→347	34
¹³ C-1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	44.11	420→356	34	422→358	43
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	46.30	410→347	34	408→345	43
¹³ C-1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	46.31	420→356	34	422→358	43
OCDF	50.33	442→379	34	444→381	43
¹³ C-OCDF	50.34	456→392	43	454→390	43
NO-PCBs					
PCB 77	24.76	290→220	25	292→222	28
¹³ C-PCB 77	24.77	302→232	25	304→234	28
PCB 81	25.33	290→220	28	292→222	28
¹³ C-PCB 81	25.34	302→232	28	304→234	28
PCB 126	29.72	324→254	22	326→256	22
¹³ C-PCB 126	29.73	338→268	22	336→266	22
PCB 169	34.41	362→290	28	360→288	25
¹³ C-PCB 169	34.42	374→302	28	372→300	25
MO-PCBs					
PCB 123	26.37	324→254	31	326→256	28
¹³ C-PCB 123	26.38	336→266	31	338→268	28
PCB 118	26.57	326→256	31	324→254	25
¹³ C-PCB 118	26.58	336→266	31	338→268	25
PCB114	27.16	326→256	25	324→254	25
¹³ C-PCB114	27.17	338→268	25	336→266	25
PCB 105	27.98	324→254	31	326→256	31
¹³ C-PCB 105	27.99	336→266	31	338→268	31
PCB 167	30.68	360→290	31	358→288	28
¹³ C-PCB 167	30.69	372→302	31	370→300	28
PCB 156	32.01	360→290	28	358→288	28
¹³ C-PCB 156	32.02	372→302	28	370→300	28
PCB 157	32.31	360→290	31	358→288	28
¹³ C-PCB 157	32.32	372→302	31	370→300	28
PCB 189	37.15	394→324	34	396→326	31
¹³ C-PCB 189	37.16	406→336	34	404→334	31
NDL-PCBs					
PCB 28	17.95	256→186	22	258→188	22
¹³ C-PCB 28	17.96	268→198	22	270→200	22
PCB 52	19.23	290→220	25	292→222	25
¹³ C-PCB 52	19.24	302→232	25	304→234	25
PCB 101	23.29	326→256	31	324→254	25
¹³ C-PCB 101	23.30	336→266	31	338→268	25
PCB 153	27.64	360→290	31	358→288	31
¹³ C-PCB 153	27.65	372→302	31	370→300	31
PCB 138	29.13	360→290	25	358→288	25
¹³ C-PCB 138	29.14	372→302	25	370→300	25
PCB 180	32.92	394→324	34	396→326	31
¹³ C-PCB 180	32.93	406→336	34	408→338	31

ANEXO 6: DEMAIS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

Além dos artigos relacionados diretamente com esta tese, teve-se a colaboração, durante o período de doutorado, em outros trabalhos, os quais são detalhados abaixo.

Revista: *Journal of analytical and applied pyrolysis*

Fator de impacto: 3.470 Qualis: A2

Volume: 129, páginas: 43 a 52, ano: 2018

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2017.12.005>

Título: *Valorization of coffee silverskin industrial waste by pyrolysis: From optimization of bio-oil production to chemical characterization by GCxGC/qMS*

Autores: Allan dos Santos Polidoro, Enelise Scapin, **Eliane Lazzari**, Aline da Silva Nunes, Anaí Loreiro dos Santos, Elina Bastos Caramão, Rosângela Jacques Assis.

Revista: *Fuel*

Fator de impacto: 5.128 Qualis: A2

Volume: 232, páginas: 572 a 580, ano: 2018

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.05.097>

Título: *Influence of the temperature in the yield and composition of the bio-oil from the pyrolysis of spent coffee grounds: Characterization by comprehensive two dimensional gas chromatography*

Autores: Carmem Tatiane Primaz, Tiago Schena, **Eliane Lazzari**, Elina Bastos Caramão, Rosângela Jacques Assis

Revista: *Microchemical journal*

Fator de impacto: 3.206 Qualis: B1

Volume: 137, páginas: 30 a 36, ano: 2018

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.05.097>

Título: *Chromatographic characterization of bio-oils from fast pyrolysis of sugar cane residues (straw and bagasse) from four genotypes of the Saccharum Complex*

Autores: Jamilly A.S. Barros, Mauricio Krause, **Eliane Lazzari**, Thiago Bjerk, Adriane L. do Amaral, Elina Bastos Caramão, Laiza C. Krause

Revista: *International journal of engineering research & science*

Fator de impacto: Qualis: B5

Volume: 3, páginas: 46 a 57, ano: 2017

Título: *Trace Analysis of Carbazole in Commercial Diesel by using Adsorption on Activated Biochar from Rice Husk Pyrolysis*

Autores: Gabriela Pereira da Silva Maciel, **Eliane Lazzari**, Thiago Bjerk, Samir M. Carvalho, José M. F. Nogueira, Elina Bastos Caramão

Revista: *Renewable Energy*

Fator de impacto: 4,900 Qualis: A2

Volume: *submetido, Agosto*

Título: *Pyrolysis of coconut fibers: chemical analysis and economic evaluation of bio-oil and characterization of biochar*

Autores: Tiago Schena, **Eliane Lazzari**, Gabriela Pereira da Silva Maciel, Jaderson K. Schneider, Mozart Daltro, Laiza C. Krauze, Thiago Bjerk, Elina Bastos Caramão.