

**UFRRJ  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS E FLORESTAIS**

**DISSERTAÇÃO**

**OZONÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA  
(BAGAÇO DE CANA) VISANDO A REDUÇÃO DO TEOR  
DE LIGNINA E DO ÁCIDO *p*-CUMÁRICO**

**Bruno Couto da Silva**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E  
FLORESTAIS**

**OZONÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA  
(BAGAÇO DE CANA) VISANDO A REDUÇÃO DO TEOR  
DE LIGNINA E DO ÁCIDO *p*-CUMÁRICO**

**Bruno Couto da Silva**

*Sob a orientação do Professor*  
**Dr. Heber dos Santos Abreu**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de concentração em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais.

Seropédica, RJ  
Maio de 2013

676.5

S586o

T

Silva, Bruno Couto da, 1987-

Ozonólise da biomassa lignocelulósica (bagaço de cana) visando a redução do teor de lignina e do ácido *p*-Cumárico / Bruno Couto da Silva - 2013.

69 f. : il.

Orientador: Heber dos Santos Abreu.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais.

Bibliografia: f. 48-52.

1. Lignina - Teses. 2. Ozônio - Teses. 3. Fontes de infravermelho - Teses. 4. Celulose - Teses. I. Abreu, Heber dos Santos, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FLORESTAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E  
FLORESTAIS**

**BRUNO COUTO DA SILVA**

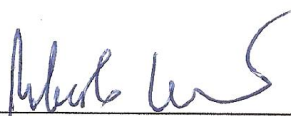
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de Concentração em Tecnologia e Utilização de Produtos Florestais.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 24/05/2013



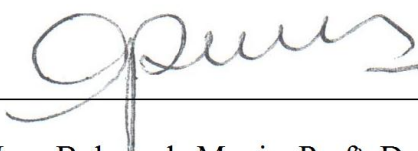
---

Heber dos Santos Abreu. Prof. Dr. UFRRJ  
(Orientador)



---

Roberto Carlos Costa Lelis. Prof. Dr. UFRRJ



---

Graciela Ines Bolzon de Muniz. Prof<sup>ª</sup>. Dra. UFRRJ

A Deus.

Aos meus pais Carlos Roberto Lopes da Silva e Marli Couto da Silva

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me permitir ter essa experiência de vida tão única e recompensadora, pelo zelo e fidelidade, pois nunca algo que eu tenha a Ele pedido deixei de receber. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Heber dos Santos Abreu, pela sua dedicação e zelo como orientador, além de sua paciência, amizade e sabedoria que foram cruciais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Carlos Costa Lelis pelos conselhos e amizade, além da concessão do uso do Laboratório de Tecnologia da Madeira do Instituto de Florestas da UFRRJ.

À Prof<sup>a</sup> Rosane Nora Castro e Luizmar de Assis Barros, pelo auxílio nas análises em CLAE.

Ao Prof. Jair Felipe Garcia Pereira, pela doação do material em estudo.

Aos técnicos Maurício Lemos Mattos e Vitor dos Santos Almeida do Laboratório de Química orgânica do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFRRJ pelos registros dos espectros de RMN <sup>13</sup>C.

Aos meus pais Carlos Roberto Lopes da Silva e Marli Couto da Silva, pela compreensão, carinho e suporte que me permitiram chegar aqui.

Aos amigos Gisely de Lima Oliveira, Vinicius Cadete Bernardes, Michel Cardoso Vieira, José Carlos Pereira Batista e João Paulo Pereira Colly, pelo carinho e amizade, pelos conselhos, seja no trabalho ou vida pessoal, sendo de grande ajuda tanto para a realização deste trabalho, assim como companheiros de caminhada.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPERJ pela infraestrutura de equipamentos do Laboratório de Química da Madeira do Instituto de Florestas da UFRRJ.

## RESUMO

SILVA, Bruno Couto da. **Ozonolysis of Lignocelulosic Biomass (sugarcane bagasse) seeking reduction of lignin content and *p*-coumaric acid.** 2013. 70 f. Dissertation (Master Science in Environmental and Forestry Science). Instituto de Florestas. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2013.

Esta pesquisa teve como objetivo a redução dos teores de lignina e ácido *p*-cumárico por ozonólise utilizando bagaço de cana-de-açúcar visando obter um material com menor propriedade de recalcitrância. O ozônio foi produzido por um ozonizador alimentado por oxigênio de pureza medicinal. A reação ocorreu em uma coluna de vidro com fluxo contínuo de ozônio de 400 mg/h. A padronização do fluxo de ozônio foi realizada por iodometria. Como amostra, foi utilizado o bagaço de cana (*Saccharum* spp), variedade rb867515 pré-extraído com etanol PA. O bagaço foi previamente moído, tendo seus teores de lignina e ácido *p*-cumárico determinados pelo método de Klason (24 %) e por CLAE (96,91 µg/ml), respectivamente. Foram realizadas análises por infravermelho (FTIR) no modo transmitância da amostra controle e dos produtos de reação em condições neutras, básicas e ácidas, revelando que as reações promoveram transformações da biomassa relacionadas as características estruturais originais da lignina controle. Os sinais observados foram quantificados por método de linha base, utilizando o sinal 1500 cm<sup>-1</sup> como padrão interno. Foram registrados espectros de RMN <sup>13</sup>C CP/MAS no estado sólido das amostras controle assim como dos produtos de ozonólise. Para as análise do teor de ácido *p*-cumárico das amostras, foi utilizado método para a determinação de ácidos fenólicos da parede celular conforme descrito na literatura específica. A determinação do teor de ácido *p*-cumárico foi realizada por CLAE usando padrão do mesmo ácido de marca FLUKA após traçada a curva de calibração. Foram encontrados 96,91µg/ml para amostra controle, nos produtos de ozonólise em condição neutra 6h (4,9 µg/ml), básico 2h (7.5 µg/ml) e ácido 4h (9.5 µg/ml). Houve perda expressiva de lignina, determinadas através do método de Klason, tendo reduzido de 24% da amostra controle para produtos de ozonólise 7,55% (2 h); 8,72% (4 h) e 13,78% (6 h) em condições neutras, de 11,70% (2 h); 13.83% (4 h) e 9.35% (6 h) e 6.67% (2 h), 6,67% (4 h) e 13,04% (6 h) em meio ácido. Os resultados mostraram que o processo de ozonólise reduziu o teor de lignina e a concentração ácido *p*-cumárico na biomassa, permitindo, propor que houve mudança da característica estrutural de lignina da amostra com estrutura etérica para uma estrutura condensada, indicando que a recalcitrância original foi significativamente reduzida, observadas as características finais do material. Não foram determinadas as perdas de celulose e hemicelulose. Os espectros de RMN <sup>13</sup>C não mostraram variações significativas desses constituintes.

Palavras chave: Parede celular, ozônio, infravermelho, Celulose, RMN <sup>13</sup>C

## ABSTRACT

SILVA, Bruno Couto da. **Ozonolysis of Lignocelulosic Biomass (sugarcane bagasse) seeking reduction of lignin content and *p*-coumaric acid.** 2013. 70 f. Dissertation (Master Science in Environmental and Forestry Science). Instituto de Florestas. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2013.

This research aimed to reduce lignin and *p*-coumaric acid content through ozonolysis using sugarcane bagasse to obtain a material with lower recalcitrance. Ozone was produced by an ozone generator with medical purity oxygen. The reaction occurred in a glass column with continuous ozone flow at 400 mg / h. The standardization of the ozone flow was performed by iodometry. As a sample, it was used sugarcane bagasse (*Saccharum* spp), variety rb867515 pre-extracted with ethanol PA. The bagasse was previously ground, and lignin and *p*-coumaric acid determined by the Klason method (24%) and HPLC (96 mg / ml), respectively. Infrared (FTIR) transmittance mode analyses of control sample, and the reaction products under neutral, basic and acidic pH revealed that the reactions promoted biomass transformations related to structural characteristics of the original lignin content. The observed infrared signals were quantitated by baseline correction using the signal 1500 cm<sup>-1</sup> as internal standard. Spectra were recorded <sup>13</sup>C NMR CP / MAS solid samples as well as control of the ozonolysis products. For the analysis of *p*-coumaric acid content, it was used a method for the determination of phenolic acids in the cell wall described in specific literature. The determination of *p*-coumaric acid was performed by HPLC using standard from FLUKA, inc. to obtain calibration curve. It was found 96.µg/ml on control sample, whereas in neutral condition 6h was found 4.9 mg / ml, in basic 2h was found 7.5 mg / ml and in 4h acid was found 9.5 g / ml. There was a significant loss of lignin, as determined by the Klason method, reducing the original 24% lignin of the control sample to 7.55% (2 h), 8.72% (4 h) and 13.78% (6 h) under neutral conditions, 11.70% (2 h), 13.83% (4 h) and 9:35% (6 h) and 6.67% (2 h) 6.67% (4 h) and 13.04% (6 h) in acidic pH. These results showed that the process of ozonolysis reduced the lignin content and *p*-coumaric acid concentration in the biomass allowing the change of the proposed structural characteristic of lignin etheric structure for a condensed structure, indicating that the original recalcitrance was significantly reduced the observed characteristics final material. There were some losses of cellulose and hemicellulose. The analyzes showed no changes in these constituents.

Key words: Cell wall, ozone, infrared, Cellulose, <sup>13</sup>C NMR



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Produção de ozônio em mg/h:	19
<b>Tabela 2.</b>	Deslocamento químico de carbonos calculado de precursores da lignina	21
<b>Tabela 3.</b>	Atribuição dos deslocamentos químicos (LIN & DENCE 1992; RESENDE et al. 2011, WIKBERG, 2004).	23
<b>Tabela 4.</b>	Atribuição dos principais sinais da lignina do espectro no infravermelho na amostra controle (LIN & DENCE, 1992)	24

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Desconstrução de plantas em combustíveis e produtos químicos, através de uma rota bioquímica ou termoquímica (CHUNDAWAT et al., 2011).	3
<b>Figura 2.</b>	Aspectos gerais da organização morfológica e química da parede celular antes e após tratamento (CHUNDAWAT et al., 2011).	10
<b>Figura 3.</b>	Tipos de ligações entre ácidos <i>p</i> -hidroxicinâmicos e hemicelulose (CHUNDAWAT et al., 2011).	12
<b>Figura 4.</b>	Processo de formação do ozônio e suas estruturas canônicas.	14
<b>Figura 5.</b>	Reação de uma molécula de ozônio em contato com água. (ANGLADA, 2012).	18
<b>Figura 6.</b>	Transformação do material lignocelulósico em etanol iniciado por ozonólise, seguido por hidrólise enzimática e sacarificação/fermentação.	22
<b>Figura 7.</b>	Alguns produtos formados por ozonólise de um modelo éter-aril-alquilico via substituição eletrofílica (BALOUSEK 1979).	23
<b>Figura 8.</b>	Estrutura molecular do ácido <i>p</i> -cumárico e ferúlico, respectivamente.	24
<b>Figura 9.</b>	Modelo da conectividade entre lignina e parede celular.	25
<b>Figura 10.</b>	Estado energético de um núcleo de hidrogênio na ausência e presença de um campo magnético externo sob um campo magnético, os núcleos de <sup>13</sup> C precessam nas suas respectivas fases de spin +1/2 e -1/2 (PAVIA et al., 2010).	27
<b>Figura 11.</b>	Acima o travamento de spin (spin locking) no sistema coordenada rotatório e abaixo sequência geral de pulsos para RMN CP/MAS (LIN & DENCE, 1992) .Nota: td-tempo de atraso de pulso; tp-tempo para rearranjo da magnetização; ti-tempo com transmissor desligado; ta-tempo de magnetização do próton-Traço vertical significa intensidade da Radio Frequencia (RF) e a linha horizontal tempo do pulso, DLI-Decaimento livre de indução.	28
<b>Figura 12.</b>	Acima o travamento de spin (spin locking) no sistema coordenada rotatório e abaixo sequência geral de pulsos para RMN CP/MAS Interação dipolo-dipolo de um par de spin (PAVIA et al., 2010).	12
<b>Figura 13.</b>	Diagrama do girador do ângulo mágico.	12
<b>Figura 14.</b>	Esquema de um sistema de CLAE (RANKE, 2007)	13
<b>Figura 15.</b>	Reação de ozonólise conduzida em uma coluna lavadora de gases.	14
<b>Figura 16.</b>	Ozonizador utilizado no experimento.	16
<b>Figura 17.</b>	Brucker Avance III, responsável pelas análises em RMN <sup>13</sup> C. Ao fundo, rotor eletromagnético, usado em conjunto com o aparelho.	17
<b>Figura 18.</b>	Espectrômetro de infravermelho, acoplado a um microscópio, responsável pelo registro dos espectros.	18
<b>Figura 19.</b>	Sistema de CLAE da marca shimadzu.	19
<b>Figura 20.</b>	Espectro CP/MAS do bagaço de cana com extrativos e com delimitação da região de deslocamento químico.	20
<b>Figura 21.</b>	Exemplos de estrutura etérica fenil-aril éter e estrutura condensada furânica-furânica.	23
<b>Figura 22.</b>	Espectro no infravermelho da amostra controle.	24

<b>Figura 23.</b>	Espectros no infravermelho da biomassa tratada em meio neutro.	25
<b>Figura 24.</b>	Valores relativos de intensidades dos sinais dos espectros das amostras tratadas em meio neutro.	26
<b>Figura 25.</b>	Espectros no infravermelho das amostras tratadas em meio básico.	27
<b>Figura 26</b>	Valores relativos das intensidades dos sinais dos espectros das amostras tratadas em meio básico	28
<b>Figura 27</b>	Espectros no infravermelho das amostras tratadas em meio ácido.	29
<b>Figura 28.</b>	Espectros no infravermelho da biomassa tratada em meio ácido.	30
<b>Figura 29</b>	Valores relativos de intensidades dos sinais dos espectros das amostras tratadas em meio ácido.	
<b>Figura 30</b>	Cromatograma da amostra controle do bagaço de cana	
<b>Figura 31</b>	Cromatograma mostrando as concentrações do ácido <i>p</i> -cumárico nas amostras tratadas com ozônio em diferentes condições de pH e tempo de reação.	
<b>Figura 32</b>	Teor de lignina das amostras.	

## LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

Å	Angstrom
ATR	Reflexão total atenuada
<sup>12</sup> C	Carbono-12
<sup>13</sup> C	Carbono-13
Cl <sub>2</sub>	Cloro gasoso
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetro
CP/MAS	Polarizao cruzada e ângulo mágico de spin
FT-IR	Infravermelho com Transformada de Fourier
G	Guaiacila
<sup>1</sup> H	Hidrognio
H	Cumarila
HO <sup>-</sup>	Hidróxido
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HO <sub>2</sub>	Hidroperoxil
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
KBr	Brometo de potássio
KI	Iodeto de Potássio
M	Metro
M	Molar (mol/L)
MCT	Detector
mg	Miligrama
mL	Mililitro
min	Minutos
mmol L <sup>-1</sup>	Mili mols por mililitro
mV	Mili Volts
N	Normal (grandeza química)
NaOH	Hidróxido de sódio
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Tiosulfato de sódio
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de amnio
nm	Nanmetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
RD	Reflectância difusa
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotaoes por minuto
S	Siringila
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µm	Micra
µL	Micro litro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1 Materiais Lignocelulósicos .....	3
2.2 Ozônio como agente deslignificante .....	4
2.3. Degradação da parede celular com ozônio.....	6
2.4. Conectividade lignina-ácido <i>p</i> -cumárico .....	7
2.5. Espectroscopia no infravermelho.....	9
2.6. Espectroscopia de RMN de <sup>13</sup> C.....	10
2.6.1. Polarização cruzada .....	10
2.6.2 MAS-Ângulo Mágico de Spin .....	11
2.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	12
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
3.1 Material .....	14
3.1 Preparo das amostras livres de extrativo .....	14
3.2 Ozonólise.....	14
3.3 Análise por RMN <sup>13</sup> C.....	16
3.4. Análise espectroscópica no infravermelho .....	17
3.5. Isolamento do ácido <i>p</i> -cumárico das amostras lignocelulósicas.....	18
3.6. Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	18
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>19</b>
4.1. Produtividade do ozonizador.....	19
4.2. RMN <sup>13</sup> C CP/MAS .....	19
4.3. Infravermelho .....	23
4.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	30
4.5. Teor de Lignina .....	33
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>35</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>40</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A composição química da parede celular é basicamente formada por lignina, celulose e hemicelulose, as quais estão fortemente associadas por ligações cruzadas formando um sistema multimolecular de alta complexidade, provendo resistência química e física a parede celular. A lignina, por exemplo, possui o papel de proteger a celulose. A degradação da celulose por tratamento ácido para viabilização da produção de etanol, por exemplo, é diminuída pela proteção que a lignina exerce sobre as estruturas celulósicas. Isso é devido à propriedade ácido-resistente da lignina, impedindo a ação hidrolítica sobre a celulose. Assim, se faz necessário o uso de tecnologias de forma melhor aproveitar os carboidratos oriundos da celulose e da hemicelulose. Uma alternativa para contornar o efeito negativo da lignina frente ao processo de hidrólise é a prévia remoção da lignina e substâncias associadas, processo que pode ser realizado via oxidação. Essas substâncias associadas são de baixa massa molecular e se enquadram na classe dos ácidos *p*-hidroxicinâmicos e se conectam formando o complexo lignina-fenol-hemicelulose (SAWAI et al., 1983), corroborando com a baixa digestibilidade enzimática da parede celular.

O uso de biomassa vegetal tem despertado um grande interesse na área da bioenergia como fonte de matéria-prima devido ao alto teor de polícarboidratos (FARRELL et al., 2006). Esses materiais de origem lignocelulósica, principalmente os resíduos agrícolas e florestais, são fontes de matéria-prima barata e abundante para a produção de biocombustíveis (GARCÍA-CUBERO, 2010).

A produção e utilização de etanol atraíram atenção mundial como forma de amenizar o aquecimento global e aperfeiçoar a produção energética. Porém, as matérias-primas para produção de etanol devem ser obtidas de partes não comestíveis de culturas alimentícias, a fim de evitar a competição direta entre o etanol e as mesmas (SAKAI et al., 2007). Desde 2007, o etanol, também conhecido como bioetanol, vem sendo produzido a partir de açúcar ou de amido obtidos a partir de frutos e grãos (GOLDEMBERG et al., 2008; UNICA, 2008).

A conversão de biomassa lignocelulósica em etanol é um processo de três etapas que envolvem pré-tratamentos seguido por hidrólise de polissacarídeos à simples açúcares seguidos por fermentação e depois o etanol. Para expandir o potencial de utilização da biomassa lignocelulósica como matéria-prima para produção de etanol, considerável progresso tem sido obtido quanto às tecnologias de pré-tratamentos, de forma a superar as barreiras estruturais a fim de obter novos tipos de biomassa para um desempenho desejado em uma dada aplicação (WYMAN et al., 2005).

O primeiro passo para que haja conversão bioquímica da biomassa vegetal para a produção do etanol tem sido o pré-tratamento termoquímico para aumentar a taxa de catálise enzimática e microbiana; ao mesmo tempo deve-se compreender a composição e arquitetura das paredes celulares para considerar os efeitos físico-químicos do pré-tratamento, que resultam numa redução da recalcitrância nativa da parede celular. (CHUNDAWAT et al., 2011).

Devido às condições normalmente extremas que são empregadas nos pré-tratamentos térmicos e químicos, novas substâncias são formadas. Elas podem atuar como inibidoras potenciais tanto da hidrólise enzimática, quanto da fermentação. Os tipos de substâncias tóxicas e suas concentrações em hidrolisados lignocelulósicos dependem tanto da matéria-prima, quanto das condições operacionais empregadas no pré-tratamento.

Existe atualmente uma gama de tecnologias que incluem tratamentos químicos, físicos e biológicos que objetivam a deslignificação da biomassa lignocelulósica. Dentre elas, as que utilizam pré-tratamento químicos são consideradas como sendo as de maior potencial (SOUSA et al., 2009). Entre os agentes oxidantes químicos, o ozônio é o que possui maior reatividade

sobre as substâncias com grupos funcionais com alta densidade eletrônica, incluindo aqui as ligações de alcenos, tais como aquelas amplamente presentes em lignina.

O tratamento do material lignocelulósico de madeira com ozônio foi proposto pela primeira vez como um agente de branqueamento em 1871 (BALOUSEK, 1979). Devido à considerável quantidade de lignina presente em materiais lignocelulósicos, ocorre um efeito de embarreamento frente ao ataque microbiano, impedindo a penetração das enzimas nas paredes celulares das fibras. A presença de celulose cristalina pode também restringir a hidrólise (VIDAL & MOLINIER, 1988).

Essa barreira química mostra-se altamente complexa com ligações cruzadas em um conjunto de unidades moleculares etereficadas e/ou condensadas (CHEN et al., 1997). As ligações etereficadas do tipo éter  $\beta$ -arilíca têm sido reveladas como uma das principais ligações a serem primeiramente destruídas na presença de ozônio, valendo-se de modelos similares às ligninas (BALOUSEK, 1979), favorecendo a manutenção de uma estrutura relativamente mais condensada. Entre essas ligações estão ligações (éter e éster) em conectividades entre lignina e a parede celular através de ácidos *p*-hidroxicinâmicos, principalmente o ácido *p*-cumárico e ferúlico, que funcionam como ancora na região de fronteira e/ou até mesmo na região central molecular da lignina. A ligação entre lignina e ácido *p*-cumárico, por exemplo, é uma característica predominante em monocotiledôneas. Esses ácidos estão ligados ao núcleo molecular da lignina através dos carbonos C- $\alpha$ , C- $\beta$  e C- $\delta$  da cadeia lateral das unidades estruturais da lignina (IIYAMA, 1994). Tal fato pode ser explicado sobre o contexto que a formação da lignina tem o ácido *p*-cumárico como centro de nucleação para iniciar a polimerização na parede celular ((JUNG & VOGEL 1992; RALPH et al. 1994)).

Um dos métodos oxidativos mais eficaz é o tratamento da biomassa com ozônio. O ozônio é uma molécula triatômica altamente oxidante, e a lignina uma substância com elevada atividade antioxidante. Preferencialmente as reações com ozônio são específicas para olefinas (NUNES et al., 2000). Uma das maiores vantagens do uso de ozônio como agente deslignificante é devido ao fato de que a degradação é muito maior sobre a lignina, com leves ataques sobre a hemicelulose e poucas alterações à celulose (SUN & CHENG, 2002).

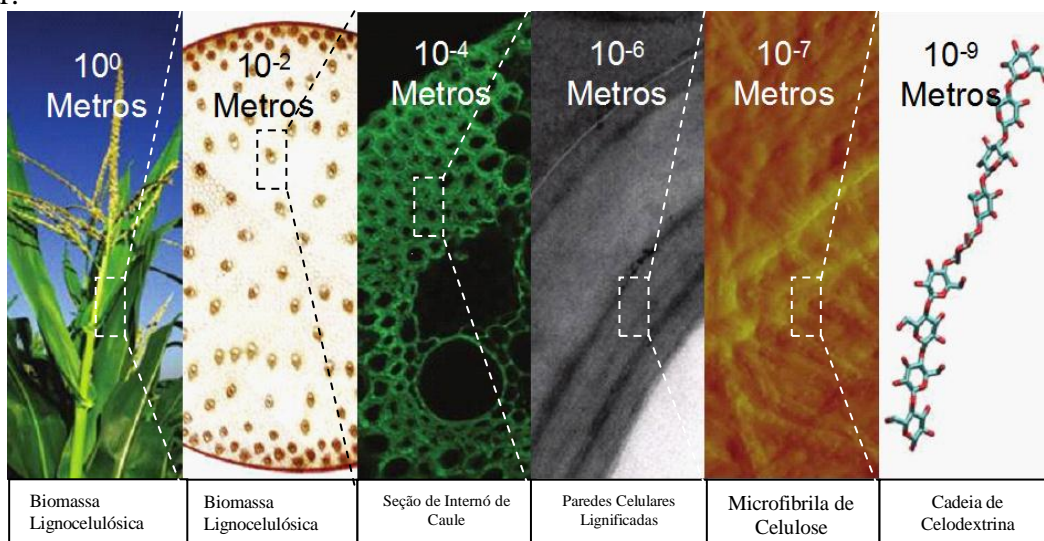
Existem muitos trabalhos científicos que buscam elucidar os mecanismos da ozonólise de materiais lignocelulósicos, porém poucos tentam compreender o efeito do ácido *p*-cumárico na recalcitrância da parede celular (LAM et al., 2003).

Diferença na configuração eletrônica entre lignina e carboidrato, principalmente as ligações duplas e centros doadores de elétrons presentes na lignina, permitem que o ozônio aja de forma seletiva, visto que o ozônio reage 105 vezes mais rápido sobre a lignina do que com carboidratos (MAIA & COLODETTE, 2003). O ozônio ataca as ligações duplas, gerando substâncias solúveis de baixa massa molecular, como alguns ácidos orgânicos, alterando o pH do meio reacional de 6,5 à 2. (CONTRERAS IGLESIAS, 2003). A maioria das referências para pré-tratamento com ozônio estão relacionadas com a pasta de celulósica para o branqueamento e tratamentos de água (CHANDRAKANTH et al., 1995; HENG et al., 2007; KLEISER & FRIMMEL, 2000). No entanto, a utilização do ozônio como agente deslignificante para acessibilidade enzimática ainda merece investigações mais profundas. Este trabalho tem como objetivo verificar o nível de alteração da biomassa da cana-de-açúcar após tratamento com ozônio, tendo como alvo a degradação da lignina e a diminuição da concentração dos ácidos *p*-cumárico para reduzir a recalcitrância e aumentar a acessibilidade enzimática.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

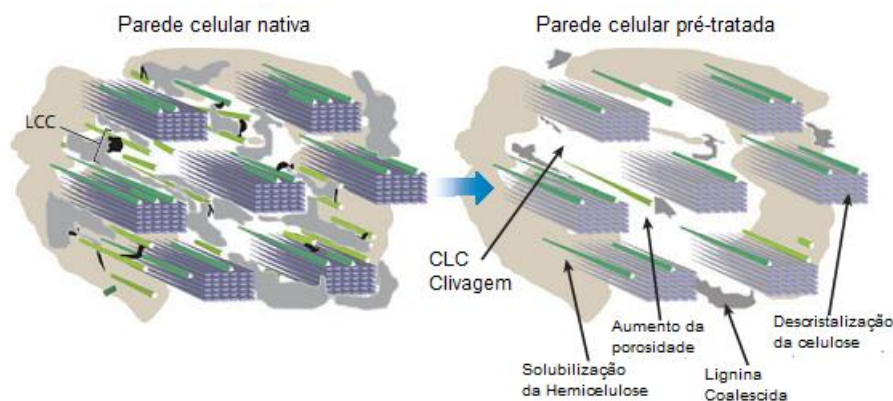
### 2.1 Materiais Lignocelulósicos

A parede celular é um compartimento da célula que merece uma específica área da ciência para compreendê-la melhor. Isso porque a composição química e a formação das substâncias na parede celular ainda é um tema de várias pesquisas no mundo todo. Os estudos sobre as ligações cruzadas entre substâncias da parede celular ainda carecem de resultados mais concretos. Essas substâncias conhecidas como celulose, hemicelulose, lignina, proteínas e outras substâncias como os ácidos *p*-hidroxicinâmicos, intrigam os cientistas e os motivam a simularem modelos e propostas estruturais sobre essa formação (BELGACEM & GANDINI, 2008). A Figura 1 retrata a macro, micro e molecular organização de um tecido de cana-de-açúcar.



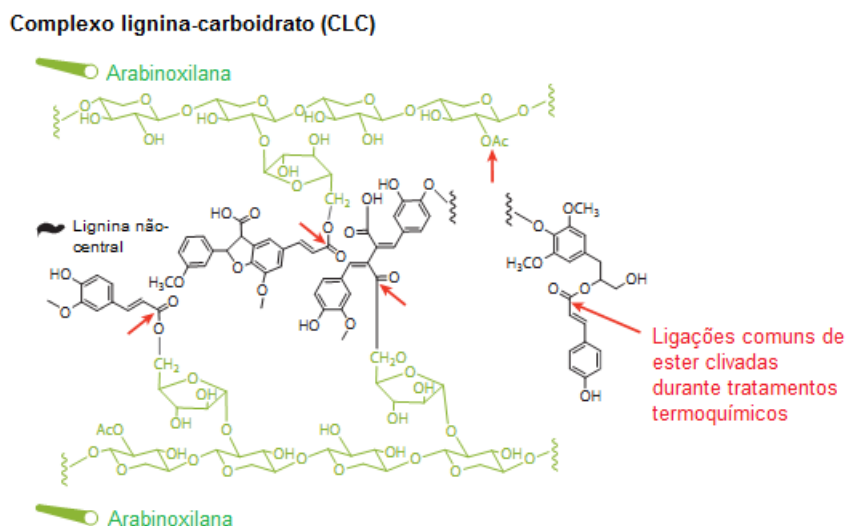
**Figura 1.** Desconstrução de plantas em combustíveis e produtos químicos, através de uma rota bioquímica ou termoquímica (CHUNDAWAT et al., 2011).

Um desses modelos propostos indica que a lignina na região de fronteira forma complexo com carboidratos e isso representa de forma simples a orientação e disposição desse modelo com relação ao papel como a lignina exerce a função de protetor da parede celular. A Figura 2 mostra os sitios de nucleação ou ligações entre lignina-carboidratos em um seguimento ilustrativos de um modelo que após tratamento para remoção da lignina conduz a um produto final com acessibilidade melhorada.



**Figura 2.** Aspectos gerais da organização morfológica e química da parede celular antes e após tratamento (CHUNDAWAT et al., 2011).





**Figura 3.** Tipos de ligações entre ácidos *p*-hidroxicinâmicos e hemicelulose (CHUNDAWAT et al., 2011).

Outros detalhes remetem-nos a figura anterior sobre a formação de ligações entre a lignina e os ácidos *p*-hidroxicinâmicos que conectam a lignina à parede celular, assumindo diferentes tipos de ligações, éter e éster em decorrência da acilação que ora pressupõe a formação da lignina, principalmente em monocotiledôneas (YU et al., 2005). Essa ligação da lignina com a parede celular através dos ácidos *p*-hidroxicinâmicos leva-nos a uma propriedade singular das monocotiledôneas e principalmente do bagaço de cana, conhecida como recalcitrância da parede celular. Essa propriedade tem sido alvo de estudos na área dos biocombustíveis, pelo fato de que isso afeta a digestibilidade enzimática, provocando perdas em rendimento assim como maior custo na produção do bioetanol.

## 2.2 Ozônio como agente deslignificante

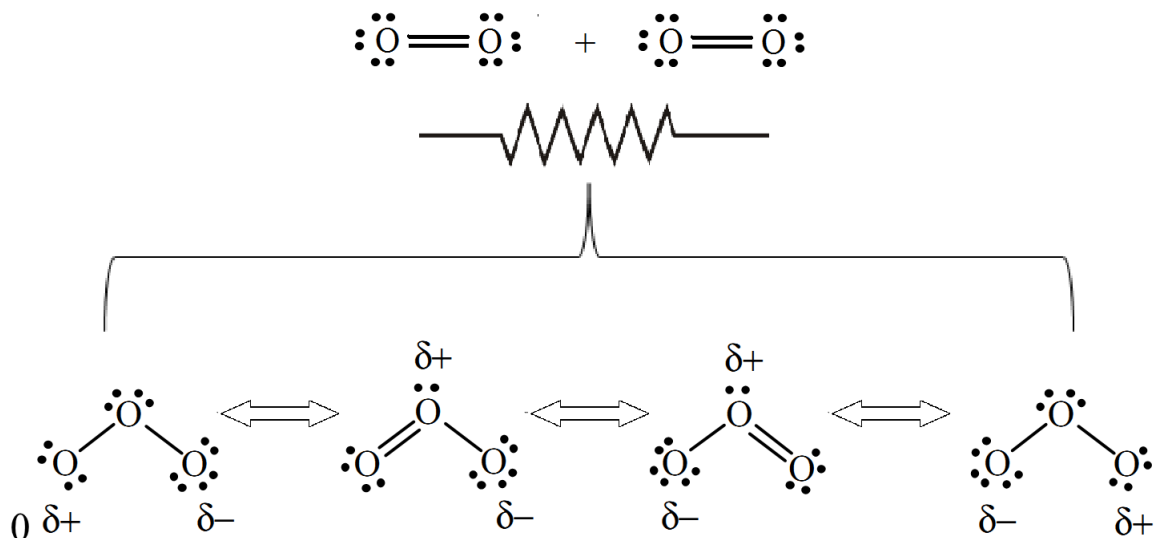
Como mencionado na introdução a necessidade de pré-tratamento é um caminho a seguir até que os métodos modernos superem a necessidade de pré-tratamentos. Um dos métodos mais promissores é a ozonólise.

O ozônio é uma molécula instável formado por adição de um átomo de oxigênio da molécula de oxigênio diatômica. Entre as substâncias habitualmente utilizadas na conservação de alimentos destaca-se o ozônio. Ele é o segundo mais poderoso oxidante (2,07 mV), depois de flúor (GUZEL-SEYDIM et al., 2004). Tal característica faz com que o ozônio, seja um agente anti-microbiano forte com ampla aplicabilidade na indústria alimentar, e um dos mais potentes desinfetantes. Este absorve radiação UV na faixa de 220-290 nm. É uma molécula com ângulo de ligação de 116,8° e distância interplanar de 1,278 Å. Seu ponto de fusão é -193°C, e seu ponto de ebulição é de -112 °C. A solubilidade de ozônio em soluções aquosas é 14 mmol/L<sup>-1</sup> a 20 °C, sendo mais solúvel, porém, em solução orgânica. A água tem sido considerada um bom solvente (HORVATH, 1984).

Tal característica faz com que o ozônio tenha intensa capacidade oxidante, o que o torna adequado a processos de branqueamento e pré-tratamento de madeira (MILLAR et al., 2003).

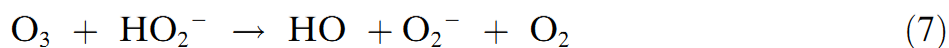
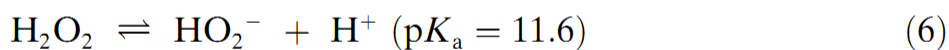
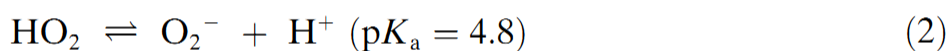
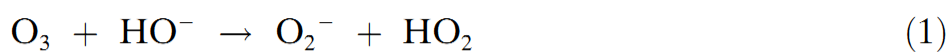
O ozônio foi proposto pela primeira vez como agente branqueador para madeira na década de 70 por Balousek (1979). Pode ser explosivo em concentrações elevadas, mas é relativamente estável em baixas temperaturas, o que é atribuído à estabilização pela

deslocalização dos elétrons como ilustrado pelas estruturas de ressonância mostrada na Figura 3.



**Figura 4.** Processo de formação do ozônio e suas estruturas canônicas.

O ozônio é uma molécula altamente instável em água e sua decomposição na mesma produz o radical HO·, também altamente instável (ANGLADA, 2012). O mecanismo se dá conforme segue modelo abaixo:



**Figura 5.** Reação de uma molécula de ozônio em contato com água (ANGLADA, 2012).

Devido esta reatividade e instabilidade, o ozônio tem que ser gerado *in situ* (ITRC, 2001(ISCO-1)). Isto é geralmente feito por um fluxo de oxigênio através de um campo elétrico, fenômeno conhecido por efeito corona (FRIDMAN, 2008).

A decomposição do ozônio depende, além da temperatura, do pH do meio, e pode ser acelerado pelo aumento da concentração de ânions HO<sup>-</sup>. A adição de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HO<sub>2</sub>) favorece o processo e, conseqüentemente, a produção de um maior número de radicais HO<sup>-</sup> (ANGLADA, 2012).

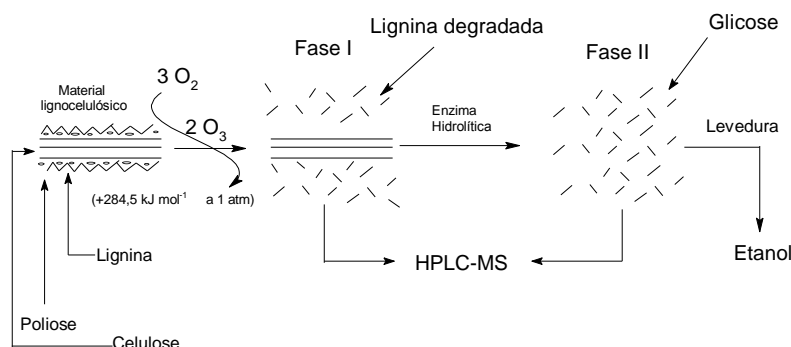
Uma das vantagens da aplicação de ozônio é que ele pode ser gerado no local, e não necessita de recipientes de armazenamento, ao contrário de outros produtos químicos. Além disso, o ozônio é altamente reativo e inespecífico a um grupo de microrganismos, e produz oxigênio como o produto final da sua clivagem (NOVAK & YUAN, 2007).

Em alta temperatura ou pH elevado, a quebra de ozônio forma uma gama de radicais livres (CSÉFALVAY et al., 2007). É amplamente utilizado na indústria (por exemplo, na produção de papel e tecido e de processamento de alimentos e de armazenagem), enquanto os seus efeitos germicidas são bem conhecidos e têm sido utilizados em uma gama de processos de esterilização como no tratamento de esgoto (RICE et al., 1981; GOTTSCHALK et al., 2000; MTUI, 2001; LAPOLLI et al., 2003).

A alta reatividade do ozônio é atribuída à configuração de elétrons da molécula (BELTRÁN, 2005). Como um agente eletrófilo, o ozônio não tem elétrons em um orbital de sua molécula. Por sua vez, a quebra da molécula de ozônio em presença de água é afetada por fatores como pH e temperatura. (NOVAK & YUAN, 2007; ERSHOV & MOROZOV, 2009).

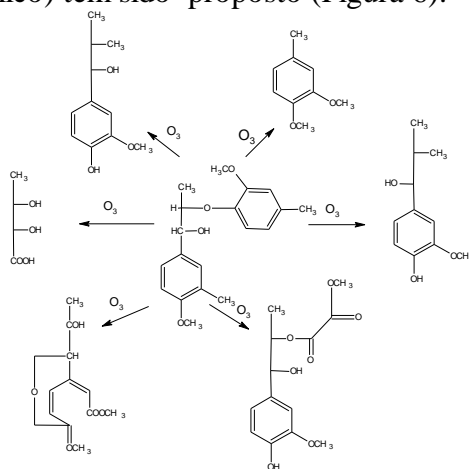
### 2.3. Degradação da parede celular com ozônio

Dependendo da composição da lignina a ozonólise pode se comportar de forma diferenciada, entendendo que a variação composicional pode gerar moléculas com estruturas diferentes. As ligninas de angiospermas (eudicotiledôneas) são menos complexas e possuem alta atividade antioxidante (PEREIRA et al., 2012). As ligninas dos tipos S, G, H, GS, HG e HGS podem apresentar formas estruturais complexas, assim como concentrações variáveis de ligações β-O-4 (éter alquil-arilica) (ABREU et al., 1999). Essa ligação é majoritária em ligninas e pode ser facilmente degradada por oxidação. A solubilização da lignina pode ser uma resposta à oxidação com formação de produtos de baixa massa molecular (MOHAN et al., 2006). O ozônio tem demonstrado ser um agente eficiente para a deslignificação de materiais lignocelulósicos. A Figura 5 detalha a ação do ozônio sobre o tecido lignocelulósico em um procedimento para obtenção de bioetanol.



**Figura 6.** Transformação do material lignocelulósico em etanol iniciado por ozonólise, seguido por hidrólise enzimática e sacarificação/fermentação.

O uso do ozônio como agente de deslignificação pode seguir o mecanismo de Criegee 1975, onde o ataque do ozônio à lignina é fundamentado na combinação da molécula de ozônio com as ligações duplas do anel aromático da lignina, formando um "ozonídeo", o qual se cliva em dois fragmentos: uma substância carbonilada e uma substância denominada "zwitterion" (GODSAY, 1985). A reação do ozônio sobre a ligação dupla presente na lignina elimina a sua característica de aromaticidade (Figura 6), diminuindo sua absorção de luz na faixa visível do espectro eletromagnético (Da SILVA & Da SILVA, 2002). Alguma forma do mecanismo zwitterion syn-anti, que na verdade é uma modificação do mecanismo "Criegee" (BALOUSEK, 1979) para dar conta da estereosseletividade exibida durante ozonólise - é explicação mais amplamente aceita para a ozonólise de olefinas. De acordo com este mecanismo, o ozônio reage com uma ligação dupla carbono-carbono via cicloadição 1,3-dipolar para formar um intermediário 1,2,3-trioxolano. Dados recentes indicam que os isômeros syn e anti podem estar em equilíbrio, proporcionando assim um fator adicional que influencia a estereoquímica de ozonólise de olefinas. Existem três rotas que podem ser seguidas, dependendo das condições de reação: Rota 1 - um ozonídeo "final" pode ser produzido por outra cicloadição. Rota 2 - zwitterion pode reagir com uma "participação de solvente" para formar um hidroperóxido intermediário. Esta parece ser a via dominante quando empregado solventes próticos. Rota 3 - dimerização e polimerização podem ocorrer para formar diperoxidos e peróxidos poliméricos. Este caminho é o mais provável em solventes não próticos quando o produto é uma cetona. Intermediários podem se decompor posteriormente para formar produtos de oxidação mais estáveis, tais como ácidos, ésteres, aldeídos e cetonas. Ozonólise de fenóis em solução aquosa tem contribuído para elucidação do mecanismo e formação de diversos produtos (MVULA & SONNTAG, 2003) Assim, reações com modelos de lignina do tipo (éter alquil-arílico) tem sido proposto (Figura 6).

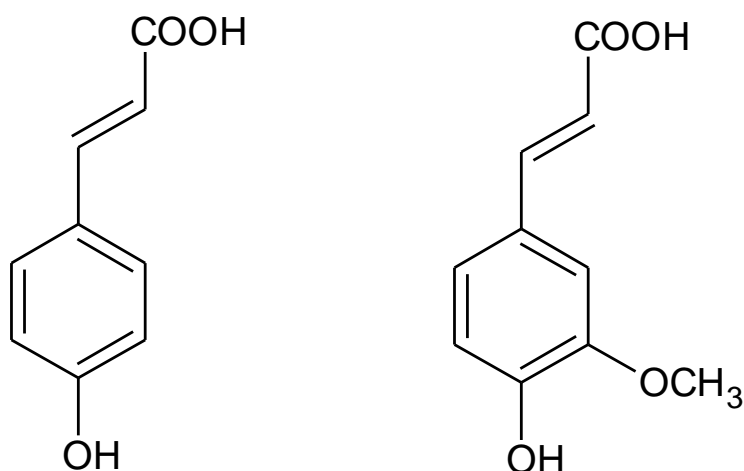


**Figura 7.** Alguns produtos formados por ozonólise de um modelo éter- $\beta$ -arílico via substituição eletrofílica (BALOUSEK 1979).

#### 2.4. Conectividade lignina-ácido *p*-cumárico

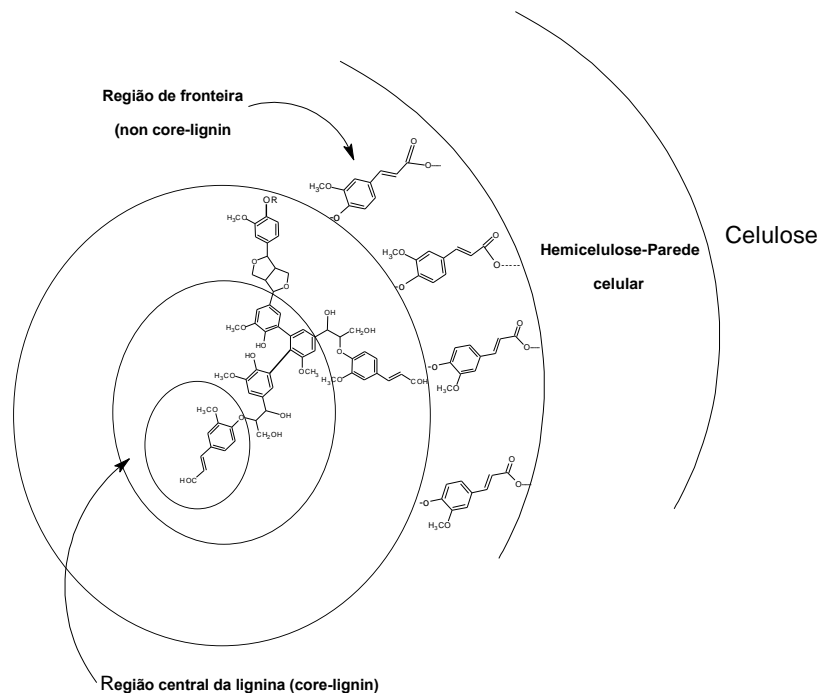
A estrutura da parede celular é formada por uma trama de macromoléculas tão adensadas que a remoção de um único elemento da parede se torna tarefa árdua e complexa. Isso se deve ao fato de que muitas ligações químicas incluindo aqui ligações covalentes, ligações de hidrogênio e forças de Van Der Waals, são altamente resistentes (FENGEL & WEGENER, 1984). Ligninas são heteropolímeros fenólicos originados do acoplamento oxidativo de três alcoóis *p*-hidroxicinâmicos (alcoóis *p*-cumárico, coniferílico e sinapílico), em reações mediadas por peroxidase (ROS BARCELÓ, 1997). A reação de acoplamento produz um heteropolímero óticamente inativo.

A lignina tem sido considerada como o principal fator limitante da digestibilidade da parede celular, embora o mecanismo pelo qual este controle seja exercido ainda não está claro. O teor de lignina não é sempre um bom medidor da degradabilidade, portanto outros fatores também podem influenciar a degradação da parede celular. Muitas vezes, o teor de lignina não está diretamente relacionado a degradabilidade, tendo em conta a fraca correlação entre essas variáveis em determinadas amostras (JUNG & BUXTON, 1994). Recentemente as ligações cruzadas entre os constituintes da parede celular têm emergido como um dos principais fatores da recalcitrância. A ligação cruzada entre os componentes da parede celular provavelmente possui uma influência marcada sobre as propriedades da parede, tais como acessibilidade, extensibilidade, aderência, plasticidade e digestibilidade (HATFIELD et al., 1999). Ácidos *p*-hidroxicinâmicos, principalmente os ácidos *p*-cumárico e o ferúlico (Figura 8), podem ser ligados covalentemente a carboidratos através de ligações éter ou éster-hemicelulose (ARGILLIER et al., 1996). Além disso, esses ácidos podem estar covalentemente ligados a lignina através de ligações do tipo éster e ou éter. A concentração de ácido *p*-cumárico e a proporção do mesmo, assim como do ácido ferúlico foram descritos como tendo um efeito negativo sobre a digestibilidade da parede celular (GABRIELSEN et al. 1990; LANGLAIS et al. 1991).



**Figura 8.** Estruturas moleculares dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico, respectivamente.

Todavia, a definição da parede celular em relação aos seus constituintes deve ser como composição interativa de várias conectividades envolvendo moléculas simples de natureza fenólica. Essa conectividade pode envolver como descrita anteriormente as ligações de éster e ou éter associando orientação molecular por diferentes grupos funcionais. Os ácidos *p*-hidroxicinâmicos podem se ligar a lignina via ligações éter sobre os carbonos C $\alpha$ , C $\beta$  e C $\gamma$  ou sobre o oxigênio fenólico da lignina, assim como ligado a parede celular na forma éterica e/ou éster do carbono C $\gamma$  (SHE et al., 2011). A Figura destaca essas ligações como possíveis entre a lignina e a parede célula.



**Figura 9.** Modelo de conectividade entre lignina e parede celular.

## 2.5. Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho constitui uma das ferramentas analíticas mais importantes em laboratórios voltados para pesquisas na área da química e afins. A energia denominada infravermelho corresponde à região do espectro eletromagnético na faixa de número de ondas que varia de  $14290$  à  $200\text{ cm}^{-1}$ . A região que apresenta número de ondas entre  $4000$ – $400\text{ cm}^{-1}$  é chamada infravermelho médio (PAVIA et al., 2010).

Assim como ocorre em outros tipos de absorção de energia, as moléculas, quando absorvem radiação no infravermelho, são excitadas para atingir um estado de maior energia. No processo de absorção em determinadas frequências de radiação no infravermelho equivalem às frequências vibracionais naturais da molécula em questão, e a energia absorvida serve para aumentar a amplitude dos movimentos vibracionais das ligações na molécula. Contudo, nem todas as ligações em uma molécula são capazes de absorver energia no infravermelho, mesmo que a frequência da radiação seja exatamente igual à do movimento vibracional.

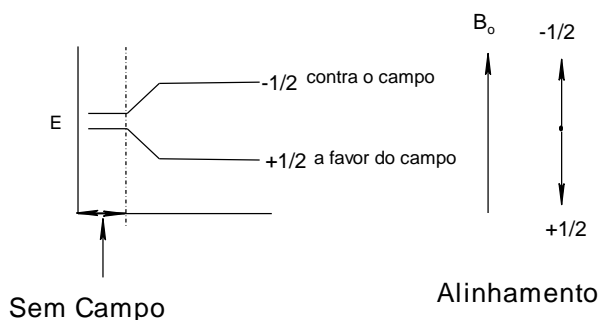
Apenas as ligações que tem um momento de dipolo que muda como uma função do tempo é capaz de vibrar ao absorver radiação no infravermelho. Ligações simétricas, como as do  $\text{H}_2$  ou  $\text{Cl}_2$ , não absorvem radiação no infravermelho. Para transferir energia, uma ligação deve apresentar um dipolo elétrico que mude na mesma frequência da radiação que está sendo introduzida. O dipolo elétrico oscilante da ligação pode, então, acoplar-se com o campo eletromagnético da radiação incidente, que varia de forma senoidal. Assim, uma ligação simétrica que tenha grupos idênticos ou praticamente idênticos em cada ponta não absorverá no infravermelho (BARBOSA et al., 2008).

Atualmente os equipamentos com dispositivos computacionais equipados com interferograma e Transformada de Fourier, permitem espectros mais preciso e mais rápidos podendo ajustar com diferentes métodos de registros de espectros. Os espectros podem ser obtidos através de três técnicas operacionais: Transmitância, Reflectância Difusa (RD) e Reflectância Total Atenuada (ATR). No caso da lignina, a faixa dos espectros no infravermelho médio está entre  $3500\text{ cm}^{-1}$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ . Nesse contexto, Lin & Dence (1992)

descrevem sucintamente as absorções de grupos funcionais e ligações em lignina assim como substâncias correlatas e madeira de forma geral.

## 2.6. Espectroscopia de RMN de $^{13}\text{C}$

A Ressonância Magnética é uma das técnicas espectroscópicas mais importante da química orgânica. Ela é caracterizada por submeter um núcleo com spin a um campo magnético. Para isso deve-se observar que apenas os átomos com massa ou número atômico ímpares entram em ressonância. Assim o átomo de  $^{13}\text{C}$ , que como isótopo do  $^{12}\text{C}$  ocorre na natureza apenas com a abundância de 1,1 %. Isso significa que em comparação com o hidrogênio seu campo magnético deve ser 4 vezes maior para registrar sua ocorrência, por saber que a constante magnetogírica do carbono é 4 vezes menor do que a do hidrogênio. Os estados energéticos dos spins do  $^{13}\text{C}$  é  $+1/2$  e  $-1/2$ , em um campo magnético sendo o primeiro alinhado ao campo e o segundo oposto ao campo magnético externo (PAVIA et al., 2010). No esquema abaixo pode de forma simplificada entender mecanismo de absorção de energia dos spins do átomo de  $^{13}\text{C}$  em um campo magnético  $M_0$  (Figura 8). Atualmente os espectrômetros são conhecidos como RMN-FT pulsados, que facilita a absorção, tendo em vista que a transformada de Fourier tem sido utilizado graças a sofisticação dos softwares computacionais.



**Figura 10.** Estado energético de um núcleo de hidrogênio na ausência e presença de um campo magnético externo sob um campo magnético os núcleos de  $^{13}\text{C}$  precessam nas suas respectivas fases de spin  $+1/2$  e  $-1/2$  (PAVIA et al., 2010).

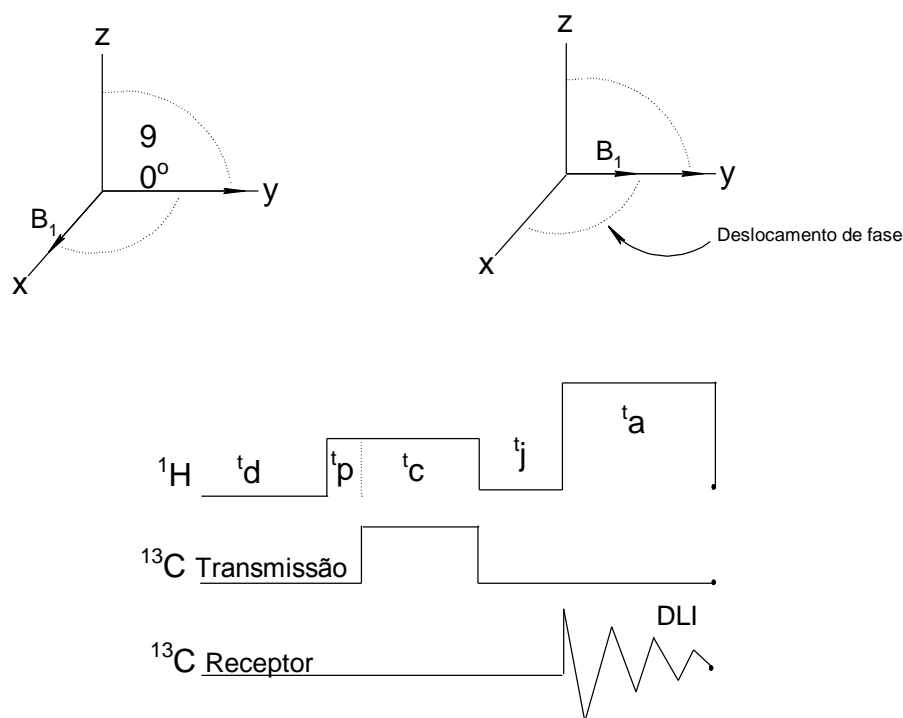
A ressonância de  $^{13}\text{C}$  atualmente se apresenta com várias tecnologias de obtenção de espectros. Essas tecnologias levam a espectros unidimensionais desacoplados e DEPT, assim como espectros bidimensionais, como os espectros nonoacoplados e heteroacoplados, como HETCOR- (Correlação de Deslocamento Químico Heteronuclear, HMQC e HSQC-Correlação Heteronuclear de Múltiplos Quanta e Correlação Heteronuclear de Único Quantum respectivamente), entre outras técnicas.

Entretanto tais ferramentas se aplicam em espectros registrados de amostras no estado líquido, comuns para substâncias de baixa massa molecular com solubilidade ótima em solventes principalmente orgânicos neutros e na maioria deuterados. Neste caso, a maioria de substâncias encaradas como extrativos são aptas para registro espectral utilizando solvente, o que para materiais insolúveis como a madeira torna-se difícil o registro dos espectros. Com o advento da técnica CP/MAS (Polarização Cruzada e Ângulo Mágico de Spin) foram criadas condições satisfatórias para análise de madeiras, lignina, celulose, e outros materiais de interesse.

### 2.6.1. Polarização cruzada

A polarização cruzada pode ser alcançada por sequência de pulsos interrompida para hidrogênio que permite a transferência de magnetização de um núcleo mais abundante como o

de hidrogênio para um núcleo mais escasso como no caso do  $^{13}\text{C}$ , sem o qual a relação sinal ruído não permitiria a observação dos sinais, influenciando no tempo de decaimento (T1), ou seja, transferência. (KOLODZIEJSKI & KLINOWSKI, 2002). Uma sequência como a descrita na Figura 9 pode ser interpretada como sequências de pulsos de modo a manter o travamento de spin do hidrogênio durante a transferência de magnetização, isso acontece enquanto a magnetização do próton permanece com spin travado e um segundo transmissor de radio frequência é ligado na frequência do  $^{13}\text{C}$  por um tempo de contato  $t_c$ .



**Figura 11.** Acima o travamento de spin (spin locking) no sistema coordenada rotatório e abaixo sequência geral de pulsos para RMN CP/MAS (LIN & DENCE, 1992) .

Nota:  $t_d$ -tempo de atraso de pulso;  $t_p$ -tempo para rearranjo da magnetização;  $t_i$ -tempo com transmissor desligado;  $t_a$ -tempo de magnetização do próton-Traço vertical significa intensidade da Radio Frequencia (RF) e a linha horizontal tempo do pulso, DLI-Decaimento livre de indução.

## 2.6.2 MAS-Ângulo Mágico de Spin

A diferença entre uma amostra sólida e uma líquida depende da extensão e do tipo de movimento molecular o que vai interferir em diversas interações entre spins. Supondo dois spins de prótons em fase onde cada um experimenta o campo magnético do outro isso gera um acoplamento direto conhecido como acoplamento dipolo-dipolo.

Uma equação simplificada representando este fenômeno está descrita a seguir, onde:

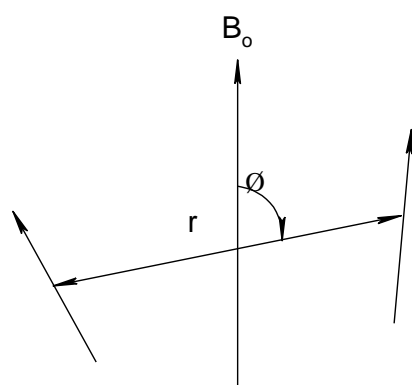
$$3 \cos^2\theta - 1 = 0$$

$$\cos \theta = (1/2)^{1/2}$$

$$\theta = 54.74^\circ = 54^\circ 44'$$

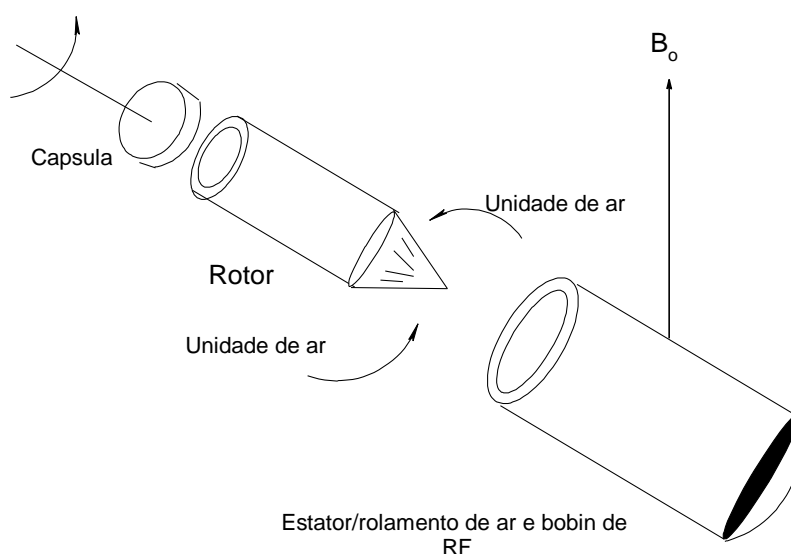
Este ângulo é então chamado ângulo mágico que permite as amostras anisotrópicas como os materiais lignocelulósico a terem seus espectros registrados numa relação boa entre sinal e ruído. A figura seguinte define melhor a equação supracitada onde ocorre a interação dipolar internuclear (Figura 10).





**Figura 12.** Acima o travamento de spin (spin locking) no sistema coordenada rotatório e abaixo sequência geral de pulsos para RMN CP/MAS Interação dipolo-dipolo de um par de spin (PAVIA et al., 2010).

A rotação do tubo é uma técnica que melhora os sinais restringindo o aparecimento de sinais de bandas laterais de spin. Isso permite aproximar uma amostra anisotrópica das amostras isotrópicas. A Figura 11 detalha um rotor de ângulo mágico.

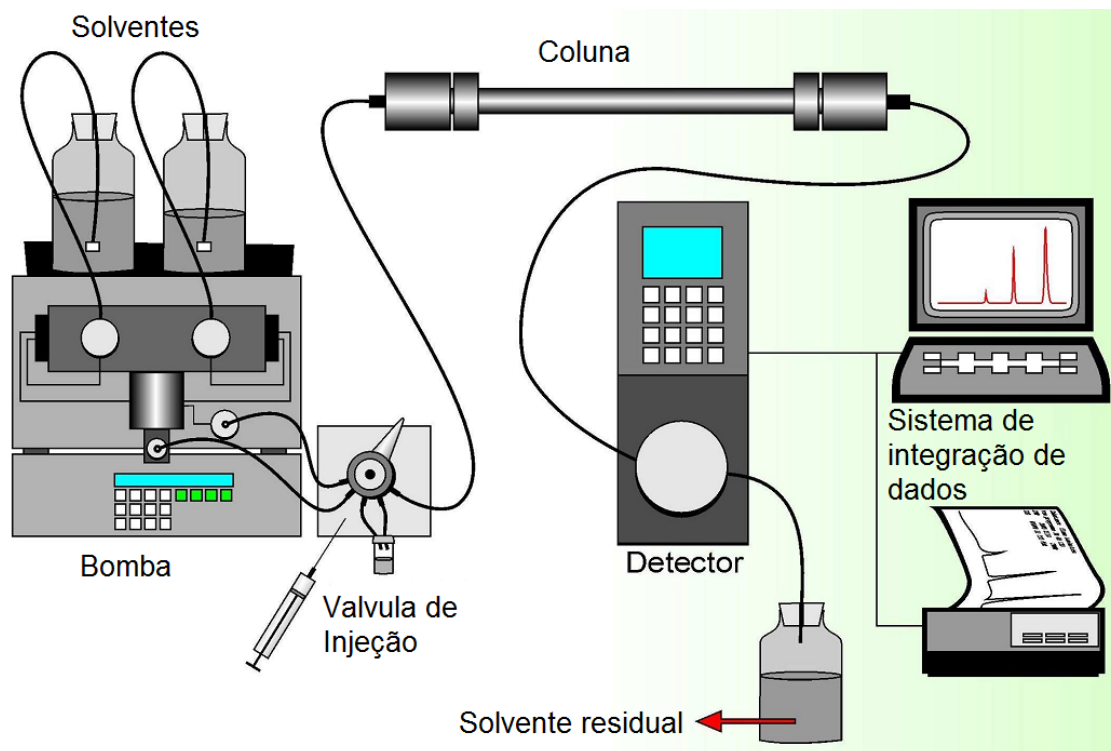


**Figura 13.** Diagrama do girador do ângulo mágico.

## 2.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica cromatográfica que permite separação e, se combinada com outras técnicas, a identificação de diversos tipos de substâncias. Para cada tipo de substância analisada, devido a propriedades muitas vezes diferentes, utiliza-se um tipo diferente de técnica. As técnicas em CLAE, assim como em todos os outros tipos de cromatografia basea-se na diferença de polaridade entre as fases móvel e estacionária.

Um exemplo de sistema de cromatografia líquida de alta eficiência se encontra conforme Figura 14.



**Figura 14.** Esquema de um sistema de CLAE (RANKE, 2007).

A cromatografia como método analítico somente surgiu no início do século passado, podendo considerar o ano de 1900 como marco inicial das análises cromatográficas.

Desde a época de David Talbott Day e Mikhail Tswett (pioneiros da técnica) muito processos foram sendo criados, outros reformulados, outros tendo seu princípio de funcionamento aperfeiçoado.

Dentre as diversas modalidades de CLAE, os métodos mais difundidos por sua aplicabilidade são as de fase normal e as de fase reversa.

O sistema de cromatografia em fase reversa consiste de uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, enquanto que em sistemas de fase normal ocorre o inverso. Isso permite uso de fases menos tóxicas e de menor custo, como metanol e água; tipos diversos de fases estacionárias; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; fácil emprego de eluição por gradiente; maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção (COLLINS et al., 2002). Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas em um fluxo líquido (SILVA, 2007).

Basicamente, um sistema de CLAE é constituído por cromatógrafo composto de bomba, coluna cromatográfica, detector e registrador (DEGANI et al., 1998; PERES, 2002).

Na CLAE a fase móvel deve ser um solvente que dissolva a amostra sem que qualquer interação química ocorra entre ambas. A fase estacionária precisa ser compatível com o detector, tendo polaridade adequada para permitir separação adequada dos componentes da amostra. A coluna cromatográfica, por sua vez, deve ser confeccionada de material inerte, resistente altas pressões. Os detectores, por sua vez, devem apresentar ampla faixa de aplicação, por exemplo, detectores espectrais (PERES, 2002).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

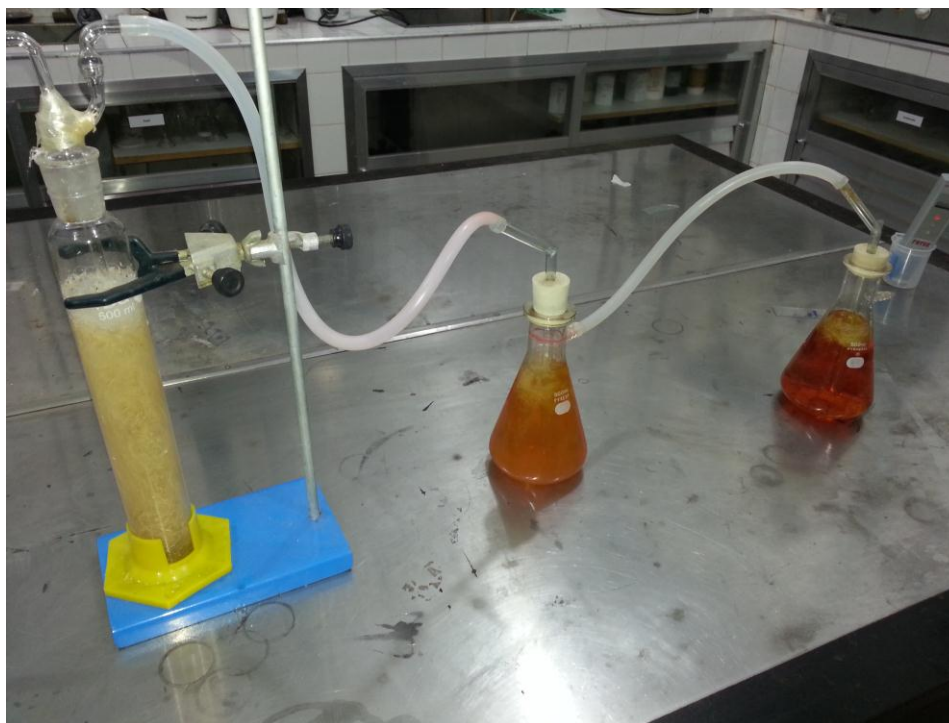
Para realização das análises, foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) da variedade rb867515, doado pelo Campus Dr. Leonel Miranda da UFRRJ. As análises foram conduzidas no laboratório de Química da Madeira do Instituto de Florestas e na Central de Ressonância Magnética do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, ambos da UFRRJ.

#### 3.1 Preparo das amostras livres de extrativo

A amostra foi pré-tratada com água quente para eliminar o excesso de açúcar de forma a garantir sua integridade química e morfologia durante o armazenamento. Para preparo das amostras livres de extrativos, a amostra foi moída e peneirada, sendo utilizado material retido em peneira de 20 mesh (SLUITER et al., 2008). Este material foi então submetido à extração em aparelho tipo sohxlet por 24h com etanol e depois com água bidesionizada quente. Nesta extração, foi usado etanol de grau PA. A extração foi realizada de acordo com Sluiter (2008). Em seguida, este material foi extraído utilizando água bidesionizada quente em um Becher de 500 ml. A cada hora, foi realizada troca de água, como forma de eliminar os açúcares liberados no meio.

#### 3.2 Ozonólise

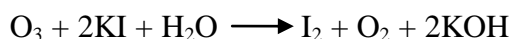
O material pré-extraído passou por um teste de absorção de água para definir o melhor tempo de maior absorção de água, em seguida o material foi então colocado em um ozonizador adaptado de um coluna de vidro, conforme mostrado na Figura 15.



**Figura 15.** Reação de ozonólise conduzida em uma coluna de vidro.

Nela foi introduzida o ozônio produzido pelo ozonizador da marca ClearWater, modelo PRO 400 (Figura 16). O ozônio em excesso foi eliminado em uma solução de KI durante todo o processo de ozonólise (Figura 15). A produção de ozônio foi calculada conforme American Water Works Association (1985). Este método consiste em uma série de cálculos baseados em iodometria, isto é, quantificação indireta de iodo presente em uma solução.

Adiciona-se na coluna de ozonização um volume de 500 ml de solução de iodeto de potássio 2% (KI) o ozônio tem a capacidade de liberar o iodo, onde:



No processo de ozonização a solução de KI, rapidamente, torna-se alcalina. Após a ozonização, a solução de KI ozonizada é acidificada com ácido sulfúrico 1N. Através da acidificação, faz-se com que o iodo seja liberado. O iodo liberado é titulado com solução padrão de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) usando solução de amido como indicador. Na coluna lavadora de gases contendo 500 ml de solução de KI 2% (KI) o ozônio é borbulhado por 5 minutos. Logo após, coleta-se 200 ml de solução de KI ozonizada da coluna de ozonização, fixando-os com 4 ml de solução de ácido sulfúrico 1N; Após fixação, titulou-se a amostra da coluna de ozonização com  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,0243N, até que ocorresse mudança de coloração para amarelo-palha; A partir daí, adicionou-se 2ml de solução de amido na amostra da coluna de ozonização, tornando a amostra azulada. A mudança de coloração foi o indicativo que houve iodo reduzido na solução. Adicionou-se  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,0243N até que a cor azulada desaparecesse por completo, tornando a solução transparente. Tomou-se o volume total de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,0243N gasto.

Obtendo-se todos estes dados, foi realizado o cálculo para obtenção da produtividade do ozonizador. A fórmula utilizada foi:

$$P_{\text{Coluna}} = \frac{N_t \times \Delta_{V_t} \times V_{\text{KI}} \times 24000 \times 60}{V_{\text{amostra}} \times t \times 1000}$$

Onde:

$P_{\text{coluna}}$  = produção de ozônio dentro da coluna de ozonização, (g O<sub>3</sub>/h);

$N_t$  = normalidade do tiosulfato de sódio, (0,0243);

$\Delta_{V_t}$  = vf - vb

vf = volume de tiosulfato consumido na titulação da amostra (ml);

vb = volume de tiosulfato consumido na titulação do branco (ml);

$V_{\text{KI}}$  = volume da solução de iodeto de potássio 2% (KI) ozonizada, (500 ml);

$V_{\text{amostra}}$  = volume da amostra coletada para a titulação, (200 mL);

t = tempo de aplicação do ozônio na coluna de ozonização, (5 minutos);

24000, 60, 1000 = fatores de conversão para obtenção da produção em g/h.



**Figura 16.** Ozonizador utilizado no experimento.

As reações de ozonólise foram realizadas com o material (bagaço de cana) em condições de pH 4.0, 6.5 e 8.0 por tempo de 2, 4 e 6 h cada, de modo que foram realizados 9 tratamentos. Inicialmente o material foi submetido à moagem em um moinho de facas do tipo Willey e em seguida homogeneizado. Para controle do pH, foram utilizadas soluções de NaOH 1% e ácido acético 1% v/m, respectivamente, para redução do tamanho, e em seguida, em moinho de bolas, para completa pulverização do material. Para as análises subsequentes tanto o material controle quanto os produtos de ozonólises foram submetidos a moagem em um moinho de bolas giratório.

### ***3.3 Analise por RMN <sup>13</sup>C***

O pó do bagaço de cana com extrativo e livre de extrativos foram moídos em um moinho de bola giratório. Com o material pulverizado foram feitas análises por ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C) CP/MAS no estado sólido. O aparelho utilizado foi um Bruker 400 MHz (BRUKE AVANCE 2)(Figura 17), dotado de rotor de 4 mm. A técnica utilizada foi CP/MAS, giro de 8000 Hz com polarização cruzada.



**Figura 17.** Espectrômetro de RMN de Hidrogênio e de  $^{13}\text{C}$ . Ao fundo, rotor eletromagnético, usado em conjunto com o aparelho.

### ***3.4. Análise espectroscópica no infravermelho***

Do mesmo material (moído em moinho de bolas), e tratados com ozônio em diferentes condições foi utilizado 1 mg, em seguida homogeneizado em 100 mg de Brometo de potássio (KBr). Com esse material foram confeccionadas pastilhas de KBr para registros dos espectros no espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier, em um espectrômetro (VARIAN 640-IR FT-IR spectrometer). O aparelho (Figura 18) operou em modo de transmitância com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , 128 varredura, amplitude espectral de  $4000\text{ à }400\text{ cm}^{-1}$ , atenuação 7. A relação comparativa dos sinais dos espectros em  $1634$ ,  $1600$ ,  $1250$  e  $1330\text{ cm}^{-1}$  foi feita pela razão entre a intensidade do sinal alvo e a intensidade do sinal em  $1500\text{ cm}^{-1}$ , utilizado como sinal padrão por não sofrer alteração da intensidade causado pelos substituintes do anel aromático.





**Figura 18.** Espectrômetro de infravermelho acoplado a um microscópio, responsável pelo registro dos espectros.

### ***3.5. Isolamento do ácido *p*-cumárico das amostras lignocelulósicas***

Para identificar a presença de ácido *p*-cumárico nas amostras lignocelulósicas, foi utilizada a metodologia conforme Deschamps & Ramos (2012). Foi utilizado 50 mg de bagaço de cana livre de extrativos e açúcares e tratado com NaOH 1% e com material oriundo de ozonólise (TAPPI, 1979). A partir dos materiais lignocelulósicos anteriormente descritos cada um foi extraído com 5 ml de NaOH 1M em um tubo de ensaio por 24 horas e encubado a 20°C. Em seguida, o material foi filtrado com auxílio de um funil de placa sinterizada e lavado com água bidesionizada, sendo o filtrado acidificado para o pH 2,5 com adição de uma solução de HCl (1:1). O volume final foi completado com água até atingir 10 ml. Após uma noite na incubadora o material foi centrifugado (13.000 rpm) por 5 minutos, sendo deixado em congelador até o momento da análise. Para as injeções no cromatógrafo, as amostras foram descongeladas e novamente centrifugadas sob as mesmas condições descritas anteriormente.

### ***3.6. Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE)***

Para análise por CLAE, utilizou-se uma amostra de ácido *p*-cumárico (marca Fluka) como padrão, através do qual foi realizada uma curva de calibração. Este foi dissolvido em metanol para preparo de solução estoque na concentração de 100 µg/ml, que por sua vez, foi diluída em cinco concentrações diferentes para a montagem da curva de calibração.

O cromatógrafo Shimadzu HPLC, (Figura 19) é composto por duas bombas LC-20A, DAD (detector de arranjo de diodos) SPD-M20A (Shimadzu), forno da coluna CTO-20A (Shimadzu) e sistema da controladora DGU-20A<sub>3</sub>. A esse sistema foi acoplada uma coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel foi composta por metanol-ácido fórmico 0,8% e

água na proporção de 6:4, eluição isocrática. A razão de fluxo foi mantida em 1mL/min e o volume de injeção 20µL. O comprimento de onda para detecção foi fixado em 326 nm e a temperatura da coluna foi mantida em 35°C.



**Figura 19.** Sistema de CLAE da marca shimadzu.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Produtividade do ozonizador

Para o cálculo da produtividade de ozônio, foram realizadas duas repetições. Os dados obtidos foram inclusos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Produção de ozônio em mg/h:

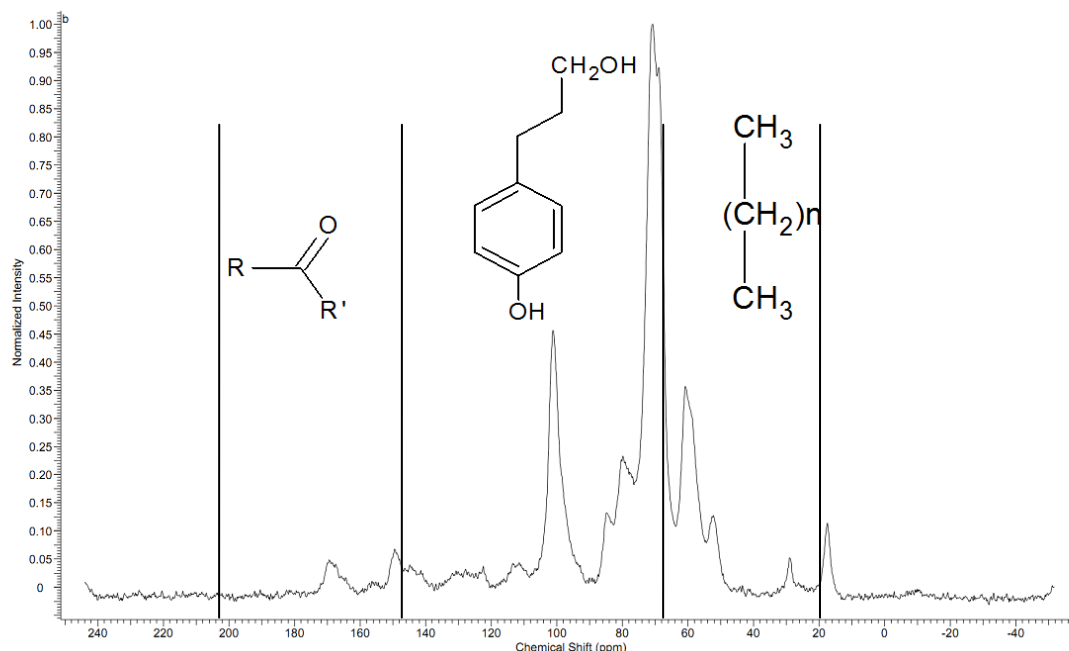
	Primeira titulação $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Segunda Titulação $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Diferença	$P_{\text{coluna}}$
<b>A</b>	30.24	4.03	26.21	<b>0.41</b>
<b>B</b>	31.44	5.12	26.32	<b>0.41</b>

### 4.2. RMN $^{13}\text{C}$ CP/MAS

Os espectros das amostras do material lignocelulósico assumem características peculiares e de fácil reconhecimento em decorrência da sua composição múltipla formada pela celulose, hemicelulose e lignina. Após pré-tratamento com solvente (etanol) as amostras foram submetidas ao RMN  $^{13}\text{C}$ .



Os espectros CP/MAS do material lignocelulósico com e sem extrativos e submetidos à ozonólise foram interpretados segundo as regiões entre 0 e 200 ppm para facilitar as análises comparativa (Figura 20).

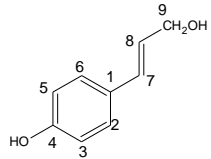
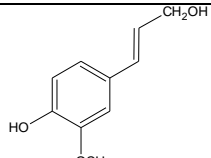
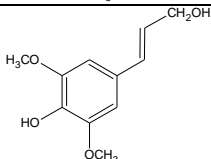
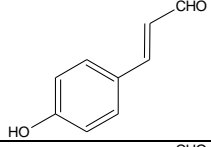
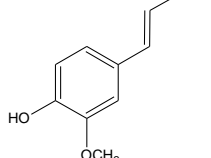
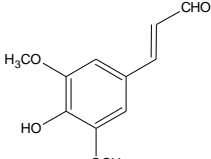
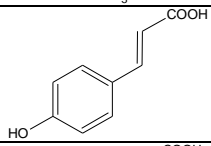
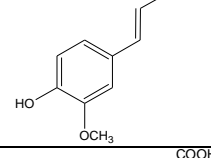
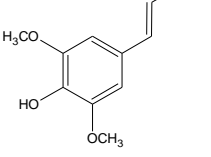


**Figura 20.** Espectro CP/MAS do bagaço de cana com extrativos e com delimitação da região de deslocamento químico.

Na região entre 0 a 50 ppm foi possível observar provável pico característico de suberina que é comum em monocotiledoneas com ocorrência entre 30 e 33 ppm (característico de carbonos metilênicos em grande quantidade), em 110-160 ppm (aromáticos e alcenos), e 172 ppm (carboxílicos). O sinal em torno de 50-56 ppm e entre 105 e 160 ppm, são característicos de presença de ácido ferúlico e/ou de ácido *p*-cumárico também encontrados na parede celular. Tais atribuições mostram que nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  CP/MAS do bagaço de cana-de-açúcar do material não extraído apresenta sinais equivalentes, principalmente em 29-33 ppm relativamente intenso, revelando a presença de carbonos  $(-\text{CH}-)_n$ , característico da cadeia alifática das suberinas. Os espectros de RMN CP/MAS do bagaço de cana-de-açúcar pré-extraído com etanol/água não apresentaram sinais característicos de suberina, mostrando se tratar de uma composição baseada na celulose, hemicelulose e lignina.

Os deslocamentos químicos dos carbonos da lignina são relativamente complexos, entretanto, pode-se atribuir alguns sinais de espectros de alguns modelos utilizados para determinação estrutural da lignina (Figura 21), principalmente dos monolignóis como os álcoois *p*-hidroxinamfílicos, *p*-hidroxicinamaldeídos e ácidos *p*-hidroxicinâmicos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Deslocamento químico calculado de carbonos de precursores da lignina.

ESTRUTURAS FENILPROPANOÍDICAS	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
	128,82	127,81	115,70	157,03	115,70	128,81	129,77	127,07	62,81
	129,31	109,38	147,57	146,26	115,23	120,05	130,20	127,19	62,92
	128,20	103,93	147,95	135,50	147,95	103,94	130,43	127,58	56,22
	126,04	131,14	116,36	160,87	116,36	131,14	153,57	126,06	193,80
	126,60	111	150,01	147,99	115,65	124,19	153,63	126,36	193,75
	125,39	106,61	148,16	139,21	148,16	106,61	125,39	126,71	193,59
	126,10	130,44	116,19	160,01	116,19	130,44	145,32	115,50	168,58
	126,31	111,25	148,17	149,40	115,73	123,07	145,05	115,63	168,24
	125,39	106,44	148,45	138,74	148,45	106,44	145,86	116,18	168,62

Os deslocamentos químicos sofrem alterações em decorrência das ligações formadas entre as unidades estruturais do tipo condensadas e eterificadas, Isso ocorre em diferentes grupos botânicos, assim como em células, camadas celulares e entre camadas das lamelas.

Como exemplo de estrutura condensadas estão as estruturas com ligações constituídas fortemente entre Carbono-Carbono, enquanto as ligações eterificadas envolvem a participação

de um átomos de oxigênio que conectam unidades ou lignóis terminais.

Os espectros desses materiais ozonizados foram submetidos a espectroscopia de  $^{13}\text{C}$  CP/MAS. O espectro da amostra natural (não extraída) mostrou algumas diferenças esperadas por se tratar de um material com várias substâncias, além dos componentes estruturais da parede celular, interferindo na precisão da interpretação, embora aparentemente pouca diferença foi observada na região aromática e na região alifática entre 20 a 40 ppm. O sinal em torno de 170 ppm também mostrou-se acrescido em intensidade talvez por apresentar várias substâncias que contém éster alifático, embora a modalidade da técnica utilizada no registro do espectro não permita avaliação quantitativa. No espectro do material controle (livre de extrato etanólico) pode se observar o perfil do sinal entre 160 e 180 ppm, segundo Lin & Dence (1992), as absorções em 163-180 ppm (grupo carboxílico de lignina), 173 ppm ( $\text{CO}_2$ ) em grupos acetílicos de hemiceluloses ou 165-167 ppm de ( $\text{C}=\text{O}$ ) em Ar- $\text{COOH}$ , ou 162 ppm (C-4) em Ar- $\text{COOH}$  e 163-180 ppm (grupo carboxílico de lignina). Também foi observado que este material possui lignina com S3/5e, G4e mais do que S3/5f, G3 em 152-142 ppm (LIN & DENCE, 1992; WIKBERG, 2004). A absorção de éster alifático cai em campo mais baixo do que em ésteres ou ácidos conjugados como é o caso do ácido *p*-cumárico. Há percepção de que o tratamento com ozônio durante 2 horas pouco se alterou nas condições de análise, ocorrendo uma mudança mais expressiva no tratamento de 6 horas. Os sinais entre 140 a 172 ppm se apresentam com melhor definição espectral. Outras mudanças não foram percebidas, até mesmo entre a celulose e hemicelulose (Anexo 7.3.1 - 7.3.11.)

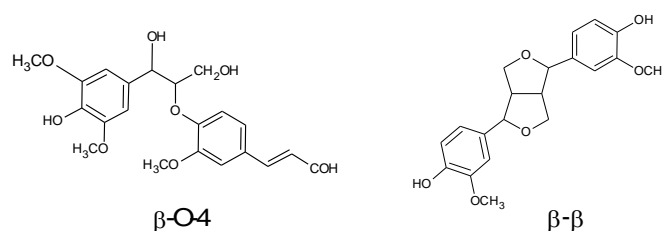
As amostras submetidas ao tratamento de 6 h em meio alcalino revelaram modificações nos sinais entre 172-152 ppm, mostrando a supressão de um ombro que justifica presença de ácido cumárico. Foi observado também o desaparecimento de um ombro em 168 ppm. Outras modificações foram observadas em 148 ppm (S3/5f, G3)

A Tabela 3 apresenta deslocamentos químicos CP/MAS das amostras tratadas em meio alcalino e em meio ácido.

**Tabela 3.** Atribuição dos deslocamentos químicos (LIN & DENCE 1992; RESENDE et al. 2011; WIKBERG, 2004).

Deslocamento químico em ppm	Atribuição	Amostra com extrato	Amostra sem extrato
173	COO- de grupo acetílico de hemiceluloses	Presente	Presente
165-167	C=O alfa em Ar- COOH	Ausente	Ausente
163-180	Grupo carboxílico de lignina	Não observado	Não observado
162	C-4 em Ar-COOH	Ausente	Ausente
153	S 3/5e, G 4e	Presente	Presente
148	S 3/5f, G 3	Presente	Presente
146	G 4f	Presente	Presente
136	S 1/4e, G1e	Presente	Presente
133	S 1/4f, G1f	Presente	Presente
120	G 6	Presente	Presente
116	G 5	Presente	Presente
112	G 2	Presente	Presente
105	C-1 de celulose	Presente	Presente
102	C-1 de hemiceluloses	Presente	Presente
89	C-4 de celulose cristalina	Presente	Presente
84	C-4 celulose amorfa	Presente	Presente
72-75	C-2/C-3/C-5 de celulose	Presente	Presente
65	C-6 de cellulose cristalina	Presente	Presente
62	C-6 de cellulose amorfa	Presente	Presente
56	OCH <sub>3</sub> de lignina	Presente	Presente
29-33	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> - suberina	Presente	Ausente
21	-CH <sub>3</sub> de grupo acetílico de hemicelulose	Presente	Ausente

O formato do sinal entre 120 e 160 ppm, atribuído S3/5e, G4e/S 3/5f, G3/G4f , e mostrou que o sinal com centro em 150 ppm e 130 ppm são relacionados as essas atribuições. A intensidade maior do sinal em 56 ppm revelou a condição de cadeia lateral do tipo S3/5e, G4 e que é mais intensa em todos espectros, entretanto nos tratamentos alcalino e ácido nos pH 8 e 4, respectivamente foram modificados (LIN & DENCE, 1992).

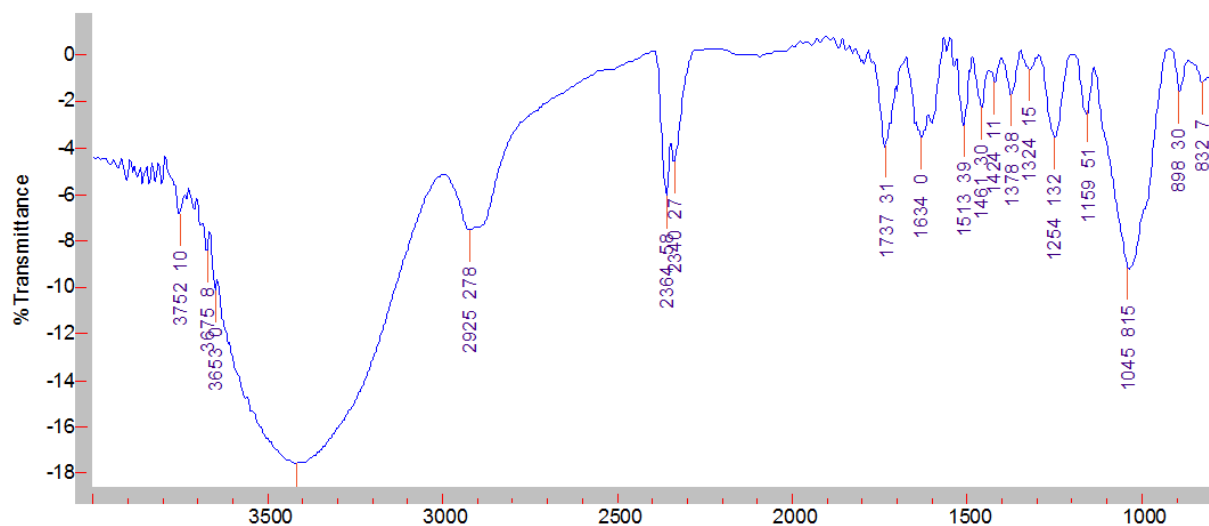


**Figura 21.** Exemplos de estrutura etérica (éter  $\beta$ -alrífica) e estrutura condensada furânica-furânica.

### 4.3. Infravermelho

Os espectros no infravermelho registrados das amostras controle (Figura 22) e tratadas com ozônio foram registrados no modo transmitância, entretanto os resultados foram significativos mesmo se tratando de madeira com relação às alterações observadas nos tratamentos. O espectro da amostra controle revelou sinais característicos de presença de hemicelulose, celulose e principalmente lignina, foco da análise. Essas absorções foram

descritas segundo Lin e Dence (1992). As intensidades relativas comparativas entre sinais foram baseados na razão da intensidade do sinal alvo pela intensidade do sinal em  $1500\text{ cm}^{-1}$  de cada espectro. Os espectros foram todos normalizados. A Tabela 4 mostra as absorções relativas a amostra controle.



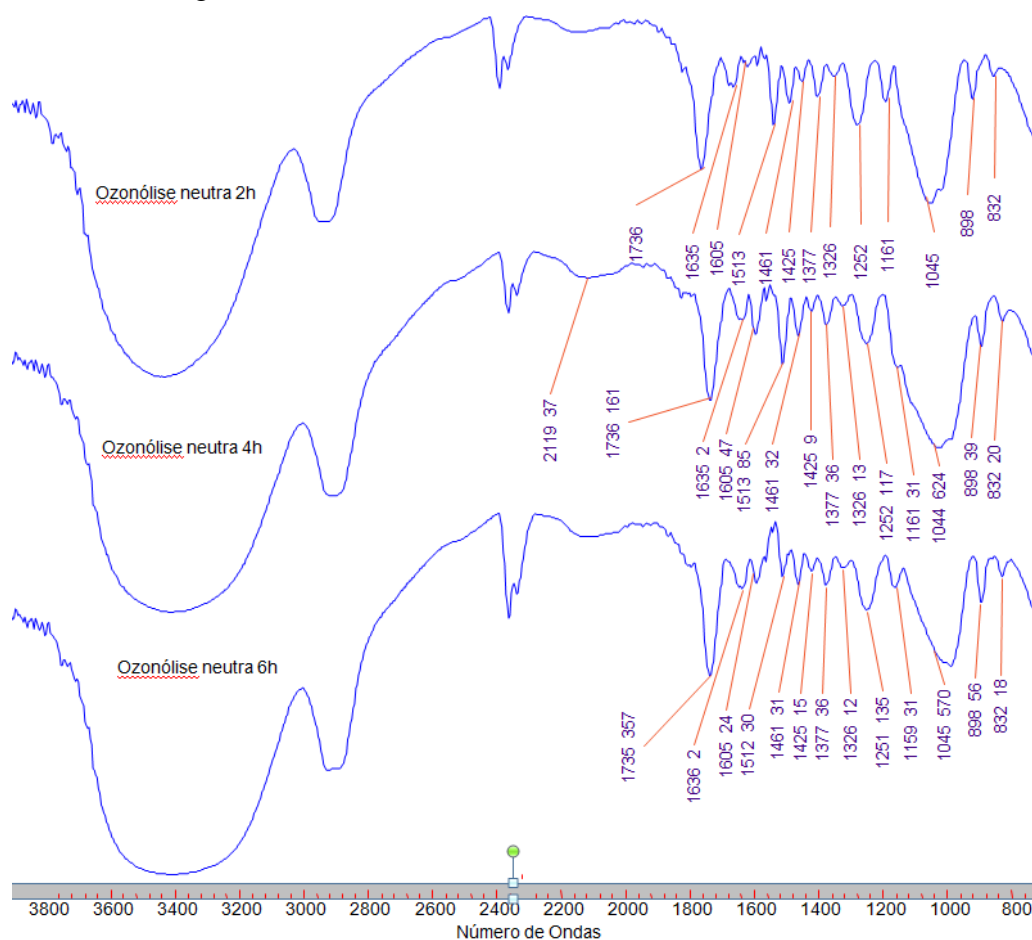
**Figura 22.** Espectro no infravermelho da amostra controle.

**Tabela 4.** Atribuição dos principais sinais da lignina do espectro no infravermelho (amostra controle (LIN & DENCE, 1992)).

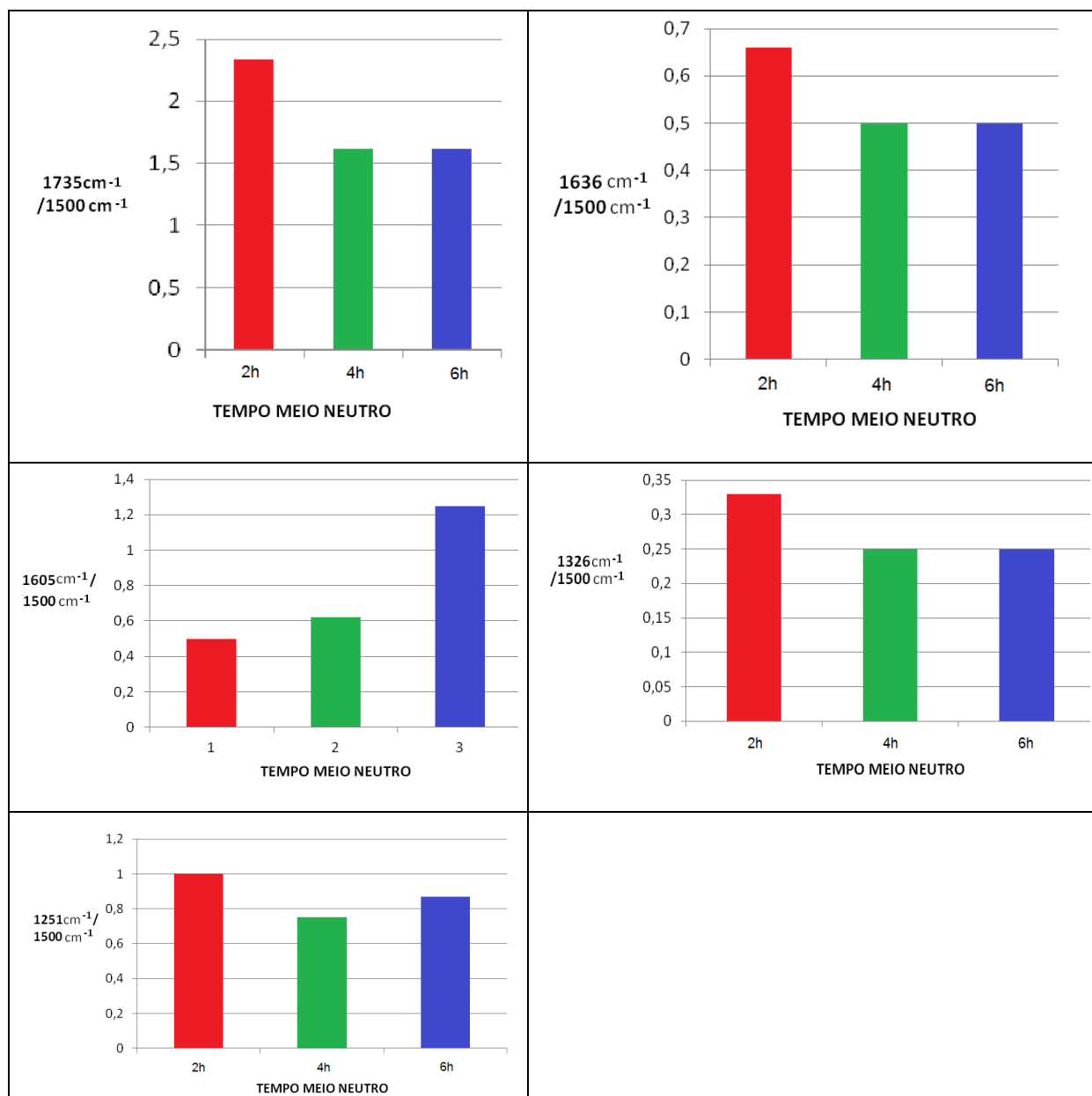
$\text{cm}^{-1}$	Atribuições
3420	Estiramento de O-H
2925	Estiramento de C-H de grupos metílicos e metilênicos
1737	Estiramento de C=O de grupos éster de carboidratos
1634	Estiramento de C=O em cetonas ou aldeídos conjugados
1575	Vibração do esqueleto aromático com estiramento de C=O, S > G, G condensado > eterificado.
1513	Vibração do anel aromático
1461	Deformação assimétrica de $-\text{CH}_3$ e $\text{CH}_2$
1378	Estiramento de CH e $\text{CH}_3$ alifático exceto $\text{OCH}_3$
1324	Vibração do anel siringílico com contribuição do estiramento de C=O de estrutura condensada
1254	Vibração do anel guaiacílico com contribuição do estiramento de C=O
1159	Estiramento de C=O de éster conjugado típico de lignina HGS

Foi observado que a reação foi eficaz nas últimas horas de tratamento neutro. Os espectros revelaram as transformações que levaram as mudanças na estrutura da lignina após, 2, 4 e 6 h tornando-a provavelmente uma lignina residual de estrutura mais condensada. O sinal em  $1735\text{ cm}^{-1}$ , sinal residual correspondente a estiramento de  $\nu\text{C=O}$  de éster principalmente de hemicelulose e do ácido *p*-hidroxicinâmico mudou pouco nas primeiras duas horas de reação, porém nas 2 e 6 horas modificou bastante, tendo em vista que, em 4 e 6 horas o sinal residual reduziu intensamente, significando que grande parte foi degradada após ozonólise. O sinal em  $1634\text{ cm}^{-1}$  que corresponde ao estiramento de  $\nu\text{C=O}$  em cetonas ou

aldeídos conjugado, mudou intensamente somente nas duas últimas horas. O sinal em  $1604\text{ cm}^{-1}$  indicou que houve mudança na estrutura da lignina residual, sendo considerada mais condensada do que a lignina original após 4 e 6 horas de reação. O sinal em  $1356\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a respiração do anel siringílico, e o sinal em  $1256\text{ cm}^{-1}$  modificaram de intensidade em 2, 4 e 6 horas de reação, porém em 4 e 6 horas manteve-se o mesmo nível de intensidade de ambas os sinais, significando que a ozonólise em meio neutro após 2 e 6 horas manteve-se sem alteração no que diz respeito aos teores de metoxila residual. Em 2 horas houve uma perda pequena de metoxila tendo em vista maior intensidade do sinal. Portanto somente após 4 horas a reação foi significativa. A reação em 6 horas não foi significativamente diferente da reação em 4 horas (Figura 25).



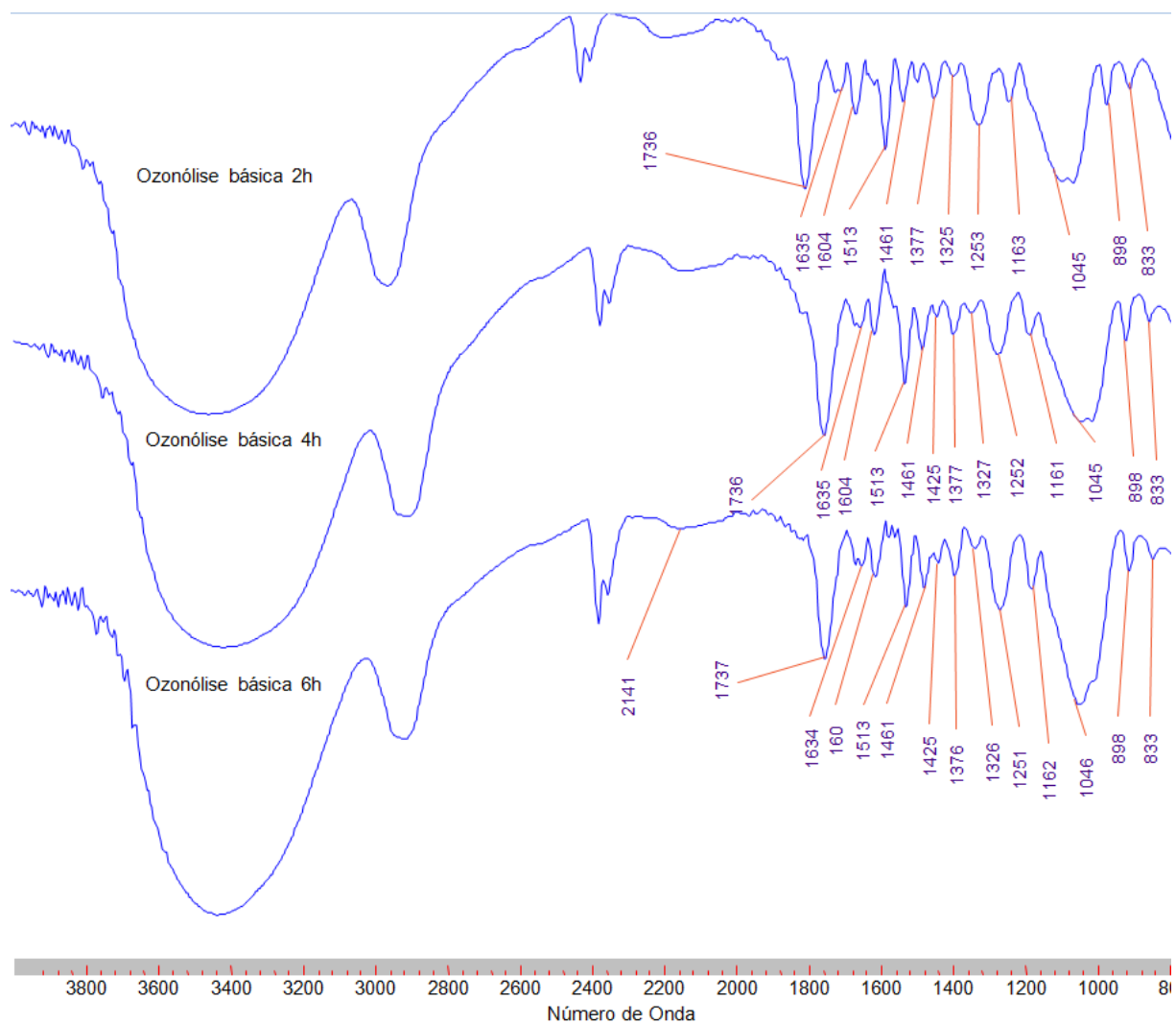
**Figura 23.** Espectros no infravermelho das amostras tratadas em meio neutro.



**Figura 24.** Valores relativos de intensidades dos sinais dos espectros das amostras tratadas em meio neutro.

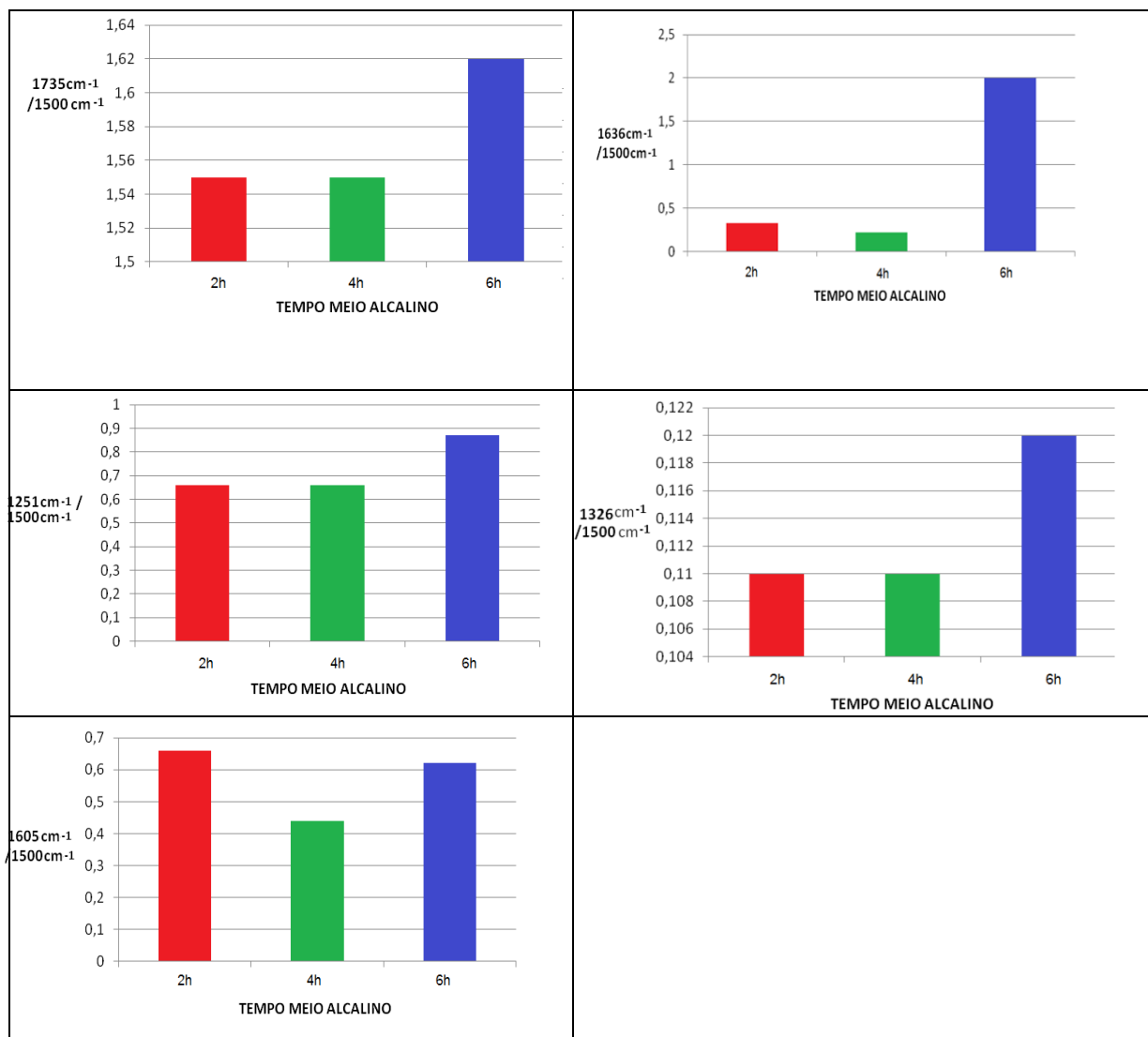
Ao contrário do tratamento neutro, a reação em meio básico foi significativa nas duas primeiras horas, observando que o sinal residual em  $1735\text{ cm}^{-1}$  teve sua intensidade bastante reduzida levando provavelmente a um conteúdo de grupamento éster a pequena concentração na biomassa após as primeiras horas de tratamento, e a uma intensidade mais alta em 6 horas de tratamento, a qual provavelmente conduziu a degradação da lignina principalmente destruindo a fração aromática. O sinal residual em  $1636\text{ cm}^{-1}$  que corresponde cetona e/ou aldeído conjugados também revelou uma diminuição substancial nas 4 horas iniciais do tratamento, enquanto em 6 horas esse mesmo sinal apresentou-se com alta intensidade revelando alta concentração. O sinal em  $1605\text{ cm}^{-1}$  apresentou-se variável em 2 horas, 4 horas e 6 horas,

mostrando que a lignina antes eterificada em 2 horas passou a ser condensada em 4 horas e voltou ser eterificada em 6 horas de tratamento. Em 2 e 4 horas o tratamento com ozônio evidenciou preferências por unidades siringílicas pelos sinais residuais menos intensos em  $1326\text{ cm}^{-1}$ , ao contrario de 6 horas onde o sinal mostrou-se bastante intenso. Em  $1251\text{ cm}^{-1}$  os sinais correspondentes a respiração do anel guaiacílico foi alterado para um intensidade menor nos tratamentos 2 e 4 horas e sensivelmente maior em 6 horas (Figura 26).



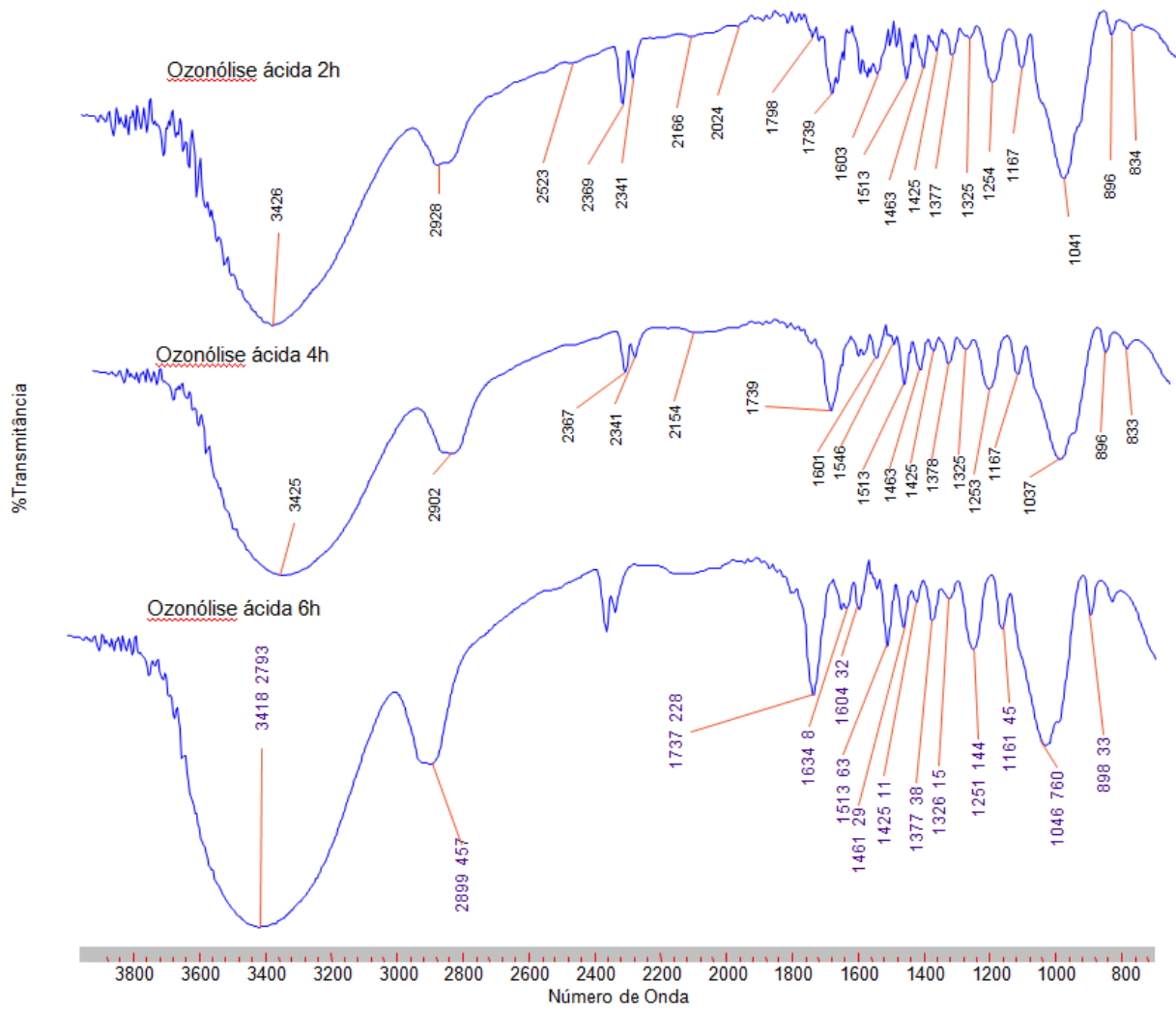
**Figura 25.** Espectros no infravermelho das amostras tratadas em meio básico.



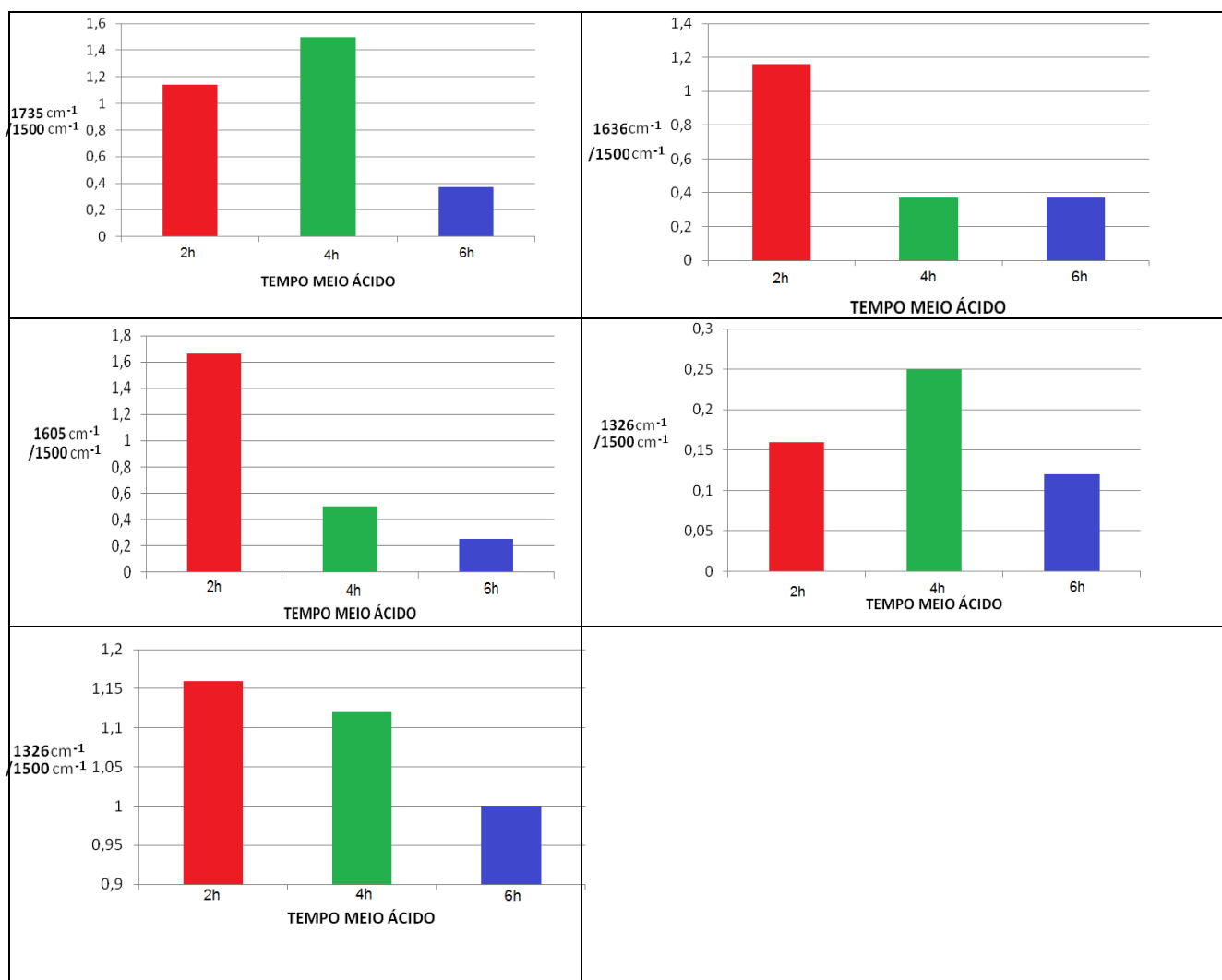


**Figura 26.** Valores relativos das intensidades dos sinais dos espectros das amostras tratadas em meio básico.

Em meio ácido a reação ozonólise com relação ao sinal residual em  $1735\text{ cm}^{-1}$  mostrou que em 2 e 4 horas houve perda de grupamento éster relativamente semelhantes e intensamente em 6 horas, enquanto da mesma forma do tratamento neutro a lignina tornou-se mais condensada, provavelmente liberando os terminais cumarílicos, evidenciados pelo sinal em  $1605\text{ cm}^{-1}$ . A perda de grupos éster conjugados e unidades estruturais com carbonilas cetônicas e aldeídicas foram afetadas fortemente a partir de 2 horas, mantendo-se constante também durante 6 horas. Houve também provável atuação do ozônio nas unidades siringílicas em 2, 4 e 6 horas, de forma alternada com base na absorção residual em  $1326\text{ cm}^{-1}$ , enquanto houve uma diminuição progressiva nas unidades guaicílicas no decorrer do tempo, chegando ao mínimo após 6 horas de tratamento observado pelo residual sinal em  $1251\text{ cm}^{-1}$ .



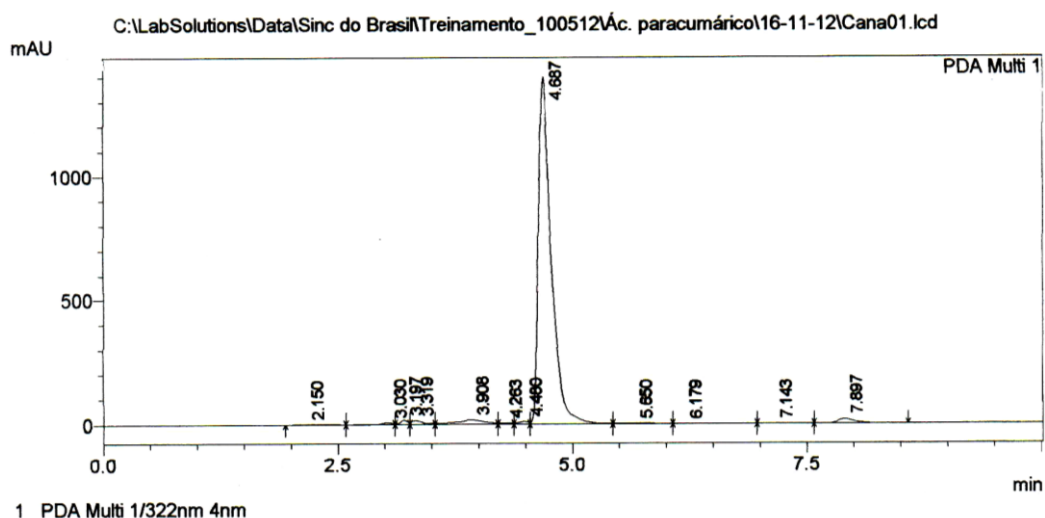
**Figura 27.** Espectros no infravermelho das amostras tratadas em meio ácido.



**Figura 29.** Valores relativos de intensidades dos sinais dos espectros das amostras tratadas em meio ácido.

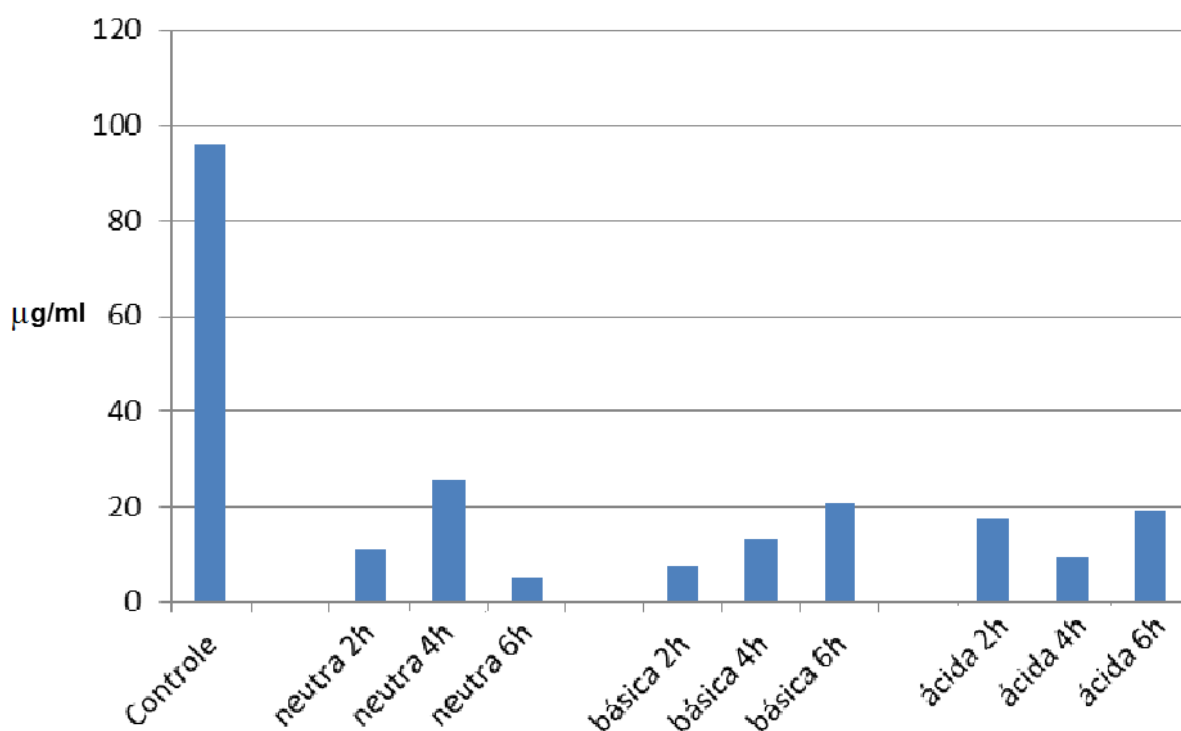
#### 4.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A determinação do ácido *p*-cumárico foi realizada através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As comparações foram feitas com base na determinação da concentração do ácido *p*-cumárico da amostra controle que revelou um valor de 96,91 mg/ml (Figura 30)



**Figura 30.** Cromatograma da amostra controle do bagaço de cana

Os resultados levaram a observar algumas mudanças nos cromatogramas de cada amostra tratada com ozônio. Utilizando-se o método que emprega, metanol-água ácido fórmico (GEETHA et al., 2011), foi possível realizar uma análise quantitativa, através do uso de um padrão do ácido *p*-cumárico (Fluka) com tempo de retenção de 4,59 min. Vale destacar a queda brusca da concentração original de 96  $\mu\text{g/ml}$  da amostra controle em relação às concentrações obtidas após os tratamentos, respectivamente, em condição neutra 6h (4,9  $\mu\text{g/ml}$ ), básica 2h (7.5  $\mu\text{g/ml}$ ) e ácida 4h (9.5  $\mu\text{g/ml}$ )(Figura 31). Foi observado nos cromatogramas das amostras tratadas com ozônio o surgimento de novos picos revelando a formação de subprodutos em decorrência de reações secundárias durante o processo de ozonólise o que coaduna com os resultados experimentais de Andreozzi (1994), confirmando a formação de outras substâncias nas amostras. Não foi observada a presença de ácido ferúlico, apesar da observação de Deschamps et al. (2011). Tal fato pode também ser atribuído ao ajuste sinal/ruído que possivelmente suprimiu os picos de menores intensidades.

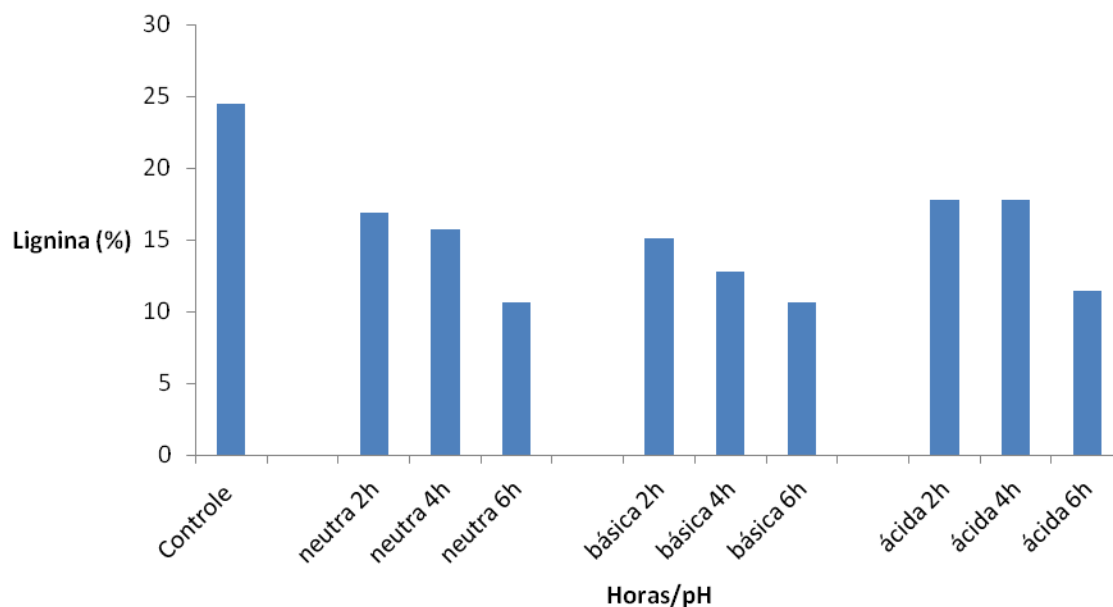


**Figura 31.** Cromatograma mostrando as concentrações do ácido *p*-cumárico residuais nas amostras tratadas com ozônio em diferentes condições de pH e tempo de reação.

Nos tratamentos em condições neutras houve uma perda significativa de ácido *p*-cumárico e em seguida em 4 horas houve uma diminuição menor de ácido *p*-cumárico seguido de 6 horas, que revelou entre todos os tratamentos a maior concentração de ácido *p*-cumárico degradado durante a ozonólise. Em condições básicas após 2 horas de reação, o ácido *p*-cumárico foi significativamente degradado; entretanto, nos passos posteriores houve diminuição do ácido *p*-cumárico degradado e em 6 horas a quantidade foi menor ainda promovendo um alto teor de ácido *p*-cumárico residual na amostra analisada. Em condições ácidas nas duas horas iniciais houve diminuição de ácido *p*-cumárico, porém não significativamente como em 4 horas e em seguida aumentando em 6 horas. Está evidente que há uma variação extrema entre cada tratamento e dentro dos próprios tratamentos. É possível observar que o comportamento das amostras nas reações deve-se claramente as condições de pH. As variações alternadas de ácido *p*-cumárico residual não permitiram qualquer especulação sobre o mecanismo de ação do ozônio, tendo em vista tratar-se de uma composição multimolecular com ingredientes quimicamente heterogêneos com alta propriedade de anisotropia e composição anatômica distintas, incluindo aqui a presença de tecidos das regiões dos nós e entre nós, vasos condutores, tecido parenquimatoso fibras e fibrotraqueídeos, entre outros. Cada elemento possui composição diferente e com variação temporal durante a deposição. Outro fator que deve ser considerado é o fato que a parede secundária detém grande quantidade de lignina e também alto teor de ácidos *p*-hidroxicinâmicos constituindo barreiras para ação de qualquer reagentes. É também relevante citar que a região de fronteira detém maior concentração de ácido *p*-cumárico fazendo a conectividade entre lignina e a parede celular em cana-de-açúcar.

#### 4.5. Teor de Lignina

Os valores de teor de lignina (Método de Klason) em amostras tratadas com ozônio revelaram, em comparação com o teor de lignina da amostra controle, uma redução progressiva em todos os tratamentos. Sendo em meio básico no contexto geral a condição mais favorável, entretanto em condição neutra a reação foi semelhante em termos de lignina degradadas em 6 horas, com o tratamento básico e tratamento neutro (Figura 32).



**Figura 32.** Teor de lignina das amostras

Pode-se observar conforme a Figura acima que no meio neutro houve uma diminuição do teor de lignina residual com perda de 7,55%; 8,72% e 13,78% em relação ao valor original, de 24% para os tempos de 2, 4, e 6h, respectivamente. Quanto ao tratamento da amostra em meio básico, as perdas na mesma ordem de tempo de reação foram de 11,70%; 13,83% e 9,35%, respectivamente. Em meio ácido, esses valores foram de 6,67%, 6,67% e 13,04%, ainda seguindo a ordem dos tempos de reação. Neste contexto, podemos então observar que, para o bagaço de cana, o tratamento mais eficiente foi o tratamento em meio neutro, devido aos teores de lignina atingidos e ao fato de que houve uma tendência progressiva de diminuição do teor de lignina. Quanto ao meio básico, houve uma tendência na perda de lignina até 4h, observando-se um aumento do teor da lignina residual no período de 6h. Já o tratamento ácido apresentou resultados similares aos tratamentos neutros, mantendo-se uma deslignificação constante até 4h, quando ocorre uma queda em 6h. Os valores de teores calculados mostrados na Figura 32 demonstra que nos tratamentos neutro e básico houve degradações mais proeminentes, entretanto há a necessidade de outros experimentos a serem realizados em outras condições de reação de ozonólise.

## 5. CONCLUSÃO

As análises das amostras tratadas com ozônio revelaram que o tratamento foi favorável à diminuição dos parâmetros que causam a recalcitrância. Na condição neutra a concentração do ácido *p*-cumárico residual foi a menor, assim como o teor de lignina em 6 horas. Neste contexto, a reação de ozonólise provavelmente diminuiu a recalcitrância da parede celular, portanto, a reação deve favorecer a digestibilidade enzimática. Essa reação também levou à formação de lignina residual menos condensada.

Na condição de pH ácido a lignina residual foi mais condensada, mostrando a seletividade do ozônio durante a reação. Neste caso, a lignina residual (condensada) resistiu à degradação com eliminação de unidades terminais etéricas, levando a supor que a reação de ozonólise atingiu preferencialmente a região de fronteira entre lignina e a parede celular, inversamente da reação em condição neutra. Em termos quantitativos todos os experimentos mostraram redução significativa do teor de lignina, sendo a condição neutra de 6 horas aquela que apresentou menor teor de lignina, muito embora, próxima as demais condições de pH.

O emprego dessa metodologia permitirá maior utilização da biomassa lignocelulósica para uso energético, principalmente para a produção do bioetanol e para uso alimentar. Tal fato deverá contribuir para a maior acessibilidade enzimática à parede celular, ao mesmo tempo que a eliminação parcial da lignina deverá conferir maior carácter de hidrofiliabilidade das amostras.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, H. S.; NASCIMENTO, A. M.; MARIA, M.A. Lignin Structure and Wood Properties Wood and Fiber Science. **Society of Wood Science & Technology** V.31. N.4 / p.426-433 1999

ANGLADA, J. M; TORRENT-SURRACAT, M; LOPEZ-RUIZ, M; MARTINS-COSTA, M. Is the HO<sup>-4</sup> Anion a Key Species in the Aqueous-Phase Decomposition of Ozone? **Chem. Eur. J.** 2012, 18, 13435 – 13445

ARGILLIER, O.; BARRIERE, Y., Une estimation de la qualité de la partie non grain du maïs ensilage sur des échantillons de plante entierre. In: COLLOQUE MAÏS ENSILAGE, 1996, Nantes. **Anais...** Nantes: INRA, 1996. p. 17-18.

BAILEY, P. S. **Ozonation in organic chemistry**. Academic Press, New York, v. 1, p. 37-43.

BALOUSEK, P.S. **The effects of ozone upon a lignin-related model compound containing a b-aryl ether linkage**. University of Wisconsin, Platteville, 1979.

BELTRÁN, F. Ozone reaction kinetics for water and wastewater systems 2003 lewis publishers

BIDLACK, J., MALONE, M. AND BENSON, R., Molecular structure and componnt integration of secondary cell walls in plants, **Proc. Okla.Acad. Sci.** v.72, p. 51-56, 1992.

CHANDRAKANTH, M.S; HONEYMAN, B.D; AMY, G.L. Modeling the interactions between ozone, natural organic matter, and particles in water treatment. **Colloids and Surfaces**. v.107, p.321-342. Environmental Research Laboratory, 1996.

CHEN. H .T; FUNAOKA, M; LAI, Y. Z. Attempts to understand the nature of phenolic and etherified components of wood lignin. **Wood Science and Technology** v. 31 P.433 - 444 1997

CHUNDAWAT, S. P. S.; BECKHAM, G. T.; HIMMEL, M. E.; DALE, B. E. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, p. 121–145, 2011.

CONTRERAS IGLESIAS. S. **Degradation and biodegradability enhancement of nitrobenzene and 2.4-dichlorophenol by means of Advanced Oxidation Processes based on ozone**. Departament d'Enginyeria Química i Metallurgia. Universitat de Barcelona, 2003.

CSÉFALVAY, E.; NÖTHE, T.; MIZSEY, P. Modelling of wastewater ozonation – determination of reaction kinetic constants and effect of temperature. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, Budapest, v.51, n.2, p.13-17, 2007.

CULLEN, P.J.; TIWARI, B.K.; O'DONNELL, C.P.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. **Trends in Food Science & Technology**,



Amsterdam, v.20, p.125-136, 2009.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRINK, D. R. Ozone in water treatment: application and engineering; **Lewis publishers inc.**, 569p, 1991.

ERSHOV, B. G; MOROZOV, P. A. The Kinetics of Ozone Decomposition in Water, the Influence of pH and Temperature. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, 2009, v.83, n.8, p. 1295–1299, 2009

FARRELL, A. E., PLEVIN, R. J.; TURNER, B.T.; JONES, A.D.; O'HARE, M.; KAMMEN, D. M. Ethanol Can Contribute to Energy and Environmental Goals. **Science** v.311, n. 5760, p. 506 – 508, 2006

GABRIELSEN, B. C.; VOGEL, K. P.; ANDERSON, B. E.; WARD, J. K. Alkali-Labile Cell-Wall Phenolics and Forage Quality in Switchgrasses Selected for Differing Digestibility. **Crop. Sci.** v.30 n.6, p.1313-1320, 1990

GARROW, J. R.; FERRANTELLI, L. M.; STARK, R. E. <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Study of Suberized Potato Cell Wall. **Plant Physiology**, v. 90, p. 783-787, 1989.

GARCÍA-CUBERO, M. T.; COCA, M.; BOLADO, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G. Chemical Oxidation with Ozone as Pre-treatment of Lignocellulosic Materials for Bioethanol Production. **Chemical Engineering Transactions**. V.21, p.1273-1278, 2010.

GODSAY, M.P. Ozone-cellulose studies: Physico-chemical properties of ozone oxidized cellulosic and lignocellulosic materials. New York: University Microfilms International, 239 p. Tese de Doutorado em Ciência e Engenharia de Polímeros. 1985.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v.36, p. 2086 - 2097, 2008.

GUNTEN, U, F. Ozonation of drinkingwater: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. **Water Research** V.31 p. 1469 – 1487, 2003  
Dübendorf, Suíça

GUZEL-SEYDIM, Z.; GREENE, A.K.; SEYDIM, A.C. Use of ozone in the food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Amsterdam, v.37, p.453-460, 2004.

GOTTSCHALK, C., LIBRA, J. A., SAUPE, A., Ozonization of water and wastewater – A practical guide to understanding ozone and applications. 2 ed. **WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.** KGa.A, Weinheim. 2000

HATFIELD, R.D., J.R. WILSON, AND D.R. MERTENS. 1999. Composition of cell walls isolated from cell types of grain sorghum stems. **J. Sci. Food Agric.** v.79. p. 891–899.

HENG, S; YEUNG, L.K; DJAFER, M; SCHROTTER, J.C. A novel membrane reactor for ozone water treatment. **Journal of Membrane Science**. V 289, p.67-75.

HORVATH, M.; BILITZKY, L.; HUETTNER, J. Ozone. **Elsevier**. v.20. 350p.1985.

INTERSTATE TECHNOLOGY AND REGULATORY COOPERATION. **Technical and Regulatory Guidance for In Situ Chemical Oxidation of Contaminated Soil and Groundwater**. 172p, 2005.

JUNG, H.G.; ENGELS, F.M. Alfafa stem tissues cell wall deposition, composition and degradability **Crop Science**, v. 62, p. 524-534, 2002

JUNG, H.G.; VOGEL, K.P. Lignification of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) and big bluestem (*Andropogon gerardii* Vitman) plant parts during maturation and its effect on fibre degradability. **Journal of the Science of Food Agriculture** V 59. p.769-776. 1992

JUNG, H.G.; BUXTON, D.R. Forage quality variation among maize inbreds: Relationships of cell-wall composition and in vitro degradability for stem internodes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* V 66. p.313 - 322. 1994

KLEISER, G.; FRIMMEL, F. H. Removal of precursors for disinfection by-products (DBPs) – differences between ozone- and OH-radical-induced oxidation, **Science of the Total Environment**, v. 256, p. 1-9, 2000.

LAM, T. B. T.; IYAMA, K.; STONE, B. A. Hot alkali-labile linkages in the walls of the forage grass *Phalaris aquatica* and *Lolium perenne* and their relation to in vitro wall digestibility. **Phytochemistry**. v. 64, p. 603–607, 2003.

LAPOLLI, F. R.; SANTOS, L. F.; HÁSSEMER, M. E. N.; AISSE, M. M.; PIVELI, R. P. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In. GONÇALVES, R. F. (Coord.). Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patógenos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquíicultura e hidropônica. Vitória: PROSAB, 2003. p. 169-208.

LIN, S. Y.; DENCE, C. W. *Methods in lignin chemistry*. Berlin: **Spring-Verlag**, 568p., 1992.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; COSTA, J. T. M.; CERQUEIRA, L. S. C.; FERREIRA, E. *Palmeiras Brasileiras e Exóticas cultivadas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarium, 2004.

MAIA, E. P.; COLODETTE, J. L. Efeito do conteúdo e da natureza da lignina residual na eficiência e na seletividade do branqueamento com ozônio. **Revista Árvore**, v.27, n.2, p.217-232, 2003.

MILLET, M. A., BAKER, A. J. & SATTER, L. D., **Biotechnol. Bioeng. Symp.** v.5 (1975), 1930.

MOHAN, D.; PITTMAN JR., STEELE, P.H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: A critical review. **Energy Fuels**. V. 20. P-848-889. 2006

MVULA, E.; von SONNTAG, C. Ozonolysis of phenols in aqueous solution. **Org. Biomol. Chem.**, v. 1, p. 1749-1756, 2003.

MTUI, G. Y. S. Effluents: a case study on Kraft pulp wastewater. **Tanzania Journal of Science**, v. 27A (Special Issue), 2001.

NOVAK, J. S.; YUAN, J. T. C. The Ozonation concept: Advantages of ozone treatment and commercial developments. In: Tewari, G.; Juneja, V. K. (ed.). Advances in thermal and non-thermal food preservation. **Ames: Blackwell Publishing**, 2007. p.185-193.

OZONE SOLUTIONS acesso em [http://www.ozoneapplications.com/info/cd\\_vs\\_uv.htm](http://www.ozoneapplications.com/info/cd_vs_uv.htm)

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Economic utilization of crop residues for value addition: a futuristic approach. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 59, p. 12–22, 2000.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. CENGAGE Learning, 2010.

PEREIRA, R.P.W; MONTEIRO, M.B.O; ABREU, H.S. Bioinformação do processo de lignificação. **EDUR/UFRRJ**. 124p, 2012

POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse

REZENDE, C. A.; LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E. R.; GARCIA, W.; submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**. v.4, n.54. p.1-19, 2011.

RICE, R. G.; ROBSON, C. M.; MILLER, G. W.; HILL, A. B. Uses of ozone in drinking water treatment. **Journal of the American Water Works Association**, Denver, v. 73, n. 1, p. 44-47, 1981.

SOUSA, L. C.; CHUNDAWAT, S. P. S.; BALAN, V.; DALE, B. E. “Cradle-to-grave” assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p.339-347, 2009.

SUN, Y. CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology** V.83 p. 1–11, 2002.

SAKAI, S.; TSUCHIDA, Y.; OKINO S.; ICHIHASHI, O.; KAWAGUCHI, H.; WATANABE.; YUKAWA, H.. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum*. **R. Appl. Environ. Microbiol.**, V 73, p.2349 – 2353, 2007.

SAWAI, A., KONDO, T. AND ARA. S. Inhibitory effects of phenolic acid esters on degradability of forage fibers. **J. Jpn. Grassl. Sci.** V 29, p.175 – 179, 1983.

SHE, D.; NIE, X. N.; XU F. GENG, Z. C., JIA, H. T.; JONES, G. L.; BAIRD, M. S. Physico-chemical characterization of different alcohol-soluble lignins from rice straw. **Cellulose Chem. Technol.**, v.46 n.3-4, p. 207-219, 2012.

SHISHIR, P.S. CHUNDAWAT, S.P. S; BECKHAM, G. T; HIMMEL, M.E; DALE, B. E. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. **Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.**. v.2 p.121–145, 2011.

SLUITER, R. A.; RUIZ, C. S., SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives

in Biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. Technical Report NREL/TP-510-42619, p. 1-12, 2008.

STAEHELIN S, HOIGNE J. Decomposition of ozone in water. Rate of initiation by hydroxide ions and hydrogen peroxide. **Environ Sci Technol**. V16. p. 676–681 1982.

SUN, Y. AND J. CHENG "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review." **Bioresource Technology**. v.83, p.1-11, 2002.

VIDAL, P. F.; MOLINIER J. "Ozonolysis of lignin - Improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust." **Biomass** v.16, p.1-17, 1988.

WARD, D. B.; TIZAOUI, C.; SLATER, M. J. Ozone-Loaded Solvents for use in Water Treatment **Ozone: Science & Engineering**, v. 25, p.485-495. 2003.

WYMAN, C.E.; DALE, B.E.; ELANDER, R.T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M.R.; LEE, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresources Technology** V.18, p.1959–1966, 2005.

UNICA, União da Indústria de cana de Açúcar 2008. Statistics of sugarcane sector season 2006/ 2007. Disponível em: [http://www.portalunica.com.br/portalunica/files/referencia\\_estatisticas\\_producaoabrasil-9-tabela.xls](http://www.portalunica.com.br/portalunica/files/referencia_estatisticas_producaoabrasil-9-tabela.xls). Acessado em 30 de março de 2013

WIKBERG, P-E. **Occurrence, Morphology and Growth of Understory Saplings in Swedish Forests**. Thesis (Doctoral Thesis) – Department of Silviculture Umeå, Swedish University of Agricultural Sciences, Suécia, 322p, 2004.

YU, P.; MCKINNON, J. J. CHRISTENSEN, D.A. Hydroxycinnamic acids and ferulic acid esterase in relation to biodegradation of complex plant cell walls, **Canadian Journal Of Animal Science** v.85, n.3. p. 255 – 267, 2005

## 7. ANEXOS

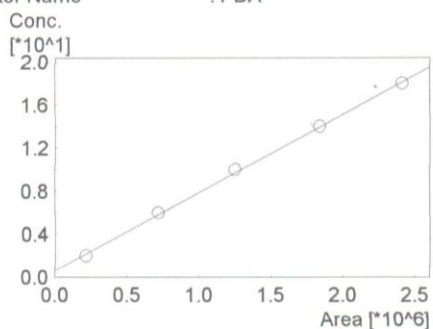
### 7.1: Cromatogramas em CLAE

#### 7.1.1: Curva de Calibração.

#### ==== Shimadzu LcSolution Calibration Curve ====

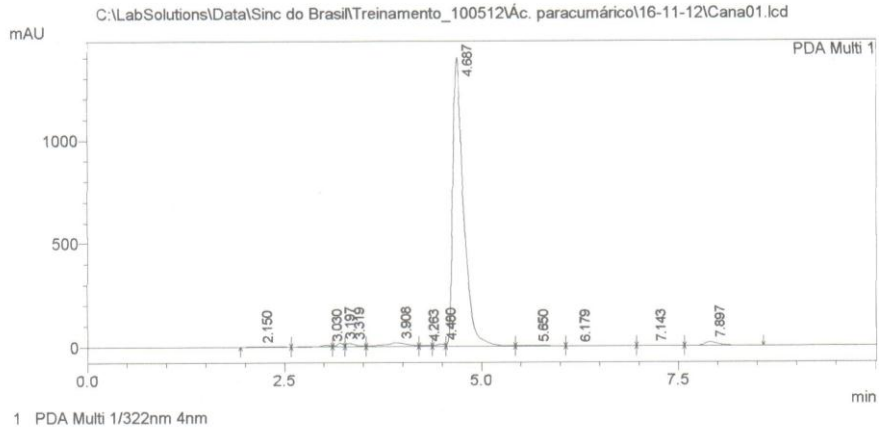
<Calibration Curve>

ID# : 1  
Name : Ác. Para cumárico  
Quantitative Method : External Standard  
Function :  $f(x)=7.25242e-006*x+0.659972$   
Rr1=0.9995290 Rr2=0.9990582  
MeanRF:8.13137e-006 RFSD:6.79248e-007 RFRSD:8.35342  
FitType : Linear  
ZeroThrough : Not Through  
WeightedRegression : None  
Detector Name : PDA



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	2.000	217087.5	217087
		214722.0	214722
2	6.000	722817.0	722817
		717275.9	717276
3	10.000	1263490.4	1263490
		1244461.2	1244461
4	14.000	1866119.7	1866120
		1807053.7	1807054
5	18.000	2415338.1	2415338
		2410139.9	2410140

#### 7.1.2. Tratamento Controle:



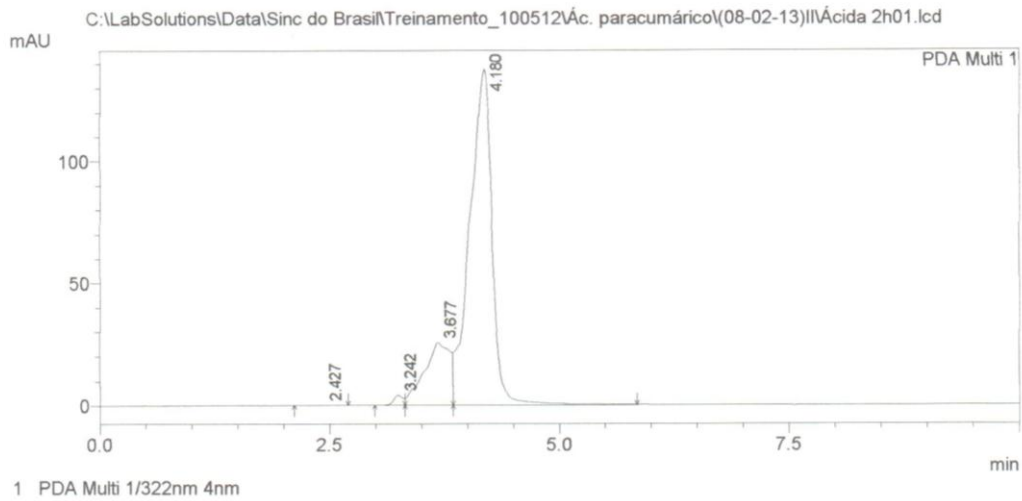
PeakTable

PDA Ch1 322nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Conc.
1	2.150	8207	429	0.056	0.000
2	3.030	67010	8093	0.461	0.000
3	3.197	107564	18306	0.740	0.000
4	3.319	149817	15368	1.030	0.000
5	3.908	405943	19017	2.791	0.000
6	4.263	59692	6178	0.410	0.000
7	4.480	86848	10821	0.597	0.000
8	4.687	13272009	1398239	91.248	96.914
9	5.650	108217	4160	0.744	0.000
10	6.179	42256	1373	0.291	0.000
11	7.143	8595	355	0.059	0.000
12	7.897	228857	18071	1.573	0.000
Total		14545016	1500410	100.000	

### 7.1.3. Tratamento ácido 2h

<Chromatogram>



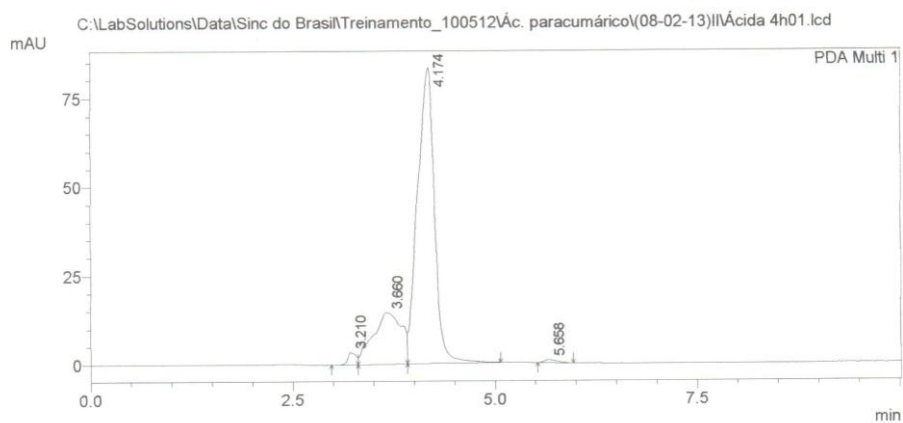
PeakTable

PDA Ch1 322nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Conc.
1	2.427	3011	165	0.106	0.000
2	3.242	29989	4000	1.051	0.000
3	3.677	502878	25575	17.622	0.000
4	4.180	2317754	137444	81.221	17.469
Total		2853631	167183	100.000	

### 7.1.4. Tratamento ácido 4h

<Chromatogram>

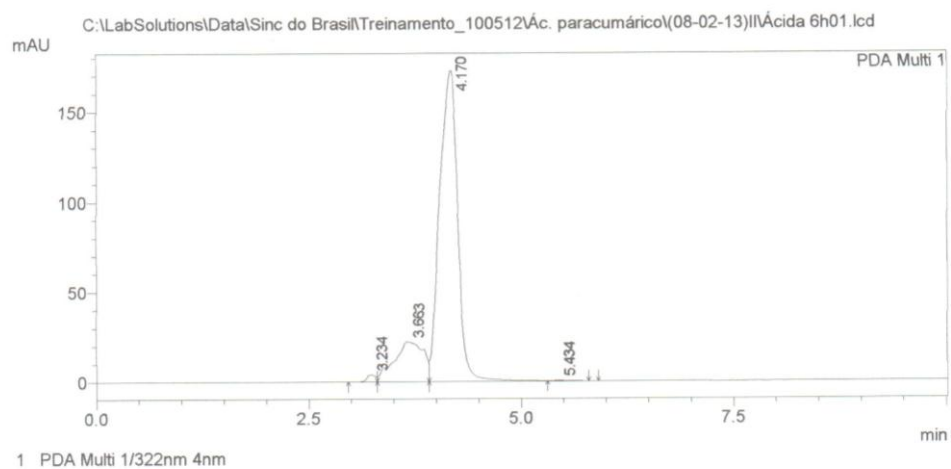


PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Conc.
1	3.210	26335	3429	1.632	0.000
2	3.660	359542	14504	22.274	0.000
3	4.174	1219446	83317	75.547	9.504
4	5.658	8834	811	0.547	0.000
Total		1614158	102062	100.000	

7.1.5. Tratamento ácido 6h

<Chromatogram>

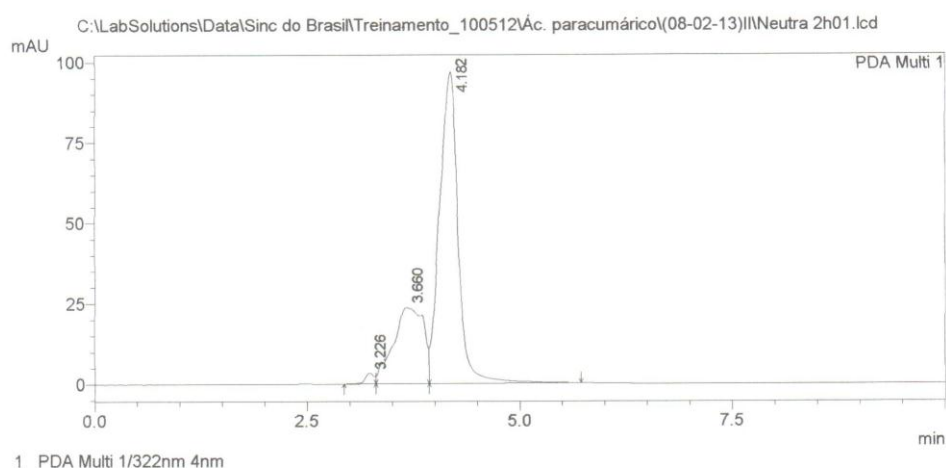


Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Conc.
1	3.234	31053	3969	0.989	0.000
2	3.663	539986	22296	17.203	0.000
3	4.170	2565281	172487	81.727	19.264
4	5.434	2521	215	0.080	0.000
Total		3138841	198968	100.000	

7.1.6. Tratamento Neutro 2h

<Chromatogram>



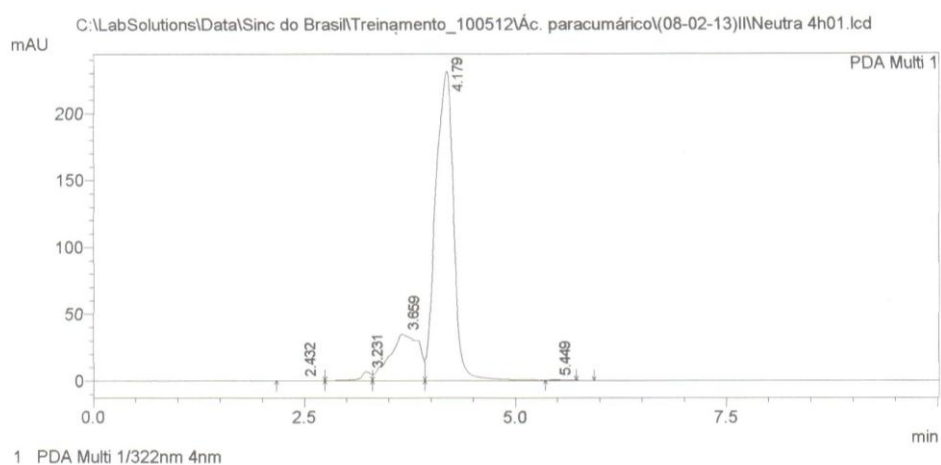
PeakTable

PDA Ch1 322nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Conc.
1	3.226	24486	3257	1.181	0.000
2	3.660	586047	23648	28.267	0.000
3	4.182	1462688	96603	70.551	11.268
Total		2073221	123508	100.000	

7.1.7. Tratamento Neutro 4h:

<Chromatogram>



PeakTable

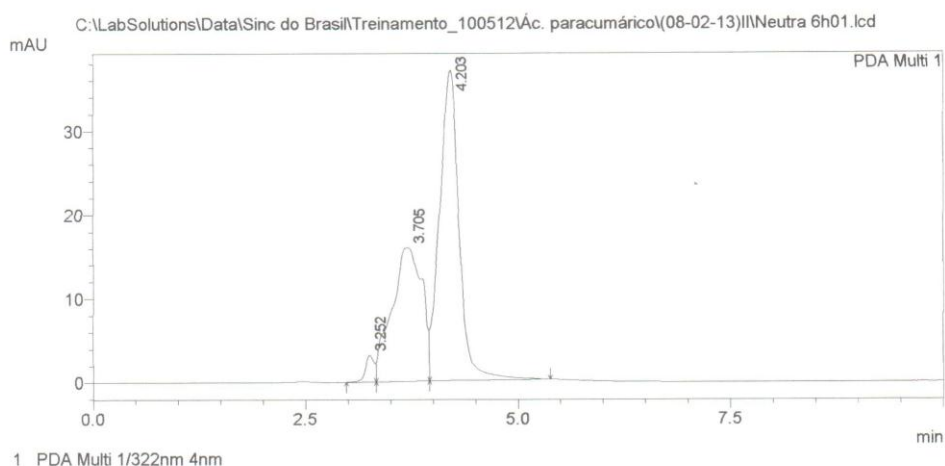
PDA Ch1 322nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Conc.
1	2.432	4438	198	0.102	0.000
2	3.231	61212	6553	1.406	0.000
3	3.659	844744	34742	19.405	0.000
4	4.179	3440070	230935	79.023	25.609
5	5.449	2792	269	0.064	0.000
Total		4353256	272697	100.000	

7.1.8. Tratamento Neutro 6h:



<Chromatogram>



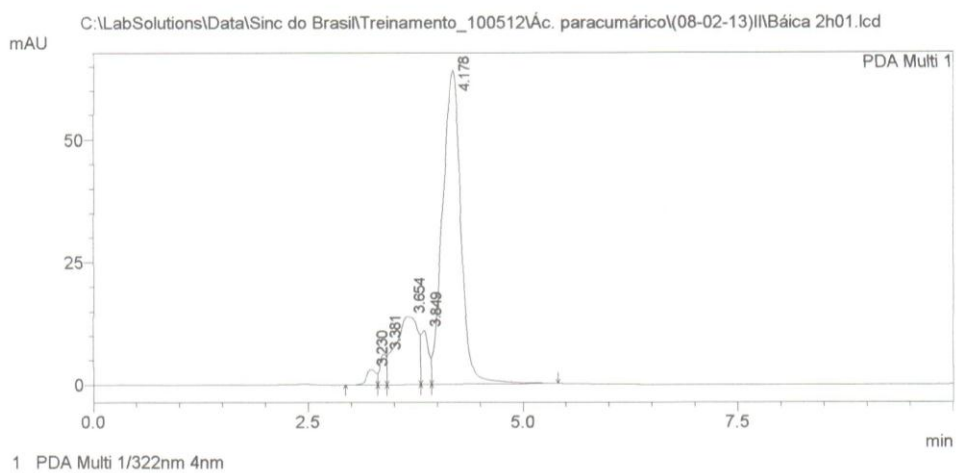
PeakTable

PDA Ch1 322nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Conc.
1	3.252	23636	3188	2.332	0.000
2	3.705	396428	15939	39.116	0.000
3	4.203	593408	36916	58.552	4.964
Total		1013472	56043	100.000	

7.1.9. Tratamento básico 2h

<Chromatogram>



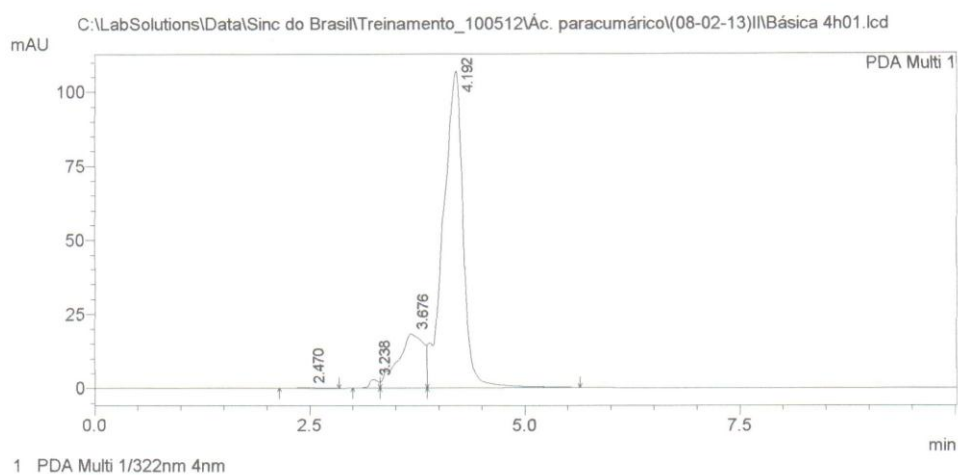
PeakTable

PDA Ch1 322nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Conc.
1	3.230	25267	3121	1.899	0.000
2	3.381	33154	6288	2.492	0.000
3	3.654	251873	13828	18.931	0.000
4	3.849	66868	10979	5.026	0.000
5	4.178	953317	64031	71.652	7.574
Total		1330478	98248	100.000	

7.1.10. Tratamento básico 4h

### <Chromatogram>

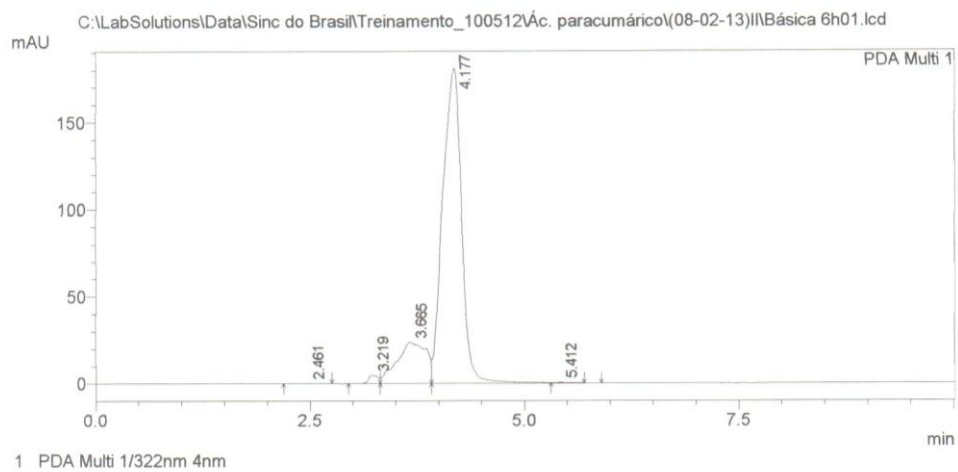


Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Conc.
1	2.470	3970	207	0.187	0.000
2	3.238	21759	2841	1.027	0.000
3	3.676	383115	18227	18.078	0.000
4	4.192	1710352	106612	80.708	13.064
Total		2119195	127886	100.000	

## 7.1.11. Tratamento básico 6h

### <Chromatogram>



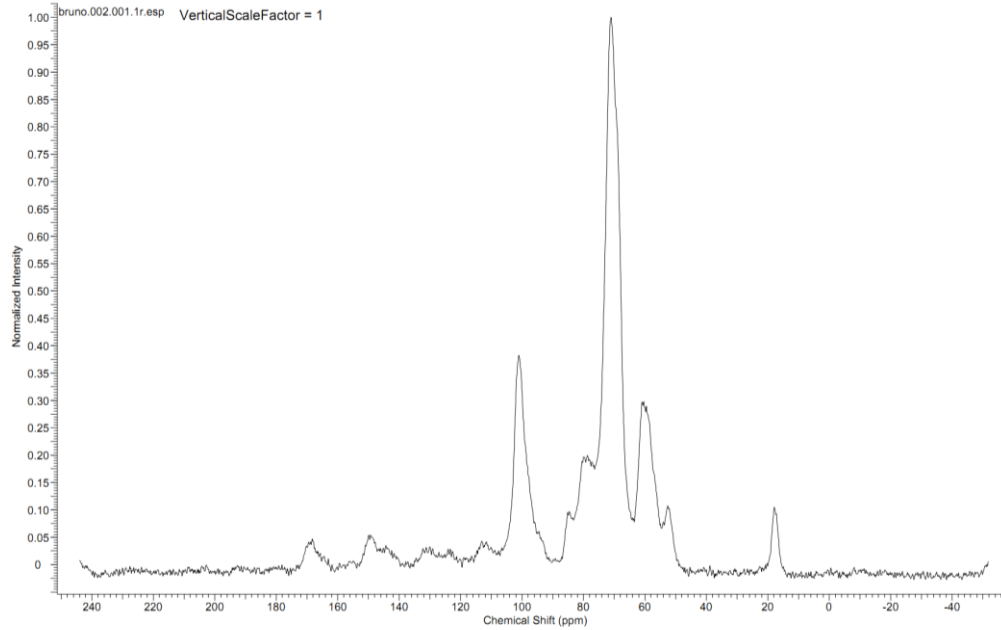
Peak Table

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Conc.
1	2.461	2821	165	0.083	0.000
2	3.219	39652	4704	1.171	0.000
3	3.665	568034	23659	16.769	0.000
4	4.177	2775144	180547	81.926	20.786
5	5.412	1712	169	0.051	0.000
Total		3387363	209244	100.000	

## 7.2. Espectros em RMN 13C

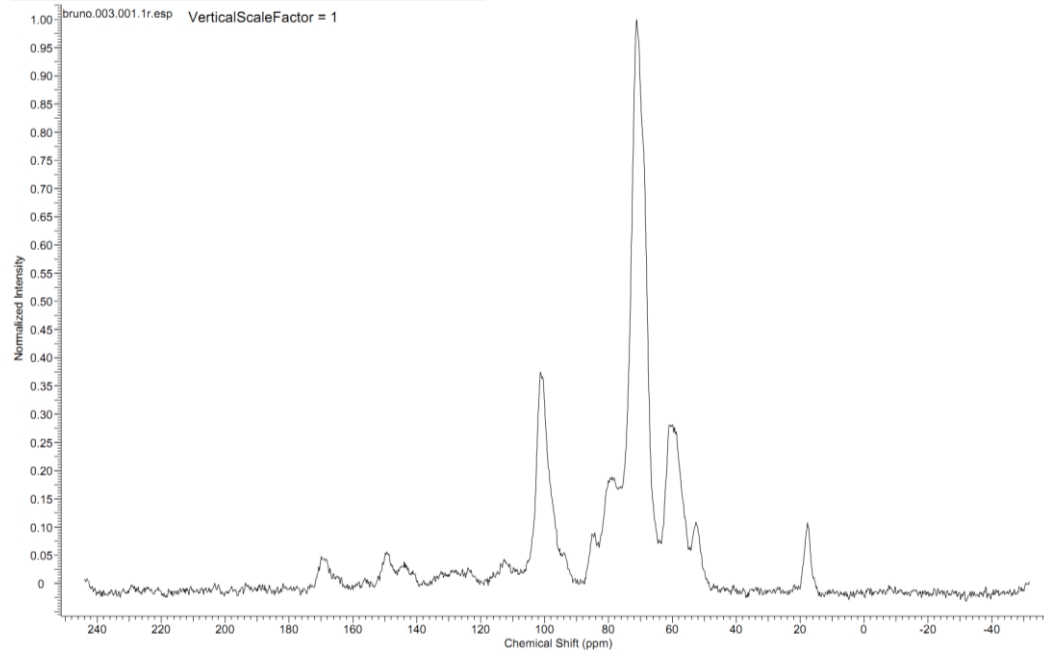
### 7.2.1 Ácida 2h

Acquisition Time (sec)	0.0344	Comment	AMOSTRA: 2h acida EXPERIMENTO: CP (8000 Hz)	Date	30 Nov 2012 09:20:16
Date Stamp	30 Nov 2012 09:20:16	File Name	C:\Users\Placebook\Documents\Material de Estudio\bruno\2\data\1\1r	Number of Transients	666
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C	Origin	spect
Original Points Count	1024	Owner	Administrator	Points Count	4096
Receiver Gain	2050.00	SW(cyclical) (Hz)	29761.90	Pulse Sequence	cp.av
Sweep Width (Hz)	29754.64	Temperature (degree C)	30.000	Solvent	METHANOL-d4
				Spectrum Offset (Hz)	9671.7783



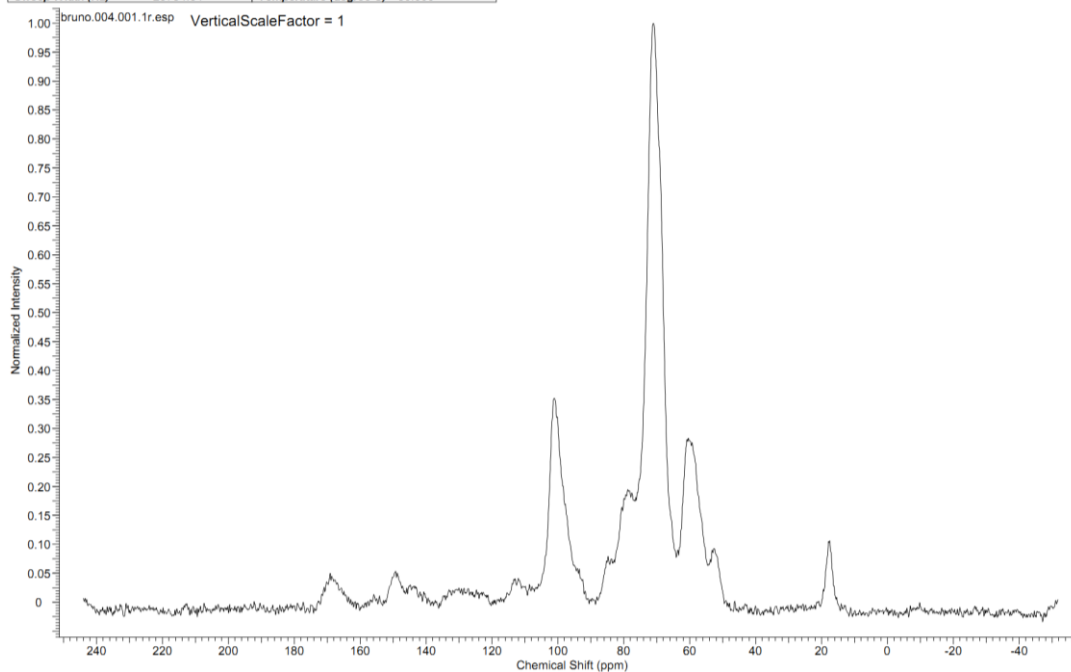
### 7.2.2. Ácida 4h

Acquisition Time (sec)	0.0344	Comment	AMOSTRA: 4h acida EXPERIMENTO: CP (8000 Hz)	Date	30 Nov 2012 10:17:52
Date Stamp	30 Nov 2012 10:17:52	File Name	C:\Users\Placebook\Documents\Material de Estudio\bruno\3\data\1\1r	Number of Transients	611
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C	Origin	spect
Original Points Count	1024	Owner	Administrator	Points Count	4096
Receiver Gain	2050.00	SW(cyclical) (Hz)	29761.90	Pulse Sequence	cp.av
Sweep Width (Hz)	29754.64	Temperature (degree C)	30.000	Solvent	METHANOL-d4
				Spectrum Offset (Hz)	9671.7783



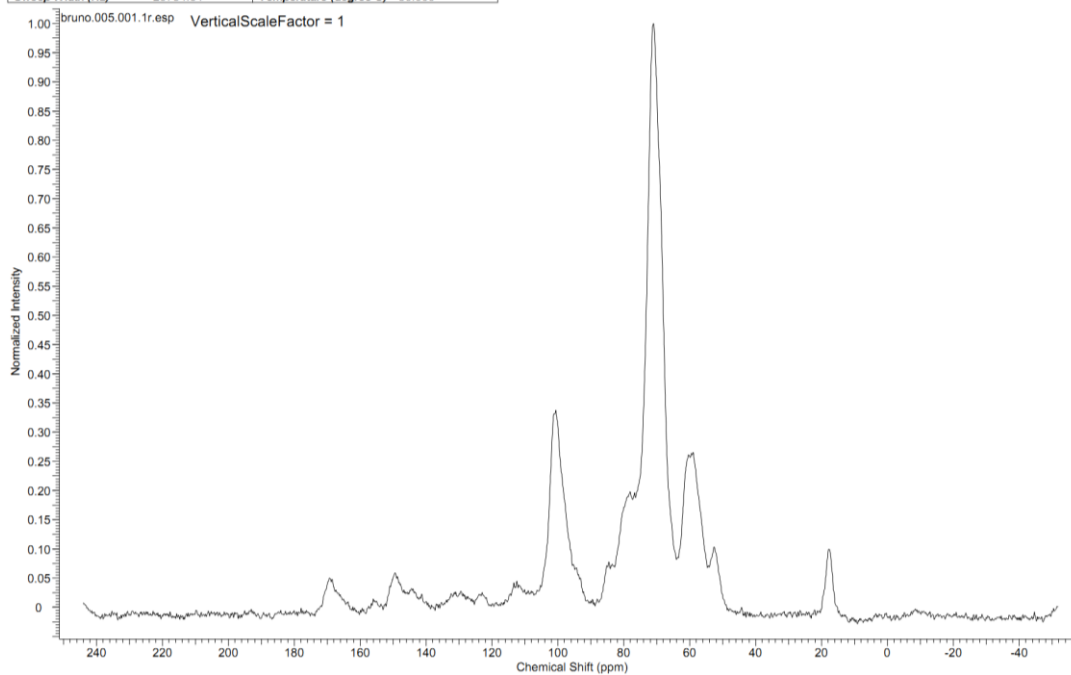
### 7.2.3. Ácida 6h

Acquisition Time (sec)	0.0344	Comment	AMOSTRA: 6h acida EXPERIMENTO: CP (8000 Hz)	Date	30 Nov 2012 11:21:52
Date Stamp	30 Nov 2012 11:21:52	File Name	C:\Users\Placebook\Documents\Material de Estudio\bruno4\pdata\111r		
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	<sup>13</sup> C	Number of Transients	548
Original Points Count	1024	Owner	Administrator	Points Count	4096
Receiver Gain	2050.00	SW(cyclical) (Hz)	29761.90	Solvent	METHANOL-d4
Sweep Width (Hz)	29754.64	Temperature (degree C)	30.000	Pulse Sequence	cp.av
				Spectrum Offset (Hz)	9671.7783



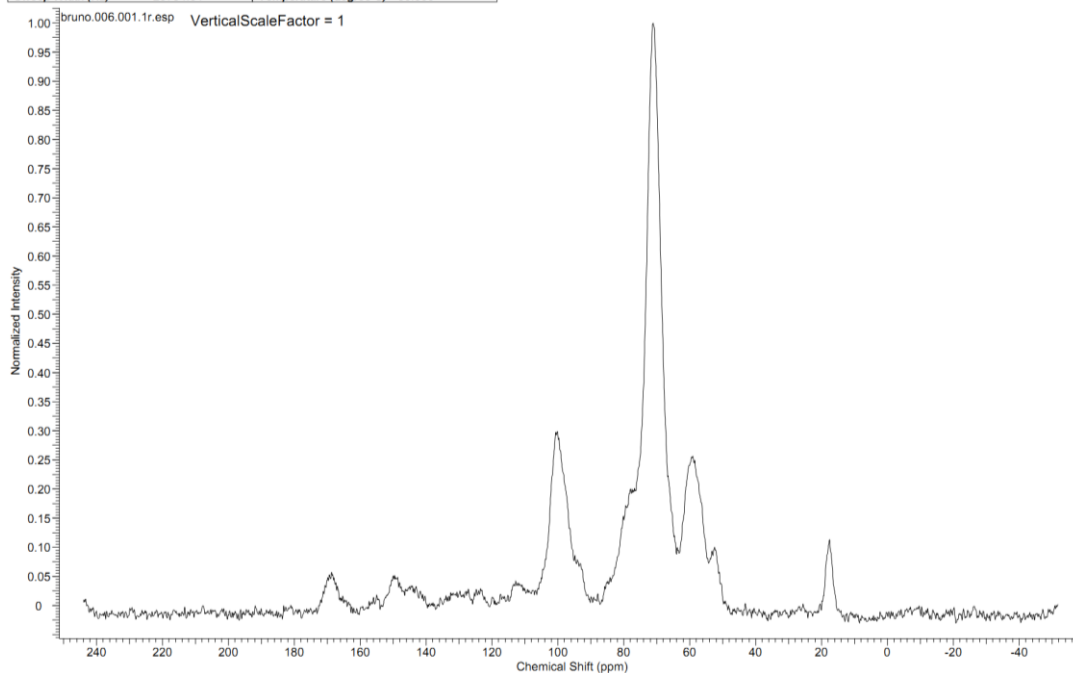
## 7.2.4. Básico 2h

Acquisition Time (sec)	0.0344	Comment	AMOSTRA: 2h neutro EXPERIMENTO: CP (8000 Hz)	Date	30 Nov 2012 13:36:16
Date Stamp	30 Nov 2012 13:36:16	File Name	C:\Users\Placebook\Documents\Material de Estudio\bruno5\pdata\111r		
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	<sup>13</sup> C	Number of Transients	1216
Original Points Count	1024	Owner	Administrator	Points Count	4096
Receiver Gain	2050.00	SW(cyclical) (Hz)	29761.90	Solvent	METHANOL-d4
Sweep Width (Hz)	29754.64	Temperature (degree C)	30.000	Pulse Sequence	cp.av
				Spectrum Offset (Hz)	9671.7783



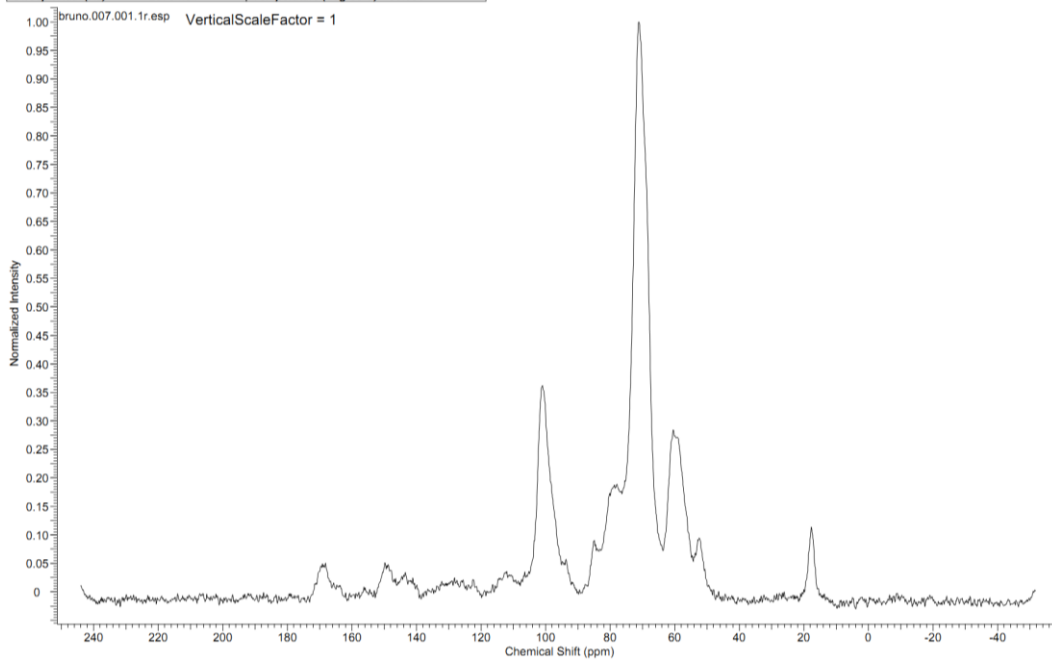
## 7.2.5. Neutro 4h

Acquisition Time (sec)	0.0344	Comment	AMOSTRA: 4h neutro EXPERIMENTO: CP (8000 Hz)	Date	30 Nov 2012 13:59:44
Date Stamp	30 Nov 2012 13:59:44	File Name	C:\Users\Placebook\Documents\Material de Estudo\bruno\6\pdata\111r		
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	<sup>13</sup> C	Number of Transients	595
Original Points Count	1024	Owner	Administrator	Points Count	4096
Receiver Gain	2050.00	SW(cyclical) (Hz)	29761.90	Solvent	METHANOL-d4
Sweep Width (Hz)	29754.64	Temperature (degree C)	30.000	Pulse Sequence	cp.av
				Spectrum Offset (Hz)	9671.7783



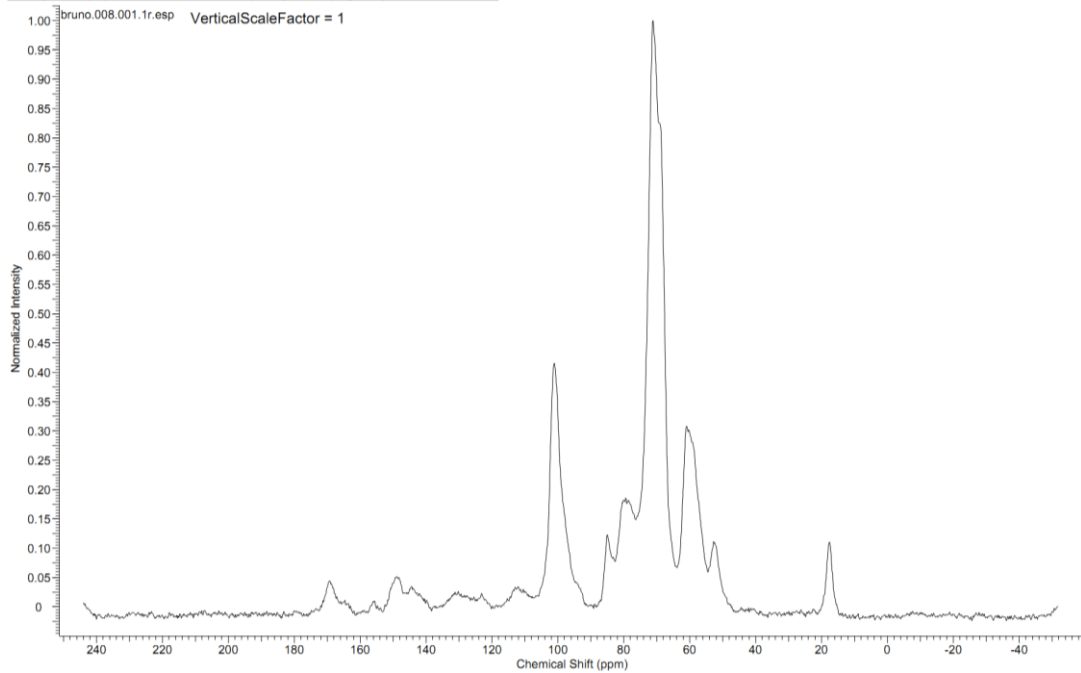
## 7.2.6. Neutro 6h

Acquisition Time (sec)	0.0344	Comment	AMOSTRA: 6h neutro EXPERIMENTO: CP (8000 Hz)	Date	30 Nov 2012 15:08:00
Date Stamp	30 Nov 2012 15:08:00	File Name	C:\Users\Placebook\Documents\Material de Estudo\bruno\7\pdata\111r		
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	<sup>13</sup> C	Number of Transients	702
Original Points Count	1024	Owner	Administrator	Points Count	4096
Receiver Gain	2050.00	SW(cyclical) (Hz)	29761.90	Solvent	METHANOL-d4
Sweep Width (Hz)	29754.64	Temperature (degree C)	30.000	Pulse Sequence	cp.av
				Spectrum Offset (Hz)	9671.7783



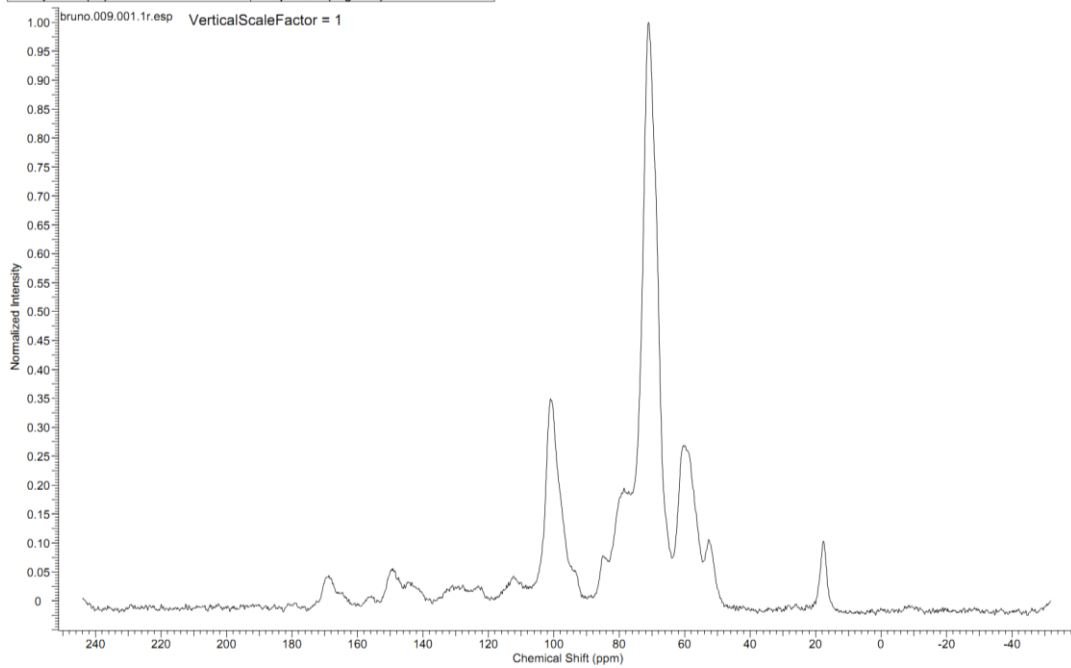
## 7.2.7. Básico 2h

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.0344	<b>Comment</b>	AMOSTRA: 2h basico EXPERIMENTO: CP (8000 Hz)	<b>Date</b>	30 Nov 2012 15:50:40
<b>Date Stamp</b>	30 Nov 2012 15:50:40	<b>File Name</b>	C:\Users\Placebook\Documents\Material de Estudio\bruno\8\pdata\111r		
<b>Frequency (MHz)</b>	100.61	<b>Nucleus</b>	<sup>13</sup> C	<b>Number of Transients</b>	2048
<b>Original Points Count</b>	1024	<b>Owner</b>	Administrator	<b>Points Count</b>	4096
<b>Receiver Gain</b>	2050.00	<b>SW(cyclical) (Hz)</b>	29761.90	<b>Solvent</b>	METHANOL-d4
<b>Sweep Width (Hz)</b>	29754.64	<b>Temperature (degree C)</b>	30.000	<b>Pulse Sequence</b>	cp.av
				<b>Spectrum Offset (Hz)</b>	9671.7783



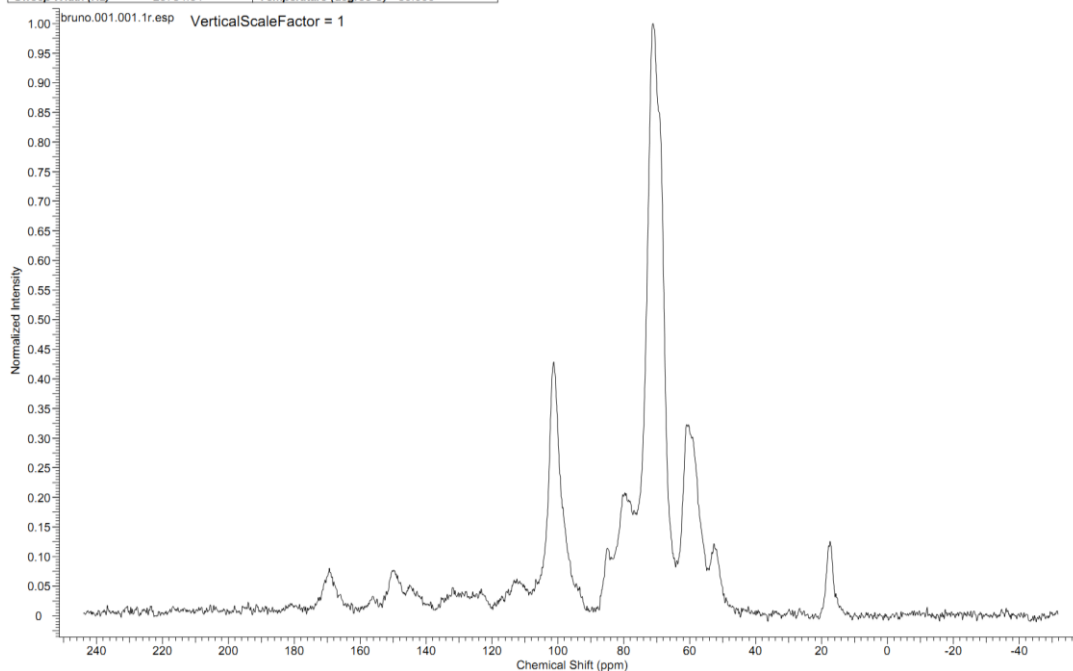
## 7.2.8. Básico 4h

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.0344	<b>Comment</b>	AMOSTRA: 4h basico EXPERIMENTO: CP (8000 Hz)	<b>Date</b>	03 Dec 2012 08:52:32
<b>Date Stamp</b>	03 Dec 2012 08:52:32	<b>File Name</b>	C:\Users\Placebook\Documents\Material de Estudio\bruno\9\pdata\111r		
<b>Frequency (MHz)</b>	100.61	<b>Nucleus</b>	<sup>13</sup> C	<b>Number of Transients</b>	1862
<b>Original Points Count</b>	1024	<b>Owner</b>	Administrator	<b>Points Count</b>	4096
<b>Receiver Gain</b>	2050.00	<b>SW(cyclical) (Hz)</b>	29761.90	<b>Solvent</b>	METHANOL-d4
<b>Sweep Width (Hz)</b>	29754.64	<b>Temperature (degree C)</b>	30.000	<b>Pulse Sequence</b>	cp.av
				<b>Spectrum Offset (Hz)</b>	9671.7783



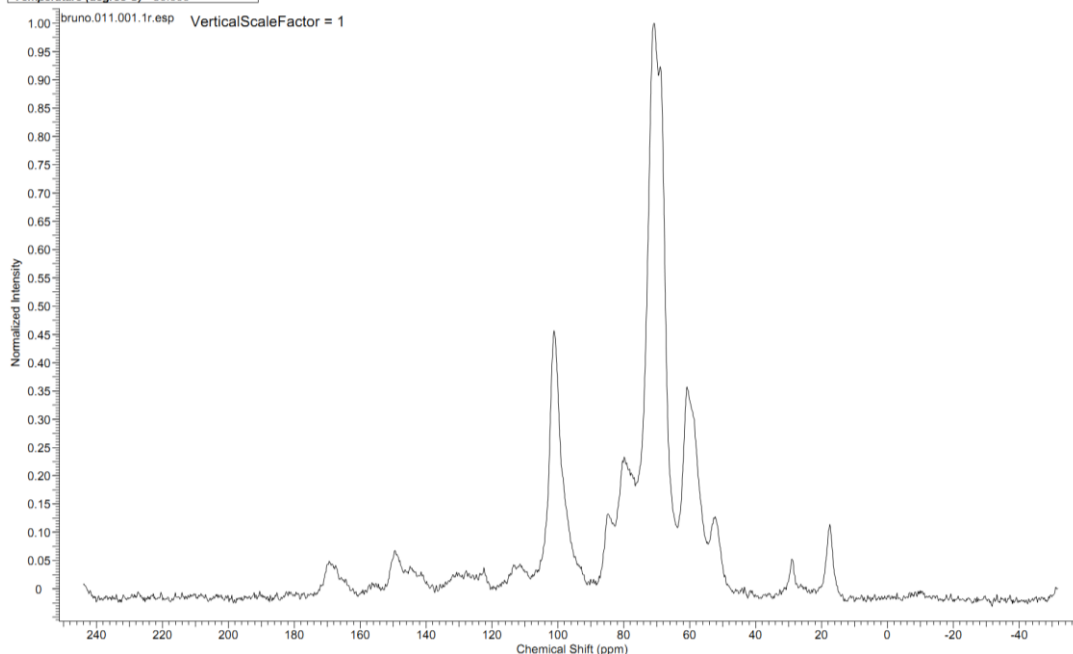
## 7.2.9. Básico 6h

Acquisition Time (sec)	0.0344	Comment	AMOSTRA: 6 h basico EXPERIMENTO: CP (8000 Hz)		Date	28 Nov 2012 16:56:48	
Date Stamp	28 Nov 2012 16:56:48	File Name	C:\Users\Placebook\Documents\Material de Estudo\bruno\11\data\111r				
Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	<sup>13</sup> C	Number of Transients	860	Origin	spect
Original Points Count	1024	Owner	Administrator	Points Count	4096	Pulse Sequence	cp.av
Receiver Gain	2050.00	SW(cyclical) (Hz)	29761.90	Solvent	METHANOL-d4	Spectrum Offset (Hz)	9671.7783
Sweep Width (Hz)	29754.64	Temperature (degree C)	30.000				



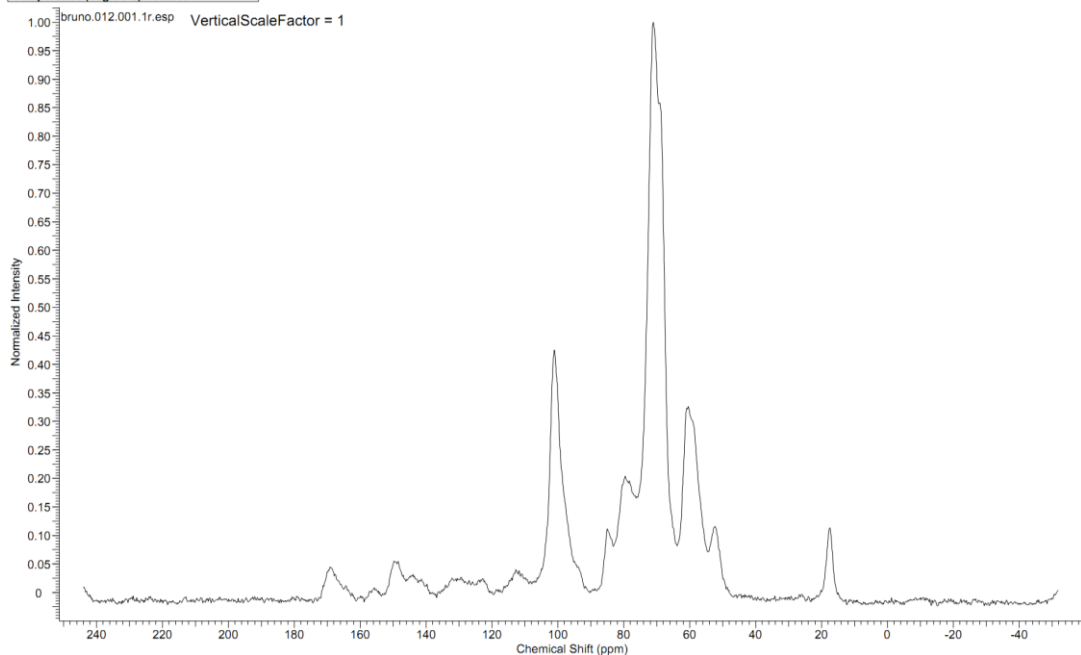
## 7.2.10. Amostra com extrativos

Acquisition Time (sec)	0.0344	Comment	AMOSTRA: Amostras com extrativos EXPERIMENTO: CP (8000 Hz)		Date Stamp	06 Dec 2012 09:11:44	
Date	06 Dec 2012 09:11:44	File Name	C:\Users\Placebook\Documents\Material de Estudo\bruno\11\data\111r				
Nucleus	<sup>13</sup> C	Number of Transients	1105	Origin	spect	Original Points Count	1024
Owner	Administrator	Points Count	4096	Pulse Sequence	cp.av	Receiver Gain	2050.00
SW(cyclical) (Hz)	29761.90	Solvent	METHANOL-d4	Spectrum Offset (Hz)	9671.7783	Sweep Width (Hz)	29754.64
Temperature (degree C)	30.000						



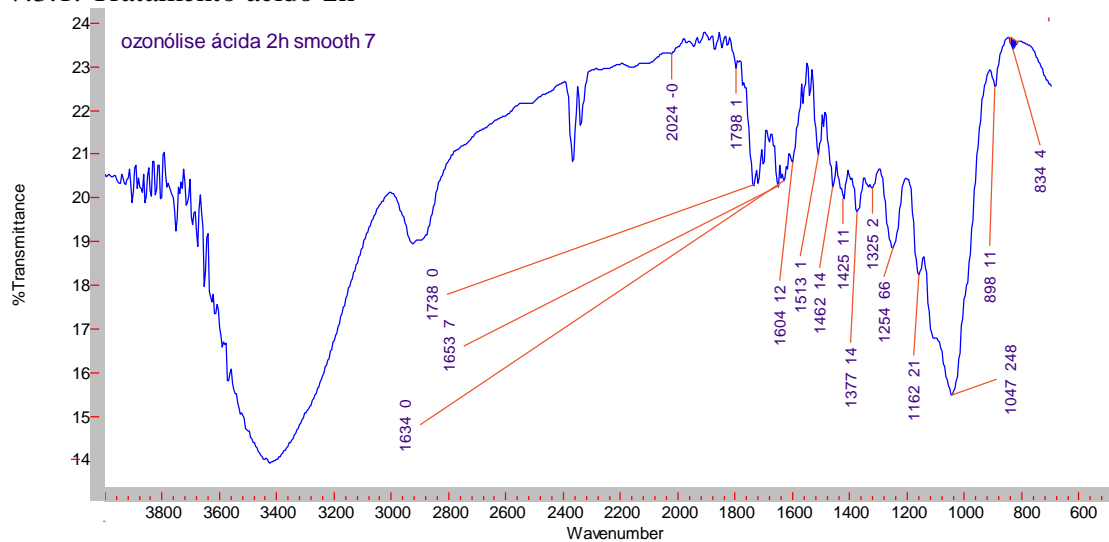
## 7.2.11. Amostra sem extrativos

Acquisition Time (sec)	0.0344	Comment	AMOSTRA: Amostras extraída etanol EXPERIMENTO: CP (8000 Hz)		
Date	06 Dec 2012 10:22:08	Date Stamp	06 Dec 2012 10:22:08		
File Name	C:\Users\Placebook\Documents\Material de Estudo\bruno\12\pdata\111r	Frequency (MHz)	100.61		
Nucleus	<sup>13</sup> C	Number of Transients	2048	Origin	spect
Owner	Administrator	Points Count	4096	Pulse Sequence	cp.av
SW(cyclical) (Hz)	29761.90	Solvent	METHANOL-d4	Spectrum Offset (Hz)	9671.7783
Temperature (degree C)	30.000			Sweep Width (Hz)	29754.64



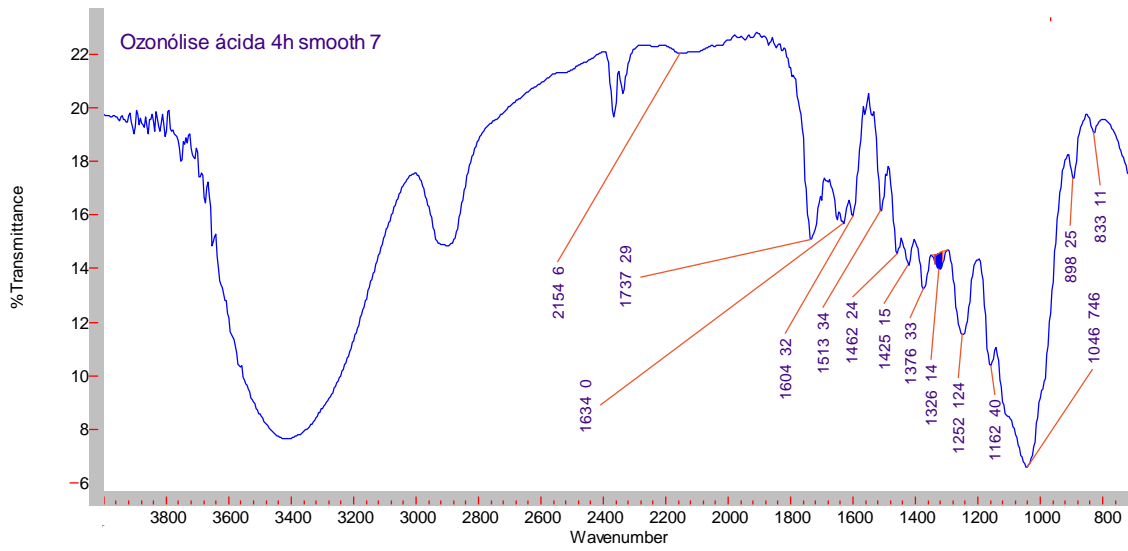
### 7.3: Infravermelho das amostras:

#### 7.3.1. Tratamento ácido 2h

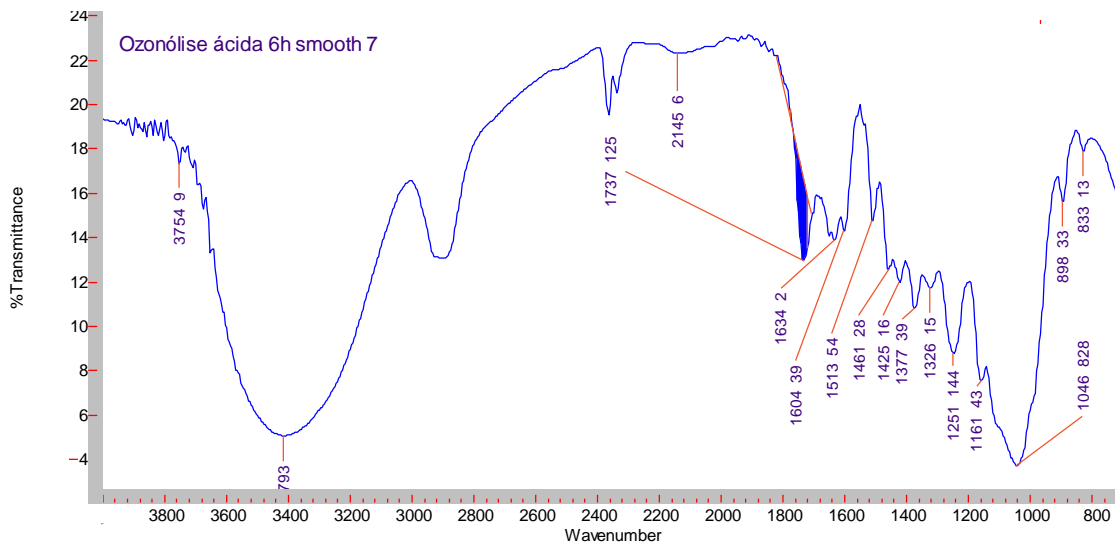


#### 7.3.2. Tratamento ácido 4h

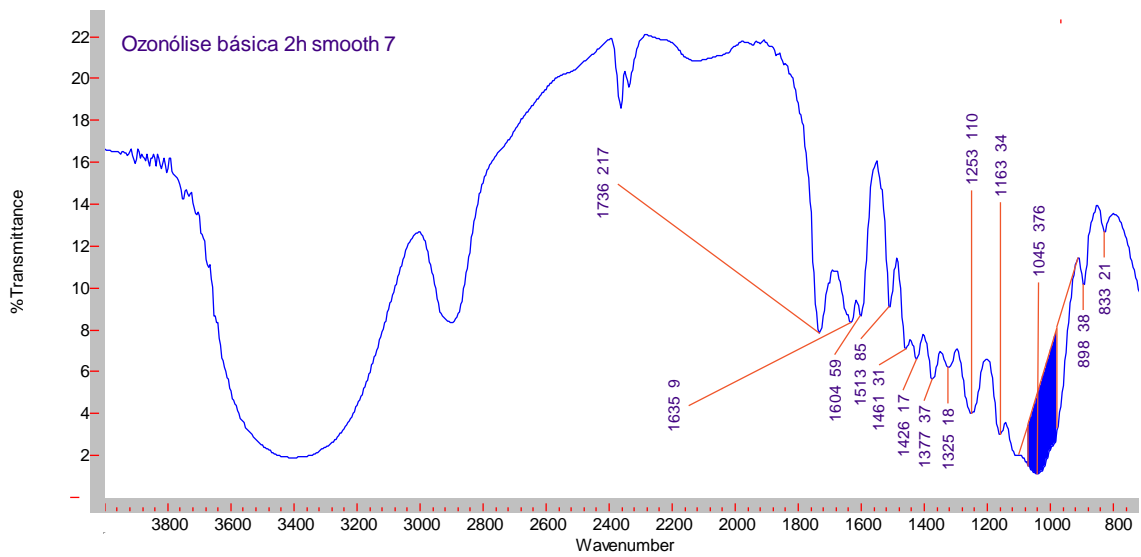




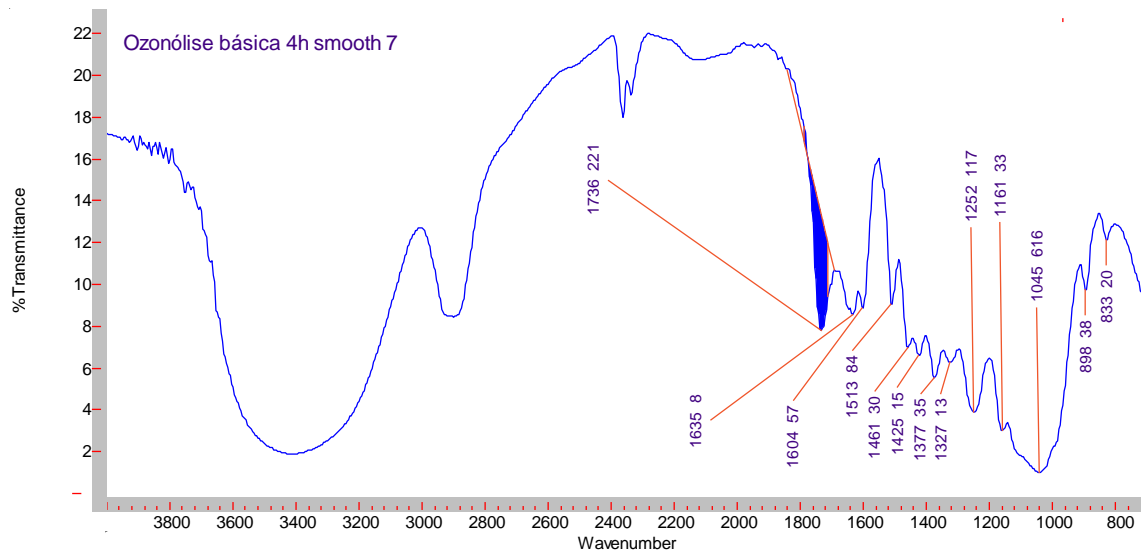
### 7.3.3 Tratamento ácido 6h



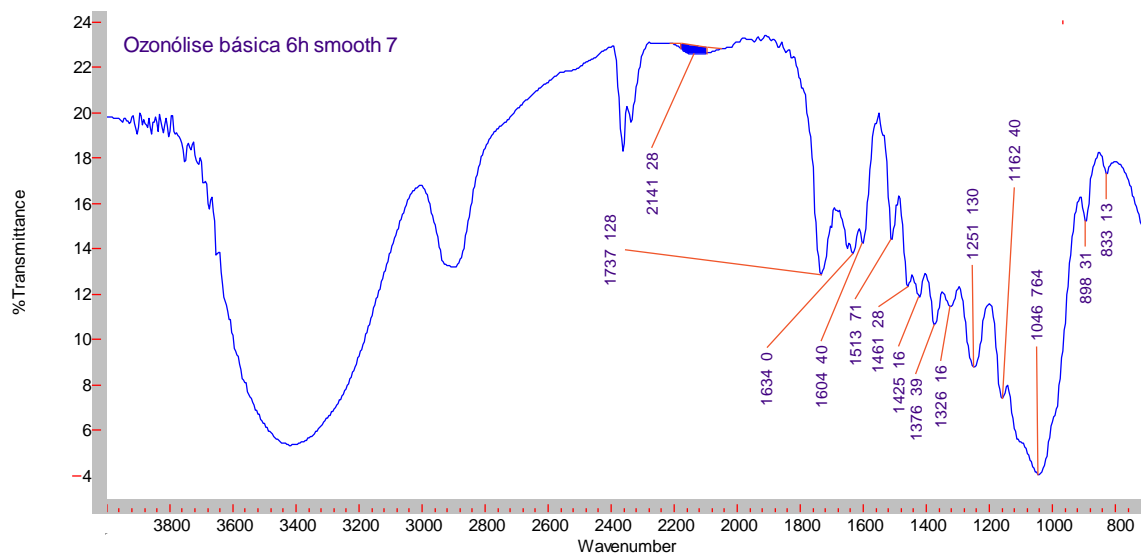
### 7.3.4. Tratamento básico 2h



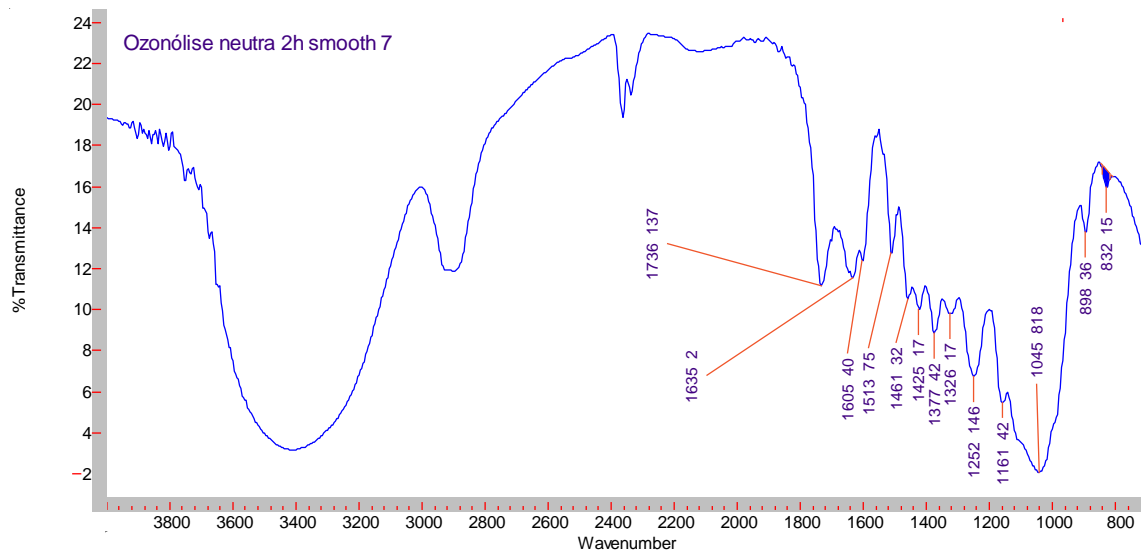
### 7.3.5. Tratamento básico 4h



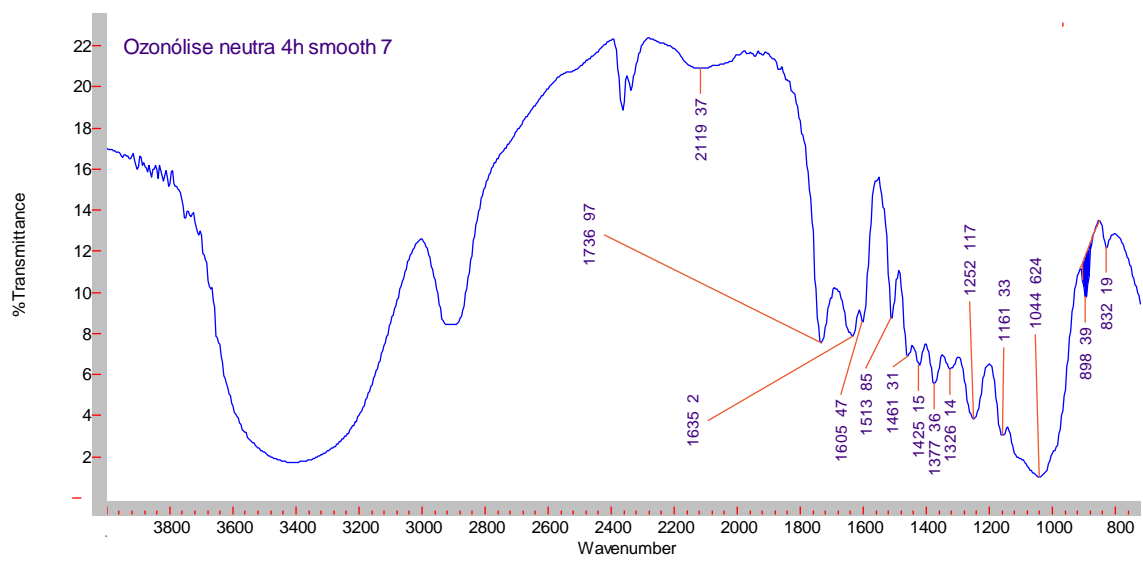
### 7.3.6. Tratamento básico 6h



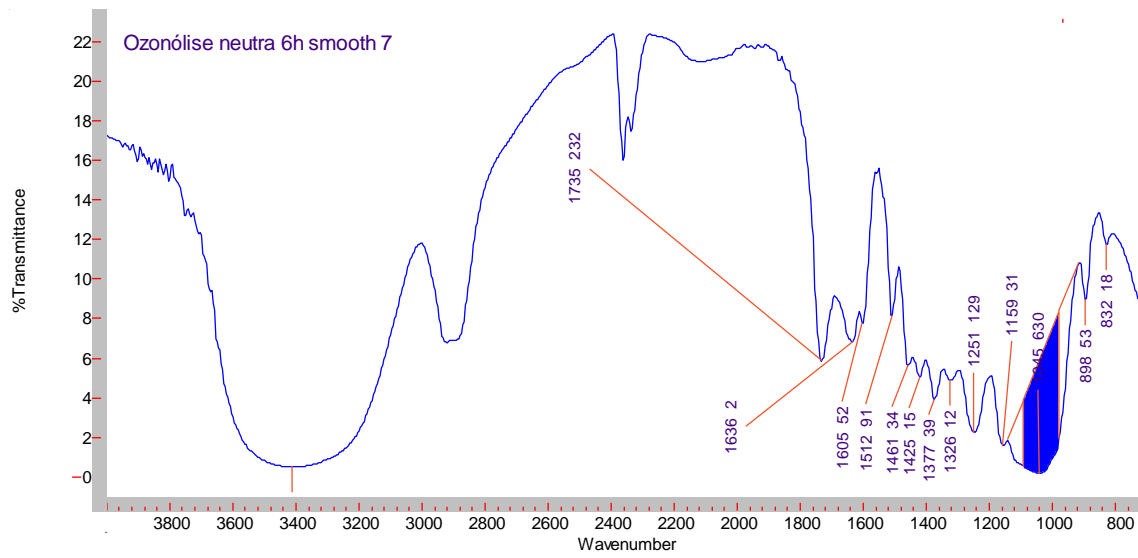
### 7.3.5. Tratamento neutro 2h



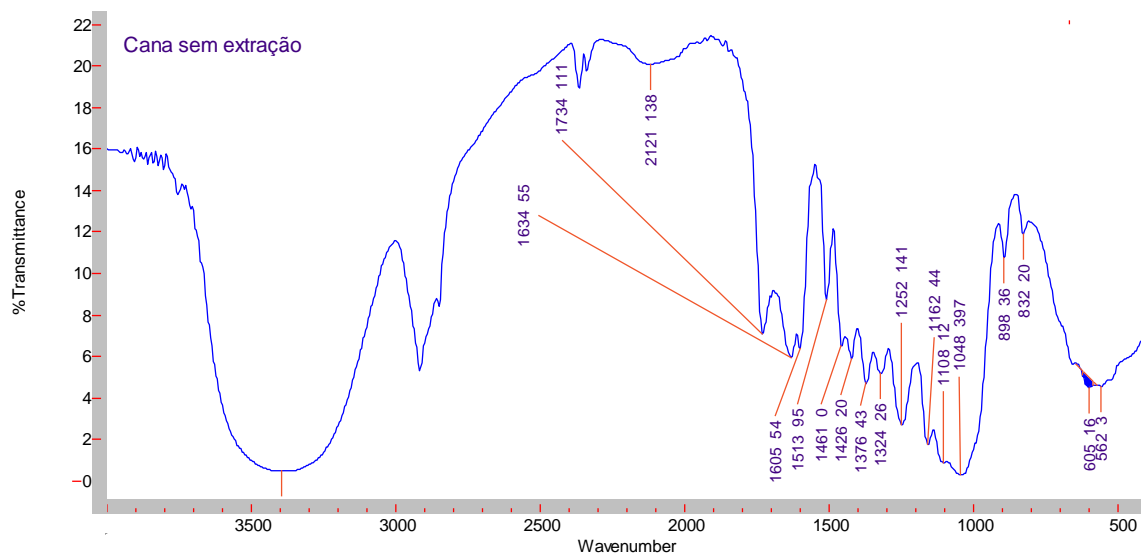
### 7.3.6. Tratamento neutro 4h



### 7.3.7. Tratamento neutro 6h



### 7.3.8. Material *in natura*



### 7.3.9. Material livre de açúcares

