



# UFAL

**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

DÉBORA SOARES DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE  
PRODUTOS DA CONVERSÃO DA CELULOSE**

**Universidade Federal de Alagoas**

**Campus A. C. Simões  
Tabuleiro do Martins  
57072-970 - Maceió-AL**

**DÉBORA SOARES DA SILVA**

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A  
DETERMINAÇÃO DE PRODUTOS DA CONVERSÃO DA CELULOSE**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do grau de Mestre em Química Analítica.

Orientadora: Profa. Dra. **Janaína Heberle Bortoluzzi**

Co-orientadora: Profa. Dra. **Rusiene Monteiro de Almeida**

Maceió, 10 de Março de 2017

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S586o Silva, Débora Soares da  
Otimização e validação de uma metodologia analítica par a determinação de  
Produtos da conversão da celulose / Débora Soares da Silva. – 2017.  
91 f. : il.

Orientadora: Janaína Heberle Bortoluzzi.

Coorientadora: Rusiene Monteiro de Almeida.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal  
de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 83-91.

1. Conversão. 2. Celulose. 3. Otimização. 4. Cromatografia Líquida de Alta  
Eficiência (HPLC) - Validação. I. Título.

CDU: 544.47



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA

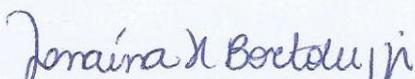


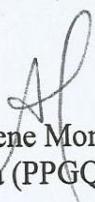
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone/Fax: (82) 3214-1144  
email: ppgqb.ufal@gmail.com

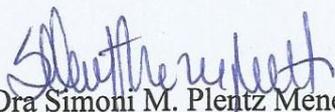
FOLHA DE APROVAÇÃO

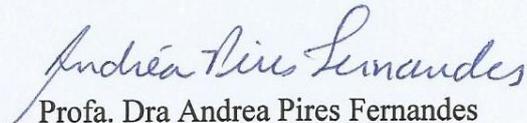
Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Débora Soares da Silva**, intitulada: “**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE PRODUTOS DA CONVERSÃO DA CELULOSE**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 10 de março de 2017, às 08:30, na Sala de Aulas do PPGQB.

COMISSÃO JULGADORA:

  
Profa Dra. Janaína Heberle Bortoluzzi  
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

  
Profa Dra. Rusiene Monteiro de Almeida  
Coorientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

  
Profa. Dra Simoni M. Plentz Meneghetti  
(PPGQB/IQB/UFAL)

  
Profa. Dra Andrea Pires Fernandes  
(IQB/UFAL)

*À minha mãe, fonte de minhas forças e à minha irmã, exemplo que sempre procurei seguir, dedico-lhes este trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me dar força, discernimento e sabedoria frente à todas as adversidades.

A toda a minha família, em especial a minha amada mãe, Noemia, por todo seu amor e carinho em todos os momentos da minha vida e a minha irmã Daniela, por todo incentivo e companheirismo, com todo carinho, meu muito obrigada.

A minha orientadora, Profa. Janaína e co-orientadora, Profa. Rusiene pela amizade, apoio, paciência, atenção e transferência de conhecimento desde a iniciação científica até a orientação desta dissertação.

A Profa. Dra. Andréa Pires Fernandes, Profa. Dra. Simoni Margareti Plentz Meneghetti, Prof. Dr. Diógenes Meneses e à Profa. Dra. Jailma Barros dos Santos por aceitarem o convite para participação da banca de defesa do mestrado.

Ao Cristian que me auxiliou tanto no manuseio do HPLC quanto em questionamentos teóricos surgidos e não menos importante tornou-se um grande amigo, compartilhando momentos tristes, cansativos, estressantes, porém, gratificantes, e sim tiveram momentos felizes, descontraídos e de muitas risadas. Obrigada querido amigo!

À todos os colegas de pesquisa do Grupo de Catálise e Reatividade Química, em especial ao Filipe, Lucas, Josinha e Nilson, por todos os momentos de descontração, companheirismo e experiências científicas.

À todos os professores do Instituto Química e Biotecnologia pelo comprometimento e empenho durante todo o curso de Mestrado em Química Analítica.

À Capes pelo apoio e bolsa concedida.

À secretaria da Pós-Graduação e todos os funcionários.

Muito Obrigada!

## RESUMO

Devido à grande demanda energética global e a preocupação com a preservação ambiental, a utilização de fontes de energia renovável está se tornando uma estratégia muito importante. Neste sentido, a celulose é atualmente um dos recursos renováveis mais abundantes e promissores, pois através do seu processamento pela reação de hidrólise são obtidos biocombustíveis e insumos de grande interesse industrial, como: hidroximetilfurfural (HMF), dihidroxiacetona (DHA), piruvaldeído, gliceraldeído e os ácidos acético, fórmico, láctico e levulínico. Diante disso, o presente trabalho propõe a otimização e a validação de uma metodologia analítica baseada na técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação dos produtos da conversão da celulose. A otimização do método proposto foi avaliada de forma univariada e de forma multivariada. No método otimizado por HPLC utiliza uma coluna de troca catiônica, uma solução de  $H_2SO_4$ , como fase móvel com  $pH=1,41$ , temperatura da coluna e do detector de  $42^\circ C$  e  $30^\circ C$ , respectivamente, fluxo de  $0,9\text{ mL/min}$  e tempo total de análise de  $25,40$  minutos. Para este estudo foram utilizados 10 padrões analíticos (glicose, frutose, gliceraldeído, piruvaldeído, ácido láctico, dihidroxiacetona, ácido fórmico, ácido acético, ácido levulínico e HMF). O método de HPLC foi validado através da verificação de parâmetros como, seletividade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, precisão (repetitividade, precisão intermediária, precisão instrumental), exatidão e robustez. Estes parâmetros foram avaliados levando-se em consideração tanto a área quanto à altura dos picos. As curvas analíticas apresentaram coeficiente de correlação  $\geq 0,9972$ . A metodologia proposta mostrou-se sensível e precisa para a faixa de concentração adotada de  $5$  a  $500\ \mu\text{g/mL}$ . Na precisão instrumental, precisão intermediária e repetitividade foram obtidos valores de  $CV \leq 6,33\%$ . A exatidão do método apresentou valores de recuperação de  $90,58$  a  $106,87\%$ , o método proposto é robusto apenas para pequenas variações de  $pH (\pm 1)$  e temperatura  $(\pm 5)$  para dihidroxiacetona, glicose e piruvaldeído, fato que pode ser explicado pelo alto valor de temperatura e  $pH$ , ficando esta variação para estudos futuros.

Palavras chaves: Celulose. Otimização. Validação. HPLC.

## ABSTRACT

Due to high global energy demand and a concern for environmental preservation, a renewable energy source is becoming a very important strategy. In this sense, a cellulose is one of the most abundant and promising renewable resources, as its treatment by hydrolysis reaction are obtained biofuels and inputs of great industrial interest, such as: hydroxymethylfurfural (HMF), dihydroxyacetone (DHA), pyruvatedehyde, glyceraldehyde Acetic, formic, lactic and levulic acids. Therefore, the present work proposes an optimization and validation of an analytical methodology in the technique of high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of cellulose conversion products. The optimization of the proposed method was evaluated in a univariate and multivariate fashion. In the HPLC-optimized method, a cation exchange column, a solution of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, was used as mobile phase with pH = 1.41, column temperature and detector of 42 °C and 30 °C respectively, flow of 0.9 mL / Min and total analysis time of 25.40 minutes. 10 analytical standards (glucose, fructose, glyceraldehyde, pyruvate, lactic acid, dihydroxyacetone, formic acid, acetic acid, levulinic acid and HMF) were used for this study. The HPLC method was validated by parameter selection, selectivity, linearity, limit of detection and limit of quantification, precision (repeatability, intermediate precision, instrumental accuracy), accuracy and robustness. These have been taken into consideration both the area and the height of the peaks. Analytical curves showed correlation coefficient  $\geq 0.9972$ . The proposed methodology proved to be sensitive and accurate for a range of 5 to 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . In the instrumental precision, intermediate accuracy and repeatability values of CV  $\leq 6,33\%$  were obtained. Accuracy offers assessment methods from 90.58 to 106.87%, the proposed method is robust only for small variations of pH ( $\pm 1$ ) and temperature ( $\pm 5$ ) for dihydroxyacetone, glucose and pyruvate, which can be explained by the high temperature and pH values.

Keywords: Cellulose. Optimization. Validation. HPLC.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Emissões de dióxido de carbono relacionadas com a energia do mundo por tipo de combustível, 1990-2040 (bilhões de toneladas) .....	19
<b>Figura 2.</b> Geração líquida de eletricidade mundial por fonte de energia, 2012 - 40 (trilhões de quilowatts-horas) .....	20
<b>Figura 3.</b> Principais componentes da biomassa lignocelulósica.....	21
<b>Figura 4.</b> Distribuição dos importantes componentes orgânicos da biomassa lignocelulósica.....	21
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática da molécula de celulose .....	21
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de hidrólise da celulose catalisada por ácido .....	24
<b>Figura 7.</b> Possibilidades de aplicações dos derivados químicos da celulose .....	25
<b>Figura 8.</b> Isomerização da glicose em frutose.....	26
<b>Figura 9.</b> Reações de conversão da frutose.....	27
<b>Figura 10.</b> Estrutura da coluna MetaCarb 87H, copolímero de estireno divinilbenzeno sulfonado na forma de H <sup>+</sup> .....	30
<b>Figura 11.</b> Detecção por IR de analitos presentes em diferentes amostras.....	31
<b>Figura 12.</b> Parâmetros de avaliação da resolução em cromatografia .....	40
<b>Figura 13.</b> Separação em função da Rs (razão: pico-altura) .....	41
<b>Figura 14.</b> Representação gráfica da matriz Doehlert com duas variáveis ( __ ) com adição de novos experimentos (.....).....	51
<b>Figura 15.</b> Cromatograma obtido na análise da solução de 1000 µg/mL dos padrões: 1-glicose, 2- frutose, 3- gliceraldeído, 4-piruváldéido, 5-ácido láctico, 6-dihidroxiacetona, 7-ácido fórmico, 8-ácido acético, 9- ácido levulínico e 10-HMF. Fase móvel H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH 1,27), fluxo 0,70 mL/min, temperatura da coluna 55 °C.....	54
<b>Figura 16.</b> Efeito do pH na resolução dos compostos. Compostos 5, 6, 8 e 9, são ácido láctico, dihidroxiacetona, ácido acético e ácido levulínico, respectivamente ....	55
<b>Figura 17.</b> Efeito da temperatura da coluna na resolução dos compostos. Compostos 5, 6, 8 e 9, são ácido láctico, dihidroxiacetona, ácido acético e ácido levulínico, respectivamente.....	57

<b>Figura 18.</b> Efeito da temperatura do detector na resolução dos compostos. Compostos 5, 6, 8 e 9, são ácido láctico, dihidroxiacetona, ácido acético e ácido levulínico, respectivamente.....	58
<b>Figura 19.</b> Efeito da taxa de fluxo da fase móvel na resolução dos compostos. Compostos 5, 6, 8 e 9, são ácido láctico, dihidroxiacetona, ácido acético e ácido levulínico, respectivamente .....	59
<b>Figura 20.</b> Diagrama de Pareto do efeito das variáveis na resolução dos picos 5,6 e 8,9. Os números 5 e 6, 8 e 9 correspondem aos compostos ácido láctico e dihidroxiacetona e ácido acético e ácido levulínico, respectivamente .....	61
<b>Figura 21.</b> Gráfico de Superfície resposta em função das variáveis pH e temperatura na resolução dos picos 1/2 (A); 2/3 (B); 3/4 (C) e 4/5 (D) .....	63
<b>Figura 22.</b> Gráfico de Superfície resposta em função das variáveis pH e temperatura na resolução dos picos 5/6 (E); 6/7 (F); 7/8 (G); 8/9 (H) e 9/10(I) .....	64
<b>Figura 23.</b> Cromatogramas obtidos das análises de seletividade para a matriz isenta (cor rosa) e matriz fortificada com os padrões de trabalho (em preto).....	68
<b>Figura 24.</b> Curvas analíticas da determinação pela área do pico de cada padrão analítico. (A) – Glicose; (B) – Frutose; (C) – Gliceraldeído; (D) – Piruvaldeído; (E) - Ácido láctico; (F) – Dhidroxiacetona; (G) – Ácido fórmico; (H) – Ácido acético; (I) – Ácido levulínico e (J) HMF .....	69
<b>Figura 25.</b> Curvas analíticas da determinação pela altura do pico de cada padrão analítico. (A) – Glicose; (B) – Frutose; (C) – Gliceraldeído; (D) – Piruvaldeído; (E) - Ácido láctico; (F) – Dhidroxiacetona; (G) – Ácido fórmico; (H) – Ácido acético; (I) – Ácido levulínico e (J) HMF .....	71
<b>Figura 26.</b> Cromatograma obtido na aplicação do método para a reação de hidrólise da celulose. Condições reacionais: temperatura de 190°C, à 10 bar, com 60 mL de água deionizada, catalisador MoO <sub>3</sub> /TiO <sub>2</sub> , 0,48g de celulose e tempo reacional de 1h. Picos 1,2,3,4,5,6 e 7 são equivalentes aos compostos glicose, frutose, gliceraldeído, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético e HMF, respectivamente .....	84
<b>Figura 27.</b> Cromatograma obtido na aplicação do método para a reação de conversão da frutose. Condições reacionais: temperatura de 190°C, à 10 bar, com	

60 mL de água deionizada, catalisador de óxido de estanho ( $\text{SnO}_2$ ), 0,48g de frutose e tempo reacional de 30 min. Picos 1,2,3,4,5,6,7 e 8 são equivalentes aos compostos glicose, frutose, gliceraldeído, ácido lático, dihidroxiacetona, ácido fórmico, ácido acético e HMF, respectivamente.  
 .....83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Trabalhos relatados na literatura científica que fazem uso da técnica de HPLC para identificar os possíveis produtos da reação de hidrólise da celulose.....	37
<b>Tabela 2.</b> Padrões analíticos da Sigma utilizados na otimização e validação do método cromatográfico .....	49
<b>Tabela 3.</b> Ensaios realizados para o planejamento fatorial completo $2^3$ com ponto central.....	51
<b>Tabela 4.</b> Experimentos realizados com a matriz Doehlert para as variáveis pH.....	52
<b>Tabela 5.</b> Resoluções obtidas para os compostos com a variação do pH da fase móvel.....	56
<b>Tabela 6.</b> Resoluções obtidas para os compostos com a variação da temperatura da coluna.....	57
<b>Tabela 7.</b> Resoluções obtidas com a variação da temperatura do detector.....	59
<b>Tabela 8.</b> Resoluções obtidas para os compostos com a variação do fluxo da fase móvel.....	60
<b>Tabela 9.</b> Parâmetros utilizados no Planejamento fatorial completo $2^3$ com ponto central e os resultados de resolução obtidos. Os números 5 e 6, 8 e 9 correspondem aos compostos ácido lático e dihidroxiacetona e ácido acético e ácido levulínico, respectivamente.....	61
<b>Tabela 10.</b> Resoluções entre todos os picos (analitos) obtidas com a matriz Doehlert .....	62
<b>Tabela 11.</b> Novos ensaios realizados com base na avaliação das superfícies de resposta.....	65

<b>Tabela 12.</b> Parâmetros estudados na otimização univariada e multivariada.....	66
<b>Tabela 13.</b> Comparação do método otimizado com dois trabalhos da literatura.....	67
<b>Tabela 14.</b> Determinação dos fatores de seletividade ( $\alpha$ ) .....	68
<b>Tabela 15.</b> Coeficientes de correlação e equação da reta das curvas analíticas obtidas no intervalo de 5 $\mu\text{g/mL}$ a 500 $\mu\text{g/mL}$ para todos os padrões analíticos.....	73
<b>Tabela 16.</b> Limites de detecção e limites de quantificação obtidos através dos dados das curvas analíticas .....	74
<b>Tabela 17.</b> Intervalo linear obtido das curvas de calibração.....	75
<b>Tabela 18.</b> Dados obtidos para o estudo da precisão instrumental do método.....	76
<b>Tabela 19.</b> Dados obtidos para a Repetitividade.....	77
<b>Tabela 20.</b> Dados obtidos para a Precisão intermediária .....	78
<b>Tabela 21.</b> Comparação dos coeficientes de variação entre os dois analistas na determinação da precisão intermediária .....	79
<b>Tabela 22.</b> Teste $F$ para a comparação dos desvios-padrão dois analistas na determinação da precisão intermediária.....	80
<b>Tabela 23.</b> Valores obtidos para o ensaio de recuperação.....	81
<b>Tabela 24.</b> Variação obtida com a mudança da temperatura da coluna.....	82
<b>Tabela 25.</b> Variação obtida com a mudança do pH da fase móvel.....	83

## LISTA DE ABREVIACOES

CV – Coeficiente De Variação

DHA – Dihidroxiacetona

EIA – *Energy Information Administration* (Administração Internacional de Energia)

EUA – United States of America (Estados Unidos da América)

EURACHEM – *A Focus for Analytical Chemistry in Europe* (Rede de Normas de Química Analítica Europeia)

FM – Fase Móvel

GCaR – Grupo de Catálise e Reatividade Química

HCOOH – cido fórmico

HMF – Hidroximetilfurfural

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida De Alta Eficiência)

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IR – ndice de Refração

kWh – Quilowatt-hora

LQ - Limite de Quantificação

LD – Limite de Detecção

NaOH – Hidróxido de Sódio

PVA – Poli Acetato De Vinila

Rs – Resolução

SnO<sub>2</sub> – xido de estanho

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	18
<b>2.1 Geral</b> .....	18
<b>2.2 Específicos</b> .....	18
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
<b>3.1 Aproveitamentos da biomassa para a geração de energia e produtos químicos</b> .....	19
<b>3.2 Biomassa</b> .....	21
3.2.1 A celulose .....	22
<b>3.3 Mecanismo da hidrólise da celulose</b> .....	23
3.3.1 Hidrólise enzimática .....	23
3.3.1 Hidrólise ácida .....	24
<b>3.4 Produtos obtidos através da hidrólise da celulose</b> .....	25
3.4.1 Glicose .....	25
3.4.2 Frutose .....	26
3.4.3 Gliceraldeído .....	27
3.4.4 Piruvaldeído .....	27
3.4.5 Dihidroxiacetona .....	28
3.4.6 Ácido láctico, ácido fórmico e ácido acético .....	28
3.4.7 Ácido levulínico .....	28
3.4.7 Hidroximetilfurfural .....	29
<b>3.5 Técnicas analíticas utilizadas na determinação dos produtos da reação de hidrólise da celulose</b> .....	29
3.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	29
3.5.1.1 Coluna de troca iônica .....	29
3.5.1.1 Detector de índice de refração .....	30
3.5.2 Estudos com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência ..	31
<b>3.6 Otimização, desenvolvimento e validação de métodos analíticos</b> ...	39
3.6.1 Resolução .....	40
3.6.2 Planejamento Fatorial 2 <sup>3</sup> e Matriz Doehlert .....	41
3.6.3 Validação de métodos analíticos .....	42
3.6.3.1 Seletividade .....	43

3.6.3.2 Linearidade e faixa linear .....	44
3.6.3.3 Precisão .....	44
3.6.3.3.1 Precisão instrumental .....	44
3.6.3.3.2 Repetitividade .....	44
3.6.3.3.3 Precisão intermediária .....	45
3.6.4 Exatidão.....	45
3.6.5 Robustez.....	45
3.6.6 Limite de Detecção e limite de Quantificação .....	46
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>47</b>
4.1 Equipamentos .....	47
4.2 Materiais.....	47
4.3 Solventes e padrões analíticos.....	48
4.4 Otimização do método para identificação dos produtos da reação de hidrólise da celulose por HPLC .....	50
4.5 Parâmetros de validação .....	52
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>54</b>
5.1 Otimização da metodologia analítica de forma univariada .....	54
5.1.2 Otimização do pH da fase móvel .....	55
5.1.3 Otimização da temperatura da coluna .....	56
5.1.4 Otimização da temperatura do detector .....	58
5.1.4.5 Otimização do fluxo da fase móvel.....	59
5.2 Otimização da metodologia analítica de forma multivariada .....	60
5.3 Comparação das otimizações realizadas de forma univariada e multivariada .....	66
<b>5.4 Validação da metodologia analítica baseada em cromatografia líquida de alta eficiência.....</b>	<b>67</b>
5.4.1 Seletividade.....	67
5.4.2 Linearidade .....	69
5.4.3 LD e LQ.....	73
5.4.4 Precisão .....	75
5.4.4.1 Precisão instrumental.....	75
5.4.4.2 Repetitividade .....	76
5.4.4.3 Precisão intermediária.....	77
5.4.5 Recuperação .....	80

5.4.6 Robustez .....	81
5.5. Aplicação da metodologia proposta .....	83
6. <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	86
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87

## 1. INTRODUÇÃO

Devido à grande demanda energética global e a preocupação com a preservação ambiental tem-se recorrido a recursos renováveis como a celulose, a qual quando submetida ao processo de hidrólise gera açúcares como: glicose, frutose, xilose e galactose (YUAN et. al., 2016).

Açúcares como a glicose e frutose podem ainda ser convertidos em outros produtos de grande interesse industrial, tais como: hidroximetilfurfural (HMF), dihidroxiacetona (DHA), pirivaldeído, gliceraldeído e os ácidos fórmico, acético, láctico e levulínico (CHHEDA et. al., 2007).

Os açúcares e outros produtos que são obtidos a partir da biomassa são usualmente analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e sua popularidade se dá por apresentar algumas vantagens, como, preparação relativamente simples de amostras e uma a capacidade de detectar e quantificar diferentes açúcares simultaneamente (SLUITER et. al., 2008, SLUITER et. al., 2011 e ZHANG E RUNGE, 2012).

Esta técnica é a mais empregada em diversos trabalhos da literatura na área da catálise (ZHOU, et. al. 2014; LIN et. al. 2015; WANG, et. al. 2015; ZHANG, et. al. 2015; YUAN, et. al. 2016; LIU, et. al. 2016; OGO et. al. 2016; ROMERO, 2016; TSUBAKI, et. al. 2016). Desta forma, os métodos analíticos utilizados levam em consideração apenas a eficiência dos catalisadores em estudo e questões importantes em metodologias de análises, como um maior número de compostos detectados em um menor tempo de corrida são negligenciados, fatores importantes que contribuem na qualidade e eficiência das indústrias.

Desta forma, visando à grande importância da determinação de açúcares e produtos obtidos na reação de hidrólise e degradação da celulose e derivados e o nenhum relato da literatura quanto à validação do método cromatográfico para este tipo de reação, é proposta à otimização e validação de uma metodologia analítica utilizando HPLC para a separação, identificação e quantificação dos produtos da hidrólise e degradação da celulose.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Otimizar e validar uma metodologia analítica para a separação, identificação e quantificação dos produtos obtidos na reação de degradação da celulose pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- ✓ Otimizar a metodologia analítica de forma univariada;
- ✓ Otimizar a metodologia analítica de forma multivariada com planejamento fatorial  $2^3$  e matriz Doehlert;
- ✓ Comparar as otimizações do método feitas de forma univariada e multivariada;
- ✓ Validar a metodologia analítica através da avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, faixa linear, robustez, limite de detecção e limite de quantificação;
- ✓ Avaliar a eficiência da metodologia proposta através da análise de amostras reais.

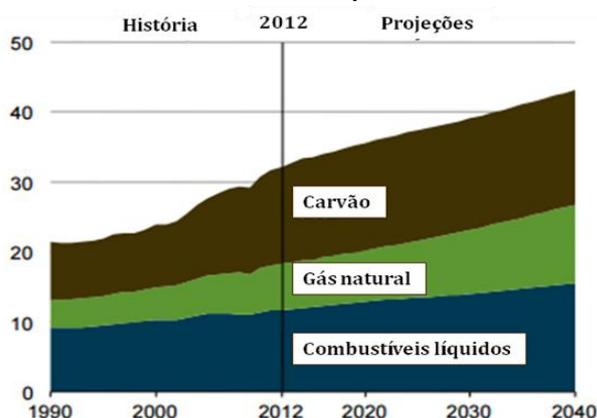
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Aproveitamentos da biomassa para a geração de energia e produtos químicos

Recursos fósseis como, petróleo, gás natural e carvão são os principais responsáveis pelo abastecimento de energia e inúmeros materiais modernos, como polímeros, resinas, têxteis, lubrificantes, fertilizantes, etc. Os custos da exploração, desenvolvimento e de acesso a esses recursos fósseis não renováveis são refletidos no preço de barril do petróleo, cujo valor em 2015, chegou à marca de US\$ 95,00 por barril e projeta-se o aumento para US\$ 125,00 por barril, em 2035. Além do alto preço, os combustíveis derivados do petróleo apresentam efeitos negativos ao meio ambiente, como o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera terrestre, resultado da queima dos combustíveis fósseis, causando grande impacto ao clima global (EIA, 2011 e CAMPBELL et. al., 1998).

Segundo a EIA 2016, as emissões de CO<sub>2</sub> provenientes do petróleo e seus derivados aumentarão de 32,2 bilhões de toneladas em 2012 para 35,6 bilhões de toneladas em 2020 e 43,2 bilhões de toneladas métricas em 2040, conforme mostra a Figura 1. Esse aumento é atribuído ao desenvolvimento de alguns países e sua necessidade em combustíveis fósseis para atender ao crescimento acelerado da demanda de energia (EIA, 2016).

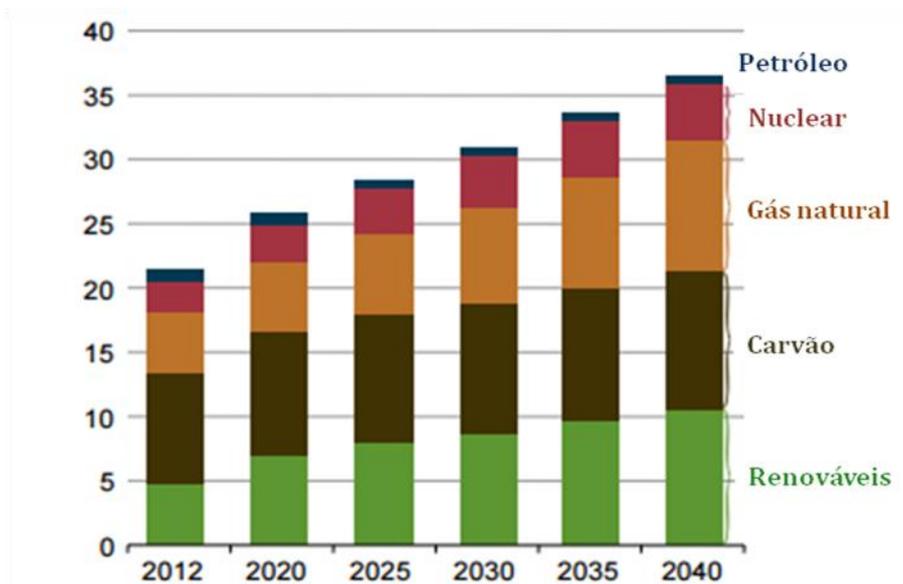
**Figura 1 - Emissões de dióxido de carbono relacionadas com a energia do mundo por tipo de combustível, 1990-2040 (bilhões de toneladas).**



Fonte: Adaptado do relatório anual da Administração Internacional de Energia (EIA), 2016.

A demanda energética mundial vai de 21,6 trilhões de quilowatts-hora (kWh), em 2012 para 25,8 trilhões de kWh em 2020 e para 36,5 trilhões de kWh em 2040 (Figura 2). Muitos países adotaram políticas e regulamentos para reduzir as emissões de gases do efeito estufa, isto tem influenciado no crescimento da utilização de energia renovável que mostram aumentos médios de 2,9% por ano de 2012 a 2040, representando um total de 5% da produção mundial em 2012.

**Figura 2 - Geração líquida de eletricidade mundial por fonte de energia, 2012-40 (trilhões de quilowatts-hora).**



Fonte: Adaptado do relatório anual da Administração Internacional de Energia (AIEA), 2016.

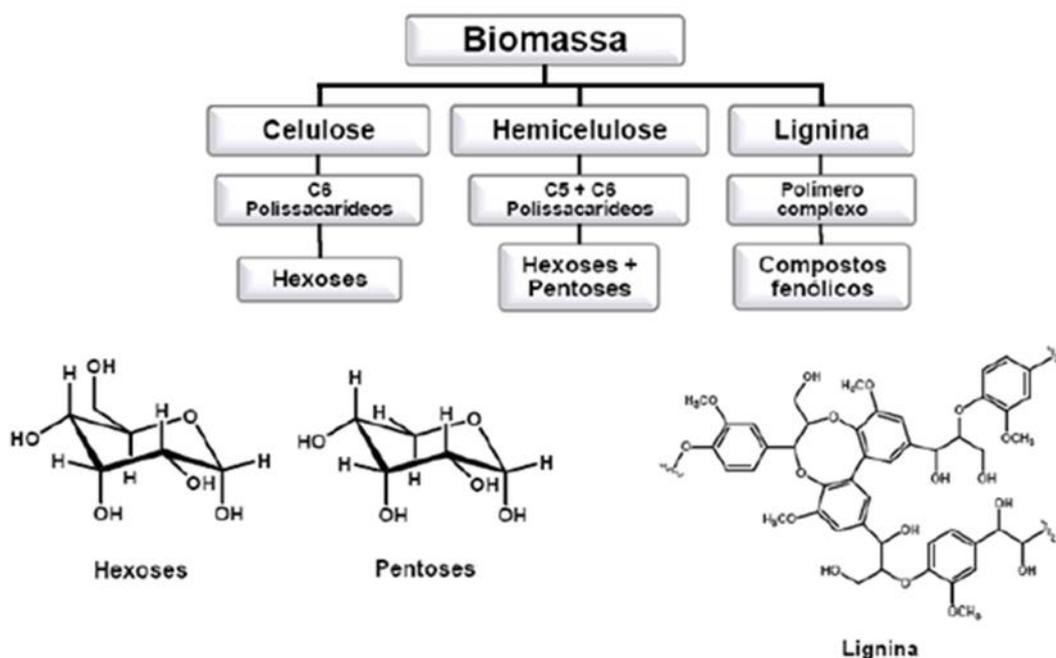
Questões como estas, estimulam à mudança na utilização de recursos fósseis por alternativas renováveis. Para um país com clima tropical, como o Brasil, a matéria prima natural indicada para substituir o petróleo é a biomassa, pois além de ser um recurso renovável, conduz à redução da emissão dos gases poluidores do ar, visto que a queima “completa” da mesma gera apenas CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (CORTEZ et. al., 1997). Além disso, esta matéria prima vem ganhando destaque mundialmente por fornecer insumos químicos de grande valia, além de geração de energia.

### 3.2 Biomassa

A biomassa pode ser definida como qualquer matéria orgânica que possa ser transformada em energia mecânica, térmica ou elétrica ou produtos químicos (Atlas de Energia Elétrica do Brasil, 2008). A biomassa que abrange madeira, gramíneas, talos de árvores e palhas é composta de celulose, hemicelulose e lignina (KLOCK, 2010).

Na Figura 3 estão representados os principais componentes da biomassa, classificados em: celulose, hemicelulose e lignina (RUBIN et. al., 2008).

Figura 3 - Principais componentes da biomassa lignocelulósica.

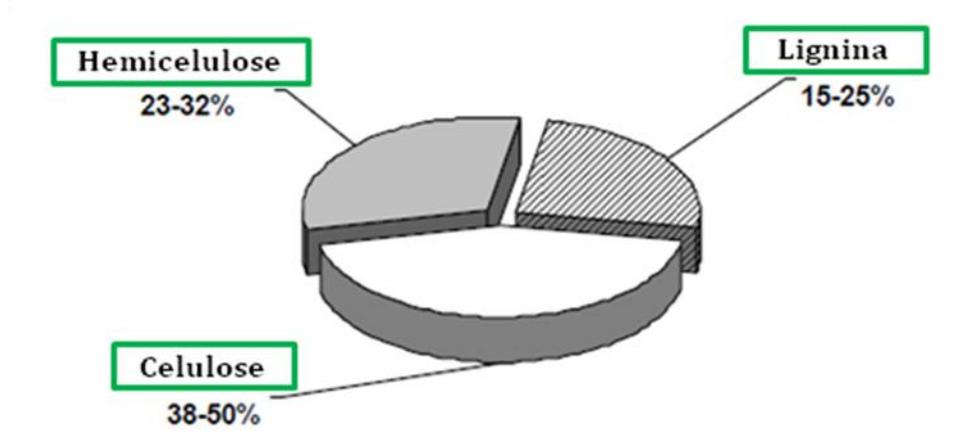


Fonte: Adaptada de RUBIN, E. M., 2008.

A celulose classifica-se como um polissacarídeo constituído de ligações entre monômeros de hexose; a hemicelulose é um heteropolissacarídeo formado por uma combinação de monômeros de pentose e hexose e a lignina é um polímero de natureza aromática com alto peso molecular que tem como base estrutural unidades de fenil-propano (CLARK et. al., 2008).

Em geral, a biomassa é constituída de 38-50% de celulose, 23-32% de hemicelulose e 15-25% de lignina, como mostra a Figura 4.

**Figura 4 - Distribuição dos importantes componentes orgânicos da biomassa lignocelulósica.**

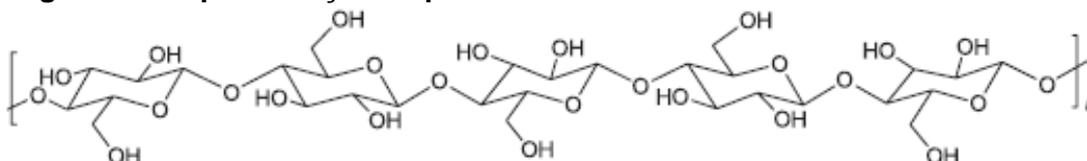


Fonte: Adaptada de GARROTE, G. et. al., 2003.

### 3.2.1 A celulose

A celulose consiste numa sequência linear de unidades de D-glicose por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), com até 10.000 unidades de glicose por molécula. A condensação de duas moléculas de  $\beta$ -D-glicose unidas por ligações deste tipo gera a celobiose, que é a repetição das unidades de glicose e assim é obtida a estrutura da celulose (Figura 5), que apresenta em uma de suas extremidades uma estrutura redutora no carbono 1 (MOTTA, Cap. 5; DA SILVA, 2011).

**Figura 5 - Representação esquemática da molécula de celulose**



Fonte: SANTOS, F. A. et. al., 2012.

A celulose é o principal componente das paredes celulares nos vegetais e um dos compostos orgânicos mais abundantes na biosfera, encontrada em frutas, hortaliças e cereais. Devido às moléculas estarem intimamente compactadas em forma de fibras longas, a celulose apresenta alto grau de cristalinidade, rigidez e é insolúvel em água, além de ser resistente à digestão pelas enzimas humanas (MOTTA e LINEBACK, 1999).

A estrutura da celulose apresenta regiões com elevado grau de cristalinidade, devido à alta organização das unidades de glicose provenientes da forte rede de ligações de hidrogênio, porém em algumas regiões de menor organização existe uma parte amorfa na celulose. Assim, na primeira região, haverá uma maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação diferentemente da segunda, na região amorfa a fibra possuirá maior flexibilidade para interagir em diferentes reações (VÁSQUEZ et. al., 2007; CASTRO, 2009).

A celulose separada dos demais componentes do material lignocelulósico irá apresentar grande reatividade conduzida pela sua estrutura química e física, que implica em deixá-la suscetível à diferentes tipos de reações, como: reações de adição, substituição, degradação e hidrólise. No entanto, a hidrólise da celulose gerando glicose e frutose destaca-se por ser o ponto de partida e ponto de entrada para obtenção de insumos importantes da indústria química (VÁSQUEZ et. al., 2007; ARANTES et. al., 2010 e HU L. et. al., 2015).

### **3.3. Mecanismo da Hidrólise da celulose**

Para o processamento de polissacarídeos, utiliza-se a reação de hidrólise que é feita com o material celulósico quebrado ou moído, visto a dificuldade de sua estrutura altamente cristalina, a qual dificulta na absorção de solventes. Dessa forma, podem ser aplicadas duas rotas no processo de hidrólise. Na primeira utiliza-se o emprego de ácidos diluídos ou como na segunda, aplicam-se enzimas como catalisadores a fim de formar produtos de degradação com bons rendimentos do material pré-tratado. Em ambas as rotas são pré-estabelecidas condições de operação que favoreçam a formação dos produtos desejados (OGEDA et. al., 2010).

#### **3.3.1 Hidrólise enzimática**

O processo de hidrólise enzimática consiste num dos principais passos para a produção de biocombustíveis de segunda geração, que ocorre inicialmente após o pré-tratamento do material lignocelulósico seguido da ação das enzimas no mesmo, liquefazendo-o antes da fermentação. As biorrefinarias

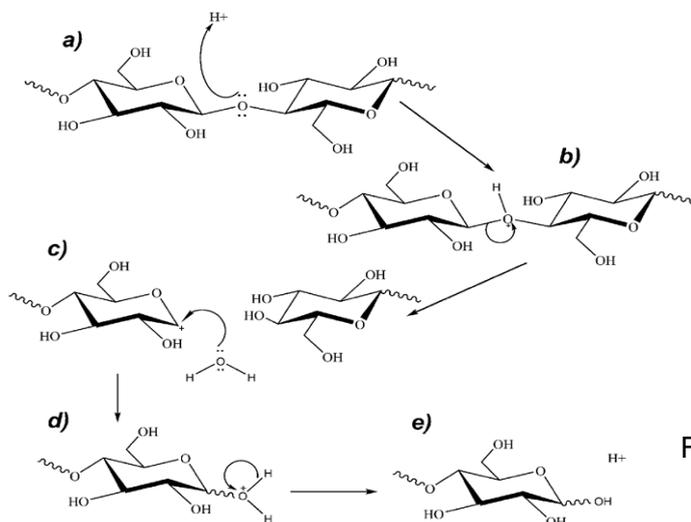
que empregam este percurso para a conversão bioquímica do material lignocelulósico em bioetanol estabelecem quatro passos principais, que consiste no pré-tratamento, na hidrólise enzimática, na fermentação e separação. O intuito da aplicação da hidrólise enzimática é quebrar as cadeias poliméricas longas da celulose, a fim de obter alguns de seus constituintes, principalmente glicose e xilose (PRUNESCU et. al., 2013).

Este processo biotecnológico, no entanto, apresenta algumas desvantagens, tais como uma baixa relação de espaço-tempo-rendimento, além da produção de pequenas quantidades de sal oriundo da regulação do pH durante a fermentação. Com as deficiências desta rota, a hidrólise ácida passa a ser uma alternativa para a produção de insumos químicos a partir da celulose (FAITH, 1945).

### 3.3.2 Hidrólise ácida

Segundo OGEDA et. al. 2010, a hidrólise ácida inicia com a protonação do oxigênio glicosídico (Figura 6 a) com posterior quebra da ligação C1–O. O carbocátion gerado na etapa b é estabilizado pela deslocalização do par de elétrons existente sobre o oxigênio do anel glicosídico, adjacente a C1. O ataque nucleofílico da água sobre C1 (Figura 6 c) com regeneração do ácido (Figura 6 d e 6 e) encerra a etapa de despolimerização (se esta ocorrer no interior da cadeia da celulose, gerando novos terminais) ou de produção de glicose (quando ocorre hidrólise diretamente nos terminais).

**Figura 6 - Mecanismo de hidrólise da celulose catalisada por ácido.**

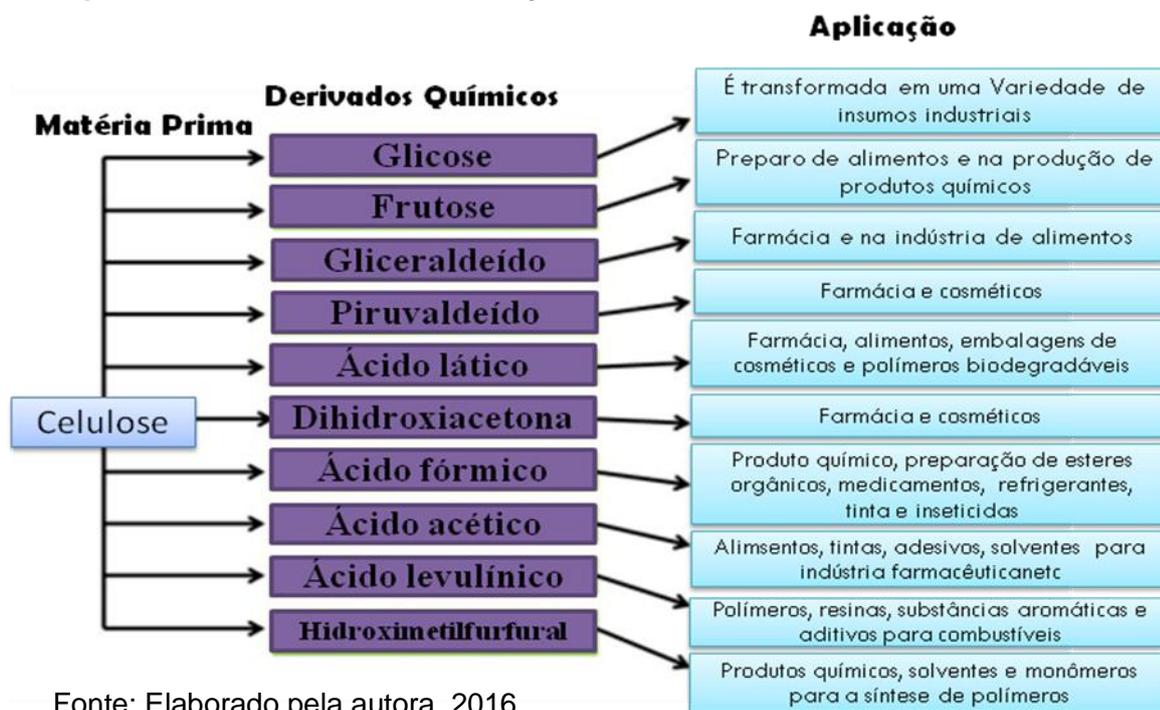


Fonte: OGEDA, T. L. et. al., 2010.

### 3.4 Produtos obtidos através da degradação da celulose

A Figura 7, mostra de forma sintética, as grandes contribuições advindas do processo da hidrólise da celulose, com a geração das espécies químicas que tem grande valor comercial e grande importância para a sociedade.

Figura 7. Possibilidades de aplicações dos derivados químicos da celulose.



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

#### 3.4.1. Glicose

A glicose é um dos compostos mais importantes para o metabolismo biológico e é o componente básico mais abundante dos polissacarídeos, tais como amido e celulose. Por não ser geralmente disponível na natureza é necessário o uso de tecnologias modernas para sua consequente produção por amido ou de celulose (ARGUN et. al., 2016).

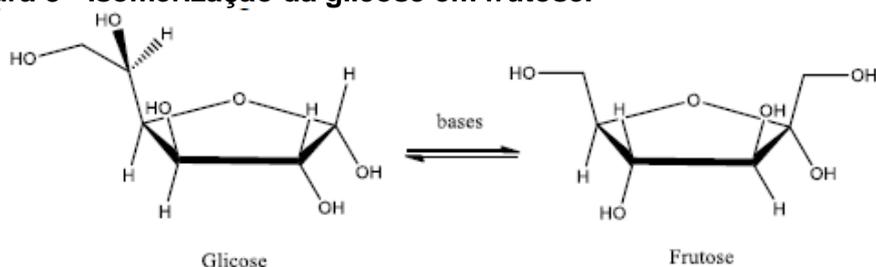
Esta substância química possui cinco grupos hidroxilas e um grupo aldeído, que a deixa com características de poli-alcoois e aldeídos, o que a torna uma matéria-prima ideal para sintetizar vários produtos químicos e combustíveis. Além disso, a conversão da glicose leva a produtos que podem ser aplicados em sua forma final (KHOWALA et. al., 2008; GUO et. al., 2016).

Assim, este recurso renovável tem atraído atenção não somente para suprir às crescentes demandas de energia, mas também para a obtenção de importantes insumos químicos, logo, esta linha de pesquisa pode ser ampliada com a possibilidade de obtenção de outros insumos derivados da glicose.

### 3.4.2 Frutose

A isomerização de glicose para frutose é um passo fundamental no processo de biorrefinarias de celulose (Figura 8). Esse processo é utilizado no ramo dietético visando à produção de alimentos e bebidas "light", pois a cor, características higroscópicas e a redução da viscosidade do edulcorante são melhoradas (ARGUN et. al., 2016).

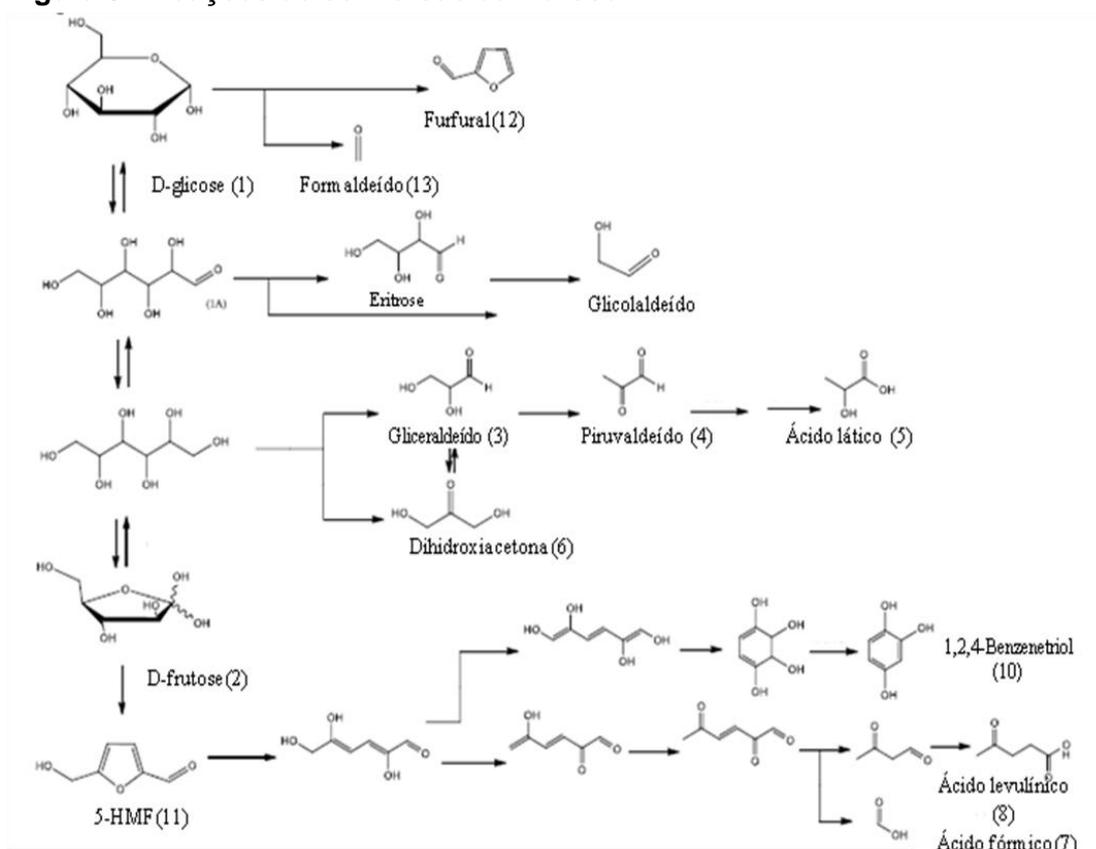
**Figura 8 - Isomerização da glicose em frutose.**



Fonte: Adaptada de GAILY, M. H. et. al., 2010.

No que concerne a aplicação industrial a frutose é pouco empregada, visto que sua maior atenção está direcionada para fins alimentícios, porém quando a mesma é submetida à determinadas condições de temperaturas e pressões em meio aquoso, pode fornecer diversos produtos químicos, como por exemplo, HMF, ácido fórmico e ácido levulínico, conforme mostra a Figura 9 (AIDA et. al., 2007 e FERREIRA et. al., 2009).

Figura 9 - Reações de conversão da frutose.



Fonte: Adaptada de AIDA et. al., 2007.

### 3.4.3 Gliceraldeído (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>)

O Gliceraldeído é um açúcar natural de três carbonos, de fórmula química molecular C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>. Classificado como uma triose, o gliceraldeído possui em sua estrutura um grupo carbonila na extremidade da molécula, semelhante à glicose. Além da importante aplicabilidade do gliceraldeído na química fina, o mesmo apresenta características que servem como intermediário do metabolismo de carboidratos (MOTA et. al, 2011 e SHEN et. al., 2015).

### 3.4.4 Piruváldeído (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>)

O piruváldeído é um composto orgânico obtido através da desidratação do gliceraldeído e é frequentemente utilizado na indústria cosmética como agente redutor isento de enxofre (HARPE e KRIPP, 2010).

#### 3.4.5 Dihidroxiacetona ( $C_3H_6O_3$ )

A dihidroxiacetona (DHA) pode ser obtida através da conversão rápida e reversível do gliceraldeído. Ela possui aplicabilidade na indústria cosmética, estando presente na composição de bronzeadores e na fabricação de polímeros. Além disso, a dihidroxiacetona é também responsável por dar origem a produtos da química fina como 1,2 propileno e ácido láctico (MOTA, et. al., 2009; HEKMAT, et. al., 2003; BICKER, et. al., 2005).

#### 3.4.6 Ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ ); ácido fórmico ( $CH_2O_2$ ) e ácido acético ( $CH_3COOH$ )

Assim como o ácido láctico, o ácido fórmico e o ácido acético são amplamente utilizados nas mesmas áreas comerciais, sendo matérias-primas básicas das indústrias alimentar e farmacêutica. Ademais, o ácido láctico é empregado na fabricação de polímeros biodegradáveis (poli ácido láctico). Estes produtos químicos podem ser obtidos por síntese química ou por fermentação, esta segunda opção exige condições críticas de temperatura e pH, por exemplo ao aumentar a temperatura pode ocorrer a ruptura da estrutura espacial da enzima e dessa forma a mesma se desnatura, inviabilizando o processo de hidrólise. Optando-se assim pela utilização da hidrólise com solventes químicos, que diferente da fermentação apresenta maiores rendimentos (GAO et. al., 2013).

#### 3.4.7 Ácido levulínico ( $C_5H_8O_3$ )

O ácido levulínico é obtido através das etapas de reidratação e desidratação do hidroximetilfurfural (HMF). Este composto químico é usado como um agente aromatizante de alimentos e também pode ser empregado como material de partida para a preparação de uma variedade de compostos farmacêuticos e industriais tais como polímeros, como acrilato e aditivos químicos (CHOUDHARY et. al., 2013; SUN et. al., 2016).

### 3.4.8 5-Hidroximetilfurfural

O 5-Hidroximetilfurfural (5-HMF) é considerado uma espécie química promissora obtida a partir de recursos renováveis. A obtenção mais frequente do HMF é através da rota sintética que compreende a hidrólise da celulose em glicose. Este produto químico pode ser utilizado como intermediário para a obtenção do herbicida natural ácido  $\delta$ -aminolevulínico, do ingrediente ativo do produto farmacêutico ranitidina e também pode ser aplicado na síntese de poliésteres e poliamidas (DONATE, 2014).

## 3.5 Técnicas analíticas utilizadas na determinação dos produtos da reação de hidrólise da celulose

Os compostos liberados da biomassa lignocelulósica podem ser determinados por diversas técnicas atuais, tais como, técnicas colorimétricas (MARSDEN et. al., 1982), espectroscopia ultravioleta (HU et. al., 2008), cromatografia gasosa (TAPPI, 2009) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (SLUITER et. al., 2011).

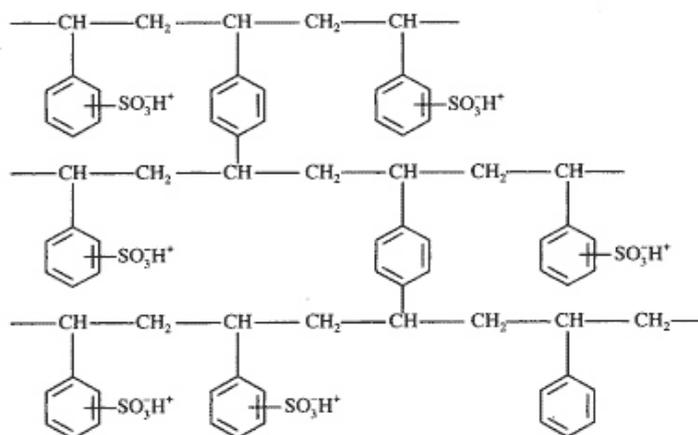
### 3.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A HPLC é a técnica analítica mais tradicional para análises destes produtos, por possuir muitas vantagens, tais como: a capacidade de detectar e quantificar diferentes açúcares simultaneamente, apresentar a preparação de amostras relativamente simples e permitir a utilização de diferentes colunas (SLUITER et. al., 2008, SLUITER et. al., 2011 e ZHANG E RUNGE, 2012).

#### 3.5.1.1 Coluna de troca iônica

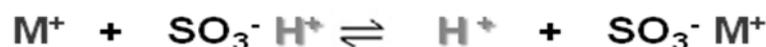
A coluna cromatográfica geralmente empregada para determinação de açúcares é uma coluna de troca iônica, mais especificamente catiônica, a qual é formada por ligações cruzadas do copolímero de estireno divinilbenzeno sulfonado na forma de  $H^+$  como mostra a Figura 11.

**Figura 10 - Estrutura da coluna MetaCarb 87H, copolímero de estireno divinilbenzeno sulfonado na forma de H<sup>+</sup>.**



Fonte: Adaptado de Harris, 2012.

As colunas de troca catiônica são adquiridas comercialmente na forma de sais de Na<sup>+</sup> ou de íon hidrônio (H<sup>+</sup>). Sua retenção baseia-se na atração eletrostática reversível entre os íons da fase móvel (da amostra e do eluente) e os centros imobilizados de carga oposta presentes na fase estacionária. A equação abaixo, ilustra este equilíbrio entre o contra íon H<sup>+</sup> e o cátion da amostra M<sup>+</sup>.



Onde M<sup>+</sup> é o cátion ou analito de carga positiva e o H<sup>+</sup> é o contra íon da fase estacionária.

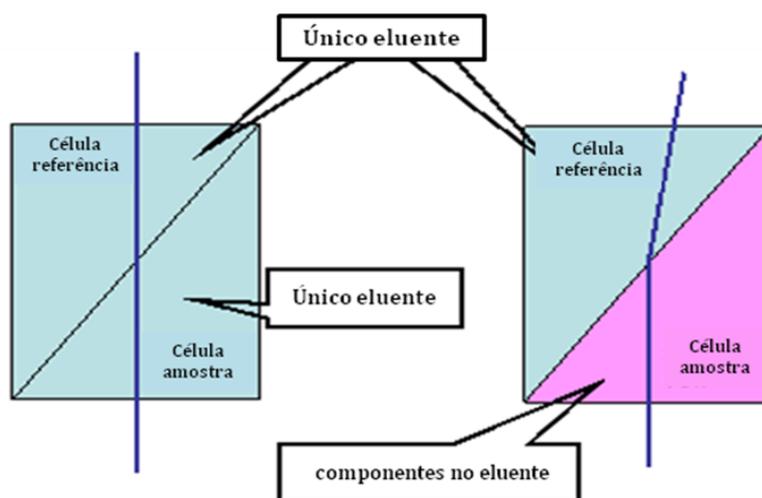
### 3.5.1.2 Detector de índice de refração

O detector normalmente utilizado com colunas de troca iônica é o índice de refração (IR), o qual é considerado um “detector universal”, visto que a mudança de índice de refração ocorre para todos os analitos. O detector de IR é apropriado para a detecção de distintos componentes, diferente do UV, em que as amostras que não possuem absorção não podem ser medidas. O IR é um detector que apresenta alta sensibilidade quando submetido a variações de temperatura.

A identificação dos compostos utilizando o detector de índice de refração é obtida quando um feixe é irradiado sobre a “célula de referência”, câmara

preenchida apenas com fase móvel, o feixe será observado em linha, pois não contém qualquer substância para analisar no presente caso (Figura 10). No entanto, na “célula da amostra”, onde o efluente terá outros componentes haverá flexão do feixe incidente, devido à diferença do índice de refração entre os dois solventes. Assim, ao medir essa mudança é visualizada a presença dos analitos de interesse.

**Figura 11 - Detecção por IR de analitos presentes em diferentes amostras.**



Fonte: Página da Waters<sup>1</sup>.

### 3.5.2 Estudos com a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência

A literatura científica dispõe de diversos trabalhos que relatam a reação de hidrólise da celulose e a identificação dos possíveis produtos desta reação através da técnica de HPLC.

O estudo realizado por Xiang, et. al., 2004 demonstra as melhores condições para a reação da hidrólise da componente celulósica da biomassa. Foi observado que em concentrações extremamente baixas de ácido sulfúrico e altas temperaturas foram obtidos produtos como: frutose, ácido levulínico, ácido fórmico, ácido acético e HMF. Os produtos foram quantificados por HPLC com detector de índice de refração e coluna Bio-Rad HPX-87H (poliestireno divinilbenzeno sulfonado na forma de H<sup>+</sup>) numa temperatura de 85 °C. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico à 0,005 mol/L com fluxo de 0,55 mL/min.

<sup>1</sup> Disponível em: <[https://http://www.waters.com/Refractive-Index-\(RI\)-Detector](https://http://www.waters.com/Refractive-Index-(RI)-Detector)> Acesso em Jul. 2016

O trabalho de Bicker et. al. 2005, investigou a influência de catalisadores metálicos (Co (II), Ni (II), Cu (II) e Zn (II)) na reação de açúcares derivados da biomassa, como sacarose, glicose e frutose. Desse processo foram obtidos produtos como, glicose, frutose, piruvaldeído, dihidroxiacetona, ácido lático, ácido acético, ácido levulínico e HMF. Estes produtos foram identificados e quantificados por HPLC com detector de índice de refração à 40 °C com uma coluna de troca catiônica (ION300H) à 50 °C. O eluente empregado foi o ácido sulfúrico numa concentração de 0,002 mol/L.

Kishida, et. al. 2006, examinou a formação de ácido lático a partir de glicolaldeído através de uma reação hidrotérmica alcalina. Portanto sob a temperatura de 300 °C durante 10 min em NaOH (0,75 mol/L) foi observada a conversão do glicolaldeído em ácido lático e também em ácido fórmico, ácido acético e piruvaldeído, que foram identificados e quantificados a partir do HPLC com detector de IR e UV e uma coluna RSpak KC-811 (poliestireno divinilbenzeno sulfonado), com ácido sulfúrico numa concentração de 0,01 mol/L.

Sluiter et. al. 2006, estudaram e quantificaram os produtos de degradação, como HMF e furfural, além de outros componentes tais como os ácidos orgânicos, lático e acético. Neste trabalho foi utilizado um HPLC equipado com um detector IR e com uma coluna Biorad Aminex HPX-87H (poliestireno divinilbenzeno sulfonado na forma de H<sup>+</sup>). Foi utilizado como fase móvel uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,005 mol/L) numa taxa de fluxo de 0,6 mL/min, temperatura da coluna foi mantida a 55 °C, resultando em um tempo de análise de 50 minutos.

No trabalho de Zhang e Runge, et. al. 2012, empregou-se o líquido iônico (cloreto de 1-alil-3-metilimidazólio) a fim de reduzir a cristalinidade e aumentar a área de superfície da celulose. Como um passo seguinte, a celulose pré-tratada foi hidrolisada na presença de um catalisador sólido (CaFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) e determinada a presença da glicose na reação. A identificação e quantificação da glicose na fase aquosa foram realizadas por HPLC com detector IR e uma

coluna Aminex HPX-87H (poliestireno divinilbenzeno sulfonado na forma de  $H^+$ ).

No estudo de Ma, et. al., 2012, focou-se no efeito de  $AlCl_3$  para obtenção dos produtos de hidrólise da celulose numa faixa de temperatura de 240 a 320 °C. Verificou-se que com concentração extremamente baixa de  $AlCl_3$  pode-se acelerar a hidrólise da celulose de forma eficaz, de modo a gerar: glicose, frutose, gliceraldeído, piruvaldeído, dihidroxiacetona, ácido láctico e HMF. Os produtos foram analisados por HPLC com detector de ultravioleta e uma coluna Shodex KS-802 operado a 80 °C, com taxa de fluxo de 1 mL/min de água deionizada.

Sánchez et. al., 2012 tiveram como objetivo principal determinar as melhores condições de reação para produzir ácido láctico pela conversão térmica de espigas de milho. Após os testes, foi obtido o ácido láctico, bem como outros produtos do fracionamento da celulose, como a glicose, ácido fórmico e ácido acético. A quantificação desses produtos foi realizada por HPLC, com detector de índice de refração e coluna Rezex™ ROA-Organic Acid  $H^+$  (8%) (poliestireno sulfonado/divinilbenzeno) numa temperatura de 40 °C. A fase móvel utilizada foi  $H_2SO_4$  à 0,005 mol/L com fluxo de 0,35 mL/min.

Zhang & Runge, 2012, demonstraram que sob condições adequadas é possível utilizar a hidrólise ácida para fracionar efetivamente a biomassa em insumos relativamente homogêneos para produzir combustíveis ou produtos químicos. Neste trabalho os produtos da degradação dos monossacarídeos, os ácidos orgânicos, acético, fórmico e levulínico e o HMF foram determinados por HPLC com detector UV e coluna analítica Supelcogel™ C610H (poliestireno sulfonado/divinilbenzeno) a uma temperatura de 50°C e fase móvel de ácido fosfórico numa concentração de 0,1% (v/v) a um fluxo constante de 0,6 mL/min.

Santos, et al. 2013, realizaram um estudo sistemático da dissolução e conversão de celulose na presença de complexos de Sn (IV) sob várias condições reacionais para verificar a influência dessas diferentes variáveis nesse processo. Os produtos detectados foram: glicose, frutose, celobiose, 5-HMF, 1,6-anidroglicose, furfuraldeído, ácidos láctico, fórmico, acético e levulínico. Tais produtos foram determinados pelo sistema de HPLC (Varian)

ProStar 210 equipado com uma coluna MetaCarb 87H (300 mm x 7,8 mm), com temperatura de 50°C. A fase móvel empregada tratou-se de uma solução ácida (0,005 mol/L) com fluxo de 0,70 mL/min.

Fajardo, et al. 2014, aplicaram nanoestruturas sintetizadas através de método hidrotermal assistido por microondas, tais espécies  $Zn_{1-x}Mn_xO$  atuaram como catalisadores na hidrólise de celulose e mostraram seletividade para a formação de glicose, frutose, 5-HMF, ácidos orgânicos (lático e fórmico) e vestígios da celobiose, 1,6-anidroglicose, gliceraldeídos e sorbitol. A determinação dos produtos foi realizada de acordo com o método descrito por Santos, et al. 2013.

Zhou, et al., 2014 estudou a perda de açúcar e os possíveis produtos da degradação da hidrólise da biomassa lignocelulósica em dois passos a fim de verificar a hipótese de que a hidrólise ácida era incompleta. Foi verificado que uma alta razão de ácido/material resultaria numa maior recuperação de carboidratos. Os produtos obtidos foram furfural, ácido levulínico e HMF, que foram quantificados por HPLC com detector UV e coluna analítica Supelcogel™ C610H (poliestireno sulfonado/divinilbenzeno) à 50 °C, empregou-se a solução de  $H_3PO_4$  (0,1% v/v) como eluente a uma taxa de fluxo de 0,60 mL/min.

Santos, et al. 2015, estudaram a conversão da frutose na presença de complexos de Sn (IV). Foram detectados glicose, 5-HMF, gliceraldeído, piruvaldeído e os ácidos orgânicos (lático, fórmico e acético). A detecção e quantificação dos diferentes produtos formados foram conduzidas pelo HPLC ProStar 210 (Varian) com uma coluna MetaCarb 87H (300 mm x 7,8 mm) programada para a temperatura de 50°C. Utilizou-se uma solução ácida (0,005 mol/L) como fase móvel e fluxo de 0,70 mL/min.

Wang, et al., 2015 relataram a hidrólise da celulose usando uma série de catalisadores em condições de irradiação de microondas. As reações empregadas à baixas concentrações mostrou-se vantajosa, indicadas pelos altos rendimentos na conversão de celulose. Foram detectados como principais produtos na reação de acordo com análise por HPLC, glicose, celobiose e HMF. Foi utilizado um HPLC, equipado com detector de UV e uma coluna de

troca iônica BioRad HPX 87H (poliestireno divinilbenzeno sulfonado na forma de  $H^+$ ) (300 mm x 7,8 milímetros) com fase móvel de ácido sulfúrico (0,005 mol/L) a 0,6 mL/min.

O trabalho de Zhang, et al. 2015 investigou uma série de líquidos iônicos sob o fracionamento da biomassa lignocelulósica. Os resultados demonstraram que estes solventes têm um grande potencial no processo da geração de biocombustíveis. Glicose, celobiose e xilose, foram determinados por HPLC com uma coluna para análises de carboidratos, Agilent ZORBAX (microesferas de sílica porosa) com temperatura de 30 °C e empregou-se como fase móvel, água deionizada mais acetonitrilo (63%) com fluxo de 0,5 mL/min.

Yuan, et al. 2016, avaliou o emprego do cloreto de metiltrioxo-1-alil-3-metilimidazólio (MTO) na transformação química da celulose. Os resultados indicaram que ao empregar o catalisador MTO à temperaturas acima de 150 °C havia o aumento do rendimento de glicose e do 5-HMF. Os produtos obtidos foram quantificados por HPLC com detector de UV e uma coluna BioRad HPX87H (poliestireno divinilbenzeno sulfonado na forma de  $H^+$ ) à 65 °C, e uma solução aquosa de ácido sulfúrico (0,005 mol/L) como fase móvel com uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min.

O estudo realizado por Tsubakia, et. al. 2016, demonstrou os efeitos da condução iônica de eletrólitos na eficiência da energia de microondas para a hidrólise hidrotérmica de amido de milho e celulose cristalina. Os resultados mostraram que o emprego de NaCl, fez com que o 5-HMF aumentasse sutilmente, já empregando o sal de  $MgCl_2$  a quantidade de 5-HMF aumentou significativamente. O rendimento de 5-HMF foi determinado por HPLC com detecção de UV a 280 nm e coluna Aminex HPX87H (poliestireno divinilbenzeno sulfonado na forma de  $H^+$ ) (300 x 7,8 milímetros) a 85 °C. Foi utilizada uma solução de ácido sulfúrico (0,008 mol/L), numa taxa de fluxo de 0,6 mL/min.

Liu, et. al. 2016 empregaram catálise heterogênea para estudar a hidrólise da celulose. Os maiores rendimentos, que foram de 72,1% e 82,5% e a seletividade de açúcares redutores – glicose, foram obtidos a 110 °C após 3 horas de reação. Os açúcares redutores foram analisados por HPLC, detector

de IR e coluna Sugar Pak (micropartículas em gel e cátions  $\text{Ca}^{2+}$ ) e solução de ácido sulfúrico (0,001 mol/L) como fase móvel a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min.

Por fim, Ogo et. al. 2016 estudou a formação de hidrocarbonetos a partir de celulose com catalisadores de platina. Os produtos obtidos, glicose, frutose, xilose, celobiose, furfural, 5-HMF, cetonas C4 e C6, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico foram analisados por HPLC com detector de UV e coluna Shodex SH-1011 (polímero reticulado).

Os trabalhos citados fornecem alguns dados de suma importância para a construção da presente pesquisa, como: o tipo de fase móvel, as colunas e as temperaturas empregadas, além dos detectores utilizados e acima de tudo os produtos identificados na reação de hidrólise da celulose. Na Tabela 1 estão resumidas estas principais informações relatadas nos estudos descritos o que comprova a popularidade da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

**Tabela 1- Trabalhos relatados na literatura científica que fazem uso da técnica de HPLC para identificar os possíveis produtos da reação de hidrólise da celulose.**

Ano	Coluna	Fase móvel (mol/L) Fluxo (mL/min)	Detector	Produtos identificados	Referência
2004	HPX-87H	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,005 mol/L) 0,6 mL/min	IR	HMF, ácido levulínico, ácido fórmico, ácido acético e frutose.	XIANG, et al.
2005	ION-300H	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,002 mol/L)	IR	Glicose, frutose, piruvaldeído, dihidroxiacetona, ácido láctico, ácido acético, ácido levulínico e HMF.	BICKER et al.
2006	RSpak KC-811	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,01 mol/L) -	IR/UV	Ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético e piruvaldeído.	KISHIDA, et al.
2008	Aminex HPX-87H	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,005 mol/L) 0,6 mL/min	IR	Glicose, ácido láctico, ácido acético e HMF.	SLUITER et al.
2012	Shodex KS-802	Água deionizada 1 mL/min	UV	Glicose, frutose, gliceraldeído, piruvaldeído, dihidroxiacetona, ácido láctico e HMF.	MA et al.
2012	Aminex HPX-87H	-	IR	Glicose	ZHANG e FANG, et al.
2012	Rezex™ ROA-Organic Acid H <sup>+</sup> (8%)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,005 mol/L) 1 mL/min 0,35 mL/min	IR	Glicose, ácido láctico, ácido fórmico e ácido acético.	SÁNCHEZ, et al.
2012	C-610H	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (1% v/v) 0,6 mL/min	UV Vis	HMF, ácido fórmico, ácido levulínico e ácido acético	ZHANG & RUNGE, 2012.
2013	MetaCarb 87H	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,005 mol/L) 0,7 mL/min	IR	Glicose, frutose, celobiose, 5-HMF, 1,6-anidroglicose, furfuraldeído, ácidos láctico, fórmico, acético e levulínico	SANTOS, et al.

2014	MetaCarb 87H	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,005 mol/L) 0,7 mL/min	IR	Glicose, frutose, 5-HMF, ácidos láctico e fórmico, celobiose, 1,6-anidroglicose, gliceraldeídos e sorbitol	FAJARDO, et al.
2014	C-610H	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (0,1 mol/L) 0,6 mL/min	UV Vis	Furfural, HMF e ácido levulínico	ZHOU, et al.
2015	MetaCarb 87H	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,005 mol/L) 0,7 mL/min	IR	Glicose, 5-HMF, gliceraldeído, piruvaldeído e os ácidos láctico, fórmico e acético	SANTOS, et al.
2015	Aminex HPX87H	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,005 mol/L) 0,6 mL/min	UV	Glicose e HMF	WANG, et al.
2015	ZORBAX Carbohidratos	Água deionizada e acetonitrila (63% v/v) 0,5 mL/min	IR	Glicose, celobiose e xilose	ZHANG, et al.
2016	Aminex HPX-87H	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,005 mol/L) 0,6 mL/min	UV	Glicose e 5-HMF	YUAN, et al.
2016	Aminex HPX-87H	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,008 mol/L) 0.6 mL/min	UV	5-HMF	TSUBAKI, et al.
2016	Sugar-Pak	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,001 mol/L) 0.6 mL/min	IR	Açúcares redutores (RS) - glicose	LIU, et al.
2016	Sugar SH-1011	–	UV Vis	Glicose, frutose, HMF, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico.	OGO et al.

Fonte: Autora, 2016. Onde (-) representa dados não obtidos ou relatados

De acordo com os dados relatados na Tabela 1,  $H_2SO_4$  é a fase móvel mais utilizada para a identificação destes produtos, assim como as colunas do tipo Sugar Pak e Aminex, as quais são colunas que apresentam a fase estacionária composta por poliestireno divinilbenzeno sulfonado, caracterizando os processos cromatográficos como um processo de troca catiônica. Os produtos da rota de hidrólise da celulose identificados variaram de acordo com os parâmetros reacionais utilizados, obtendo diferentes seletividades sob as quais os trabalhos foram desenvolvidos.

Foi observado que nos trabalhos da literatura para a reação de hidrólise da celulose, o foco principal é o desenvolvimento de catalisadores (homogêneos/heterogêneos) para a aplicação no meio reacional. Porém, quando trata-se do emprego de otimização, desenvolvimento e validação dos métodos analíticos para a identificação e quantificação destes produtos não há relatos na literatura para este tipo de reação.

### **3.6 Otimização, desenvolvimento e validação de métodos analíticos**

Grandes variações das metodologias implicam na importância da otimização e validação de métodos analíticos para as mais diferentes amostras a serem analisadas (HUBER et. al, 2007).

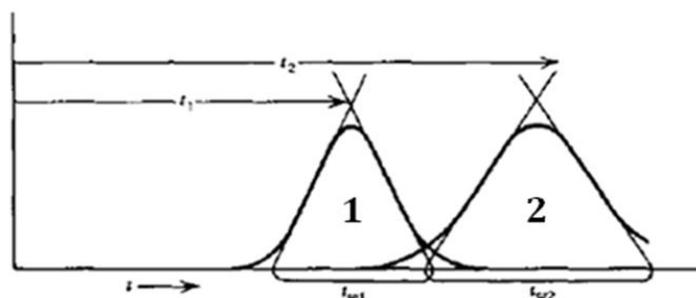
Conforme relatado no tópico anterior, utiliza-se maciçamente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para análises destes tipos de amostras. Através da recepção dos dados obtidos pelo HPLC, as variações da natureza da matriz e na composição das amostras podem influenciar na separação dos analitos. Esta separação quando não é efetiva deve ser melhorada através da proposta de otimização do método, através do fator resolução.

### 3.6.1 Resolução

De acordo com a literatura, o objetivo usual em cromatografia líquida é a separação adequada dos componentes de uma determinada amostra. Dentro deste objetivo, a resolução é uma medida quantitativa desta relação de separação. Como ilustrado pela Figura 12 e representado pela equação 1, a resolução entre dois picos adjacentes é definida como a distância entre os picos 1 e 2 divididos pela largura médias das respectivas bases (LLOYD, S. R., 1979).

**Figura 12 - Parâmetros de avaliação da resolução em cromatografia.**

$$R_s = \frac{1}{2} \frac{(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)} \quad \text{Equação 1}$$

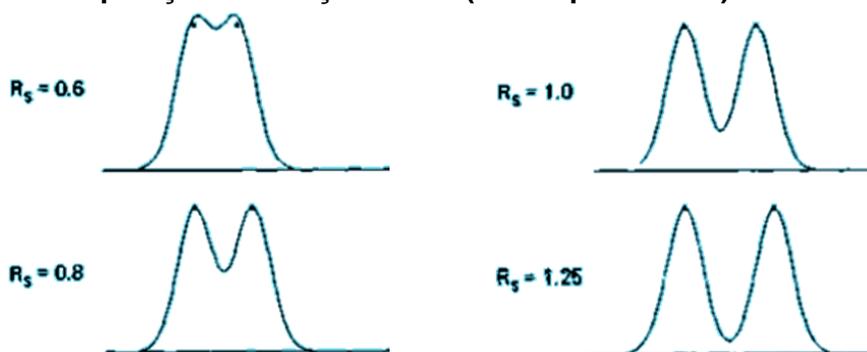


Fonte: Adaptado de LLOYD, S. R., 1979.

Onde  $t_1$  e  $t_2$  referem-se aos valores da distância entre os picos 1 e 2 e  $T_{w1}$  e  $T_{w2}$  são os valores de  $T_w$ , referentes a base da largura dos mesmos.

A Figura 13 mostra as separações de dois compostos, com diferentes valores de resolução. Quando  $R_s = 0,6$  e  $R_s = 0,8$ , são obtidas separações ruins.  $R_s = 1$ , indica que os dois picos são razoavelmente separados, isto é, apenas 2% de um pico é sobreposto por outro, se as quantidades dos dois componentes forem iguais. Dessa forma, valores maiores de  $R_s$  significa uma boa separação:  $R_s = 1,25$  é recomendado para fins quantitativos e  $R_s > 1,5$  indica separação completa (COLLINS et al., 2006).

**Figura 13 - Separação em função da  $R_s$  (razão: pico-altura)**



Fonte: Adaptado de LLOYD, S. R., 1979.

### 3.6.2 Planejamento Fatorial $2^3$ e Matriz Doehlert

Em geral, a otimização dos métodos analíticos pode ser feita através de avaliações empíricas ou estatísticas. Os processos tradicionais que otimizam de forma empírica, apresentam como desvantagens, a demanda de um maior tempo de análise e o fato de analisar um fator por vez, podendo ignorar as interações entre os fatores que são estudados. Em contrapartida, quando os processos estatísticos de otimização são aplicados estas interações são levadas em consideração (HUBER et. al, 2007).

Através dos planejamentos experimentais norteados em princípios estatísticos obtém-se o máximo de informação útil do sistema em estudo, executando um número mínimo de experimentos. Para tal procedimento, utiliza-se o planejamento fatorial completo, que é uma técnica muito empregada no estudo de duas ou mais variáveis independentes (fatores) (MARINHO et. al., 2005).

No planejamento fatorial, os efeitos (ou influências) de uma ou mais variáveis na resposta de um processo são medidos pela combinação de todas as variáveis em todos os níveis, resultando assim numa análise de uma única variável, com as combinações de todas as demais. Geralmente utilizam-se dois ou no máximo três níveis, com o intuito de não aumentar os pontos experimentais quando se propõe o planejamento (CALADO et. al., 2003).

Quando são investigados  $k$  fatores em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de  $2^k$  experimentos. Usualmente, os níveis estabelecidos correspondem a valores máximos e mínimos, isto é, pelos sinais – (menos) para o nível mais baixo e + (mais) para o nível mais alto quando são estudados fatores quantitativos (TEÓFILO et. al., 2006).

A avaliação dos efeitos das variáveis e interações entre cada fator investigado é observada através do diagrama de Pareto, que faz um levantamento preliminar das variáveis mais significativas sob a resposta do sistema em estudo. Após a construção do diagrama de Pareto, um estudo mais crítico sob as variáveis pode ser realizado, cujos fatores mais significativos no Diagrama de Pareto são estudados separadamente com mais níveis, obtendo-se assim mais informações do sistema. Este estudo é realizado segundo a metodologia de superfície de resposta, obtida através do planejamento de Doehlert, que baseiam-se em modelos matemáticos para obter os valores ideais das variáveis, ou seja, a região ótima na superfície definida pelos fatores (VILELA, 2013 e TEÓFILO et. al., 2006).

A Matriz Doehlert é utilizada quando deseja-se um tratamento mais sofisticado do estudo, isto é, determinar um conjunto ótimo de condições experimentais obtidos através dos modelos de segunda ordem, denominados de designs de superfície de resposta. Este tipo de planejamento oferecem vantagens na otimização das variáveis, como por exemplo, necessitam de menos experimentos e que são mais eficientes, visto o tratamento “fino” que é realizado (FERREIRA et. al., 2004).

### 3.6.3 Validação de métodos analíticos

Quando são concluídas todas as etapas de otimização é realizada a validação do método analítico otimizado, a fim de garantir a confiabilidade da resposta analítica obtida das amostras sob análise.

Segundo o Guia de validação e controle de qualidade analítica (2011), a validação pode ser definida como:

Determinado procedimento analítico objetiva demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os

parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação preconizados. Trata-se de um estudo experimental e integralmente documentado.

Existem várias outras definições para validação, o INMETRO (2011) e a EURACHEM (2014) atribui a validação como um instrumento pelo qual é comprovado, através de evidências objetivas que os requisitos necessários para uma aplicação ou uso específico foram atendidos. Em geral, vários autores definem validação de métodos e de acordo com a literatura tais conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladoras.

Na validação são estabelecidos parâmetros de avaliação que visam conferir credibilidade aos dados gerados, de modo a garantir que estes expressem o valor real da medida obtida. São investigados, normalmente, a linearidade, a seletividade, a precisão, a exatidão, a faixa linear, o limite de detecção e limite de quantificação e por fim os estudos de robustez são realizados. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e também figuras analíticas de mérito (CASS et al., 2001 e RIBANI et al., 2004).

Assim, tais parâmetros serão definidos, bem como suas formas de avaliação.

#### 3.6.3.1 Seletividade

A seletividade é a habilidade de um método em separar os compostos da amostra, ou seja, os compostos de interesse dos interferentes que serão detectados pelo detector. Compete a esta figura de mérito, assegurar que o sinal medido não tem influência por substâncias interferentes, como por exemplo, ingrediente ativo, impurezas e produtos de degradação, assim como outros compostos de propriedades similares que possam estar presentes (CASS et. al., 2001; RIBANI et. al., 2004; INMETRO, 2011 e EURACHEM, 2014).

A seletividade pode ser feita analisando-se diversas amostras da matriz, para que se investigue a possível presença de compostos que interfiram ou se sobreponham ao sinal do analito de interesse (CASS et al., 2001).

### 3.6.3.2 Linearidade e faixa linear

A linearidade é realizada através da construção da curva de calibração analítica, ou seja, a partir de medidas de padrões analíticos em diversas concentrações, no mínimo, cinco concentrações diferentes em triplicata ( $n > 2$ ).

A avaliação dos dados obtidos para a linearidade é feita através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, e é verificado o quanto esta reta descreve os pontos, por meio de seu coeficiente de correlação ( $r$ ). Em que, valores de  $r > 0,99$  são aceitáveis na maioria dos métodos analíticos (CASS et. al., 2001).

Em uma técnica instrumental a relação linear descrita pela equação  $y = ax + b$ , só é válida para um determinado intervalo de massa ou concentração do analito medido que também pode ser denominado faixa linear dinâmica. A faixa linear de um método analítico corresponde ao intervalo de concentração de analito em que a resposta é proporcional a concentração (HARRIS, 2008). Esta faixa tem como menor ponto, o limite inferior da faixa de concentração, ou seja, o limite de quantificação que é dependente do sistema de resposta do equipamento de medição.

### 3.6.3.3 Precisão

A precisão de um método é a habilidade do método de reproduzir o mesmo resultado, embora não necessariamente o correto, sempre que o procedimento for executado. A mesma pode ser avaliada através de três etapas, que diferem em relação às condições em que são feitas as análises, entretanto não é regra geral (CASS et. al., 2001).

#### 3.6.3.3.1 Precisão instrumental

A precisão instrumental é avaliada efetuando medidas repetitivas da mesma amostra sequencialmente e o tratamento é feito considerando a média dos valores da área do pico ou altura do pico. A precisão de um método é observada através do desvio-padrão e/ou do coeficiente de variação das medidas obtidas (RIBANI, et al., 2004).

#### 3.6.3.3.2 Repetitividade

A repetitividade mede o grau de concordância entre os resultados de uma série de replicatas de injeções sucessivas de um mesmo mensurando,

efetuada sob as mesmas condições de medição (ALBANO e RAYA-RODRIGUES, 2009). Este parâmetro envolve várias medições da mesma amostra em diferentes preparações, sendo denominado algumas vezes por precisão intra-ensaio podendo ser expressa através da estimativa do desvio padrão (RIBANI, et al., 2004), onde o recomendado pelo INMETRO são sete ou mais repetições para o cálculo.

#### 3.6.3.3.3 Precisão intermediária

Este parâmetro indica o efeito das variações dentro do laboratório em diferentes dias não consecutivos. Pode incluir medidas feitas por diferentes analistas em diferentes equipamentos. O mesmo envolve a preparação de múltiplas amostras. Este ensaio tem como objetivo verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI, et al., 2004; INMETRO, 2011).

#### 3.6.4 Exatidão

A exatidão trata-se do grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro de mensurando. Este parâmetro é avaliado pelo estudo da recuperação que defini-se como a proporção da quantidade de substância de interesse, presente ou adicionada na proporção analítica do material teste, que pode ser extraída ou quantificada (RIBANI, et al., 2004).

Sua porcentagem é calculada pela fórmula abaixo:

$$\text{Recuperação (\%)} = (\text{valor}_{\text{obtido}} / \text{valor}_{\text{adicionado}}) \times 100\%$$

Esta porcentagem é determinada por meio da comparação de análises em quintuplata de três concentrações, de brancos da amostras com soluções-padrão da amostra, as quais representam 100% de recuperação (CASS et al., 2001).

#### 3.6.5 Robustez

Através da robustez é observada a sensibilidade que o método otimizado apresenta em relação a pequenas variações de seus valores. Quando o mesmo não é afetado por pequenas alterações em seu sistema é considerado então, robusto (INMETRO, 2011). A avaliação pode ser feita através de pequenas mudanças nas variações no pH e/ou concentração da

fase móvel, alterações na performance da coluna, temperatura do ambiente, volume de amostra etc. A robustez pode ser determinada por meio da análise individual ou simultânea dos parâmetros que são mais sensíveis à variação (CASS et. al., 2001).

Se com essas alterações os resultados obtidos ainda estiverem de acordo com os limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, o método é robusto e essas alterações podem ser incorporadas no procedimento (ARAGÃO, et. al., 2009).

### 3.6.6 Limite de Detecção e limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) tem como conceito, a menor concentração do composto que pode ser medida com uma precisão especificada, dentro do critério de aceitação do método. Já o limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração da espécie de interesse que pode ser detectada pela técnica instrumental proposta (CASS et al., 2001).

LD e LQ podem ser determinados por intermédio dos dados obtidos na curva analítica, esta consideração apresenta maior confiabilidade estatística por levar em consideração o intervalo de confiança da regressão. Assim, LD neste método pode ser expresso conforme a equação 2:

$$\mathbf{LD= 3,3 \times (s/S)} \qquad \text{Equação 2}$$

Onde “s” equivale à estimativa do desvio padrão da resposta, considerado como o valor do desvio padrão do coeficiente linear da equação e “S” é a inclinação, ou coeficiente angular da curva analítica.

Na determinação do LQ, os mesmos critérios adotados para o LD podem ser aplicados utilizando a relação 10:1, observados na Equação 3. Os parâmetros necessários para aplicações destes cálculos podem ser obtidos através de Softwares como Origin® (RIBANI et al., 2004).

$$\mathbf{LQ= 10 \times (s/S)} \qquad \text{Equação 3}$$

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Equipamentos

- ✚ Cromatógrafo líquido SHIMADZU (Japão), com bomba isocrática de modelo LC-20AD, com detector de Índice de Refração RID - 10A, forno - CTO-20A e sistema de injeção manual;
- ✚ Balança analítica modelo AX200 SHIMADZU (Japão), com precisão de 0,01 mg até 200 g;
- ✚ Sistema de filtração MilliQ-Plus, Millipore® (EUA) composto por cilindro de pressurização, sistema SmartPak DQ3, lâmpada UV (185 nm) tanque e sistema com filtro 0,22  $\mu\text{m}$ , garantindo água deionizada com uma resistividade de 18,2 M $\Omega$ ;
- ✚ Sistema Ultrasônico para desgaseificação da fase móvel da marca UNIQUE (Brasil) modelo UltraSonic Cleaner.
- ✚ Sistema de filtração a vácuo composto por bomba a vácuo modelo WP611560 da MILLIPORE (EUA);
- ✚ pHmetro KEM, com titulador potenciométrico AT-500N (EUA);
- ✚ pHmetro Gehaka, com eletrodo combinado de vidro associado ao potenciômetro PG – 1800 (Brasil).

### 4.2 Materiais

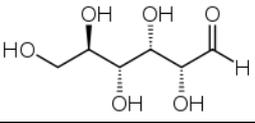
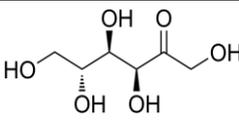
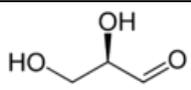
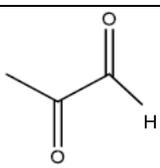
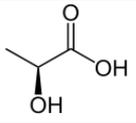
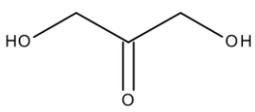
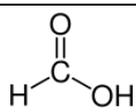
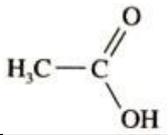
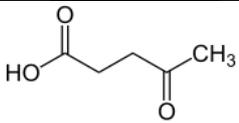
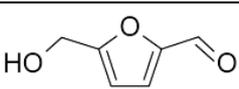
- ✚ Balões volumétricos calibrados de 1, 2, 5 e 10 mL;
- ✚ Micropipetas da marca Brand (Wertheim) com capacidades de: 0,5 à 10  $\mu\text{L}$ ; 100 à 1000  $\mu\text{L}$  e 5000 à 10000  $\mu\text{L}$  e ponteiros adequadas a cada capacidade de volume;
- ✚ Para filtração das amostras analisadas no HPLC utilizou-se filtros de PVDF (difluoreto de polivinilideno) da marca Whatman™ (Austrália) com diâmetro de 25 mm e tamanho de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ;
- ✚ Aparato de filtração de vidro da marca SUPELCO (EUA), com filtro com um filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ .

### 4.3 Solventes e padrões analíticos

- ✚ Solução de extran (5% v/v) da Sigma Aldrich (EUA) para limpeza e descontaminação de todas as vidrarias e materiais utilizados;
- ✚ Para a preparação da fase móvel de HPLC foi utilizada água deionizada obtida através do sistema de filtração MilliQ-Plus, Millipore® (EUA);
- ✚ O preparo da fase móvel foi feito a partir de uma solução concentrada de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (85% v/v) da Vetec (Brasil), cujo volume necessário para preparar a fase móvel foi calculado para diferentes concentrações e em seguida, o pH foi determinado com o auxílio do pHmetro. Após o preparo a mesma foi filtrada num sistema de vácuo para remoção das partículas e impurezas e logo após, a solução foi colocada num banho ultrassônico por no mínimo 1 hora para remoção das bolhas.
- ✚ Os padrões analíticos utilizados na otimização e validação do método proposto são da Sigma-Aldrich (EUA) e estão relacionados na Tabela 2, com suas respectivas purezas e características:

A solução estoque utilizada para a construção da curva analítica foi preparada pesando cerca de 0,01g de cada um dos padrões analíticos, glicose, frutose, gliceraldeído, piruvaldeído, ácido lático, dihidroxiacetona, ácido fórmico, ácido acético, ácido levulínico e 5-hidroximetilfurfural (HMF) e dissolvido em uma balão volumétrico de 5mL com a fase móvel de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ (0,003 mol/L) resultando numa concentração de 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Tabela 2 - Padrões analíticos da Sigma utilizados na otimização e validação do método cromatográfico.**

<i>Reagentes</i>	<i>Pureza</i>	<i>Fórmula estrutural</i>	<i>Fórmula molecular</i>
Glicose	99,7%		$C_6H_{12}O_6$
Frutose	≥99,0 %		$C_6H_{12}O_6$
Gliceraldeído	≥90,0 %		$C_3H_6O_3$
Pirualdeído	≥99,0 %		$C_4H_6O_2$
Ácido láctico	≥85,5 %		$C_3H_6O_3$
Dihidroxiacetona	≥99,0 %		$C_3H_6O_3$
Ácido fórmico	85%		$CH_2O_2$
Ácido acético	99,7%		$CH_3COOH$
Ácido levulínico	≥99,0 %		$C_5H_8O_3$
Hidroximetilfurfural	≥98,5%		$C_6H_6O_3$

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

#### **4.4 Otimização do método para identificação dos produtos da reação de hidrólise da celulose por HPLC**

O estudo da metodologia por HPLC iniciou-se com o levantamento bibliográfico das possíveis rotas sugeridas para a reação da hidrólise da celulose e os diferentes produtos que estas rotas pudessem originar.

De acordo com os dados da literatura e os parâmetros cromatográficos utilizados no GCaR (Santos, et al. 2013) foi iniciada a otimização da metodologia analítica de forma univariada e multivariada.

Na otimização univariada o estudo foi realizado, variando pH da fase móvel nos valores de 1,27 a 1,51; temperatura da coluna de 30°C a 55°C e temperatura do detector de 30°C a 40°C e por fim foram testadas as taxas de fluxo da fase móvel de 0,70 mL/min a 0,90 mL/min.

Na sequência, os diferentes parâmetros (pH, fluxo da fase móvel e temperatura da coluna cromatográfica) foram analisados de forma multivariada através de um planejamento fatorial completo  $2^3$ . Quando emprega-se um planejamento fatorial completo  $2^3$ , estatisticamente busca-se descobrir como a resposta (resolução) dependerá dos três fatores, temperatura, pH e fluxo da fase móvel. Dessa forma, para executar o planejamento fatorial completo  $2^3$  realizou-se 8 experimentos com um ponto central (PC) em duplicata, totalizando em 10 experimentos. Na Tabela 3 estão demonstradas às distintas condições de análise, isto é, os fatores nos níveis mínimos e máximos e ponto central.

**Tabela 3 - Ensaio realizados para o planejamento fatorial completo  $2^3$  com ponto central**

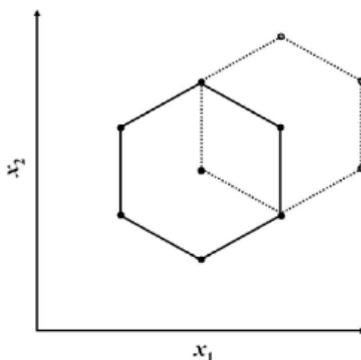
Experimento	pH	Temperatura (°C)	Fluxo (mL/min)
1	1,81	30	0,7
2	1,27	30	0,9
3	1,27	30	0,7
4	1,81	30	0,9
5	1,81	55	0,9
6	1,81	55	0,7
7	1,27	55	0,9
8	1,27	55	0,7
PC	1,54	43	0,8

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

A partir da análise do Diagrama de Pareto obtido com as análises do planejamento fatorial completo  $2^3$  optou-se por variar o pH e a temperatura com a matriz Doehlert conforme mostra a Tabela 4. Através dos resultados obtidos nestas análises foram construídos os gráficos de superfície de resposta dos padrões analíticos em estudo, os quais foram analisados estatisticamente utilizando-se o software STATISTICA, versão 6.0 da STATSOFT.

A matriz Doehlert exibe pontos que equivalem aos vértices de um hexágono gerado de um simplex regular, em que para duas variáveis tal planejamento descreve um domínio circular, isto é, a matriz Doehlert apresenta um ponto central com seis pontos adicionais, resultando num hexágono regular e, por isso é descrita como sendo um domínio circular (Figura 14).

**Figura 14 - Representação gráfica da matriz Doehlert com duas variáveis ( — ) com adição de novos experimentos (....)**



Fonte: TEÓFILO, R. F. et. al., 2006.

**Tabela 4 - Experimentos realizados com a matriz Doehlert para as variáveis pH e temperatura.**

<b>Experimento</b>	<b>pH</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
1	1,47	40
2	1,47	50
3	1,67	45
4	1,47	30
5	1,27	35
6	1,27	45
7	1,67	35

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

#### **4.5 Parâmetros de validação**

O primeiro parâmetro analisado foi a linearidade, cuja determinação foi realizada através da construção da curva de calibração externa. A curva analítica foi preparada através da solução estoque de 2000 µg/mL construída com 10 pontos de diferentes concentrações na faixa de 5 a 500 µg/mL, e cada ponto foi analisado em triplicata. Os dados obtidos nas análises foram plotados no Origin® (versão 6.0) para obtenção da equação da reta e do coeficiente de correlação. Os dados obtidos foram tratados considerando tanto a área como a altura do pico como sinais analíticos.

Através da curva analítica também foi possível obter o LD e LQ, visto que os valores são obtidos por meio da equação que utiliza os valores de estimativa do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva.

A seletividade do método foi avaliada com os possíveis produtos de degradação dos padrões de interesse, por meio da comparação da matriz isenta dos analitos de interesse (no caso, todos os 10 padrões) e a matriz fortificada com os mesmos. Esta fortificação foi feita sob o branco da amostra, isto é, a matriz isenta dos analitos de interesse e também pelo cálculo da seletividade.

A amostra utilizada para a obtenção da seletividade foi feita empregando as condições padrão realizadas nas reações de hidrólise de celulose no GCaR. Em geral utiliza-se um reator de aço inoxidável de 200 mL, temperatura de 190°C, à 10 bar, com 60 mL de água deionizada e o catalisador de óxido de estanho ( $\text{SnO}_2$ ) com tempo de 30 minutos. Para esta amostra foram utilizados estes parâmetros, porém sem a adição do substrato (celulose). As amostras partem normalmente de 8000  $\mu\text{g/mL}$  de celulose, sendo necessário, portanto uma diluição desta amostra para a análise no HPLC.

A precisão instrumental foi obtida através de 10 injeções sucessivas de uma solução de 450  $\mu\text{g/mL}$  contendo todos os padrões analíticos. Para este estudo, esta amostra foi injetada 10 vezes no mesmo dia e pelo mesmo analista, onde calculou-se o desvio padrão e coeficiente de variação.

A repetitividade foi avaliada com a injeção de padrões na concentração de 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  preparadas 10 vezes e analisadas em triplicata. Com os resultados obtidos foram calculados o desvio padrão e o coeficiente de variação.

A precisão intermediária foi realizada em dias diferentes, variando o analista, onde foram preparadas 10 amostras de padrões na concentração de 450  $\mu\text{g/mL}$ . As concentrações foram obtidas pelas curvas de calibração e posteriormente foram determinados o desvio padrão e o coeficiente de variação para comparação de resultados entre diferentes analistas.

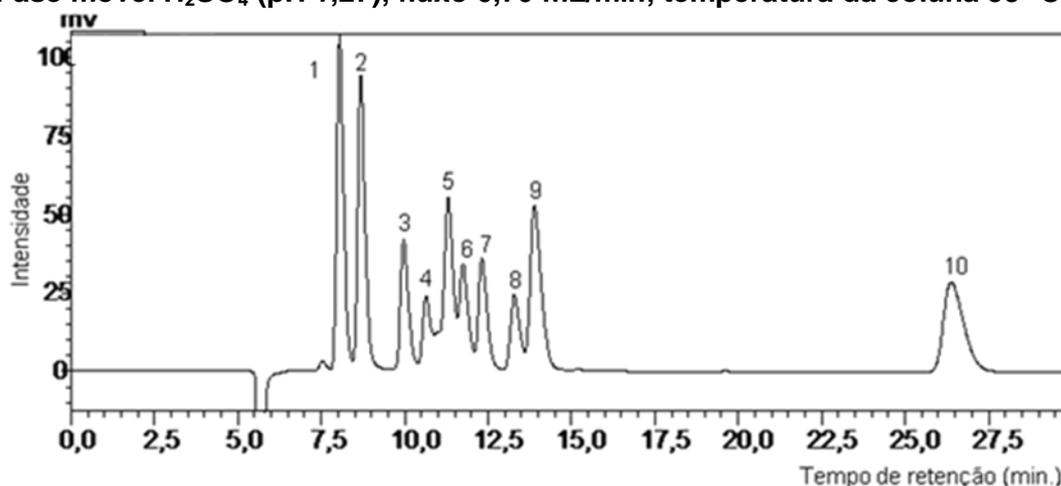
A exatidão do método foi avaliada pelo ensaio de recuperação, no qual foi feita a adição de soluções padrão em três diferentes concentrações (5  $\mu\text{g/mL}$ , 350  $\mu\text{g/mL}$  e 700  $\mu\text{g/mL}$ ) sob o branco da amostra.

A robustez do método foi avaliada de acordo com as variáveis mais influenciáveis no desenvolvimento do método, pH e temperatura. Para finalização da validação foi realizada uma análise de três amostras de reação de hidrólise da celulose.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente foi realizada uma análise com as condições semelhantes às iniciais utilizadas no grupo GCaR (fase móvel de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com concentração de 0,005 mol/L, temperatura da coluna de 55 °C e fluxo de 0,70 mL/min), conforme metodologia descrita por Santos, et al. 2013 e assim determinou-se a ordem de eluição dos padrões analíticos: glicose, frutose, gliceraldeído, piruvaldeído, ácido láctico, dihidroxiacetona, ácido fórmico, ácido acético, ácido levulínico e HMF, como pode ser observado na Figura 15.

**Figura 15 - Cromatograma obtido na análise da solução de 1000  $\mu\text{g/mL}$  dos padrões: 1- glicose, 2- frutose, 3- gliceraldeído, 4-piruvaldeído, 5-ácido láctico, 6- dihidroxiacetona, 7-ácido fórmico, 8-ácido acético, 9- ácido levulínico e 10-HMF. Fase móvel  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 1,27), fluxo 0,70 mL/min, temperatura da coluna 55 °C.**



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Após os testes iniciais, observou-se que os compostos 5 e 6, 8 e 9 (ácido láctico e dihidroxiacetona; ácido acético e ácido levulínico) apresentaram baixa resolução, de 1,15 e 1,17, respectivamente, sendo necessário então, a otimização dos parâmetros com o intuito de obter melhor resolução para estes compostos. Lembrando que conforme descrito na revisão bibliográfica a resolução deve ser  $\geq 1,25$  (COLLINS et al., 2006).

### 5.1 Otimização da metodologia analítica de forma univariada

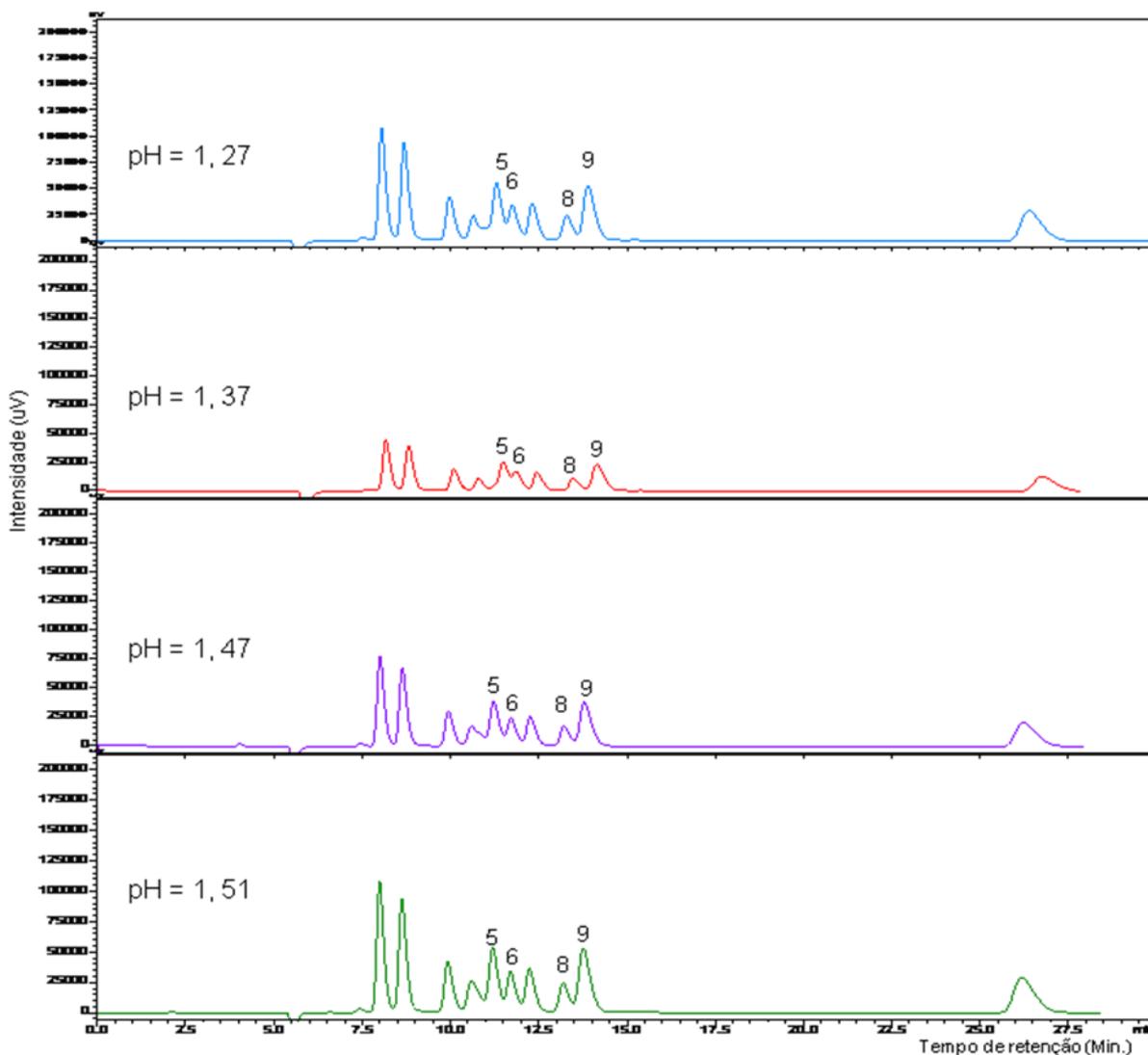
A fim de avaliar as condições experimentais com uma única variável por vez, ou seja, forma univariada, foi realizado o estudo da variação do pH,

temperatura da coluna e do detector e fluxo da fase móvel, conforme discutido a seguir.

### 5.1.2 Otimização do pH da fase móvel

A fase móvel foi avaliada nos seguintes valores de pH: 1,27; 1,37; 1,47 e 1,51. Os cromatogramas da Figura 16, mostram o efeito da variação do pH com taxa de fluxo de 0,7 mL/min, temperatura da coluna em 55 °C e temperatura do detector de 35 °C.

**Figura 16 - Efeito do pH na resolução dos compostos. Compostos 5, 6, 8 e 9, são ácido láctico, dihidroxiacetona, ácido acético e ácido levulínico, respectivamente.**



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

As resoluções obtidas para os compostos 5 e 6 (ácido láctico e dihidroxiacetona) e 8 e 9 (ácido acético e ácido levulínico) com a variação do pH da fase móvel estão representadas na Tabela 5.

**Tabela 5** - Resoluções obtidas para os compostos com a variação do pH da fase móvel.

Compostos	Resolução			
	1,27	1,37	1,47	1,51
pH				
Ácido láctico e Dihidroxiacetona	1,15	0,98	1,24	1,25
Ácido acético e Ácido levulínico	1,17	1,25	1,15	1,14

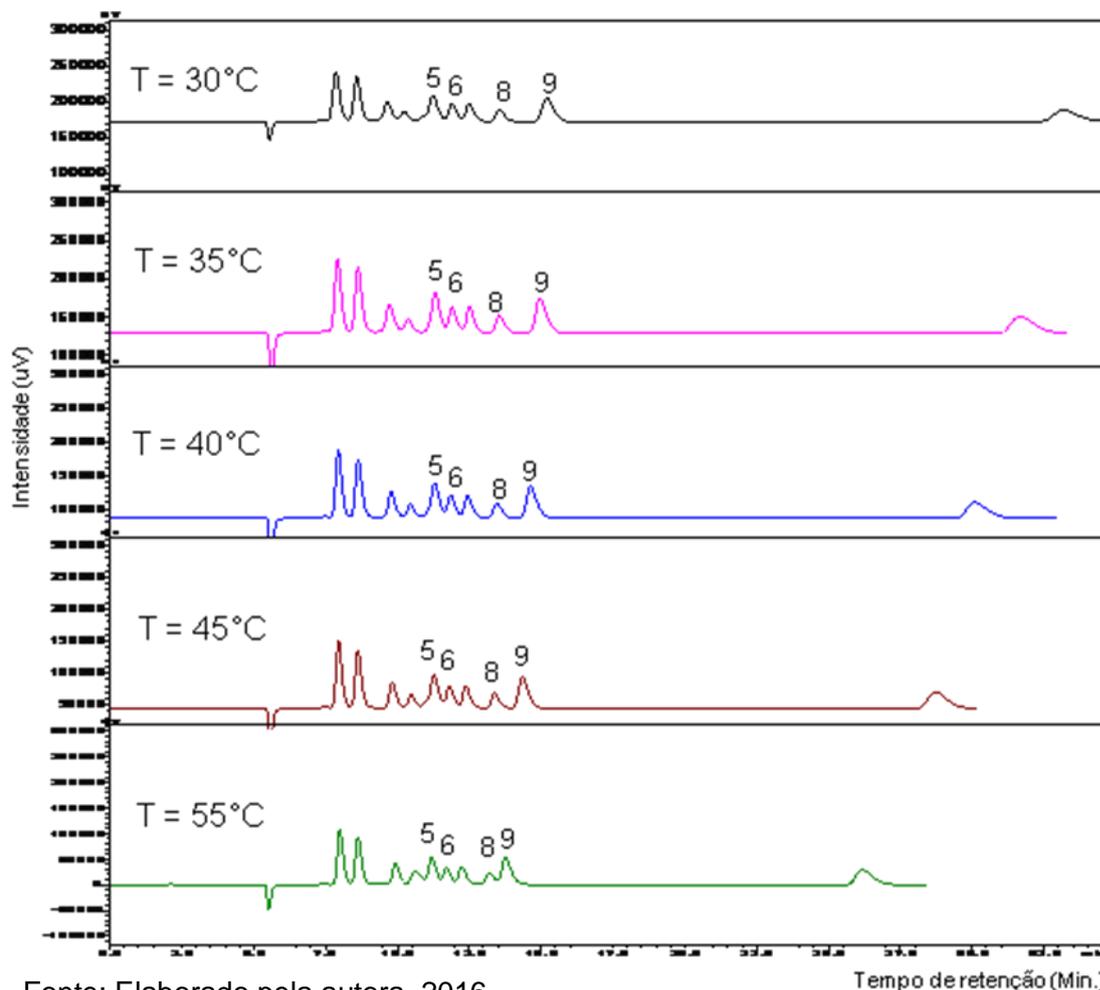
Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Foi observado que no pH 1,51 (0,03 mol/L) os compostos ácido láctico e dihidroxiacetona apresentaram melhor resolução, apesar de ácido acético e ácido levulínico apresentarem a pior resolução, porém se comparado com as condições iniciais 1,15 e 1,17 houve uma melhora considerável. Houve um aumento de 0,10 para os primeiros compostos e diminuição de apenas 0,03 para os outros 2 compostos e por isso este pH foi estabelecido para a continuação do desenvolvimento do método analítico.

### 5.1.3 Otimização da temperatura da coluna

Após a otimização do pH da fase móvel, foi estudada a temperatura da coluna com o intuito de melhorar a resolução dos quatro compostos citados anteriormente. A Figura 17 mostra os cromatogramas obtidos com a variação da temperatura da coluna em 30°C, 35°C, 40°C, 45°C e 55°C e os parâmetros, pH, temperatura do detector e fluxo da fase móvel fixados em 1,51, 35°C e 0,7 mL/min, respectivamente.

Figura 17 - Efeito da temperatura da coluna na resolução dos compostos. Compostos 5, 6, 8 e 9, são ácido láctico, dihidroxiacetona, ácido acético e ácido levulínico, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

A Tabela 6 mostra os valores de resolução obtidos na variação da temperatura da coluna.

Tabela 6 - Resoluções obtidas para os compostos com a variação da temperatura da coluna.

Compostos	Resolução				
	30	35	40	45	55
Ácido láctico e Dihidroxiacetona	1,27	1,27	1,39	1,24	1,25
Ácido acético e Ácido levulínico	2,65	2,32	2,60	1,72	1,34

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

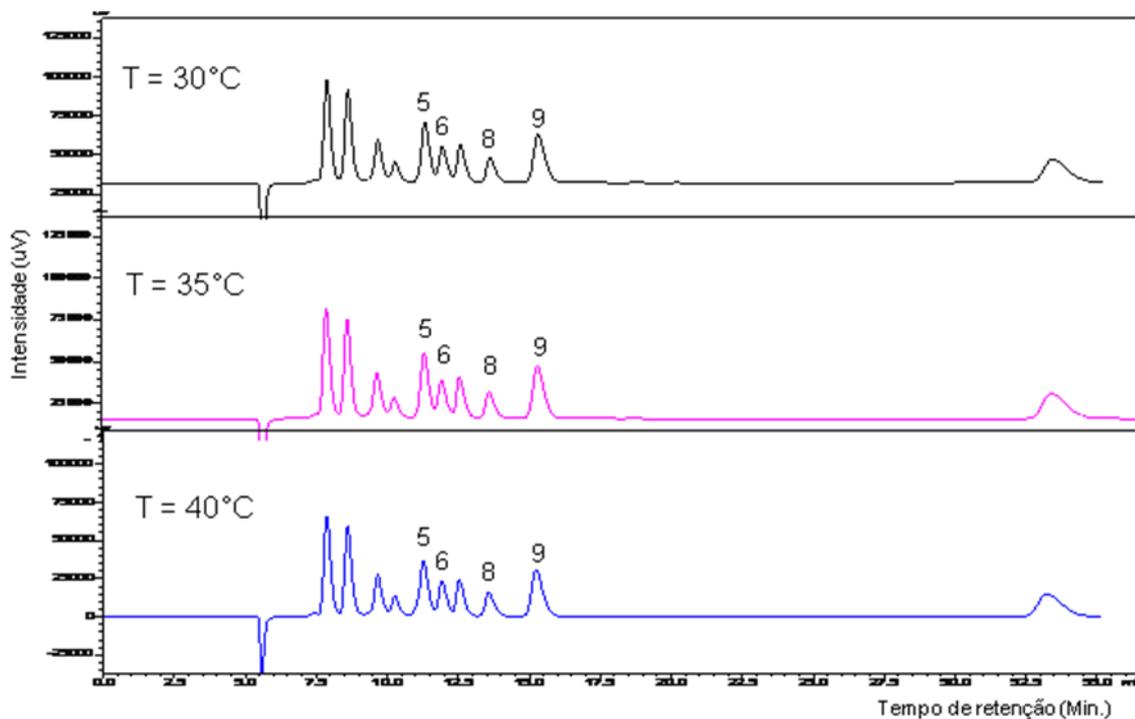
De acordo com os valores de resolução apresentados na Tabela 5 pode-se observar que todas as temperaturas testadas foram adequadas para a

resolução entre os segundos compostos, porém a fim de preservar a vida útil da coluna, optou-se por fixar a mais baixa temperatura para a otimização do método.

#### 5.1.4 Otimização da temperatura do detector

Na sequência, foi testada a temperatura do detector, variando em 30, 35 e 40°C e os parâmetros, pH, temperatura da coluna e fluxo da fase móvel fixados em 1,51, 30°C e 0,7 mL/min, respectivamente. Os cromatogramas obtidos podem ser visualizados na Figura 18.

**Figura 18 - Efeito da temperatura do detector na resolução dos compostos. Compostos 5, 6, 8 e 9, são ácido láctico, dihidroxiacetona, ácido acético e ácido levulínico, respectivamente.**



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Na Tabela 7 estão apresentados os valores de resolução obtidos entre os compostos 5, 6, 8 e 9.

**Tabela 7 - Resoluções obtidas com a variação da temperatura do detector.**

Compostos	Temperatura		
	Temperatura (°C)	30	35
Ácido láctico e Dihidroxiacetona	1,27	1,39	1,32
Ácido acético e Ácido levulínico	2,65	2,27	2,62

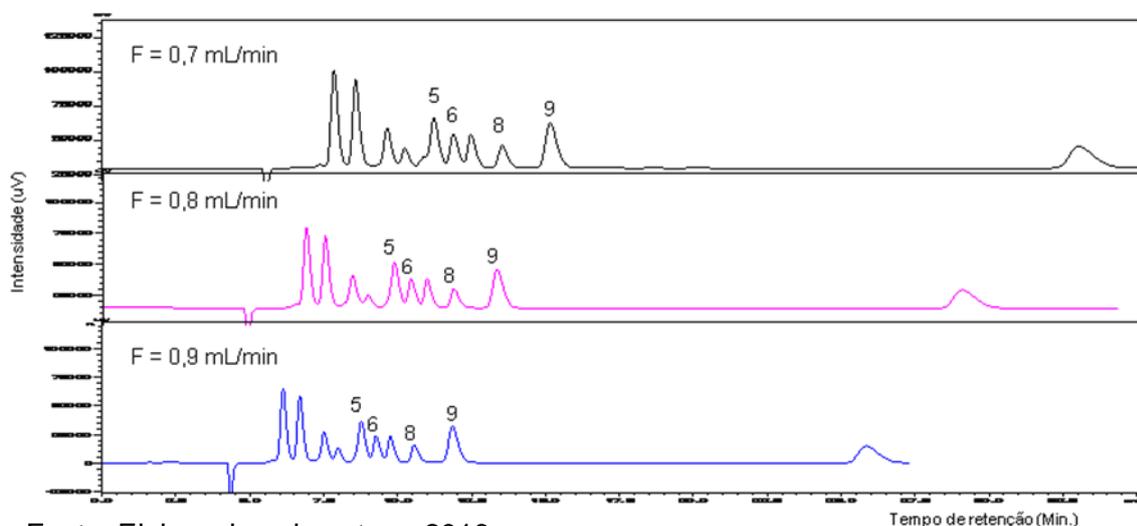
Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Pode-se observar que empregando todas as temperaturas, são obtidas resoluções adequadas entre os compostos, isto é  $> 1,25$ , porém seguindo a mesma teoria de escolha feita para a temperatura da coluna, aqui também foi fixada a temperatura de 30 °C para a otimização do método.

### 5.1.5 Otimização do fluxo da fase móvel

Por fim, foi avaliado o fluxo da fase móvel de forma a obter um tempo reduzido de análise sem alteração na resolução dos compostos obtidos. A variação do fluxo estudada foi de 0,70 a 0,90 mL/min, já os parâmetros, pH, temperatura da coluna e do detector e fluxo da fase móvel foram fixados em 1,51 e 30°C, respectivamente. A Figura 19 mostra os resultados obtidos nos testes cromatográficos para esta variação.

**Figura 19 - Efeito da taxa de fluxo da fase móvel na resolução dos compostos. Compostos 5, 6, 8 e 9, são ácido láctico, dihidroxiacetona, ácido acético e ácido levulínico, respectivamente.**



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Na Tabela 8 estão representados os valores de resolução obtidos entre os 4 compostos com a variação do fluxo da fase móvel. Como pode ser observado não ocorrem alterações significativas na resolução dos compostos quando a taxa de fluxo é alterada, no entanto o tempo total de análise é alterado.

**Tabela 8 - Resoluções obtidas para os compostos com a variação do fluxo da fase móvel.**

<b>Compostos</b>	<b>Resolução</b>		
	<b>0,7</b>	<b>0,8</b>	<b>0,9</b>
<b>Fluxo (mL/min)</b>			
<b>Ácido láctico e Dihidroxiacetona</b>	1,29	1,28	1,27
<b>Ácido acético e Ácido levulínico</b>	2,70	2,50	2,52
<b>Tempo (min.)</b>	35	30	27

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Através do estudo da taxa de fluxo da fase móvel (FM) foi possível observar que em 0,9 mL/min houve uma diminuição do tempo de análise em 8 minutos, visto que aumentando-se a vazão os analitos eluem mais rapidamente da coluna cromatográfica. Dessa forma, para a avaliação univariada do método, estabeleceu-se um fluxo de 0,9 mL/min para as corridas cromatográficas do método proposto.

## **5.2 Otimização da metodologia analítica de forma multivariada**

Para a otimização de forma multivariada empregou-se o planejamento fatorial completo  $2^3$  para a avaliação dos fatores influenciáveis na resolução. Na Tabela 9 estão demonstrados os 9 experimentos realizados neste estudo com os resultados de resolução entre os picos 5 e 6, 8 e 9 correspondentes ao ácido láctico, dihidroxiacetona, ácido acético e ácido levulínico, respectivamente.

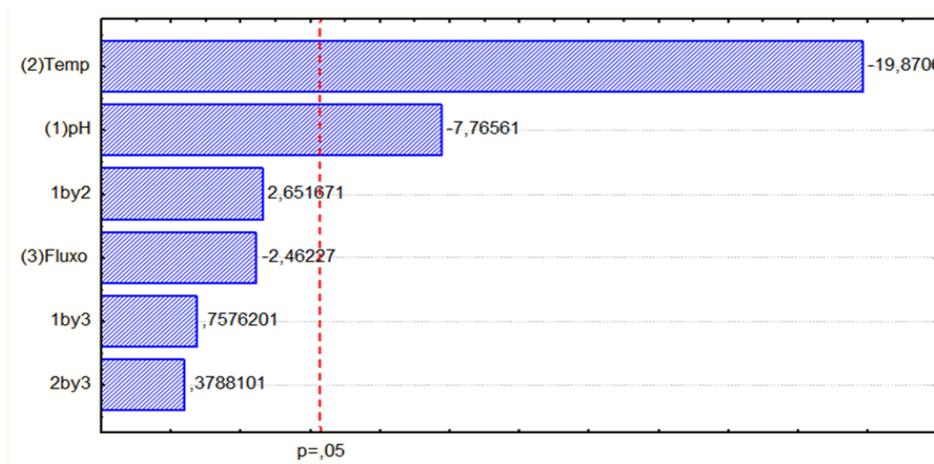
**Tabela 9 - Parâmetros utilizados no Planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> com ponto central e os resultados de resolução obtidos. Os números 5 e 6, 8 e 9 correspondem aos compostos ácido lático e dihidroxiacetona e ácido acético e ácido levulínico, respectivamente.**

Experimento	Resolução	
	( 5 e 6)	( 8 e 9)
1	1,57	2,54
2	1,27	2,44
3	1,31	2,58
4	1,51	2,41
5	1,60	1,11
6	1,64	1,12
7	1,30	1,12
8	1,32	1,15
PC	1,60	1,69

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Através das análises realizadas e os resultados obtidos e apresentados na Tabela 9 foi construído o Diagrama de Pareto, apresentado na Figura 20. Como pode-se observar na Figura 19, apenas a temperatura e pH apresentaram influência significativa no estudo. Ambos parâmetros, pH e temperatura influenciaram negativamente sob a resolução dos picos, isto é, em valores de temperatura e pH menores, foram obtidas melhores respostas.

**Figura 20 - Diagrama de Pareto do efeito das variáveis na resolução dos picos 5,6 e 8,9. Os números 5 e 6, 8 e 9 correspondem aos compostos ácido lático e dihidroxiacetona e ácido acético e ácido levulínico, respectivamente.**



Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Através da linha tracejada no diagrama de Pareto que indica o limite de significância é possível inferir também sobre a avaliação das interações de todos os parâmetros da otimização, cujo fatores demarcados do lado esquerdo, não apresentaram influência significativa nas respostas obtidas, mesmo quando avaliados separadamente, como o fluxo da fase móvel (3) e também quando avaliados simultaneamente, como por exemplo, nas interações de pH e temperatura (1by2), pH e fluxo (1by3) e temperatura e fluxo (2by3).

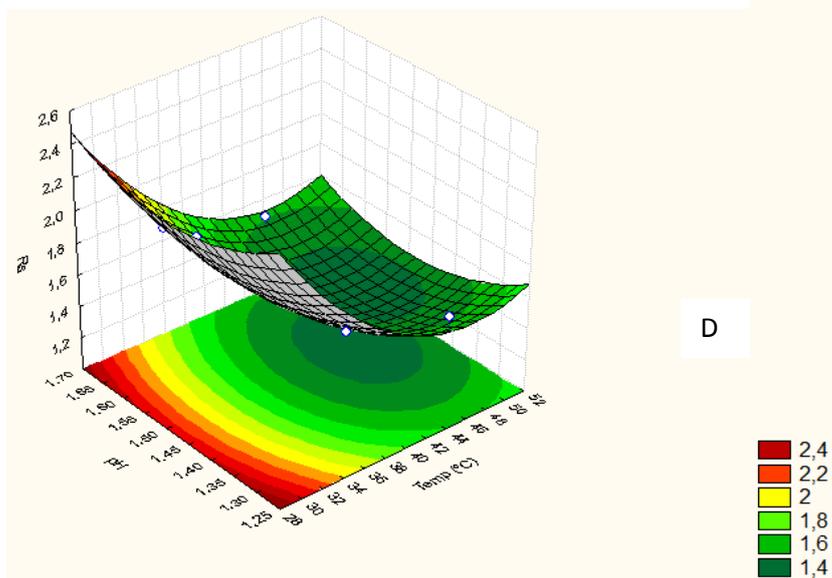
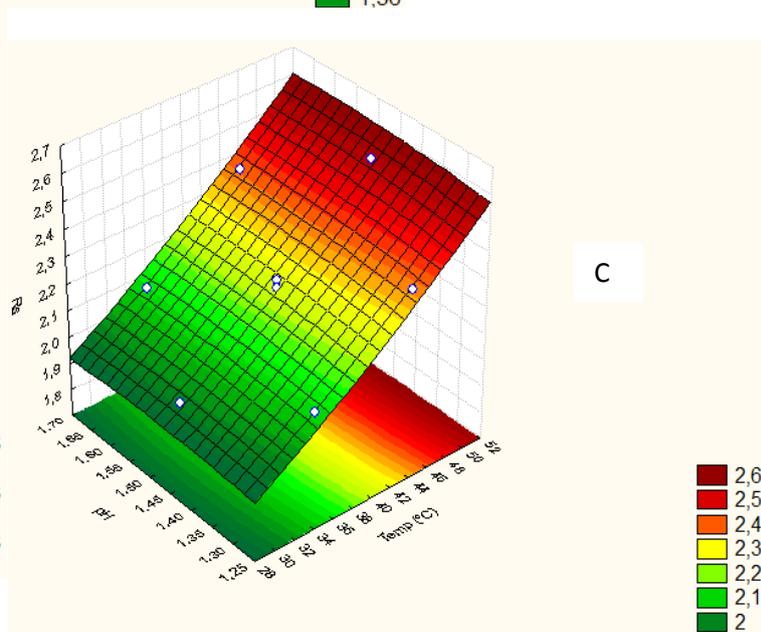
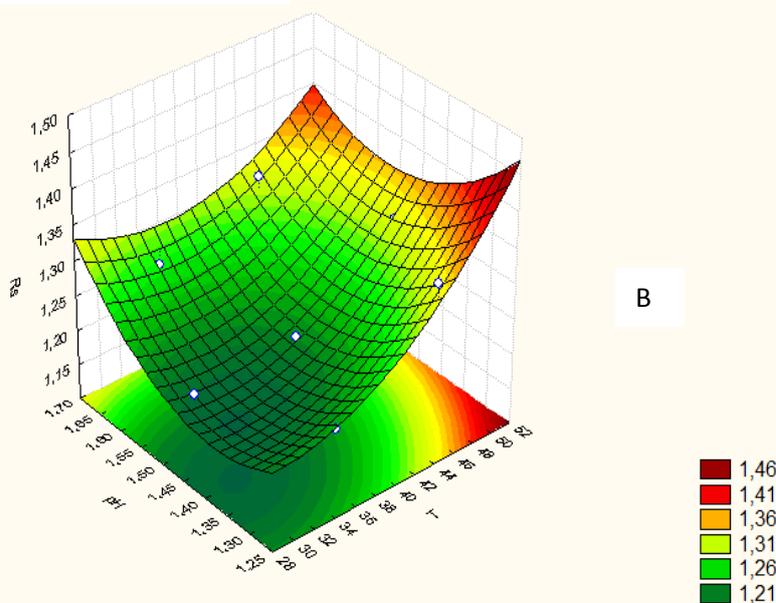
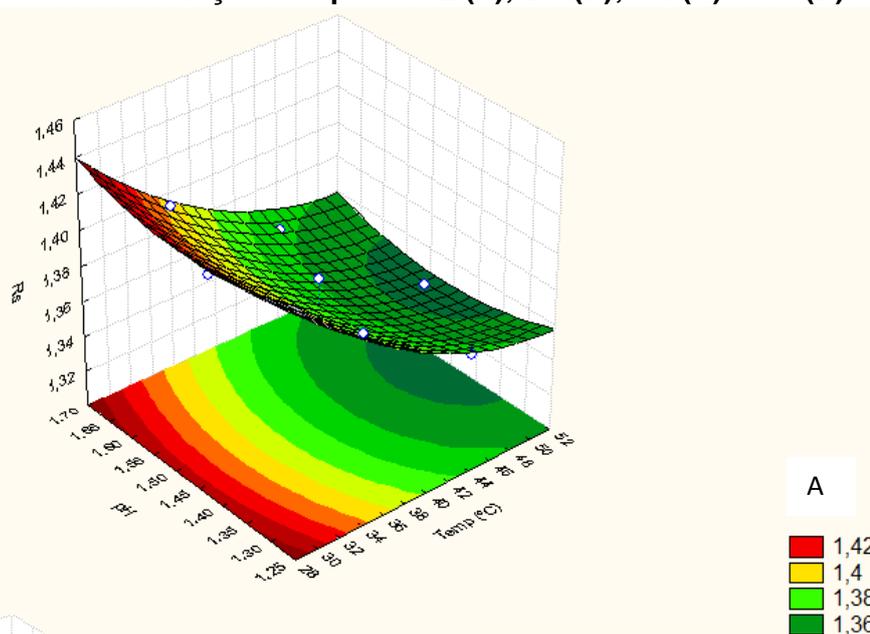
Com as variáveis mais influenciáveis obtidas no Diagrama de Pareto foi realizado o planejamento Doehlert e com o mesmo foram realizados sete experimentos, cujos resultados estão apresentados na Tabela 10 e assim obtidas as superfícies de resposta dos compostos em estudo, representado nas Figuras 21 e 22.

**Tabela 10 - Resoluções entre todos os picos (analitos) obtidas com a matriz Doehlert.**

<b>Resolução</b>									
<b>Experimento</b>	<b>(1/2)</b>	<b>(2/3)</b>	<b>(3/4)</b>	<b>(4/5)</b>	<b>(5/6)</b>	<b>(6/7)</b>	<b>(7/8)</b>	<b>(8/9)</b>	<b>(9/10)</b>
1	1,38	2,26	1,21	1,45	1,41	1,14	1,68	1,51	11,29
2	1,35	2,54	1,31	1,30	1,00	1,50	1,83	1,15	11,25
3	1,36	2,38	1,32	1,56	1,01	1,46	1,67	1,32	11,18
4	1,41	1,98	1,20	2,18	1,31	1,21	1,61	1,97	11,68
5	1,40	2,09	1,21	1,83	1,06	1,37	1,59	1,78	11,78
6	1,36	2,36	1,34	1,64	1,18	1,99	1,65	1,32	11,64
7	1,40	2,10	1,26	1,76	1,20	1,24	1,57	1,73	11,62

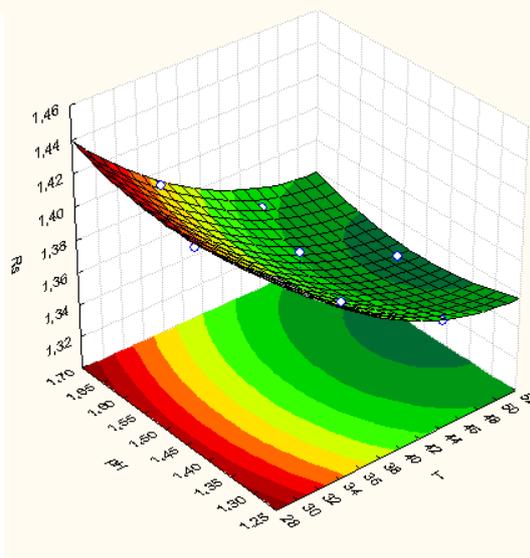
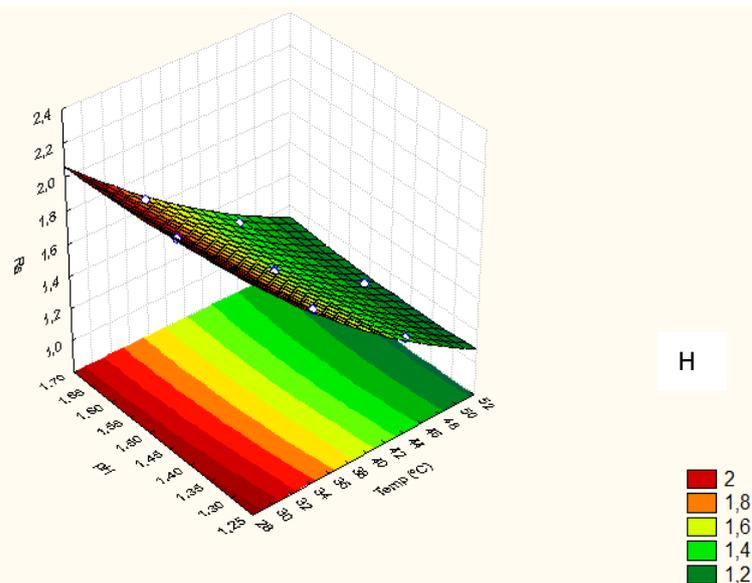
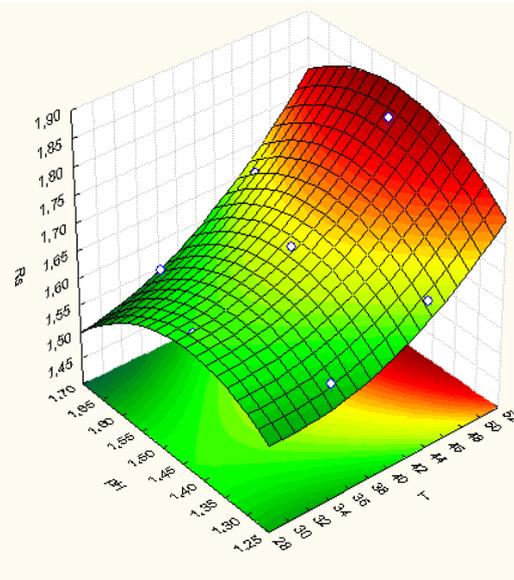
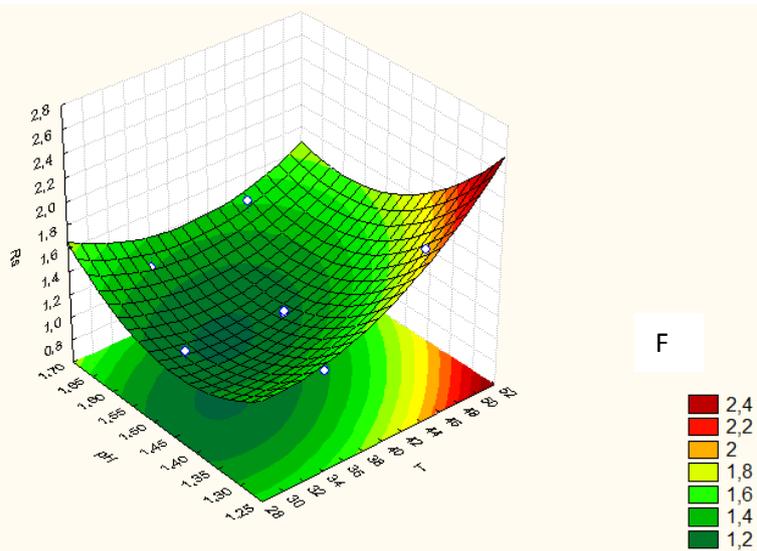
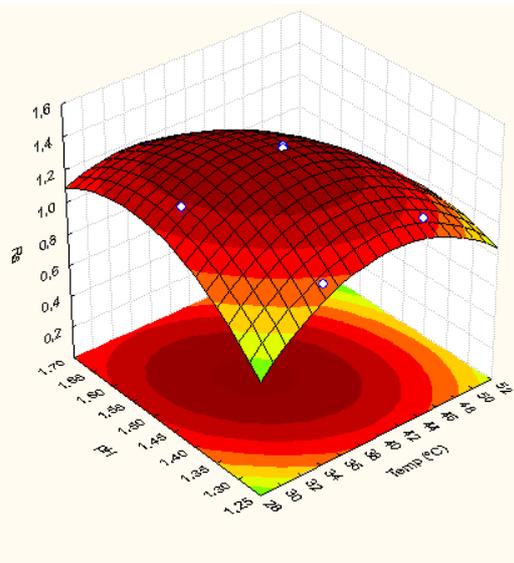
Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

Figura 21 - Gráfico de Superfície resposta em função das variáveis pH e temperatura na resolução dos picos 1/2 (A); 2/3 (B); 3/4 (C) e 4/5 (D).



Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Figura 22 - Gráfico de Superfície resposta em função das variáveis pH e temperatura na resolução dos picos 5/6 (E); 6/7 (F); 7/8 (G); 8/9 (H) e 9/10(I).



Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Após a avaliação das superfícies de respostas (Figura 21 e 22), verificou-se que a resolução mínima obtida entre os picos 1e 2 (Fig. 21 A), 2 e 3 (Fig. 21 B), 3 e 4 (Fig. 21 C), 4 e 5 (Fig. 21 D), 5 e 6 (Fig. 22 E), 6 e 7 (Fig. 22 F), 7 e 8 (Fig. 22 G), 8 e 9 (Fig. 22 H) e 9 e 10 (Fig. 22 I) foram 1,36; 2,00; 1,40; 1,50 e 1,36, respectivamente, o que prova que independentemente dos valores de pH e temperatura testadas a resolução mínima é maior que 1,25, ou seja, são ideais para fim quantitativo.

De acordo com as Figuras 21 C, 22 E, 22 F e 22 H, correspondentes as resoluções entre os picos 3 e 4, 5 e 6, 6 e 7 e 8 e 9, foi feita uma avaliação das superfícies de resposta e chegou-se em alguns parâmetros que aparentemente devem ser testados com o intuito de melhorar a resolução entre estes compostos.

Neste sentido foram realizados novos ensaios com pH de 1,27 e 1,41 e temperaturas de 42°C e 46°C, cujos resultados estão apresentados na Tabela 11 e que foram obtidos considerando os gráficos de superfícies repostas dos picos 3,4; 5,6; 6,7 e 8,9, os outros foram eliminados pela resolução mínima ser aceitável para fins quantitativos.

**Tabela 11 - Novos ensaios realizados com base na avaliação das superfícies de resposta**

		Resolução			
Temperatura					
pH	(°C)	(3 e 4)	(5 e 6)	(6 e 7)	(8 e 9)
1,27	42	1,58	1,33	1,28	2,27
1,27	46	1,65	1,32	1,30	2,02
1,41	42	1,65	1,35	1,31	2,26
1,41	46	1,66	1,33	1,28	2,01

Fonte: Elaborado pela autora, 2016.

É possível através da Tabela 11 que em todas as condições, os valores de resolução são considerados ideais para fins quantitativos, porém em geral o teste que apresenta melhores valores é em pH = 1,41 e T= 42°C, portanto

estes são os valores ótimos descritos pela interpretação gráfica da superfície de resposta para encontrar a região ótima.

### 5.3 Comparação das otimizações realizadas de forma univariada e multivariada

Diante do exposto, na Tabela 12 estão demonstrados os resultados obtidos empregando tanto a otimização univariada (método tradicional) quanto a otimização multivariada em que utiliza-se o planejamento experimental completo  $2^3$  e Doehlert.

**Tabela 12 - Parâmetros estudados na otimização univariada e multivariada**

Parâmetros	Univariada	Multivariada	
		Planejamento fatorial completo $2^3$	Planejamento Doehlert
pH da Fase móvel	1,51	1,27	1,41
Temperatura da coluna (°C)	30	30	42
Temperatura do detector (°C)	30	30	30*
Taxa de fluxo (mL/min)	0,9	0,7; 0,8 e 0,9	0,9*
Tempo de Análise (min)	27	35, 30 e 27	25,40

\* parâmetro fixo

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Com a metodologia clássica têm-se alguns problemas como a não percepção das interações entre duas variáveis e a distinção das variações aleatórias de efeitos concretos, já com o planejamento experimental, que é baseado em teorias matemáticas, têm-se a vantagem de investigar todas as causas potenciais simultaneamente e ainda obter conclusões seguras a respeito de todos os efeitos individuais independentemente uns dos outros, realizando um menor número de experimentos e obtendo maiores informações do objeto em estudo.

Assim, para dar continuidade às etapas seguintes do presente trabalho, adotaram-se os parâmetros otimizados significativamente determinados de forma multivariada, pH = 1,41 e temperatura da coluna = 42°C e os parâmetros

otimizados de forma univariada, fluxo da fase móvel = 0,9 mL/min e temperatura do detector = 30°C.

A metodologia aqui proposta apresenta algumas vantagens quando comparada com alguns dos trabalhos citados da literatura, como por exemplo, o de Bicker et al. 2005 e Sluiter et al. 2006, apresentam um tempo total de 50 minutos de análise para a determinação de 8 e 4 produtos, respectivamente, enquanto a presente metodologia propõe a determinação de 10 produtos num tempo total de análise de 27 minutos, conforme demonstra a Tabela 13.

**Tabela 13 - Comparação do método otimizado com dois trabalhos da literatura**

<b>PARÂMETROS</b>	<b>TRABALHO 1</b>	<b>TRABALHO 2</b>	<b>MÉTODO OTIMIZADO</b>
	BICKER et al. 2005	SLUITER et al. 2006	
<i>Fase móvel</i>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<i>Taxa de fluxo</i>	-	0,6 mL/min	0,9 mL/min
<i>Produtos de interesse</i>	08	04	10
<i>Tempo de análise</i>	50 min	50 min	25,40 min
<i>Temperatura Coluna</i>	55 °C	50 °C	42 °C
<i>Detector</i>	IR	IR	IR

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

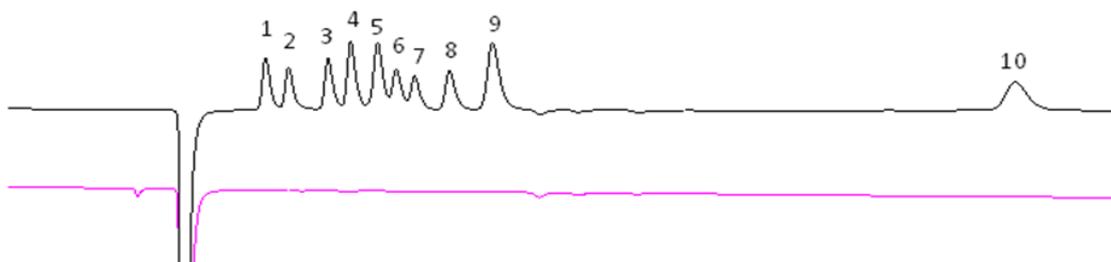
Dessa forma, estabelecida as condições ideais para a separação, identificação e quantificação dos compostos, iniciou-se o processo de validação da metodologia analítica por HPLC.

## **5.4 Validação da metodologia analítica baseada em cromatografia líquida de alta eficiência**

### **5.4.1 Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada com possíveis produtos de degradação dos padrões de interesse e foi possível observar nos cromatogramas representados na Figura 23 que não houve eluição de nenhum interferente na matriz isenta, portanto por este teste o método mostrou-se ser seletivo aos analitos de interesse.

**Figura 23 - Cromatogramas obtidos das análises de seletividade para a matriz isenta (cor rosa)**



Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Além disso, foram realizados os cálculos de seletividade para a determinação dos fatores de seletividade ( $\alpha$ ), medida esta que fornece a informação de quão bem a coluna separa os analitos da amostra (SKOOG et al, 2006) e estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 14 - Determinação dos fatores de seletividade ( $\alpha$ )**

Picos	$\alpha$
1/2	1,12
2/3	1,04
3/4	1,10
4/5	1,18
5/6	1,07
6/7	1,07
7/8	1,05
8/9	1,26
9/10	2,2

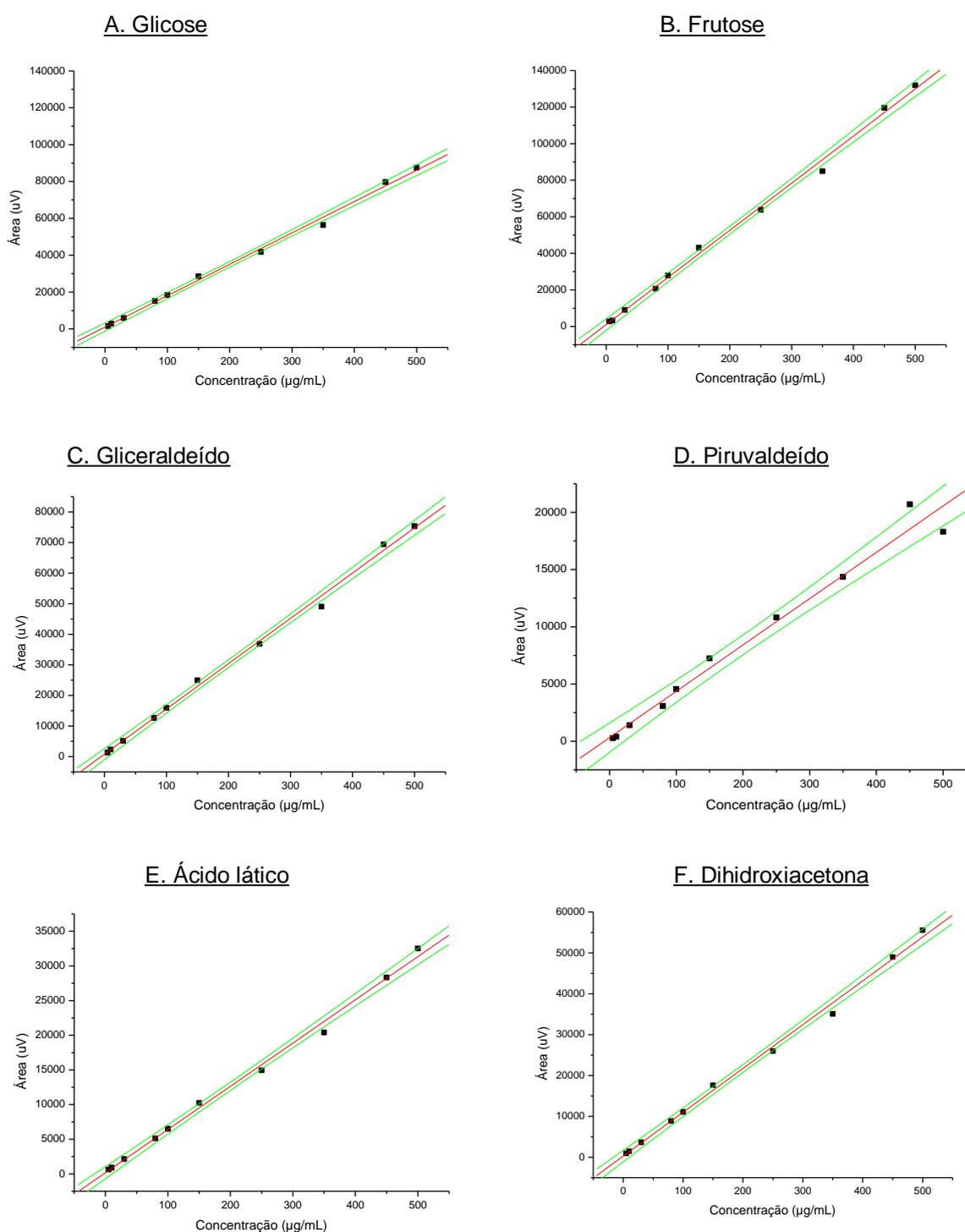
Fonte: Elaborado pela autora, 2016

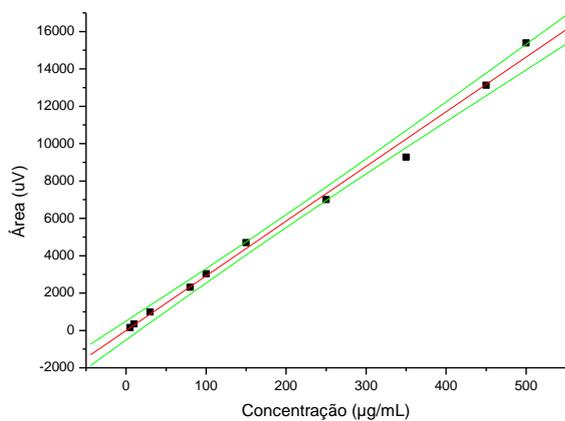
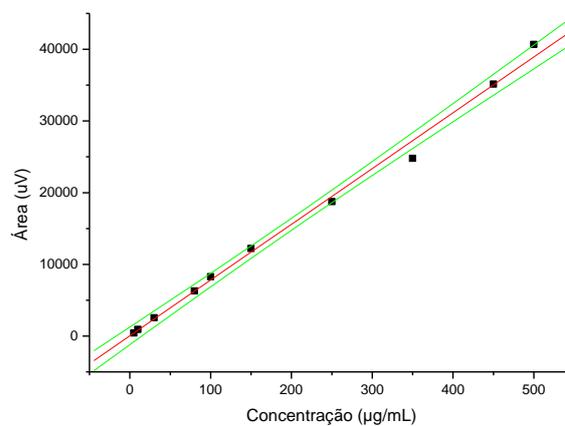
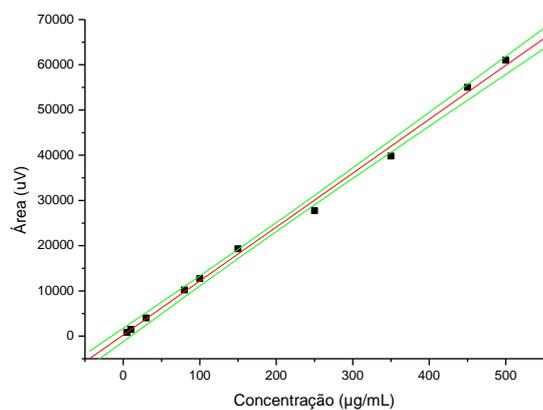
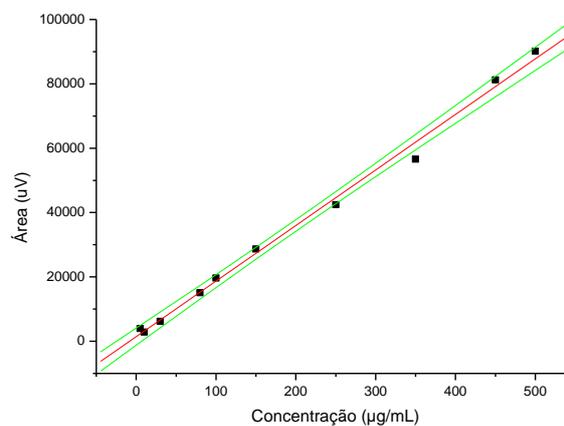
Como pode ser observado pela Tabela 13, através deste teste o método também mostrou-se seletivo, visto que os fatores de seletividade calculados indicaram separação suficiente entre os picos cromatográficos ( $\alpha > 1$ ).

### 5.4.2 Linearidade

Os dados da linearidade e as curvas analíticas obtidas de diluições da solução estoque de cada padrão na faixa de 5  $\mu\text{g/mL}$  a 500  $\mu\text{g/mL}$ , considerando a área dos picos obtidos no cromatogramas estão representados na Figura 24.

**Figura 24 - Curvas analíticas da determinação pela área do pico de cada padrão analítico. (A) – Glicose; (B) – Frutose; (C) – Gliceraldeído; (D) – Piruvato; (E) – Ácido lático; (F) – Dihidroxiacetona; (G) – Ácido fórmico; (H) – Ácido acético; (I) – Ácido levulínico e (J) HMF.**

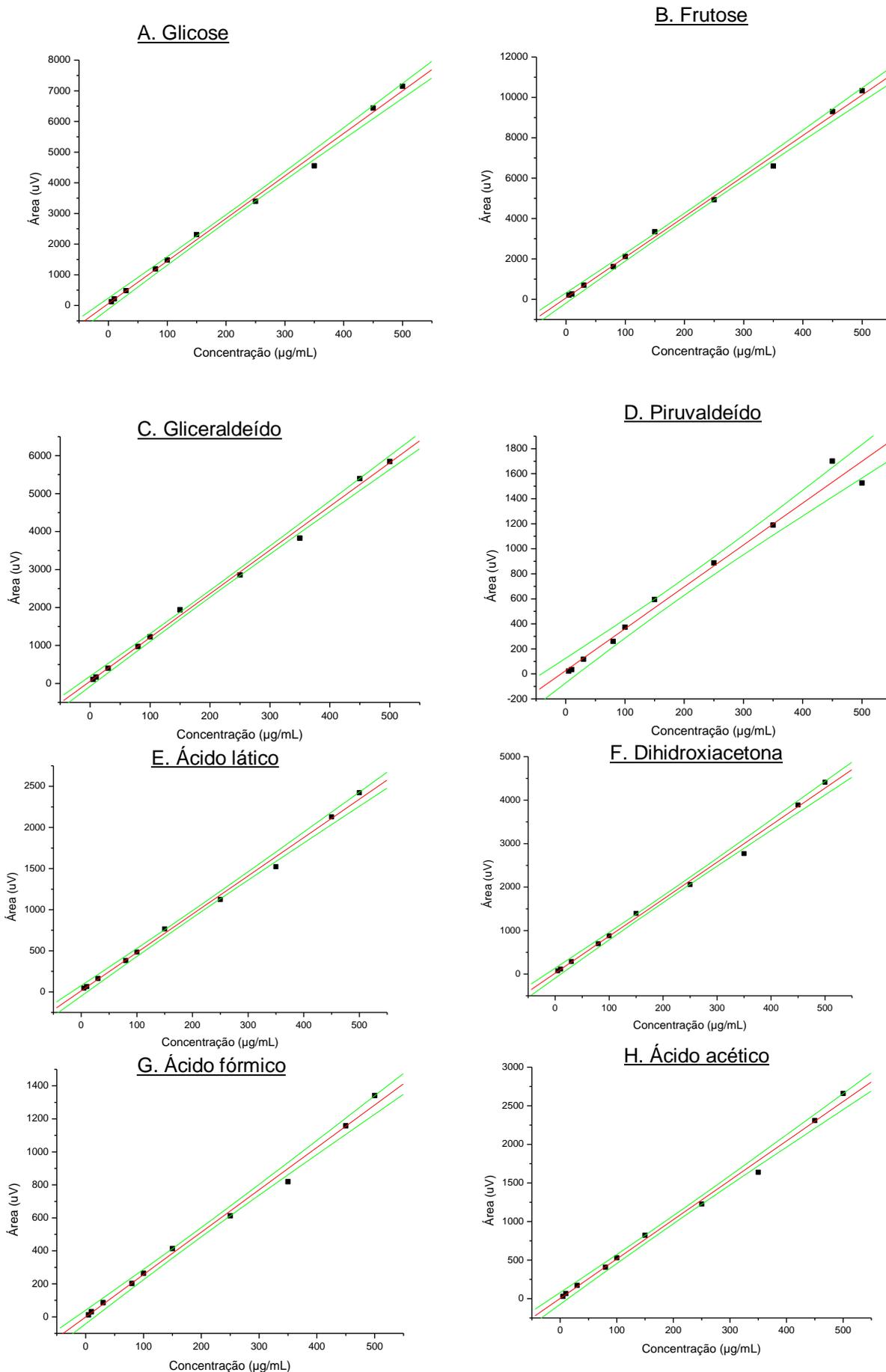


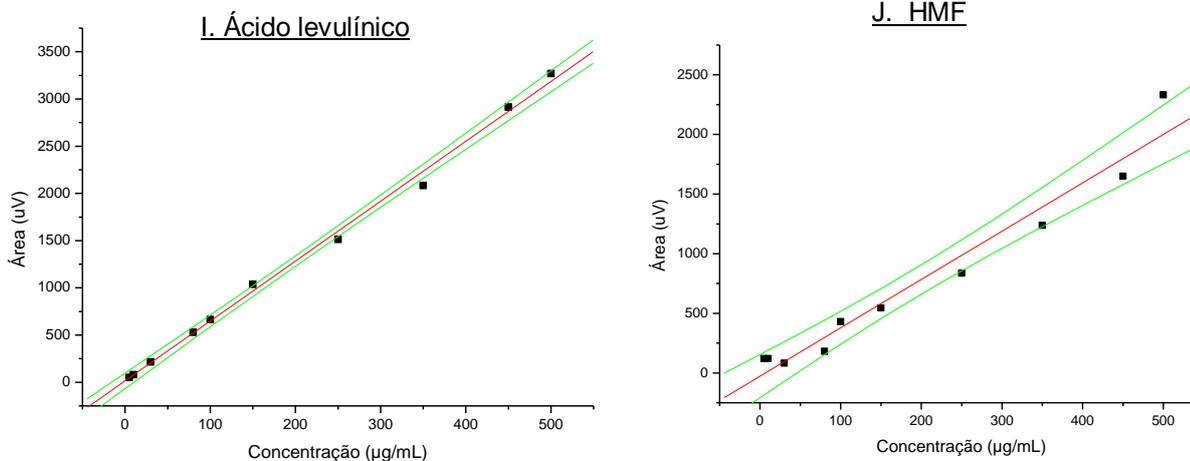
G. Ácido fórmicoH. Ácido acéticoJ. Ácido levulínicoJ. HMF

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

A altura dos picos também foi considerada como sinal analítico para construção das curvas analíticas. Na mesma faixa de concentração de 5 µg/mL a 500 µg/mL e estas estão representadas na Figura 25.

Figura 25 - Curvas analíticas da determinação pela altura do pico de cada padrão analítico. (A) – Glicose; (B) – Frutose; (C) – Gliceraldeído; (D) – Piruvaldeído; (E) - Ácido láctico; (F) – Dihidroxiacetona; (G) – Ácido fórmico; (H) – Ácido acético; (I) – Ácido levulínico e (J) HMF.





Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Todas as curvas apresentaram o número de pontos adequados para a construção da curva, sendo superior a 5 pontos tanto para área como para a altura e os pontos aqui excluídos foram os que ficaram abaixo do intervalo de confiança de 95% estabelecidos pelo programa Origin®.

Pela classificação do INMETRO, o método proposto apresentou uma linearidade ideal tanto pela área quanto pela altura dos picos, quando considerados como sinal analítico, pois observando os valores apresentados na Tabela 14, os valores de coeficientes de correlação ( $r$ ) foram maiores ou igual a 0,9971.

**Tabela 15 - Coeficientes de correlação e equação da reta das curvas analíticas obtidas no intervalo de 5 µg/mL a 500 µg/mL para todos os padrões analíticos**

PADRÕES	ÁREA DO PICO		ALTURA DO PICO	
	r	Equação	r	Equação
<b>Glicose</b>	0,9994	$y = 1023,53 + 170,29 x$	0,9981	$y = 63,36 + 13,87 x$
<b>Frutose</b>	0,9995	$y = 1066,08 + 261,77 x$	0,9998	$y = 89,48 + 20,50 x$
<b>Gliceraldeído</b>	0,9995	$y = 796,88 + 147,28 x$	0,9984	$y = 58,30 + 11,51 x$
<b>Pirivaldeído</b>	0,9987	$y = 77,75 + 53,25 x$	0,9974	$y = 15,33 + 3,44 x$
<b>Ác. láctico</b>	0,9990	$y = 172,01 + 74,33 x$	0,9991	$y = 21,00 + 4,64 x$
<b>DHA</b>	0,9981	$y = 274,61 + 117,24 x$	0,9992	$y = 32,37 + 8,50 x$
<b>Ác. fórmico</b>	0,9982	$y = 6,78 + 39,27 x$	0,9999	$y = 6,71 + 2,57 x$
<b>Ác. acético</b>	0,9972	$y = 24,00 + 107,83 x$	0,9992	$y = 14,20 + 5,06 x$
<b>Ác.levulínico</b>	0,9983	$y = 272,65 + 139,17 x$	0,9998	$y = 23,10 + 6,47 x$
<b>HMF</b>	0,9973	$y = 1429,64 + 122,67 x$	0,9992	$y = 40,44 + 5,08 x$

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Cabe ressaltar, que quanto mais próximo de 1 o valor de “r” estiver, maior a relação linear entre as duas variáveis (área pico versus concentração e altura do pico versus concentração). As equações da reta foram plotadas no origin para posteriores cálculos de concentração e para a validação do método analítico proposto.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 14, observou-se que o método mostrou maior sensibilidade quando a área foi tomada como sinal analítico e não a altura, uma vez que quanto maior o coeficiente angular da reta maior a sensibilidade do método analítico.

#### 5.4.3 LD e LQ

Os limites de detecção foram calculados de acordo com o método baseado em parâmetros da curva analítica e descritos na parte experimental. Na determinação dos parâmetros pela área dos picos obtidos foi determinado um intervalo de 0,54 – 1,34 µg/mL para o limite de detecção e para o limite de quantificação foi estabelecida a faixa de 1,64 – 4,06 µg/mL. Quando

considerou-se a altura dos picos, os limites de detecção e quantificação ficaram na faixa de 0,78 – 1,79 µg/mL e 2,37 – 5,43 µg/mL , respectivamente conforme mostra a Tabela 15.

**Tabela 16 - Limites de detecção e limites de quantificação obtidos através dos dados das curvas analíticas**

<b>Limite de detecção e limite de quantificação (µg/mL)</b>				
<b>PADRÕES</b>	<b>ÁREA DO PICO</b>		<b>ALTURA DO PICO</b>	
	<b>LD</b>	<b>LQ</b>	<b>LD</b>	<b>LQ</b>
<b>Glicose</b>	0,97	2,95	1,29	3,9
<b>Frutose</b>	0,54	1,64	1,76	5,32
<b>Gliceraldeído</b>	0,71	2,16	1,26	3,8
<b>Piruvaleído</b>	1,3	3,93	0,98	2,96
<b>Ácido Lático</b>	0,93	2,83	1,64	4,96
<b>Dihidroxiacetona</b>	0,63	1,90	0,78	2,37
<b>Ácido fórmico</b>	0,91	2,76	1,06	3,22
<b>Ácido Acético</b>	0,98	2,97	1,34	4,06
<b>Ácido Levulínico</b>	1,34	4,06	1,68	5,1
<b>Hidroximetilfurfural</b>	1,22	3,70	1,79	5,43

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Em alguns trabalhos da literatura, recomenda-se atribuir como limite de quantificação o menor ponto da curva, ou seja, para o presente trabalho foi de 5 µg/mL, o que é validado para a área e altura do pico, pois os valores de LD e LQ obtidos não foram muito altos, apresentando assim resultados satisfatórios.

Os intervalos lineares dos padrões estão representados na Tabela 16 de acordo com a área e a altura dos picos.

Tabela 17 - Intervalo linear obtido das curvas de calibração

Intervalo linear µg/mL				
PADRÕES	ÁREA DO PICO		ALTURA DO PICO	
<b>Glicose</b>	2,95	500,00	3,9	500,00
<b>Frutose</b>	1,64	500,00	5,32	500,00
<b>Gliceraldeído</b>	2,16	500,00	3,8	500,00
<b>Piruvaleído</b>	3,93	500,00	2,96	500,00
<b>Ácido Lático</b>	2,83	500,00	4,96	500,00
<b>Dihidroxiacetona</b>	1,90	500,00	2,37	500,00
<b>Ácido fórmico</b>	2,76	500,00	3,22	500,00
<b>Ácido Acético</b>	2,97	500,00	4,06	500,00
<b>Ácido Levulínico</b>	4,06	500,00	5,1	500,00
<b>Hidroximetilfurfural</b>	3,70	500,00	5,43	500,00

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

#### 5.4.4 Precisão

##### 5.4.4.1 Precisão instrumental

A precisão do método foi avaliada através de 10 injeções sucessivas da mesma amostra seguido por um branco, e assim determinada a precisão instrumental. Por intermédio dos dados obtidos foi possível calcular os valores de desvio padrão e coeficientes de variação (CV) apresentados na Tabela 17.

Tabela 18 - Dados obtidos para o estudo da precisão instrumental do método

Padrões	ÁREA DO PICO		ALTURADO PICO	
	Desvio Padrão ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	Desvio Padrão ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)
<b>Glicose</b>	1,40	0,77	0,44	0,25
<b>Frutose</b>	1,85	1,09	0,60	0,34
<b>Gliceraldeído</b>	1,72	0,96	0,64	0,36
<b>Piruváldo</b>	2,18	1,22	1,09	0,66
<b>Ác. Láctico</b>	1,88	1,13	0,61	0,36
<b>DHA</b>	1,60	0,97	0,61	0,37
<b>Ác. fórmico</b>	0,96	0,60	0,67	0,40
<b>Ác. Acético</b>	1,07	0,65	0,78	0,42
<b>Ác. Levulínico</b>	2,12	1,25	0,69	0,38
<b>HMF</b>	3,82	2,23	1,48	0,86

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Os valores de desvio padrão e coeficiente de variação obtidos foram  $\leq 2,18$  e  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/mL}$  tanto pela área quanto pela altura. Estes resultados mostram que a metodologia proposta é precisa, visto que para análises deste tipo de amostra são aceitos valores de coeficiente de variação de até 20%, os baixos valores dos desvios-padrão também corroboraram para indicar que estes parâmetros avaliados apresentam um conjunto de dados homogêneos.

#### 5.4.4.2 Repetitividade

A repetitividade foi obtida através de injeções de 10 amostras na concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  obtidas em diferentes preparações. Os resultados de área e altura foram plotados nas curvas de calibração para determinação da concentração e estão representados na Tabela 18. Das concentrações foram determinados o desvio padrão e o CV.

Tabela 19 - Dados obtidos para a Repetitividade

Padrões	ÁREA DO PICO		ALTURADO PICO	
	Desvio Padrão ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	Desvio Padrão ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)
Glicose	2,13	2,02	0,83	0,77
Frutose	1,86	1,79	0,93	0,83
Gliceraldeído	2,73	2,57	0,41	0,38
Piruvaleído	3,43	3,15	1,28	1,27
Ác. Lático	2,74	2,60	0,45	0,39
DHA	1,40	1,43	0,39	0,40
Ác. fórmico	1,59	1,56	0,77	0,71
Ác. Acético	3,16	3,24	1,19	1,05
Ác. Levulínico	3,11	3,20	1,70	1,63
HMF	7,41	6,33	1,88	1,74

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Foi possível inferir que os coeficientes de variação obtidos tanto pela área como pela altura do pico foram  $\leq 6,33$ , estando na faixa permitida de até 20%, os valores de desvio padrão pela área foram  $\leq 7,41$  e pela altura  $\leq 1,88$ , logo o método é repetitivo.

#### 5.4.4.3 Precisão intermediária

Este parâmetro foi feito por outro analista em dia diferente, através da preparação de 10 amostras de padrões na concentração de  $450 \mu\text{g mL}^{-1}$  e injetadas no HPLC. As concentrações foram obtidas a partir das curvas de calibração e posteriormente foram determinados o desvio padrão e o CV, os quais estão representados na Tabela 19.

Tabela 20 - Dados obtidos para a Precisão intermediária

Padrões	ÁREA DO PICO		ALTURADO PICO	
	Desvio Padrão ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	Desvio Padrão ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)
<b>Glicose</b>	2,39	2,09	2,17	1,90
<b>Frutose</b>	2,7	2,48	2,34	2,02
<b>Gliceraldeído</b>	2,96	2,63	2,71	2,46
<b>Piruvaleído</b>	3,30	2,93	2,85	2,83
<b>Ác. Lático</b>	2,84	2,49	3,01	2,50
<b>DHA</b>	2,11	1,93	1,81	1,69
<b>Ác. fórmico</b>	1,41	1,51	1,37	1,39
<b>Ác. Acético</b>	1,97	1,86	1,10	0,92
<b>Ác. Levulínico</b>	2,33	2,19	1,80	1,63
<b>HMF</b>	3,50	2,97	1,81	1,64

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Através dos dados da Tabela 19, observa-se que os coeficientes de variação obtidos tanto pela área como pela altura do pico foram  $\leq 3,50\%$ . Os desvios padrão obtidos pela área foram  $\leq 3,50$  e pela altura  $\leq 3,01$ , indicando que o método apresenta precisão intermediária adequada.

Para comparação entre os diferentes analistas, foram utilizados os resultados obtidos na precisão intermediária com os obtidos no teste de repetitividade e construída a Tabela 20.

**Tabela 21 - Comparação dos coeficientes de variação entre os dois analistas na determinação da precisão intermediária**

<b>Padrões</b>	<b>ÁREA DO PICO CV (%)</b>		<b>ALTURA DO PICO CV (%)</b>	
	<i>Analista 1</i>	<i>Analista 2</i>	<i>Analista 1</i>	<i>Analista 2</i>
<b>Glicose</b>	2,02	2,09	0,77	1,90
<b>Frutose</b>	1,79	2,48	0,83	2,02
<b>Gliceraldeído</b>	2,57	2,63	0,38	2,46
<b>Piruvaleído</b>	3,15	2,93	1,27	2,83
<b>Ác. Lático</b>	2,60	2,49	0,39	2,50
<b>DHA</b>	1,43	1,93	0,40	1,69
<b>Ác. fórmico</b>	1,56	1,51	0,71	1,39
<b>Ác. Acético</b>	3,24	1,86	1,05	0,92
<b>Ác. Levulínico</b>	3,20	2,19	1,63	1,63
<b>HMF</b>	6,33	2,97	1,74	1,64

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

É possível observar de acordo com a Tabela 20 que não houve maiores divergências entre os coeficientes de variação obtidos com a modificação dos analistas em diferentes dias de análises. Além disso, foi realizado o teste F através da Equação 4, cujos valores calculados estão apresentados na Tabela 21, afim de saber se os desvios-padrão dos dois analistas eram “significamente” diferentes entre si.

$$F_{calculado} = S_1^2 / S_2^2 \quad \text{Equação 4}$$

Onde F é o quociente entre os quadrados dos valores de desvio-padrão.

**Tabela 22 - Teste  $F$  para a comparação dos desvios-padrão dois analistas na determinação da precisão intermediária**

	ÁREA DO PICO		Teste $F$	ALTURA DO PICO		Teste $F$
	$S_1^2$	$S_2^2$		$S_1^2$	$S_2^2$	
<b>Glicose</b>	2,13	2,39	0,79	0,83	2,17	0,14
<b>Frutose</b>	1,86	2,75	0,46	0,93	2,34	0,15
<b>Gliceraldeído</b>	2,73	2,96	0,85	0,41	2,71	0,02
<b>Pirivaldeído</b>	3,43	3,30	1,08	1,28	2,85	0,20
<b>Ác. Lático</b>	2,74	2,84	0,93	0,45	3,01	0,02
<b>DHA</b>	1,40	2,11	0,44	0,39	1,81	0,04
<b>Ác. fórmico</b>	1,41	1,59	0,79	0,77	1,37	0,31
<b>Ác. Acético</b>	1,97	3,16	0,38	1,10	1,19	0,86
<b>Ác. Levulínico</b>	2,33	3,11	0,55	1,70	1,80	0,89
<b>HMF</b>	3,50	7,41	0,22	1,88	1,81	1,07

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Através foram calculados num nível de confiança de 95% e comparados a valores tabelados de  $S_1^2$  e  $S_2^2$  de acordo com o grau de liberdade 2 (n-1), que corresponde a 19. Dessa forma através da avaliação dos valores obtidos na Tabela 21, os valores de  $F$  calculados demonstraram ser menores dos que o valor tabelado, portanto os desvios-padrão dos dois analistas não são significativamente diferentes um do outro, corroborando assim com os coeficientes de variação, calculados anteriormente.

#### 5.4.5 Recuperação

O ensaio de recuperação foi executado através da fortificação da matriz da amostra com os padrões de trabalho em três níveis de concentrações, ou seja, uma concentração inicial, intermediária e máxima da curva analítica.

Os valores de recuperação estão representados na Tabela 22, os quais foram calculados de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Recuperação (\%)} = (\text{valor}_{\text{obtido}} / \text{valor}_{\text{adicionado}}) \times 100\%$$

**Tabela 23 - Valores obtidos para o ensaio de recuperação**

PICO	ÁREA DO PICO			ALTURA DO		
	Recuperação (%)					
Concentração dos padrões (µg/mL)	10	150	450	10	150	450
<b>Glicose</b>	98,57	91,11	105,83	101,39	103,22	95,09
<b>Frutose</b>	106,88	100,86	99,83	100,73	105,73	93,85
<b>Gliceraldeído</b>	90,58	96,91	106,26	94,41	102,64	98,14
<b>Pirualdeído</b>	102,95	92,16	105,87	103,59	105,10	104,05
<b>Ác. Lático</b>	96,59	96,53	105,60	96,89	105,52	104,60
<b>DHA</b>	106,47	98,18	106,52	101,84	106,87	104,48
<b>Ác. fórmico</b>	104,43	91,04	95,37	113,91	105,35	100,50
<b>Ác. Acético</b>	103,31	95,56	94,00	114,05	103,38	94,32
<b>Ác. Levulínico</b>	104,14	91,13	98,60	90,97	104,42	92,95
<b>HMF</b>	99,72	101,12	100,35	97,39	104,10	95,10

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Os valores de recuperação variaram entre 90,58 e 106,87%, estando de acordo com as especificações esperadas, as quais determinam que os intervalos aceitáveis estejam entre 90 e 107% para a faixa de concentração (%) maior ou igual a 0,01 (BRITO, 2001).

#### 5.4.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada a partir das principais variáveis do sistema em estudo. Foram avaliados pH ( $\pm 0,1$ ) e temperatura ( $\pm 5$  °C). Os resultados obtidos no teste de robustez estão apresentados nas Tabelas 23 e 24, respectivamente.

**Tabela 24 - Variação obtida com a mudança da temperatura da coluna**

Compostos	Condição Inicial (µg/mL)	ÁREA DO PICO			Condição Inicial (µg/mL)	ALTURA DO PICO		
		V <sub>1</sub> (µg/mL)	V <sub>2</sub> (µg/mL)	S <sub>Área</sub> (µg/mL)		V <sub>1</sub> (µg/mL)	V <sub>2</sub> (µg/mL)	S <sub>Altura</sub> (µg/m)
Temperatura (°C)	42	37	47		37	47		
Glicose	351,15	346,23	334,27	2,39	354,83	324,61	339,72	2,17
Frutose	349,16	353,00	335,59	2,7	358,58	349,18	337,96	2,34
Gliceraldeído	340,72	363,45	360,15	2,96	353,96	350,39	332,46	2,71
Pirivaldeído	367,98	365,93	326,42	3,30	357,64	336,88	355,63	2,85
Ác. Lático	348,48	358,33	315,69	2,84	358,27	356,80	322,02	3,01
DHA	350,18	339,59	326,42	2,11	360,31	339,59	341,21	1,81
Ác. fórmico	358,38	360,29	319,84	1,41	358,03	360,29	331,06	1,37
Ác. Acético	345,03	339,78	326,56	1,97	355,07	359,51	348,94	1,10
Ác. Levulínico	361,62	334,43	322,53	2,33	356,62	349,88	342,87	1,80
HMF	359,95	353,86	327,33	3,50	356,15	353,86	338,20	1,81

Fonte: Elaborado pela autora, 2016

**Tabela 25 - Variação obtida com a mudança do pH da fase móvel**

Compostos	Condição Inicial (µg/mL)	ÁREA DO PICO			ALTURA DO PICO			S <sub>Altura</sub> (µg/mL)
		V <sub>1</sub> (µg/mL)	V <sub>2</sub> (µg/mL)	S <sub>Área</sub> (µg/mL)	V <sub>1</sub> (µg/mL)	V <sub>2</sub> (µg/mL)	S <sub>Área</sub> (µg/mL)	
pH	1,41	1,40	1,42			1,40	1,42	
Glicose	351,15	348,84	332,83	2,39	354,83	350,78	352,56	2,17
Frutose	349,16	358,10	328,46	2,7	358,58	351,68	350,42	2,34
Gliceraldeído	340,72	355,55	343,47	2,96	353,96	361,28	348,31	2,71
Piruvaleído	367,98	356,62	364,18	3,30	357,64	347,33	349,98	2,85
Ác. Lático	348,48	359,23	366,08	2,84	358,27	354,02	353,75	3,01
DHA	350,18	351,11	365,69	2,11	360,31	361,69	359,25	1,81
Ác. fórmico	358,38	359,73	351,73	1,41	358,03	356,01	350,07	1,37
Ác. Acético	345,03	351,20	330,11	1,97	355,07	347,67	351,80	1,10
Ác. Levulínico	361,62	351,78	325,31	2,33	356,62	351,58	350,45	1,80
HMF	359,95	355,86	332,83	3,50	356,15	348,16	353,13	1,81

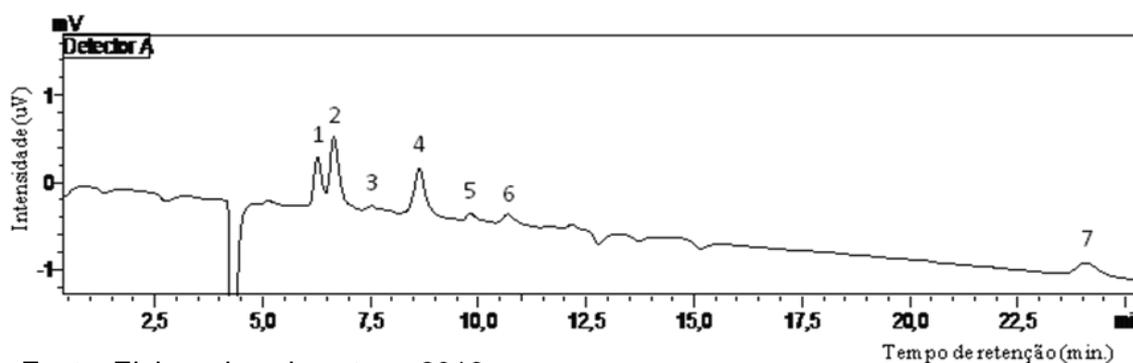
Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Pode-se observar que apenas compostos como dihidroxiacetona, glicose e piruvaleído apresentaram concentrações similares às iniciais depois dos ensaios de robustez realizados, portanto o método de forma geral o método não foi robusto. Isto pode ser explicado pelo valores de variação de temperatura e pH serem altos, cabe à estudos futuros uma avaliação da melhor taxa de variação aplicadas à robustez do método analítico.

### 5.5. Aplicação da metodologia proposta

Após a validação do método foi obtida uma amostra de uma reação teste de conversão da celulose (Figura 26) e frutose (Figura 27) realizada no GCaR para análise dos possíveis produtos formados. Através da Figura 26, pode-se observar que foram determinados 7 produtos (glicose, frutose, gliceraldeído, ácido lático, ácido fórmico, ácido acético e HMF). Assim como mostrado na Figura 27, foram determinados 7 produtos (glicose, gliceraldeído, DHA, ácido lático, ácido fórmico, ácido acético e HMF).

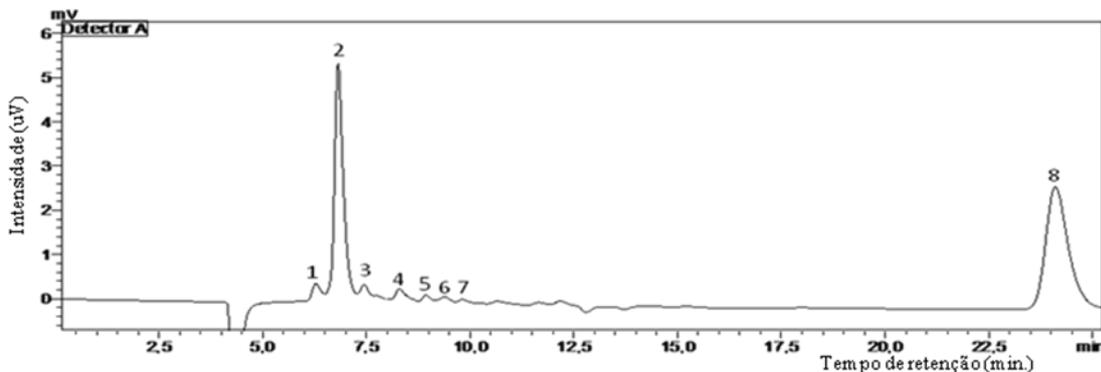
Figura 26 - Cromatograma obtido na aplicação do método para a reação de hidrólise da celulose. Condições reacionais: temperatura de 190°C, à 10 bar, com 60 mL de água deionizada, catalisador  $\text{MoO}_3/\text{TiO}_2$ , 0,48g de celulose e tempo reacional de 1h. Picos 1,2,3,4,5,6 e 7 são equivalentes aos compostos glicose, frutose, gliceraldeído, ácido lático, ácido fórmico, ácido acético e HMF, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Todos estes compostos identificados puderam ser quantificados tanto pela área quanto pela altura, onde foram encontrados 0,095% de glicose, 0,135% de frutose, 0,006% de gliceraldeído, 0,655% de ácido lático, 5,3% de ácido fórmico, 0,008% de ácido acético e 2,830% de HMF pela área e 0,120% de glicose, 0,146% de frutose, 0,012% de gliceraldeído, 0,545% de ácido lático, 0,328% de ácido fórmico, 0,021% de ácido acético e 0,093 % de HMF pela altura .

Figura 27 - Cromatograma obtido na aplicação do método para a reação de conversão da frutose. Condições reacionais: temperatura de 190°C, à 10 bar, com 60 mL de água deionizada, catalisador de óxido de estanho (SnO<sub>2</sub>), 0,48g de frutose e tempo reacional de 30 min. Picos 1,2,3,4,5,6,7 e 8 são equivalentes aos compostos glicose, frutose, gliceraldeído, ácido láctico, dihidroxiacetona, ácido fórmico, ácido acético e HMF, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora, 2016

Através do cromatograma representado pela Figura 27 foram quantificados quando levou-se em consideração a área do pico para os cálculos 0,239% de glicose, 0,329% de gliceraldeído, 0,781% de ácido láctico, 0,316% de dihidroxiacetona; 0,129% de ácido fórmico, 0,275% de ácido acético e 8,470 % de HMF. Pela altura do pico foram encontrados 0,292% de glicose, 4,660% de gliceraldeído, 0,391% de ácido láctico, 0,944% de dihidroxiacetona, 0,344% de ácido fórmico, 1,160% de ácido acético e 0,365% de HMF.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método proposto para a determinação dos produtos da reação de hidrólise da celulose por HPLC apresentou resultados considerados satisfatórios em relação a alguns trabalhos da literatura, visto que foi possível a determinação simultânea, pela separação, identificação e quantificação de 10 produtos da reação em 25,40 minutos de análise, com temperatura da coluna em 42°C, utilizando uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvel, com fluxo de 0,70 mL/min e pH=1,42.

Através das otimizações univariada e multivariada chegou-se a melhores valores de resolução com a multivariada, e através da superfície resposta foi possível obter os valores ótimos das variáveis influenciáveis na resolução dos picos e assim a metodologia proposta pôde ser validada tomando-se como sinal analítico tanto área quanto a altura dos picos cromatográficos.

As curvas analíticas apresentaram relação linear adequada entre sinal analítico e concentração, uma vez que o coeficiente de correlação foi  $\geq 0,9972$  tanto pela área quanto pela altura. O método proposto mostrou-se ser seletivo através das diferentes formas de avaliação utilizadas, em relação aos ensaios de precisão foram obtidos valores de CV  $\leq 3,24$  %, o que está de acordo com as normas exigidas. O método mostrou-se ser exato através dos ensaios de recuperação para a faixa de variação de 90,58 a 106,87%. Em relação à robustez apenas os compostos, dihidroxiacetona, glicose e piruvaldeído não sofreram alteração em suas concentrações nos ensaios de robustez realizados, logo o método mostrou-se ser robusto para estes compostos. Desta forma, através da avaliação de todos os parâmetros de validação exigidos, foi possível quantificar com êxito dez compostos da reação de conversão da celulose e frutose.

## REFERÊNCIAS

AIDA, T. M.; TAJIMA, K.; WATANABE, M. **Reactions of d-fructose in water at temperatures up to 400°C and pressures up to 100 MPa.** Journal of Supercritical Fluids. Vol. 42, 110 – 119, 2007.

ALBANO, F. M.; RODRIGUES, R. M. T. **Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais - Guia Prático.** Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2009.

ALMEIDA, M. L. O. d'. **Celulose e papel: tecnologia de fabricação de pasta celulósica.** 2. Ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo, 1988.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. **Validação de métodos cromatográficos de análise - Um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “Química Verde” na determinação de metilxantinas em bebidas.** Química Nova. Vol. 32, 2476 – 2481, 2009.

ARANTES, V.; SADDLER, J. N. **Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis.** Biotechnology for Biofuels. Vol. 3, 2010.

ARGUN, H.; ONARAN G. **Glucose and 5-hydroxymethylfurfural production from cellulosic waste by sequential alkaline and acid hydrolysis.** Renewable Energy 96. 442 – 449, 2016.

AQUINO, A. S. **Análise de Rotas Alternativas para Sequestro Químico de CO<sub>2</sub>: Produção de Metanol, Gás de Síntese e Acido Acético.** Monografia (Grau em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2008.

**Atlas de energia elétrica do Brasil / Agência Nacional de Energia Elétrica.** 3. ed. – Brasília : Aneel, 2008. 236 p.: il. ISBN: 978-85-87491-10-7. 1.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; SILVA, V. L. **Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI-CG/EM).** Química Nova. Vol. 31, 2035 – 2041, 2008.

BERNARDI, I. B. M.; ARAÚJO, D. A.; RIBEIRO, C.; AVANSI, W.; LONGO, E.; DE ALBUQUERQUE, J. A. N.; MENEGHETTI, M. P. S.; ALMEIDA, M. R.; FAJARDO, V. H. **Microwave hydrothermal synthesis,**

**characterization, and catalytic performance of  $Zn_{1-x}Mn_xO$  in cellulose conversion.** Chemical Papers. Vol. 68 (9,) 1213–1218, 2014.

BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicação.** São Paulo, 2001. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de Experimentos usando Statistica.** Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003.

CAMPBELL, C. J.; LAHERRÉRE, J. H. **The End of Cheap Oil.** Scientific American. Vol 60, Março 1998.

CANETTIERI, E. V.; SILVA, J. B. A. E.; FELIPE, M. G. A. **Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate.** Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 90, 159 – 168, 2001.

CASS Q. B.; DEGANI A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação.** Editora EdUFSCar, 2001 p.77.

CASTRO, H. F. **Papel e Celulose (Apostila 4) - Processos Químicos Industriais II.** Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena – EEL, 2009.

CHHEDA, J. N.; ROMAN-LESHKOV Y.; DUMESIC. J. A. **Production of 5-hydroxymethylfurfural and furfural by dehydration of biomass-derived mono- and poly-saccharides.** Green Chemistry. Vol. 9, 342 – 350, 2007.

CHOUDHARY, V.; MUSHRIF, S. H.; ANDERKO, A. **Insights into the Interplay of Lewis and Brønsted Acid Catalysts in Glucose and Fructose Conversion to 5-(Hydroxymethyl)furfural and Levulinic Acid in Aqueous Media.** J. American Chemical Society. Vol. 135, 3997– 4006, 2013.

CLARK, J.; DESWARTE, F. **Introduction to Chemicals from Biomass.** John Wiley & Sons: Chichester, 2008.

COLLINS, H.; GILBERTO L.; BONATO, S.P. **Fundamentos de Cromatografia.** Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006.

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. S.; **Tecnologia de Conversão de Biomassa.** Universidade do Amazonas – EFEI, Manaus, 1997.

DA SILVA, V.C. **Solventes Verdes para Biopolímeros: Síntese e Aplicação de Líquidos Iônicos na Derivatização de Celulose.** Tese (Doutorado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental. São Paulo, 2011. 108p.

DONATE, P.M. **Síntese Ambientalmente Correta a partir de Biomassa.** Orbital: The Electronic Journal of Chemistry. Vol 6, nº. 2, 2014.

DOS SANTOS, B. J.; DA SILVA, L. F.; ALTINO, M. R. S. F.; MOREIRA, S.T.; MENEGHETTI, M. R.; MENEGHETTI, M. P. S. **Cellulose conversion in the presence of catalysts based on Sn(IV).** Catal. Sci. Technol. Vol. 3, 673, 2013.

DOS SANTOS, DE ALBUQUERQUE, J. A. N.; ZANTA, L.P.S.C.; MENEGHETTI, M.R.; MENEGHETTI, M. P. S. **Fructose conversion in the presence of Sn<sub>(IV)</sub> catalysts exhibiting high selectivity to lactic acid.** RSC Adv. Vol. 5, 90952, 2015.

EL, H. L. **Catalytical conversion of carbohydrates in subcritical water: A new chemical process for lactic acid production.** Journal of Molecular Catalysis A: Chemical. Vol. 239, 151–157, 2005.

ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION (EIA, 2011). [www.eia.gov/ieo](http://www.eia.gov/ieo) (Acesso em Setembro de 2016).

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics.** Teddington. 2014. [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf) > (Acesso em maio de 2016).

FAITH, W.L. **Development of the scholler process in the United-States.** Industrial and Engineering Chemistry. Vol. 37, 9 – 11, 1945.

FENGEI, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastruture, Reactions.** Walter de Gruyter: Berlin, 1989.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. **Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares.** Química Nova. Vol. 32, 623 – 638, 2009.

FERREIRA, L. C. S.; SANTOSA, N. L. W.; QUINTELLA, M. C.; NETO, B. B.; JUAN, M. B. S. **Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review.** Talanta. Vol. 63, 1061 – 1067, 2004.

GABRIEL, J. R. **Estudo da hidrólise de carboidratos em meio neutro, utilizando uma mistura de ésteres derivados mistura de ésteres derivados do óleo de mamona.** Tese (Doutor em Ciências), Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 2009.

GAILY, M. H.; ELHASSAN, B. M.; ABASAEED, A. E.; AL-SHRHAN, M. **Isomerization and Kinetics of Glucose into Fructose.** International Journal of Engineering & Technology. Vol. 10, 1– 5, 2010.

GAO P.; LI G.; YANG F.; LV X. N.; FAN H.; MENG L.; YU X-Q. **Preparation of lactic acid, formic acid and acetic acid from cotton cellulose by the alkaline pre-treatment and hydrothermal degradation.** Industrial Crops and Products. Vol. 48, 61 – 67, 2013.

GARROTE, G.; CRUZ, J. M.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C., **Valorisation of waste fractions from autohydrolysis of selected lignocellulosic materials.** J. Chem. Technol. Biotechnol. Vol. 78, 392-398, 2003.

GILBERT, N.; HOBBS, I. A.; LEVINE, J. D. **Hidrolisis of wood – using dilute sulfuric acid.** Industrial and Engineering Chemistry. Vol.44, 1712 – 1720, 1952.

GRISUTA, B. **Levulinic Acid from Lignocellulosic Biomass.** Bandung, Indonesië, 1975.

**Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2011. 72 p.

HEKMAT, D. BAUER, R. FRICKE, J. **Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with Gluconobacter oxydans.** Bioprocess and Biosystems Engineering. Vol. 26, 109 –116, 2003.

HARRIS, DANIEL C. **Análise Química Quantitativa**, 7ª Edição, LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro-RJ, 2008.

HASCHE. R. L. **By-Products of Wood Saccharification.** Industrial and Engineering Chemistry. Vol. 37, n.01, 1945.

HU, Z.; WANG, J.; CHAI, X.; KONG, H. **A novel method for determination of sugars by UV spectroscopy.** Huaxue Gongye Yu Gongcheng Jishu. Vol 59, 1232 – 1237, 2008.

HUBER, G. W.; IBORRA, S.; CORMA. A. **Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering**. Chemical Reviews. Vol.106, 4044 – 4098, 2006.

HUBER L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA D.B.; RODRIGUES M.I.; **Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças**. Revista do Instituto Adolfo Lutz. Vol. 66,142 – 151, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientação sobre validação de métodos analíticos, DOQ-CGCRE-008**, 2011.

KAMM, B.; GRUBER, P. R.; **Biorefineries – Industrial Processes and Products**. Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley–VCH: Weinheim. Vol. 4, 101 – 133, 2005.

KARP S. G.; WOICIECHOWSKI A. L.; SOCCOL V. T; SOCCOL C. R. **Pretreatment Strategies for Delignification of Sugarcane Bagasse: A Review**. Brazilian Archives Of Biology And Technology. Vol. 56, 679 – 689, 2013.

KHOWALA, S.; VERMA, D.; BANIK, S. P. **Biomolecules: (introduction, structure & function)**. Indian Institute of Chemical Biology 4, Raja S. C. Mullick Road. Kolkata – 700032. INDIA. 2008.

KISHIDAA H.; JINB F.; YANB X.; MORIYAC T.; ENOMOTO H. **Formation of lactic acid from glycolaldehyde by alkaline hydrothermal reaction**. Carbohydrate Research. Vol. 341, 2619 – 2623, 2006.

KLOCK, U. **LIGNINA - Disciplina Química da Madeira**. Universidade Federal de Paraná, 2010.

KUPIAINEN, L. AHOLA, J. TANSKANEN, J. **Kinetics of glucose decomposition in formic acid**. Chemical engineering research and design. Vol. 89, 2706 – 2713, 2011.

LEE J. **Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol**. Journal of Biotechnology. Vol. 56, 1 – 24, 1997.

LEITE, F. **Validação em análise química** – Campinas, SP: Editora Átomo, 2002. 4ª edição.

LEITE, R. C., & CORTEZ, L. A. B. (2008). **O etanol combustível no Brasil**. Revista Biocombustíveis no Brasil: Realidades e Perspectivas, Ministério das Relações Exteriores.

LINEBACK, D.R. **The chemistry of complex carbohydrates**. Complex Carbohydrates in Food. Marcel Dekker, Inc New York, 1999.

LIN R. ; CHENG J.; LINGKAN D.; SONG W.; , ZHOU J.; CEN. K.; **Subcritical water hydrolysis of rice straw for reducing sugar production with focus on degradation by-products and kinetic analysis**. Bioresource Technology. Vol.186, 8 – 14, 2015.

LIU X.; XU Q.;, LIU J.; YIN D.; SU S.; DING H. **Hydrolysis of cellulose into reducing sugars in ionic liquids**. Fuel. Vol. 164, 46 – 50, 2016.

LLOYD, S. R. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. JOHN WILEY & SONS, INC. New York • Chichester • Brisbane • Toronto, 1979.

LU, Y.; Yang, B.; Gregg, D.; Saddler, J. N.; Mansfield, S. D. **Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues**. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 98, 641, 2002.

Maa Y.; Ji W.; Zhu X.; Tian L.; Wana X. **Effect of extremely low  $AlCl_3$  on hydrolysis of cellulose in high temperature liquid water**. Biomass and bioenergy. Vol. 39, 106-111, 2012.

MARINHO M. R. M.; DE CASTRO W. B. **Planejamento Fatorial: Uma Ferramenta Poderosa Para Os Pesquisadores**. COBENGE 2005 – Congresso Brasileiro de Ensino de Engenharia, 12 a 15 de setembro – Campina Grande Pb.

MARSDEN, W. L.; GRAY, P. P.; NIPPARD, G. J.; QUINLAN, M. R. **Evaluation of the DNS method for analysing lignocellulosic hydrolysates**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Vol. 32, 1016 – 1022, 1982.

MARQUES, G.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO A, J. C.; EVTUGUIN, D. V. **Acetylated heteroxylan from agave sisalana and its behavior in alkaline pulping and TCF/ECF bleaching**. Carbohydrate Polymers, Barking. Vol. 81, 517 – 523, 2010.

MARQUES, F. Pesquisa FAPESP 2008, 149, 20.

MENDES, L. V. P. **Produção de 5-hidroximetilfurfural (HMF) por desidratação da frutose através de catálise heterogênea e homogênea**.

Dissertação (Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2012.

MOTTA, V. A. Bioquímica Básica – Capítulo 5 – Carboidratos. Autolab, Análises Clínicas.

MOTA, C. J. A.; PESTANA, C. F. M. **Co-produtos da Produção de Biodiesel**. Revista Virtual Química. Vol. 3, 416 – 425, 2011.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. **Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel**. Química Nova. Vol. 32, 639 – 648, 2009.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D.C. **Chemical analysis of Pinus oocarpa wood PARTE I – quantification of macromolecular components and volatile extractives**. Revista Árvore. Vol. 29, 461– 470, 2005.

MUSSATO, I. S.; ROBERTO, I. C. **Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, n. 28, p. 34 – 39, set/out 2002.

OGEDA T. L.; PETRI F. S. D. **Hidrólise enzimática de biomassa**. Química Nova. Vol. 33, No. 7, 1549 – 1558, 2010

OGO S.; NISHIO T.; SEKINE H.; ONDA A.; SEKINE Y. **One pot direct catalytic conversion of cellulose to C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> hydrocarbons using Pt/H-USY zeolite catalyst at low temperature**. Fuel Processing Technology. Vol.141, 123 – 129, 2016.

ONDA A.; OCHI T.; KAJIYOSHI K.; YANAGISAWA K. **A new chemical process for catalytic conversion of D-glucose into lactic acid and gluconic acid**. Applied Catalysis A: General. Vol. 343, 49 – 54, 2008.

PARAJO, J. C.; Garrote, G.; CRUZ, J. M.; Dominguez, H. **Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials**. Trends Food Sci. Technol. Vol. 15, 115 – 120, 2004.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. In Series on Biotechnology, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, Vol. 2, 45, 2008.

PLOW, R. H.; SAEMAN, J. F.; TURNER, H. D.; SHERRARD, E. C. **The rotary digester in wood saccharification**. Industrial and Engineering Chemistry. Vol. 37, 36 – 43, 1945.

PRUNESCU R. M.; SIN G. **Dynamic modeling and validation of a lignocellulosic enzymatic hydrolysis process – A demonstration scale study**. Bioresource Technology. Vol. 150, 393 – 403, 2013.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova. Vol. 27, 771 – 780, 2004.

ROMERO A.; ESTHER A.; SASTRE A.; MARQUEZ A. N. **Conversion of biomass into sorbitol: Cellulose hydrolysis on MCM-48 and D-Glucose hydrogenation on Ru/MCM-48**. Microporous and Mesoporous Materials. Vol. 224, 1 – 8, 2016.

RUBIN, E. M. **Genomics of cellulosic biofuels**. Nature 2008, Vol. 454, 841.

SANDUN F.; SUSHIL A.; CHAUDA C.; NAVEEN M. **Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction**. Energy & Fuels 2006. Vol. 20, 1727–1737.

SÁNCHEZ C.; EGÜÉS I.; GARCÍA A.; LLANO-PONTE R.; LABIDI J. **Lactic acid production by alkaline hydrothermal treatment of corn cobs**. Chemical Engineering Journal. Vol. 181– 182 655– 660, 2012.

SANTOS F. A.; QUEIRÓZ J. H.; COLODETTE J. L.; FERNANDES A. S.; GUIMARÃES V. M.; REZENDE T. S. **Potencial da Palha de Cana-de-açúcar para Produção de Etanol**. Química Nova. Vol. 35, 1004 –1010, 2012.

SANTOS, J. B. **Conversão Catalítica De Frutose E Glicose Em Presença De Catalisadores De Sn(IV)**. Tese (Doutora em Química), Universidade Federal de Alagoas, AL, 2015.

SHEN D.; YAO S.; WU S.; LIU Q.; XIAO R. **Kinetic study on the thermo-oxidative degradation of glyceraldehydes under different oxygen concentrations**. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. Vol. 113, 665 – 671, 2015.

SHI, J.; YANG, Y. WANG, N. et al. **Catalytic conversion of fructose and sucrose to 5-hydroxymethylfurfural using simple ionic liquid/DMF binary reaction media**. Catalysis Communications. Vol. 42, 89, 2013.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass.** Laboratory Analytical Procedure (LAP) - NREL Laboratory Analytical Procedures for standard biomass analysis are available electronically at, August 2012.

SLUITER A.; HAMES B.; RUIZ R.; SCARLATA C.; SLUITER J.; **Templeton D. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples.** Laboratory Analytical Procedure (LAP) - NREL Laboratory Analytical Procedures for standard biomass analysis are available electronically at, August 2006.

SUN D.; TAKAHASHI Y.; YAMADA Y.; SATO S. **Efficient formation of angelica lactones in a vapor-phase conversion of levulinic acid.** Applied Catalysis A: General. Vol. 526, 62 – 69, 2016.

TAMANINI, C. & HAULY, M. C. O. **Resíduos agroindustriais para a produção biotecnológica de xilitol.** Seminário: Ciências Agrárias, Londrina. Vol. 25, 315 – 330, 2004.

TAPPI. Carbohydrate composition of extractive-free wood and wood pulp by gas – liquid chromatography. 2009.

TOMÉ, J. A., 2014. Etanol de segunda geração: o grande salto tecnológico. Disponível em: <[http://www.crq4.org.br/informativomat\\_1213](http://www.crq4.org.br/informativomat_1213)>. Acesso em: 10 de Setembro de 2016.

TEÓFILO, F. R.; FERREIRA, M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova.** Vol. 29, 338 – 350, 2006.

TSUBAKIA S.; OONOA K.; ONDAB A.; YANAGISAWAB K.; MITANID T.; JUN-ICHI A. **Effects of ionic conduction on hydrothermal hydrolysis of corn starch and crystalline cellulose induced by microwave irradiation.** Carbohydrate Polymers. Vol. 137, 594 – 599, 2016.

VÁSQUEZ, M. P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M. B.; PEREIRA Jr., N. **Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production simultaneous Saccharification and Fermentation.** Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 12, 137 – 140, 2007.

VILELA, E. F. **Utilização do planejamento fatorial para a otimização do experimento do pêndulo.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)

em Física licenciatura), UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS/UNIFAL-MG, MG, 2013.

XIANG Q.; Y. LEE Y. Y.; TORGET W. R. **kinetics of glucose decomposition during dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass**. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 113 – 116, 2004.

WANG. J.; ZHOU M.; YUAN Y.; ZHANG Q.; FANG X.; ZANG S. **Hydrolysis of cellulose catalyzed by quaternary ammonium perchlorates in 1-allyl-3-methylimidazolium chloride**. Bioresource Technology. Vol. 197, 42 – 47, 2015.

YANG L.; SU J.; CARL S.; LYNAM J. G.; XIAOKUN YANG X.; LIN H. **Catalytic conversion of hemicellulose acid biomass Lactic through the aqueous phase neutral pH**. Applied Catalysis B: Environmental. Vol. 162, 149 – 157, 2015.

YUAN Y.; WANG J.; FU N.; ZANG S. **Hydrolysis of cellulose in 1-allyl-3-methylimidazolium chloride catalyzed by methyltrioxorhenium**. Catalysis Communications. Vol. 76, 46 – 49, 2016.

ZHANG C.; RUNGE T. **Fractionating Pentosans and Hexosans in Hybrid Poplar**. Industrial & Engineering Chemistry Research. Vol. 51, 133 – 139, 2012.

ZHANG F.; Fang Z. **Hydrolysis of cellulose to glucose at the low temperature of 423 K with  $\text{CaFe}_2\text{O}_4$ -based solid catalyst**. Bioresource Technology. Vol. 124, 440 – 445, 2012.

ZHOU S.; RUNGE T. M. **Validation of lignocellulosic biomass carbohydrates determination via acid hydrolysis**. Carbohydrate Polymers. Vol. 112, 179 – 185, 2014.

ZHANG P.; DONG S.; MA H.; WANG Y.; HU X. **Fractionation of corn stover into cellulose, hemicellulose and lignin using a series of ionic liquid**. Industrial Crops and Products. Vol. 76, 688 – 696, 2015.