



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Josiane Aparecida de Liz

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO
DE MONÔMEROS FENÓLICOS DERIVADOS DA LIGNINA KRAFT POR
EXTRAÇÃO COM PONTEIRA DESCARTÁVEL E GC-FID**

FLORIANÓPOLIS

2021

Josiane Aparecida de Liz

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO
DE MONÔMEROS FENÓLICOS DERIVADOS DA LIGNINA KRAFT POR
EXTRAÇÃO COM PONTEIRA DESCARTÁVEL E GC-FID**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz A. S. Madureira

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Liz, Josiane Aparecida
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE MONÔMEROS FENÓLICOS DERIVADOS DA LIGNINA
KRAF TPOR EXTRAÇÃO COM PONTEIRA DESCARTÁVEL E GC-FID /
Josiane Aparecida Liz ; orientador, Luiz A. S.
Madureira, 2021.

65 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Química. 2. DPX-WAX. 3. Licor Negro. 4. Lignina. 5.
Cromatografia a gas.. I. Madureira, Luiz A. S. . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Química. III. Título.

Josiane Aparecida de Liz

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO
DE MONÔMEROS FENÓLICOS DERIVADOS DA LIGNINA KRAFT POR
EXTRAÇÃO COM PONTEIRA DESCARTÁVEL E GC-FID**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke
UFSC - Florianópolis

Profa. Dra. Dilma Budziak
UFSC-Curitibanos

Dr. Fabrício Augusto Hansel
Embrapa, PR

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre Química.

Prof. Dr. Daniel L. G. Borges
Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Prof. Dr. Luiz A. S. Madureira,
Universidade Federal de Santa Catarina
Orientador

Florianópolis, 2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Carlos Macedo de Liz e Marizete Antunes de Lima de Liz por estarem do meu lado em todas minhas decisões, sempre me incentivando a continuar estudando, me dando todo o suporte, amor, carinho e apoio nos momentos difíceis. Eu amo muito vocês e serei sempre grata por tudo que fizeram e ainda fazem por mim.

Ao meu Lindo, Thiago Jones, sobretudo pela paciência, carinho e apoio. Agradeço por estar ao meu lado durante essa etapa, me aconselhando e acalmando sempre que precisei, sua presença tornou os desafios mais leves. Amo você!

Ao meu irmão Cristian Macedo de Liz e a toda a minha família, primos, tios, padinhos, avós *in memoriam* Sebastião Ribeiro de Liz e Horizontina Macedo de Liz, obrigada por me apoiarem cada um da sua forma e por todo amor que sempre me deram. Eu amo todos vocês.

À todos os meus amigos que de alguma forma também estiveram me apoiando nesta caminhada, principalmente a Mariana do Carmo, Cristiane de Oliveira, Jéssica Moroso, Patrícia Rosa, Rodrigo Henrique Saatkamp, e Camila Conaco que compartilharam comigo muitos momentos de alegria e também foram um ombro amigo para chorar nos dias tristes. Vocês fazem os meus dias serem melhores e mais leves, vou levar vocês no meu coração pra sempre.

Aos meus colegas do LaGOAmb pelas risadas, momentos de descontração e principalmente por toda a ajuda profissional que em alguns momentos também foi pessoal, em especial a Karine Garcia, Marina Coelho, Angela Concer, Sara Graf, Gustavo e Diogo Morelli, a ajuda de vocês foi essencial para que a realização deste trabalho fosse possível.

Marina e Karine muito obrigada por terem me dado apoio no momento que eu mais precisei, por terem me ensinado tanto no decorrer desse projeto e pelas correções na dissertação, eu sou imensamente grata por toda a ajuda, suporte e ensinamentos de vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Madureira, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, confiança, dedicação na orientação, apoio, paciência e principalmente por todos os ensinamentos transmitidos ao longo desses anos. Meu muito obrigada!

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-

graduação pela estrutura, todas as oportunidades e pelo ensino público e de qualidade. Aos docentes do Departamento de Química da UFSC, por todo conhecimento compartilhado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação (CAPES) pela bolsa de estudos até mesmo no período de pandemia, me permitindo ter dedicação ao programa de pós-graduação em química e desenvolver este trabalho.

Ao Dr Fabrício Augusto Hansel, Químico e Analista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Colombo, PR), que forneceu as amostras de licor negro e e me auxiliou durante todo o projeto.

Agradeço a Deus e a todos, que mesmo não citados, mas que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho, me acompanhando durante todo o mestrado, fazendo parte deste momento, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Neste estudo é proposta a utilização da técnica de extração em ponteiras descartáveis (DPX) juntamente com a cromatografia a gás com detector por ionização em chama (GC/FID) para a determinação de 5 monômeros de lignina: 4-hidroxibenzoaldeído, vanilina, acetossiringona, acetovanilona, siringaldeído. O objetivo principal do trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica capaz de determinar esses derivados de lignina do processo kraft por meio da acidificação do licor negro, produto gerado pelas indústrias de celulose. As ponteiras utilizadas para realizar as extrações desses compostos, adquiridas comercialmente, possuem capacidade de 1 mL e contêm em seu interior 20 mg de material sorvente constituído de poliamino (DPX-WAX). Devido à polaridade dos derivados de lignina foi necessário uma adequação do método para a análise por GC/FID por meio da derivação com o agente sililante N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA). As otimizações dos principais parâmetros que afetam a eficiência de extração foram realizadas de forma univariada, sendo as condições ótimas constituídas de 3 ciclos de extração de 30 s com 800 μL de amostra e 3 ciclos de dessorção de 30 s com 200 μL de acetona, após derivação com 40 μL de BSTFA. A partir das condições otimizadas foram obtidos os parâmetros analíticos com coeficientes de determinação superiores a 0,9931, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. As precisões variaram de 2,1 a 13,1% para os ensaios intradia e de 4,8 a 11,6% para os interdia. Os ensaios de recuperação apresentaram valores na faixa de 69 a 99%. Nas amostras reais 1 e 2 foram encontrados valores de 1,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os analitos 4-hidroxibenzoaldeído e siringaldeído e para os analitos vanilina, acetovanilina e acetossiringona, os valores determinados foram, respectivamente, 21,7, 19,2 e 20,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na amostra 1 e 28,7, 21,2 e 19,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na amostra 2. Dessa forma pode-se observar que o método foi adequado para a determinação desses compostos fenólicos monoméricos oriundos do licor negro gerado no processo kraft.

Palavras-chave: DPX-WAX. Licor Negro. Lignina. Cromatografia a gás.

ABSTRACT

In the present study, the disposable pipette extraction technique (DPX) in conjunction with gas chromatography with flame ionization detector (GC/FID) is proposed for the determination of 5 lignin monomers: 4-hydroxybenzaldehyde, vanillin, acetosyringone, acetovanillone, syringaldehyde. The main objective of this work was developing an analytical methodology capable of determining these lignin derivatives from kraft process after acidification of black liquor, a product generated by cellulose industries. The commercially available tips used to extract these compounds have the capacity of 1 mL and contain 20 mg of sorbent material composed of polyamino (DPX-WAX). Due to the polarity of the lignin derivatives, the method has been adapted using silylating N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) derivative reagent before the GC/FID analysis. The optimizations of the main parameters that affect the extraction efficiency were carried out in a univariate mode, achieving optimal conditions with 3 extraction cycles of 30 s with 800 μL of sample and 3 desorption cycles of 30 s with 200 μL of acetone and 40 μL of BSTFA. From the optimal conditions, the following analytical parameters were obtained: coefficients of determination above 0.9931, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 1.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. Accuracies ranged from 2.1 to 13.1% for intraday trials and from 4.8 to 11.6% for interday trials. The recovery tests conferred values in the range of 69 to 99%. In the real samples 1 and 2, values of 1.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were found for the analytes 4-hydroxybenzaldehyde and syringaldehyde. Concentrations of vanillin, acetovanillin and acetosyringone were equal to 21.7, 19.2 and 20.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, in sample 1 and 28.7, 21.2 and 19.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in sample 2. The method was suitable for the determination of these monomeric phenolic compounds from black liquor of kraft process.

Keywords: DPX-WAX. Black Liquor. Lignin. Gas Chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de recuperação da lignina através da acidificação do licor negro	14
Figura 2 - Desenho esquemático de uma planta de celulose	16
Figura 3 - Representação do processo Kraft	18
Figura 4 - Estrutura química do Licor Negro de alta viscosidade	19
Figura 5 - Estrutura da lignina em madeira macia	21
Figura 6 Fenóis derivados de lignina após reação de oxidação com CuO em meio alcalino	23
Figura 7--Representação de uma reação de silanização utilizando o agente BSTFA.....	24
Figura 8 - Extração em ponteira descartável (DPX).....	29
Figura 9 Cromatograma da separação de uma solução padrão contendo os cinco derivados fenólicos da lignina após derivatização com N,O - 4 bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) por GC-FID, no modo <i>splitless</i>	41
Figura 10 - Cromatograma que ilustra o teste da ponteira C18	43
Figura 11 - Cromatograma que ilustra o teste da ponteira Fase- Reversa.....	43
Figura 12 - Cromatograma que ilustra o teste da ponteira WAX.....	44
Figura 13 Gráfico de barras resultante da otimização em triplicata do número de ciclos	45
Figura 14--Gráfico de barras resultante da otimização em triplicata do tempo de equilíbrio.....	46
Figura 15 Gráfico de barras resultante da otimização em triplicata do solvente de dessorção.....	47
Figura 16 - Procedimento de DPX otimizado.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição típica dos licores negros do processo Kraft.....	20
Tabela 2 Diferentes tipos de fase extratora comerciais com seus respectivos usos para a técnica de extração com DPX	31
Tabela 3 Trabalhos reportados na literatura utilizando a técnica de DPX no preparo de amostra	32
Tabela 4 Planejamento univariado para otimização do tempo de extração e dessorção.....	38
Tabela 5 Planejamento univariado para otimização número de ciclos de extração e dessorção.....	38
Tabela 6 - Tempo de retenção dos analitos obtidos na separação cromatográfica....	42
Tabela 7 - Resultados obtidos através da curva de calibração dos analitos	49
Tabela 8 Resultados obtidos através de ensaios de recuperação para a avaliação da exatidão e precisão do método desenvolvido	50
Tabela 9 Resultados obtidos nas análises de duas amostras de licor negro utilizando o método proposto.....	51
Tabela 10 Comparação do método desenvolvido com outros reportados na literatura	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN - Acetonitrila, do inglês Acetonitrile.

AOAC - Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês Association of Official Analytical Chemists.

C18 - Octadecilsilano, do inglês Octadecylsilane.

DAD - Detector por arranjo de diodos, do inglês Diode array detector.

DPX - Extração em ponteira descartável, do inglês Disposable pipette extraction.

DPX-RP - Extração em ponteira descartável com fase reversa, do inglês Reverse phase disposable pipette extraction.

DPX-CX - Extração em ponteira descartável com fase de troca catiônica, do inglês Cationic change disposable pipette extraction.

DPX-WAX - Extração em ponteira descartável com fase de troca aniônica, do inglês Anionic change disposable pipette extraction.

DPX-WCX - Extração em ponteira descartável com fase de troca catiônica, do inglês Cationic change disposable pipette extraction.

DPX-Si - Extração em ponteira descartável com fase de silício, do inglês Silicon phase disposable pipette extraction.

DPX-SC - Extração em ponteira descartável vazia, do inglês Empty disposable pipette extraction.

DPX-Blank - Extração em ponteira descartável branca, do inglês Blank disposable pipette extraction.

D-SPE - Extração em fase sólida dispersiva, do inglês Dispersive solid phase extraction.

EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês United States Environmental Protection Agency.

GC-ECD - Cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons, do inglês Gas chromatographic with electron capture detector.

GC-FID - Cromatografia gasosa com detector por ionização de chama, do inglês Gas chromatography with flame ionization detector.

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês Gas chromatography - mass spectrometry.

GC-MS/MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em tandem, do inglês Gas chromatography - mass spectrometry/mass spectrometry.

HF-LPME - Microextração em fase líquida suportada com fibra oca, do inglês Hallow fiber liquid-phase microextraction.

HPLC-DAD - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos, do inglês High performance liquid chromatography with diode array detection.

HPLC-FLD - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, do inglês High performance liquid chromatography with fluorescence detection.

IL-DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva baseada em líquidos iônicos, do inglês Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction.

DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva em seringa, do inglês Dispersive liquid-liquid microextraction.

LLE - Extração líquido-líquido, do inglês Liquid-liquid extraction.

LOD - Limite de detecção, do inglês Limit of detection.

LOQ - Limite de quantificação, do inglês Limit of quantification.

QuEChERS - Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto, Seguro, do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe.

R - Coeficiente de correlação linear, do inglês Linear correlation coefficient.

R² - Coeficiente de determinação, do inglês Coefficient of determination.

RP - Fase Reversa, do inglês Reverse Phase.

RSD - Desvio Padrão Relativo, do inglês Relative Standard Deviation.

SME - Margem de erro simultânea, do inglês Simultaneous margin of error.

SPE - Extração em fase sólida, do inglês Solid phase extraction.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 O PROCESSO DA INDÚSTRIA DE CELULOSE	16
2.2 PROCESSO KRAFT	17
2.3 LICOR NEGRO	18
2.4 LIGNINAS.....	21
2.4.1 Derivados fenólicos da lignina	22
2.5 DERIVAÇÃO	24
2.6 DETERMINAÇÃO DE DERIVADOS DE LIGNINA	25
2.7 PREPARO DE AMOSTRA	26
2.8 EXTRAÇÃO EM PONTEIRA DESCARTÁVEL	28
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	35
4.2 INSTRUMENTAÇÃO CROMATOGRÁFICA	35
4.3 LIMPEZA DE VIDRARIAS	36
4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	36
4.5 AMOSTRA DE LICOR NEGRO E ACIDIFICAÇÃO DO MEIO	36
4.6 OTIMIZAÇÕES DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM PONTEIRAS DESCARTÁVEIS.....	37
4.6.1 Condições fixadas inicialmente	37
4.7 LIMPEZA E CONDICIONAMENTO DA PONTEIRA.....	37
4.7.1 Escolha da Ponteira Comercial	37
4.7.2 Otimização de ciclos e tempo de extração	38
4.7.3 Otimização do solvente de dessorção	38
4.8 CONDIÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO DOS PADRÕES	39
4.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO.....	39
4.9.1 Parâmetros analíticos de mérito	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1 OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	41
5.2 OTIMIZAÇÕES DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM PONTEIRAS DESCARTÁVEIS.....	42
5.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR DPX	44

5.3.1 Otimização do número de ciclos e tempo	44
5.3.2 Otimização do solvente de dessorção.....	46
5.5 PROCEDIMENTO OTIMIZADO DO PREPARO DE AMOSTRAS.....	47
5.6 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS A PARTIR DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA	48
5.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO	51
5.8 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA	51
6 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
APÊNDICE A: TABELA ANOVA – ESCOLHA DA QUANTIDADE DE CICLOS.....	63
APÊNDICE B: TABELA ANOVA – ESCOLHA DO TEMPO DE CADA CICLO.....	63
APÊNDICE C: TABELA ANOVA – ESCOLHA DO SOLVENTE.....	64
APÊNDICE D: CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LICOR NEGRO PROVENIENTE DA MADEIRA DE EUCALIPITOS	64

1 INTRODUÇÃO

A produção de celulose pelo método Kraft é dominante no Brasil e no mundo em geral pelo fato de gerar poucos resíduos de licor negro, principal subproduto do processo. Esse subproduto pode ser totalmente reaproveitado, o que torna este processo ecologicamente correto (COSTA, 2000). Em uma moderna indústria de celulose há etapas como: descascamento da madeira, picagem de cavacos, cozimento, depuração, lavagem, branqueamento e secagem (CORREIA, 2010). A função do processo Kraft é dissolver a lignina, agente ligante das fibras na madeira, com o objetivo de liberar as fibras com o mínimo de degradação dos carboidratos (celulose e hemicelulose).

A celulose é um polímero natural de cadeia longa presente nos vegetais. Essa substância caracteriza-se como um importante componente das células vegetais que é usualmente chamada de fibra, base para a produção de papel (AZZOLINI; FABRO, 2012). Associada à celulose encontra-se a lignina, uma macromolécula que confere rigidez à parede celular e na madeira é responsável pela ligação entre as fibras.

No processo Kraft, ao concluir a etapa de cozimento da madeira nos digestores, os residuais químicos e as substâncias dissolvidas formam a solução aquosa, que é chamada de licor preto, rico em lignina e reagentes químicos utilizados na polpação. O processo Kraft de recuperação processa o licor negro e regenera os produtos químicos de cozimento (MELO *et al.*, 2011).

Segundo Carreiro (2009), o licor negro possui alcalinidade ativa e pode ocasionar problemas no controle biológico das estações de tratamento de efluentes e impactos severos em ecossistemas aquáticos, além de emissões de poluentes atmosféricos. O Licor negro atualmente tem sido utilizado como insumo energético, com menor ou maior eficiência dependendo do processo utilizado (BRANDÃO, 2015).

Os monômeros derivados da lignina presentes no licor podem ser utilizados como marcadores de origem da lignina, para analisar a qualidade do licor que foi separado. Além disso, podem ter um valor comercial, visto que a possibilidade de escassez de matérias-primas utilizadas na exploração de petróleo vem gerando um espaço para o desenvolvimento de novos produtos e processos baseados em materiais orgânicos renováveis, como a lignina (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014).

Quais os monômeros de lignina ainda podem estar presentes na água residual proveniente da separação do licor negro após o tratamento ácido? Para obter respostas a este questionamento, fazem-se necessários estudos mais aprofundados sobre estas águas residuais, visando a escolha de um método analítico possível de determinar um maior número de monômeros com maior sensibilidade. Um método robusto que seja capaz de pré-concentrar e extrair com maior eficiência os monômeros restantes da lignina.

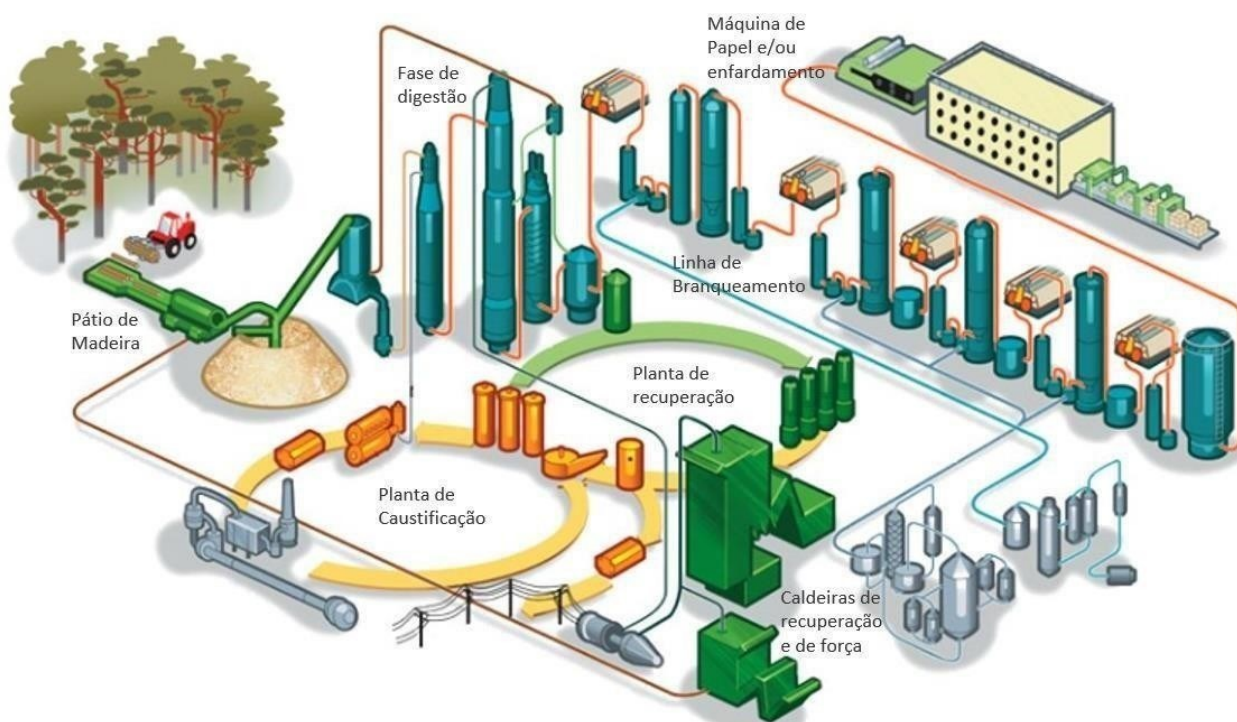
Com o objetivo de desenvolver um método baseado em preparo de amostra que seja aliado à química verde, oferecendo menos riscos ao meio ambiente e produção de resíduos, a extração em ponteira descartável (DPX, do inglês Disposable pipette extraction) demonstra-se uma técnica vantajosa devido à utilização de pouco solvente orgânico. Desse modo, propõe-se o uso da técnica de DPX juntamente com um sistema de cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (GC-FID) no desenvolvimento de um método analítico capaz de detectar e determinar, quantitativamente, cinco monômeros de lignina presentes em amostras de licor negro mesmo após o tratamento ácido para a remoção da lignina kraft.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O PROCESSO DA INDÚSTRIA DE CELULOSE

De forma geral e ilustrativa, a Figura 2, abaixo, apresenta uma visão do processo industrial para obtenção de celulose.

Figura 2 - Desenho esquemático de uma planta de celulose



Fonte: Adaptado de Valmet (2018).

As toras de madeira são transportadas até a fábrica, onde são cortadas e descascadas em pequenos pedaços, chamados de cavacos e encaminhados para o processo de cozimento.

Os cavacos de madeira alimentam o digestor, e passam pelo processo Kraft, onde são impregnados com licor de cozimento, que contém principalmente hidróxido de sódio e sulfeto de sódio. O sulfeto de sódio é adicionado ao digestor para melhorar o processo de dissociação da lignina das fibras da celulose, acelerando a operação de cozimento da madeira e aumentando a resistência da polpa (CARDOSO; DOMINGOS; PASSOS, 2008). Em temperaturas elevadas (150 a 170 °C), os hidróxidos e íons sulfeto reagem com a lignina e os carboidratos presentes (principalmente glucomanas e xilanas). Como resultado do tratamento, as fibras de

celulose podem ser facilmente separadas (PAULA, 2010). Após essa etapa a polpa de celulose é lavada e peneirada.

Em seguida, a polpa passa pelo branqueamento até o grau desejado, sendo depois bombeada para uma torre de armazenamento à frente da máquina de secagem de celulose. Neste ponto, a polpa pode ser usada para a produção de papel se for uma usina integrada, ou seja, se a usina tiver uma máquina de papel. Caso contrário, a polpa é bombeada para a máquina de secagem, onde a água é removida e uma polpa seca é formada. Em seguida ela é cortada em folhas menores e enfardadas antes de serem transportadas para o cliente (JORGE, 2018).

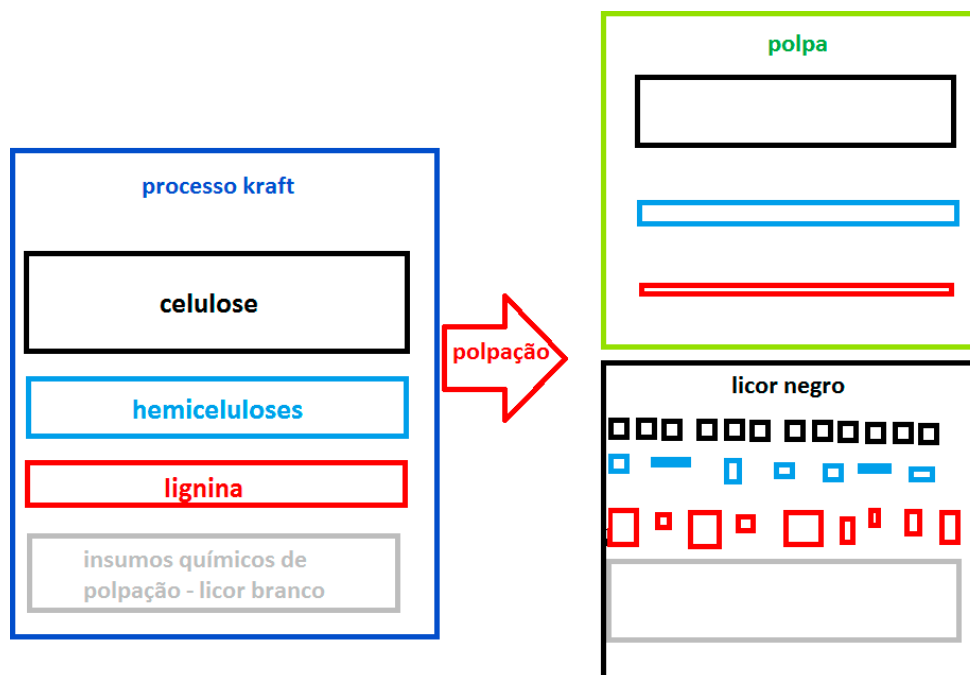
Após o processo de digestão, o líquido separado da polpa na lavagem chama-se “licor negro”. O mesmo consiste em material orgânico dissolvido, compostos inorgânicos e substâncias químicas usadas no cozimento. O licor negro tem sua concentração de sólidos secos aumentada por meio das diferentes etapas de evaporação. Em seguida é transportado para a caldeira de recuperação para ser queimado, e seu vapor utilizado para gerar eletricidade.

2.2 PROCESSO KRAFT

Atualmente o processo básico de produção do papel no Brasil fundamenta-se em quatro etapas: a extração e preparação da madeira; o polpamento; a transformação da madeira em celulose marrom; a transformação da celulose marrom em celulose branqueada e a etapa de finalização do papel desejado (ALVES *et al.* 2018). Sucintamente, a função do processo Kraft dentro de uma indústria do papel é dissolver a lignina, agente ligante das fibras na madeira, com o objetivo de liberar as fibras com o mínimo de degradação dos carboidratos (celulose e hemicelulose) (Figura 3). O processo Kraft apresenta em uma de suas etapas o cozimento e em seguida a polpação, onde são empregados o NaOH e o Na₂S como agentes ativos na reação (D’ALMEIDA, 1988). A etapa de polpação gera um subproduto conhecido como licor negro, uma mistura complexa que contém grandes quantidades de substâncias orgânicas, componentes inorgânicos e reagentes não convertidos no processo Kraft e água (FORTUNATTO, 2014). O licor negro é utilizado como combustível para produção de vapor e hoje é visto como uma eficiente fonte de bioenergia (HAMAGUCHI, 2013).

XXXX

Figura 3 - Representação do processo Kraft

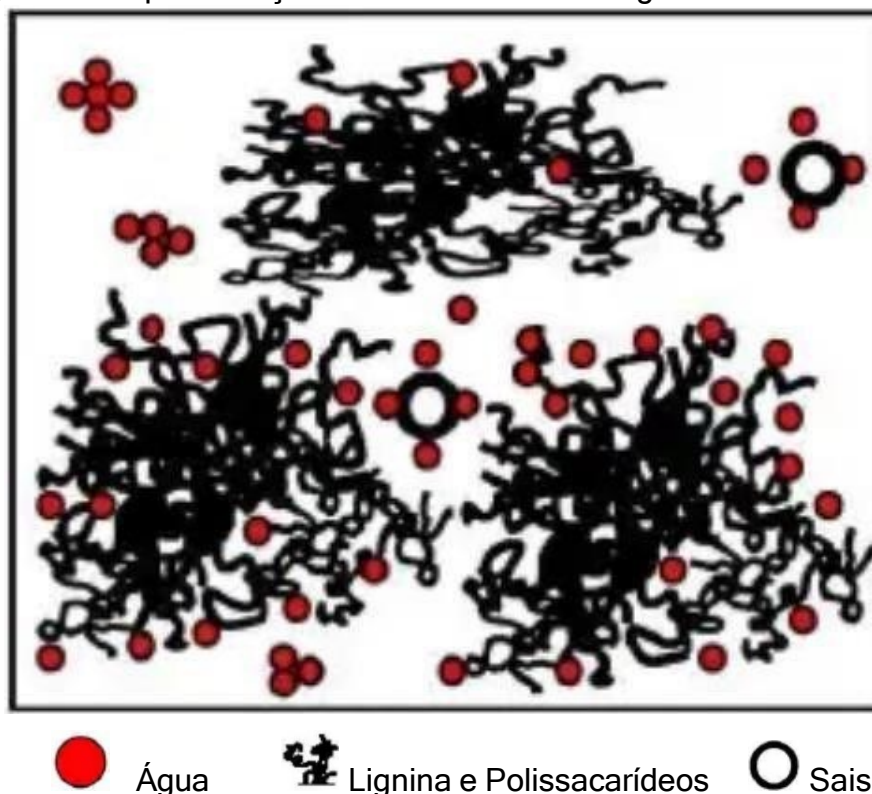


Fonte: Oliveira (2016).

2.3 LICOR NEGRO

O licor negro é uma solução constituída de água, matéria orgânica e matéria inorgânica, sendo que, a matéria inorgânica apresenta basicamente os resíduos dos reagentes químicos utilizados na etapa de cozimento da madeira. Os compostos orgânicos são constituídos por lignina, polissacarídeos, ácidos carboxílicos e extrativos (GULLICHSEN; FOGELHOLM, 1999). Na Figura 4 pode-se verificar os componentes químicos do licor negro. A composição do licor dependerá não apenas da madeira utilizada, mas também da relação de álcali/madeira empregada no cozimento, rendimento do cozimento e teor residual de lignina presente na polpa (ADAMS, 2001).

Figura 4 - Representação ilustrativa do Licor Negro de alta viscosidade



Fonte: Cardoso, Oliveira e Passos (2009).

O licor negro é uma solução heterogênea. A lignina presente é totalmente degradada durante o processo, gerando fragmentos com diferentes tamanhos. Para se analisar a lignina gerada no processo Kraft, contida no licor negro, utiliza-se dois processos diferentes, a ultrafiltração e a precipitação ácida. Existe um interesse nestes dois processos, ambos estão sendo estudados e pesquisados mais a fundo, pois, caso a lignina e seus derivados se tornem atrativo de maior valor no mercado, estes processos podem ser montados em escala industrial (FOELKEL, 2009).

A composição química do licor negro depende do tipo de matéria-prima utilizada, podendo ser elas de madeira mole (como por exemplo o Pinus), ou duras (como *Eucalyptus*) ou plantas fibrosas (como o bambu), além das condições de operação. De qualquer forma, para qualquer tipo de madeira e condições operacionais, o licor negro pode ser considerado como uma solução aquosa complexa (CARDOSO; DOMINGOS; PASSOS, 2008).

De acordo com Anzaldo (2007), o licor negro do processo Kraft contém entre 15 a 18% de sólidos dissolvidos em sua composição. Na Tabela 1 são apresentadas as composições típicas dos licores negros do processo *Kraft* de madeiras de folhosas e coníferas.

Tabela 1 - Composição típica dos licores negros do processo Kraft

Componente	Composição (% em peso)	
	Madeira de conífera	Madeira de folhosa
Lignina	45	38
Ácidos Xilososacárico	1	5
Ácidos Glucosacárico	14	4
Hidroxiácidos	7	15
Ácido Fórmico	6	6
Ácido Acético	4	14
Resinas e Ácidos Graxos	7	6
Terebintina	1	-
Outros	15	12

Fonte: Anzaldo (2007, p. 10).

É a lignina que dá ao licor uma cor escura distinta e, portanto, seu nome: licor negro. Conforme a tabela acima, a porcentagem de lignina varia de acordo com o tipo da madeira e pode representar de 35 a 40% dos sólidos secos (VAKKILAINEN, 2009). As quantidades de celulose e hemicelulose variam dependendo de quanto tempo o processo de cozimento ocorre. Normalmente eles compõem 25 a 30 % dos sólidos secos.

Na literatura existem estudos na área de análises do licor negro por meio de precipitação ácida. Em 2016, Berrima *et al.* (2016) precipitaram a lignina do licor negro valendo-se de ácido sulfúrico diluído e a carbonizaram a uma temperatura de 600 °C, formando um carvão adsorvente dos íons Pb (II), Cd (II), Hg (II) e Ni (II). Os autores concluíram que o carvão a base de lignina pode ser utilizado como adsorvente reutilizável em processos de remoção de metais tóxicos. Fu *et al.* (2013) estudaram o carvão ativado obtido através da lignina e demonstraram a eficiência do composto em adsorver o corante azul de metileno e dessa forma a possível aplicação desse adsorvente.

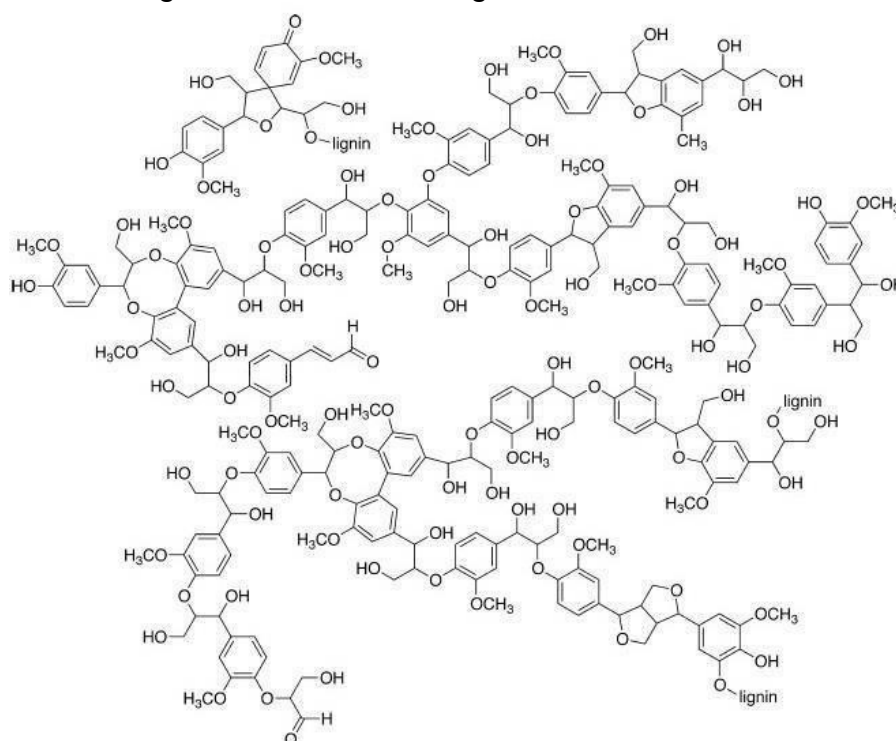
Pereira, Rodrigues e Hansel (2018) comparam a extração em fase sólida com a extração líquido-líquido, para a determinação de monômeros de lignina no licor verde após tratamento alcalino de madeira de eucalipto. A partir da análise semiquantitativa foram identificados nove compostos, sendo eles dos grupos aldeídos, cetonas e ácidos. Um composto do grupo das cetonas foi o que apresentou maiores quantidades no licor negro gerado.

2.4 LIGNINAS

A lignina é um dos principais componentes dos tecidos de gimnospermas (madeiras macias) e angiospermas (madeiras duras). As gramíneas (palmeiras, bambu e cana de açúcar), embora apresentem um significativo teor de lignina, não são classificadas como madeira. Sabe-se que a lignina tem um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo responsável pela resistência mecânica dos vegetais, além de proteger os tecidos lignificados contra ataques de microrganismos. Vegetais primitivos como fungos, algas e líquens não são lignificados (LAI; SARKANEN, 1971; FENGEL; WEGENER, 1983).

Sendo a segunda molécula mais abundante na terra, ficando atrás apenas dos carboidratos (celulose e hemicelulose) (PAULA, 2010), a lignina tem um papel fundamental na vida das plantas. Distribuída entre as suas células, tem a função de manter as fibras “coladas” umas às outras. Em razão disso, é a lignina que dá a rigidez e resistência mecânica à madeira. De acordo com Cardoso, Domingos e Passos (2008), a lignina é um polímero formado por estruturas de fenil-propano, a qual, durante as operações do processo de celulose, é fragmentada tendo seus carboidratos dissolvidos e convertidos em ácidos de baixa massa molar (Figura 5).

Figura 5 - Estrutura da lignina em madeira macia



Fonte: Souto, Calado e Pereira Júnior (2015).

Uma das principais funções da lignina é conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânico aos tecidos vegetais (FENGEL; WEGENER, 1984). A massa molar típica de lignina isolada está no intervalo de 800 - 20.000 g mol⁻¹, mas o grau de polimerização na natureza é difícil de medir, já que a lignina é invariavelmente fragmentada durante a extração e consiste de vários tipos de sub-estruturas que se repetem aparentemente de maneira casual (DOHERTY; MOUSAVIOUN; FELLOWS, 2011).

A produção de lignina deverá aumentar significativamente com o atual incremento das biorrefinarias lignocelulósicas. A conversão da lignina tem um potencial significativo como fonte para a produção sustentada de combustíveis e produtos químicos (BOZELL *et al.*, 2007; WIESENTHAL *et al.*, 2006; PERLACK *et al.*, 2005). Com sua estrutura e propriedades químicas única, uma grande variedade de produtos químicos a granel e finos, particularmente compostos aromáticos, como a vanilina, assim como combustíveis são potencialmente obtidos a partir da lignina (ZAKZESKI *et al.*, 2010).

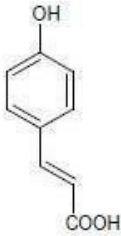
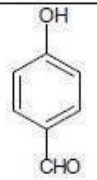
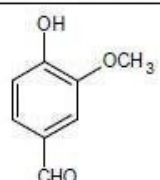
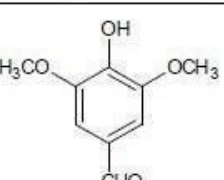
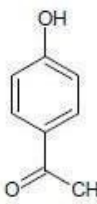
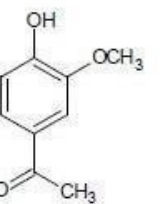
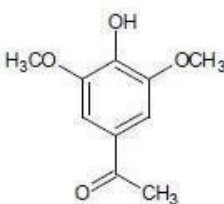
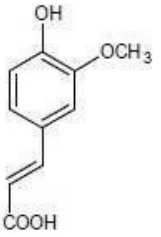

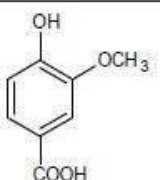
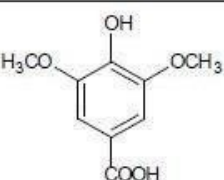
2.4.1 Derivados fenólicos da lignina

Por ser um biopolímero, a lignina apresenta um grande número de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, o que resulta em uma baixa temperatura de vaporização. É possível fazer a caracterização da lignina por meio de reações de oxidação onde as ligações intramoleculares entre os monômeros de fenilpropanóides são clivadas (PEGORARO *et al.*, 2011). Sendo esses pertencentes aos grupos: Guaicil(G) e Siringil (S), p-hidroxifenil (P), podendo ser visualizado na Figura 6.

Para esta reação utiliza-se óxido cúprico ou nitrobenzeno, sendo o óxido cúprico o mais utilizado, devido ao maior rendimento, gerando tanto fenóis aldeídicos quanto fenóis cetônicos. Já o nitrobenzeno forma apenas produtos fenóis aldeídicos (HEDGES; ERTEL, 1982). Na reação de óxido cúprico em meio alcalino é possível gerar 11 produtos fenólicos. Cada composto é formado por um único anel fenólico e podem ser agrupados devido às suas semelhanças estruturais (GOÑI, HEDGES, 1990). Na análise posterior pode ser usado um cromatógrafo a gás, depois de devida derivação, no qual existe uma grande variedade de reagentes derivatizantes. Esses reagentes são capazes de tornar os produtos gerados da

oxidação da lignina mais voláteis e quimicamente mais estáveis (HEDGES; ERTEL, 1982).

Figura 6 - Fenóis derivados de lignina após reação de oxidação com CuO em meio alcalino

Fenóis cinamílicos (C)	Fenóis p-hidroxilicos (P)	Fenóis vanilínicos (V)	Fenóis siringílicos (S)	
 ácido p-cumárico	 p-hidroxi benzaldeído	 vanilina	 siringaldeído	A l d e í d o s
	 p-hidroxi acetofenona	 acetovanilona	 acetosiringona	
 ácido ferúlico	 ácido p-hidroxibenzoico	 ácido vanilínico	 ácido siringico	A c i d o s

Fonte: Thevenot, Dignac e Rumpel (2010).

Os produtos da degradação da lignina que pertencem ao grupo vanilil (G), estão presentes em gimnospermas e angiospermas, independentemente do tipo de tecido. Já o grupo siringil (S) é encontrado em angiospermas lenhosas e sua relação com o guaicil pode ser vista através dos valores de razão S/G.. E os fenóis do grupo p-hidroxifenil (P) são encontrados em maior abundância nas gramíneas (SALIBA *et al.*, 2001).

2.5 DERIVAÇÃO

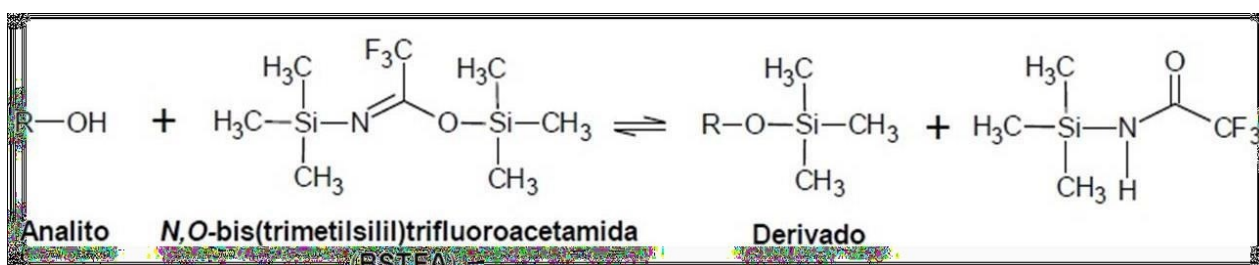
A técnica GC é empregada nas análises de substâncias gasosas, voláteis e termicamente estáveis. Quando as substâncias em análise não apresentam estes pré-requisitos são necessárias modificações para adequá-la à técnica. Particularmente, para substâncias de alta massa molar e/ou contendo grupos funcionais fortemente polares, por exemplo, emprega-se a derivação (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A reação de derivação é um processo químico que utiliza uma espécie capaz de reagir com o analito para gerar um derivado aumentando a eficiência cromatográfica da análise (SCHUMMER *et al.*, 2009). Alguns exemplos de reações de derivação são: esterificação, alquilação, acetilação e silanização. Essa última diferencia-se das demais reações por ocasionar os seguintes efeitos nos analitos:

- Redução da polaridade do composto derivatizado;
 - Aumento da volatilidade, estabilidade térmica, maior seletividade e sensibilidade;
 - Picos mais finos e com diminuição da cauda, e uma melhor separação;
- (FARAJZADEH; NOURI; KHORRAM, 2014).

Na reação de silanização, quando o N,O-bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) é usado, ocorre a substituição de um hidrogênio lábil de grupos funcionais como carboxila, hidroxila, amina e amida, por um grupo alquilsilil. Dentre os agentes sililantes o trimetilsilil é o mais comum, sendo sua reação possível visualizar no esquema da reação na Figura 7 (CABAN; STEPNOWSKI, 2018).

Figura 7 - Representação de uma reação de silanização utilizando o agente BSTFA



Fonte: Alves (2014).

A reação ocorre por um mecanismo de reação nucleofílica de segunda ordem (SN₂), estabilizando e aumentando a velocidade da reação, na presença de um solvente aprótico. A velocidade da reação vai depender da rapidez do ataque da espécie nucleofílica ao átomo de silício que está ligado ao oxigênio. Quanto menos impedido for o nucleófilo e quanto mais forte for o grupo de saída, mais rápido e mais estável será a reação (SCHUMMER *et al.*, 2009; CABAN; STEPNOWSKI, 2018).

Em contrapartida às vantagens, os agentes que promovem a silanização, como trimetilclorosilil (TMCS), bis (trimetilsilil) acetamida (BSTA), N-metil-N-(tert-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (BTMSTFA), entre outros, são muito sensíveis à umidade, ocasionando reações de hidrólise. Então ambos os solventes e a amostra devem estar secos (FARAJZADEH; NOURI; KHORRAM, 2014).

Álcoois e fenóis apresentam propriedades que dificultam a análise por cromatografia a gás. Além disso, a extração desses compostos é difícil devido à polaridade da hidroxila (-OH), podendo levar a perdas do analito na etapa de preparação da amostra, pois são compostos com altas temperaturas de ebulição (FARAJZADEH; NOURI; KHORRAM, 2014). No caso dos álcoois e fenóis, a reação para a formação do derivado é rápida, sendo de extrema importância o efeito da temperatura no injetor, uma vez que a temperatura acelera a reação de derivação, que necessita ser completa em um curto intervalo de tempo (PUSCH, 2016). Após o procedimento de derivação é possível obter uma melhor sensibilidade do método de detecção (ALVES, 2014).

2.6 DETERMINAÇÃO DE DERIVADOS DE LIGNINA

Reporta-se na literatura uma série de técnicas, as quais são capazes de avaliar e determinar compostos derivados de lignina. Dentre estas, encontram-se as técnicas de GC e HPLC, técnicas eletroforéticas, bem como técnicas de ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês nuclear magnetic resonance) e raios X, entre outras.

Dupont *et al.* (2007) caracterizaram produtos de degradação de compostos derivados de celulose e lignina de papéis envelhecidos via eletroforese capilar e os limites de detecção encontrados foram inferiores a 0,5 mg L⁻¹. Fu *et al.* (2014)

determinaram ligninas em biomassa para a produção de combustíveis alternativos por meio de NMR. LV *et al.* (2012) estudaram os mecanismos de adsorção de mercúrio em lignina por meio de técnicas espectroscópicas de raios X, sendo este uso em crescente desenvolvimento, uma vez que auxilia a remoção de potenciais elementos tóxicos aos ambientes aquáticos e terrestres, como o mercúrio.

Hage e Boon (1996) desenvolveram e validaram um método analítico para a determinação de polímeros de lignina por meio das técnicas de pirólise e LC-MS e obtiveram valores de limites de detecção inferiores a $1,5 \times 10^{-6}$ mg L⁻¹ para os derivados fenólicos de lignina.

Louchoarn *et al.* (2010) desenvolveram e validaram uma metodologia analítica para a análise de produtos derivados de lignina em sólidos dissolvidos em água marinha por meio da técnica de GC-MS. Os limites de detecção encontrados foram inferiores a 15×10^{-3} mg L⁻¹.

Pinto (2015) desenvolveu uma metodologia analítica para a determinação de derivados fenólicos de lignina em sedimentos utilizando a técnica de SPME seguida da análise por GC-FID, obtendo uma boa separação de nove analitos. A metodologia apresentou bons resultados em termos de limites de detecção, seletividade, robustez, precisão e exatidão.

Pereira, Rodrigues e Hansel (2018) realizaram um estudo comparativo preliminar das extrações líquido-líquido e fase sólida na análise de derivados da lignina após pré-tratamento alcalino de madeira. Constatou-se que o melhor método para a verificação dos compostos fenólicos gerados a partir do tratamento alcalino da madeira foi a extração em fase sólida (SPE, do inglês Solid Phase Extraction) seguida por análise em GC-MS.

2.7 PREPARO DE AMOSTRA

Os principais propósitos relacionados ao preparo de amostra são a pré-concentração do analito a fim de aumentar a sensibilidade, isolar o composto de interesse da matriz, promovendo a remoção de componentes presentes na amostra que atuam como interferentes nas etapas posteriores de separação e detecção, e adequar os analitos para separação instrumental, quando necessário, convertendo-o para sua forma mais detectável por meio de derivação (COMELLI, 2019)

O preparo de amostra é essencial para o procedimento analítico, sendo

muitas vezes a primeira etapa antes de uma análise cromatográfica (PINTO; QUEIROZ, 2015). Ultimamente, novas técnicas de preparo de amostra vêm sendo desenvolvidas objetivando a simplificação e a redução do uso de solventes orgânicos (PINTO; QUEIROZ, 2015).

Por muitos anos o preparo de amostras foi considerado menos importante que a separação e detecção, porém, à medida que a química analítica se desenvolveu, essa etapa gradualmente tornou-se uma parte importante da análise, sendo frequentemente a etapa mais longa em um procedimento analítico. O preparo de amostra pode ocupar até 80% do tempo de uma análise e é capaz de afetar quase todas as etapas posteriores do procedimento analítico sendo, portanto, fundamental para a identificação inequívoca, confirmação e quantificação dos analitos (LAAKS; JOCHMANN; SCHMIDT, 2011; CHEN *et al.*, 2008; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009). Desde o procedimento de amostragem até a análise dos dados, todas as etapas podem apresentar erros que comprometam a qualidade do resultado analítico final. Porém, o preparo da amostra é a que apresenta maior probabilidade de causar problemas e dificuldades, como gerar erros na quantificação devido à perda de analito, provocando baixa reprodutibilidade e baixos rendimentos de extração, consumo de tempo, custo e contaminação dos equipamentos (FUMES *et al.*, 2015; PATTERSON *et al.*, 2013).

A seleção da técnica de preparo de amostra mais adequada é o principal fator para se obter resultados confiáveis e exatos. Tal escolha depende de diversos fatores tais como as características tanto dos analitos envolvidos no procedimento quanto da matriz em que se encontram e da interação analito-matriz. Portanto, requer a otimização adequada dos parâmetros que exercem influência sob essa interação, com a finalidade de se atingir a eficiência de extração máxima com o método utilizado (PATTERSON *et al.*, 2013; BORDIN *et al.*, 2015; JARDIM, 2010).

Com relação à matriz, devem ser levados em consideração o seu estado físico, o volume de amostra disponível, os conteúdos de matéria orgânica (no caso de matriz ambiental, por exemplo) e o pH. Quanto aos analitos, devem ser avaliadas suas propriedades físicas e químicas como massa molar, carga elétrica, polaridade, volatilidade, pKa, as propriedades que permitam a sua detecção e suas concentrações na matriz (JARDIM, 2010). Muitos protocolos de preparo de amostras em métodos bioanalíticos ainda são baseados em técnicas clássicas simples, como extração líquido-líquido (LLE, do inglês Liquid-liquid extraction) e extração por SPE

(LAAKS; JOCHMANN; SCHMIDT, 2011; NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009).

Apesar das vantagens obtidas com a SPE em relação à LLE, abordagens convencionais de preparo de amostras ainda exigem muito consumo de tempo, grandes volumes de amostra e solventes. Muitas vezes também demandam extrações repetidas para o enriquecimento suficiente do extrato e etapas de concentração por evaporação ou destilação, consistindo em muitas etapas que as tornam laboriosas e propensas a perdas de analitos. Além dessas desvantagens, existe ainda o interesse econômico, visto que, os solventes orgânicos de alta pureza utilizados nessas técnicas são caros, geralmente tóxicos, prejudiciais ao meio ambiente e ainda muitas vezes precisam ser manuseados antes do destino final (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009; LAAKS; JOCHMANN; SCHMIDT, 2011).

Esses fatores combinados com o aumento da sensibilidade dos instrumentos analíticos estimularam um avanço das técnicas de preparo de amostra, permitindo o uso de menores quantidades de amostra. Conseqüentemente, a massa de fase extratora necessária, o volume de solvente utilizado e de resíduos gerados, bem como o tempo de análise requerido também são reduzidos (NOVÁKOVÁ; VLČKOVÁ, 2009; FUMES *et al.*, 2015). Desse modo, as tendências atuais das técnicas de preparo de amostra são a miniaturização, simplificação dos processos, redução do custo, automação e obtenção de uma melhor capacidade de extração dos analitos aumentando a seletividade, recuperação, reprodutibilidade e linearidade do método (CHEN *et al.*, 2008; LAAKS; JOCHMANN; SCHMIDT, 2011; SZULTKA *et al.*, 2014; BORDIN *et al.*, 2015). As técnicas de microextração representam, por esse motivo, uma parte importante do preparo de amostras moderno e, embora sejam muito diversas, todas compartilham uma característica comum que é o fato da quantidade da fase extratora ser pequena em comparação ao volume da amostra (LAAKS; JOCHMANN; SCHMIDT, 2011). Dentre as diversas microtécnicas disponíveis atualmente as baseadas no uso de materiais sorventes são de longe as mais utilizadas, como é o caso da técnica de extração em ponteiros descartáveis (DPX) (FUMES *et al.*, 2015).

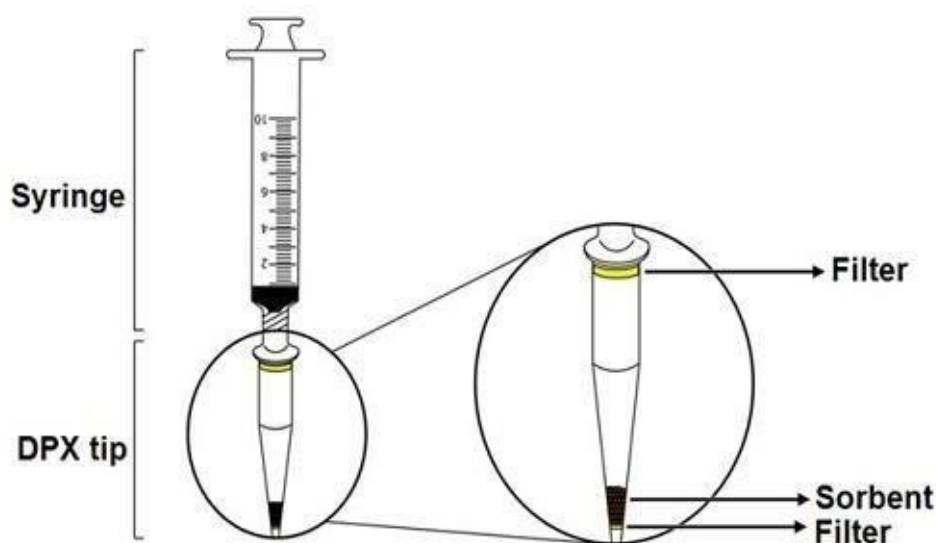
2.8 EXTRAÇÃO EM PONTEIRA DESCARTÁVEL

A técnica de extração em ponteiros descartáveis (DPX, do inglês Disposable Pipette Extraction) foi desenvolvida no ano de 2003 pelo Dr. William Brewer da

Universidade da Carolina do Sul, EUA, sob o número de patente US6566145 B2 (BREWER, 2003). A técnica pode ser considerada uma variante da SPE e da extração em fase sólida dispersiva (D-SPE, do inglês Dispersive Solid Phase Extraction), uma importante etapa do método QuEChERS (do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). A vantagem da DPX frente a essas técnicas está na utilização de menor massa de fase extratora, redução no consumo de solventes e a promoção de uma rápida extração dos analitos em soluções. Também tem como vantagem dispensar a utilização de vácuo, empregando ponteiras descartáveis em vez de cartuchos ou tubos de ensaio. Diferente da D-SPE, que é utilizada apenas na sorção de interferentes do método QuEChERS, a DPX permite a sorção e dessorção dos analitos (PINTO; QUEIROZ, 2015). Outra vantagem da técnica de DPX é a mobilidade das partículas da fase extratora que permite uma rápida mistura e equilíbrio com a amostra durante a agitação. Desse modo, o analito pode ser extraído em menos tempo e dessorvido com menos solvente, sem a necessidade de uma etapa de concentração separada (BREWER, 2003).

A DPX consiste de uma ponteira padrão de pipeta (1 mL ou 5 mL) modificada, "carregada" com sorvente SPE comercial ou sem sorvente (para desenvolver novas técnicas), onde uma pequena quantidade de sorvente está contida livremente em seu interior entre dois filtros (BORDIN *et al.*, 2016; BORDIN *et al.*, 2015; PINTO; QUEIROZ, 2015; LAMBERT, 2009). Um dos filtros é colocado na extremidade inferior e outro na extremidade superior da ponteira. O primeiro tem como finalidade proporcionar uma barreira permeável que permita a passagem livre dos fluídos em qualquer direção (aspiração/dispensação), ao mesmo tempo em que retém a fase extratora. O segundo, colocado na extremidade superior, impede a passagem de qualquer material sólido ou fluído para o interior da pipeta, assegurando a não contaminação da mesma e a retenção do sorvente (Figura 8) (PINTO; QUEIROZ, 2015; LAMBERT, 2009).

Figura 8 - Extração em ponteira descartável (DPX)



Fonte: Bordin *et al.* (2016).

O fato do sorvente estar contido livremente na ponteira permite o fluxo bidirecional (aspirar ou dispensar) dos fluidos, acelerando o processo de extração. As ponteiras DPX podem ser facilmente acopladas a uma seringa de polipropileno, podendo a extração ser realizada manualmente para pequenos lotes de amostras ou em casos de laboratórios com grande volume de amostras, sistemas automatizados já encontram-se disponíveis no mercado (PINTO; QUEIROZ, 2015; LAMBERT, 2009).

A primeira ponteira de DPX disponível comercialmente foi fundamentada na cromatografia clássica, composta por partículas C18, incorporadas com polímeros, como fase extratora. Desde então, similar ao que ocorreu com os cartuchos SPE tradicionais, novas ponteiras contendo diferentes materiais sorventes com mecanismos de interação distintos e específicos para cada grupo de analitos, como hidrofóbico, troca iônica e afinidade, foram introduzidas no mercado conforme apresentado na Tabela 2 (PINTO; QUEIROZ, 2015; CHAVES *et al.*, 2015).

Tabela 2 - Diferentes tipos de fase extratora comerciais com seus respectivos usos para a técnica de extração com DPX

Ponteira	Composição da fase extratora	Uso
DPX-RP	Estireno-divinilbenzeno	Extração de compostos apolares e pouco polares. Ex: praguicidas
DPX-CX	Grupos ácido sulfônico	Extração de compostos básicos. Ex: drogas de caráter básico
DPX-WAX	Grupo poliamino	Extração de compostos ácidos. Ex: drogas e metabólitos
DPX-WCX	Grupos policarboxilato	Extração de compostos básicos. Ex: especialmente amino glicosídeos
DPX-Si	Sílica gel	Limpeza (cleanup) de amostras ambientais
DPX-C18	C18 (20% de sílica gel)	Remoção de interferentes presentes na matriz
DPX-SC	Vazio ou com areia (lavada com ácido)	Coleta de amostras sólidas
DPX-Blank	Vazio	Desenvolvimento de métodos com novas fases extratoras

Fonte: Adaptado de Pinto e Queiroz (2015).

A técnica de DPX é muito utilizada em procedimentos de limpeza. Entretanto, na área de preparo de amostras, também vem sendo aplicada em análises forenses, ambientais, de resíduos alimentares na extração de compostos não polares e medicamentos com características ácidas e básicas. Os métodos reportados na literatura que empregam a técnica DPX, associada às técnicas analíticas como GC-FID, HPLC, LC-MS/MS e GC-MS comprovam a seletividade, alta detectabilidade analítica e linearidade adequadas para análises de amostras biológicas e ambientais (PINTO; QUEIROZ, 2015; BORDIN *et al.*, 2016; CORAZZA *et al.*, 2017).

A Tabela 3 apresenta alguns exemplos de métodos reportados na literatura utilizando DPX como técnica de preparo de amostra nos últimos anos.

Tabela 3 - Trabalhos reportados na literatura utilizando a técnica de DPX no preparo de amostra

Analito	Matriz	Técnica analítica	Tipo de material sorvente	Referência
Anfetaminas, cocaína, antidepressivos tricíclicos, meperidina, metadona e fenciclidina	Urina	GC-MS	DPX-CX	ELLISON <i>et al.</i> , 2009
Praguicidas organoclorados e organofosforados	Alimentos	GC-MS	DPX- WAX	GUAN <i>et al.</i> , 2009
Metanfetaminas e anfetamina	Sangue	GC-MS	DPX-C18	HASEGAWA <i>et al.</i> , 2007
Cocaína e nicotina	Mecônio	GC-MS	DPX-CX	MOZANER <i>et al.</i> , 2014
Opiáceos	Humor vítreo	GC-MS	DPX-CX	HASEGAWA <i>et al.</i> , 2011
Explosivos	Água	LC- UV/vis	DPX-RP	GUAN <i>et al.</i> , 2014
Canabinoides e seus metabólitos	Urina	LC- MS/MS	DPX- WAX	ANDERSSON <i>et al.</i> , 2016
Praguicidas organoclorados, organofosforados e fungicidas	Frutas e vegetais	GC-MS	DPX-RP	GUAN <i>et al.</i> , 2010
Antibióticos aminoglicosídeos	Tecidos	LC- MS/MS	DPX-CX	LEHOTAY <i>et al.</i> , 2013
Pesticidas	Água potável	HPLC-DAD	DPX-WAX	CORAZZA <i>et al.</i> , 2019.

Fonte: Adptada de Oenning (2015).

Com base nos trabalhos reportados na Tabela 3 é possível perceber que existe uma ampla aplicabilidade para a técnica de DPX, sendo possível utilizá-la em uma grande variedade de matrizes para a análise de diversos compostos. Outra vantagem é a possibilidade do uso de materiais alternativos como fase extratora, ampliando ainda mais seu campo de aplicação (PINTO; QUEIROZ, 2015; MAFRA *et al.*, 2018).

Corazza *et al.* (2019) obtiveram ótimos resultados ao determinar pesticidas em amostras de água potável utilizando a técnica de DPX por troca aniônica (DPX - WAX) como preparo de amostra. O sorvente de troca aniônica fraca (WAX) tem uma fase de amina secundária com uma estrutura de estireno divinil benzeno. O

mecanismo de retenção dos analitos pela fase extratora contendo o grupo poliamino da ponteira do tipo DPX-WAX é baseado em interações de troca aniônica. A combinação desses mecanismos fornece um elevado potencial para uma extração seletiva da maioria dos compostos utilizados neste trabalho.

Até o momento, não foram reportados na literatura trabalhos que se proponham a determinar monômeros fenólicos da lignina kraft a partir da acidificação do licor negro empregando como preparo de amostra a técnica de DPX. A maioria dos métodos desenvolvidos recentemente utiliza técnicas como DLLME e HF-LPME, que além dos procedimentos padrões das técnicas, também envolvem etapas de derivação e hidrólise, fazendo com que o tempo total de preparo da amostra chegue a mais de 2 horas (FERNANDEZ *et al.*, 2017; CERQUEIRA, 2018; YE *et al.*, 2020). Tendo em vista o potencial da técnica de DPX, o presente trabalho propõe desenvolver um método mais rápido e simples para a determinação dos monômeros derivados de lignina presentes no licor negro após tratamento ácido com posterior análise por GC-FID.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

✓ Desenvolver um método analítico utilizando a técnica DPX para extração de monômeros de lignina do processo kraft, resultantes da acidificação do licor negro, e posterior análise por GC-FID.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Adequação dos parâmetros cromatográficos para a melhorar a resolução e posterior análise quantitativa dos monômeros de lignina utilizando técnica de GC-FID.

✓ Otimização das variáveis que podem influenciar a técnica de DPX: fase extratora, número de ciclos de extração e eluição, tempo dos ciclos, tipo de solvente e pH da amostra.

✓ Otimizar o método de quantificação das ligninas por GC-FID com a obtenção dos parâmetros analíticos de mérito tais como linearidade, LOD, LOQ, precisão e exatidão.

✓ Aplicação da metodologia desenvolvida em amostras de licor negro.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os padrões e reagentes utilizados nesse trabalho foram: vanilina (99,0%), 4-hidroxibenzoaldeído (>95,0%), acetossiringona 97%, acetovanilona 98%, siringaldeído 98%, todos sólidos e adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha). Para as reações de derivação utilizou-se o agente derivatizante N, O bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) 99% (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Os solventes Acetato de Etila, Acetona e Acetonitrila da Tedia (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), todos com alto grau de pureza. Para o ajuste de pH utilizou-se HCl adquirido na Qhemis e NaOH da Mallinckrodt. Para a centrifugação utilizou-se centrífuga da Fanem - Excelsa Baby II - 206R (São Paulo, SP, Brasil). As ponteiras de 1 mL descartável de C18, Fase Reversa e WAX, com os filtros inferior e superior, foi adquirida da empresa DPX Technologies (Estados Unidos)

A amostra de licor negro analisada, proveniente de madeira de eucalíptos foi fornecida pela *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária* (EMBRAPA) Colombo/PR.

4.2 INSTRUMENTAÇÃO CROMATOGRÁFICA

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu (modelo GC-2014- Kyoto, Japão) equipado com detector por ionização em chama (FID) e injetor split/splitless. Como gás de arraste empregou-se N₂ ultrapuro (99,995%) em uma taxa de vazão 1 mL min⁻¹ com injetor operando no modo *splitless* (1 min) a 280 °C, e o detector a 300 °C. A coluna capilar utilizada DB-5MS (30 m, 0,25 mm id, 0,25 µm de espessura do filme) é composta de 95% de polidimetilsiloxano e 5% de fenila, obtida da Restek (Bellefonte, PA, USA).

O programa de temperatura no forno da coluna iniciou em 60 °C (mantidos por 2 minutos). Em seguida, a temperatura foi aumentada a uma taxa de aquecimento de 10 °C por minuto, até atingir 180 °C quando se alterou a taxa de aquecimento para 6 °C por minuto até 280 °C. Totalizando 33 minutos para cada corrida cromatográfica.

4.3 LIMPEZA DE VIDRARIAS

Todas as vidrarias utilizadas no preparo de amostra foram lavadas com água corrente, detergente comercial diluído e escova. Após enxágue, os materiais foram mergulhados em solução de Extran 5% (v/v), mantidos por pelo menos 24 h em recipiente fechado e posteriormente enxaguados com água deionizada. Para eliminar resíduos orgânicos, calcinou-se a vidraria em mufla da Quimis aparelhos científicos LTDA. (Diadema, São Paulo), modelo 31824 a 400 °C durante quatro horas, exceto os materiais volumétricos. Após as etapas de limpeza, acondicionou-se a vidraria em local apropriado, envolta em papel alumínio e manuseada apenas com o uso de luvas de polietileno para evitar possíveis contaminações.

4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções estoques dos padrões a serem trabalhadas foram preparadas pesando-se 30 mg de cada padrão, adicionando-se um a um em diferentes balões volumétricos de 10 mL e avolumados com acetato de etila. A solução de trabalho foi preparada a partir das soluções estoque, resultando em uma mistura contendo os padrões: vanilina, 4-hidroxibenzaldeído, acetossiringona e acetovanilona dissolvidos em acetato de etila, em balão volumétrico de 10 mL, com concentração de 1000 mg L⁻¹. Todos os procedimentos foram realizados em frascos de vidro (Supelco, Saint Louis, Missouri, USA) com capacidade para 40 mL e 20 mL para os analitos e BSTFA, respectivamente. Utilizou-se água deionizada no preparo das soluções para a curva de calibração para as determinações de derivados fenólicos de lignina. Para o controle de pH das amostras utilizou-se soluções de HCl 0,1M e NaOH 0,1M.

4.5 AMOSTRA DE LICOR NEGRO E ACIDIFICAÇÃO DO MEIO

Para o procedimento de acidificação do licor negro foram adicionadas algumas gotas ácido clorídrico (iniciado a 12 mol L⁻¹ e seguido de 1 mol L⁻¹) nas duas amostras de licor negro (150 mL e pH 14), até atingir pH 9, seguido de centrifugação a 3500 rpm por 15 min. A fração precipitada foi reservada. O sobrenadante foi acidificado novamente até pH 7 adicionando gota a gota de HCl (12 mol L⁻¹ e 1 mol L⁻¹) sob agitação. Posteriormente, o mesmo método foi seguido para

obter frações em pH 5, 3 e 1 sequencialmente (Lourençon *et al.* 2015). Em seguida a amostra final com pH 1 foi filtrada e elevou-se seu pH com NaOH à 0,5 mol L⁻¹, até 5 para que pudesse ser feito o preparo de amostra, pois a ponteira não suporta pH menor.

4.6 OTIMIZAÇÕES DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM PONTEIRAS DESCARTÁVEIS

4.6.1 Condições fixadas inicialmente

Para realizar a otimização do método analítico desenvolvido, foi preparada uma solução estoque mix de 1000 µg mL⁻¹ em acetato de etila contendo os 5 padrões trabalhados. A partir da solução mix estoque, 30 µL dessa solução foram adicionados a 10 mL de água ultra-pura para simular a matriz e posteriormente ajustado o pH para 5. As concentrações dos 5 analitos foram mantidas em 30 µg mL⁻¹, o volume de BSTFA adicionado foi mantido em 40 µL e foram avaliadas as condições ótimas dos seguintes parâmetros: solvente de extração; solvente de dessorção; tempo de extração e tempo de dessorção. A resposta analítica utilizada em todos os experimentos foi a média geométrica das áreas dos picos dos 5 analitos em estudo.

4.7 LIMPEZA E CONDICIONAMENTO DA PONTEIRA

Antes de iniciar a etapa de extração com um material sorvente é importante a etapa de condicionamento desse material para a ativação dos sítios ativos. Entre as extrações também é importante a limpeza adequada para proporcionar as mesmas condições iniciais para todas as extrações. Sendo assim, seguindo a literatura (COMELLI, 2019), foi fixado 3 ciclos com 800 µL de acetonitrila por 30 s para a limpeza da ponteira e para o condicionamento 1 ciclo com 800 µL de água por 30 s.

4.7.1 Escolha da Ponteira Comercial

Com o propósito de desenvolver uma metodologia onde o fator tempo é de extrema importância, este trabalho optou pela utilização de ponteiras de DPX

comerciais, sem a necessidade da preparação da ponteira com qualquer tipo de material sorvente não comercial antes das análises.

Portanto, de acordo com os trabalhos de Corazza *et al.* (2019), Hasegawa *et al.* (2007) e Guan *et al.* (2014) que relatam terem trabalhado com soluções aquosas, foram selecionado 3 ponteiras comerciais para testes, C18, Fase revera e WAX

4.7.2 Otimização de ciclos e tempo de extração

Para a técnica de extração nesse trabalho, que objetiva a máxima eficiência de extração dos analitos, foram fixados 3 etapas (pois sua eficiência já consta em literatura, CORAZZA, 2017) contendo 3 ciclos de aspiração da amostra no mesmo frasco. Cada etapa continha 1 frasco com 800µL amostra. Inicialmente otimizou-se univariadamente o tempo do ciclo, testando-se 10 s, 30 s e 50 s. Após, a quantidade de ciclos testando-se 3, 6 e 9 conforme ilustrado na Tabelas 4 e tabela 5.

Tabela 4 - Planejamento univariado para otimização do tempo de extração e dessorção

Ciclos	Tempo (s)	Volume de amostra
3	10	800 µL
3	30	800 µL
3	50	800 µL

Fonte: autora (2021).

Tabela 5 - Planejamento univariado para otimização número de ciclos de extração e dessorção

Ciclos	Tempo(s)	Volume de amostra
3	30	800 µL
6	30	800 µL
9	30	800 µL

Fonte: autora (2021).

4.7.3 Otimização do solvente de dessorção

Para obter-se uma boa eficiência de dessorção dos analitos, foi realizada a

otimização dos solventes utilizados na etapa de dessorção. A extração foi feita com 3 etapas de 3 ciclos de 800 μL por 30 s de equilíbrio em cada, finalizando com 3 ciclos (em um mesmo frasco) de 200 μL de solvente na etapa de dessorção. Sendo os solventes testados: acetonitrila, acetona e acetato de etila.

4.8 CONDIÇÕES DE DERIVATIZAÇÃO DOS PADRÕES

Alíquotas de 200 μL do solvente de dessorção, após a extração dos padrões, foram secas sob um fluxo de nitrogênio. Então foi adicionado um valor fixo de 40 μL de agente derivatizante (BSTFA) e acrescentado 200 μL do solvente acetona, totalizando um volume final de 240 μL . Essa solução foi agitada em um vortex por 10 s e 1 μL foi injetado no cromatógrafo, onde ocorreu a reação de derivatização no injetor do equipamento. Entre as corridas foi necessário fazer uma injeção de 1 μL de hexano, pois como a reação de derivatização acontece no injetor do cromatógrafo, o BSTFA pode acabar reagindo com o liner, por este ser de vidro.

4.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

4.9.1 Parâmetros analíticos de mérito

Os parâmetros analíticos de mérito do método proposto foram obtidos por meio de curvas de calibração para cada um dos cinco analitos, utilizando-se todas as condições anteriormente otimizadas da etapa de preparo de amostra. As curvas de calibração foram construídas utilizando água MiliQ fortificada em 5 níveis de concentração, cada nível realizado em triplicata. Por meio das curvas de calibração obtiveram-se os outros parâmetros de mérito: faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação linear (R), limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). Os valores de LOQ foram definidos como o primeiro ponto da faixa linear das curvas de calibração de cada analito, enquanto os LOD foram definidos como os respectivos valores de LOQ de cada analito dividido por 3,3. Seguindo as normas de Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos - INMETRO.- DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2003).

Para os valores de LOQ foram aceitos apenas os resultados obtidos em triplicata que apresentaram desvio padrão relativo (RSD) inferior a 20%. Para avaliar

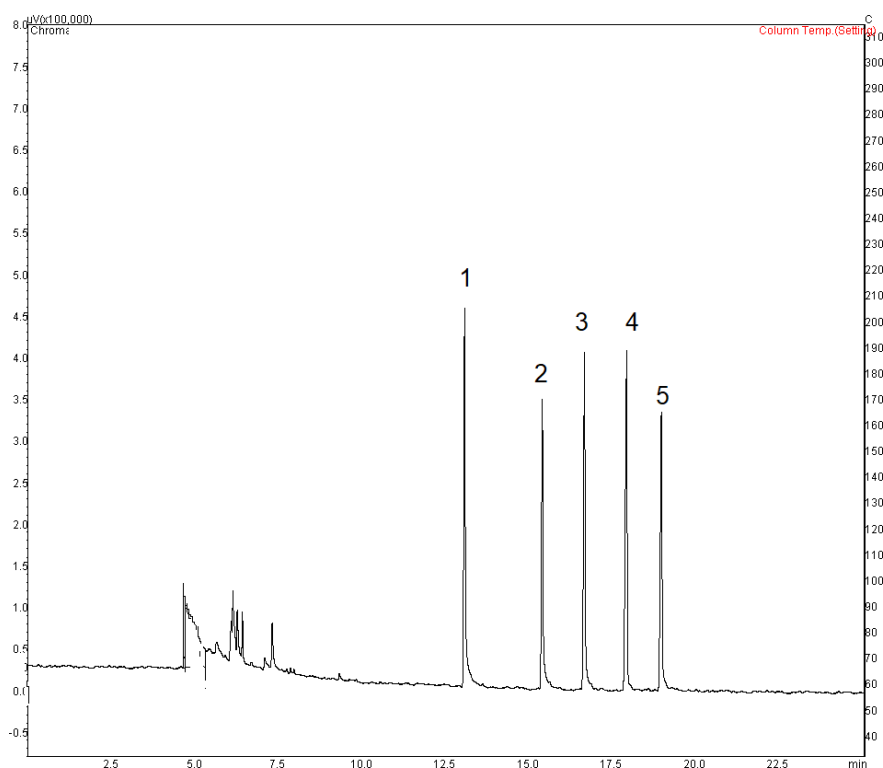
a precisão e exatidão do método utilizou-se o licor branco (Na_2S 228,3 g L^{-1} e NaOH 194,3 g L^{-1}) para simular a matriz, acidificado em pH 5.. Para a exatidão do método proposto foram realizados ensaios de recuperação em três níveis de fortificação, em triplicata. A precisão do método também foi verificada através de recuperações realizadas em triplicata, por meio dos valores de desvio padrão relativo (RSD) obtidos, sendo aceitos valores de até 20%. A precisão intra-dia foi avaliada em três níveis diferentes de fortificação, em triplicata, todas realizadas no mesmo dia. Enquanto no caso da precisão inter-dia, esta foi verificada em apenas um nível de fortificação, porém, realizada em 3 dias diferentes, todos em triplicata (RIBANI *et al.*, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Primeiramente, antes das otimizações propostas para a etapa de extração aplicando a técnica de DPX, foi realizada a otimização da separação cromatográfica dos cinco analitos a partir de uma solução mix de 150 mg L⁻¹ preparada em acetato de etila e acidificada com ácido clorídrico conforme descrito previamente na seção 4.4. A condição escolhida tomou como base o trabalho de Pinto (2015), no qual estão descritas as condições cromatográficas para a separação de vários monômeros de lignina. Com base nessas condições prévias, foi injetado 1 µL da mistura de padrões dos analitos deste trabalho, totalizando 32 min de corrida cromatográfica. A separação cromatográfica dos analitos está apresentada na Figura 9.

Figura 9 - Cromatograma da separação de uma solução padrão contendo os cinco derivados fenólicos da lignina após derivatização com N,O - 4 bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) por GC-FID, no modo *splitless*



Legenda: (1) 4-Hidroxibenzaldeído ; (2) Vanilina ; (3) Acetovanilina ; (4) Siringaldeído; (5) Acetossiringona . Fonte: autora (2021).

Por meio do cromatograma comprova-se que foi possível obter uma boa separação dos analitos nas condições selecionadas, com os respectivos tempos de retenção apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Tempo de retenção dos analitos obtidos na separação cromatográfica

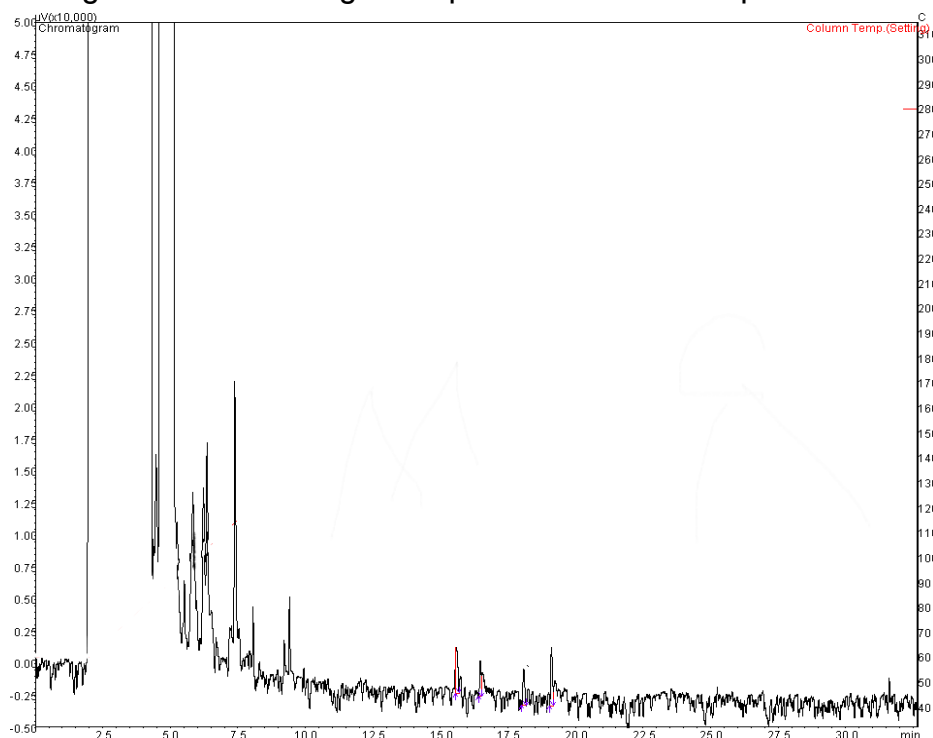
Analito	Tempo de retenção (min)
4-Hidroxibenzaldeído	12,97
Vanilina	13,34
Acetovanilina	14,45
Siringaldeído	16,86
Acetossiringona	17,60

Fonte: autora (2021).

5.2 OTIMIZAÇÕES DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM PONTEIRAS DESCARTÁVEIS

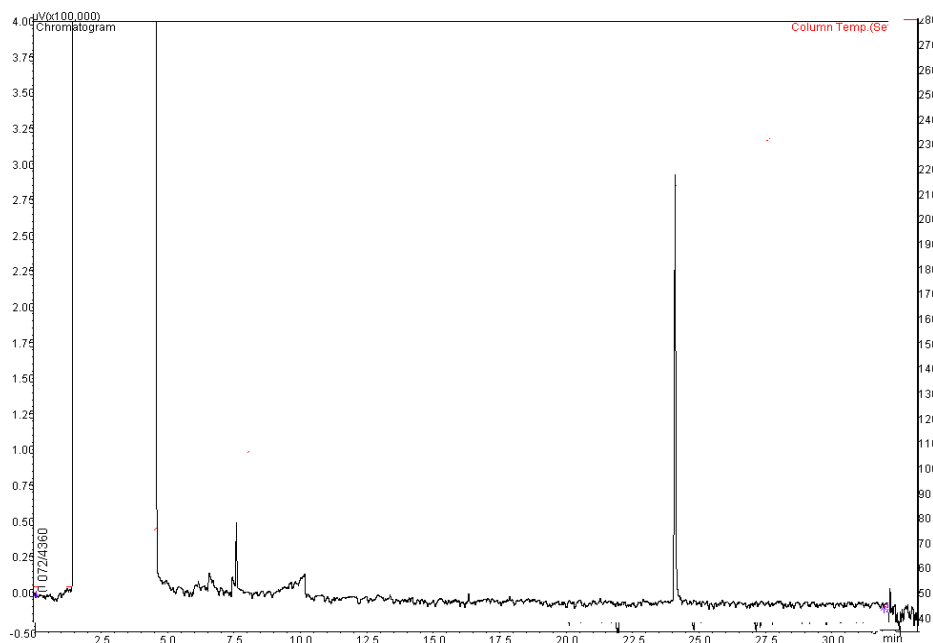
Levando em consideração as especificidades dos compostos a serem trabalhados, foram testados três tipos de ponteiros para a realização do preparo de amostra com a técnica DPX: C18, WAX e Fase reversa (RP, do inglês *Reverse Phase*). Como Mostram as figuras abaixo.

Figura 10 - Cromatograma que ilustra o teste da ponteira C18



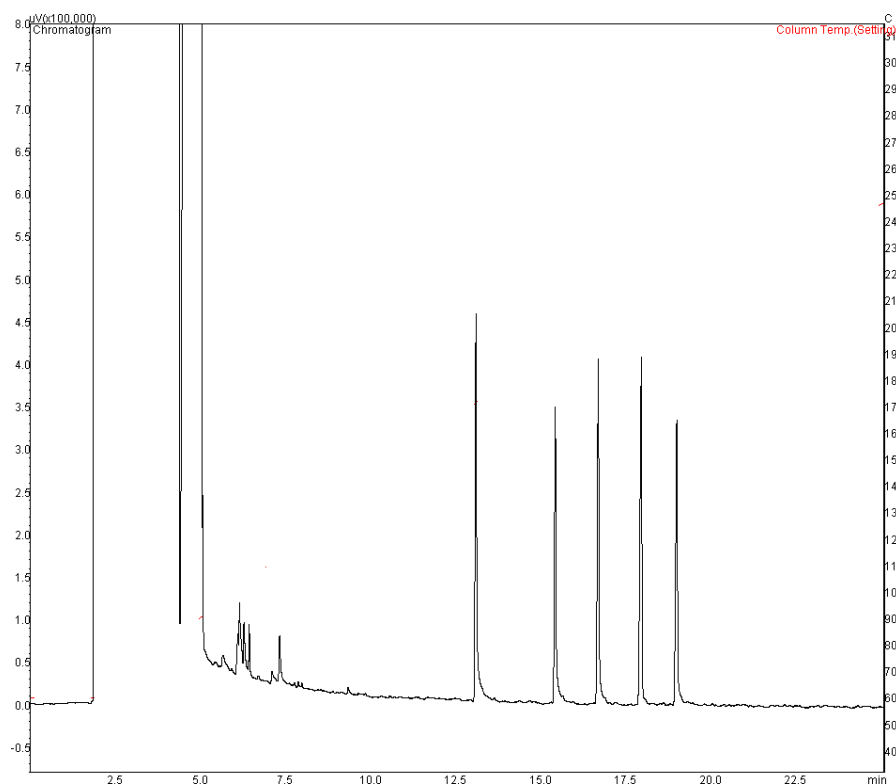
*Condições DPX: 3 mL de água ultrapura fortificada com $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos, 3 ciclos de extração com tempo de equilíbrio de 30s e 3 ciclos de dessorção com $200 \mu\text{L}$ de acetato de etila por 30s. Seco sob fluxo de N_2 seguido pela adição de $40 \mu\text{L}$ de BSTFA e $200 \mu\text{L}$ de acetato de etila
 Fonte: autora (2021).

Figura 11 - Cromatograma que ilustra o teste da ponteira Fase- Reversa



*Condições DPX: 3 mL de água ultrapura fortificada com $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos, 3 ciclos de extração com tempo de equilíbrio de 30s e 3 ciclos de dessorção com $200 \mu\text{L}$ de acetato de etila por 30s. Seco sob fluxo de N_2 seguido pela adição de $40 \mu\text{L}$ de BSTFA e $200 \mu\text{L}$ de acetato de etila.
 Fonte: autora (2021).

Figura 12 - Cromatograma que ilustra o teste da ponteira WAX



*Condições DPX: 3 mL de água ultrapura fortificada com $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos, 3 ciclos de extração com tempo de equilíbrio de 30 s e 3 ciclos de dessorção com $200 \mu\text{L}$ de acetato de etila por 30 s. Seco sob fluxo de N_2 seguido pela adição de $40 \mu\text{L}$ de BSTFA e $200 \mu\text{L}$ de acetato de etila.
Fonte: autora (2021).

Com os resultados mostrados nas Figuras 10, 11 e 12, é possível observar que as melhores respostas para os cinco analitos foram obtidas com o uso da ponteira WAX. Os picos não identificados referem-se, possivelmente, a subprodutos das reações de derivação, reações entre os próprios reagentes e a coluna cromatográfica e/ou impurezas presentes nos padrões ou coluna. Porém, ressalta-se que estes não interferem na análise.

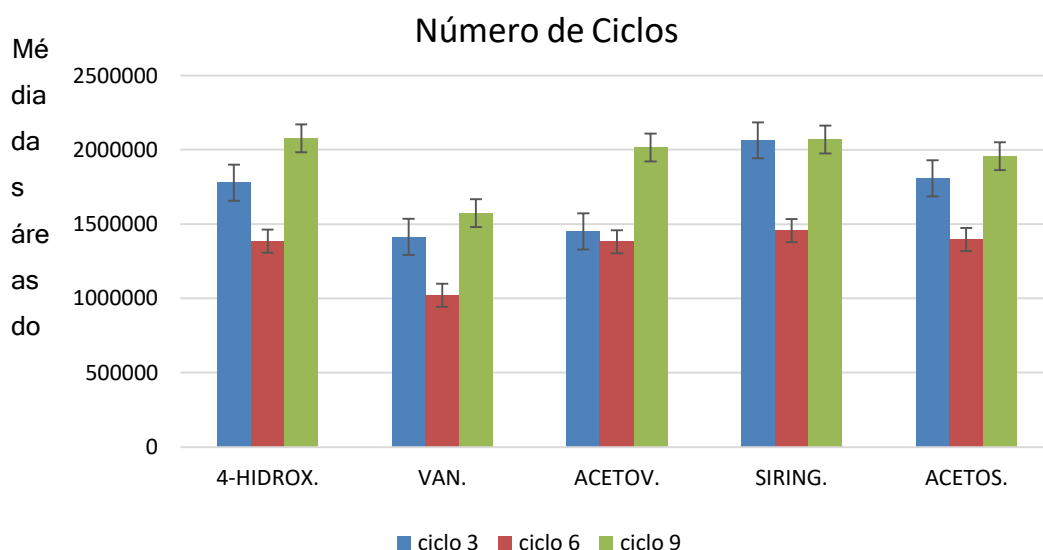
5.3 MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR DPX

5.3.1 Otimização do número de ciclos e tempo

Nessa etapa foi avaliada as condições de extração, variando-se primeiramente o número de ciclos de extração e posteriormente o tempo de equilíbrio da amostra com a fase extratora, visando-se a maior eficiência de extração e o menor tempo. O resultado desse estudo foi alcançado com uma otimização

univariada, na qual inicialmente fixaram-se os parâmetros de concentração em $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. A quantidade de frascos, mantidas em 3 com $800 \mu\text{L}$ da amostra com os padrões. O tempo de equilíbrio em cada ciclo, totalizando 30 s. O volume do solvente de dessorção em $200 \mu\text{L}$ e volume do agente derivatizante $40 \mu\text{L}$, variando-se apenas os números de ciclos em cada frasco em 3, 6 e 9, conforme está apresentado no gráfico da Figura 13.

Figura 13 - Gráfico de barras resultante da otimização em triplicata do número de ciclos



*Condições DPX: 3 mL de água ultrapura fortificada com $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos, extração com número de ciclos variados e dessorção de 3 ciclos com $250 \mu\text{L}$ de acetato de etila por 30 segundos. Fonte: autora (2021).

A partir dos resultados apresentados na Figura 13 é possível observar diferentes respostas para 3, 6 e 9 ciclos. Nota-se uma melhor eficiência na extração com 9 ciclos para os analitos 4-hidroxibenzaldeído, siringaldeído e acetoseringora.

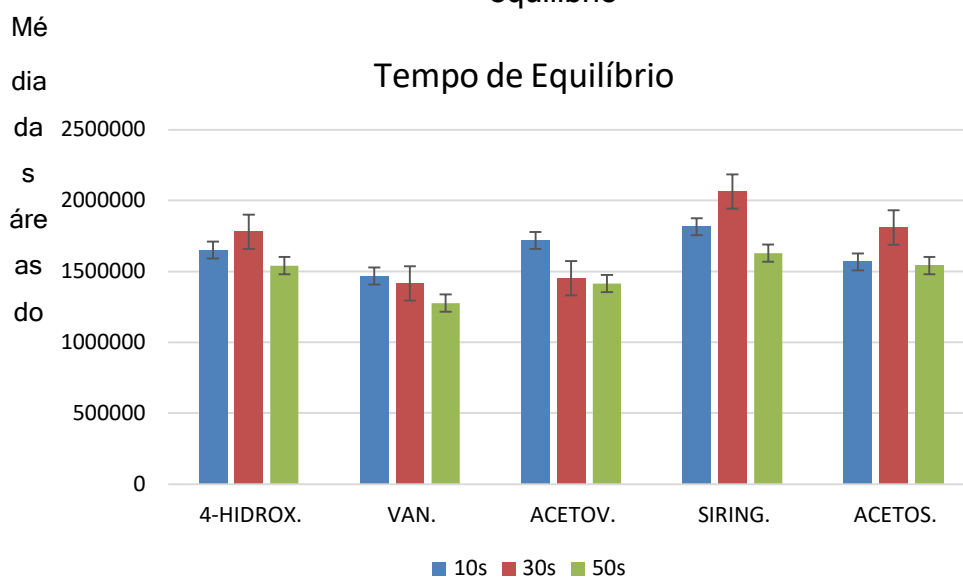
Porém, as áreas se assemelham muito aos resultados obtidos com 3 ciclos, sendo uma diferença pouco significativa, não interferindo na veracidade dos resultados. Já

a Vanilina e Acetovanilia demonstraram melhores resultados com 3 ciclos. Sendo assim, levando-se em consideração a precisão do método, visando o menor tempo no preparo da amostra, e os dados estatísticos obtidos pela ANOVA que estão dispostos no apêndice A deste documento. Optou-se por adotar 3 ciclos de extração.

Em seguida foi realizada a avaliação do tempo de equilíbrio dos analitos entre a solução e a fase extratora, fixando-se a concentração em $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. A quantidade de frascos, mantidas em 3 com $800 \mu\text{L}$ da amostra com os padrões.

Considerando o número de ciclos já otimizados em 3, o volume do solvente de dessorção em 200 μL , e volume do agente derivatizante 40 μL , variando-se apenas o tempo de equilíbrio em 10 s, 30 s e 50 s, conforme apresentado na figura 14.

Figura 14 - Gráfico de barras resultante da otimização em triplicata do tempo de equilíbrio



*Condições DPX: 3 mL de água ultrapura fortificada com 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos, extração com tempo de equilíbrio variados e dessorção de 3 ciclo com 200 μL de acetato de etila por 30 s, seco sob fluxo de N_2 seguido pela adição de 40 μL de BSTFA e 200ul de acetato de etila.

Fonte: autora (2021).

Conforme os resultados obtidos pelas áreas dos gráficos de barra apresentados na Figura 14, é possível perceber que os analitos Vanilina e Acetovanilina obtiveram resultados ótimos com tempo de 10 s, porém se assemelham aos resultados obtidos com tempo de 30 s. O resultado do restante dos analitos mostrou que todos obtiveram condições ótimas com o tempo e 30 s. Sendo a diferença dos resultados pouco significativa entre os tempos de 10 s e 30 s para os analitos Vanilina e Acetovanilina. Portanto levando em consideração a melhor eficiência para o restante dos analitos, e os dados estatísticos obtidos pela ANOVA estão dispostos no Apêndice B que está disposto no apêndice deste documento. Optou-se por manter o tempo de 30s em cada ciclo.

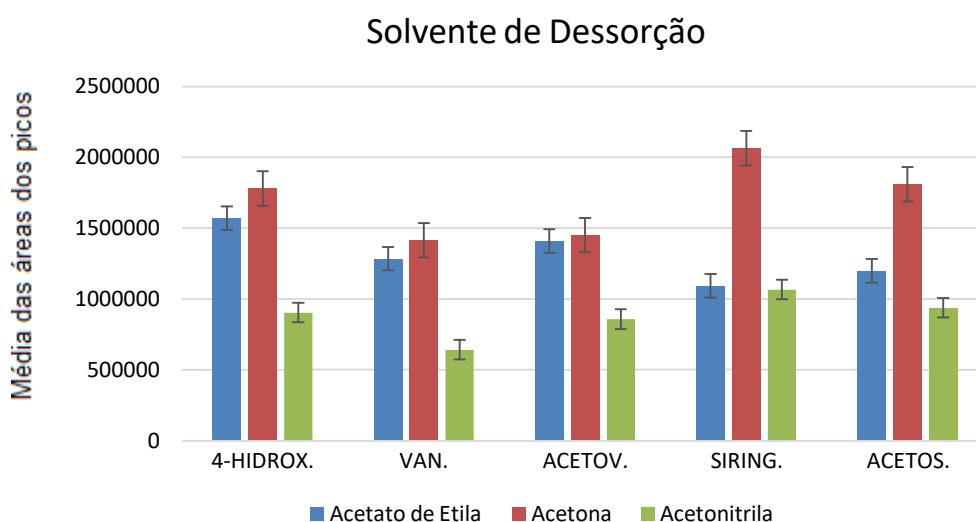
5.3.2 Otimização do solvente de dessorção

Nesse estudo foi avaliada a eficiência da dessorção, em triplicata, de três

solventes orgânicos distintos por meio do planejamento univariado, fixando-se a concentração dos analitos em $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ e as condições ótimas otimizadas na DPX.

Os solventes que se mostraram eficientes nos trabalhos encontrados em literatura (PINTO, 2015; GRAF, 2019) e que foram testados são: acetonitrila, acetona e acetato de etila. A comparação das médias das áreas para cada um dos padrões, nos procedimentos de dessorção dos analitos, apresenta um perfil que ressalta uma melhor resposta para o solvente acetona, como mostra a figura 15. Eos dados estatísticos obtidos pela ANOVA que estão dispostos no apêndice C deste documento, confirmam a escolha .

Figura 15 - Gráfico de barras resultante da otimização em triplicata do solvente de dessorção



*Condições DPX: 3mL de água ultrapura fortificada com $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos, extração com tempo de equilíbrio variados e dessorção de 3 ciclo com $200 \mu\text{L}$ de acetato de etila por 30 segundos, seco sob fluxo de N_2 seguido pela adição de 40 μL de BSTFA e 200 μL .

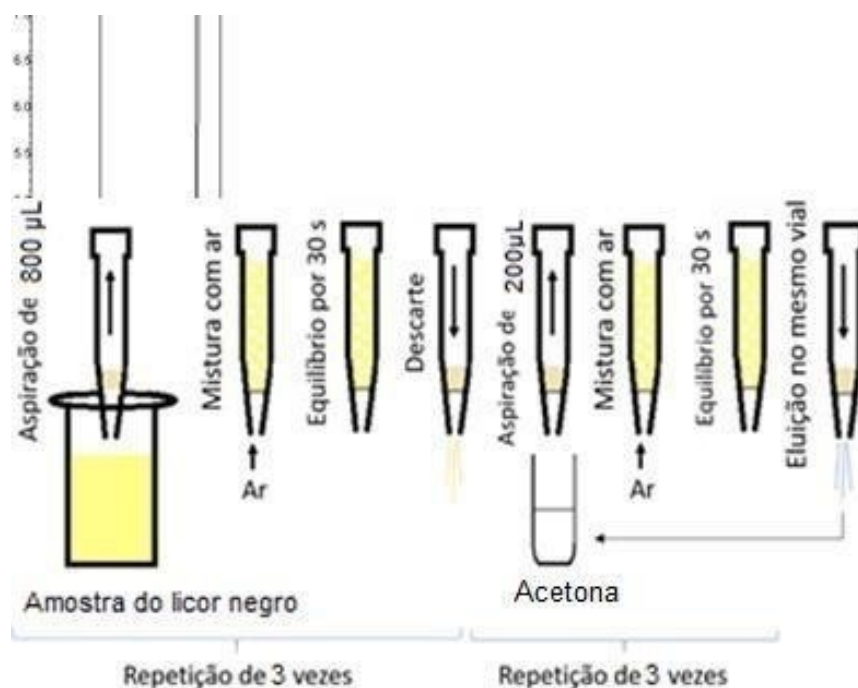
Fonte: autora (2021).

5.5 PROCEDIMENTO OTIMIZADO DO PREPARO DE AMOSTRAS

O procedimento de preparo das amostras foi desenvolvido com base nas condições ótimas alcançadas, conforme descrito na sessão 5.3. As extrações foram realizadas utilizando 3 mL de água fortificada com os cinco analitos. Para o procedimento de extração, foram realizados 3 etapas de extração e 1 de eluição, cada etapa de extração constituiu de 3 ciclos de aspiração de $800 \mu\text{L}$ da amostra,

seguido da aspiração de ar, equilíbrio por 30s e eluição da amostra para o mesmo frasco, repetiu-se mais duas vezes cada etapa, totalizando três etapas contendo 3 ciclos em cada uma delas. . No procedimento de dessorção líquida, foi realizado apenas 1 etapa, também com 3 ciclos, cada ciclo constituiu na aspiração de 200 μL de acetona presente em um frasco pequeno, seguido da aspiração de ar, equilíbrio de 30 s e eluição do solvente no mesmo frasco para o início de um novo ciclo. Ao final do terceiro ciclo o extrato foi eluido e seco sob fluxo de N_2 e após adicionado 40 μL de BSTFA e 200 μL de acetona, totalizando um volume de 240 μL para posterior análise por GC-FID. O tempo total do procedimento de preparo de amostra é de cerca de 5 minutos. Após cada procedimento de extração, a ponteira foi limpa e condicionada com 800 μL de acetona por 3 ciclos de 30 s.

Figura 16 - Procedimento de DPX otimizado



Fonte: Modificado de Oenning (2018).

5.6 OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS ANALÍTICOS A PARTIR DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA

A partir da otimização de todas as variáveis para se alcançar as melhores condições de separação e sinais analíticos, foram preparadas as curvas de calibração pela fortificação dos padrões em água MiliQ acidificada em pH 5. Os

resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados obtidos através da curva de calibração dos analitos

Analito	Equação da reta	Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	r^2	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)¹⁾
4- Hidroxibenzaldeído	$y = 390551x - 131922$	5,0 - 40,0	0,9931	1,5	5,0
Vanilina	$y = 42293x + 8566$	5,0 - 40,0	0,9983	1,5	5,0
Acetovanília	$y = 40452x + 156473$	5,0 - 40,0	0,9933	1,5	5,0
Siringaldeído	$y = 42853x + 107531$	5,0 - 40,0	0,9939	1,5	5,0
Acetoserigona	$y = 12488x - 3952,60$	5,0 - 40,0	0,9932	1,5	5,0

Fonte: autora (2021).

Com base nos resultados ilustrados na Tabela 7 pode-se observar que os valores do coeficiente de determinação obtidos para os analitos foram satisfatórios estando todos acima de 0,9931. Os valores de LOD obtidos para os analitos foram de $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e os valores de LOQ foram de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Para a avaliação da exatidão e da precisão do método desenvolvido foram realizados ensaios de recuperação com a adição de diferentes concentrações de analitos no licor branco acidificada em pH 5. Os resultados estão mostrados na Tabela 8. Os experimentos foram realizados em triplicata em cada nível de fortificação.

Tabela 8 - Resultados obtidos através de ensaios de recuperação para a avaliação da exatidão e precisão do método desenvolvido

Analito	Níveis fortificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	de Recuperação (n=3)	Precisão (%)	
			Intra-dia (RSD %) n=3	Inter-dia (RSD %) n=9
4-Hidroxibensaldeído	5	69	4,1	-
	20	79	5,2	11,6
	30	98	9,7	-
Vanilina	5	77	6,6	-
	20	73	7,3	10,9
	30	70	6,7	-
Acetovanilina	5	73	13,1	-
	20	82	6,9	8,2
	30	93	3,6	-
Siringaldeido	5	75	6,8	-
	20	74	2,1	9,9
	30	75	13,7	-
Acetosiringona	5	84	3,1	-
	20	94	2,9	4,8
	30	99	9,2	-

Fonte: autora (2021).

Conforme apresentado na Tabela 8 é possível observar a precisão do método realizada a partir do desvio padrão relativo (RSD, do inglês Relative Standard Deviation). No caso dos ensaios intradia os valores de RSD variaram de 2,1 a 13,1% e os interdia compreenderam uma faixa de 4,8 a 11,6%, resultados considerados satisfatórios e que estão de acordo com os valores de precisão aceitos que devem ser inferiores a 20%. Desse modo, com base nos resultados obtidos, o método analítico desenvolvido nesse trabalho demonstrou-se válido para a faixa linear de trabalho utilizada para todos os analitos estudados.

Com relação à avaliação da exatidão do método, avaliada por meio da recuperação relativa, variou de 69 a 99%. De acordo com a Associação dos Químicos Analíticos (AOAC, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*) valores de porcentagem de recuperação relativa entre 40 e 120% para concentrações até $1 \mu\text{g L}^{-1}$ são aceitáveis para avaliar a exatidão de um método (AOAC, 2016). Por terem sido empregadas concentrações superiores, alguns valores obtidos nas recuperações relativas do método proposto estão fora da faixa aceita pela AOAC. Porém, considera-se aceitável por tratar-se de um método que utiliza microextração, como também, devido à complexidade da matriz manipulada.

5.7 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

Após todas as etapas de otimização e validação do método de preparo de amostras proposto para análise de monômeros fenólicos em licor negro após tratamento ácido, o método foi aplicado nas amostras reais de bambu, para detectar e quantificar a presença dos cinco padrões trabalhados. Os resultados obtidos após a análise são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados obtidos nas análises de duas amostras de licor negro utilizando o método proposto

Analito	Amostra
4- Hidroxibenzaldeído	> LOD
Vanilina	21,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Acetovanilina	19,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Siringaldeído	> LOD
Acetosiringona	20,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Legenda: >LOD: Superior ao limite de detecção; LOQ: Superior ao limite de quantificação.
Fonte: autora (2021).

De acordo com os resultados evidenciados para a amostra de licor negro analisada, verificamos que os analitos 4- Hidroxibenzaldeído e Siringaldeído foram encontrados com concentrações iguais a $1,6\mu\text{g mL}^{-1}$, estando abaixo do LOQ, porém acima do LOD, Os analitos, vanilina, Acetovanilina e Acetosiringona, apresentaram respectivamente concentrações iguais a $21,7\mu\text{g mL}^{-1}$, $19,2\mu\text{g mL}^{-1}$ e $20,7\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentando valores acima do LOQ. O Cromatograma de análise da amostra segue anexo no apêndice D.

5.8 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA

O método proposto nesse trabalho foi comparado com outras metodologias reportadas na literatura utilizadas para a determinação de monômeros de lignina em amostras aquosas. Por falta de relatos na literatura deste tipo de composto em água,

comparamos a alguns parametros do método com outros desenvolvidos para análises de amostras de solos e sedimentos.

Conforme apresentado na Tabela 9, é possível observar que o método desenvolvido nesse trabalho utiliza menores volumes de solventes em relação aos outros métodos, contribuindo, desse modo, para a geração de uma baixa quantidade de resíduos.

Outro fato importante é o tempo total de preparo de amostra, enquanto o método desenvolvido nesse trabalho necessita apenas de 5 min para realizar essa etapa, os outros métodos necessitam de muito mais tempo podendo alcançar até de mais de 1 hora para executar essa etapa.

Com relação às faixas lineares de trabalho obtidas pelo método desenvolvido nesse estudo, observa-se que essas são amplas e foram alcançados níveis de concentração relativamente inferiores à boa parte dos métodos apresentados na Tabela 10. Embora tenham sido atingidos valores das faixas lineares de trabalho próximos ou com uma abrangência inferior a outros métodos em alguns casos, deve ser levado em consideração o volume, tipo de amostra e o instrumento de separação e detecção utilizados em cada método.

Tabela 10 - Comparação do método desenvolvido com outros reportados na literatura

Anlitos	Matriz	Preparo de amostra	Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume de solvente	Instrumentação	Tempo de preparo de amostra (min)	Referência
4- Hidroxibenzaldeído Siringaldeído Acetossiringona Vanilina Acetovanilina	Água	DPX	5 - 40	200 μl	GD-FID	> 5	Este Trabalho
4- Hidroxibenzaldeído Siringaldeído Acetossiringona Vanilina Acetovanilina	Água	SPME	60 - 180	0,5mL	GC-MS	> 35	PEREIRA; RODRIGUES; HANSEL (2018)
4- Hidroxibenzaldeído Siringaldeído Acetossiringona Vanilina Acetovanilina	Água	LLME	60 - 180	0,5 mL	GC-MS	> 50	PEREIRA; RODRIGUES; HANSEL (2018)
Siringaldeído Acetossiringona Vanilina Acetovanilina	Solo	DPX	1 - 20	200 μl	GC-FID	> 5	GRAF S. L. SARA
Siringaldeído Acetossiringona Vanilina Acetovanilina	Solo	SPME	35 - 225 65 - 225 75 - 225	3,3mL	GC-FID	> 60	PINTO S. MAYARA

Fonte: autora (2021).

6 CONCLUSÃO

O método proposto nesse trabalho demonstrou êxito na detecção e quantificação dos respectivos analitos provenientes das águas residuais gerada após tratamento ácido o licor negro. O tempo total para a execução do preparo de amostra desenvolvido é baixo, cerca de 5 minutos, o que contribui para a frequência analítica do método. A utilização de pequenos volumes de amostra e solventes orgânicos proporcionou a produção de uma pequena quantidade de resíduos, o que vai de encontro com os princípios da química analítica verde.

Os parâmetros analíticos de mérito obtidos apresentaram valores aceitos pelas normas de validação, como coeficientes de correlação linear superiores a 0,9931 para todos os analitos estudados, ensaios de recuperação 69 e 99%, precisões intradia que variaram de 2,1 a 13,1% e interdia de 4,8 a 11,6%.

De maneira geral, o método proposto foi devidamente otimizado e validado, demonstrando que a utilização da técnica de extração em ponteiras descartáveis (DPX) destacou-se como uma alternativa rápida, simples e eficiente, podendo ser utilizada em análises de rotina. Desse modo, o método desenvolvido tem capacidade para ser utilizado na identificação e quantificação dos analitos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, T. Sodium salt scaling in black liquor evaporators and concentrators. **Tappi Journal Peer Reviewed Paper**, v. 84, n. 6, p. 1-18, jun. 2001.

ALVES, Érica daré *et al.* **Estudo do processo de obtenção celulose Kraft com ênfase no forno de cal**. Revista Liberato, v. 16. 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/319131217_Estudo_do_processo_de_obtencao_celulose_Kraft_com_enfase_no_forno_de_cal/citation/download. Acesso em: 03 abr. 2020.

ALVES, Victor Rodrigues. **Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de derivados fenólicos de lignina por SPME-GC/FID**. 2014. 42 f. Monografia (Graduação em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

ANDREUCCETTI, Melissa Tatiana. **Caracterização do Licor Negro de Eucalipto na Etapa de Evaporação e Correlação de Suas Propriedades**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - UNICAMP, Campinas, 2010.

ANZALDO, José. **Lignina organosolv de Eucalyptus dunniimaiden, alternativa para a síntese de adesivos de poliuretano para madeira**. Tese (Especialização em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

AOAC: **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL**. 17th ed., AOAC International, Arlington, 2

AZZOLINI, J. C.; FABRO, L. F.; Controle da eficiência do sistema de tratamento de efluentes de uma indústria de celulose e papel da região Meio Oeste de Santa Catarina. **Unoesc & Ciência – ACET**, Joaçaba, v. 3, n. 1, p. 75-90. 2012.

BERRIMA, Bisma *et al.* Adsorption of heavy metals on charcoal from lignin. **Cellulose chemistry and technology**, v. 50, n. 5-6, p. 701-709, 2016. Disponível em: [http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT5-6\(2016\)/p.701-709.pdf](http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT5-6(2016)/p.701-709.pdf). Acesso em: 13 out. 2017

BORDIN, Dayanne Cristiane Mozaner *et al.* Disposable pipette tips extraction: fundamentals, applications and state of the art. **Journal Of Separation Science**, v. 39, n. 6, p. 1168-1172, 25 fev. 2016.

BORDIN, Dayanne Cristiane Mozaner *et al.* Técnicas de preparo de amostras biológicas com interesse forense. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p.125-143, 2015.

BOZELL, J. J. *et al.* **Top value added candidates from biomass**. Richland, A: Pacific Northwest National Laboratory, 2007. v. 2.

BRANDÃO, Ana Beatriz Benck. **O uso do licor negro como fonte de energia para**

uma indústria de polpa e papel. Monografia (Especialização em Engenharia Industrial Madeireira) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

BREWER, William. **Disposable pipette extraction.** Google Patents, 20 mai. 2003.
CABAN, Magda; STEPNOWSKI, Piotr. Silylation of acetaminophen by trifluoroacetamide-based silylation agents. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 154, p. 433-437, maio 2018.

CARDOSO, M. **Análise da unidade de recuperação do licor negro de eucalipto no processo “Kraft”, avaliando alternativas de processamento.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1998.

CARDOSO, M., OLIVEIRA, E. D., PASSOS, M. L. Chemical composition and physical properties of black liquor and their effects on liquor recovery operation in Brazilian pulp mills. **Fuel**, v. 88, p. 756-763, 2009.

CARDOSO, Marcelo A.; DOMINGOS, Éder O. A.; PASSOS, Maria Laura. **Chemical composition and physical properties of black liquors and their effects on liquor recovery operation in Brazilian pulp mills.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

CARREIRO, Milton Roberto de Mattos. **Análise Energética e Ambiental do Processamento do Licor Negro Gerado em Fábricas de Celulose e Papel.** Itajubá. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Instituto de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2009. Disponível em: <https://repositorio.unifei.edu.br/xmlui/handle/123456789/1582>. Acesso em: 10 jul. 2021.

CERQUEIRA, Gabriela Dias. **Determinação de plastificantes e seus metabólitos em urina e saliva por HF-LPME-GC/MS para estudos de exposição odontológica.** 2018. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

CHAVES, Andréa R. *et al.* The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography**, v. 1399, p. 1-7, 19 jun. 2015.

CHEN, Yi *et al.* Sample preparation. **Journal Of Chromatography**, v. 1184, n. 1-2, p. 191-219, mar. 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia.** 4. ed. São Paulo: Unicamp, 2006.

COMELLI, Heloisa Campos. **Determinação de monoftalatos em urina humana empregando a técnica de extração em ponteira descartável (DPX) E HPLC-DAD.** 2019. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

CORAZZA, Gabriela *et al.* A hybrid material as a sorbent phase for the disposable pipette extraction technique enhances efficiency in the determination of phenolic

endocrinedisrupting compounds. **Journal Of Chromatography**, v. 1513, p. 42-50, set. 2017.

CORAZZA, Gabriela *et al.* Assessment of a Fully Optimized DPX-Based Procedure for the Multiclass Determination of Pesticides in Drinking Water Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1211-1221, 23 mai. 2019.

CORREIA, F. M. **Análise de distúrbios de compactação de cavacos de eucalipto em digestores contínuos fase vapor**. 2010. 132 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Celulose e Papel) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2010.

COSTA, A. O. S. **Alternativas para o controle de um sistema de evaporadores de Múltiplo efeito**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

CURBELO, Fabíola Dias da Silva. **Estudo da remoção de óleo em águas produzidas na indústria de petróleo, por adsorção em coluna utilizando a vermiculita expandida e hidrofobizada**. 2002. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal 2002.

D'ALMEIDA, M. L. O. Celulose e papel. *In*: SENAI; IPT. **Tecnologia de fabricação de pasta celulósica**. 2. ed. São Paulo: Escola SENAI Theobaldo de Nigris, 1988. v. 1, cap. 3.

DOHERTY, W. O. S.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWS, C. M. Value-adding to cellulosic ethanol: lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 259-276, 2011.

DUPONT, A-L. *et al.* Comprehensive characterization os cellulose-and lignocellulosedegradation products in aged papers: Capillary zone electrophoresis of low-molar mass organic acids, carbohydrates, and aromatic lignin derivates. **Carbohydrates Polimers**, v. 68, p. 1-16, 2007.

FARAJZADEH, Mir Ali; NOURI, Nina; KHORRAM, Parisa. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 55, p. 14-23, 2014.

FARELLA, N. *et al.* Deforestation modifying terrestrial organic transport in the Rio Tapajós, Brazilian Amazon. **Organic Geochemistry**, v. 32, p. 1443-1458, 2001.

FENGEL, D., WEGNER, G. Wood, **Chemistry Utrastructure, Reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1983.

FENGEL, Dietrich; WEGENER, Gert. **Wood, chemistry, ultrastructure, reactions**. New York: Waster & Grugter, 1984.

FERNANDEZ, Miriany A. Moreira *et al.* Hollow fiber liquid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method to analyze bisphenol A and other plasticizer metabolites. **Journal Of Chromatography**, v. 1481, p. 31-36, jan. 2017.

FOELKEL, C. Individualização das fibras da madeira do eucalipto para a produção de celulose kraft. **Eucalyptus Online Book & Newsletter**, v. 107, 2009.

FORTUNATTO, Ana Carla. **Alternativas para o aproveitamento do licor negro da indústria de papel e celulose**. Monografia (Especialização em Gestão Ambiental e Negócios no Setor Energético do Instituto)- Instituto de Energia e Ambiente da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

FU, Kaifang *et al.* Preparation, characterization and application of lignin-based activated carbon from black liquor lignin by steam activation. **Chemical Engineering Journal**, v. 228, p.1074-1082, jul. 2013. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201500096806>. Acesso em: 10 jul. 2021.

FUMES, Bruno Henrique *et al.* Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, v. 71, p. 9-25, set. 2015.

GOÑI, M. A.; HEDGES, J. L. Cutin-derived CuO reaction products from purified cuticles and tree leaves. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 54, p. 3065, 1990.

GRAF, Sara Selena Lenz. **Determinação de monômeros derivados da lignina por extração com ponteira descartável seguido de GC-FID**. 2019. Monografia (TCC em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

GRINBAUM, Elvira Lúcia. **Avaliação de área contaminada com licor negro e resíduos de indústria de fabricação de papel**. Dissertação (Mestrado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

GULLICHSEN, J., FOGELHOLM, J. **Chemical Pulping**. Finnish Paper Engineers Association: Helsinki, 1999.

HAGE, E. R. A. V. D.; BOON, J. J. On-line Curie-point pyrolysis high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of lignin polymers. **Journal of Chromatography**, v. 736, p. 61-75, 1996.

HAMAGUCHI, Marcelo. **Additional revenue opportunities in pulp mills and their impacts on the kraft process**. Tese (Doutorado em Scienc e Technology) - Lappeenranta University of Technology, Lappeenranta, Finland, 2013.

HEDGES, John I.; ERTEL, John R. Characterization of Lignin by Gas Capillary Chromatography of Cupric Oxide Oxidation Products. **Analytical Chemistry**, Seattle, v. 54, n. 2, p. 174-178, fev. 1982.

HEDGES, John I.; MANN, Dale C. The characterization of plant tissues by their lignin oxidation products. **Geochimica Et Cosmochimica Acta**, v. 43, n. 11, p. 1803-1807, nov. 1979.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos: DOQ-CGCRE-008**. Brasília: Inmetro, 2003.

JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Extração em fase sólida: Fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n.1, p. 13-25, 2010.

JORGE, Isabela E. **Estudo sobre a extração de lignina do licor negro, seu impacto no processo de recuperação e geração de energia e seu potencial uso em novas aplicações**. 2018. 60f. Monografia (Especialização em Energias Renováveis) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

LAACKS, Jens; JOCHMANN, Maik A.; SCHMIDT, Torsten C. Solvent-free microextraction techniques in gas chromatography. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 2, p. 565-571, 5 nov. 2011.

LAI, Y. Z., SARKANEN, K. V. Isolation and structural studies. *In*: SARKAMEN, K. V., LUDWIG, C.H. **Lignins: occurrence, formation, structure and reaction**. New York: Wiley, 1971. p. 165-230.

LAMBERT, S. Disposable pipette tip extraction-leaner, greener sample preparation. **Chromatography Today**, v. 2, p. 12-14, 2009.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Chemical modification of lignins: towards biobased polymers, **Prog. Polym. Sci.**, v. 39, n. 7, p. 1266-1290, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670013001421>. Acesso em: 10 jul. 2021.

LOURENÇON, T. V. *et al.* Hardwood and softwood kraft lignins fractionation by simple sequential acid precipitation. **Scientia Chromatographica**, v. 154, n. 5, p. 82-88, 2015. Disponível em: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586615301921. Acesso em: 10 jul. 2021.

LOUCHOARN, P. *et al.* Analysis of lignin-derived phenols in standard reference materials and ocean dissolved organic matter by gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Marine Chemistry**, v. 118, n. 1/2, p. 85-97, 2010.

LV, J. *et al.* Adsorption of mercury lignin: Combined surface complexation modeling and X-ray absorption spectroscopy studies. **Environmental Pollution**, v. 162, p. 255-261, 2012.

MAFRA, Gabriela *et al.* Expanding the applicability of cork as extraction phase for disposable pipette extraction in multiresidue analysis of pharmaceuticals in urine samples. **Journal Of Chromatography**, v. 1103, n. 10102, p.159-166, dez. 2018.

MELO, J. R. *et al.* Estudo das características do licor preto. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2011.

MORELLI, Diogo Cherem *et al.* Ultrasound-assisted and disposable pipette

extraction for the determination of faecal contaminants in sediment samples by GC-MS. **International Journal Of Environmental Analytical Chemistry**, p. 1-12, 24 jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1782393>. Acesso em: 10 jul. 2021.

NOVÁKOVÁ, Lucie; VLČKOVÁ, Hana. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1-2, p. 8-35, dez. 2009.

OENNING, Anderson Luiz. **Desenvolvimento de metodologia para análises toxicológicas forenses na determinação de praguicidas em urina humana empregando a técnica de extração em ponteiras descartáveis e GC-MS**. 2018. 83 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

OLIVEIRA, Caroline Tirolla. **Estudos de separação de lignina do licor negro kraft em diferentes condições experimentais: caracterização e fracionamento**. 2016. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Universidade Federal de São Carlos, Câmpus Sorocaba, 2016.

PATTERSON, Tucker A. *et al.* Concurrent determination of bisphenol A pharmacokinetics in maternal and fetal rhesus monkeys. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 267, n. 1, p. 41-48, fev. 2013.

PAULA, S. C. S. **Precipitation of lignin from Kraft black liquor**. Tese (Mestrado Integrado em Engenharia Química) - FEUP, Porto, 2010.

PEGORARO, Rodinei Facco *et al.* Fenóis derivados da lignina, carboidratos e aminoaçúcares em serapilheira e solos cultivados com eucalipto e pastagem. **Revista Árvore**, v. 35, n. 2, p. 359-370, abr. 2011.

PEREIRA, Elisa Mendes; RODRIGUES, Maria Luiza Fernandes; HANSEL, Fabrício Augusto. **Esudo comparativo preliminar das extrações líquido-líquido e fase sólida na análise de derivados da lignina após pré-tratamento alcalino de madeia**. Curitiba, 2018.

PERLACK, R. D. *et al.* **Biomass as Feedstock for a Bioenergy and Bioproducts Industry: The Technical Feasibility of a Billion-Ton Annual Supply**. Department of Energy/GO-102005-2135, apr. 2005.

PINTO, M. A. L.; QUEIROZ, M. E. C. Extração em ponteiras descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p. 101-108, 2015.

PINTO, Mayara Santana. **Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de derivados fenólicos de lignina em sedimentos por SPME-GC/FID**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

PINTO, Mônia Ap. Lemos; SOUZA, Israel D.; QUEIROZ, Maria Eugênia C. Determination of drugs in plasma samples by disposable pipette extraction with C18-

BSA phase and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 139, p. 116-124, 30 mai. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.052>. Acesso em: 10 jul. 2021.

PINTO, Mônia Aparecida Lemos; QUEIROZ, Maria Eugênia Costa. Extração em ponteiras descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p.101-108, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2015.019>. Acesso em: 10 jul. 2021.

PUSCH, Jéssica Maria Espurio. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de marcadores químicos de contaminação fecal em amostras de sedimento**. 2016. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

RANGEL, T. P. **Biogeoquímica da matéria orgânica nos sedimentos dos 7 estuários do Rio das Ostras e Rio São João/RJ**. Dissertação (Mestrado em Geoquímica Ambiental) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2011.

REIS, Haroldo Marinho dos. **Análise Exergética e Ambiental do Processo de Obtenção do Licor de Cozimento Kraft para Extração de Celulose**. Dissertação (Pós-Graduação em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2013.

RIBANI, M. *et al.* **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004

SALIBA, Eloísa de Oliveira Simões *et al.* Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917-928, out. 2001.

SARGAZI, Shahnaz *et al.* One-step in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction and GC-FID determination of trace amounts of di (2-ethylhexyl) phthalate and its metabolite in human urine samples. **Journal Of Analytical Chemistry**, v. 72, n. 5, p. 557-561, maio 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1134/s1061934817050100>. Acesso em: 10 jul. 2021.

SCHUMMER, C. *et al.* Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. **Talanta**, v. 77, n. 4, p.1473-1482, 15 fev. 2009.

SOUTO, Felipe; CALADO, Veronica; PEREIRA JÚNIOR, Nei. Fibras de carbono a partir de lignina: uma revisão da literatura. **Scientific Electronic Library**, p. 1-15, 1 mar. 2015.

SZULTKA, Malgorzata *et al.* Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis. **Journal Of Separation Science**, v. 37, n. 21, p. 3094-3105, 25 set. 2014.

THEVENOT, Mathieu; DIGNAC, Marie-France; RUMPEL, Cornelia. Fate of lignins in soils: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1200-1211, 2010.

VAKKILAINEN, Esa K. Boundaries of Recovery Boiler Development. Lappeenranta University of Technology. **International Recovery Boiler Conference**, Finland, 2009.

VAKKILAINEN, Esa K; HONGHI, Tran. **The Kraft Chemical Recovery Process**. 2016.

VALMET. **Lignin – an excellent renewable fuel**. 2018. Disponível em: <https://www.valmet.com/pulp/chemical-recovery/lignin-separation/lignin-renewablefuel/>. Acesso em: 03 abr. 2020.

WIESENTHAL, T. *et al.* **How Much bioenergy can Europe produce without harming the environment?** Copenhagen, Denmark: European Environment Agency, 2006.

YANG, Baijuan *et al.* Application of solid-phase microextraction to the determination of polycyclic aromatic sulfur heterocycles in Bohai Sea crude oils. **Journal of Separation Science**, v. 36, p. 2646-2655, 2013.

YE, Zhihan *et al.* Determination of Phthalate and Metabolites in Human Urine by Lithium Bis(trifluoromethanesulfonyl)imide-Enhanced Dual Microextraction Method Optimized by Central Composite Design. **Chromatographia**, v. 83, n. 3, p. 397-408, fev. 2020.

YOSHIDA, H. *et al.* Kraft lignin in polyurethanes. II. Effects of the molecular weight of kraft lignin on the properties of polyurethanes from a kraft lignin-polyether triol-polymeric MDI system. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 40, n. 11-12, p. 1819-1832, 1990. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.1990.070401102>. Acesso em: 10 jul. 2021.

ZAKZESKI, J. *et al.* A Valorização Catalítica da Lignina para a Produção de Substâncias Químicas Renováveis. **Chem. Rev.**, v. 110, p. 3552-3599, 2010.

APÊNDICE A: TABELA ANOVA – ESCOLHA DA QUANTIDADE DE CICLOS

Anova: fator único

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
3 ciclos	5	8513337	1702667	7,35E+10
6 ciclos	5	6636856	1327371	3,03E+10
9 Ciclos	5	9691384	1938277	4,4E+10

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	9,49E+11	2	4,75E+11	9,634333	0,003195	0,734772
Dentro dos grupos	5,91E+11	12	4,93E+10			
Total	1,54E+12	14				

APÊNDICE B: TABELA ANOVA – ESCOLHA DO TEMPO DE CADA CICLO

Anova: fator único

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
10s	5	8214244	1642849	1,79E+10
30s	5	8513337	1702667	7,35E+10
50s	5	7395954	1479191	1,87E+10

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,34E+11	2	6,69E+10	1,823395	0,203487	0,734772
Dentro dos grupos	4,4E+11	12	3,67E+10			
Total	5,74E+11	14				

APÊNDICE C: TABELA ANOVA – ESCOLHA DO SOLVENTE

Anova: fator único

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Acetato	5	6569973	1313995	3,54E+10
Cetona	5	8513337	1702667	7,35E+10
Acetonitrila	5	4405049	881009,9	2,4E+10

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	1,69E+12	2	8,45E+11	19,06005	0,000188	0,734772
Dentro dos grupos	5,32E+11	12	4,43E+10			
Total	2,22E+12	14				

APÊNDICE D: CROMATOGRAMA DA AMOSTRA DE LICOR NEGRO PROFENIENTE DA MADEIRA DE EUCALIPITOS

