



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Antonia Regina dos Santos Gois

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO
DE FENÓIS PRESENTES EM FRAÇÃO AQUOSA DE PIRÓLISE POR
GC/MS E UHPSFC**

**METHODOLOGY DEVELOPMENT FOR QUANTIFICATION OF
PHENOLS PRESENT IN PYROLYSIS AQUEOUS FRACTION BY
GC/MS AND UHPSFC**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Antonia Regina dos Santos Gois

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO
DE FENÓIS PRESENTES EM FRAÇÃO AQUOSA DE PIRÓLISE POR
GC/MS E UHPSFC**

Defesa da Dissertação apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Química, da Universidade Federal de
Sergipe, para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lisiane dos Santos Freitas

*Defense of the Dissertation presented
to the Post Graduate Program in
Chemistry of the Federal University of
Sergipe to obtain MSc. in Chemistry.*

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

G616d Gois, Antonia Regina dos Santos
Desenvolvimento de metodologia para quantificação de fenóis presentes em fração aquosa de pirólise por GC/MS e UHPSFC / Antonia Regina dos Santos Gois ; orientador Lisiane dos Santos Freitas - São Cristóvão, 2021.
109 f. : il.

Dissertação (mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Química. 2. Calcinação (Metalurgia). 3. Fenóis. 4. Cromatografia a fluido supercrítico. I. Santos, Lisiane dos Santos Freitas orient. II. Título.

CDU 54



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
Programa de Pós-Graduação em Química
PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Antonia Regina dos Santos Gois apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 28/05/2021.

Lisiane Santos

Prof.^a Dr.^a Lisiane dos Santos Freitas
Departamento de Química- UFS

Marcelo da Rosa Alexandre

Prof. Dr. Marcelo da Rosa Alexandre
Departamento de Química- UFS

Lucio Cardozo Filho

Prof. Dr Lucio Cardozo Filho
Universidade Estadual de Maringá

*A Jesus, seu amor e sua misericórdia
mantiveram-me de pé nos momentos
em que eu mesma não conseguia
sustentar.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tanto amor, pelo dom da vida e por ter nos concedido uma natureza tão perfeita.

Aos amores da minha vida, primeiramente meus pais, Rosa e Domingos, por todo amor e esforço para que eu pudesse estudar. Em seguida, meus irmãos, Mariana, Antonio e Rafael por estarem sempre do meu lado. Sem vocês eu nada seria.

Ao meu namorado, Marcelo Hora, por deixar os meus dias mais leves e ter sido meu apoio quando eu achava que não ia conseguir, foi minha calma em meio ao caos. A sua família por me acolherem tão bem.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Lisiane dos Santos Freitas, pela amizade, confiança em ter me aceitado no seu grupo de pesquisa e por todo o conhecimento compartilhado, são coisas que levarei comigo pelo resto da vida.

Aos integrantes meu grupo de pesquisa LAC, pelo companheirismo, trabalho em grupo e principalmente aos amigos ganhei. Em especial, Fernando, que me acompanhou desde o início, correndo de um laboratório para o outro, inclusive nos finais de semana ou a noite.

Aos grupos de pesquisa do departamento de química, LCP, PEB, LABORGANICS, LEMON, LCNT, onde encontrei ajuda várias vezes em que precisei e fiz grandes amigos, em especial Jhonattas, Mirele, Tarcísio, Izabela, Isis, Miliana, Rafael, Julio, Mariana e Michael Douglas.

Aos que estão sempre comigo, Thiago, Wenes Christian, Raissa, Marlon, Luana, Dog, Alayne, Rhayza, Leo, mesmo com a distância nessa quarentena, ajudaram muito nos momentos em que mais me desesperei.

Aos integrantes do Laboratório de Pesquisas Farmacêutica e Quimiometria (LabFarQui) – Unicamp, em especial a Prof. Dr^a. Márcia Cristina Breitreitz e seu aluno de doutorado MSc. Igor Miranda, por todo conhecimento compartilhado e por me acolherem tão bem em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Lúcio Cardozo Filho e todo o seu grupo de pesquisa, pela acolhida e troca de conhecimento durante minha passagem por Maringá - PR.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Química, por todo o conhecimento passado adiante, em especial o Prof. Dr. Sandro Navickiene, por sempre me ajudar a resolver problemas com os equipamentos e afins. A Prof^a. Dr^a Valéria Regina, pela amizade e carinho.

Aos professores da banca pelo aceite ao convite.

À Universidade Federal de Sergipe, ao programa de Pós-Graduação em Química, ao CNPQ, a Capes, por todo apoio estrutural e financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma direta ou indireta contribuíram para o trabalho, meu muito obrigada

RESUMO

O produto líquido da decomposição térmica da biomassa pelo processo de pirólise é formado pela fração bio-óleo e fração aquosa. A fase aquosa pode chegar a 30% m/m dos produtos formados durante o processo. O conhecimento da sua composição é de suma importância para definir qual será sua rota de destino, seja no reaproveitamento dos compostos para aplicação industrial ou tratamento do efluente para descarte. As técnicas analíticas como Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (GC/MS) e a Cromatografia com fluido supercrítico de ultra alta eficiência (UHPSFC) foram utilizadas para avaliar a composição de compostos fenólicos presentes nas frações aquosas dos resíduos de feijão, pinha, acerola, uva, pinhão e goiaba. As análises no GC/MS foram realizadas no modo qualitativo e em seguida o método foi otimizado para o quantitativo, uma extração precisou ser realizada previamente. Para a análise por UHPSFC foram realizados testes para otimizar as condições de análise, e por fim, os fenóis foram quantificados. Ambos os métodos apresentaram um perfil semelhante em relação a concentração total dos fenóis nas frações aquosas, o aumento na concentração variou a depender do tipo de biomassa utilizada na pirólise e obedeceu a seguinte ordem: vagem de feijão < semente de pinha < semente de acerola < semente de goiaba < casca de pinhão < semente de uva. O método de análise proposto por UHPSFC apresentou ser adequado para fenóis em água de pirólise, além das amostras poderem ser analisadas de forma direta, foi muito mais curto (21 min) quando comparado com o método da cromatografia a gás (50 min).

Palavras-chave: *Pirólise; Fração aquosa; Compostos fenólicos; GC/MS; Cromatografia com fluido supercrítico.*

ABSTRACT

The liquid product of the thermal decomposition of the biomass by the pyrolysis process is formed by the bio-oil fraction and the aqueous fraction. The aqueous phase can reach 30% w / w of the products formed during the process. Knowledge of your composition is of paramount importance to define what will be its destination route, whether in the reuse of compounds for industrial application or treatment of effluent for disposal. Analytical techniques such as Gas Chromatography with Mass Spectrometry (GC / MS) and Chromatography with ultra-high efficiency supercritical fluid (UHPSFC) were used to evaluate the composition of phenolic compounds present in the aqueous fractions of the residues of beans, pinecones, acerola, grape, pine nuts and guava. The analyzes in the GC / MS were performed in a qualitative way and then the method was optimized for the quantitative, an extraction had to be performed previously. For the UHPSFC analysis, tests were performed to optimize the analysis conditions, and finally, the phenols were quantified. Both methods presented a similar profile in relation to the total concentration of phenols in the aqueous fractions, the increase in concentration varied depending on the type of biomass used in pyrolysis and was follow order: bean pod <pine cone seed <acerola seed < guava seed <pine seed <grape seed. The analysis method proposed by UHPSFC proved to be suitable for phenols in pyrolysis water, in addition to the samples being able to be analyzed directly, was much shorter (21 min) when compared to the gas chromatography method (50 min).

Keywords: *Pyrolysis; Aqueous phase; Phenolic compounds; GC/MS; Supercritical fluid chromatography.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organograma dos principais produtos da pirólise da biomassa de origem lignocelulósica.....	7
Figura 2. Rotas de destino para a aplicação da fração aquosa.	8
Figura 3. Estrutura do fenol e alguns de seus derivados.	10
Figura 4. Diagrama de fases. Fonte: Baseado em Saito e Lesellier E West [64,65].	16
Figura 5. Sistema de pirólise utilizado [27].	25
Figura 6. Distribuição dos compostos por classe química nas frações aquosas das diferentes biomassas: a) vagem de feijão; b) semente de pinha; c) semente acerola; d) semente de uva; e) casca de pinhão; f) semente de goiaba.	30
Figura 7. Cromatogramas com as programações das rampas de temperatura já otimizadas. Tempo total de análise: a) 50 min – SPB-5; b) 54,67 min – ZB-Wax; c) 62 min – Rtx-1MS.	33
Figura 8. Altura dos picos nas três colunas. Os analitos estão divididos em classes: a) dihidroxifenóis (R=OH), b) metoxifenóis (R=OCH ₃) e c) alquilfenóis (R=CH ₃ ; CH ₂ CH ₃).....	34
Figura 9. Fator de cauda referente aos 14 analitos investigados nas colunas: SPB-5, Rtx-1MS e ZB-Wax. Ordem: 1: fenol; 2: o-cresol; 3: p-cresol; 4: m-cresol; 5: 2,5-dimetilfenol; 6: 3,5-dimetilfenol; 7: guaiacol; 8: 4-etilfenol; 9: 4-metoxifenol; 10: o-catecol; 11: resorcinol; 12: Bifenila; 13: 4-metilcatecol; 14: 2,6-dimetoxifenol.	35
Figura 10. Curva de van Deemter para a coluna SPB-5 nas vazões de 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, e 1,8 mL.min ⁻¹	36
Figura 11. Área do 2,6-dimetoxifenol em cada uma das vazões.....	37
Figura 12. Reação de derivatização do fenol com o BSTFA.....	38
Figura 13. Cromatogramas de padrões de fenóis com derivatização de BSTFA + 1%TMCS (a) e sem derivatizante (b).	39
Figura 14. Área (a) e altura (b) dos fenóis analisados com e sem derivatizante, divididos em classes: dihidroxifenóis (R=OH), metoxifenóis (R=OCH ₃) e alquilfenóis (R=CH ₃ ; CH ₂ CH ₃).	40
Figura 15. Área dos analitos nos tempos de derivatização de 20, 30 e 40 minutos.	41
Figura 16. Curvas analíticas dos seguintes padrões de fenóis: Fenol, o-Cresol, p-Cresol, m-Cresol, 4-Etilfenol, Guaiacol, o-Catecol, Resorcinol, 4-Metilcatecol e 2,6-Dimetoxifenol.	42

- Figura 17.** Curvas analíticas, preparadas na matriz, dos seguintes padrões de fenóis: (1) Fenol, (2) o-Cresol, (3) p-Cresol, (4) m-Cresol, (5) 4-Etilfenol, (6) Guaiacol, (7) o-Catecol, (8) Resorcinol, (9) 4-Metilcatecol e (10) 2,6-Dimetoxifenol..... 45
- Figura 18.** Cromatogramas obtidos por GC/MS para a análise das frações aquosas de pirólise: (a) semente de goiaba (b) casca de pinhão (c) semente de uva (d) semente de acerola (e) vagem de feijão e (f) semente de pinha. 49
- Figura 19.** Concentração total dos fenóis nas diferentes frações aquosas (a) e suas respectivas biomassas (b)..... 49
- Figura 20.** Estrutura da lignina e suas principais subunidades – p-Hidroxifenila, Guaiacil e Siringil. **Fonte:** Adaptado de Amidon et al., [85]. 51
- Figura 21.** Possíveis mecanismos para a conversão do guaiacol, em catecóis, cresóis e fenol, durante a pirólise. **Fonte:** Adaptado de Haruno Kawamoto [87]. 52
- Figura 22.** Cromatogramas por UHPSFC da separação dos padrões fenólicos em diferentes fases estacionárias obtidas nas condições cromatográficas – pressão: 103 bar, temperatura: 40 °C, eluição: modo gradiente linear 0-20% de modificador orgânico em 10 minutos, vazão: 0,8 mL. min⁻¹, volume de injeção: 1,0 µL, diluente: ACN, detecção: 220 nm. 55
- Figura 23.** Parâmetros para a escolha da coluna calculados para o analito de maior retenção (resorcinol): a) N^op vs Coluna; b) H vs Coluna. 57
- Figura 24.** Perfil cromatográfico obtido com a coluna Torus 2-PIC. 58
- Figura 25.** Curva da H vs vazão da fase móvel utilizando coluna 2-PIC para o analito mais retido (resorcinol). 59
- Figura 26.** Cromatogramas nas diferentes proporções dos aditivos e modificador orgânico na FM: (a) MeOH 0,1% HFor; (b) MeOH:H₂O (97.5:2.5) 0,1% HFor; (c) MeOH:H₂O (95:5) 0,1% HFor; (d) MeOH:H₂O (95:5); (e) MeOH:ACN (80:20). 60
- Figura 27.** Figuras de contornos nas três pressões avaliadas. 62
- Figura 28.** Superfícies de respostas: (a) Temperatura do forno vs tempo de gradiente, (b) Pressão vs tempo de gradiente. 63
- Figura 29.** Cromatogramas de UHPSFC das frações aquosas nos diferentes solventes de diluição: (a) Isopropanol:ACN (1:3); (b) H₂O:ACN (1:3); (c) H₂O:ACN (1:20); (d) H₂O:MeOH (1:50); (e) H₂O. Volume de injeção de 1 µL. 65
- Figura 30.** Curvas analíticas do guaiacol, fenol, 4-metilcatecol, o-catecol e resorcinol, respectivamente. 67
- Figura 31.** Curvas analíticas preparadas na matriz do guaiacol, fenol, 4-metilcatecol,

o-catecol e resorcinol.	69
Figura 32. (a) Cromatograma dos padrões nas condições de análises otimizadas; (b) Cromatograma da fração aquosa de semente de goiaba.	72
Figura 33. (a) Concentração dos compostos fenólicos determinados por GC/MS e por UHPSFC nas frações aquosas de pirólise, (b) respectivas biomassas.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição em % de lignina, celulose e hemicelulose das biomassas utilizadas neste trabalho.	5
Tabela 2. Propriedades físico-químicas de alguns fenóis.	11
Tabela 3. Trabalhos da literatura que utilizam da cromatografia gasosa para a caracterização dos compostos orgânicos presentes em diferentes frações aquosas.	14
Tabela 4. Resumo das diretrizes de validação do método analítico. Fonte: Adaptada de Raposo e Ibelli-Bianco [76].	19
Tabela 5. Colunas utilizadas nas análises por GC/MS.....	22
Tabela 6. Colunas utilizadas nas análises por UPC ²	23
Tabela 7. Local de coleta das amostras e método de secagem.....	24
Tabela 8. Condições cromatográficas das análises qualitativas no GC/MS.	26
Tabela 9. Condições cromatográficas para análises de fenóis por GC/MS.	27
Tabela 10. Parâmetros do planejamento fatorial 2 ³	29
Tabela 11. Íons monitorados e tempo de retenção dos fenóis analisados por GC/MS.	38
Tabela 12. Equações da reta, coeficiente de correlação (r) e determinação (r ²) dos fenóis avaliados.	44
Tabela 13. Curvas solvente e matriz: Equações da reta, coeficiente de correlação (r) e determinação (r ²), e RCA – GC/MS. A ordem é: (1) Fenol, (2) o-Cresol, (3) p-Cresol, (4) m-Cresol, (5) 4-Etilfenol, (6) Guaiacol, (7) o-Catecol, (8) Resorcinol, (9) 4-Metilcatecol e (10) 2,6-Dimetoxifenol.	46
Tabela 14. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos fenóis avaliados neste trabalho – GC/MS.	48
Tabela 15. Concentrações dos fenóis divididas em subclasses: fenóis (fenol, o-cresol, p-cresol, m-cresol e 4- etilfenol), dihidroxifenóis (o-catecol, 4-metilcatecol e resorcinol), guaiacol (2- metoxifenol) e siringol (2,6-dimetoxifenol) nas seis frações aquosas.	53
Tabela 16. Os 17 ensaios do planejamento experimental e as respostas em relação ao número de picos (N ^o p).	62
Tabela 17. Equações da reta e coeficiente de determinação dos cinco (5) fenóis. ..	68
Tabela 18. Curvas solvente e matriz: Equações da reta, coeficiente de correlação (r) e determinação (r ²), e RCA – UHPSFC.....	70

Tabela 19. Limite de detecção e quantificação dos fenóis avaliados neste trabalho – UHPSFC.	71
Tabela 20. Comparação dos métodos de análise por GC/MS e UHPSFC.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- IEA – *International Energy Agency*; Agência Internacional de Energia
- EPA – *Environmental Protection Agency*; Agência de Proteção Ambiental
- FDA – *Food and Drug Administration*; Administração de Alimentos e Drogas
- GC/MS – *Gas Chromatography / Mass Spectrometry*; Cromatografia Gasosa / Espectrometria de Massas
- MS – *Mass Spectrometry*; Espectrometria de Massas
- TOFMS – *Time-of-flight Mass Spectrometry*; Espectrometria de massa de tempo de voo
- GC – *Gas Chromatography*; Cromatografia Gasosa
- LC – *Liquid Chromatography*; Cromatografia Líquida
- SFC – *Supercritical fluid chromatography*; Cromatografia de Fluido Supercrítico
- APCI-HRMS – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization-High Resolution Mass Spectrometry*; Ionização Química a Pressão Atmosférica -Espectrometria de Massa de Alta Resolução
- SPE – *Solid Phase Extraction*; Extração em Fase Sólida
- HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- UHPLC – *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*; Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência
- UHPSFC – *Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography*; Cromatografia de Fluido Supercrítico de Ultra Alta Eficiência
- DAD – *Diode Array Detector*; Detector de Arranjo de Diodos

SIM – *Selected Ion Monitoring*; Monitoramento do Íon Selecionado

SCAN – Modo de Aquisição por Varredura de Íons

TICC – *Chromatogram of Total Ion Current*; Cromatograma da
Corrente Total de íons

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2. Processo de pirólise	2
1.3. Biomassa	4
1.4. Fração aquosa	7
1.4.1. Fenóis.....	9
1.5. Métodos de análise e caracterização da fração aquosa	12
1.5.1. Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas.....	13
1.5.2. Cromatografia com fluido supercrítico.....	15
1.6. Validação do método analítico	18
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Reagentes	22
3.2. Coleta e preparo das amostras	24
3.3. Processo de pirólise	24
3.4. Análise das frações aquosas por gc/ms	25
3.4.1. Preparo da amostra (Extração e Derivatização).....	26
3.4.2. Análise qualitativa das frações aquosas por GC/MS.....	26
3.4.3. Otimização do método e quantificação dos fenóis por GC/MS.....	27
3.5. Análise das frações aquosas por cromatografia com fluido supercrítico de ultra alta eficiência (UHPSFC)	28
3.5.1. Parâmetros avaliados para a análise por cromatografia com fluido supercrítico de ultra alta eficiência (UHPSFC).....	28
3.5.2. Planejamento fatorial 2 ³	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Análises das frações aquosas de pirólise por GC/MS –Caracterização.....	30
4.2. Otimização do método de análise por GC/MS.....	31
4.2.1. Seleção da fase estacionária.....	31
4.2.2. Vazão.....	36

4.2.3. Uso do derivatizante.....	37
4.2.4. Tempo de derivatização.....	40
4.3. Avaliação das figuras de mérito para o método por GC/MS.....	41
4.3.1. Linearidade e sensibilidade.....	41
4.3.2. Seletividade não específica (efeito matriz).....	44
4.3.3. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	48
4.4. Análise quantitativa de fenóis na fração aquosa de pirólise – gc/ms.....	48
4.5. Desenvolvimento do método de análise por UHPSFC.....	54
4.5.1. Seleção da Fase estacionária (FE).....	54
4.5.2. Seleção da Vazão (F).....	58
4.5.3. Seleção do Modificador orgânico.....	59
4.5.4. Seleção dos parâmetros de Pressão, temperatura e tempo de gradiente do modificador.....	61
4.5.5. Seleção do Diluente.....	64
4.6. Avaliação das figuras de mérito para o método por UHPSFC.....	66
4.6.1. Linearidade.....	66
4.6.2. Seletividade não específica (efeito matriz).....	68
4.6.3. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	70
4.7. Análise quantitativa de fenóis na fração aquosa de pirólise – UHPSFC.....	71
5. CONCLUSÕES.....	74
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES	87

1. INTRODUÇÃO

O produto líquido do processo de pirólise, formado pela presença de uma fase orgânica e uma fase aquosa (cerca de 30% m/m), é constituído por uma mistura complexa de compostos orgânicos e pode ser avaliado como um material de partida para a produção de biocombustíveis e produtos químicos [1]. A água gerada no sistema durante o processo de pirólise é resultado da presença de umidade na biomassa e reações de desidratação de seus componentes [2].

A elevada quantidade deste produto aquoso e suas características complexas, como a multiplicidade de substâncias químicas oxigenadas, confere a ele características únicas, como seus baixos valores de pH. Por apresentar alta polaridade tende a solubilizar os compostos orgânicos mais polares produzidos durante a pirólise, como por exemplo, fenóis, furanos e ácidos de cadeia curta que possuem altos coeficientes de distribuição na água, resultando em uma maior concentração dessas espécies em sua composição [3]. São compostos que possuem valor agregado para a indústria, principalmente quando nos referimos aos fenóis, estes apresentam uma vasta aplicabilidade como matérias primas ou intermediários na síntese de produtos farmacêuticos, sabores de alimentos, herbicidas, resinas e adesivos [4].

A fração aquosa é considerada um efluente do processo de pirólise, conseqüentemente, deve ser tratada com múltiplas etapas para ser lançada ao meio ambiente. Entretanto, por apresentar uma alta carga orgânica em sua composição, trabalhos apontam para seu aproveitamento através da extração dos compostos [5], eletrólise para obtenção de hidrogênio [6] ou até mesmo como fase extratora para compostos oxigenados do bio-óleo (desoxigenação) [7].

Visto que a composição química da fração aquosa é muito complexa e depende significativamente do tipo de biomassa que foi utilizada na pirólise, faz-se necessário a caracterização e a quantificação dos compostos com o objetivo de determinar o destino mais adequado para este efluente. Embora a concentração de muitos compostos seja mais alta na fase aquosa do que na fase orgânica do bio-óleo, o desenvolvimento dos métodos para a sua análise não é algo comumente descrito na literatura.

As técnicas cromatográficas são as mais aplicadas para a caracterização dos produtos líquidos da pirólise, onde a cromatografia gasosa com espectrometria de

massas (GC/MS) é comumente utilizada para a caracterização da fração aquosa, mas a quantificação de fenóis nessa matriz restringiu-se a alguns poucos trabalhos na literatura [8,9]. Apesar da alta capacidade de separação de misturas complexas, para a análise de amostras aquosas, a técnica de cromatografia gasosa necessita de etapas trabalhosas de preparo de amostra pois precisam passar por processos de extração [2].

A cromatografia líquida tem uma ampla gama de aplicações na análise qualitativa e quantitativa da fração aquosa, possibilitando a análise direta desse tipo de amostra, apesar de ter uma menor capacidade de separação em comparação com o GC [10]. A cromatografia com fluído supercrítico ainda não foi avaliada para a quantificação de fenóis presentes em fração aquosa de pirólise, apenas para a caracterização das classes dos compostos orgânicos presentes em amostras de bio-óleo, sendo esta considerada como uma ferramenta analítica promissora para a análise amostras complexas [11].

Em meio as possibilidades de análises e as técnicas analíticas que podem ser aplicadas, o presente trabalho busca desenvolver um método simples e eficiente capaz de caracterizar e quantificar fenóis em amostras de frações aquosas oriunda de diferentes matrizes (semente de uva, goiaba, pinha, acerola, casca de pinhão e vagem de feijão). Dentre as técnicas de análise a serem avaliadas neste trabalho estão a cromatografia gasosa com espectrometria de massas e a cromatografia com fluído supercrítico de ultra alta eficiência.

1.2. Processo de Pirólise

Os processos termoquímicos de gaseificação, pirólise e combustão estão entre os mais atuais para a conversão da biomassa. A pirólise é um processo que consiste na degradação térmica da biomassa sob atmosfera inerte obtendo como produto um sólido (carvão), um gás e um líquido complexo formado por uma mistura, em sua maioria, de compostos orgânicos oxigenados [12,13].

A depender do tempo de permanência da matéria-prima no reator e a taxa de aquecimento, a pirólise pode ser classificada como lenta, rápida ou instantânea. Cada uma das três modalidades corresponderá à preferência de formação de um dos produtos [14,15]. A pirólise lenta, devido à baixa taxa de aquecimento e longo período de permanência suficiente para reações de polimerização, maximiza os rendimentos sólidos (carvão) e o rendimento de bio-óleo pode chegar até 50%. A

pirólise rápida é caracterizada por suas altas taxas de aquecimento e breves tempos de permanência, podendo seu produto líquido atingir um rendimento de 50 a 70% em peso. A pirólise instantânea possui taxas de aquecimento extremamente altas (1000 °C/s) e tempos de permanência curtos, resultando em altos rendimentos de bio-óleo, podendo chegar até 80% em peso [16].

Considerando uma matéria prima (biomassa) de origem lignocelulósica, seus componentes possuem diferentes temperaturas de degradação dentro do processo de pirólise. Em geral, a hemicelulose é o primeiro constituinte a se degradar, em uma faixa de 220 a 315 °C, seguida pela celulose em um intervalo menor de 315 a 400 °C. Já a lignina se decompõe em uma maior faixa de temperatura frente aos demais componentes, no intervalo de 160 a 900 °C. Durante a degradação térmica, uma série de reações ocorrem simultaneamente, incluindo desidratação, despolimerização, isomerização, descarboxilação e processos de carbonização, responsáveis pela composição complexa seus produtos [17].

O processo forma três produtos (gás, sólido e líquido) em proporções diferentes dependo da biomassa e das condições da pirólise. O produto gasoso, biogás, é constituído de moléculas de baixa massa molecular que não são condensados com o resfriamento, como o dióxido de carbono, monóxido de carbono, hidrogênio e metano [18]. O produto sólido, comumente conhecido como biocarvão, é composto por resíduos orgânicos e inorgânicos oriundos da degradação térmica parcial ou completa dos componentes da biomassa[16]. O produto líquido consiste em duas fases, uma orgânica e uma aquosa [19]. Ambas as fases são caracterizadas por ser uma mistura complexa de compostos como ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres, furanos, nitrogenados, alifáticos e fenóis, que podem ser empregados em processos industriais para a produção de energia, combustíveis ou insumos químicos [20].

Na literatura, trabalhos envolvem o processo de pirólise visando melhora-lo com o desenvolvimento de técnicas avançadas que são elaboradas tendo como finalidade à redução na temperatura de reação, aumento no rendimento e na qualidade dos produtos, minimizando as reações secundárias e proporcionando um aquecimento mais seletivo, maior eficiência energética e menor custo de produção [21]. Dentre os processos investigados para esse fim, estão a pirólise catalítica, pirólise a vácuo, pirólise por micro-ondas, co-pirólise e pirólise de dióxido de carbono (CO₂) [21]. Segundo Xin et al. [22], tecnologias atuais de pirólise foram

desenvolvidas para melhorar a qualidade do óleo de biocombustível em termos de valor de aquecimento, miscibilidade com outros combustíveis líquidos, etc. O foco do presente trabalho não foi otimizar o processo de pirólise, nem utilizar catalizadores ou quaisquer métodos citados acima, mas investigar seu efluente, para tal, foi utilizado um sistema de pirólise lenta em um reator de leito fixo.

1.3. Biomassa

A crise do petróleo em 1973 trouxe à comunidade internacional mais consciência da dependência dos recursos de combustíveis, uma série de medidas tomadas nos anos seguintes, políticas para racionalizar o uso de energia e melhorar a eficiência energética, foram implementadas pelos países industrializados. Acordos como o Protocolo de Quioto (1994) e o Tratado da Carta de Energia (1991), foram assinados afim de melhorar o uso das fontes energéticas, reduzir emissões de gases causadores do efeito estufa e aumentar a parcela de energia renováveis. Ainda assim, atualmente o petróleo ainda exerce uma importante influência na sociedade, através do seu consumo para a produção de energia e insumos para a indústria química [23].

Além das crises econômicas geradas no século passado, o consumo de combustíveis fósseis trouxe consigo impacto ambiental a partir da emissão de gases do efeito estufa e degradação da qualidade do ar, ocasionada por poluentes como SO_x e NO_x . Em um estudo realizado pela Agência Internacional de Energia (IEA) [24], considerando um cenário mundial eficiente – em que medidas econômicas de energia fossem implementadas – utilizando tecnologias disponíveis atualmente, a emissão atmosférica de SO_x e NO_x seria reduziria em um terço entre 2015 – 2040, em comparação com os dias de hoje.

Dentre as tecnologias disponíveis atualmente, a energia da biomassa é uma alternativa que vem sendo estudada ao longo dos anos como recurso renovável para a produção de combustíveis neutros em carbono e com baixa emissão de gases poluentes. A biomassa pode ser definida como material biológico de organismos vivos, na maioria das vezes plantas ou materiais derivados de plantas, de origem orgânica animal ou gerados pelo ser humano. Podemos citar como exemplos, resíduo florestal, produção de algas, processos industriais, resíduos municipais ou operações de limpeza de terras [15,25].

As biomassas de origem vegetal podem ser majoritariamente constituídas por sacarídeos, oleaginosos, amiláceos e lignocelulósicos, mesmo as que não apresentam material lignocelulósico como constituinte maioritário, por exemplo biomassas oleaginosas, também possuem celulose, hemicelulose e lignina na sua composição estrutural, mas em menor proporção. A biomassa lignocelulósica tem em sua composição formada basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, onde, estas estruturas fazem parte da parede celular da planta de forma estável, compacta e resistente [26].

O teor de celulose varia entre 40 e 60%, dependendo da biomassa, estruturalmente é um polissacarídeo composto por mais de 10000 subunidades de glicose ligadas entre si por ligações glicosídicas, que contribuem para o aspecto linear da molécula. O teor de hemicelulose varia de 15 a 30%, sua estrutura molecular é basicamente um heteropolissacarídeo ramificado composto por hexoses, pentoses, ácidos urônicos e desoxi-hexoses, com cadeia de tamanho menor comparada a celulose. A lignina é um polímero hidrofóbico que envolve as cadeias de celulose e hemicelulose, e geralmente está presente na biomassa na faixa de 10 a 25%. Sua molécula é composta por anéis aromáticos carregados de hidroxilas e metilas, que são unidos por ligações éter e C – C para formar a sua estrutura tridimensional [15,26]. A Tabela 1 apresenta a composição lignocelulósica de algumas biomassas.

Tabela 1. Composição em % de lignina, celulose e hemicelulose das biomassas utilizadas neste trabalho.

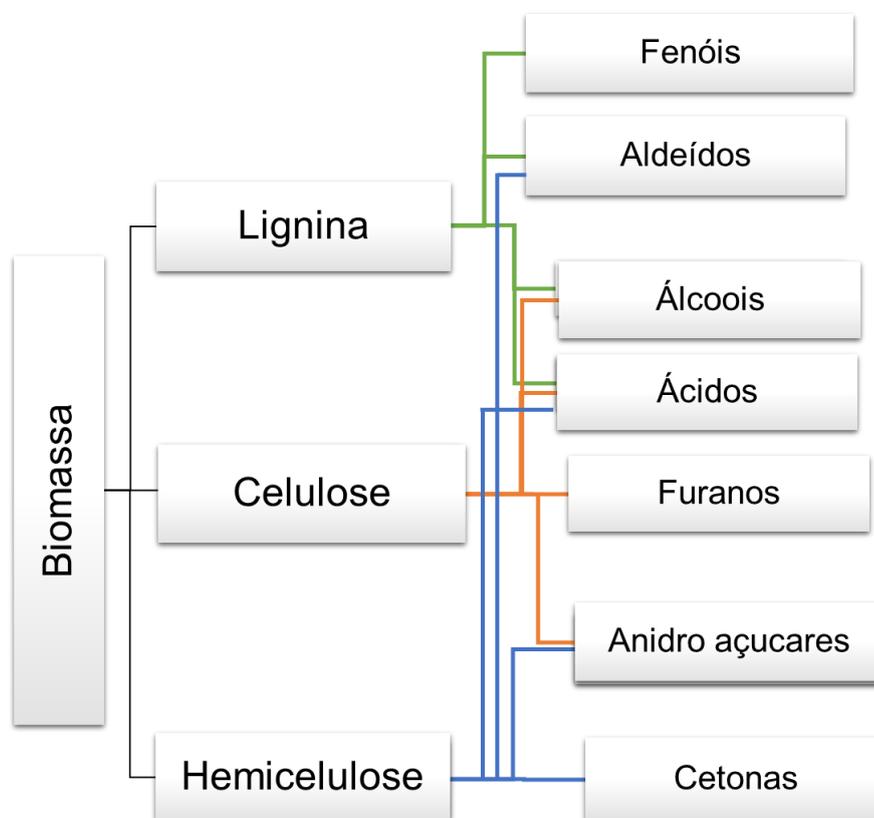
Biomassa	Lignina	Celulose	Hemicelulose	Referência
Vagem de Feijão-Caupi	7,31	29,97	24,33	Santos et al. [27]
Semente de Acerola	20,11	35,07	17,17	Edilton et al. [28]
Casca de Pinhão	36,17	26,93	13,75	Resende [29]
Semente de Uva	44,0	7,0	31,0	Moldes et al. [30]
Semente de Goiaba	7,6	60,6	9,2	Elizalde-González E Hernández-Montoya [31]

Durante todo o processo de degradação térmica da biomassa, várias reações ocorrem simultaneamente dentro do sistema, estas podem ser classificadas como

primárias e secundárias. As reações primárias englobam despolimerização, fragmentação e formação de carvões (carbonização). As reações secundárias acontecem a partir dos compostos primários não estáveis que são suscetíveis a reagir através de craqueamento e recombinação [14].

São os componentes da biomassa, celulose, hemicelulose e lignina, que durante a exposição à altas temperaturas sofrem reações resultando nos diferentes compostos orgânicos que compõe os produtos da pirólise. A decomposição térmica da celulose acarreta na sua despolimerização seguida de outras reações secundárias, entre elas, decomposição dos produtos primários (açúcares), desidratação e isomerização, que são responsáveis pela formação de ácidos, álcoois, anidro-açúcares, furanos e água. A hemicelulose tem reações de decomposição semelhantes a celulose, e além da formação de ácidos e anidro açúcares, também há a formação de cetonas e aldeídos. A lignina passa por três processos durante a pirólise, a desidratação, a formação de voláteis e em seguida a formação de pequenos gases moleculares. Durante decomposição da estrutura da lignina, a clivagem das ligações éter e carbono-carbono presentes tem como produto resultante os compostos fenólicos [14,32]. A figura 1 apresenta os principais compostos formados a partir da decomposição térmica desses três principais constituintes da biomassa lignocelulósica.

Figura 1. Organograma dos principais produtos da pirólise da biomassa de origem lignocelulósica.



1.4. Fração Aquosa

A fração aquosa representa de 15 a 30% em peso de líquido gerado durante o processo. Esta fase é formada a partir da umidade existente na biomassa e de reações de desidratação da lignina que ocorrem durante o processo de pirólise [2]. Segundo Sanches Filho et al. [9] a fração aquosa é formada por 80% em peso de água e 20% em peso de compostos orgânicos de alta polaridade. São compostos que foram arrastados para a água no momento da pirólise, como anidro-açúcares, ácidos de cadeia curta e fenóis, os dois últimos contribuem principalmente para os baixos valores de pH que a fração aquosa apresenta [33].

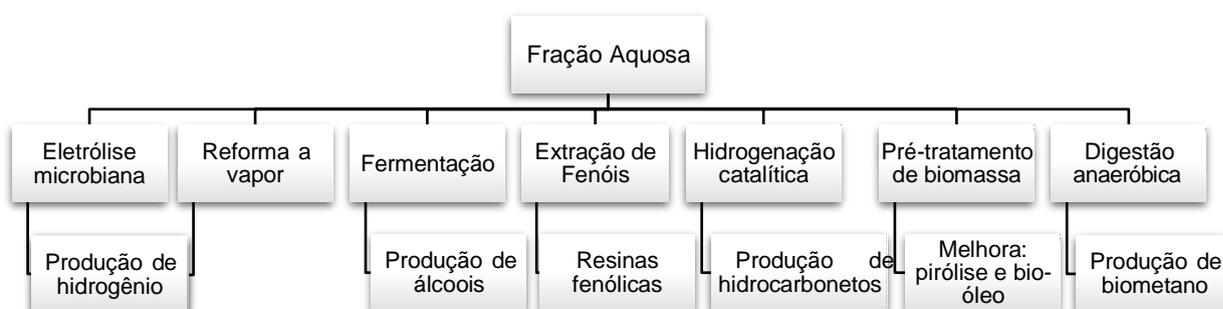
Quando comparada à fase orgânica do bio-óleo ou até mesmo ao petróleo bruto, a fração aquosa é um produto de baixo valor agregado e não apresenta interesse para ser aplicada de alguma forma direta no setor energético [9]. Entretanto, devido a sua composição química complexa e altamente tóxica, resultado da presença dos compostos oxigenados [34], pode ser utilizada como fonte de matéria-prima em diversos processos. Os seus componentes podem ser

utilizados em bio-refinarias aplicados em processos de conversão catalítica de furanos e fenólicos para hidrocarbonetos [35], fermentação de levoglucosano para produzir álcoois e dióis [36], produção de hidrogênio a partir de ácidos orgânicos através de eletrólise microbiana [6], produção de hidrocarbonetos a partir da hidrogenação catalítica dos compostos oxigenados [37] e produção de biometano a partir da digestão anaeróbica de fração aquosa [38].

A fração aquosa também foi avaliada como solução para pré-tratamento de biomassa, promovendo uma melhora na qualidade do bio-óleo [39]. Em trabalho recente, sua atividade biológica foi avaliada pela primeira vez investigando a ação antifúngica contra fungos humanos patogênicos, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, onde, a inibição no crescimento da levedura chegou em 100% [40].

Seu descarte sem tratamento, além de acarretar a poluição do meio ambiente, leva ao desperdício de substâncias que poderiam ser de grande utilidade para a indústria química e/ou petroquímica [41]. Suas possíveis aplicações podem ser observadas na figura 2.

Figura 2. Rotas de destino para a aplicação da fração aquosa.



Com o foco na preocupação na demanda de energia, Xing et al. [42] estudaram a reforma a vapor dos compostos oxigenados da fração aquosa para a produção de hidrogênio avaliando o efeito de diferentes catalisadores. Satinover et al. [43] destacam o uso da eletrólise microbiana para a degradação da matéria orgânica presente resultando na produção de H₂, onde cerca de 80% dos compostos avaliados sofreram degradação, incluindo ácidos orgânicos, derivados de açúcar e fenólicos. Já Kaombe E Hagg [44] estudaram a remoção da fração aquosa do bio-óleo por osmose direta com o intuito de remover apenas a água na sua condição de

pura, sem trazer consigo os componentes valiosos que estão dissolvidos nela.

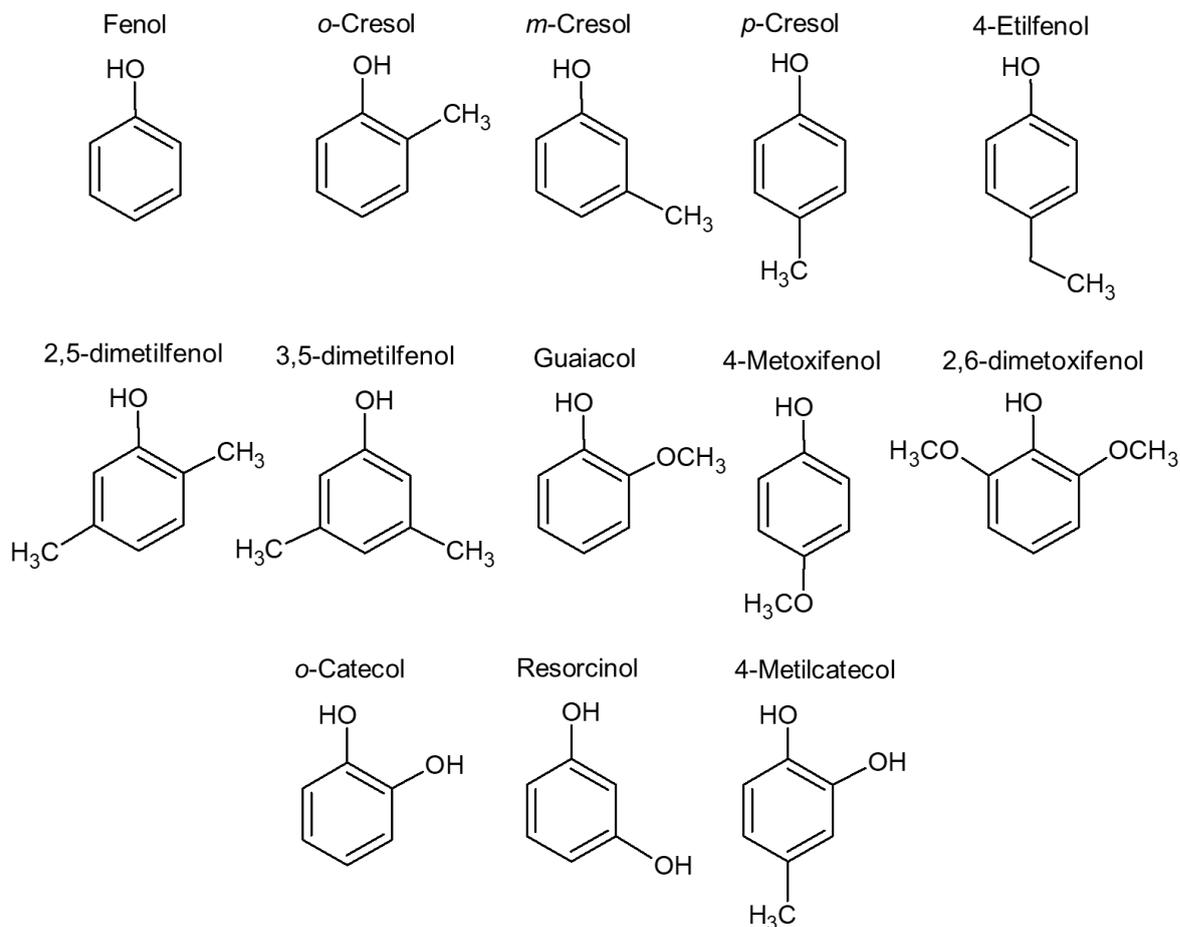
Apesar de não apresentar tantos estudos na literatura como o bio-óleo, com o decorrer dos anos alguns trabalhos foram desenvolvidos com foco na fração aquosa, conforme descrito nos textos acima. Para avaliar qual destino será dado às frações aquosas, é necessário desenvolver metodologias de análises afim de conhecer melhor sua composição, avaliando as classes de compostos estão presentes na amostra, principalmente aquelas de valor agregado.

1.4.1. Fenóis

O reaproveitamento dos fenóis presentes na fração aquosa do bio-óleo pode agregar valores aos resíduos em bio-refinarias, além de minimizar os efeitos do seu descarte no meio ambiente, contribuindo como alternativa verde para a produção de resinas fenólicas e outros produtos que são originalmente oriundos da indústria do refino do petróleo.

Os fenóis são constituídos de um anel aromático com no mínimo um grupo hidroxila (OH), suas estruturas podem diversificar, variando de uma simples molécula de fenol até um composto polimerizado [45]. São naturalmente reativos e possuem características ácidas devido a presença do OH em sua estrutura. Dentre os fenóis que são largamente distribuídos na natureza, são encontrados praticamente em todo reino vegetal os flavonóides, ácidos fenólicos e cumarinas. Na classe dos fenóis de estrutura simples são encontrados os alquil-fenóis, siringois, guaiacóis e catecóis [46]. A figura 3 apresenta a estrutura do fenol e alguns de seus derivados.

Figura 3. Estrutura do fenol e alguns de seus derivados.



A produção de fenóis no processo de pirólise pode ser caracterizada, em sua maioria, pela presença da lignina na composição da biomassa e é de grande interesse para as bio-refinarias, já que pode ser utilizada para substituir parcialmente ou totalmente os fenóis de origem fóssil [47]. São os fenóis principais responsáveis pelo odor de fumo presente nas frações aquosas, além de apresentarem características corantes, antimicrobianas e antioxidantes. Suas atividades antimicrobianas resultam da perturbação das membranas citoplasmáticas das bactérias, fazendo com que os fluidos intracelulares vazem [22]. Dentre as classes de fenóis, os di-hidroxibenzenos são os que possuem a maior capacidade antioxidante [22].

Diante das suas possíveis aplicações, no ano de 2006, cerca de dois terços da produção mundial de fenol foi destinada a fabricação de plásticos, sendo um componente essencial para as resinas fenol-formaldeído e epóxi, onde aproximadamente 95% de toda essa produção de fenol foi de origem fóssil [48].

Além da sua grande aplicação na indústria de resinas, o fenol e seus derivados, como metil e metóxi fenóis, atuam também como precursores na produção de uma gama de medicamentos, herbicidas, cosméticos e produtos farmacêuticos, com alto valor econômico [49]. Possuem aplicabilidade nas indústrias de alimentos, onde são utilizados para estender o tempo de vida útil dos itens, mantendo a qualidade dos alimentos afim de melhorar suas características sensoriais e a segurança [50].

Os fenóis possuem características químicas diferentes conforme a sua estrutura, quantidade de hidroxilas e substituintes. São compostos ácidos e solúveis em água, os baixos valores de lipossolubilidade (log P) dos analitos contribuem com a sua solubilidade em água, que é proporcional a sua polaridade. A Tabela 2 estão apresentados alguns compostos e suas principais propriedades.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas de alguns fenóis.

Composto	Fórmula molecular	Log P*	pKa	Solubilidade em água a 25°C (g 100 mL ⁻¹)	ceptor/ Doador H ⁺
Fenol	C ₆ H ₆ O	1,46	9,9	8,28	1/1
<i>o</i> -Cresol	C ₇ H ₈ O	1,95	10,26	2,50	1/1
<i>m</i> -Cresol	C ₇ H ₈ O	1,96	10,09	2,40	1/1
<i>p</i> -Cresol	C ₇ H ₈ O	1,94	10,26	1,90	1/1
4-Metilcatecol	C ₇ H ₈ O ₂	1,37	9,55	3,79	2/2
4-Etilfenol	C ₈ H ₁₀ O	2,58	10,00	0,49	1/1
3,5- Dimetilfenol	C ₈ H ₁₀ O	2,35	10,19	0,48	1/1
2,5-Dimetilfenol	C ₈ H ₁₀ O	2,33	10,41	0,35	1/1
Guaiacol	C ₇ H ₈ O ₂	1,32	9,98	1,87	2/1
4-Metoxifenol	C ₇ H ₈ O ₂	1,41	10,05	1,95	2/1
2,6-Dimetoxifenol	C ₈ H ₁₀ O ₃	1,15	9,37	1,73	3/1
<i>o</i> -Catecol	C ₆ H ₆ O ₂	0,88	9,5	46,10	2/2
Resorcinol	C ₆ H ₆ O ₂	0,8	9,3	71,70	2/2
Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	2,49	10,19	0,25	2/1

*Coeficiente de partição octanol/água

São compostos que podem ser encontrados em água de origem residual de diferentes tipos de indústrias, por exemplo refinarias de petróleo, fábricas de plástico, pesticidas, indústria química, e etc., [51]. O lançamento de águas residuais contendo esses compostos podem causar impactos negativos sobre os seres

humanos e os ecossistemas, diante disso, são classificados como contaminantes ambientais prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) [52]. Em virtude da alta toxicidade, mesmo em baixas concentrações, apresentam ameaças aos seres humanos e animais.

A exposição ao longo do tempo pode levar a dores de cabeça, diarreia, irritação da pele, anorexia e desconforto gastrointestinal, casos agudos de exposição são, em sua maioria, fatais podendo levar a danos no sistema nervoso, coração, rins e fígado [53]. A concentração em ambiente aquático deve ser extremamente baixa e limitada, a máxima permitida para fenol em águas potáveis estabelecida pela EPA é de $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ [54].

A fim de evitar o descarte inadequado do efluente, fração aquosa de pirólise, somada a possibilidade de recuperação e aproveitamento dos compostos de valor agregado, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologia para acompanhar a concentração desses analitos nessa matriz. Para isso, é importante que a técnica de análise utilizada possibilite a quantificação dos compostos.

1.5. Métodos de análise e caracterização da fração aquosa

Devido à grande variedade das biomassas utilizadas no processo de pirólise e principalmente a complexidade dos seus produtos, bio-óleo e fração aquosa, a caracterização é indispensável para determinar a sua composição e possíveis rotas de aplicação de seus constituintes em diversos setores industriais. Entre os compostos presentes na fração aquosa, os fenóis são de grande interesse para a indústria de química devido ao seu alto valor agregado. Para avaliar a composição e a concentração destes compostos algumas técnicas analíticas serão discutidas no decorrer deste trabalho.

A cromatografia gasosa com detector de massas (GC/MS) é a técnica mais utilizada para a caracterização, separação e determinação dos compostos presentes nos produtos de pirólise, neste caso a quantificação é realizada de forma individual para cada analito [9,55]. A cromatografia com fluido supercrítico é mais uma possibilidade discutida neste trabalho para a análise da fração aquosa de pirólise, além de não apresentar processos trabalhosos de preparo de amostra podendo ser feita a sua injeção direta, os analitos podem ser quantificados de forma individual como na cromatografia gasosa.

1.5.1. *Cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas*

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação de misturas complexas, sua junção ao espectrômetro de massas (MS) tinha inicialmente como principal aplicação a identificação de compostos para fins qualitativos, já que a análise quantitativa poderia ser realizada por detectores convencionais [56]. A combinação de técnicas cromatográficas com a detecção por espectrometria de massas (MS), altamente sensível e seletiva, permite simultaneamente a separação, identificação e quantificação de diferentes compostos, sendo reconhecida como uma técnica poderosa para a análise quantitativa [45]. A aplicabilidade da cromatografia gasosa estendeu-se em diversas áreas, além da química e petroquímica, análise ambiental, análise de alimentos e agricultura, investigação forense, toxicologia, bioquímica, entre outros.

Por ser a fração aquosa constituída majoritariamente por compostos fenólicos e ácidos de cadeia curta, a cromatografia gasosa com espectrômetro de massas (GC/MS) pode ser utilizada na separação e determinação desses compostos [9,55]. A tabela 3 apresenta trabalhos na literatura que utilizam da cromatografia gasosa para análise da composição da fração aquosa oriunda de diferentes biomassas. Apesar da característica polar compostos avaliados, as colunas utilizadas na maioria dos trabalhos citados na tabela 3 fizeram uso de fases estacionárias de baixa polaridade compostas por 5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano.

Tabela 3. Trabalhos da literatura que utilizam da cromatografia gasosa para a caracterização dos compostos orgânicos presentes em diferentes frações aquosas.

Biomassa	Técnica Analítica	Fase estacionária	Referência
<i>Jatropha Curcas</i>	GC/MS	5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano	Kanaujia et al. [57]
Palha de cana-de-açúcar	GCxGC/TOFMS	50%-fenil-50%-metilpolisiloxano e 5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano	Maciel et al. [2]
Carvalho	GC/MS	5%-difenil-95%-dimetilpolisiloxano	Mukarakate et al. [58]
Resíduo de azeite	GC/MS	100%-dimetilpolisiloxano	Pozo et al. [55]
Semente de Crambe	GCxGC/TOFMS	50%-fenil-50%-metilpolisiloxano e 5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano	Silva et al. [59]
Semente de mamona	GC/MS	50%-fenil-50%-metilpolisiloxano	Silva et al. [40]

Alguns poucos trabalhos da literatura também fazem o uso do GC/MS para a quantificação dos compostos presentes na fração aquosa. Sanches Filho et al., [9], com o intuito de desenvolver um método para quantificação de compostos fenólicos por GC/MS em fração aquosa de bio-óleo, fizeram em seu trabalho a comparação de dois métodos de preparo, onde, para isso eles avaliaram as concentrações de 10 analitos de interesse fazendo o uso de padrões analíticos. Em outro trabalho, Auersvald et al. [8], além de utilizarem da espectroscopia para quantificação de fenólicos totais, também utilizaram do GC/MS para a quantificação de cerca de 60 compostos presentes tanto na fração orgânica como na fração aquosa de diferentes bio-óleo, onde, dentre esses 60 analitos os fenóis estão presentes.

Apesar da possibilidade de caracterização dos compostos presentes na fração aquosa e a quantificação individual dos analitos, devido ao processo de extração prévia a análise no GC/MS, parte dos analitos deixam de ser quantificados em razão da saturação do solvente de extração associada com perdas nas etapas de evaporação do solvente [9].

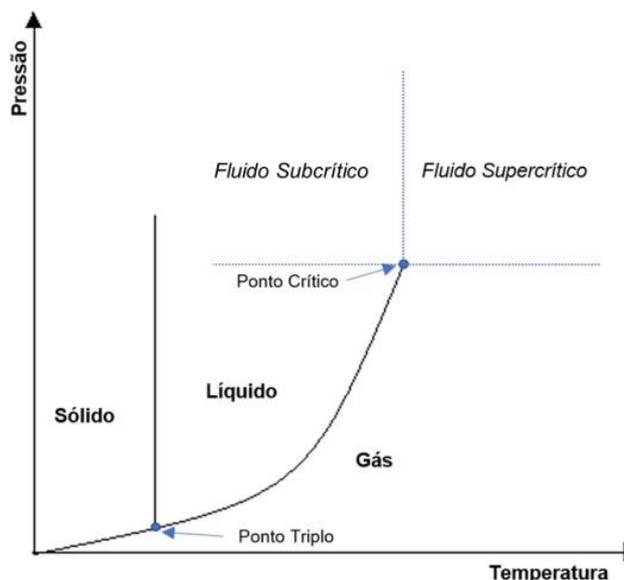
1.5.2. Cromatografia com fluido supercrítico

Tanto a cromatografia gasosa (GC) como a cromatografia líquida (LC) possuem vantagens e limitações particulares, sendo que ambas as técnicas são escolhidas de acordo com as características das amostras e analitos presentes, a cromatografia com fluido supercrítico surge então como uma técnica cromatográfica que une pontos fortes do LC e GC enquanto minimiza seus inconvenientes, fazendo uso do fluido supercrítico como fase móvel fundamentando-se em suas propriedades de baixa viscosidade e alta difusividade, responsáveis por melhorar a eficiência da coluna e reduzir o tempo de análise [60,61].

Os instrumentos atuais de cromatografia com fluido supercrítico são fundamentados em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC), sendo o segundo conhecido como um marco na história da cromatografia líquida, graças as fases estacionárias porosas com partículas menores que 2 μm que proporcionam análises ultrarrápidas, separações em alta resolução e equilíbrio mais rápido da coluna. Seguindo os princípios do UHPLC, temos a cromatografia com fluido supercrítico de ultra alta eficiência (UHPSFC), onde, a empresa Waters foi a responsável por desenvolver o primeiro instrumento completamente dedicado ao cromatógrafo analítico com fluido supercrítico de ultra alta eficiência, o Acquity Ultra Performance Convergence Chromatography (UPC²) [62,63].

Segundo a definição de Saito [64], o fluido supercrítico é um gás altamente comprimido que possui densidade semelhante à de um líquido. O diagrama de fases (figura 4), como o próprio nome diz, refere-se ao estado da matéria (sólido, líquido e gasoso) em que a substância se encontra a depender de suas condições de temperatura e pressão.

Figura 4. Diagrama de fases. Fonte: Baseado em Saito e Lesellier E West [64,65].



No ponto triplo a substância existe nas três fases, sólido, líquido e gasoso. A partir do ponto crítico, condição de mais elevada da temperatura e pressão, a substância encontra-se no estado supercrítico, na forma de um fluido, onde a densidade é semelhante à de um líquido, a viscosidade semelhante à de um gás e a difusividade entre as de um líquido e um gás. O CO_2 é o fluido mais utilizado por possuir temperatura ($31,1\text{ }^\circ\text{C}$) e pressão ($73,9\text{ Bar}$) crítica relativamente baixas, além de não ser tóxico, não-inflamável e ser de baixo custo [64].

Enquanto que na cromatografia líquida a fase móvel é formada por uma mistura de solventes, com viscosidade maior e sua difusividade menor que a dos gases, na cromatografia de fluido supercrítico a fase móvel é, em sua grande maioria, composta por dióxido de carbono em seu estado supercrítico, na maioria das vezes, com uma pequena porcentagem de modificador orgânico, sendo a viscosidade do fluido supercrítico muito menor do que de qualquer outro solvente orgânico, logo, o coeficiente de difusão dos solutos nesses fluidos são maiores do que nos solventes [66].

O CO_2 possui polaridade similar ao hexano e heptano, por isso, para a separação de substâncias polares faz-se, em sua maioria, o uso de modificadores orgânicos polares como metanol, etanol, acetonitrila e isopropanol afetando diretamente a polaridade da fase móvel, sua força de eluição, a solubilidade dos analitos e conseqüentemente a seletividade de separação [67]. Entretanto, quando um modificador orgânico é adicionado, as condições de pressão e temperatura para

atingir o estado supercrítico são alteradas, portanto o fluido pode se encontrar no estado subcrítico, mas o nome da técnica – Cromatografia com Fluido Supercrítico – é mantido por apresentar propriedades similares entre as fases móveis [60]. Nos casos em que uso do modificador orgânico é insuficiente na separação, aditivos polares, tais como, ácido fórmico e trifluoroacético, e bases, como hidróxido de amônio, são utilizados com o intuito de ampliar a faixa de polaridade dos compostos a serem analisados, potencializando o poder de solvatação da fase móvel. A presença de uma pequena quantidade de água como aditivo, assim como os ácidos e as bases, também tem influência sobre a separação e formato dos picos [68].

Em meio a tantas vantagens de se utilizar a cromatografia com fluido supercrítico como técnica de análise podemos destacar a redução no consumo de solventes orgânicos, tempos de análise mais curtos, efeitos matriciais reduzidos e principalmente a possibilidade de separações mais rápidas sem perder a eficiência [69]. Dentre suas possíveis aplicações podemos citar a análise de pesticidas, petróleo, polímeros, alimentos e fármacos, sendo o último sua maior área de aplicação [70,71]. Alguns poucos trabalhos da literatura abordam o uso da cromatografia de fluido supercrítico para amostras complexas oriundas do processo de pirólise, e nenhum deles referente ao desenvolvimento de método para quantificação de fenóis na fração aquosa de pirólise [11,72].

Crepier et al. [11] fizeram a caracterização da fase orgânica de bio-óleo utilizando SFC-(-) APCI-HRMS, inicialmente, analisando uma mistura de 36 compostos, em sua maioria fenóis, onde 9 deles foram detectados na amostra, mas a quantificação não chegou a ser realizada. Os poucos trabalhos relacionados a quantificação de fenóis utilizando SFC são referentes a polifenóis. Liu et al. [73] otimizaram e validaram um método para a separação de 9 de polifenóis por SFC-MS/MS, para a quantificação em extrato de alho por SFE, onde os autores conseguiram um quantificar 5 compostos, e concluíram que o método apresenta potencial para esse tipo de análise. Toribio et al. [74] também avaliaram a separação de 9 polifenóis usando SFC, mas desta vez aplicada a análise de uma matriz complexa, neste caso, o pólen de abelha, onde o método proposto foi aplicado com sucesso para determinação desses compostos e 4 deles que estavam presentes na amostra foram quantificados. Nenhum trabalho, até o presente momento, utiliza da cromatografia com fluido supercrítico de ultra alta eficiência para a quantificação de compostos fenólicos em fração aquosa de pirólise.

1.6. Validação do Método Analítico

A validação do método analítico é realizada afim de avaliar a capacidade do método desenvolvido em proporcionar resultados precisos para aplicação de rotina. O método precisa fornecer resultados de qualidade e confiabilidade adequadas, do contrário pode levar a sérias consequências, por exemplo, o estudo do efeito de novos medicamentos com resultados obtidos de maneira equivocada podem colocar em risco a vida dos pacientes [75].

Como consequência da importância da validação e os diferentes tipos de amostras a serem analisadas, várias diretrizes foram publicadas por instituições nacionais e internacionais, dentre elas estão a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) *Food and Drug Administration* (FDA) e a *Environmental Protection Agency* (EPA). A tabela 4 traz algumas dessas diretrizes de maneira resumida, as áreas mais comuns são análise farmacêutica, ambiental, toxicológica e de alimentos, a grande maioria não foi focada em determinar compostos específicos [76].

Tabela 4. Resumo das diretrizes de validação do método analítico. **Fonte:** Adaptada de Raposo e Ibelli-Bianco [76].

SIGLA	NOME DA ORGANIZAÇÃO	NACIONAL ou INTERNACIONAL	MATRIZ	ÁREA	ANO
AOAC	Associação de Comunidades Analíticas	Internacional	Analítico	Alimentos	2002
IUPAC	A União Internacional de Química Pura e Aplicada	Internacional	Analítico	Não especificado	2002
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária	Nacional	Analítico	Farmacêutica	2003
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária	Nacional	Biológico	Drogas	2003
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais	Internacional	Analítico	Metais, materiais de minérios	2011
EMA	Agência Europeia de Medicamentos	Internacional	Biológico	Drogas	2011
ISO 12787	A Organização Internacional para Padronização	Internacional	Analítico	Cosméticos	2011
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos	Nacional	Analítico	Farmacêutica	2016

Dentre os parâmetros, ou melhor, figuras de méritos fundamentais de validação comuns impostos pelas diretrizes estão: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

A seletividade é descrita como a capacidade do método analítico de

determinar um analito sem a interferência de outros compostos na matriz e está relacionada com a especificidade. Segundo González et al. [77] um método só é considerado específico quando for perfeitamente seletivo para o analito, como poucos métodos são específicos pode-se dizer que a seletividade é o melhor termo a ser usado na validação.

A linearidade está associada a relação linear entre as concentrações conhecidas do analito na amostra e a resposta do instrumento. A partir da construção de curva analítica são obtidos o coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (R^2), o primeiro coeficiente descreve a presença de uma relação linear entre as duas variáveis investigadas, o segundo avalia o ajuste do modelo, quanto o modelo foi capaz de explicar os dados [76].

A precisão pode ser avaliada através do desvio padrão relativo dos resultados de uma série de repetições. Ela deve ser expressa em termos de repetibilidade (medições no mesmo dia), precisão intermediária (medições realizadas em dias diferentes), e a reprodutibilidade (medições realizadas em laboratórios diferentes). A exatidão é a medida do quão o valor obtido se desvia do valor verdadeiro. A amostra analisada possui concentração conhecida e, posteriormente, é realizada a comparação entre os valores [78].

Com base na definição da resolução nº899 de 2003 da ANVISA [79], o limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito que pode ser detectado na amostra, mesmo que não seja possível ser quantificado. Em métodos instrumentais, a estimativa pode ser feita através da relação de 3 vezes o ruído da linha de base. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser determinada na amostra com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser estabelecido através da análise de soluções contendo concentrações decrescentes até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver método simples e rápido para a quantificação de fenóis presentes em diferentes frações aquosas de pirólise por cromatografia com fluido supercrítico.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar qualitativamente as classes de compostos orgânicos nas frações aquosas de pirólises de semente de uva, semente de goiaba, semente de acerola, semente de pinha, casca de pinhão manso e vagem de feijão por cromatografia gasosa/ espectrometria de massas (GC/MS);
- Desenvolver um método de análise para a quantificação de fenóis em frações aquosas de pirólise por GC/MS;
- Desenvolver método de análise direta para fenóis presentes nas frações aquosas por cromatografia com fluido supercrítico de alta ultra eficiência (UHPSFC);
- Quantificar por GC/MS e UHPSFC os fenóis presentes nas seis frações aquosas;
- Comparar as metodologias de análise por GC/MS e UHPSFC para a análise de fenóis em água de pirólise.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

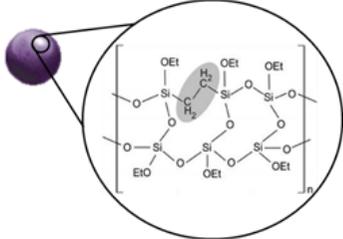
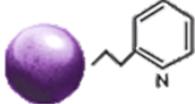
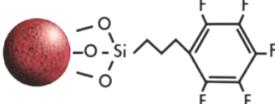
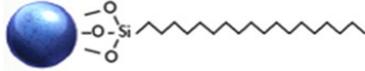
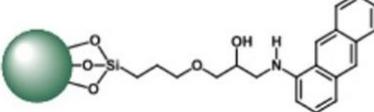
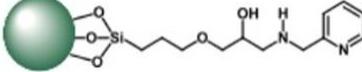
3.1. Reagentes

Os experimentos foram realizados utilizando os reagentes: diclorometano (Tedia, EUA; Vetec, Brasil ou Synth, Brasil), piridina (Pró-Análise), bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida + 1% trimetil-clorosilano (BSTFA + TMCS) (SUPELCO). Os padrões de fenóis utilizados foram bifenila (padrão interno), fenol, *o*-cresol, *p*-cresol, *m*-cresol, 4- etilfenol, 3,5-dimetilfenol, guaiacol, 2,5-dimetilfenol, 4-metoxifenol, *o*-catecol, resorcinol, 4-metilcatecol, 2,6-dimetoxifenol, eugenol (Sigma-Aldrich, Brasil). Para análise por GC/MS o gás hélio foi o gás de arraste com 99,99% de pureza e para a análise por UHPSFC-DAD o dióxido de carbono (CO₂) de pureza superior a 99% ambos adquiridos da WHITE MARTINS. Para as análises no GC/MS, três colunas foram utilizadas e estão listadas na tabela 5 e para as análises no UPC², as seis que foram utilizadas estão na tabela 6.

Tabela 5. Colunas utilizadas nas análises por GC/MS.

Colunas	Estrutura da Fase estacionária	Dimensões	Espessura do filme
SPB - 5	5%-difetil-95%-dimetilpolisiloxano	60 m x 0,25 mm	0,25 µm
Rtx - 1MS	100%-dimetilpolisiloxano	30 m x 0,25 mm	0,25 µm
ZB - Wax	polietilenoglicol	30 m x 0,25 mm	0,25 µm

Tabela 6. Colunas utilizadas nas análises por UPC².

Colunas	Estrutura da Fase estacionária	Dimensões	Tamanho de partícula
Bridged-Ethylene Hybrid (BEH)		2,1 x 100,0 mm	1,7 µm
Bridged-Ethylene Hybrid 2-Ethylpyridine (BEH 2-EP)			
Charged-Surface Hybrid Fluoro-pheny (CSH FPh)			
High-Strength Silica C18 (HSS C18)		2,1 x 50,0 mm	1,7 µm
Torus 1-Amino Anthracene (1-AA)			
Torus 2-picolylamine (2-PIC)			

3.2. Coleta e Preparo das Amostras de Biomassa

As amostras de sementes de uva (*Vitis vinífera L.*), goiaba (*Psidium guajava L.*), pinha (*Annona squamosa*) e acerola (*Malpighia emarginata*), além de cascas de pinhão (*Araucaria angustifolia*) e vagem de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) foram coletadas em diferentes localidades como mostra a tabela 7. Após a coleta foram encaminhadas ao Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP), Universidade Federal de Sergipe. As amostras foram separadas do resíduo e lavadas em água corrente para a remoção dos interferentes. Sendo secas em estufa com circulação de ar até a umidade inferior a 10%.

Tabela 7. Local de coleta das amostras e método de secagem.

Amostra	Local de Coleta	Secagem
Semente de uva	Vinícola Rio Sol. Lagoa Grande – PE	Na indústria
mente de goiaba	POMAR. Aracaju-SE*	60 °C/ 5 horas
ascas de pinhão	mercado público. Maringá-PR	
mente de pinha	Feira livre. São Cristóvão-SE	
mente de acerola	POMAR. Aracaju-SE*	60°C/ 24 horas.
Vagem de feijão	Feira Livre. Aracaju-SE	

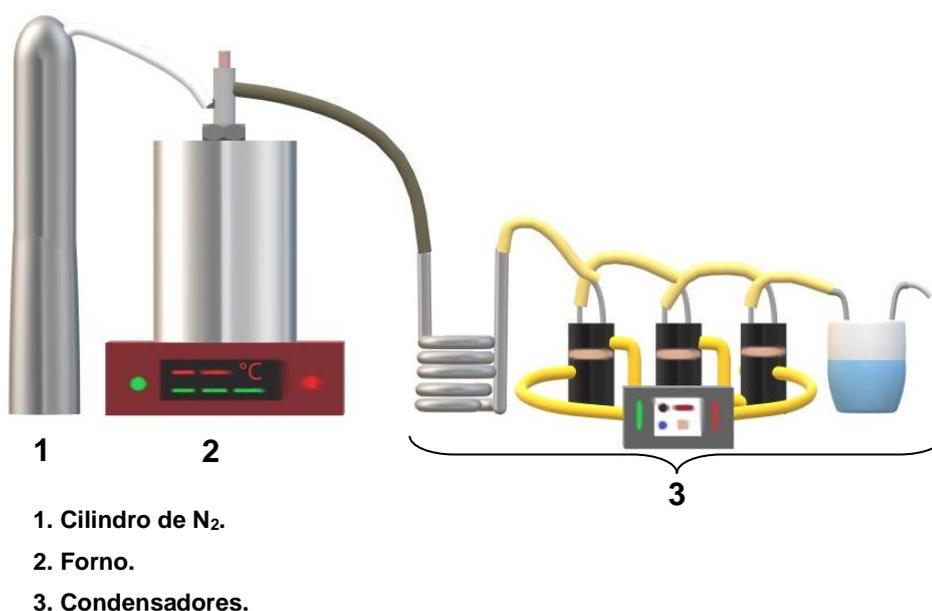
*Indústria de Processamento de Polpa de Frutas POMAR

3.3. Processo de pirólise

As pirólises das biomassas foram realizadas em um reator de aço inoxidável, com rosca concêntrica, resistente a 1200°C de temperatura, possuindo as seguintes dimensões: diâmetro interno 5,3 cm, diâmetro externo 6,6 cm e comprimento de 30 cm, usado para comportar a biomassa. O forno de modelo tubular, leito fixo, refratário, aquecido eletricamente da marca Therma de temperatura máxima de 1050°C.

A conexão foi realizada por tubos de aço inoxidável e uma zona de pré-resfriamento em formato de espiral (figura 5), onde ficou a maior quantidade de fração aquosa, ligado entre o reator e três espirais menores, refrigerados a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a coleta do bio-óleo. Ao final do sistema, foi colocado um cartucho (*trap*) com cerca de 1 g de carvão ativado para a coleta dos vapores. O nitrogênio (N_2) foi usado no sistema como gás inerte durante a pirólise. O banho termostático modelo MQBTC99-20, marca Microquímica Equipamentos LTDA, serviu para a refrigeração dos frascos coletores. O reator foi aquecido à 600°C . Logo após estabilizar a temperatura dentro do reator, cerca de 30g de biomassa foi introduzida, sob o fluxo de $5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de nitrogênio e permaneceu, com a temperatura constante, por 60 min até finalizar a pirólise.

Figura 5. Sistema de pirólise utilizado [27].



3.4. Análise das frações aquosas por GC/MS

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos extraídos da fração aquosa foi realizada por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC/MS), em um equipamento modelo QP2010 Plus da marca Shimadzu, utilizando hélio como gás de arraste (grau de pureza 99,995%).

3.4.1. Preparo da amostra (extração e derivatização)

Para a análise das amostras de fração aquosa por GC/MS, foi necessário inicialmente ser realizada uma extração líquido-líquido de 1 mL de amostra utilizando acetato de etila como solvente extrator (3x de 1 mL), o solvente foi escolhido com base no trabalho de Ren et al. [34]. Em seguida, o extrato foi transferido a uma coluna de sulfato de sódio anidro para a remoção de resquícios de água que possam ter permanecido após a extração. Após a remoção da umidade, 200 µL do extrato foram transferidos a um vial, onde foram adicionados 60 µL de piridina, 80 µL do derivatizante BSTFA + 1%TMCS (99:1) (N,O-bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida + 1% trimetil-clorosilano) e 20 µL do padrão interno bifenila (aproximadamente 22,8 mg.L⁻¹). A solução, em frasco fechado, foi homogeneizada em Vórtex colocada em banho de areia a 60°C, tempo de derivatização em 40 min na chapa aquecedora marca IKA® C - MAG HP7. O volume final da amostra foi de 1 mL em diclorometano.

3.4.2. Análise qualitativa das frações aquosas por GC/MS

Na análise qualitativa, a identificação dos compostos foi realizada através da comparação de seus espectros com os espectros apresentados nas bibliotecas (NIST e WILEY) do software do equipamento, onde apenas os picos que possuíram área acima de 0,10 e similaridade maior que 85% foram considerados, a tabela 8 apresenta as condições de análise.

Tabela 8. Condições cromatográficas das análises qualitativas no GC/MS.

Parâmetros	GC/MS
Coluna	SPB-5 – 5%-difenil-95%-dimetil polisiloxano (60m x 0,25 mm DI x 0,25 µm)
Split / Volume Injetado	1:20 / 1,0 µL
Temperatura do Injetor	280 °C
Temperatura do Detector	280 °C
Temperatura da fonte	250 °C
Programação da Rampa	80 °C (5 min), 2 °C min ⁻¹ – 105 °C (5 min), 2 °C min ⁻¹ – 150 °C (2 min), 10 °C min ⁻¹ – 280 °C (10 min)

Modo de operação do espectrômetro de massas Modo SCAN (varredura), com ionização por impacto de elétrons (70 eV)

Tempo de Análise 70 min

3.4.3. Otimização do método e quantificação dos fenóis por GC/MS

Após análise qualitativa, a otimização do método e quantificação dos fenóis presentes nas frações aquosas foi realizada utilizando o espectrômetro de massas no modo monitoramento do íon selecionado (SIM). Para garantir as melhores condições de análise dos fenóis nas amostras alguns parâmetros foram otimizados utilizando uma mistura de 13 padrões: fenol, o-cresol, p- cresol, m-cresol, 4-etilfenol, 3,5-dimetilfenol, guaiacol, 2,5-dimetilfenol, 4-metoxifenol, o-catecol, resorcinol, 4-metilcatecol e 2,6-dimetoxifenol. A quantificação das amostras foi realizada por padronização interna, utilizando padrão de bifenila. Os parâmetros avaliados foram: tempo de derivatização, fase estacionária e vazão da fase móvel.

Inicialmente, as três fases estacionárias que estão descritas na tabela 5 foram avaliadas, em seguida, a vazão da fase móvel que variou em 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 e 1,8 mL.min⁻¹, e por último, o tempo de derivatização, nas condições de análise presentes na tabela 9. Antes do tempo de derivatização, a influência do uso de derivatizante foi investigada. Os tempos estudados foram: 20, 30 e 40 min, na literatura trabalhos utilizam o BSTFA na temperatura de 60 °C em tempos de 30 [80] e 40 min [81].

Tabela 9. Condições cromatográficas para análises de fenóis por GC/MS.

Parâmetros	GC/MS
Split / Volume Injetado	1:20 / 1,0 µL
Temperatura do Injetor	280 °C
Temperatura do Detector	280 °C
Temperatura da fonte	250 °C
Programação da Rampa	80 °C (1 min), 5 °C min ⁻¹ - 135 °C (5 min), 3 °C min ⁻¹ - 150 °C (2 min), 5 °C min ⁻¹ - 200 °C (2 min), 10 °C min ⁻¹ - 280 °C (6 min)

Modo de operação do espectrômetro de massas	Modo SIM (<i>Selected Ion Monitoring</i>), ionização por impactos de elétrons (70 eV)
Tempo de Análise	50 min

3.5. Análise das frações aquosas por cromatografia com fluido supercrítico de ultra alta eficiência (UHPSFC)

As análises das frações aquosas por cromatografia com fluido supercrítico foram realizadas no Laboratório de Pesquisas Farmacêutica e Quimiometria (LabFarQui) – Unicamp, utilizando o cromatógrafo de convergência (UPC²) com injetor automático e sistema binário de bombeamento de fase, onde uma das bombas é exclusiva para o CO₂ e um detector de arranjo de diodos, tendo como software o Empower 2, adquiridos da empresa Waters Corporation.

Para determinar a melhor condição de análise foi realizada a otimização de alguns parâmetros que influenciam diretamente na separação: Fases estacionárias, vazão da fase móvel, modificador orgânico, diluente da amostra, temperatura, pressão e tempo de gradiente do modificador.

3.5.1. Parâmetros avaliados para a análise por cromatografia com fluido supercrítico de ultra alta eficiência (UHPSFC)

Foram avaliadas 6 fases estacionárias (tabela 6), 5 vazões diferentes da fase móvel, 4 modificadores orgânicos e 5 diluentes da amostra, exatamente nesta ordem. As vazões variaram em 0,6, 0,75, 0,8, 0,9 e 1,0 mL.min⁻¹. Os modificadores orgânicos foram MeOH:H₂O 95:5 (v/v), MeOH:H₂O 97,5:2,5 (v/v), MeOH 100% e MeOH:ACN 80:20 (v/v). Os diluentes testados foram H₂O 100%, Isopropanol:ACN 1:3 (v/v), H₂O:ACN 1:3 (v/v), H₂O:MeOH 1:20 (v/v) e H₂O:MeOH 1:50 (v/v). Todos esses parâmetros foram avaliados utilizando uma mistura de 14 fenóis (fenol, *o*-cresol, *m*-cresol, *p*-cresol, 2,5-dimetilfenol, 3,5- dimetilfenol, 4-metilcatecol, guaiacol, *o*-catecol, resorcinol, 4-etilfenol, 4-metoxifenol e 2,6-dimetoxifenol) a 100 mg.L⁻¹ preparada a partir de soluções estoque diluídas em acetonitrila.

A condição cromatográfica inicial para avaliar os parâmetros citados acima foi fluxo de 0,8 mL.min⁻¹, temperatura de 40 °C e pressão de 103 bar (1500 psi). O volume da solução dos padrões injetado foi de 1,0 µL, com um gradiente de

modificador linear variando de 0 a 20% de modificador em 10 minutos, mantendo a proporção CO₂:MeOH 80:20 por mais 1 minuto, retornando a porcentagem inicial de CO₂ em 2 minutos, com mais 5 minutos nessa condição para equilíbrio antes da próxima injeção, totalizando em 18 minutos de análise. As análises foram realizadas com varredura do comprimento de onda entre 200-400 nm, onde 220 nm foi definido como o melhor para a detecção dos compostos fenólicos.

3.5.2. Planejamento fatorial 2³

A fim de avaliar o efeito da densidade do fluido em relação as condições do método de análise, as variáveis pressão, temperatura da coluna e tempo do gradiente (até 18% de B), foi montado um planejamento fatorial 2³ desenvolvido utilizando o software Fusion QbD, obtendo como resposta número de picos com determinada resolução, fator de separação e tempo de retenção para o analito mais retido. O software Fusion além de nos dar o planejamento fatorial estruturado, incluindo a ordem aleatória de execução dos experimentos para a análise, permite a exportação e importação dos dados para o software Empower. A tabela 10 apresenta os níveis dos parâmetros avaliados.

Tabela 10. Parâmetros do planejamento fatorial 2³.

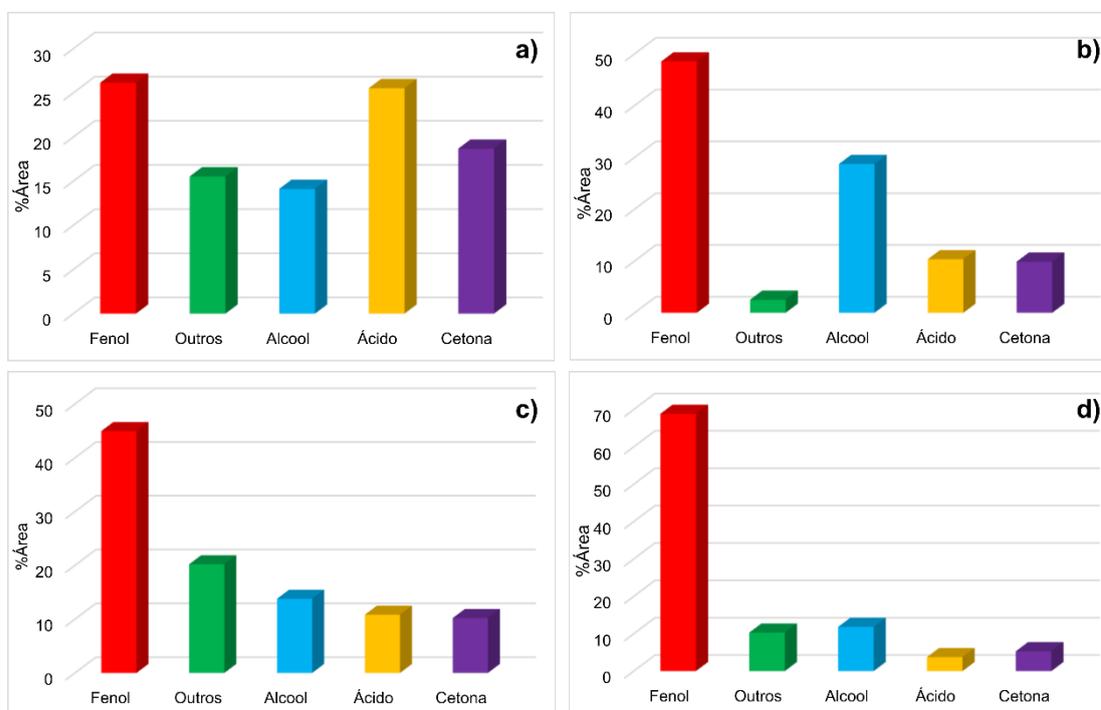
Parâmetros	Pontos Fatoriais		Ponto Central
Temperatura (°C)	+1 (50)	-1 (30)	0 (40)
Pressão (psi)	+1 (2250)	-1 (1750)	0 (2000)
Tempo de Gradiente (min)	+1(18)	-1 (7,2)	0 (12,6)

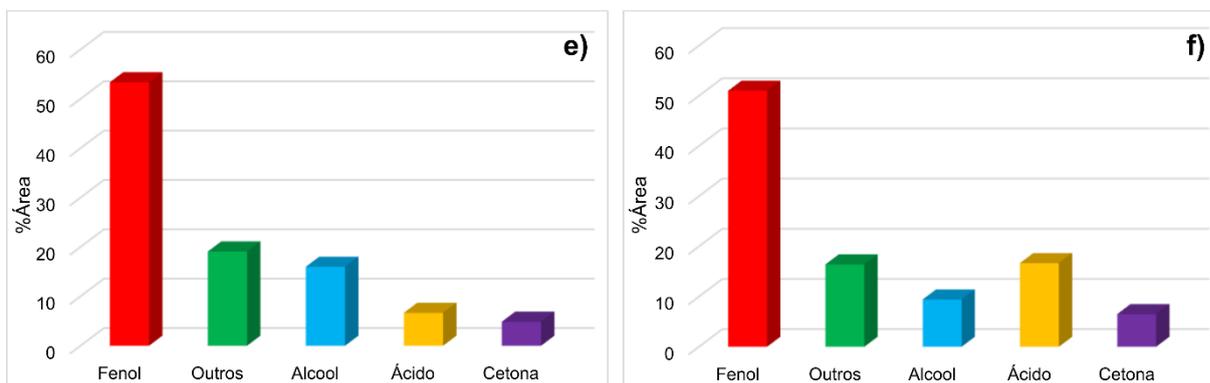
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises das frações aquosas de pirólise por GC/MS – Caracterização

A partir da análise por GC/MS foi possível avaliar a composição e classes de compostos orgânicos presentes com maior intensidade nas amostras de frações aquosas. A quantidade de picos identificados nas amostras ficou entre 15 e 30% dos picos cromatográficos presentes nos cromatogramas de corrente de íons totais (TICC), o restante que não foi identificado pois apresentaram baixa intensidade (abaixo de 0,10%) ou similaridade com o espectro de massas da biblioteca abaixo de 85%. No geral, a composição das frações aquosas de pirólise apresentou uma mistura de compostos onde estão presentes cetonas, ácidos, fenóis, nitrogenados, álcoois, compostos com funções mistas, etc. A figura 6 apresenta o perfil das amostras a partir de suas classes químicas.

Figura 6. Distribuição dos compostos por classe química nas frações aquosas das diferentes biomassas: a) vagem de feijão; b) semente de pinha; c) semente acerola; d) semente de uva; e) casca de pinhão; f) semente de goiaba.





Todas as frações aquosas possuem os fenóis como sendo a classe de compostos majoritários nas amostras. O percentual de área variou de 25% (vagem de feijão) em até quase 70% (semente de uva) dentre as outras classes de compostos. As frações aquosas de casca de pinhão, semente de goiaba e semente de uva apresentaram os maiores percentuais dentre as demais, acima de 50%. Este fato se deve ao maior teor de lignina em relação ao conteúdo de holocelulose presente na biomassa. Todas as frações aquosas apresentaram o *o*-Catecol como o principal componente das amostras.

Também foram encontrados compostos pertencentes à classe dos álcoois, ácidos e cetonas. Com relação aos compostos denominados como outros, são em grande maioria compostos com mais de uma função em sua cadeia, como por exemplo um grupo carboxílico e uma carbonila, ou compostos como açúcares, furanos e ésteres que estão em menor quantidade.

4.2. Otimização do método de análise por GC/MS.

A partir da caracterização das frações aquosas de pirólise, fatores que influenciam na análise dos fenóis: fase estacionária, vazão da fase móvel e tempo de derivatização, foram otimizados.

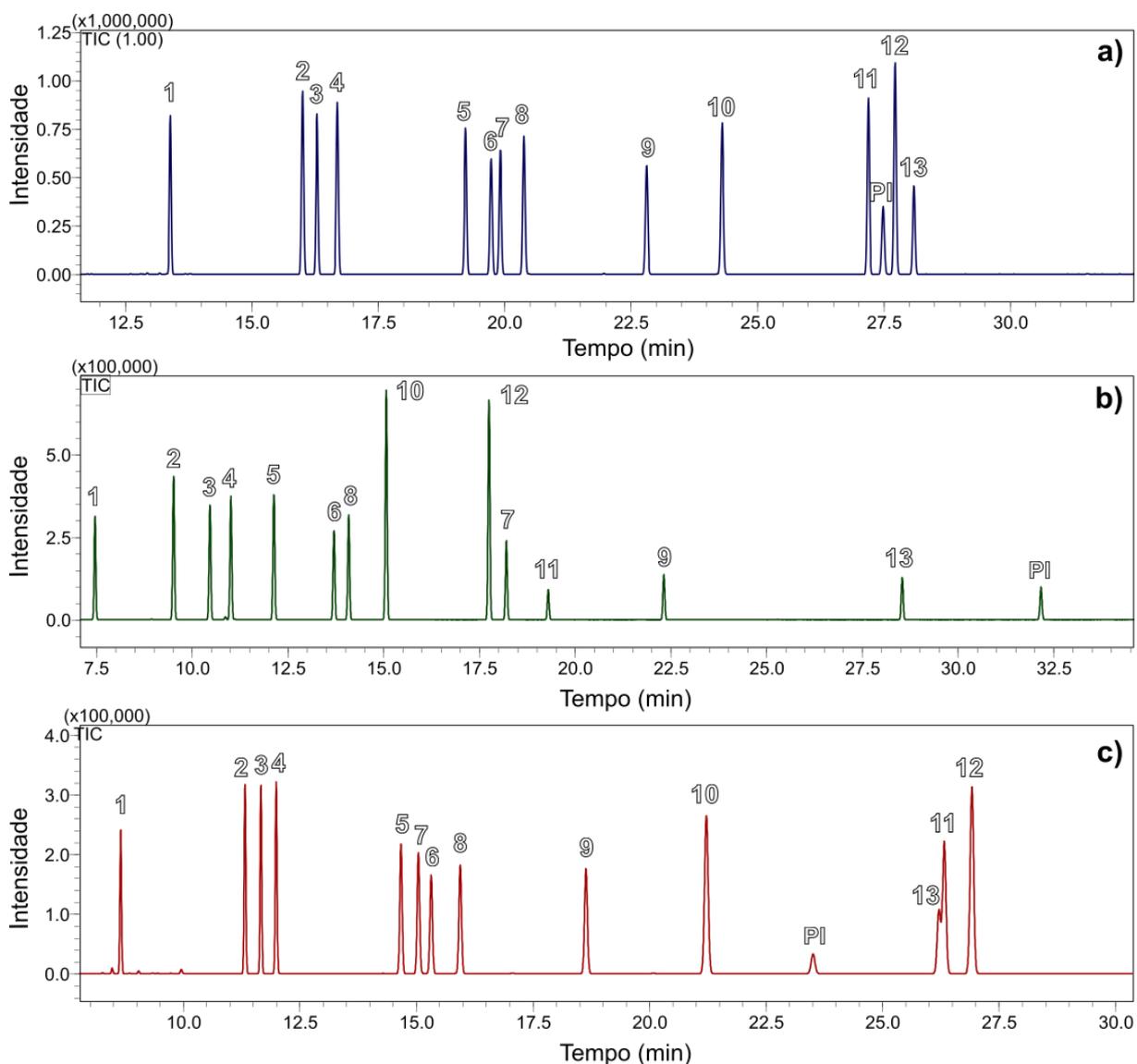
4.2.1. Seleção da fase estacionária

A otimização da fase estacionária (FE) não é um parâmetro comumente avaliado na cromatografia gasosa, entretanto, o presente trabalho busca otimizar os principais fatores que influenciam as análises. Três colunas capilares com fase estacionária constituída de filme líquido foram avaliadas. A FE 100% – dimetilpolisiloxano (Rtx-1MS) é apolar e pode ser utilizada para a análise de

solventes, produtos de petróleo, hidrocarbonetos saturados, entre outros. A 5% difenil – 95% dimetilpolisiloxano (SPB-5) também é apolar, mas em virtude da presença do grupo fenil, pode ser utilizada para a análise de pesticidas, alcaloides, e hidrocarbonetos aromáticos. A polietilenoglicol (ZB-Wax) foi a única de característica polar avaliada, ácidos graxos, FAMES e álcoois são exemplos de analitos que podem ser analisados ao utilizar essa FE.

Inicialmente, uma mistura dos padrões de fenóis foi injetada nas três colunas diferentes, cada uma teve sua programação de rampa de temperatura otimizada (apêndice 1) a fim de obter a melhor separação no menor tempo, na figura 7 estão os cromatogramas.

Figura 7. Cromatogramas com as programações das rampas de temperatura já otimizadas. Tempo total de análise: a) 50 min – SPB-5; b) 54,67 min – ZB-Wax; c) 62 min – Rtx-1MS.

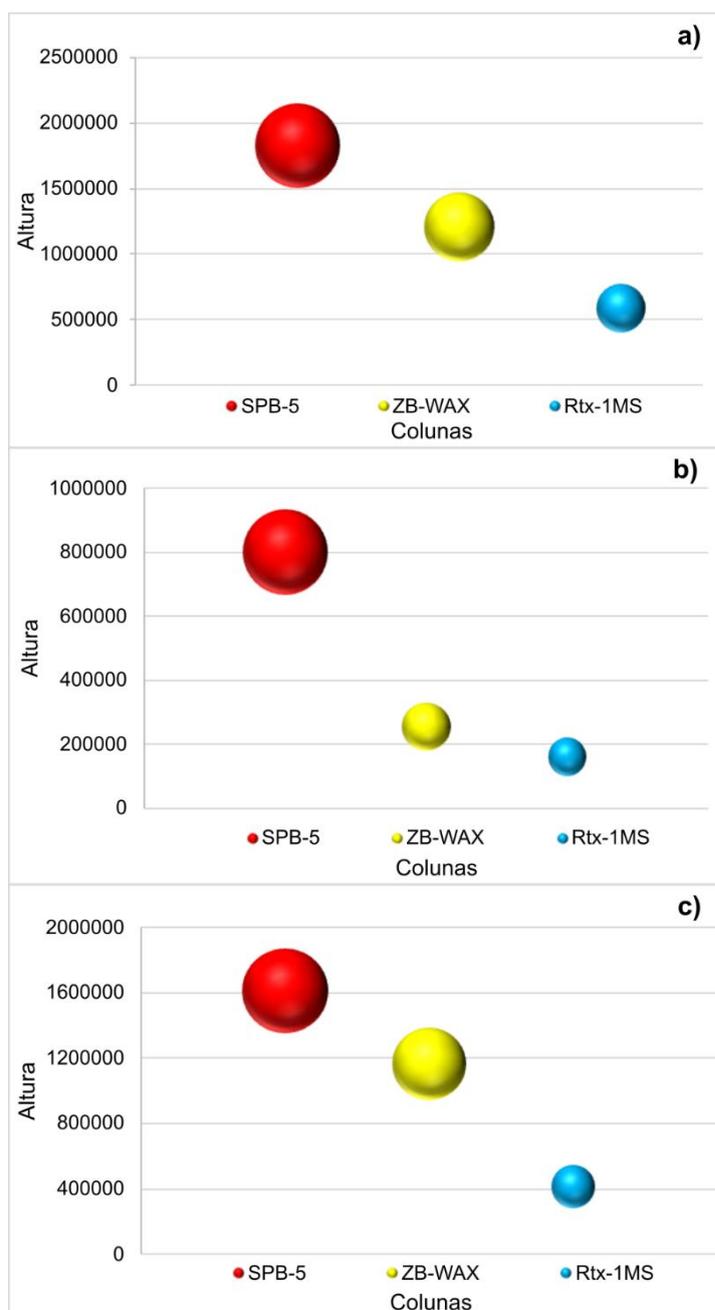


1: fenol; 2: *o*-cresol; 3: *p*-cresol; 4: *m*-cresol; 5: 2,5-dimetilfenol; 6: 3,5-dimetilfenol; 7: guaiacol; 8: 4-etilfenol; 9: 4-metoxifenol; 10: *o*-catecol; 11: resorcinol; PI: Bifenila; 12: 4-metilcatecol; 13: 2,6-dimetoxifenol.

A separação nas colunas de menor polaridade ou apolar ocorre baseada na velocidade dos analitos, estes tendem a eluir na ordem do ponto de ebulição, nas polares predominam as interações intermoleculares que ocorrem entre os analitos e os grupos polares das fases estacionárias [82]. No presente trabalho, a coluna mais polar (ZB-Wax) apresentou o maior tempo de eluição dentre as demais, o analitos saíram até 32 min. Já a Rtx-1MS apresentou tempo de eluição similar a SPB-5, mas um maior tempo de total de análise, além de uma coeluição que não foi possível de

ser resolvida variando apenas a rampa de temperatura. A fim de verificar a sensibilidade do método utilizando cada uma das colunas, a figura 8 expressa graficamente a variação da altura dos picos.

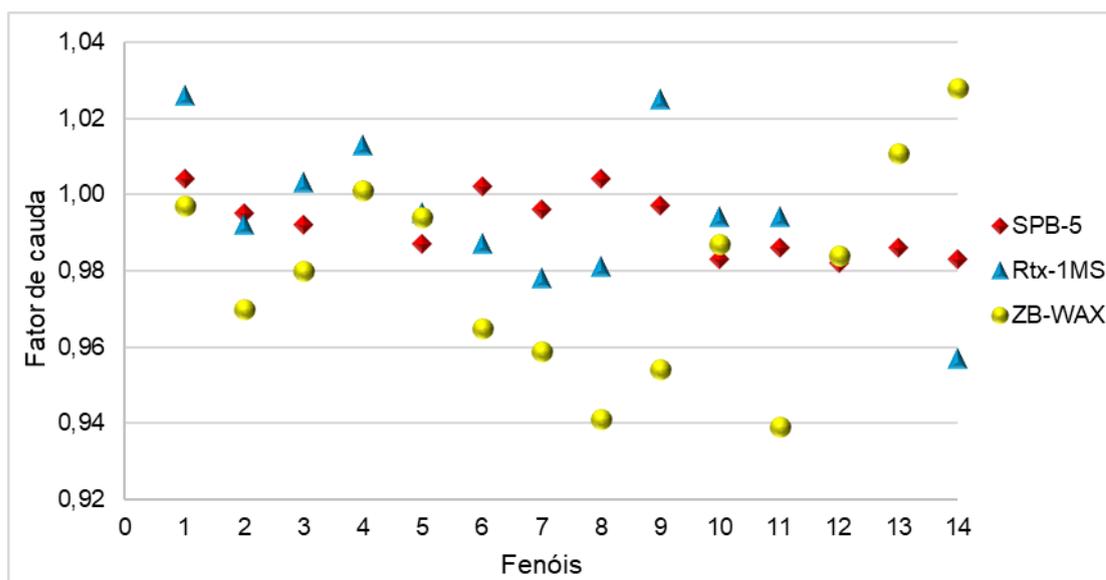
Figura 8. Altura dos picos nas três colunas. Os analitos estão divididos em classes: a) dihidroxifenóis ($R=OH$), b) metoxifenóis ($R=OCH_3$) e c) alquilfenóis ($R=CH_3$; CH_2CH_3).



Dentre as três colunas, a SPB-5 apresentou o menor tempo de análise, programação da rampa de temperatura mais rápida (apêndice 1). Foi possível notar

a diminuição na intensidade dos picos à medida que o tempo de análise aumenta, ZB-Wax e Rtx-1MS, respectivamente. Verificou-se que à medida que havia maior retenção dos compostos, o pico cromatográfico apresentava-se de forma mais larga e de menor intensidade. Apesar da eluição dos analitos de interesse não ter passado dos 32 minutos, as amostras de frações aquosas injetadas apresentaram compostos com tempos de eluição maiores que os fenóis, onde o tempo total de análise chegou até 62 min (Rtx-1MS). Com a finalidade de acrescentar na escolha da coluna, o fator de cauda para cada um dos analitos foi avaliado, como mostra a figura 9.

Figura 9. Fator de cauda referente aos 14 analitos investigados nas colunas: SPB-5, Rtx-1MS e ZB-Wax. Ordem: 1: fenol; 2: *o*-cresol; 3: *p*-cresol; 4: *m*-cresol; 5: 2,5-dimetilfenol; 6: 3,5-dimetilfenol; 7: guaiacol; 8: 4-etilfenol; 9: 4-metoxifenol; 10: *o*-catecol; 11: resorcinol; 12: Bifenila; 13: 4-metilcatecol; 14: 2,6-dimetoxifenol.



O fator de cauda está relacionado com a simetria do pico, quanto mais próximo esse valor for de 1 mais simétrico, conseqüentemente, picos com fator de cauda maior ou menor que 1 apresentam assimetria. No caso da figura 9, as colunas Rtx-1MS e ZB-Wax apresentaram instabilidade em seus valores de fator de cauda, que variaram de forma desordenada para cada analito. Já a SPB-5 mostrou-se mais estável e manteve seus valores em torno de 0,98 - 1,00 para a maioria dos picos. A SPB-5 foi a única FE testada que possui em sua estrutura grupos fenil, capazes de realizar interações π - π com os fenóis, apresentando um melhor desempenho dentre as demais colunas. Com base no que foi avaliado, a coluna SPB-5 foi então definida

para dar continuidade as análises.

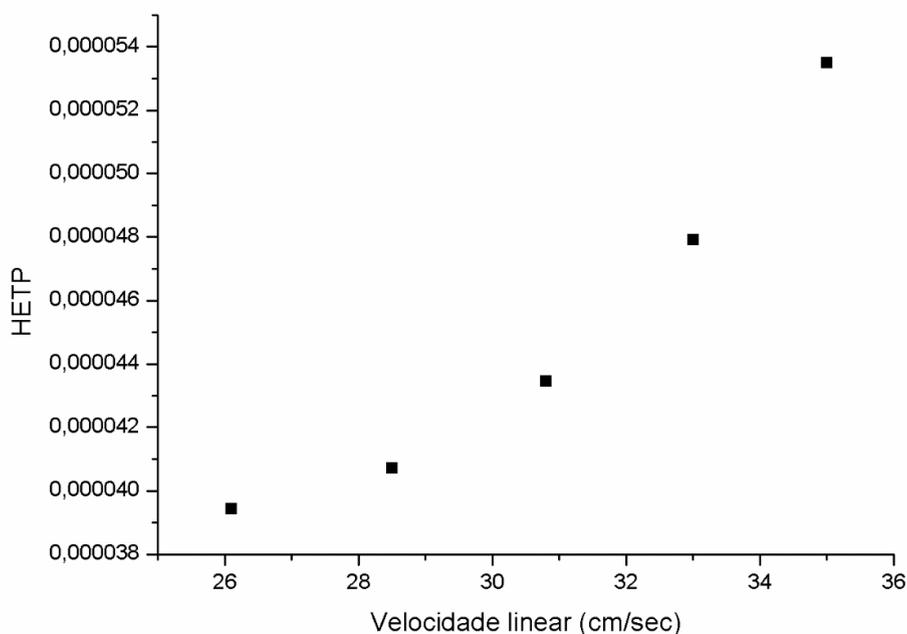
4.2.2. Vazão

Para avaliar as variações das vazões da fase móvel sobre a eficiência, o presente trabalho aplicou a teoria de van Deemter. Sua equação (Eq. 1) faz a relação da altura do prato teórico (H) – uma maneira de expressar a eficiência – em função da velocidade da fase móvel (μ), que varia juntamente com a vazão. O coeficiente A está relacionado com empacotamento da coluna, termo B é coeficiente de dispersão e o coeficiente C é o termo de transferência de massa.

$$H=A+B/\mu+C\mu \text{ Eq. (1)}$$

O gráfico de van Deemter é construído com a altura do prato teórico (H) em função da velocidade da fase móvel (μ). A figura 10 apresenta a curva de van Deemter para o analito mais retido, o 2,6-dimetoxifenol.

Figura 10. Curva de van Deemter para a coluna SPB-5 nas vazões de 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, e 1,8 mL.min⁻¹.

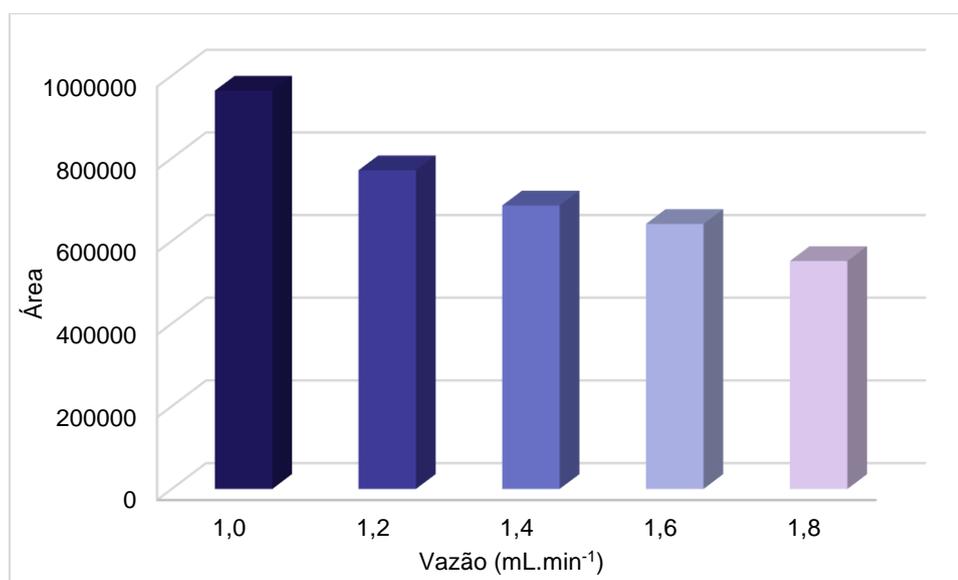


A relação da altura do prato teórico (H ou HETP) com a eficiência é inversamente proporcional, logo, quanto menor HETP maior será a eficiência. Neste trabalho, a menor vazão apresentou-se como a melhor entre as demais, a HETP

aumenta juntamente com a velocidade linear, apesar de não ser um aumento tão significativo ao olhar os valores do eixo y.

A sensibilidade também foi afetada com o aumento da vazão, à medida que a vazão aumenta, a sensibilidade diminui e a intensidade do sinal é reduzida gradativamente. A figura 11 apresenta a variação da área do analito mais retido (2,6-dimetoxifenol) à medida que a velocidade aumenta.

Figura 11. Área do 2,6-dimetoxifenol em cada uma das vazões.



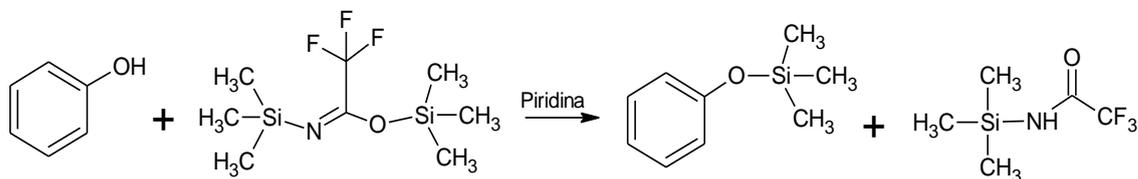
Apesar da figura 11 mostrar apenas a variação da área para o 2,6-dimetoxifenol, um comportamento semelhante foi observado para todos os outros analitos presentes na mistura de fenóis, a resposta do detector diminuiu com o aumento da vazão. Com base no que foi observado no gráfico de van Deemter e o efeito sobre a sensibilidade do método, a vazão de 1,0 mL.min⁻¹ foi definida para dar continuidade as análises.

4.2.3. *Uso do derivatizante*

A derivatização é realizada com o intuito de melhorar as propriedades cromatográficas dos analitos através da modificação de sua estrutura. Dentre as vantagens de utilizar agente derivatizante, conferir maior estabilidade térmica aos compostos a serem analisados é uma das principais [80]. O presente trabalho utilizou como derivatizante o BSTFA + 1%TMCS (bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida + 1% trimetil-clorosilano), onde, a reação de derivatização resulta na substituição do

hidrogênio da hidroxila pelo grupo trimetilsilil (figura 12).

Figura 12. Reação de derivatização do fenol com o BSTFA.



Inicialmente duas misturas de padrões de fenóis, derivatizados e sem derivatizar, foram injetados nas condições da tabela 9. Com a mudança na estrutura do analito, sua interação com a fase estacionária e ionização ocorrerá de maneira diferente, conseqüentemente tempo de retenção e o íon base obtido nos espectros de massa também mudam. A tabela 11 apresenta os tempos de retenção e os íons base de cada analito.

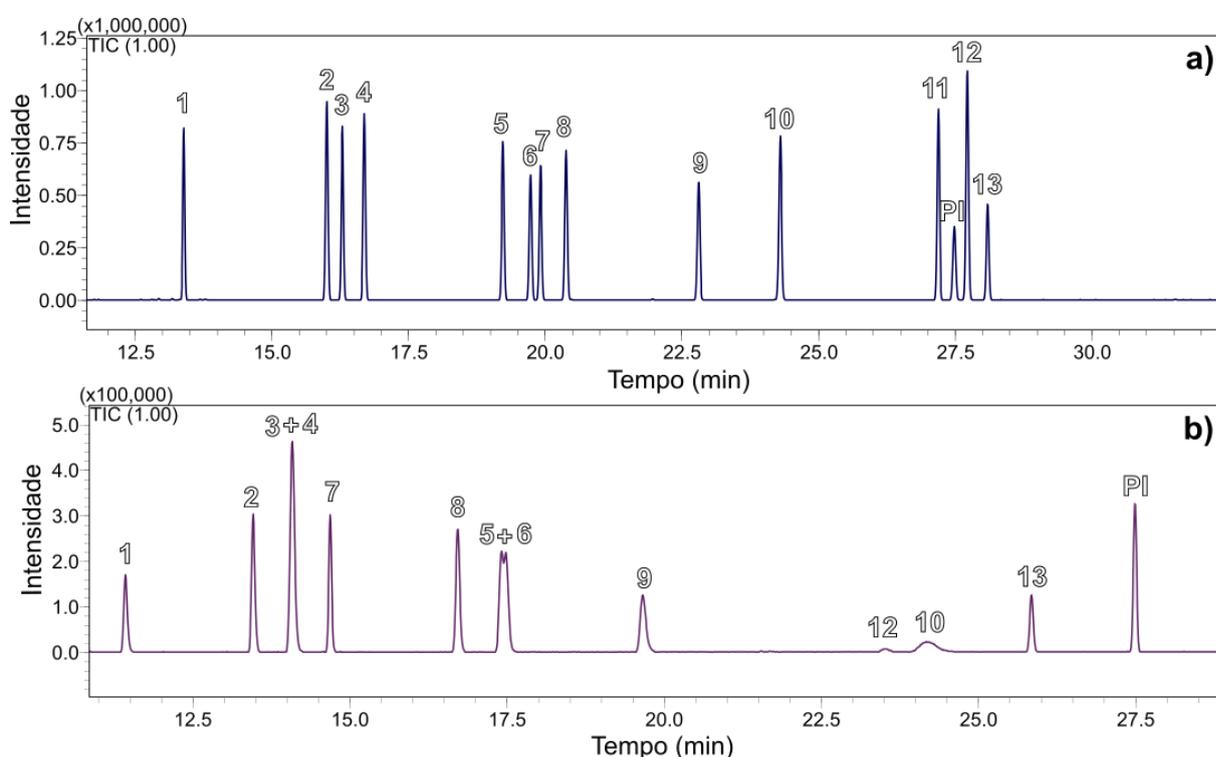
Tabela 11. Íons monitorados e tempo de retenção dos fenóis analisados por GC/MS.

Composto	Derivatizados		Não derivatizados	
	Íon (m/z)	Tempo de retenção (min)	Íon (m/z)	Tempo de retenção (min)
Fenol	151	13.390	94	11.426
<i>o</i> -Cresol	91	16.006	108	13.458
<i>p</i> -Cresol	165	16.290	107	14.080
<i>m</i> -cresol	165	16.692	107	14.080
2,5-Dimetilfenol	179	19.227	107/122	17.410
3,5-Dimetilfenol	179	19.731	107/122	17.478
Guaiacol	166	19.912	109	14.684
4-Etilfenol	179	20.383	107/122	16.713
4-Metoxifenol	181	22.805	109/124	19.657
<i>o</i> -Catecol	73	24.299	110	24.167
Resorcinol	73/239	27.191	110	-
4-Metilcatecol	73	27.722	124	23.493
2,6-Dimetoxifenol	196	28.095	154/139	25.839
Bifenila (PI)*	154	27.483	154	27.487

*(PI) Padrão Interno

No geral, a derivatização aumentou o tempo de retenção dos analitos, visto que o grupo trimetilsilil adicionado aumenta a massa do composto. A figura 13 apresenta dois cromatogramas resultantes das análises, em um deles a mistura dos padrões passou pelo processo de derivatização e outro não. A partir dos cromatogramas foi possível observar que a não derivatização resultou em uma diminuição no número de picos e nas suas intensidades.

Figura 13. Cromatogramas de padrões de fenóis com derivatização de BSTFA + 1%TMCS (a) e sem derivatizante (b).

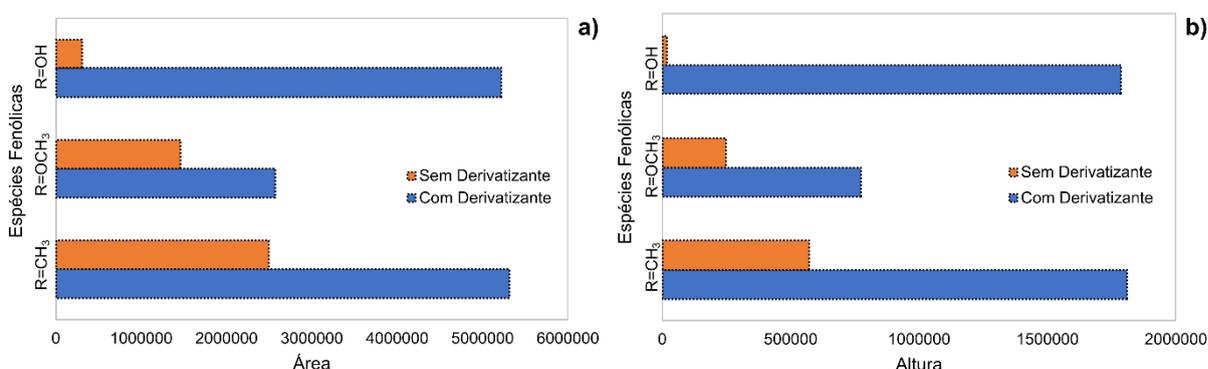


1: fenol; 2: *o*-cresol; 3: *p*-cresol; 4: *m*-cresol; 5: 2,5-dimetilfenol; 6: 3,5-dimetilfenol; 7: guaiacol; 8: 4-etilfenol; 9: 4-metoxifenol; 10: *o*-catecol; 11: resorcinol; PI: Bifenila; 12: 4-metilcatecol; 13: 2,6-dimetoxifenol.

No cromatograma sem derivatizante, a diminuição na quantidade de picos é resultado da coeluição entre alguns analitos: *p*-cresol com o *m*-cresol e 2,5-dimetilfenol com o 3,5-dimetilfenol. Ainda nesta condição, os dihidroxifenóis (4-metilcatecol e *o*-catecol) apresentaram a menor intensidade e área dentre os demais compostos, possivelmente, resultado da desidratação desses analitos, que pode começar já no injetor. Essas diferenças observadas entre os cromatogramas podem ser decorrentes da capacidade dos fenóis em formar ligações de hidrogênio, levando

a uma baixa volatilidade, estabilidade térmica insuficiente, ou induzir possíveis interações com o empacotamento das colunas, ocasionando uma baixa detectabilidade [81]. A derivatização melhora a detecção, principalmente em uma matriz complexa. A figura 14 expressa graficamente a diferença na área e altura dos compostos com e sem a derivatização, é possível observar o efeito sobre a detecção dos analitos.

Figura 14. Área (a) e altura (b) dos fenóis analisados com e sem derivatizante, divididos em classes: dihidroxifenóis (R=OH), metoxifenóis (R=OCH₃) e alquilfenóis (R=CH₃; CH₂CH₃).

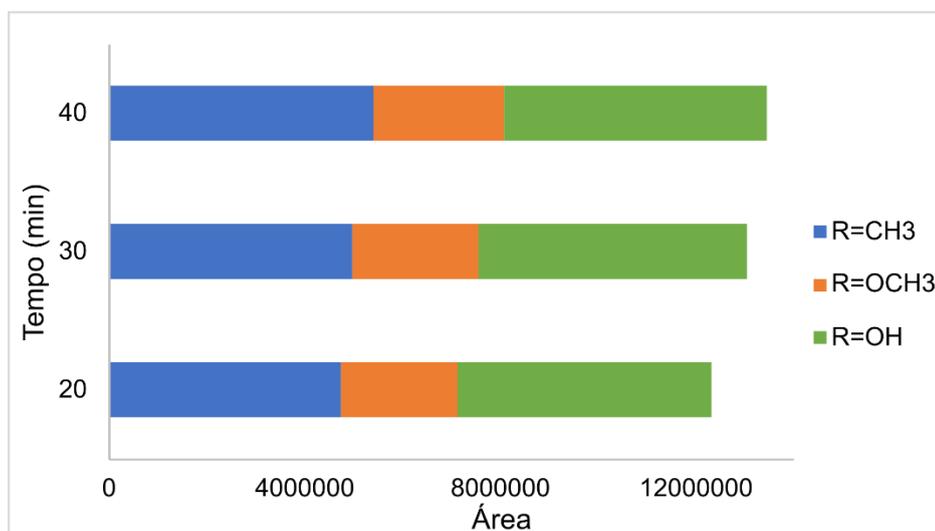


Apesar do custo elevado do agente derivatizante, poucos microlitros são utilizados nas reações, maiores são as vantagens adquiridas, como por exemplo a possibilidade dos analitos serem medidos com maior sensibilidade e mais facilmente separados de interferentes [83].

4.2.4. Tempo de derivatização

O processo de derivatização depende principalmente da temperatura e do tempo, o procedimento experimental deste trabalho foi adaptado de Santos et al. [27]. O tempo de derivatização dos analitos foi avaliado com o objetivo de verificar sua influência sobre esta classe de compostos em específico. As misturas dos padrões de fenóis foram então preparadas e derivatizadas conforme descrito na seção 3.4.1., o tempo de aquecimento na chapa variou entre 20, 30 e 40 minutos, seu efeito foi avaliado tendo como resposta a área dos compostos como mostra a figura 15.

Figura 15. Área dos analitos nos tempos de derivatização de 20, 30 e 40 minutos.



A partir do gráfico, pode-se observar que há um aumento da resposta analítica (área) à medida que o tempo de derivatização aumenta, uma maior quantidade de compostos são derivatizados. Depois de 30 minutos em reação na chapa de aquecimento haviam fenóis remanescentes, sem derivatizar, o que pode ser concluído com o aumento da área em 40 minutos. Apesar da pequena diferença na resposta de 30 para 40 minutos, o maior tempo de derivatização foi mantido a fim de evitar que alguns analitos não sejam derivatizados.

4.3. Avaliação das figuras de mérito para o método por GC/MS

Após a otimização dos parâmetros cromatográficos, neste trabalho as figuras de mérito avaliadas foram: Linearidade / intervalo / faixa de trabalho, Seletividade / limite de detecção e limite de quantificação. Embora a análise inicial tenha sido realizada com 13 padrões de compostos fenólicos, somente 10 deles foram validados e quantificados, os demais tiveram presentes em quantidade menores nas amostras, com percentual de área menor que 0,10%.

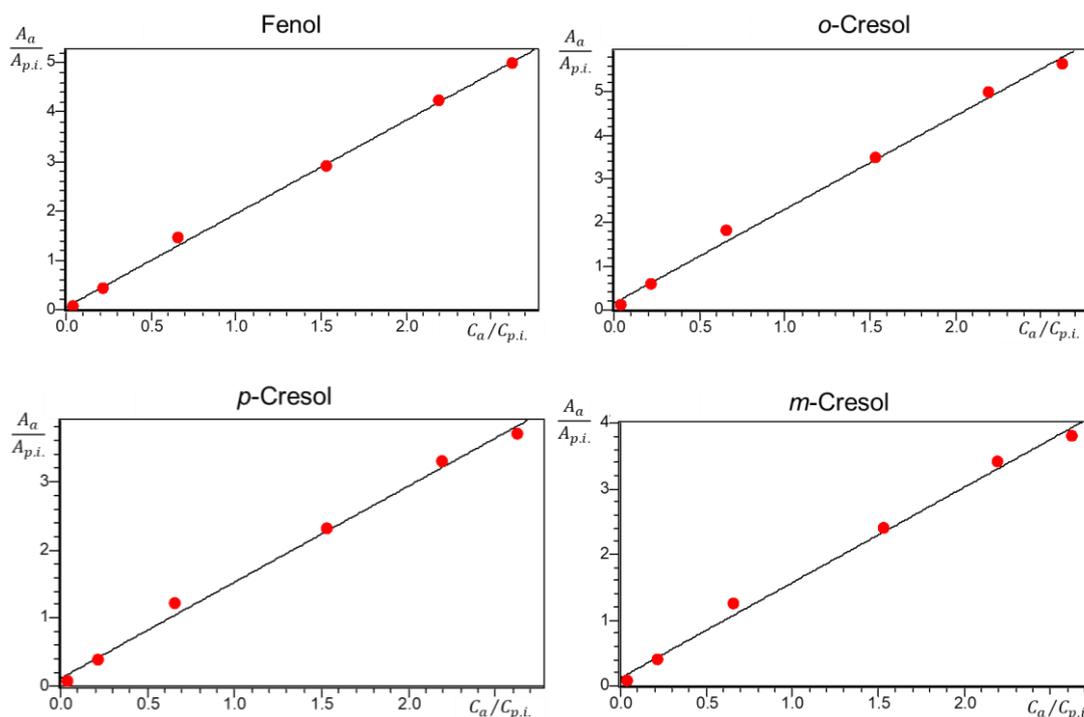
4.3.1. Linearidade e sensibilidade

A linearidade está relacionada com a capacidade da metodologia analítica obter resposta proporcional a concentração do analito na amostra, em um determinado intervalo [79]. Pode ser determinada a partir da curva analítica, através dos valores dos coeficientes linear e angular da reta, a relação linear é expressa,

geralmente, em termos de coeficiente de correlação (r) e determinação (r^2).

Para a construção das curvas analíticas, os padrões foram preparados em soluções estoque que variaram de 1000 à 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o solvente de diluição utilizado foi o diclorometano. As concentrações das curvas analíticas foram: 1; 5; 15; 35; 50 e 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e a concentração do padrão interno (P.I.) foi fixa em 22,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em triplicata ($n=3$) e para a construção das curvas foi utilizado o programa GC/MS solution Version 4.20 obtido da Shimadzu Corporation. Por ser utilizada a padronização interna, as curvas foram construídas a partir da relação analito / padrão interno: $A_a/A_{p.i.}$ versus $C_a/C_{p.i.}$, conforme a figura 16. A partir das curvas de calibração, as equações da reta e os coeficientes de correlação e determinação foram obtidos (tabela 12).

Figura 16. Curvas analíticas dos seguintes padrões de fenóis: Fenol, o-Cresol, p-Cresol, m-Cresol, 4-Etilfenol, Guaiacol, o-Catecol, Resorcinol, 4-Metilcatecol e 2,6-Dimetoxifenol.



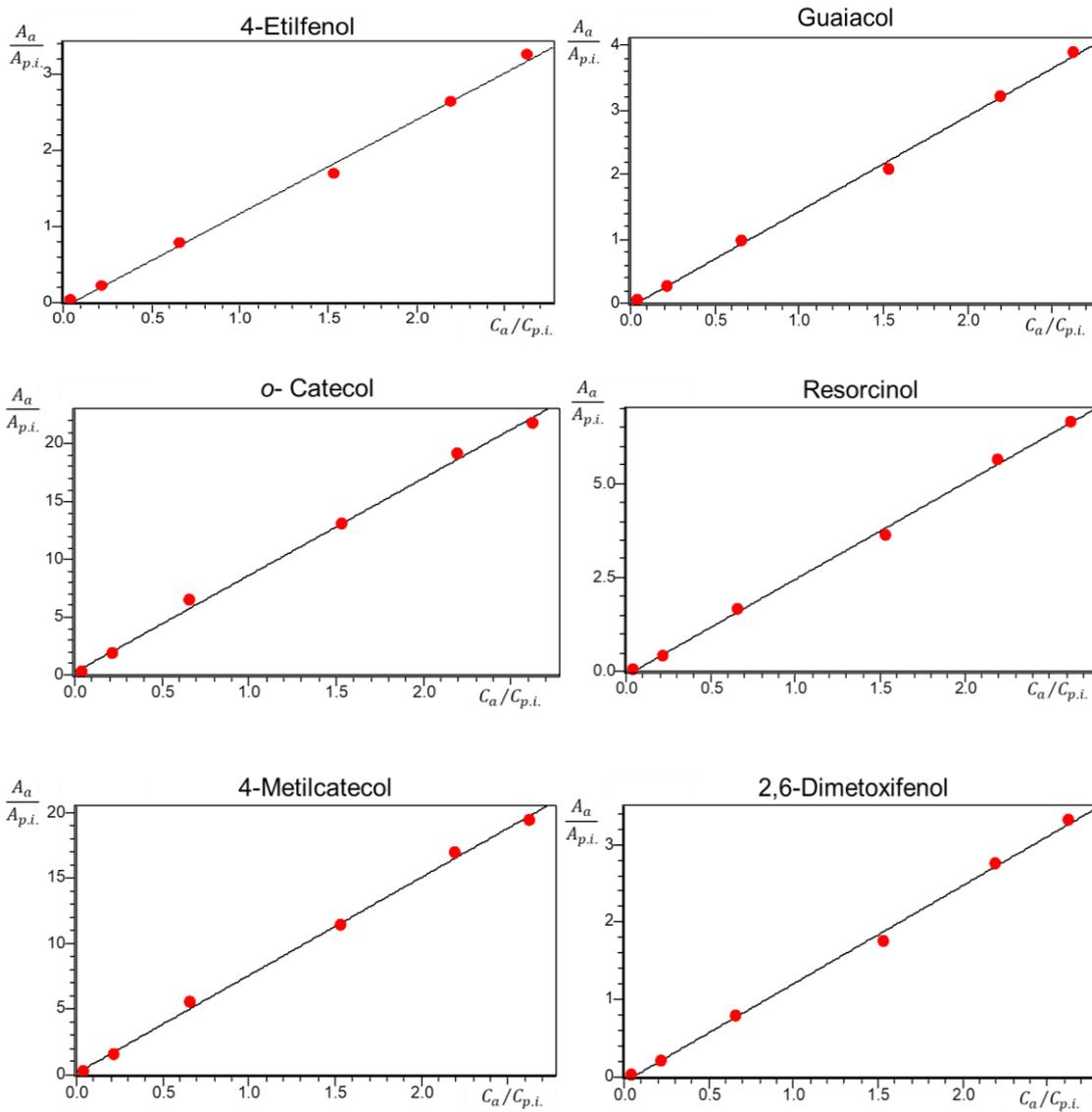


Tabela 12. Equações da reta, coeficiente de correlação (r) e determinação (r^2) dos fenóis avaliados.

	Analito	Equação da reta	r^2	r
1	Fenol	$y = 1,889x + 0,054$	0,999	0.999
2	o-Cresol	$y = 2,146x + 0,155$	0,995	0.998
3	p-Cresol	$y = 1,412x + 0,116$	0,994	0.997
4	m-Cresol	$y = 1,452x + 0,118$	0,994	0.997
5	4-Etilfenol	$y = 1,234x - 0,061$	0,997	0.999
6	Guaiacol	$y = 1,479x - 0,053$	0,998	0.999
7	o-Catecol	$y = 8,403x + 0,223$	0,997	0.998
8	Resorcinol	$y = 2,566x - 0,108$	0,998	0.999
9	4-Metilcatecol	$y = 7,484x + 0,112$	0,998	0.999
10	2,6-Dimetoxifenol	$y = 1,267x - 0,064$	0,997	0.999

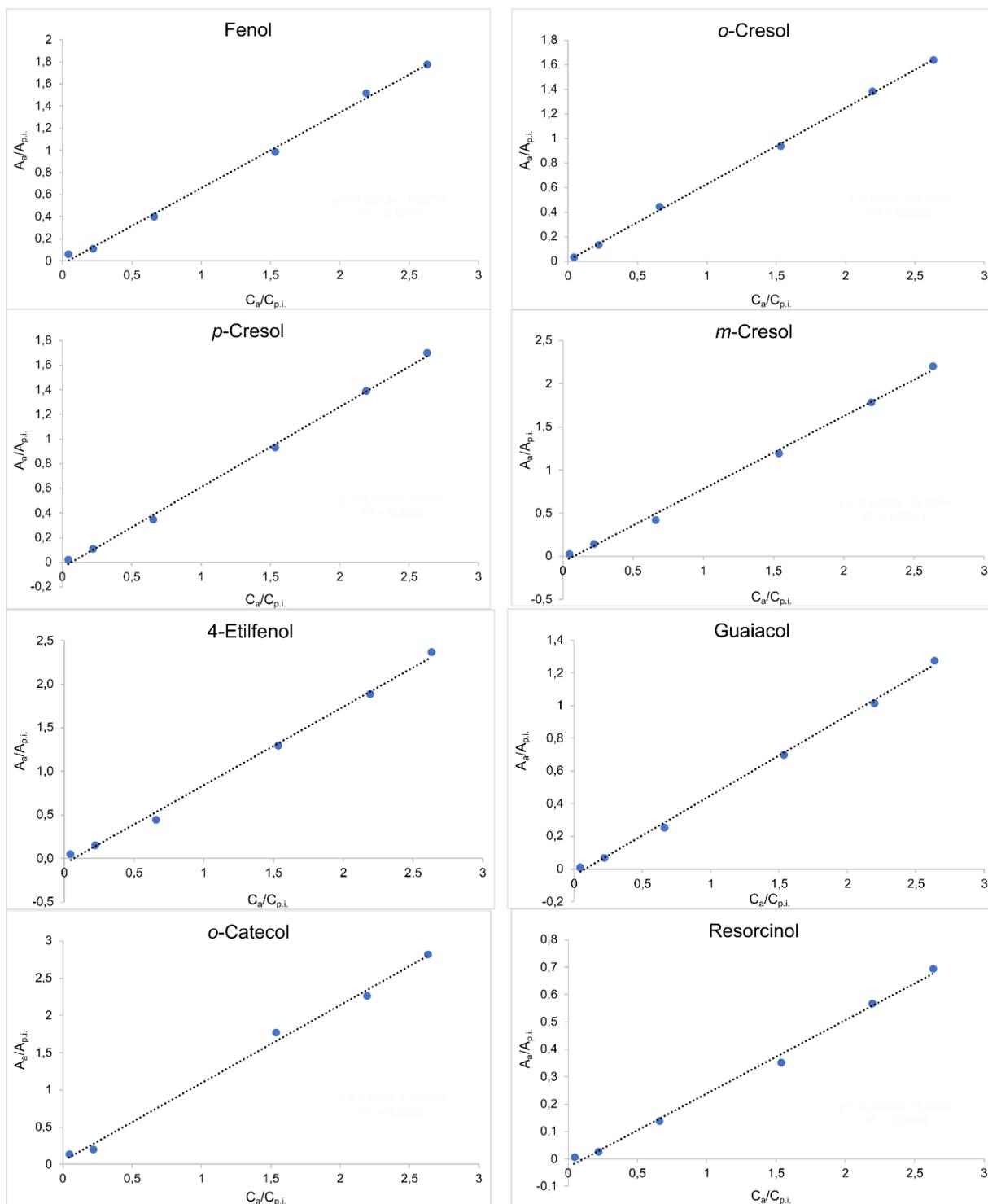
Considerando os valores estabelecidos pela ANVISA [79] e INMETRO [84], todas as curvas analíticas avaliadas na faixa de trabalho desse estudo estão dentro do critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação linear (r), que deve ser >0,99, indicando que há relação linear entre a concentração do analito na amostra e a resposta medida necessária para a quantificação. Ainda, partir das equações das retas, é possível observar que o 4-Metilcatecol e o o-Catecol são os analitos que apresentaram maior inclinação (coeficiente angular), logo, são os analitos com maior sensibilidade ao método.

4.3.2. Seletividade não específica (efeito matriz)

A seletividade é a capacidade do método em quantificar o analito na presença de outros componentes. A depender, os interferentes podem levar ao aumento ou redução do sinal, comprometendo o resultado. Sendo assim, por se tratar a fração aquosa de uma amostra complexa, a seletividade foi avaliada a partir do estudo do efeito matriz. Para tal, amostras de fração aquosa foram fortificadas com padrões de fenóis na mesma faixa de concentração que foi avaliada a linearidade, 1 a 60 μg .

mL⁻¹. A figura 17 apresenta as curvas analíticas preparadas na matriz e a tabela 13, as equações das retas, coeficiente de correlação e determinação, e RCA – razão dos coeficientes angulares – para as curvas preparadas no solvente e na matriz.

Figura 17. Curvas analíticas, preparadas na matriz, dos seguintes padrões de fenóis: (1) Fenol, (2) o-Cresol, (3) p-Cresol, (4) m-Cresol, (5) 4-Etilfenol, (6) Guaiacol, (7) o-Catecol, (8) Resorcinol, (9) 4-Metilcatecol e (10) 2,6-Dimetoxifenol.



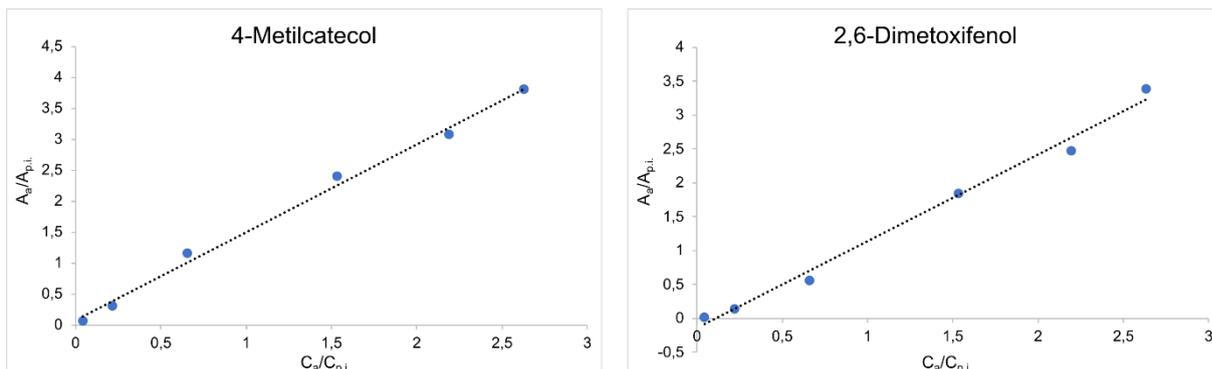


Tabela 13. Curvas solvente e matriz: Equações da reta, coeficiente de correlação (r) e determinação (r^2), e RCA – GC/MS. A ordem é: (1) Fenol, (2) o-Cresol, (3) p-Cresol, (4) m-Cresol, (5) 4-Etilfenol, (6) Guaiacol, (7) o-Catecol, (8) Resorcinol, (9) 4-Metilcatecol e (10) 2,6-Dimetoxifenol.

	Solvente	Matriz			RC A
	Equação da reta	Equação da reta	r^2	r	
1	$y = 1,889x + 0,054$	$y = 0,6833x - 0,0239$	0,997	0,999	0,36
2	$y = 2,146x + 0,155$	$y = 0,62x + 0,0079$	0,999	0,999	0,29
3	$y = 1,412x + 0,116$	$y = 0,6527x - 0,042$	0,998	0,999	0,44
4	$y = 1,452x + 0,118$	$y = 0,8436x - 0,0644$	0,997	0,999	0,58
5	$y = 1,234x - 0,061$	$y = 0,9001 - 0,0602$	0,996	0,998	0,73
6	$y = 1,479x - 0,053$	$y = 0,4887x - 0,0378$	0,998	0,999	0,33
7	$y = 8,403x + 0,223$	$y = 1,048x + 0,0438$	0,996	0,998	0,13
8	$y = 2,566x - 0,108$	$y = 0,2689x - 0,0306$	0,996	0,998	0,11
9	$y = 7,484x + 0,112$	$y = 1,4248x + 0,074$	0,994	0,997	0,19
10	$y = 1,267x - 0,064$	$y = 1,2824x - 0,1448$	0,990	0,995	1,01

As curvas preparadas a partir da fortificação da matriz também apresentaram valores dos coeficientes de correlação e determinação dentro do estabelecido pelas

agências reguladoras ANVISA [79] e INMETRO [84]. O efeito matriz foi avaliado a partir dos valores da razão dos coeficientes angulares (RCA). Para cada um dos analitos investigados, o valor de RCA menor que 1 indica um efeito matriz negativo, ou seja, houve uma redução na intensidade do sinal analítico quando preparados no extrato da fração aquosa em comparação com os que foram preparados no solvente. O *o*-Catecol, Resorcinol e 4-Metilcatecol foram os analitos que sofreram maior redução na intensidade do sinal dentre os demais, por possuírem maior número de hidroxilas em suas estruturas, podem interagir mais fortemente com os interferentes presentes na matriz. A fim de evitar equívocos na quantificação, as curvas analíticas preparadas na matriz serão utilizadas.

4.3.3. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Por fim, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir da curva analítica. O limite de detecção é a menor concentração do analito que pode ser detectada e o limite de quantificação é a menor concentração de análise do analito no método. A estimativa foi realizada a partir da curva analítica através das equações 2 e 3, onde s é o desvio padrão, neste trabalho, calculado no menor nível da curva analítica e b é o coeficiente angular. A tabela 14 traz os valores de LD e LQ em $\mu\text{g. mL}^{-1}$.

$$LD = \frac{3,3 \cdot s}{b} \quad (\text{Eq.2}) \qquad LQ = \frac{10 \cdot s}{b} \quad (\text{Eq.3})$$

Tabela 14. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos fenóis avaliados neste trabalho – GC/MS.

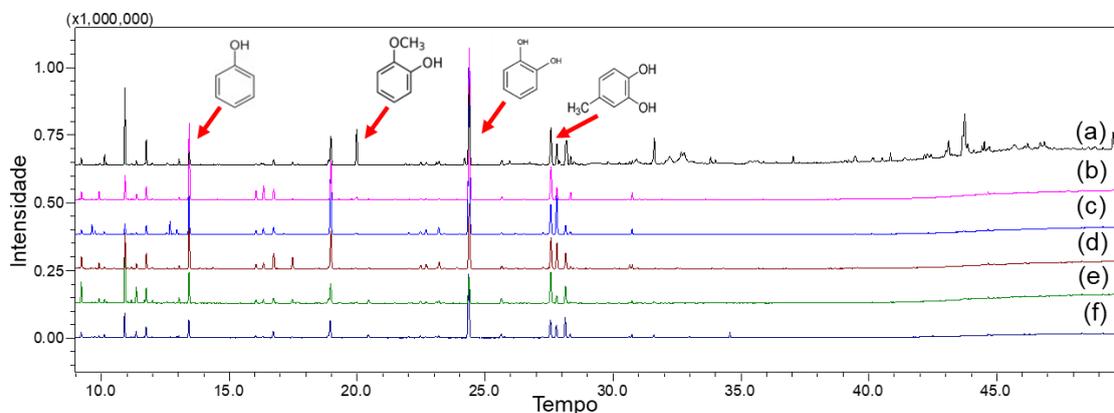
	LD ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)
Fenol	0,76	2,30
o-Cresol	0,27	0,81
p-Cresol	0,18	0,55
m-Cresol	0,19	0,56
4-Etilfenol	0,03	0,08
Guaiacol	0,19	0,56
o-Catecol	0,29	0,87
Resorcinol	0,18	0,54
4-Metilcatecol	0,05	0,16
2,6-Dimetoxifenol	0,04	0,12

Os valores dos limites de detecção variaram de 0,03 até 0,76 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, e os limites de quantificação de 0,08 até 2,30 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Quando comparados com os limites encontrados por Lazzari et al. [1] utilizando cromatografia líquida bidimensional, o presente trabalho chegou a LD e LQ mais baixos – com exceção do guaiacol – principalmente ao observar os valores do 4-metilcatecol, *o*-catecol, 4-etilfenol e o 2,6-dimetoxifenol. Sendo assim, podemos considerar os resultados como satisfatórios.

4.4. Análise quantitativa de Fenóis na fração aquosa de pirólise – GC/MS

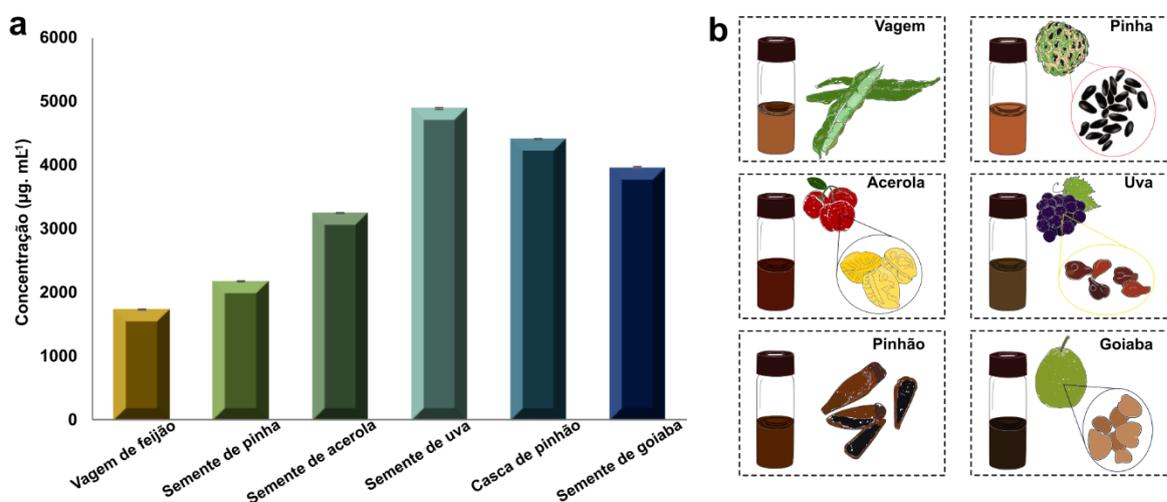
Após a avaliação das figuras de mérito, as seis frações aquosas estudadas neste trabalho foram analisadas em triplicata, e os principais monômeros de fenóis quantificados utilizando o modo de monitoramento do íon selecionado (SIM). A figura 18 apresenta o cromatograma referente as seis frações aquosas analisadas.

Figura 18. Cromatogramas obtidos por GC/MS para a análise das frações aquosas de pirólise: (a) semente de goiaba (b) casca de pinhão (c) semente de uva (d) semente de acerola (e) vagem de feijão e (f) semente de pinha.



Dentre os analitos que foram possíveis de serem identificados e quantificados estão o fenol, *o*-cresol, *m*-cresol, *p*-cresol, 4-etilfenol, guaiacol, *o*-catecol, resorcinol, 4-metilcatecol e 2,6-dimetoxifenol. A concentração total dos fenóis nas diferentes amostras variou de $1736 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $4892 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (no apêndice 3 encontram-se as concentrações de cada analito). A figura 19 apresenta um gráfico da concentração total dos fenóis quantificados nas seis frações aquosas.

Figura 19. Concentração total dos fenóis nas diferentes frações aquosas (a) e suas respectivas biomassas (b).



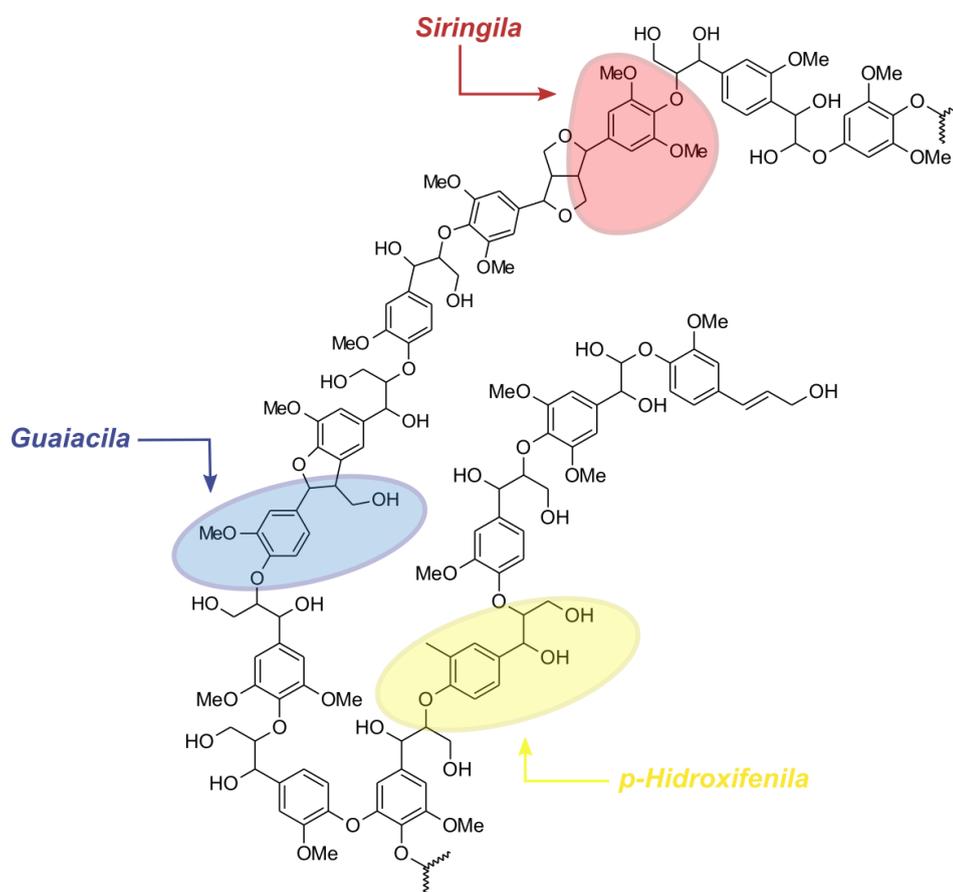
As frações aquosas de semente de uva, semente de goiaba e cascas de pinhão foram as que apresentaram uma maior concentração de fenóis quantificados,

seguidas da semente de acerola, semente de pinha e vagem de feijão. Essas diferenças estão relacionadas com a composição lignocelulósica das biomassas e suas reações de decomposição, sendo a lignina considerada como a principal fonte de formação de compostos fenólicos durante a pirólise [14]. A composição de lignina na vagem de feijão é a menor que nas demais biomassas, com 7,31% [27], o que explica a baixa concentração de fenóis encontrados, enquanto a alta concentração na semente de uva é resultado do alto teor de lignina presente em sua composição, cerca de 44%, como encontrado na literatura [30].

Entretanto, se olharmos para a semente de goiaba, seu percentual de lignina na tabela 1 é de 7,6% [31], mas ainda assim sua fração aquosa apresenta uma grande quantidade de fenóis. Segundo Collard E Blin [12], que em seu artigo de revisão abordaram a respeito das reações que ocorrem com os componentes da biomassa, na faixa de 400 a 600°C há uma diminuição nos anéis de furanos, estes oriundos da degradação da celulose, e aumento nos anéis de benzeno que são substituídos por grupos alifáticos ou oxigenados remanescentes (hidroxila e éter), contribuindo para formação de fenóis. Sendo assim, na faixa de temperatura em que foi realizada a pirólise neste trabalho, a celulose pode ser considerada como uma grande contribuinte para formação de compostos fenólicos, onde a biomassa de semente de goiaba apresenta o maior percentual dentre as demais, cerca de 60,6% [31].

A concentração das espécies fenólicas, no produto líquido da pirólise, depende da formação estrutural da lignina em cada biomassa, e a proporção em que estão distribuídas as unidades de p-hidroxifenila, guaiacil e siringil que a compõe [15]. A figura 20 apresenta uma estrutura representativa da lignina e como suas unidades – em destaque – podem estar distribuídas.

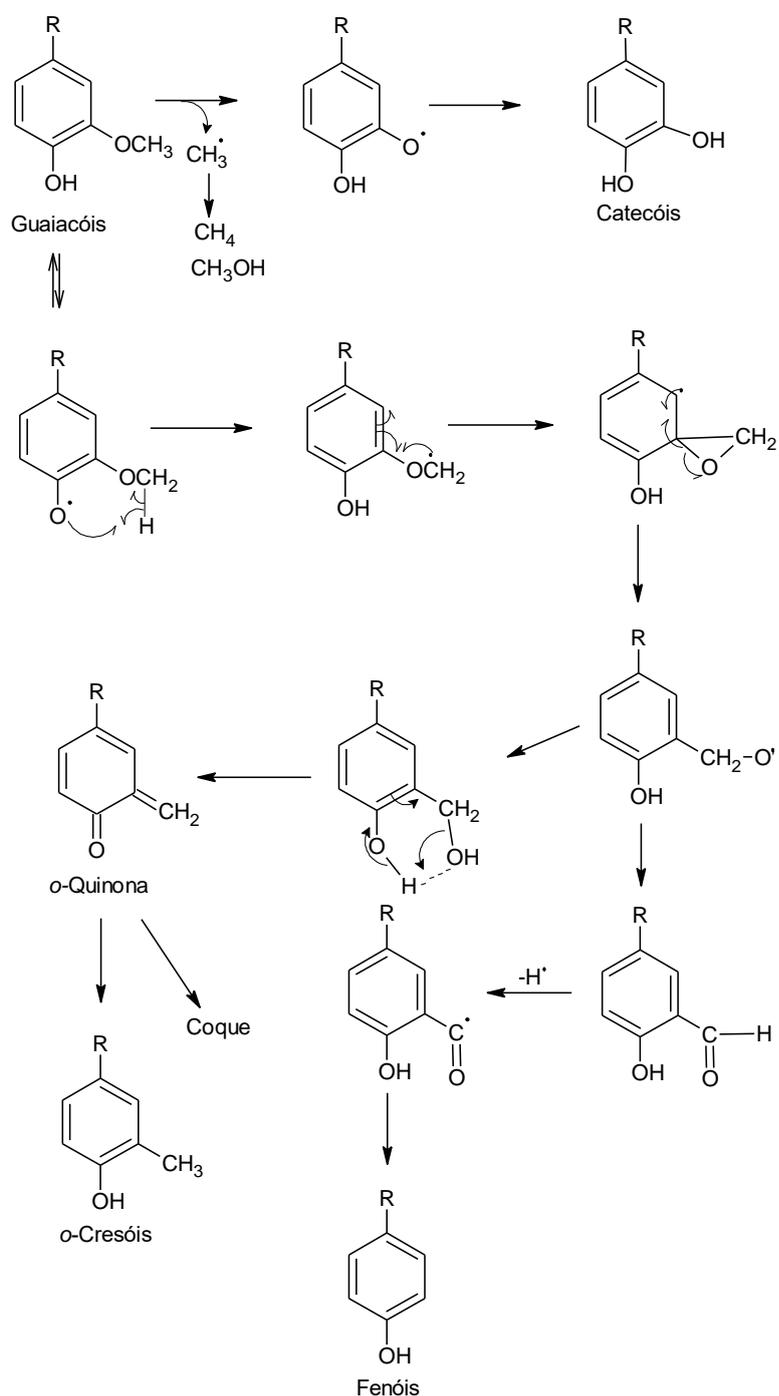
Figura 20. Estrutura da lignina e suas principais subunidades – p-Hidroxifenila, Guaiacil e Siringil. **Fonte:** Adaptado de Amidon et al., [85].



Durante o processo de pirólise, as unidades Guaiacila (G), Siringila (S) e p-Hidroxifenila (H) são responsáveis pela formação de guaiacóis, siringois e aquilfenóis, respectivamente. Em alguns casos, os compostos formados a partir da p-Hidroxifenila são majoritários no produto líquido da pirólise, resultado das reações de desmetoxilação que as unidades de S e G sofrem durante a degradação térmica da lignina, convertendo-se em unidades de H [86].

Reações secundárias podem ocorrer com os produtos da degradação das unidades da lignina, Kawamoto [87] em seu artigo de review (Lignin pyrolysis reactions), propôs possíveis rotas de reações que ocorrem com os fenóis durante o processo de pirólise e mudam a substituição de anéis aromáticos, acredita-se que a partir do guaiacol podem formar outras espécies fenólicas como catecóis, cresóis e o próprio fenol. A figura 21 abaixo mostra suas possíveis rotas de conversão.

Figura 21. Possíveis mecanismos para a conversão do guaiacol, em catecóis, cresóis e fenol, durante a pirólise. **Fonte:** Adaptado de Haruno Kawamoto [87].



As frações aquosas das seis biomassas apresentaram diferentes proporções quanto ao teor de compostos com grupos alquil (fenóis), metoxi (guaiacol e siringol) e dihidroxi (catecóis). A tabela 15 traz as concentrações dos fenóis divididas em subclasses.

Tabela 15. Concentrações dos fenóis divididas em subclasses: fenóis (fenol, *o*-cresol, *p*-cresol, *m*-cresol e 4- etilfenol), dihidroxifenóis (*o*-catecol, 4-metilcatecol e resorcinol), guaiacol (2- metoxifenol) e siringol (2,6-dimetoxifenol) nas seis frações aquosas.

	Concentração ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)					
	Feijão	Pinha	Acerola	Uva	Pinhão	Goiaba
Fenóis	847,8 \pm 0,1	750 \pm 2	1323 \pm 1	976 \pm 1	1623,5 \pm 0,1	511 \pm 1
Dihidroxifenóis	732,3 \pm 0,4	1288 \pm 10	1868 \pm 5	3827 \pm 14	2699 \pm 3	2142 \pm 16
Guaiacol	73,85 \pm 0,01	58,059 \pm 0,001	54,67 \pm 0,02	89,6 \pm 0,1	97,22 \pm 0,01	993 \pm 3
Siringol	82,355 \pm 0,003	80,64 \pm 0,03	***	***	***	313,2 \pm 0,1
Total	1736,4 \pm 0,5	2176 \pm 12	3245 \pm 6	4892 \pm 15	4419 \pm 3	3959 \pm 20

As frações aquosas de uva, pinhão e goiaba apresentaram as maiores concentrações de Dihidroxifenóis, sendo esta, a subclasse que é maioria em todas as amostras, com exceção da obtida a partir da vagem de feijão, que possui os Fenóis como majoritários. A fração aquosa de goiaba destaca-se por ter o Guaiacol em grande quantidade, cerca de 993 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, nas demais sua concentração não chegou a 10% deste valor. As frações aquosas de pinhão e acerola possuem a maior concentração de Fenóis dentre todas as outras, em torno de 40% de sua composição. É notório a variação das classes dos fenóis em cada uma das frações aquosas, mas é possível observar, exceto na acerola e no pinhão, que quando há um aumento na concentração de Dihidroxifenóis diminui a quantidade de Fenóis, resultado da composição estrutural da lignina, das séries de quebras e reações ocorrem dentro do sistema, e de reações secundárias em que alguns compostos podem ser convertidos em outros.

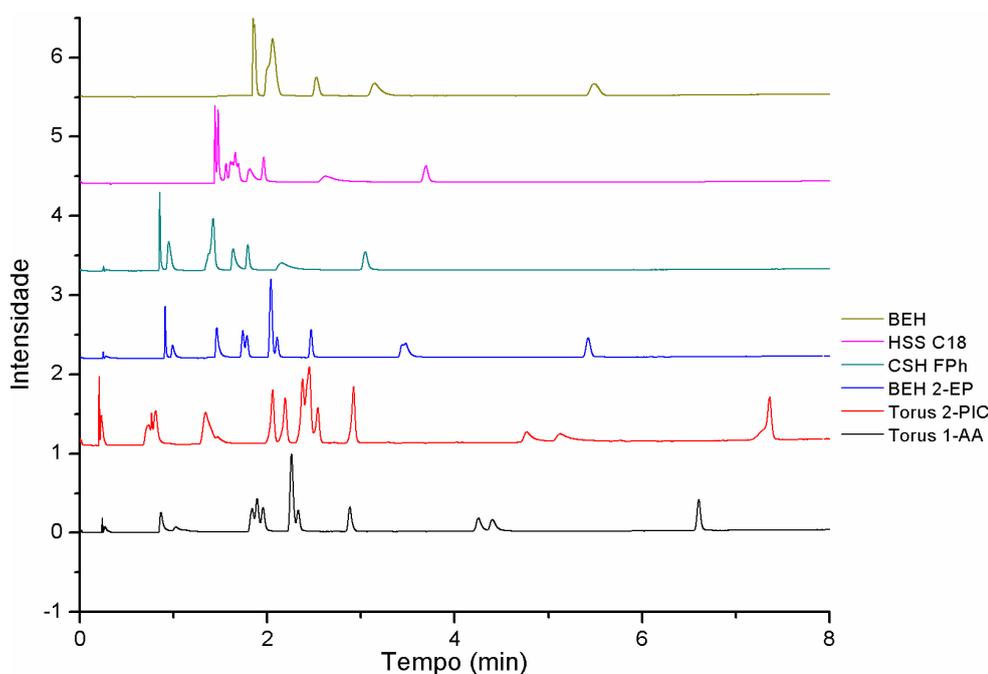
4.5. Desenvolvimento do método de análise por UHPSFC

A otimização dos parâmetros cromatográficos é essencial para o desenvolvimento do método, na cromatografia com fluido supercrítico não é diferente. Os fatores que mais influenciam a retenção e separação na cromatografia com fluido supercrítico são: o tipo de fase estacionária, modificador orgânico e condições de pressão e temperatura [72,88]. Sendo assim, o presente trabalho buscou estudar esses parâmetros para separação de fenóis em fração aquosa de pirólise começando pela escolha da fase estacionária, em seguida vazão, modificador orgânico, condições de pressão, temperatura, tempo de gradiente e diluente.

4.5.1. Seleção da Fase estacionária (FE)

Para o desenvolvimento de um método por UHPSFC a escolha da coluna e modificador de fase móvel são os primeiros parâmetros a serem avaliados. Em relação a escolha da fase estacionária, geralmente diferentes colunas, entre 4 e 6, são selecionadas com o intuito de obter distintos perfis cromatográficos, neste trabalho 6 fases estacionárias foram avaliadas (tabela 6). Os tipos de FE foram selecionados nas diferentes faixas de polaridade, já que a composição da fase móvel do SFC é composta de uma mistura de CO₂ (não polar) e um modificador orgânico (polar), podendo atuar tanto como na cromatografia em fase reversa (FE apolar), fase normal (FE polar) ou um intermediário entre as duas. As diferentes fases estacionárias atuam na separação dos compostos de forma distinta. A figura 22 apresenta os resultados das análises dos 14 compostos fenólicos nas diferentes FE.

Figura 22. Cromatogramas por UHPSFC da separação dos padrões fenólicos em diferentes fases estacionárias obtidas nas condições cromatográficas – pressão: 103 bar, temperatura: 40 °C, eluição: modo gradiente linear 0-20% de modificador orgânico em 10 minutos, vazão: 0,8 mL. min⁻¹, volume de injeção: 1,0 µL, diluente: ACN, detecção: 220 nm.



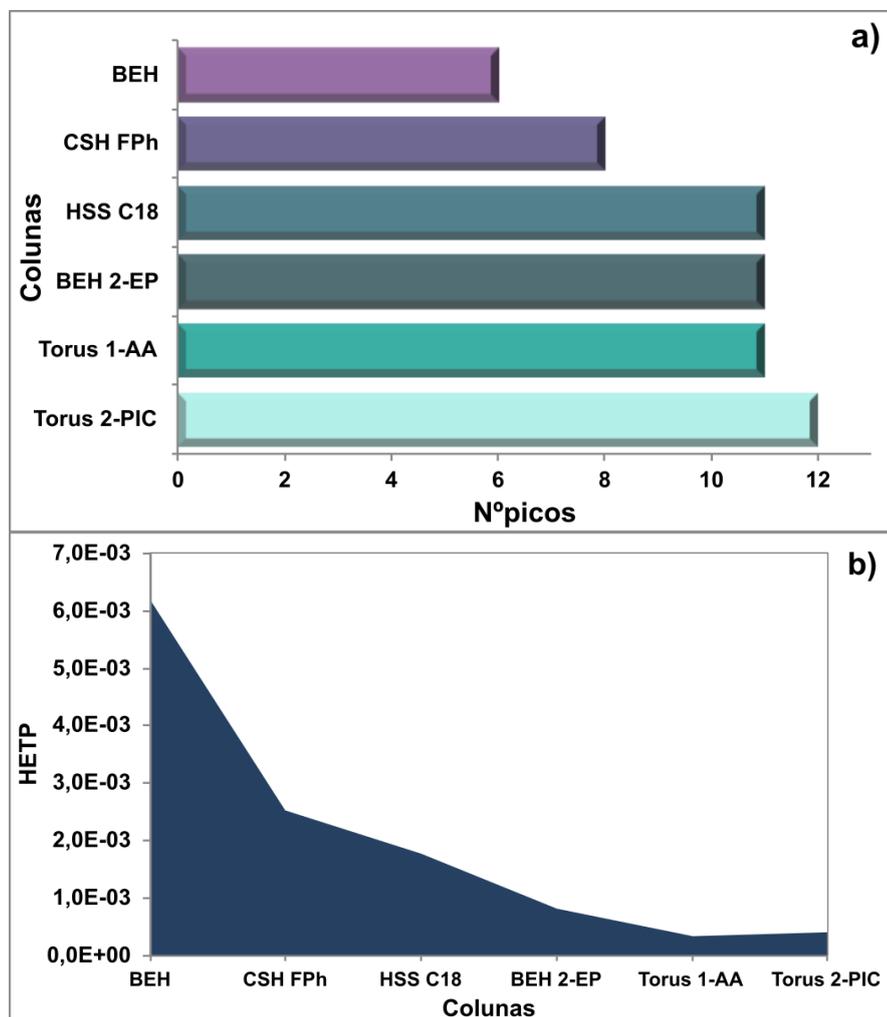
O tempo total de análise foi de 18 min (0-20% do modificador em 10 min), mas os 14 compostos fenólicos saíram antes de 8 min em todas as fases estacionárias avaliadas. Como pode ser observado nos cromatogramas acima, as colunas BEH e HSS C18 apresentaram perfil de retenção semelhante para os primeiros analitos, não havendo separação entre eles, onde quase todos os compostos fenólicos, em ambos os casos, saíram coeluidos entre 1 e 2,5 min. A retenção dos analitos na HSS C18 foi menor do que na BEH, o que pode ser justificado pela baixa interação dos analitos, de característica polar, com a FE apolar. Os dois primeiros picos da BEH se resumem em uma mistura de 11 fenóis (fenol, 4- metoxifenol, *o*-cresol, *p*-cresol, *m*-cresol, 3,5-dimetil fenol, guaiacol, eugenol, 2,6- dimetoxifenol e 4-etilfenol), resultado da baixa interação dos analitos com a FE. No trabalho de West et al. [89], utilizando o modelo de Abraham para a classificação de fases estacionárias, os autores chegaram à conclusão que coluna a coluna BEH, tende a interagir fortemente com bases, apesar desta coluna ser polar, os analitos investigados neste trabalho são de característica ácida o que justifica a

baixa capacidade da coluna em separá-los.

Em seguida, as colunas CSH FPh e BEH 2-EP apresentaram 8 e 10 picos, respectivamente, uma menor coeluição dos picos que as duas anteriores. Ambas as FE possuem em suas estruturas anéis aromáticos, assim como os analitos investigados, que resultam em interações do tipo π - π ocasionando uma melhor separação dos picos e uma menor largura da base, mesmo havendo coeluição. As duas colunas Torus, 1-AA e 2-PIC, possuem estruturas semelhantes, grupos hidroxila e amina que favorecem as interações com analitos que possuem caráter de doador e receptor de ligação de hidrogênio (interação intermolecular mais forte), a diferença encontra-se na estrutura aromática, onde, uma possui um anel de piridina e a outra anéis de benzeno condensados, responsáveis pelas interações intermoleculares do tipo π - π . Os fenóis são analitos que possuem as duas características citadas acima e realizam os dois tipos de interação (π - π e ligações de H) com as FE, o que justifica as colunas 1-AA e 2-PIC apresentarem as melhores separações e os melhores tempos de retenção dos analitos.

A fim de definir a melhor FE para a separação dos fenóis, além dos cromatogramas, dois gráficos foram construídos referentes ao número de picos ($N^{\circ}p$) e altura do prato (H) em função das colunas avaliadas (figura 23).

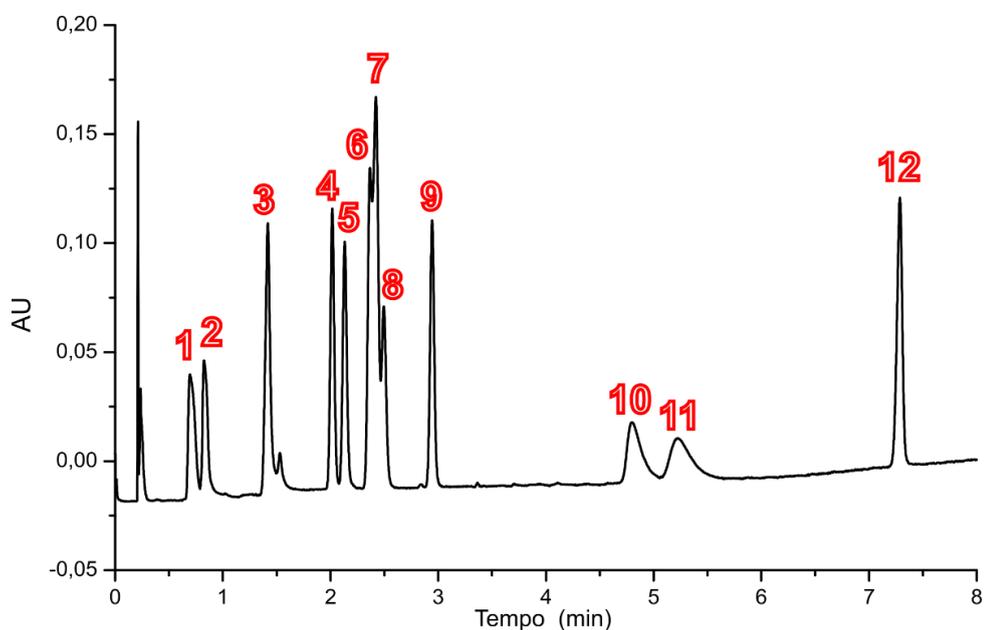
Figura 23. Parâmetros para a escolha da coluna calculados para o analito de maior retenção (resorcinol): a) N^op vs Coluna; b) H vs Coluna.



Como pode ser observado na Figura 23 as colunas Torus 1-AA e Torus 2-PIC apresentaram os melhores resultados para os parâmetros avaliados, sendo que na coluna 2-PIC foi observado um maior número de picos (12), onde 11 dos 14 compostos foram separados. Para avaliar a eficiência de cada coluna a altura de pratos teóricos foi calculada (HETP) e as colunas 1-AA e 2-PIC apresentaram os menores valores, logo, são as mais eficientes dentre as demais. Com base nos parâmetros avaliados acima, as duas colunas (1-AA e 2-PIC) geraram os melhores resultados, mas por apresentar maior número de picos e melhor perfil do cromatograma, a coluna Torus 2-PIC foi escolhida para as análises. A figura 24 apresenta o cromatograma dos 14 compostos ((1) guaiacol, (2) eugenol, (3) 4-etilfenol, (4) 2,5-dimetilfenol, (5) *o*-cresol, (6) 3,5-dimetilfenol, (7) *m*-cresol, *p*-cresol e 2,6-dimetoxifenol, (8) fenol, (9) 4-metoxifenol, (10) 4-metilcatecol, (11) *o*-catecol e

(12) resorcinol) utilizando a coluna Torus 2-PIC. A ordem de eluição foi verificada injetando os padrões de maneira individual.

Figura 24. Perfil cromatográfico obtido com a coluna Torus 2-PIC.

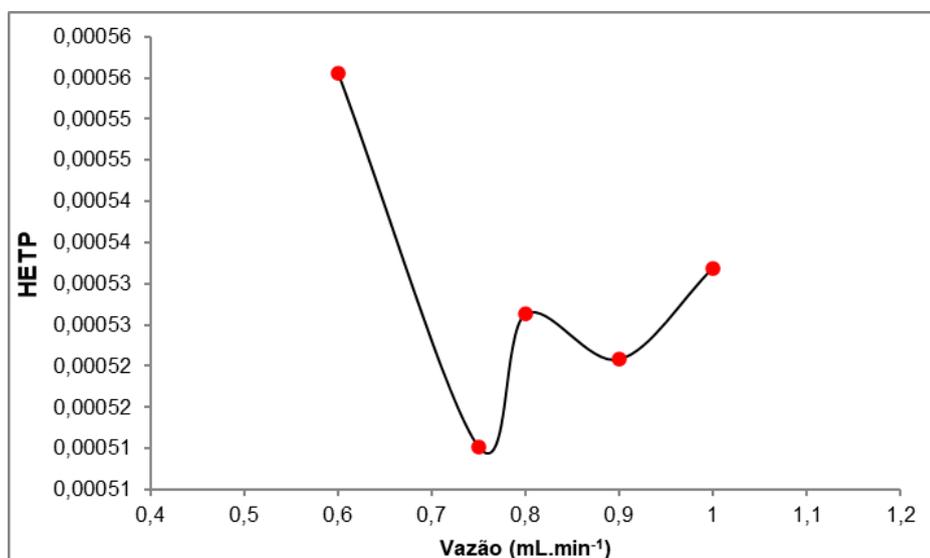


A ordem de eluição está diretamente ligada com a polaridade do analito, por se tratar de uma FE polar, os analitos que possuem os menores valores de log P (tabela 2), *o*-catecol e resorcinol, apresentaram maior retenção. Aqueles com valores muito próximos de log P entre si, como é o caso dos cresóis e dimetilfenóis, resultaram em coeluição.

4.5.2. Seleção da Vazão (*F*)

Avaliar a vazão de um método cromatográfico busca reduzir o tempo de análise, porém é necessário cuidado para evitar perda de eficiência quando se trabalha com valores extremos. Além disso, como o aumento da vazão eleva a pressão de entrada, a retenção é influenciada em SFC por aumentar a densidade do fluido. Como consequência, retenções menores são esperadas, o que pode ocasionar em sobreposições. O presente trabalho avaliou 5 vazões diferentes: 0,6, 0,75, 0,8, 0,9 e 1 mL. min⁻¹ utilizando a coluna 2-PIC e o método citado na seção 3.6.1. O gráfico (figura 25) foi plotado para o pico de maior retenção (resorcinol).

Figura 25. Curva da H vs vazão da fase móvel utilizando coluna 2-PIC para o analito mais retido (resorcinol).



Com base na curva da Figura 25, a menor altura do prato teórico foi encontrada na vazão de 0,75 mL.min⁻¹. Em 0,6 e 1,0 mL.min⁻¹ apresentaram-se os maiores valores de HETP, logo, são as vazões que apresentam menor eficiência. Sabendo que vazões mais baixas acarretam no alargamento dos picos e mais altas podem levar a sua sobreposição, com base nos cromatogramas que foram obtidos nas vazões avaliadas, 0,8 mL.min⁻¹ foi escolhido para dar continuidade as análises, mantendo um bom formato dos picos e evitando possíveis coeluições dos analitos com interferentes presentes na matriz.

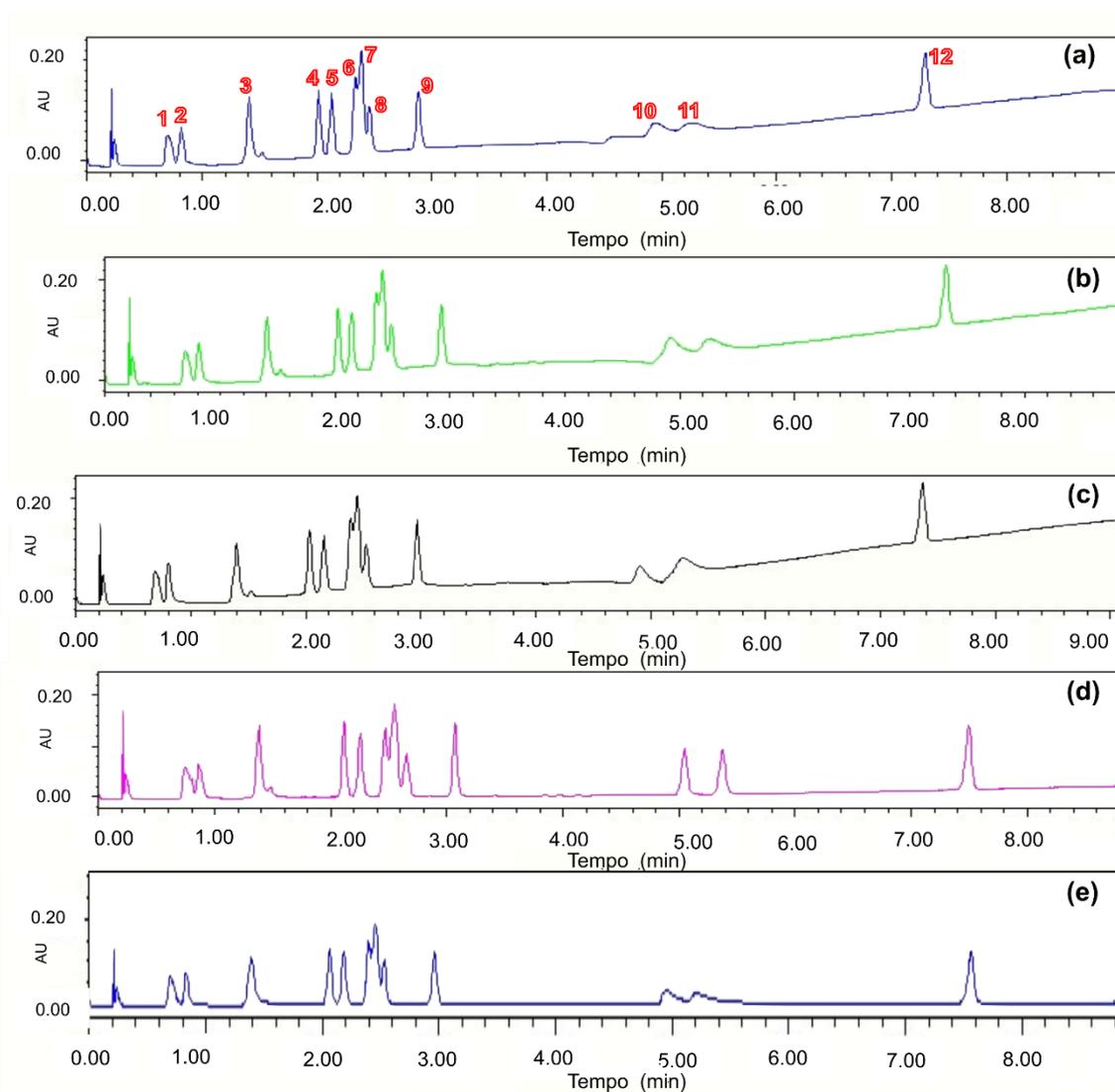
4.5.3. Seleção do Modificador orgânico

Definidos a coluna e a vazão da fase móvel (FM) do método, a escolha do modificador orgânico foi passo seguinte. A melhora da solubilidade do analito, impedindo que haja precipitação na coluna, além de favorecer a resolução dos picos e reduzir interações dos analitos com grupos silanóis residuais, são vantagens adquiridas ao se utilizar um modificador na composição da fase móvel em cromatografia por fluido supercrítico [65].

O modificador orgânico foi escolhido com base na polaridade dos analitos estudados, como apresenta a tabela 2, os baixos valores de log P indicam a maior solubilidade destes analitos em água, que é proporcional a sua polaridade. Dentre os solventes orgânicos polares o metanol é comumente utilizado nas análises por

SFC, sendo completamente miscível com o CO₂ nas diferentes faixas de pressão e temperatura [90], já foi utilizado na literatura como modificador para avaliar a retenção, dentre outros compostos não fenólicos, do *o*-catecol e resorcinol por Ovchinnikov et al. [91]. Neste trabalho, o metanol foi testado, na forma pura, com água e acetonitrila (ACN), com e sem adição de ácido fórmico. Os cromatogramas são mostrados na figura 26.

Figura 26. Cromatogramas nas diferentes proporções dos aditivos e modificador orgânico na FM: (a) MeOH 0,1% HFor; (b) MeOH:H₂O (97.5:2.5) 0,1% HFor; (c) MeOH:H₂O (95:5) 0,1% HFor; (d) MeOH:H₂O (95:5); (e) MeOH:ACN (80:20).



(1) guaiacol, (2) eugenol, (3) 4-etilfenol, (4) 2,5-dimetilfenol, (5) *o*-cresol, (6) 3,5-dimetilfenol, (7) *m*-cresol, *p*-cresol e 2,6-dimetoxifenol, (8) fenol, (9) 4-metoxifenol, (10) 4-metilcatecol, (11) *o*-catecol e (12) resorcinol

Inicialmente, a fase móvel foi avaliada sem a presença de ácido fórmico, variando apenas a proporção de água, na proporção MeOH:H₂O (95:5) houve uma leve diminuição no tempo de retenção, devido da interação existente entre a FE e FM, onde, possuindo a água uma alta polaridade e capacidade de funcionar como receptor e doador de ligações de hidrogênio [90], compete diretamente com os fenóis pelos locais ativos evitando interações indesejáveis dos analitos, MeOH:H₂O (95:5) foi a proporção de fase então selecionada para comparar com as fases acidificadas.

Em seguida, o uso do ácido fórmico e seu efeito nas diferentes composições de FM foi avaliado. A Figura 26 (a, b e c) apresenta uma distorção na linha de base devido a presença do ácido fórmico e o sinal dos picos 4-Metilcatecol e *o*-Catecol (eluição em 5 min) aumenta levemente com o aumento da proporção de água, mas são os mais afetados com a composição da fase móvel e apresentam-se deformados. O uso da ACN na composição da fase móvel também não apresentou diferença significativa no perfil dos cromatogramas. Quando utilizamos a maior proporção de água na mistura, MeOH:H₂O (95:5) sem uso de aditivo ácido, (Figura 26d) foram obtidos os melhores resultados quanto ao perfil dos picos.

4.5.4. Seleção dos parâmetros de Pressão, temperatura e tempo de gradiente do modificador

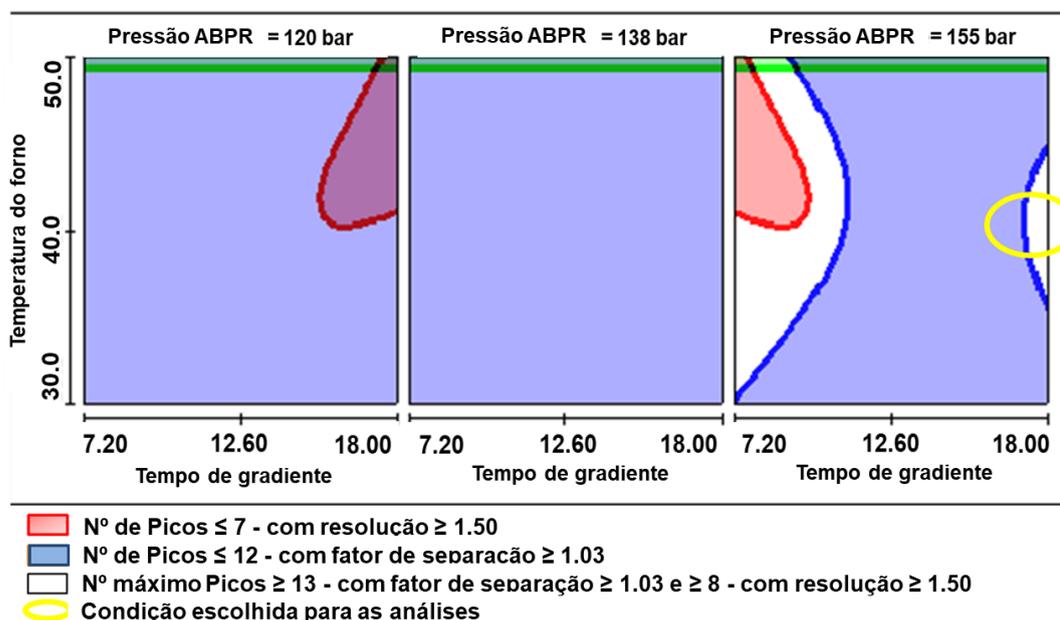
Pressão e temperatura são parâmetros que têm grande efeito sobre a densidade da fase móvel, logo, atuam de forma direta na retenção dos compostos. Quando a fase móvel no SFC é composta de CO₂ puro a densidade do fluido supercrítico é o fator que define a solubilidade do composto, interação soluto-solvente, logo, responsável pelas alterações no fator de retenção [65]. Entretanto, quando um modificador orgânico está presente na composição, a depender da quantidade, a influência desses parâmetros sobre a separação é minimizada [91]. Sendo assim, nesta seção foi investigada a melhor combinação do tempo de gradiente do modificador, pressão e temperatura, a partir do planejamento descrito na seção 3.6.2. A tabela 16 apresenta as condições do planejamento experimental, distribuídas de forma aleatória, para cada ponto.

Tabela 16. Os 17 ensaios do planejamento experimental e as respostas em relação ao número de picos (Nºp).

Ensaio	Tempo de gradiente (min)	Temperatura do Forno (°C)	Pressão (bar)	Nºp \geq 1.50 - USP Resolução	Nºp \geq 1.03 - Fator de separação
1	7,2	30	120	9	10
2	18	30	120	8	10
3	7,2	30	155	8	13
4	18	30	155	9	12
5	12,6	30	138	8	10
6	7,2	40	138	8	12
7	18	40	138	8	11
8	12,6	40	120	7	13
9	12,6	40	155	7	13
10	12,6	40	138	8	11
11	12,6	40	138	8	11
12	12,6	40	138	8	11
13	7,2	50	120	8	12
14	18	50	120	8	9
15	7,2	50	155	7	14
16	18	50	155	8	12
17	12,6	50	138	8	11

Uma superfície de contorno foi gerada (figura 27) utilizando o software Fusion QbD a partir dos resultados da tabela 16 onde na região branca estão as melhores condições, ou seja, nas condições onde foi obtido o maior número de picos dentro das especificações de resolução e fator de separação.

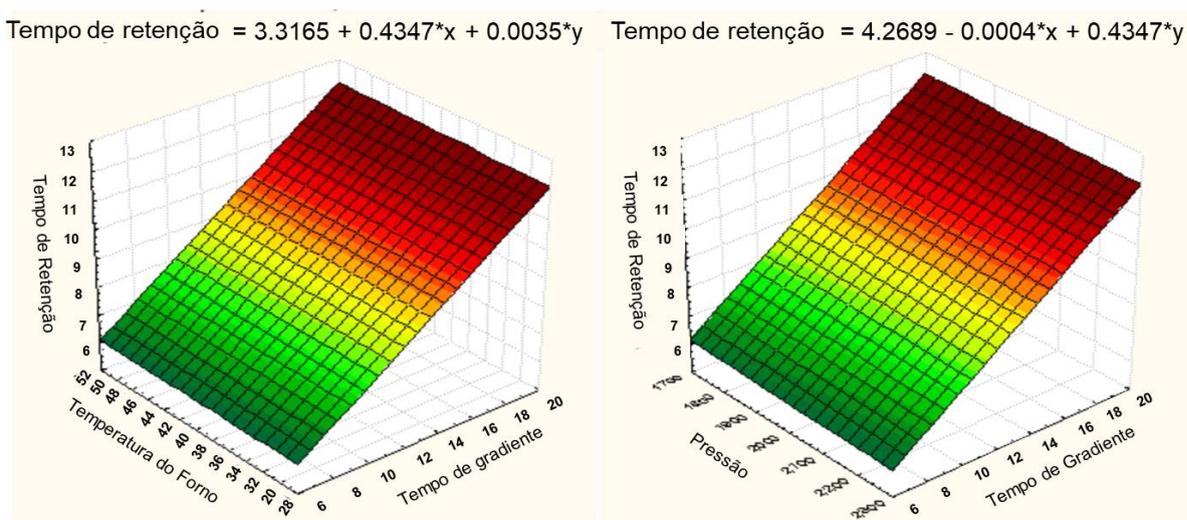
Figura 27. Figuras de contornos nas três pressões avaliadas.



A partir da figura 27 foi possível determinar a pressão em 155 bar como a mais adequada para o método de análise, visto que abaixo deste valor (120 e 138 bar) não foi obtido máximo de resposta em nenhuma região do gráfico. Em valores mais altos de pressão observou-se maior número de picos com fator de separação ≥ 1.03 , esse mesmo efeito da pressão sobre o fator de separação também foi observado por Ovchinnikov et al. [90] em seu trabalho, quando analisou o resorcinol e o pirocatecol em diferentes FE. Uma das possíveis justificativas desse comportamento deve-se ao fato que em pressões mais altas locais de fortes interações tornam-se mais disponíveis para os analitos, resultando maior interação do analito com a FE.

Para avaliar se a influência da pressão e da temperatura é significativa sobre o tempo de retenção do analito mais retido (resorcinol), um gráfico de superfície de resposta foi construído (figura 28). O software Statistica 8 foi utilizado para gerar os modelos e os gráficos, o modelo estatístico utilizado foi linear com um $R^2=0,9991$ apresentando um bom ajuste. A significância estatística foi realizada através da variância com um intervalo de 95% de confiança que reflete em um nível de significância de 5% ($p\text{-valor}=0,05$). A figura 28 apresenta as superfícies de resposta para o resorcinol.

Figura 28. Superfícies de respostas: (a) Temperatura do forno vs tempo de gradiente, (b) Pressão vs tempo de gradiente.



Como pode ser observado nas duas superfícies de resposta tanto a variação da temperatura do forno, como a variação da pressão não tem influência sobre a

resposta (tempo de retenção), apenas o tempo de gradiente, esse comportamento pode ser concluído ao observar o diagrama de pareto no apêndice 4.

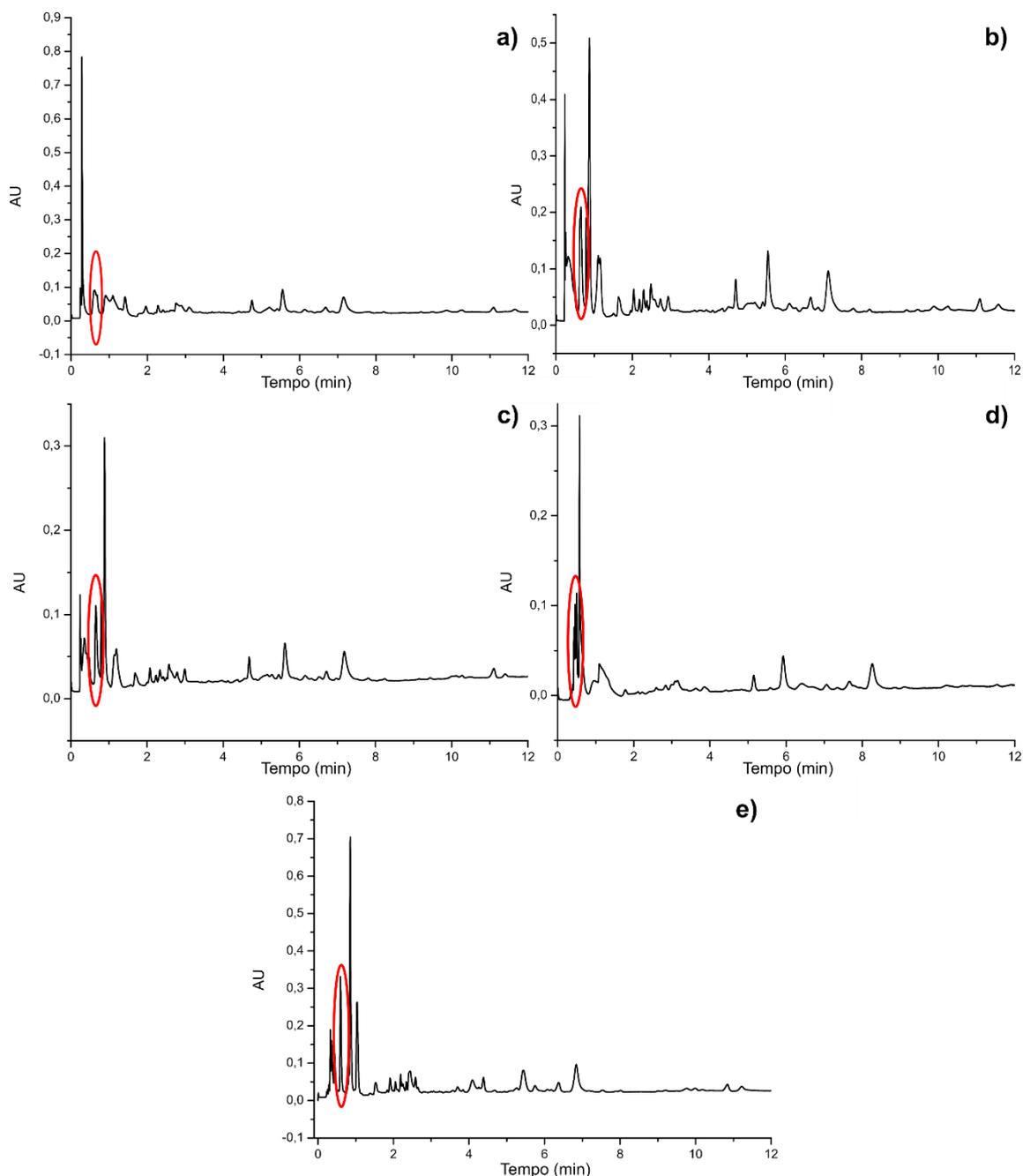
Com base no trabalho de Ovchinnikov et al., [33] os compostos fenólicos são menos suscetíveis a mudanças de pressão. Os efeitos da pressão e temperatura na separação são pequenos, portanto, não devem ser de grande preocupação durante a otimização do método, mas pode auxiliar quando o modificador orgânico está presente na fase móvel em pequenas quantidades. Segundo o trabalho de Asberg et al. [88], os autores concluem que o efeito da variação da temperatura sobre a densidade da FM é maior quando há pequenas quantidades de modificador, o que não foi o caso deste trabalho, onde a porcentagem de modificador orgânico chegou a 18%.

Considerando que a pressão e temperatura não tiveram influência sobre o tempo de retenção, as condições escolhidas foram com base no maior número de picos dentro das especificações de fator de separação e resolução. Sendo assim, as condições de análises escolhidas estão demarcadas em amarelo figura 27, onde a pressão foi fixada em 155 bar, a temperatura em 40°C e o tempo do gradiente 18 minutos já que em 7.20 minutos pode haver uma maior coeluição dos analitos de interesse com interferentes presentes na matriz.

4.5.5. Seleção do Diluente

Como descrita na seção 3.6.1, as misturas dos padrões de compostos fenólicos utilizadas para otimizar todos os parâmetros descritos foram preparadas em acetonitrila e não apresentaram nenhuma deformação de pico ou ruído na linha de base. Para o preparo das frações aquosas de pirólise não foi realizada etapa de extração desses analitos, ela foi diretamente misturada com o solvente de diluição na proporção 1:20 de Amostra:Solvente, com exceção da fração aquosa de semente de uva que foi diluída em 1:40. Entretanto, quando as amostras de fração aquosa foram misturadas com acetonitrila apresentaram um efeito negativo sobre os picos dos analitos de interesse, a fim de melhorar formato de pico, linha de base e até mesmo a solubilidade do analito no diluente, alguns solventes orgânicos foram testados. A depender do solvente de diluição testado, como pode ser observado na figura 29, o perfil do cromatograma mudou.

Figura 29. Cromatogramas de UHPSFC das frações aquosas nos diferentes solventes de diluição: (a) Isopropanol:ACN (1:3); (b) H₂O:ACN (1:3); (c) H₂O:ACN (1:20); (d) H₂O:MeOH (1:50); (e) H₂O. Volume de injeção de 1 µL.



Dentre as misturas de solventes avaliados a água foi o solvente que apresentou melhor formato de picos, principalmente para o guaiacol, destacado em vermelho na figura 29. No trabalho de Fairchild et al. [92], os autores observaram que solventes muito polares como o metanol (MeOH) levaram a distorções de pico mesmo em pequenos volumes de injeção, resultado do contraste entre a força de

eluição do solvente amostral e eluente. Consequentemente, a utilização de água como solvente de eluição também seria um problema, mas Sarrut et al. [93] em seu trabalho observaram que uma maior proporção de acetonitrila no volume de injeção prejudica mais o formato do pico do *o*-cresol quando comparado a utilização de uma alta quantidade de água, os autores supõem que esse comportamento se deva a alta afinidade dos analitos em água e a boa afinidade da água pela FE, desse modo, o analito interage preferencialmente com a fase estacionária. Sendo assim, as análises neste trabalho utilizaram de água como solvente de diluição das frações aquosas.

4.6. Avaliação das figuras de mérito para o método por UHPSFC

4.6.1. Linearidade

Dos 11 compostos fenólicos que foram separados, 5 deles (guaiacol, fenol, 4-metilcatecol, *o*-catecol e resorcinol) foram os analitos encontrados em maior concentração nas seis frações aquosas diferentes, que foram possíveis de serem quantificados, o restante dos analitos estudados no trabalho apresentaram coeluição com interferentes da matriz ou não foram possíveis de serem detectados por apresentarem baixa concentração. Sendo assim, para verificar a linearidade do método, curvas analíticas – relação da resposta do equipamento com a concentração conhecida do analito – foram construídas a partir de soluções estoques dos 5 compostos fenólicos em acetonitrila com concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, de onde foram preparadas as concentrações das curvas que variaram de 2 até 180 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em sete níveis de concentração. As análises dos padrões para as curvas analíticas foram realizadas em triplicata ($n=3$), em seguida, os dados (área dos analitos) foram coletados e utilizados para construir as curvas de cada composto fenólico (figura 30). As equações da reta e os coeficientes de determinação e correlação linear para as curvas estão apresentados na tabela 17.

Figura 30. Curvas analíticas do guaiacol, fenol, 4-metilcatecol, o-catecol e resorcinol, respectivamente.

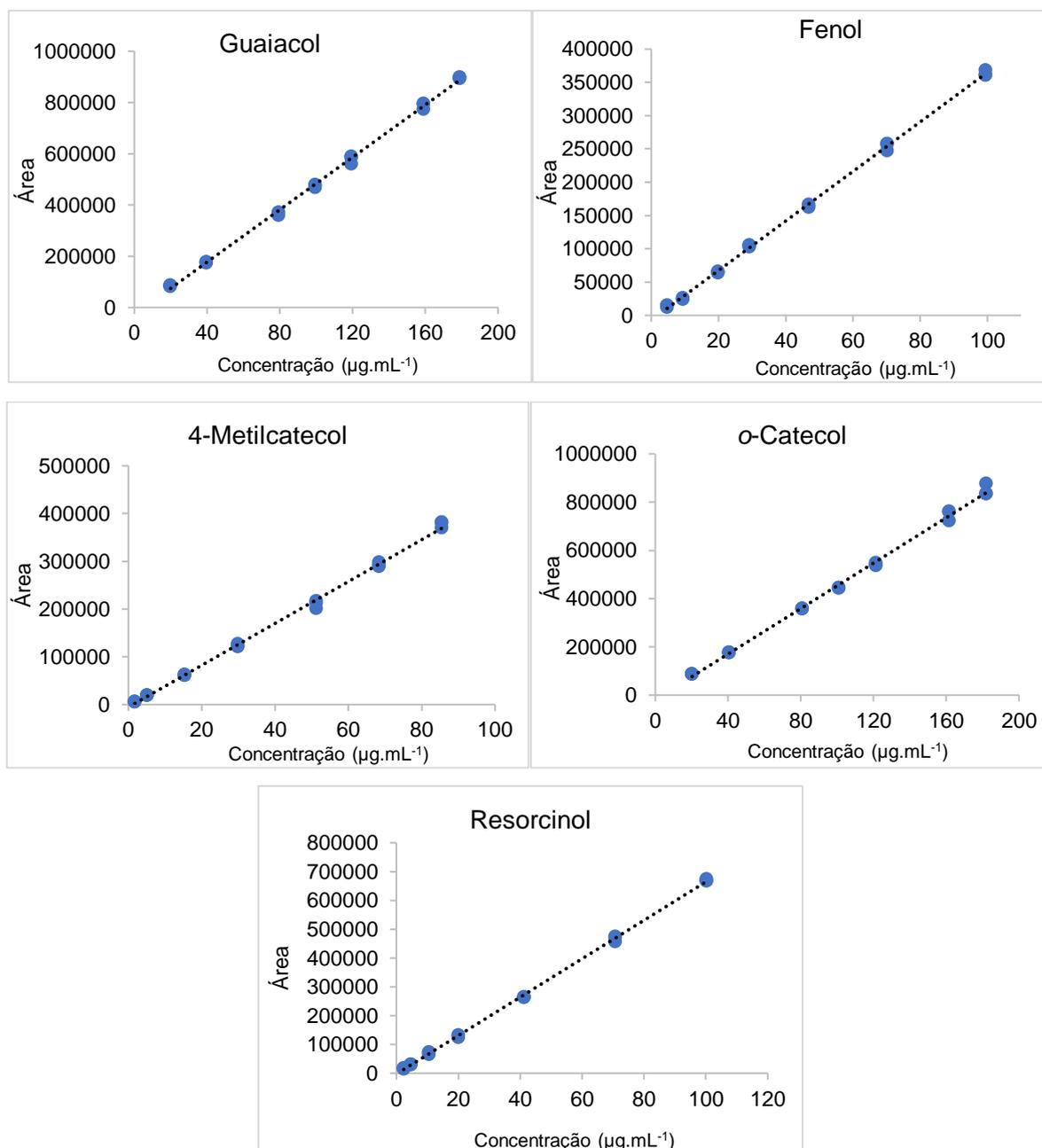


Tabela 17. Equações da reta e coeficiente de determinação dos cinco (5) fenóis.

	Compostos	Intervalo de concentração (µg. mL ⁻¹)	Equação da reta	R ²	r
1	Guaiacol	20-180	$y = 5113,4x - 27532$	0,9987	0,9993
2	Fenol	5-100	$y = 3720x - 7004,9$	0,9992	0,9996
3	4-Metilcatecol	2-100	$y = 4381,5x - 5461,7$	0,9977	0,9989
4	o-Catecol	20-180	$y = 4709,8x - 18062$	0,9971	0,9986
5	Resorcinol	2-100	$y = 6671,9x - 2824,8$	0,9994	0,9997

Os valores dos coeficientes de correlação linear (r) das curvas de todos os 5 analitos apresentaram uma boa relação de linearidade entre a concentração dos analitos e as respostas cromatográficas (áreas) no intervalo avaliado, todas com o valor de $r > 0,99$ dentro das condições especificadas pela ANVISA [79] e pelo INMETRO [84]. O Resorcinol e o Guaiacol foram os analitos que apresentaram maior sensibilidade ao método.

4.6.2. Seletividade não específica (efeito matriz)

Por se tratar de uma amostra complexa e outros compostos poderem apresentar interferências na determinação dos analitos, a seletividade do método foi avaliada a partir do estudo do efeito matriz, através da comparação das inclinações das curvas dos padrões no solvente com as inclinações das curvas preparadas na matriz. Estas foram construídas a partir da análise das amostras fortificadas com os padrões, no intervalo de concentração avaliado na linearidade. A figura 31 apresenta as curvas analíticas preparadas na matriz e a tabela 18 as equações da reta, o coeficiente de determinação e correlação linear e a RCA – razão dos coeficientes angulares.

Figura 31. Curvas analíticas preparadas na matriz do guaiacol, fenol, 4-metilcatecol, o-catecol e resorcinol.

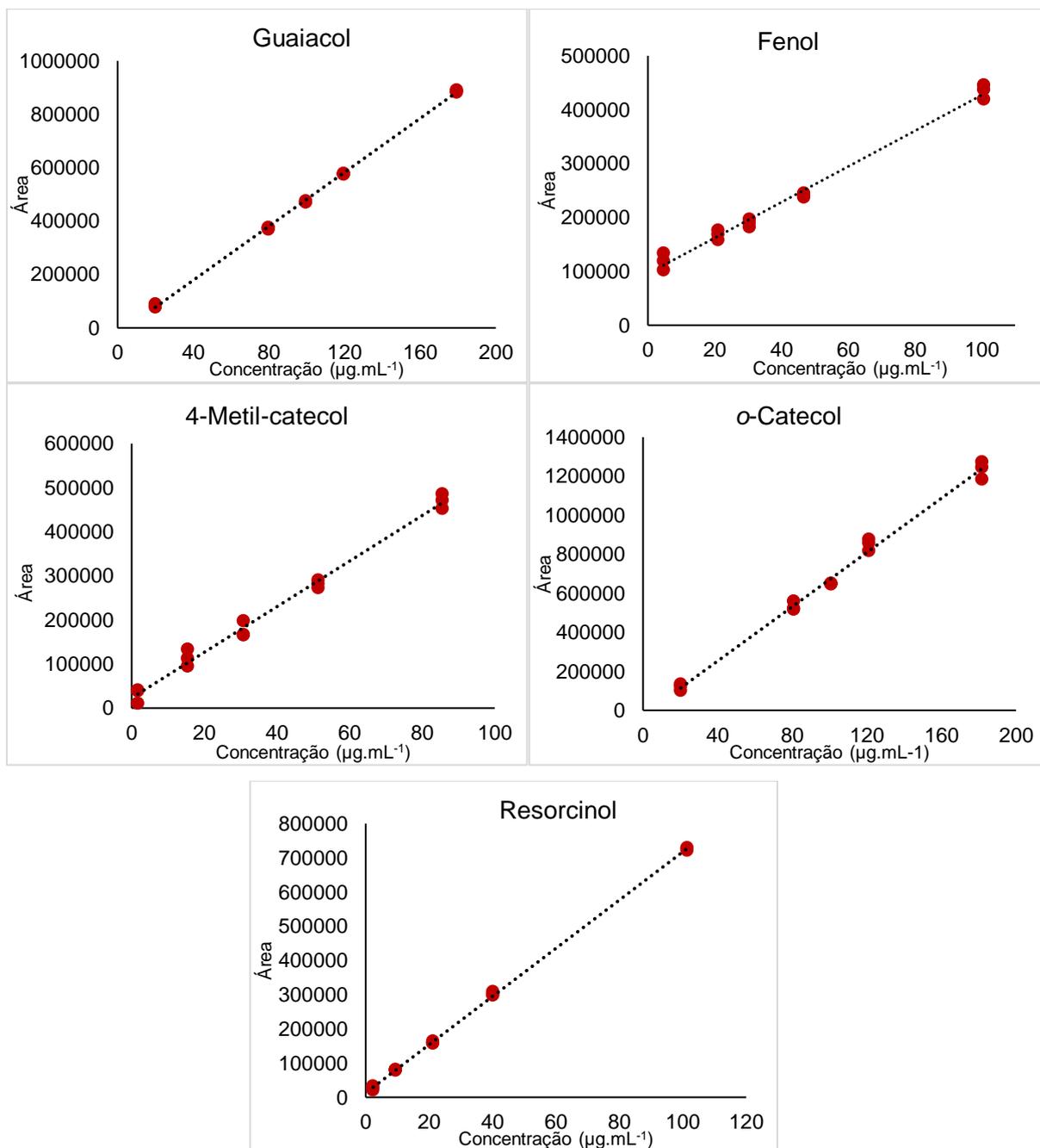


Tabela 18. Curvas solvente e matriz: Equações da reta, coeficiente de correlação (r) e determinação (r^2), e RCA – UHPSFC.

	Compostos	Solvente	Matriz			RCA
		Equação da reta	Equação da reta	r^2	r	
1	Guaiacol	$y = 5113,4x - 27532$	$y = 5053,4x - 23699$	0,9994	0,9998	0,99
2	Fenol	$y = 3720x - 7004,9$	$y = 3311,6x + 95797$	0,99	0,995	0,89
3	4-Metilcatecol	$y = 4381,5x - 5461,7$	$y = 5169,2x + 23227$	0,9905	0,9953	1,18
4	<i>o</i> -Catecol	$y = 4709,8x - 18062$	$y = 6954,9x - 25755$	0,9935	0,9968	1,48
5	Resorcinol	$y = 6671,9x - 2824,8$	$y = 7043,1x + 12778$	0,9996	0,9998	1,06

Todos os analitos apresentaram um coeficiente de correlação linear (r) dentro do que foi estabelecido pelo INMETRO [84] e ANVISA [79], acima de 0,99. O *o*-catecol e resorcinol, com base nos respectivos valores de coeficiente angular, apresentaram a maior sensibilidade ao método. O efeito matriz, avaliado a partir dos valores da RCA, apresentou-se mais acentuado no *o*-catecol do que nos demais analitos. Os valores acima de 1 indicam um aumento da intensidade do sinal analítico quando a curva foi preparada na matriz, resultado de suas interações com os interferentes que estão presentes. A fim de evitar o efeito de matriz sobre a quantificação dos analitos e obter resultados confiáveis, as curvas analíticas de correspondência da matriz foram utilizadas na quantificação.

4.6.3. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir da curva analítica de cada analito. A partir do limite de detecção é possível dizer a concentração do analito que pode ser detectada, já sua quantificação, como o próprio nome diz, é estabelecido pelo limite de quantificação. Os valores dos LD e LQ foram calculados a partir das curvas analíticas preparadas na matriz utilizando as equações 2 e 3 da secção 4.3.4. A tabela 19 traz os valores de LD e LQ em $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, para o método desenvolvido por UHPSFC.

Tabela 19. Limite de detecção e quantificação dos fenóis avaliados neste trabalho – UHPSFC.

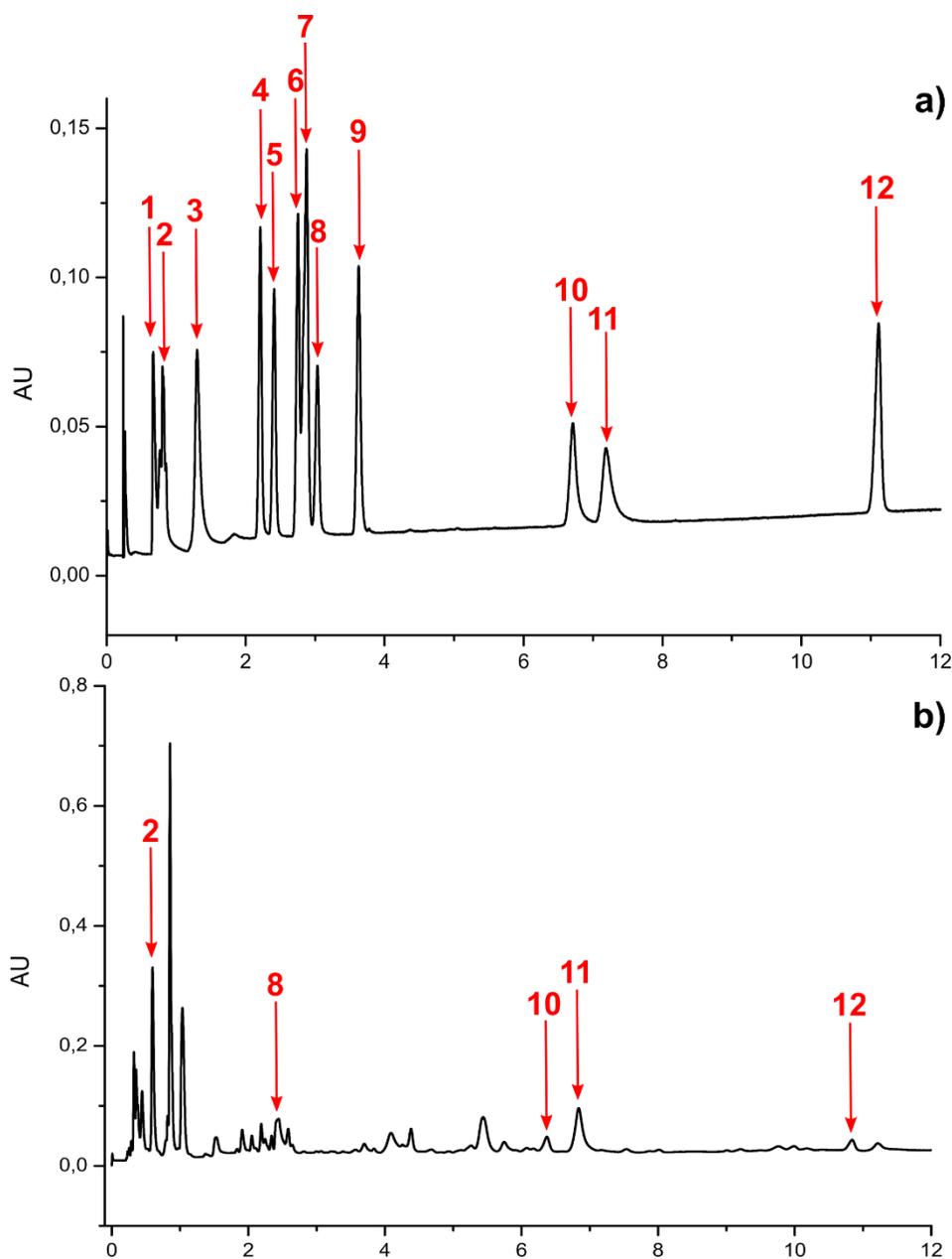
	Limite de quantificação – LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Limite de detecção – LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Fenol	14,58	4,82
4-Metil-Catecol	12,83	4,23
O-Catecol	25,50	8,41
Resorcinol	2,78	0,92
Guaiacol	7,54	2,49

Os valores dos limites de detecção variaram de 0,92 até 8,41 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, e os limites de quantificação de 2,78 até 25,50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Apesar de apresentarem valores mais altos dos que foram encontrados nas análises por GC/MS, não foi um problema para a quantificação das frações aquosas devido à alta concentração desses analitos em sua composição.

4.7. Análise quantitativa de Fenóis na fração aquosa de pirólise – UHPSFC

Determinadas as condições cromatográficas de análise, foi possível separar 11 dos 14 compostos fenólicos selecionados para a análise, nesta mesma ordem de eluição: guaiacol, eugenol, 4-etilfenol, 2,5-dimetilfenol, *o*-cresol, 3,5-dimetilfenol, fenol, 4-metoxifenol, 4-metilcatecol, *o*-catecol e resorcinol, o *m*-cresol, *p*-cresol e 2,6-dimetoxifenol coeluíram entre si. A figura 32 apresenta dois cromatogramas, um referente a mistura de padrões no método otimizado e outro a fração aquosa de semente de goiaba.

Figura 32. (a) Cromatograma dos padrões nas condições de análises otimizadas; (b) Cromatograma da fração aquosa de semente de goiaba.



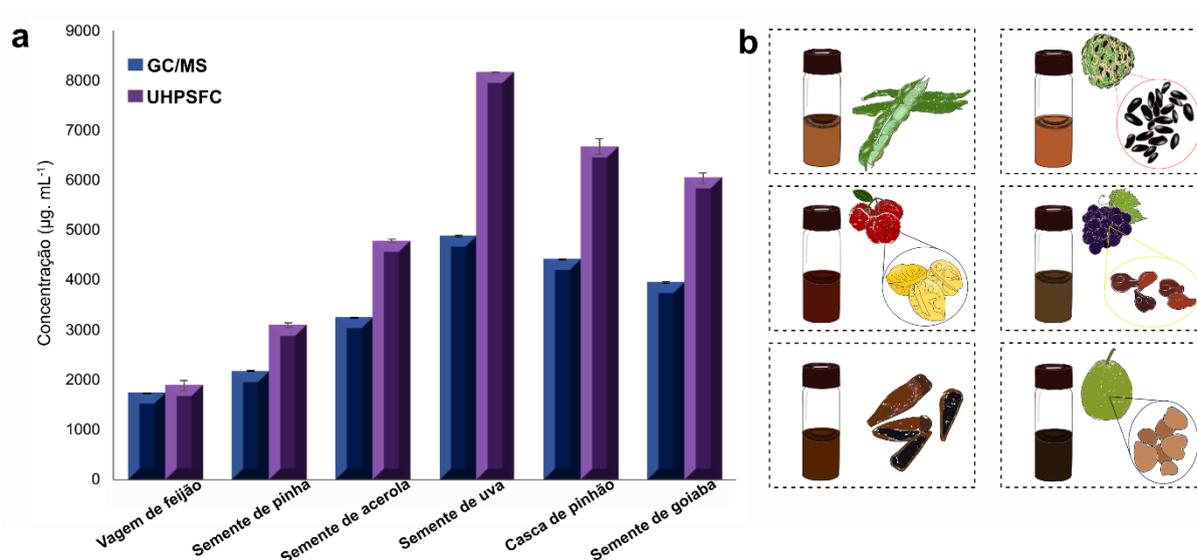
(1) Guaiacol, (2) eugenol, (3) 4-etilfenol, (4) 2,5-dimetilfenol, (5) o-cresol, (6) 3,5-dimetilfenol, (7) m-cresol, p-cresol e 2,6-dimetoxifenol, (8) fenol, (9) 4-metoxifenol, (10) 4-metilcatecol, (11) o-catecol e (12) resorcinol.

Os 5 analitos destacados na figura 32b foram identificados a partir dos tempos de retenção – a fortificação da amostra com padrões foi realizada para confirmar – e comparação dos espectros de UV. Estes foram os analitos encontrados em maior concentração nas seis frações aquosas que foram possíveis de serem quantificados, os demais apresentaram coeluição com outros compostos das amostras ou nem

sequer estavam presentes. A quantificação dos compostos foi realizada utilizando padronização externa, a partir das curvas analíticas preparadas na matriz.

Definidas as curvas a serem utilizadas na quantificação, as áreas referentes aos 5 analitos nas 6 frações aquosas foram coletadas, e suas concentrações foram calculadas. A figura 33 apresenta a concentração total dos fenóis nas frações aquosas de vagem de feijão, semente de pinha, semente de acerola, semente de uva, casca de pinhão e semente de goiaba, respectivamente. As concentrações individuais dos analitos e seus respectivos valores de desvio padrão encontram-se no apêndice 6.

Figura 33. (a) Concentração dos compostos fenólicos determinados por GC/MS e por UHPSFC nas frações aquosas de pirólise, (b) respectivas biomassas.



Assim como foi observado através da cromatografia gasosa, na cromatografia com fluido supercrítico as frações aquosas de semente de uva, goiaba e as cascas de pinhão apresentaram a maior concentração de compostos fenólicos, seguidos da semente de acerola, semente de pinha e vagem de feijão. Por ser uma técnica direta de análise a cromatografia com fluido supercrítico apresentou valores de concentração de fenóis maiores do que nas cromatografia gasosa. Os passos de manipulação das amostras de fase aquosa – extração, remoção da água (coluna de sulfato de sódio) e derivatização – que são necessários para as análises por GC/MS podem causar perdas de analitos durante o processo, resultando em uma quantificação parcial nesse tipo de amostra, a SFC surge então como uma técnica promissora para este tipo de análise. A tabela 20 faz uma comparação dos

parâmetros de cada método após as otimizações, as condições otimizadas estão nos apêndices 2 e 5.

Tabela 20. Comparação dos métodos de análise por GC/MS e UHPSFC.

Parâmetros	UHPSFC	GC/MS
Preparo de amostras Aquosas	Análise direta (apenas diluição)	Extração, remoção de água e derivatização
Tempo de preparo de amostras	5 min	70 min
Tempo de corrida	21 min	50 min
Capacidade de picos	menor	maior

A UHPSFC apresentou boa performance para a análise de amostras aquosas de pirólise em comparação com a GC/MS, através da redução de passos no preparo de amostra e menor tempo de análise é possível o acompanhamento da concentração de fenóis em fração aquosa de processos de pirólise. Embora o limite de detecção e quantificação sejam maiores, não se torna um problema, visto que as amostras analisadas possuem alta concentração de fenóis e tiveram que ser diluídas para a análise.

5. CONCLUSÕES

Considerando que a fração aquosa da pirólise da biomassa é constituída por uma mistura complexa de compostos de alta polaridade e de grupos funcionais variados, foi aplicada a análise via cromatografia gasosa com espectrometria de massas para a separação, caracterização dos compostos e classificação por grupos funcionais. Em seguida um método foi otimizado e definidas as melhores condições de análises: Coluna SPB-5; tempo de análise em 50 min; vazão em 1 mL.min⁻¹; tempo de derivatização em 40 min. O método mostrou-se apropriado para a quantificação dos fenóis existentes nas frações aquosas, todos os analitos foram possíveis de serem separados. A amostra com maior concentração de fenóis foi a fração aquosa obtida a partir da semente de uva, enquanto que a amostra de vagem

de feijão foi a que apresentou a menor.

O estudo da cromatografia com fluido supercrítico de alta ultra eficiência não é relatado na literatura para a separação de fenóis em fração aquosa de pirólise, sendo assim, teve seus parâmetros essenciais de análise estudados nesse trabalho, onde, o método ficou definido utilizando uma coluna polar Torus 2- PIC, modificador orgânico MeOH:H₂O 95:5 em um gradiente de 18 min até 18%, vazão de 0,8 mL.min⁻¹, amostra preparada em água, pressão de 155 bar e temperatura do forno em 40°C. Nessa condição de análise, 11 dos 14 fenóis foram separados, onde 5 deles foram quantificados nas amostras de fração aquosa.

O comportamento da concentração dos fenóis nas frações aquosas foi semelhante entre os dois métodos de análise desenvolvidos, as amostras de semente de uva, casca de pinhão e semente de goiaba, apresentaram-se como fontes promissoras para obtenção de fenóis. A diferença de concentração observada de um método para o outro na mesma amostra é resultado das limitações encontradas, na perda da quantificação dos analitos que permanecem na água durante a extração ante a análise por GC/MS, apresentando concentrações menores do que nas análises por UHPSFC. Em tempos curtos de análise, preparo de amostra sem etapas trabalhosas e possibilidade de injeção direta, a UHPSFC mostrou-se adequada para a análise de amostras aquosas de pirólise em comparação com a GC/MS, maiores concentrações dos analitos foram obtidas, sendo possível o acompanhamento da concentração de fenóis nessa matriz.

6. Perspectivas futuras

Ajustar ao SFC-MS os parâmetros otimizados neste trabalho para UHPSFC e validar o método.

REFERÊNCIAS

- [1] Lazzari, E.; Arena, K.; Caramão, E. B.; Herrero, M., Quantitative Analysis of Aqueous Phases of Bio-Oils Resulting from Pyrolysis of Different Biomasses by Two-Dimensional Comprehensive Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1602*, p 359–367.
- [2] Pereira da Silva Maciel, G.; Machado, M. E.; Barbará, J. A.; Molin, D. D.; Caramão, E. B.; Jacques, R. A., GC × GC/TOFMS Analysis Concerning the Identification of Organic Compounds Extracted from the Aqueous Phase of Sugarcane Straw Fast Pyrolysis Oil. *Biomass and Bioenergy* **2016**, *85*, p 198–206.
- [3] Ren, S.; Ye, X. P.; Borole, A. P., Separation of Chemical Groups from Bio-Oil Water-Extract via Sequential Organic Solvent Extraction. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2017**, *123*, p 30–39.
- [4] Cesari, L.; Canabady-Rochelle, L.; Mutelet, F., Separation of Phenols from Lignin Pyrolysis Oil Using Ionic Liquid. *Sep. Purif. Technol.* **2019**, *209* (July 2018), p 528–534.
- [5] Schroeder, P.; Nascimento, B. P. do; Romeiro, G. A.; Figueiredo, M. K. K.; Veloso, M. C. da C., Chemical and Physical Analysis of the Liquid Fractions from Soursop Seed Cake Obtained Using Slow Pyrolysis Conditions. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2017**, *124*, p 161–174.
- [6] Lewis, A. J.; Ren, S.; Ye, X.; Kim, P.; Labbe, N.; Borole, A. P., Hydrogen Production from Switchgrass via an Integrated Pyrolysis-Microbial Electrolysis Process. *Bioresour. Technol.* **2015**, *195*, p 231–241.
- [7] Vitasari, C. R.; Meindersma, G. W.; de Haan, A. B., Water Extraction of Pyrolysis Oil: The First Step for the Recovery of Renewable Chemicals. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102* (14), p 7204–7210.
- [8] Auersvald, M.; Macek, T.; Schulzke, T.; Staš, M.; Šimáček, P., Influence of Biomass Type on the Composition of Bio-Oils from Ablative Fast Pyrolysis. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2020**, *150* (April), p 104838.

- [9] Sanches Filho, P. J.; Silveira, L. A.; Betemps, G. R.; Oliveira, P. K.; Sampaio, D. M.; de los Santos, D. G., Use of Lyophilization as Analytical Strategy for Chromatographic Characterization of Aqueous Phase of Bio-Oil Produced by Rice Husk Pyrolysis. *Microchem. J.* **2020**, *152* (October 2019), p 104457.
- [10] Staš, M.; Auersvald, M.; Kejla, L.; Vrtiška, D.; Kroufek, J.; Kubička, D., Quantitative Analysis of Pyrolysis Bio-Oils: A Review. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2020**, *126* (2020),.
- [11] Crepier, J.; Le Masle, A.; Charon, N.; Albrieux, F.; Duchene, P.; Heinisch, S., Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography Hyphenated to Atmospheric Pressure Chemical Ionization High Resolution Mass Spectrometry for the Characterization of Fast Pyrolysis Bio-Oils. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2018**, *1086* (April), p 38–46.
- [12] Collard, F. X.; Blin, J., A Review on Pyrolysis of Biomass Constituents: Mechanisms and Composition of the Products Obtained from the Conversion of Cellulose, Hemicelluloses and Lignin. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *38*, p 594–608.
- [13] Hameed, S.; Sharma, A.; Pareek, V.; Wu, H.; Yu, Y., A Review on Biomass Pyrolysis Models: Kinetic, Network and Mechanistic Models. *Biomass and Bioenergy* **2019**, *123* (February), p 104–122.
- [14] Hu, X.; Gholizadeh, M., Biomass Pyrolysis: A Review of the Process Development and Challenges from Initial Researches up to the Commercialisation Stage. *J. Energy Chem.* **2019**, *39* (x), p 109–143.
- [15] Wang, S.; Dai, G.; Yang, H.; Luo, Z., Lignocellulosic Biomass Pyrolysis Mechanism: A State-of-the-Art Review. *Prog. Energy Combust. Sci.* **2017**, *62*, p 33–86.
- [16] Kan, T.; Strezov, V.; Evans, T. J., Lignocellulosic Biomass Pyrolysis: A Review of Product Properties and Effects of Pyrolysis Parameters. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2016**, *57*, p 1126–1140.
- [17] Pang, Y. X.; Yan, Y.; Foo, D. C. Y.; Sharmin, N.; Zhao, H.; Lester, E.; Wu, T.; Pang, C. H., The Influence of Lignocellulose on Biomass Pyrolysis Product Distribution and Economics via Steady State Process Simulation. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2020**, No.

July, p 104968.

- [18] Chernova, N. I.; Kiseleva, S. V.; Larina, O. M.; Sytchev, G. A., Manufacturing Gaseous Products by Pyrolysis of Microalgal Biomass. *Int. J. Hydrogen Energy* **2020**, *45* (3), p 1569–1577.
- [19] Kumar, R.; Strezov, V.; Weldekidan, H.; He, J.; Singh, S.; Kan, T.; Dastjerdi, B., Lignocellulose Biomass Pyrolysis for Bio-Oil Production: A Review of Biomass Pre-Treatment Methods for Production of Drop-in Fuels. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2020**, *123* (November 2019),.
- [20] Cheng, F.; Bayat, H.; Jena, U.; Brewer, C. E., Impact of Feedstock Composition on Pyrolysis of Low-Cost, Protein- and Lignin-Rich Biomass: A Review. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2020**, *147* (January), p 104780.
- [21] Foong, S. Y.; Chan, Y. H.; Cheah, W. Y.; Kamaludin, N. H.; Tengku Ibrahim, T. N. B.; Sonne, C.; Peng, W.; Show, P. L.; Lam, S. S., Progress in Waste Valorization Using Advanced Pyrolysis Techniques for Hydrogen and Gaseous Fuel Production. *Bioresour. Technol.* **2021**, *320* (PA), p 124299.
- [22] Xin, X.; Dell, K.; Udugama, I. A.; Young, B. R.; Baroutian, S., Transforming Biomass Pyrolysis Technologies to Produce Liquid Smoke Food Flavouring. *J. Clean. Prod.* **2020**, No. xxxx, p 125368.
- [23] Cabeza, L. F.; Palacios, A.; Serrano, S.; Ürge-Vorsatz, D.; Barreneche, C., Comparison of Past Projections of Global and Regional Primary and Final Energy Consumption with Historical Data. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2018**, *82* (October 2016), p 681–688.
- [24] International Energy Agency (IEA). *Energy Efficiency* **2018**, IEA, Paris. <https://www.iea.org/reports/energy-efficiency-2018> (acessada em 11 de fevereiro de 2020).
- [25] Nunes, L. J. R.; Causer, T. P.; Ciolkosz, D., Biomass for Energy: A Review on Supply Chain Management Models. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2020**, *120* (December 2019), p 109658.

- [26] Lorenci Woiciechowski, A.; Dalmas Neto, C. J.; Porto de Souza Vandenberghe, L.; de Carvalho Neto, D. P.; Novak Sydney, A. C.; Letti, L. A. J.; Karp, S. G.; Zevallos Torres, L. A.; Soccol, C. R., Lignocellulosic Biomass: Acid and Alkaline Pretreatments and Their Effects on Biomass Recalcitrance – Conventional Processing and Recent Advances. *Bioresour. Technol.* **2020**, *304* (October 2019), p 122848.
- [27] Santos, R. M.; Bispo, D. F.; Granja, H. S.; Sussuchi, E. M.; Ramos, A. L. D.; Freitas, L.S., Pyrolysis of the Caupi Bean Pod (*Vigna unguiculata*): Characterization of Biomass and Bio-Oil. *J. Braz. Chem. Soc.* **2020**, *00*, p 1-12.
- [28] Edilton, J.; Júnior, L.; Maria, J.; Neuman, J.; Neiva, M., Caracterização Físico-Química de Subprodutos Obtidos Do Processamento de Frutas Tropicais Visando Seu Aproveitamento Na Alimentação Animal. *Rev. Ciência Agronômica* **2006**, *37* (1), p 70–76.
- [29] Rezende, S. C. de, Valorização Da Casca Do Pinhão, Um Subproduto Da Semente de Araucaria Angustifolia, Para Produção de Materiais Poliméricos., Dissertação de Mestrado, Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, **2016**.
- [30] Moldes, D.; Gallego, P. P.; Rodríguez Couto, S.; Sanromán, A., Grape Seeds: The Best Lignocellulosic Waste to Produce Laccase by Solid State Cultures of *Trametes Hirsuta*. *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25* (6), p 491–495.
- [31] Elizalde-González, M. P.; Hernández-Montoya, V., Guava Seed as an Adsorbent and as a Precursor of Carbon for the Adsorption of Acid Dyes. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100* (7), p 2111–2117.
- [32] Dai, G.; Zhu, Y.; Yang, J.; Pan, Y.; Wang, G.; Reubroycharoen, P.; Wang, S., Mechanism Study on the Pyrolysis of the Typical Ether Linkages in Biomass. *Fuel* **2019**, *249* (January), p 146–153.
- [33] Chen, G. Q.; Wu, X. F., Energy Overview for Globalized World Economy: Source, Supply Chain and Sink. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *69* (November 2016), p 735–749.
- [34] Ren, S.; Ye, X. P.; Borole, A. P.; Kim, P.; Labbé, N., Analysis of Switchgrass-Derived

Bio-Oil and Associated Aqueous Phase Generated in a Semi-Pilot Scale Auger Pyrolyzer. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2016**, *119*, p 97–103.

- [35] Li, H.; Xu, Q.; Xue, H.; Yan, Y., Catalytic Reforming of the Aqueous Phase Derived from Fast-Pyrolysis of Biomass. *Renew. Energy* **2009**, *34* (12), p 2872–2877.
- [36] Zhou, M.; Xiao, G.; Wang, K.; Jiang, J., Catalytic Conversion of Aqueous Fraction of Bio-Oil to Alcohols over CNT-Supported Catalysts. *Fuel* **2016**, *180*, p 749–758.
- [37] Vispute, T. P.; Zhang, H.; Sanna, A.; Xiao, R.; Huber, G. W., Renewable Chemical Commodity Feedstocks from Integrated Catalytic Processing of Pyrolysis Oils. *Science (80-.)*. **2010**, *330* (6008), p 1222–1227.
- [38] Liaw, S. S.; Perez, V. H.; Westerhof, R. J. M.; David, G. F.; Frear, C.; Garcia-Perez, M., Biomethane Production from Pyrolytic Aqueous Phase: Biomass Acid Washing and Condensation Temperature Effect on the Bio-Oil and Aqueous Phase Composition. *Bioenergy Res.* **2020**,.
- [39] Chen, D.; Wang, Y.; Liu, Y.; Cen, K.; Cao, X.; Ma, Z.; Li, Y., Comparative Study on the Pyrolysis Behaviors of Rice Straw under Different Washing Pretreatments of Water, Acid Solution, and Aqueous Phase Bio-Oil by Using TG-FTIR and Py-GC/MS. *Fuel* **2019**, *252* (January), p 1–9.
- [40] Silva, R. V. S.; Gonçalves, A. D.; Vinhal, J. O.; Cassella, R. J.; Santos, R. C.; Dal Sasso, M. A.; Peixoto, B. S.; Borba-Santos, L. P.; Rozental, S.; Azevedo, D. A.; et al., Bioproducts from the Pyrolysis of Castor Seed Cake: Basic Dye Adsorption Capacity of Biochar and Antifungal Activity of the Aqueous Phase. *J. Environ. Chem. Eng.* **2021**, *9* (1), p 0–1.
- [41] Zhang, S. P.; Li, X. J.; Li, Q. Y.; Xu, Q. L.; Yan, Y. J., Hydrogen Production from the Aqueous Phase Derived from Fast Pyrolysis of Biomass. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2011**, *92* (1), p 158–163.
- [42] Xing, R.; Dagle, V. L.; Flake, M.; Kovarik, L.; Albrecht, K. O.; Deshmane, C.; Dagle, R. A., Steam Reforming of Fast Pyrolysis-Derived Aqueous Phase Oxygenates over Co, Ni, and Rh Metals Supported on MgAl₂O₄. *Catal. Today* **2016**, *269*, p 166–174.

- [43] Satinover, S. J.; Elkasabi, Y.; Nuñez, A.; Rodriguez, M.; Borole, A. P., Microbial Electrolysis Using Aqueous Fractions Derived from Tail-Gas Recycle Pyrolysis of Willow and Guayule. *Bioresour. Technol.* **2019**, *274* (September 2018), p 302–312.
- [44] Kaombe, D. D.; Hägg, M. B., Forward Osmosis for the Dewatering of Pyrolysis Oil Aqueous Phase. *Sep. Purif. Technol.* **2014**, *138*, p 92–97.
- [45] Ge, L.; Li, S.; Lisak, G., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Advanced Sensing Technologies of Phenolic Compounds for Pharmaceutical and Biomedical Analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *179*, p 112913.
- [46] Angelo, P. M.; Jorge, N., Compostos Fenólicos Em Alimentos - Uma Breve Revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2007**, *66* (1), p 1–9.
- [47] Guzelciftci, B.; Park, K. B.; Kim, J. S., Production of Phenol-Rich Bio-Oil via a Two-Stage Pyrolysis of Wood. *Energy* **2020**, *200*, p 117536.
- [48] Elumalai, S.; Arumugam, B.; Kundu, P.; Kumar, S., Phenol Derivatives of Lignin Monomers for Aromatic Compounds and Cycloalkane Fuels; *Elsevier B.V.*, **2020**,.
- [49] Awasthi, A.; Dhyani, V.; Biswas, B.; Kumar, J.; Bhaskar, T., Production of Phenolic Compounds Using Waste Coir Pith: Estimation of Kinetic and Thermodynamic Parameters. *Bioresour. Technol.* **2019**, *274* (September 2018), p 173–179.
- [50] Raza, W.; Lee, J.; Raza, N.; Luo, Y.; Kim, K. H.; Yang, J., Removal of Phenolic Compounds from Industrial Waste Water Based on Membrane-Based Technologies. *J. Ind. Eng. Chem.* **2019**, *71*, p 1–18.
- [51] Duan, W.; Meng, F.; Cui, H.; Lin, Y.; Wang, G.; Wu, J., Ecotoxicity of Phenol and Cresols to Aquatic Organisms: A Review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *157* (April), p 441–456.
- [52] United States Environmental Protection Agency. Priority Pollutant List. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf> (acessado em 15 de abril de 2020).
- [53] Jun, L. Y.; Yon, L. S.; Mubarak, N. M.; Bing, C. H.; Pan, S.; Danquah, M. K.; Abdullah, E. C.; Khalid, M., An Overview of Immobilized Enzyme Technologies for

- Dye and Phenolic Removal from Wastewater. *J. Environ. Chem. Eng.* **2019**, 7 (2), p 102961.
- [54] Maurício Rigo, Estudo de Biodegradação de Compostos Fenólicos Em Águas Residuárias. **2005**, p 183.
- [55] del Pozo, C.; Bartrolí, J.; Puy, N.; Fàbregas, E., Separation of Value-Added Chemical Groups from Bio-Oil of Olive Mill Waste. *Ind. Crops Prod.* **2018**, 125 (August), p 160–167.
- [56] Gruber, B.; David, F.; Sandra, P., Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Current Trends and Perspectives. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2020**, 124 (xxxx),.
- [57] Kanaujia, P. K.; Naik, D. V.; Tripathi, D.; Singh, R.; Poddar, M. K.; Siva Kumar Konathala, L. N.; Sharma, Y. K., Pyrolysis of Jatropha Curcas Seed Cake Followed by Optimization of Liquid-Liquid Extraction Procedure for the Obtained Bio-Oil. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2016**, 118, p 202–224.
- [58] Mukarakate, C.; Evans, R. J.; Deutch, S.; Evans, T.; Starace, A. K.; Ten Dam, J.; Watson, M. J.; Magrini, K., Reforming Biomass Derived Pyrolysis Bio-Oil Aqueous Phase to Fuels. *Energy and Fuels* **2017**, 31 (2), p 1600–1607.
- [59] Silva, R. V. S.; Pereira, V. B.; Stelzer, K. T.; Almeida, T. A.; Romeiro, G. A.; Azevedo, D. A., Comprehensive Study of the Liquid Products from Slow Pyrolysis of Crambe Seeds: Bio-Oil and Organic Compounds of the Aqueous Phase. *Biomass and Bioenergy* **2019**, 123 (February), p 78–88.
- [60] Storbeck, K. H.; Gilligan, L.; Jenkinson, C.; Baranowski, E. S.; Quanson, J. L.; Arlt, W.; Taylor, A. E., The Utility of Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (UHPSFC-MS/MS) for Clinically Relevant Steroid Analysis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2018**, 1085 (January), p 36–41.
- [61] Si, W.; Liu, Y.; Xiao, Y.; Guo, Z.; Jin, G.; Yan, J.; Shen, A.; Zhou, H.; Yang, F.; Liang, X., An Offline Two-Dimensional Supercritical Fluid Chromatography × Reversed Phase Liquid Chromatography Tandem Quadrupole Time-of-Flight Mass

Spectrometry System for Comprehensive Gangliosides Profiling in Swine Brain Extract. *Talanta* **2020**, *208* (September 2019), p 120366.

- [62] Perrenoud, A. G.; Veuthey, J.; Guillarme, D., Trends in Analytical Chemistry The Use of Columns Packed with Sub-2 Mm Particles in Supercritical Fluid Chromatography. *Trends Anal. Chem.* **2014**, *63*, p 44–54.
- [63] West, C., Recent Trends in Chiral Supercritical Fluid Chromatography. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2019**, *120*, p 115648.
- [64] Saito, M., History of Supercritical Fluid Chromatography: Instrumental Development. *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, *115* (6), p 590–599.
- [65] Lesellier, E.; West, C., The Many Faces of Packed Column Supercritical Fluid Chromatography - A Critical Review. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1382*, p 2–46.
- [66] Speybrouck, D.; Lipka, E., Preparative Supercritical Fluid Chromatography: A Powerful Tool for Chiral Separations. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1467*, p 33–55.
- [67] Pilařová, V.; Plachká, K.; Khalikova, M. A.; Svec, F.; Nováková, L., Recent Developments in Supercritical Fluid Chromatography – Mass Spectrometry: Is It a Viable Option for Analysis of Complex Samples? *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2019**, *112*, p 212–225.
- [68] Tarafder, A., Metamorphosis of Supercritical Fluid Chromatography to SFC: An Overview. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2016**, *81*, p 3–10.
- [69] Cutillas, V.; García-Valverde, M.; Gómez-Ramos, M. del M.; Díaz-Galiano, F. J.; Ferrer, C.; Fernández-Alba, A. R., Supercritical Fluid Chromatography Separation of Chiral Pesticides: Unique Capabilities to Study Cyhalothrin and Metalaxyl as Examples. *J. Chromatogr. A* **2020**, No. xxxx.
- [70] Manjare, S. D.; Dhingra, K., Supercritical Fluids in Separation and Purification: A Review. *Mater. Sci. Energy Technol.* **2019**, *2* (3), p 463–484.
- [71] Berger, T. A., *Supercritical Fluid Chromatography | Applications*; Elsevier Inc., **2019**.
- [72] Crepier, J.; Le Masle, A.; Charon, N.; Albrieux, F.; Heinisch, S., Development of a

Supercritical Fluid Chromatography Method with Ultraviolet and Mass Spectrometry Detection for the Characterization of Biomass Fast Pyrolysis Bio Oils. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1510*, p 73–81.

- [73] Liu, J.; Ji, F.; Chen, F.; Guo, W.; Yang, M.; Huang, S.; Zhang, F.; Liu, Y., Determination of Garlic Phenolic Compounds Using Supercritical Fluid Extraction Coupled to Supercritical Fluid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, *159*, p 513–523.
- [74] Toribio, L.; Arranz, S.; Ares, A. M.; Bernal, J., Polymeric Stationary Phases Based on Poly(Butylene Terephthalate) and Poly(4-Vinylpyridine) in the Analysis of Polyphenols Using Supercritical Fluid Chromatography. Application to Bee Pollen. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1572*, p 128–136.
- [75] Rozet, E.; Marini, R. D.; Ziemons, E.; Boulanger, B.; Hubert, P., Advances in Validation, Risk and Uncertainty Assessment of Bioanalytical Methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *55* (4), p 848–858.
- [76] Raposo, F.; Ibelli-Bianco, C., Performance Parameters for Analytical Method Validation: Controversies and Discrepancies among Numerous Guidelines. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2020**, *129*, p 115913.
- [77] González, O.; Blanco, M. E.; Iriarte, G.; Bartolomé, L.; Maguregui, M. I.; Alonso, R. M., Bioanalytical Chromatographic Method Validation According to Current Regulations, with a Special Focus on the Non-Well Defined Parameters Limit of Quantification, Robustness and Matrix Effect. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1353*, p 10–27.
- [78] Yuwono, M.; Indrayanto, G., Validation of Chromatographic Methods of Analysis. *Profiles Drug Subst. Excipients Relat. Methodol.* **2005**, *32* (05), p 241–260.
- [79] ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – RE Nº 899, de 29 de maio de **2003**.
- [80] Pessoa, G. de P.; Santos, A. B. dos; Souza, N. C. de; Alves, J. A. C.; Nascimento, R. F. do, Desenvolvimento de Metodologia Para Avaliar Remoção de Estrogênios Em Estações de Tratamento de Esgotos. *Quim. Nova* **2012**, *35* (5), p 968–973.

- [81] Schummer, C.; Delhomme, O.; Appenzeller, B. M. R.; Wennig, R.; Millet, M., Comparison of MTBSTFA and BSTFA in Derivatization Reactions of Polar Compounds Prior to GC/MS Analysis. *Talanta* **2009**, *77* (4), p 1473–1482.
- [82] Dignac, M. F.; Houot, S.; Derenne, S., How the Polarity of the Separation Column May Influence the Characterization of Compost Organic Matter by Pyrolysis-GC/MS. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2006**, *75* (2), p 128–139.
- [83] Lanças, F. M. Fundamentos da Cromatografia Gasosa. 1ª ed. – Campinas, São Paulo: Editora Átomo, 2017.
- [84] INMETRO, Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos – DOQ-CGCRE-008, Revisão 09 – JUN/2020.
- [85] Amidon, T. E.; Bujanovic, B.; Liu, S.; Howard, J. R., Commercializing Biorefinery Technology: A Case for the Multi-Product Pathway to a Viable Biorefinery. *Forests* **2011**, *2* (4), p 929–947.
- [86] Liu, C.; Hu, J.; Zhang, H.; Xiao, R., Thermal Conversion of Lignin to Phenols: Relevance between Chemical Structure and Pyrolysis Behaviors. *Fuel* **2016**, *182*, p 864–870.
- [87] Kawamoto, H., Lignin Pyrolysis Reactions. *J. Wood Sci.* **2017**, *63* (2), p 117–132.
- [88] Åsberg, D.; Enmark, M.; Samuelsson, J.; Fornstedt, T., Evaluation of Co-Solvent Fraction, Pressure and Temperature Effects in Analytical and Preparative Supercritical Fluid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1374*, p 254–260.
- [89] West, C.; Lemasson, E.; Bertin, S.; Hennig, P.; Lesellier, E., An Improved Classification of Stationary Phases for Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1440*, p 212–228.
- [90] Taylor, L. T., Packed Column Supercritical Fluid Chromatography of Hydrophilic Analytes via Water-Rich Modifiers. *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V. 2012, pp 196–204.
- [91] Ovchinnikov, D. V.; Pokrovskiy, O. I.; Kosyakov, D. S.; Bogolitsyn, K. G.; Ul'yanovskii, N. V.; Falev, D. I., Evaluation of Temperature and Pressure Effects on

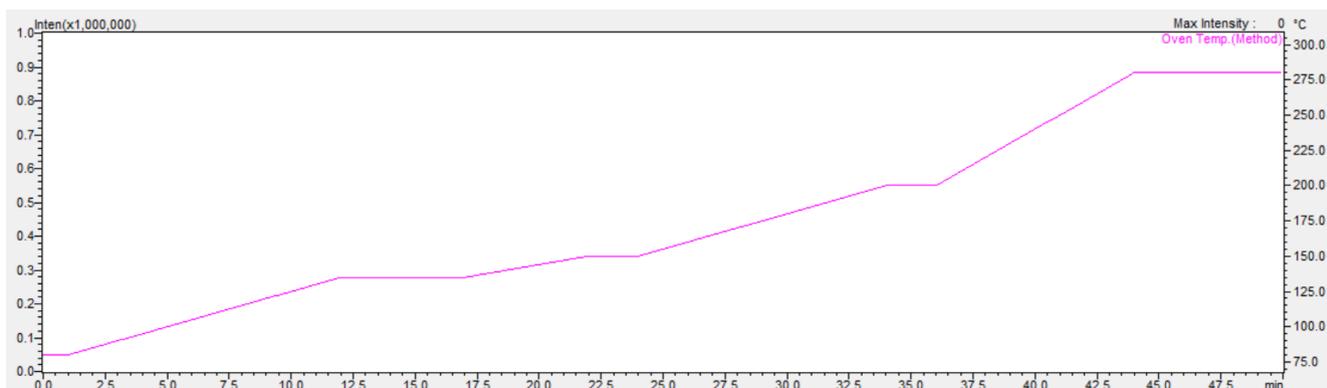
Retention in Supercritical Fluid Chromatography on Polar Stationary Phases. *J. Chromatogr. A* **2020**, *1610*, p 460600.

- [92] Fairchild, J. N.; Hill, J. F.; Iraneta, P. C., Influence of Sample Solvent Composition for SFC Separations. *LCGC North Am.* **2013**, *31* (4), p 326–333.
- [93] Sarrut, M.; Corgier, A.; Crétier, G.; Le Masle, A.; Dubant, S.; Heinisch, S., Potential and Limitations of On-Line Comprehensive Reversed Phase Liquid Chromatographyxsupercritical Fluid Chromatography for the Separation of Neutral Compounds: An Approach to Separate an Aqueous Extract of Bio-Oil. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1402*, p 124–133.

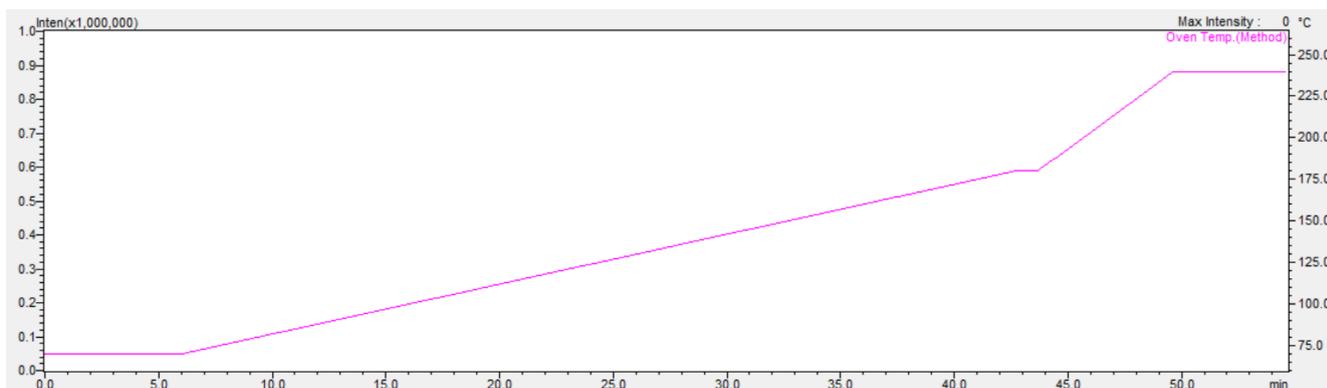
APÊNDICES

Apêndice 01: Programação das rampas de temperatura para cada coluna – GC/MS.

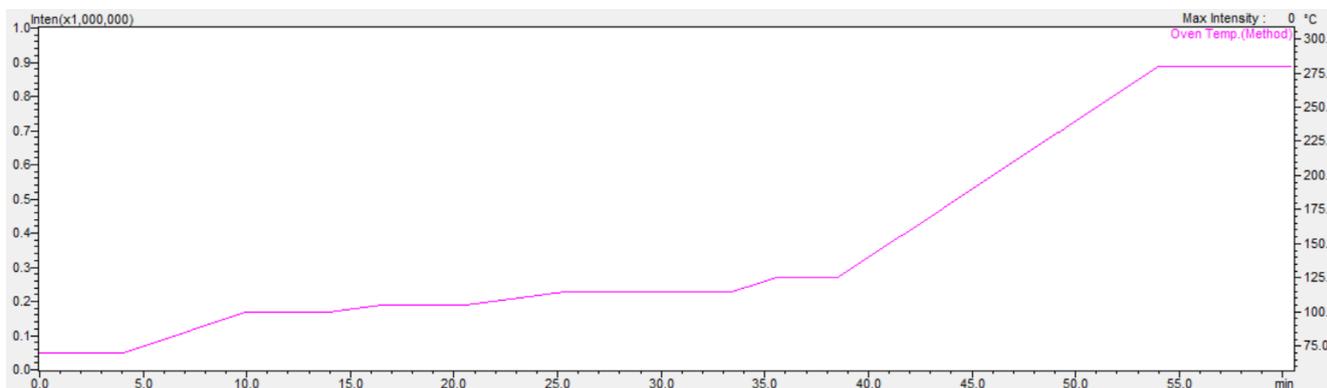
SPB – 5



ZB – Wax



Rtx – 1MS



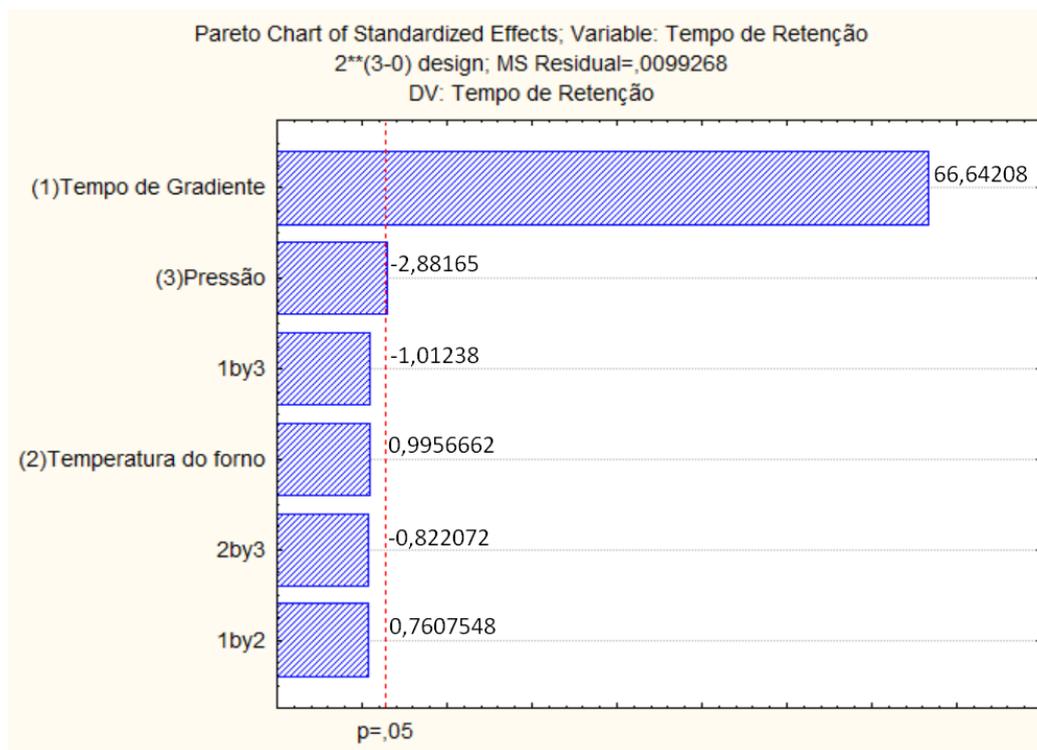
Apêndice 02: Parâmetros otimizados para as análises das frações aquosas por GC/MS.

Parâmetros	GC/MS
Tempo de derivatização	40 min
Vazão	1,0 mL.min ⁻¹
Split / Volume Injetado	1:20 / 1,0 µL
Temperatura do Injetor	280 °C
Temperatura do Detector	280 °C
Temperatura da fonte	250 °C
Coluna	SPB-5 (5%-difenil-95%-dimetilpolisiloxano)
Programação da Rampa	80 °C (1 min), 5 °C min ⁻¹ - 135 °C (5 min), 3 °C min ⁻¹ – 150 °C (2 min), 5 °C min ⁻¹ – 200 °C (2 min), 10 °C min ⁻¹ – 280 °C (6 min)
Tempo de Análise	50 min

Apêndice 03: Tabela com as concentrações dos compostos fenólicos por GC/MS.

	Concentração ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)						
	Íon (m/z)	Feijão	Pinha	Acerola	Uva	Pinhão	Goiaba
Fenol	151	549,39 \pm 0,02	432 \pm 1	830,1 \pm 0,7	630,1 \pm 0,6	1108,39 \pm 0,03	264 \pm 1
o-Cresol	91	53,91 \pm 0,01	35,61 \pm 0,12	93,0 \pm 0,1	65,9 \pm 0,1	138,86 \pm 0,01	<LQ
p-Cresol	165	90,8 \pm 0,03	69,3 \pm 0,1	125,19 \pm 0,04	115,4 \pm 0,1	189,807 \pm 0,005	69,11 \pm 0,04
m-Cresol	165	103,77 \pm 0,01	165,69 \pm 0,35	221,7 \pm 0,1	116,7 \pm 0,1	133,547 \pm 0,004	120,8 \pm 0,2
4-Etilfenol	179	49,923 \pm 0,004	46,93 \pm 0,03	52,511 \pm 0,003	47,056 \pm 0,004	52,86 \pm 0,01	56,88 \pm 0,02
Guaiacol	166	73,85 \pm 0,01	58,059 \pm 0,001	54,67 \pm 0,02	89,6 \pm 0,1	97,22 \pm 0,01	992,6 \pm 2,6
o-Catecol	73	570,3 \pm 0,3	1065 \pm 9	1400 \pm 4	3095 \pm 14	2592 \pm 3	1779 \pm 14
Resorcinol	239	85,619 \pm 0,003	94,02 \pm 0,05	133,613 \pm 0,001	133,7 \pm 0,1	-	101,16 \pm 0,02
4-Metilcatecol	73	76,42 \pm 0,03	128,88 \pm 1,47	134 \pm 1	598,3 \pm 2,3	107,06 \pm 0,24	262,5 \pm 2,3
2,6-Dimetoxifenol	196	82,355 \pm 0,002	80,64 \pm 0,03	-	-	-	313,3 \pm 0,1
Total		1736,3 \pm 0,4	2176 \pm 12	3045 \pm 6	4892 \pm 17	4420 \pm 3	3959 \pm 20

Apêndice 04: Diagrama de pareto gerado pelo Statistica 8 a partir do planejamento experimental 23 tendo como resposta o tempo de retenção do último analito.



Apêndice 05: Parâmetros otimizados para as análises das frações aquosas por UHPSFC.

Parâmetros	
Fase Estacionária	Torus 2-PIC
Vazão	0,8 ml.min ⁻¹
Modificador orgânico	MeOH:H ₂ O (95:5)
Pressão	2250 psi
Temperatura	40 °C
Tempo de Gradiente do modificador	18 min (18%)
Natureza do diluente	H ₂ O

Apêndice 06: Tabela com as concentrações dos compostos fenólicos por UHPSFC.

	Concentração (mg.L ⁻¹)					
	Feijão	Pinha	Acerola	Uva	Pinhão	Goiaba
Fenol	303 ± 42	982 ± 12	555 ± 24	< LQ	1787 ± 35	285 ± 15
4-Metilcatecol	< LQ	290 ± 16	674 ± 3	1808 ± 6	1177 ± 33	418 ± 15
o-Catecol	836 ± 56	1378 ± 4	1647 ± 3	5828 ± 4	3276 ± 81	1835 ± 6
Resorcinol	749 ± 11	448 ± 8	1913 ± 8	362 ± 9	265 ± 10	374 ± 5
Guaiacol	< LQ	< LQ	< LQ	165 ± 3	179 ± 2	3137 ± 59
Total	1888 ± 109	3098 ± 40	4789 ± 38	8163 ± 22	6684 ± 161	6049 ± 100