



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

ROBSON MOREIRA MARTINS

**OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE LIGNINA DE MANDIOCA
UTILIZANDO SISTEMA ACELERADO POR SOLVENTE (ASE)**

FORTALEZA

2018

ROBSON MOREIRA MARTINS

OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE LIGNINA DE MANDIOCA
UTILIZANDO SISTEMA ACELERADO POR SOLVENTE (ASE)

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento de Química Analítica e Físico-química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Química com Habilitação Industrial.

Orientador Pedagógico: Prof.º Dr. Jair Mafezoli.

Orientador Profissional: Dr. Edy Sousa de Brito

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M345o Martins, Robson Moreira.
Otimização do método de extração de lignina de mandioca utilizando sistema acelerado por solvente (ASE) / Robson Moreira Martins. – 2018.
60 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Jair Mafezoli.
Coorientação: Prof. Dr. Edy Sousa de Brito.
1. Mandioca. 2. Lignina. 3. ASE. 4. RMN. I. Título.

CDD 540

ROBSON MOREIRA MARTINS

OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE LIGNINA DE MANDIOCA
UTILIZANDO SISTEMA ACELERADO POR SOLVENTE (ASE)

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento de Química Analítica e Físico-química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Química com Habilitação Industrial.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr. Jair Mafezoli (Orientador pedagógico)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Edy Sousa de Brito (Orientador profissional)

Embrapa Agroindústria Tropical

Dra. Lorena Mara Alexandre e Silva (Examinadora)

Embrapa Agroindústria Tropical

A todos aqueles que amo
e guardo no peito.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a minha tia, Maria de Fátima Moreira que sempre me incentivou a seguir meus planos e cumprir minhas metas. Um pilar extremamente importante e que sem ela, talvez não estivesse realizado esse sonho.

Aos meus pais, que mesmo não presentes, auxiliaram de longe toda essa longa caminhada.

A Elayne Regina que caminha comigo há quase 13 anos. Obrigado por me incentivar, me apoiar e escutar. Você foi e é essencial na vida.

Ao João Vyctor, Letícia Xavier, Maria Luiza, Thaynara Coutinho, Mateus Cajado, Luiza Vitória que ingressaram comigo nessa caminhada. Eu desejo a vocês todo o sucesso do mundo e muito amor.

A todos os amigos que conquistei na vida, muito obrigado por tudo. Sem vocês tudo isso teria sido mais difícil.

Ao Douglas Florêncio, que entrou na minha vida e mudou tudo. Obrigado pelo ombro para chorar, sorrir e desopilar. Obrigado por entrar na minha vida e torna-la mais especial. E por me amar mesmo com as dificuldades. Acredite você foi um divisor de águas.

Ao Edy de Souza Brito por ter me aceitado como orientando e por todo o cuidado prestado.

A Lorena Mara, técnica do Laboratório Multiusuário de Produtos Naturais, obrigado por toda a paciência e por todo o ensinamento que me ofereceu.

Ao Professor Jair Mafezoli, pela prontidão de me aceitar, primeiramente, como voluntário no LABFITO e por acompanhar esse processo de finalização de curso.

A Luís Gustavo, professor do departamento de Estatística da Universidade Federal do Ceará – UFC – por todo o apoio prestado pelo trabalho, pela paciência e amizade;

Ao grupo PET Química UFC que fez parte de toda a minha carreira universitária. Obrigado pelo aprendizado oferecido, pelas risadas dadas, pelos puxões de orelha, pois sem eles não teria acertado tanto nessa jornada.

A todos os participantes do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais – LMPQN. Sou muito agradecido pela atenção, pelo carinho e pelo tratamento maravilhoso nesse período que fui estagiário.

“As conquistas são apenas provas de que todo choro pode ser recompensado, e que chorar não é sintoma de fraqueza.”

- Autor Desconhecido

RESUMO

A mandioca é uma raiz tuberosa cuja utilização variada torna um produto benéfico para inúmeros países. Sua adaptação a clima tropicais e subtropicais além de solos pobres faz com que essa raiz sirva de base alimentar para países africanos, contribuindo também para economia desses países. A lignina é uma macromolécula formada pela polimerização de três álcoois, amorfa e que tem por característica aumentar a resistência da parede celular e conferir proteção contra patógenos. Sua molécula é bastante estudada devido a complexidade das ligações e diversidade e compostos que podem ser originados na sua extração. Este presente trabalho teve por finalidade aprimorar o método de extração de lignina utilizando-se do sistema acelerado por solvente (ASE) e compará-lo com o método de extração por Soxhlet, utilizou-se da técnica de ^1H - ^{13}C HSQC para estudar a qualidade dos extratos obtidos a partir dos componentes característicos da lignina como siringil, guaiacil.

Palavras-chave: Mandioca, Lignina, ASE, RMN.

ABSTRACT

Cassava is a tuberous root which varied use makes it a beneficial product for many countries. Its adaptation to tropical and subtropical climate as well as poor soils makes this root serve as a food base for African countries, also contributing to the economies of these countries. Lignin is a macromolecule formed by the polymerization of three alcohols, amorphous and that has a function is to increase the resistance of the cell wall and provide protection against pathogens. This molecule is well studied due to the complexity of the bonds and the diversity of compounds that can be originated in its extraction. This work aimed to improve lignin extraction using the solvent-accelerated system (ASE) and compare it with the Soxhlet extraction method applied the ^1H - ^{13}C HSQC technique to study the quality of the extracts obtained by the extraction methods, at different times, from the characteristic components of lignin such as syringyl, guaiacil.

Keywords: Cassava, Lignin, ASE, HSQC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Degradação da Linamarina	4
Figura 2: Representação da disposição das fibras celulose, hemicelulose e lignina	7
Figura 3: Ligações presentes nas moléculas de celulose	8
Figura 4: Componentes da Hemicelulose	9
Figura 5: Exemplo de interligação dos núcleos formadores da lignina.....	10
Figura 6: Síntese dos precursores das unidades p-hidroxifenil (H), Siringil (S) e Guaiacil (G).....	11
Figura 7: Proposta de estrutura de lignina presente em madeiras de angiospermas.....	12
Figura 8: Célula de extração do ASE	14
Figura 9: Imagem esquemática do Soxhlet.....	15
Figura 10: Etapa de Precipitação (a) Lignina 15 minutos e (b) lignina 60 minutos.....	22
Figura 11: Amostras preparadas para RMN	23
Figura 12: Espectro HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de lignina de mandioca ASE/T=45min.....	29
Figura 13: Espectro HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de lignina de mandioca ASE/T=60 min.....	30
Figura 14: Espectro HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de lignina de mandioca ASE/T=75 min.....	31
Figura 15: Espectro HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de lignina de mandioca ASE/T=90 min.....	32
Figura 16: Espectro HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de lignina e mandioca ASE/T=120 min.....	33
Figura 17: Espectro HSQC Lignina de mandioca ASE 120 min, ampliado	34
Figura 18: Espectro ^1H da lignina de mandioca ASE/ 45 min	36
Figura 19: Espectro ^1H da lignina de mandioca ASE/60 min	36
Figura 20: Espectro de ^1H de lignina de mandioca ASE/75min.....	37
Figura 21: Espectro ^1H da lignina de mandioca ASE/90 min	37
Figura 22: Espectro da lignina de mandioca ASE/ 120 min	38
Figura 23: HSQC da lignina Soxhlet.....	40
Figura 24: Espectro de ^1H da lignina Soxhlet.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais produtores mundiais de mandioca	5
Tabela 2: Porcentagem dos principais componentes em materiais lignocelulósicos	7
Tabela 3: Condições utilizadas na otimização da concentração de etanol	18
Tabela 4: Condições utilizadas na otimização da temperatura e quantidade de amostra	19
Tabela 5: Amostras em triplicatas para otimização de tempo de análise	19
Tabela 6: Massa de Madioca utilizado no processo de extração por Soxhlet	22
Tabela 7: Resultado dos extratos de lignina para diferentes concentrações de etanol ...	24
Tabela 8: Massa de lignina extraída nas células de 100 e 34 mL.....	25
Tabela 9: Variação da porcentagem de extração de lignina com o tempo	26
Tabela 10: Média e desvio padrão relacionado as extrações de lignina.....	27
Tabela 11: Resultados de fonte adicional de erro.....	28
Tabela 12: Porcentagem de S/G nas ligninas extraídas.....	34
Tabela 13: Tabela de deslocamento químico de hidrogênio	35
Tabela 14 Tabela de rendimento dos extratos obtidos por Soxhlet.....	39

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1: Otimização da extração de lignina.....	21
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Variação de massa de lignina com tempo, utilizando-se temperatura de 190°C e concentração de solvente 50% etanol/água.....	28
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 MANDIOCA	3
2.2 MANDIOCA NO BRASIL	4
2.3 MANDIOCA NO MUNDO.....	5
2.4 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MANDIOCA.....	5
2.5 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	6
2.5.1 Celulose.....	7
2.5.2 Hemicelulose	8
2.5.3 Lignina.....	9
2.6 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	13
2.6.1 ASE: Extração por solvente acelerado	13
2.6.2 Soxhlet	14
2.7 MÉTODOS DE ANÁLISE	16
2.7.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	16
2.7.2 Análise Estatística.....	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 EXTRAÇÃO DE LIGNINA POR ASE	18
4.1.1 Otimização da concentração de solvente.	18
4.1.2 Otimização da temperatura e quantidade de amostra.....	18
4.1.3 Otimização do tempo de extração.	19
4.2 MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR SOHXLET.....	22
4.3 PRECIPITAÇÃO DA LIGNINA	22
4.4 PREPARAÇÃO DA LIGNINA PARA ANÁLISE POR RMN.....	23

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
5.1 ANÁLISE DAS MASSAS DE LIGNINA NOS METODOS DE COMPARAÇÃO	24
5.1.1 Resultado de extração para diferentes concentrações de solvente.....	24
5.1.2 Comparação dos extratos das células de 100 mL e 34 mL com relação à temperatura de extração.	25
5.1.3 Análise dos resultados das ligninas extraídas em células de 34 mL com tempos de extração diferentes.....	25
5.1.4 Análise de espectros HSQC das amostras de lignina extraídas do ASE	29
5.1.5 Análise dos espectros de ¹H do ASE	35
5.1.6 Análise comparativa entre os métodos de ASE e Soxhlet.....	39
6 CONCLUSÕES.....	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) é um arbusto lenhoso as pertence à família das Euphobiaceae e é também conhecida como maniva e aipim. Caracteriza-se pela fácil adaptação em solos pobres e ambientes tropicais como de países asiáticos, africanos e latino americanos. A grande quantidade de amido presente em suas raízes faz com que seja considerada um alimento de grande importância para comunidades mais carentes e superpopulosas (FIGUEIREDO, 2012).

A produção anual de mandioca foi de 270 milhões de toneladas em 2012 com progressão para 290 milhões em 2020, sendo sua utilização dependente de cada país em qual é produzida (ZHU, 2015). Em países como a Nigéria, cerca de 80% da produção é voltada para abastecimento interno, enquanto que nos países asiáticos ocorre a exportação de produtos derivados da mandioca como farinha (LUZ; MOREIRA; CARDOSO, 2014).

A mandioca é constituída por material lignocelulósico, sendo lignina um dos maiores componentes (exceto em comparação com a celulose e hemicelulose). A lignina é obtida industrialmente pelo processo de polpação e pelas grandes variáveis associadas ao processo, sua estrutura é modificada de forma que sua destinação é em primeira instância como matriz energética (ABDELKAFI et al., 2011).

A lignina é uma macromoécula, hidrofóbica, tridimensional e altamente ramificada (OGATA, 2013). Está presente na parede celular, juntamente com a celulose e hemicelulose e confere rigidez, resistência e proteção as células e tecidos da planta. Considerada quimicamente amorfa, é formada pela polimerização de três tipos de álcoois principais (álcool coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico) acoplados a anéis aromáticos (CLARA; ARAÚJO, 2015).

A extração de lignina é discutida na literatura de diferentes formas. A utilização de tratamentos alcalinos e ácidos são boas alternativas industriais. A obtenção de ligninas mais puras e menos complexas são obtidas com tratamentos à base de solventes orgânicos (ARNI, 2018). Devido ao grande volume de solvente utilizado para obtenção de lignina, métodos que otimizem a extração utilizando-se menos solventes são bastante almejados. Dentro desse grupo estão presentes os métodos de extração por

solvente pressurizado, que combinam alta pressão e temperatura para aumentar a solubilidade do material no solvente (AZMIR et al., 2013).

O objetivo do presente trabalho foi o otimizar um método de extração de lignina por ASE e analisar semiquantitativamente a qualidade dos extratos utilizando-se da técnica de HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$

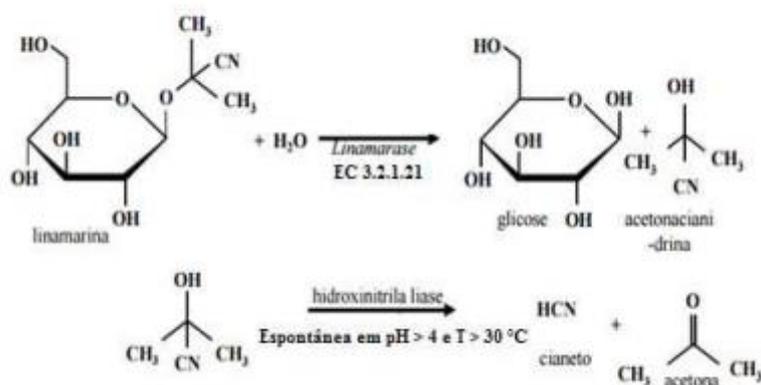
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MANDIOCA

A mandioca é classificada como arbusto pertencente à família *Euphorbiacea*. De origem na América do Sul é conhecida por ser rústica e se adaptar as condições climáticas. A grande produção anual torna a mandioca uma fonte para a nutrição e variadas aplicações, como na produção de energia, por exemplo, etanol e biocombustíveis (ZHU, 2015) (LUZ; MOREIRA; CARDOSO, 2014).

Domesticada na parte oeste central do Brasil a cerca de 10 000 anos atrás, contribuiu como fonte básica de alimento para os americanos anteriores a chegada de Colombo. No período das navegações, a mandioca chegou à África através dos Portugueses, constituindo-se atualmente como um dos principais produtos de base no continente africano, juntamente com o milho (SHIGAKI, 2016). A mandioca também constitui uma fonte de alimentação animal, principalmente nos arredores das indústrias de produção de fécula. A produção de resíduos sólidos (bagaço) é bastante elevada, chegando a cerca de 900 kg por tonelada de raiz processada. Devido à grande capacidade de retenção de água do bagaço, dificuldade no transporte e secagem a mandioca tem destino quase imediato para alimentação animal, devido ao alto grau de carboidratos e fibras presentes (MATSUI et al., 2003).

Apesar de muito utilizada na alimentação humana, a utilização da mandioca como alimento enfrenta problemas devido à presença de glicosídeos cianogênicos. Quando ocorre a quebra dos tecidos vegetais o glicosídeo linamarina é clivado em glicose e acetonacianodrina pela ação da enzima linamarase, a qual não é inativada com o calor da cocção. Por conseguinte, ocorre à geração de HCN através da degradação da acetonacianodrina pela enzima hidroxinitriliase, conforme Figura 1 (FIGUEIREDO, D.M.; CZAMANSKI, R.T; BARCELOS, 2012; VALDIR CARNEIRO SILVA, 2016).

Figura 1: Degradação da Linamarina

Fonte: (VALDIR CARNEIRO SILVA, 2016)

A geração de HCN leva a classificação da mandioca como mansa ou doce e brava ou amarga. A mandioca com potencial de gerar acima de 100 mg/kg de HCN são consideradas bravas, abaixo desse valor são consideradas mansa. A ingestão é um fator preocupante, uma vez que pH ácidos facilitam a hidrólise dos cianogênicos (FIGUEIREDO, D.M.; CZAMANSKI, R.T; BARCELOS, 2012).

A diferença básica entre os dois tipos de mandioca está relacionada com a sua destinação. Enquanto as bravas são utilizadas para obtenção de farinha e extração de amido, as mansas são mais versáteis, sendo utilizadas da mesma forma que as bravas ou também consumidas cozidas ou fritas (LOSADA VALLE et al., 2004).

2.2 MANDIOCA NO BRASIL

O Brasil destaca-se como um centro produtor de mandioca. Em 2016 o Brasil apresentou uma produção de 23,71 milhões de toneladas de raiz de mandioca, tornando-se o quarto produtor mundial desse alimento (CONAB, 2017). A produção está associada as grandes regiões de cerrado brasileiro, cujas terras caracterizadas pela rusticidade facilitam o plantio, em sua maioria voltada à produção de amido. (RINALDI; VIEIRA, 2015)

Dentre os estados brasileiros, o Pará se destaca como o maior produtor de raiz de mandioca, com safra de 5,17 milhões de toneladas, seguido de Paraná e Bahia com produção de 2,79 e 1,74 milhões de toneladas em 2016, respectivamente (CONAB, 2017). Apesar dessa produção, determinados estados como o Para tem sua produção diminuindo devido à erosão favorecida pelo plantio de mandioca. Em muitos casos faz-

se necessário a adoção de medidas conservacionistas como o cultivo mínimo (GONZALES et al., 2014).

2.3 MANDIOCA NO MUNDO

A mandioca é produzida em mais de 100 países tropicais e subtropicais devido ao uso eficiente da água e dos nutrientes do solo. A resistência a pragas e a tolerância a diversas condições climáticas faz com que a mandioca tenha rendimentos mundiais razoáveis com poucos insumos. (SHIGAKI, 2016)

Estima-se que em 2012 foram produzidas mais de 280 milhões de toneladas mundialmente. Um aumento de 60% em relação ao ano de 2000. Os rendimentos globais aumentaram cerca de 1,8% na última década, o que representa 12,8 toneladas por hectare (FAO, 2013). Os principais países produtores podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1: Principais produtores mundiais de mandioca

Posição	País	Produção de mandioca (t)
1	Nigéria	47,406,770
2	Tailândia	30,227,542
3	Indonésia	23,936,920
4	Brasil	21,484,218
5	Angola	16,411,674
6	Gana	15,989,940

Fonte: World Atlas, 2017

Em regiões tropicais essa produção é favorecida pelo clima seco, sem fertilizantes, onde inúmeras outras culturas não podem crescer (SHIGAKI, 2016). Cerca de 80% da mandioca produzida na África é para consumo humano, devido a subnutrição, enquanto em outros continentes como a Ásia se impõe um mercado exportador de produtos à base de mandioca (LUZ; MOREIRA; CARDOSO, 2014).

2.4 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MANDIOCA

As composições das raízes de mandioca variam com a posição geográfica, características de solo e condições ambientais nas quais estão inseridas (MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO, 2009). Considerada uma raiz tuberosa tem a sua composição química básica formada por água, amido, carboidrato redutores, fibras que podem ser solúveis ou insolúveis, proteínas e lipídeos (FIGUEIREDO, 2012).

É composta essencialmente de carboidratos (32 a 35%), dos quais 80% é amido. As raízes ainda contêm pequenas quantidades de açúcares como sacarose, glicose, frutose e maltoses, tendo porcentagens diferentes nos tipos de mandioca, por exemplo, algumas variedades de mandioca doce possuem 17% de composição de sacarose (MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO, 2009).

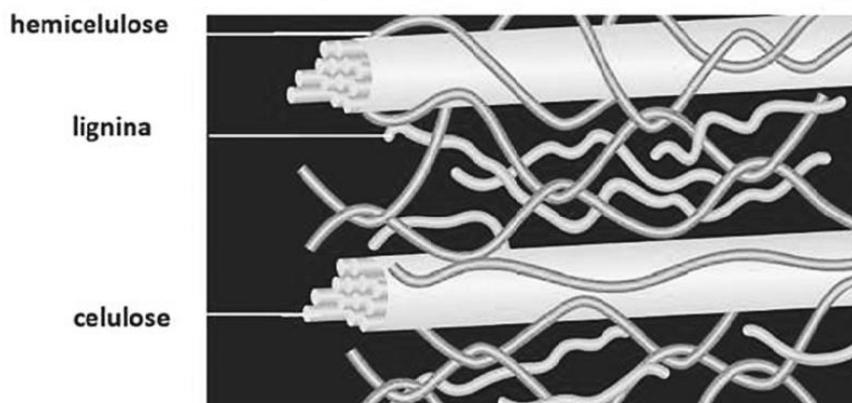
As raízes de mandioca contem minerais como cálcio, ferro, magnésio, zinco e manganês além de grande quantidade de vitamina C (15 a 45 mg / 100 g). O conteúdo presente de cálcio se comparado a outro cultivo de base como milho é alto e varia entre 15 e 35 mg/100 g de material, além de ser grande fonte de potássio (MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO, 2009; SHIGAKI, 2016).

O conteúdo de proteínas e aminoácidos é baixo não ultrapassando 3% do valor total. Desse conteúdo, 50% são proteínas e 50% são aminoácidos, predominantemente o ácido aspártico, além de outros compostos não protéicos como os cianogênicos, os nitritos e nitratos (SHIGAKI, 2016).

As etapas de processamento em alguns casos terminam por diminuir as quantidades de minerais, vitaminas, proteínas e gordura disponíveis. As maiores quantidades desses componentes se concentram na casca da raiz e não na raiz descascada, ou seja, dependendo do processamento, tem seu valor nutricional diminuído em comparação a outros tubérculos (MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO, 2009).

2.5 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Formados por estruturas firmes e fibrosas, os materiais lignocelulósicos são compostos em sua maioria pelos polissacarídeos (celulose e hemicelulose), cujas estruturas são separadas por macromoléculas compostas de aromáticos e álcoois (ligninas) exemplificado na Figura 2. Dependendo da origem do vegetal podem ser encontrados outros compostos como ácidos graxos, compostos nitrogenados e sais minerais (SILVA, 2010).

Figura 2: Representação da disposição das fibras celulose, hemicelulose e lignina

FONTE: (BATISTA; CHAVES, 2014)

A biomassa lignocelulósica é a mais abundante do mundo com cerca de 200 bilhões de toneladas produzidas anualmente, sendo sua utilização para conversão de energia e produtos químicos uma área de rápido crescimento (ERDOCIA et al., 2014). Deste modo, faz-se necessário conhecer as principais características dos componentes lignocelulósicos. Na Tabela 2 pode-se visualizar a participação dos componentes de fibra na composição celulares de algumas plantas (BATISTA; CHAVES, 2014; SILVA, 2010)

Tabela 2: Porcentagem dos principais componentes em materiais lignocelulósicos

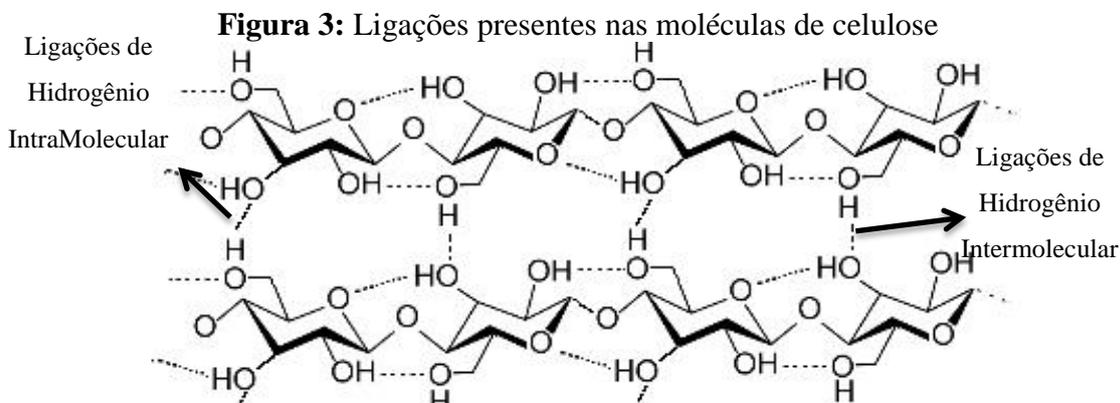
Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Farelo de cevada	23,0	32,7	24,4
Bagaço de cana	40,2	26,4	25,2
Folhas de milho	37,6	34,5	12,6
Palhas de trigo	33,8	31,8	20,1
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3

Fonte: (SILVA, 2010)

2.5.1 Celulose

A celulose é um polímero natural com alta força e rigidez por unidade de peso. Conhecido por ser um polissacarídeo estrutural presente em madeira e em fibras agrícolas, também pode ser obtido de microrganismos como bactérias. Caracteriza-se por ser altamente comercializada mundialmente, principalmente para a indústria de papel e celulose (JONOOBI et al., 2015).

A celulose pode fazer parte de 23% a 50% da biomassa lignocelulósica (Tabela 2). São basicamente unidades de β -D-glicoses unidas por ligações glicosídicas β -1-4 carbono-carbono e por ligações de hidrogênio intermoleculares (SILVA, 2010).



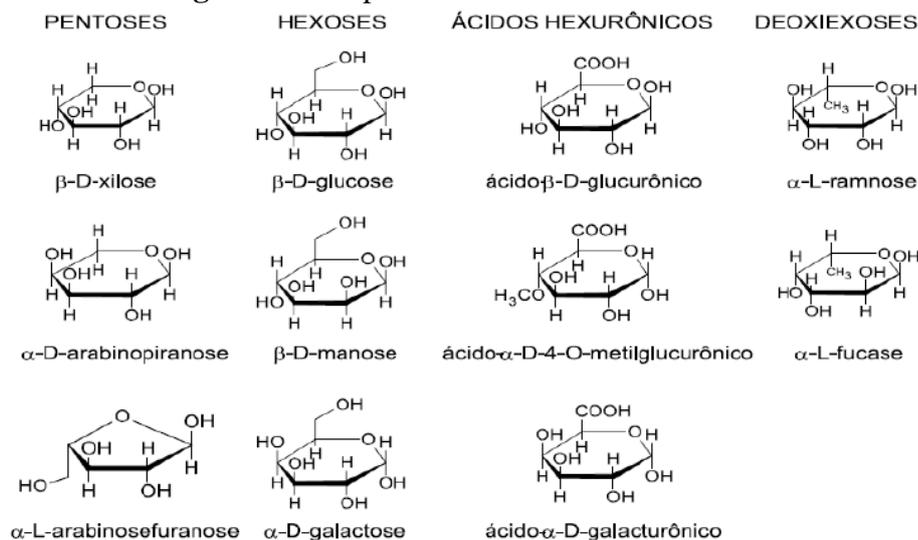
Fonte: JONOBI et al., 2015 (Adaptado).

A cadeia celulósica é formada através das interações vistas na Figura 3. Ocorrem interações do grupo OH, que dão origem tanto as ligações de hidrogênio intermoleculares (na mesma cadeia de celulose) quanto as intramoleculares (com as cadeias adjacentes). Essas ligações são responsáveis por algumas características físicas e químicas desse polímero. Por exemplo, as ligações intramoleculares conferem rigidez a molécula, enquanto as ligações intermoleculares, quando organizadas, irão formar as fibras vegetais (BENAR, 1992).

2.5.2 Hemicelulose

A hemicelulose é geralmente associada à celulose na parede celular dos vegetais. Também chamadas de polioses, a hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante da parede celular. Apresentam-se mais semelhantes em composição com a celulose do que a lignina, sendo encontrada anteriormente a camada de lignificação da parede celular. (OGATA, 2013; SILVA, 2010)

São caracterizados por serem heterogêneos e um polissacarídeo de baixa massa molecular. Consiste em uma cadeia ramificada de açúcares que podem ser aldopentoses (xilose e arabinoses) e aldohexoses (glicose, manose e galactose). A molécula de hemicelulose ainda contém ácidos como β -d-Glucômico e β -D-galactâmico entre outros componentes que podem ser visto na Figura 4 (BATISTA; CHAVES, 2014).

Figura 4: Componentes da Hemicelulose

Fonte: (OGATA, 2013)

Apesar da celulose e a hemicelulose serem formadas por açúcares, são polissacarídeos com características diferentes. A celulose é formada por dímeros de glicose, não tem ramificação, possui cadeias de alta polimerização e cristalinização. Já as hemiceluloses são compostas por diferentes açúcares, tem cadeia ramificada e em comparação a celulose é considerada amorfa (PASQUINI et al., 2010). Entretanto, a presença conjunta desses dois polissacarídeos favorecem as propriedades como o intumescimento e o aumento da flexibilidade (BENAR, 1992).

2.5.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula de alta abundância na natureza. Caracterizada por ser hidrofóbica, possui estrutura tridimensional e amorfa altamente ramificada. É o terceiro componente na parede celular, chegando a compor até 30% da massa total seca (OGATA, 2013).

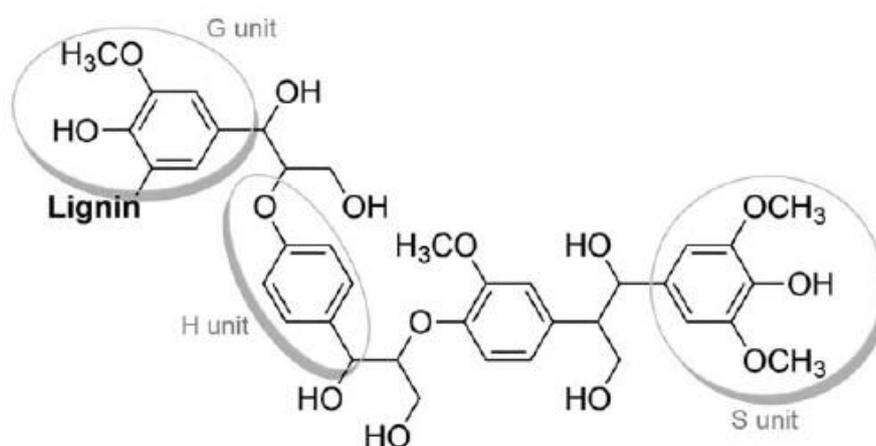
Essa macromolécula está presente na lamela média, na parede primeira e secundária de células fibrosas e confere rigidez e resistência à compressão as células e proteção dos tecidos contra ataques de patógenos, além de ser responsável pelo transporte de água, nutrientes e metabólitos. (CLARA; ARAÚJO, 2015)

A lignina presente em materiais lignocelulósicos possui composição de monômeros dependendo de sua fonte de obtenção. Existem 3 tipos principais de lignina: (1) ligninas de gimnospermas (madeiras macias); (2) angiospermas (madeira dura) e (3) provenientes de herbáceas, cuja importância cresce junto com as pesquisas de

combustíveis renováveis como bioetanol de biomassa (BURANOV; MAZZA, 2008).

Quimicamente é um complexo amorfo derivado da polimerização de 3 tipos principais de álcoois: o álcool coniferílico, sinapílico e p-cumarílico. Estes estão acoplados em núcleos aromáticos de fenilpropanoides ou p-hidroxifenilo (H), guaiacil (G) e unidades de siringil (S). A porcentagem relativa desses componentes na lignina irá depender das espécies de materiais das quais elas são originadas (OLIVEIRA et al., 2017). As estruturas e ligações desses núcleos podem ser visto na Figura 5.

Figura 5: Exemplo de interligação dos núcleos formadores da lignina

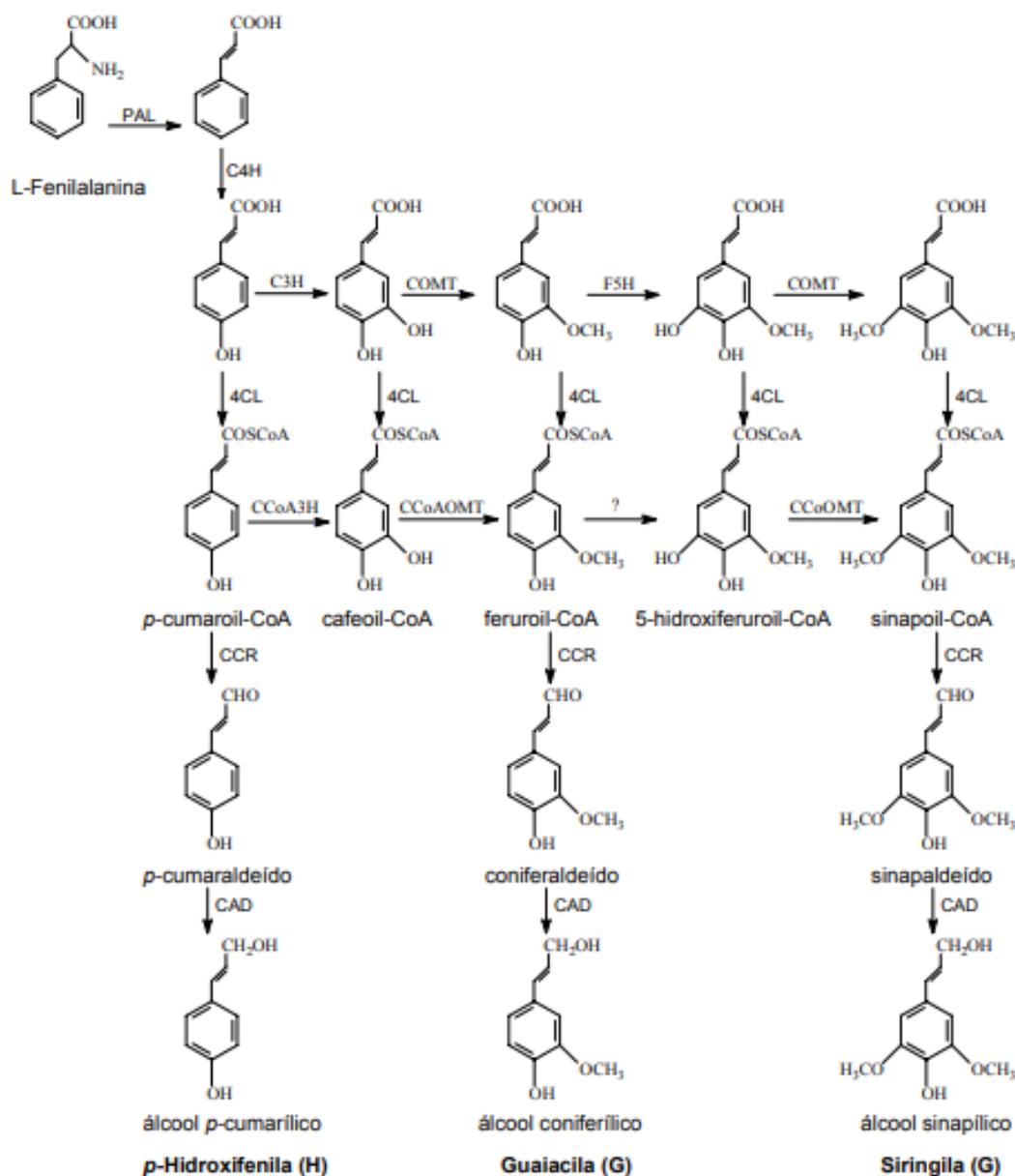


Fonte: OLIVEIRA et al., 2017

O processo de lignificação deriva de uma biossíntese bastante específica. São duas rotas principais para a produção dos monômeros da lignina que servirão de base para a polimerização: (1) ácido chiquímico e (2) ácido cinâmico, cuja rota de biossíntese depende dos precursores fenilalanina e tirosina produzidos pelas rotas metabólicas do ácido chiquímico (REGINA ÁLVARES MALTHA et al., 2007).

A Figura 6 mostra a síntese desses materiais a partir da rota do ácido cinâmico. Nessa rota, as unidades de lignina são obtidas pela desaminação da fenilalanina pela enzima fenilalanina amonialiase (PAL), o que leva a formação de grupos cinamoil-CoAs. Esses grupos dão origem aos compostos fenólicos, base das unidades de siringil (S), guaiacil (G) e p-hidroxifenil (H) (BAUCHER et al., 1998).

Figura 6: Síntese dos precursores das unidades p-hidroxifenil (H), Siringil (S) e Guaiacil (G)



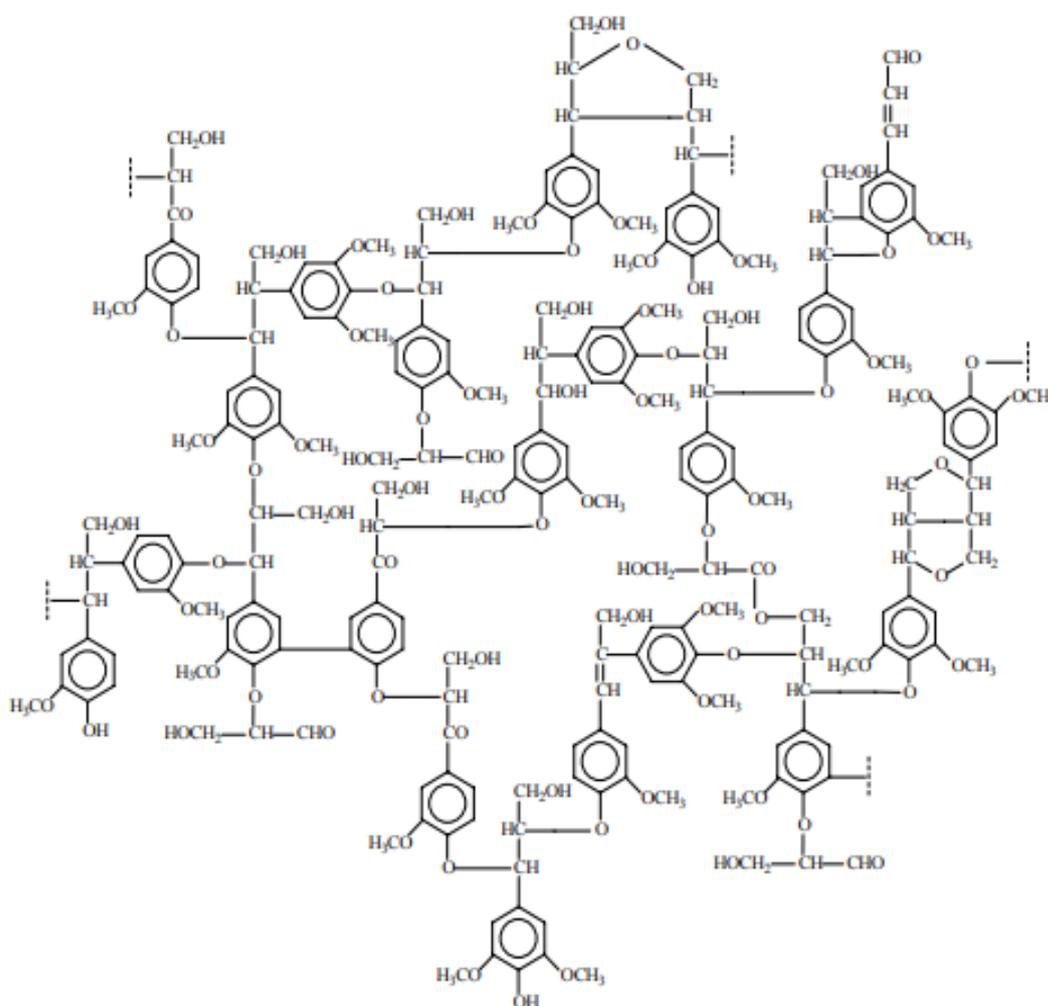
Fonte: REGINA et al., 2007

Por ser complexa e irregular, a estrutura da lignina vem sendo amplamente estudada e alguns modelos de estruturas são propostas (Figura 7). A estrutura da lignina não pode ser isolada de forma inalterada caso seja utilizada um método químico de extração, devido as fortes ligações das ligninas formadoras do complexo LCC. O LCC é uma nomenclatura desenvolvida para definir as ligações covalentes existentes entre ligninas e polissacarídeos, principalmente a hemicelulose, que passam a impedir a separação seletiva dos componentes da madeira. Apesar da pouca quantidades em

madeira, é de grande importância para sustentação da parede celular (ABDELKAFI et al., 2011).

A falta de técnicas ideais que sejam capazes de fornecer informações quantitativas para toda a lignina e várias ligações do complexo LCC ainda são escassas. No entanto, já existem métodos quantitativos eficientes desenvolvidos como a oxidação por nitrobenzeno e pirolise que geram produtos específicos de componentes da lignina derivados do siringil e guaiacol, por exemplo. A ligação dos produtos gerados ainda é bastante subjetiva, o que dificulta o trabalho de determinação (BALAKSHIN et al., 2011; YUAN et al., 2011).

Figura 7: Proposta de estrutura de lignina presente em madeiras de angiospermas



Fonte: REGINA et al., 2007

2.6 METODOS DE EXTRAÇÃO

As técnicas utilizadas para decompor a biomassa dividem-se em métodos físicos, químicos e biológicos. Os métodos físicos e químicos de tratamento podem transformar a biomassa em diferentes componentes. Enquanto o tratamento físico reduz o tamanho da matéria prima a fim de facilitar o acesso a partes mais internas da planta, os tratamentos químicos visam decompor a biomassa a partir da hidrólise. A hidrólise visa quebrar as ligações de hidrogênio presentes para retirada de lignina e ou hemicelulose, juntamente com a modificação da celulose. Métodos alcalinos utilizando hidróxido de sódio e sua combinação com uma mistura de dioxano e ácido clorídrico e métodos iônicos de extração, são alguns exemplos dessa metodologia (ARNI, 2018).

O advento da química verde e a procura de melhores fontes de extração fazem com que modelos anteriormente citados sejam inviáveis sustentavelmente. Atualmente, são bastante estudadas técnicas que visam aumentar a capacidade do solvente de interação com a matéria prima e, conseqüentemente, seu poder de extração. Extração acelerada por solvente (ASE) ou líquido pressurizado (PLE), Soxhlet, líquido supercrítico (SFE) e variadas especialidades de extração por micro-ondas e ultrassom são aplicadas nas metodologias de plantas medicinais (AZWANIDA, 2015).

O levantamento bibliográfico realizado não obteve registros de métodos específicos de extração para esse tipo de raiz, apesar de o processo de deslignificação ser bastante discutido por diversos autores, resultando na escolha por metodologias já definidas para processos de extração de conteúdos vegetais.

2.6.1 ASE: Extração por solvente acelerado

Extração por solvente acelerado é também conhecido como extração por líquido pressurizado (PLE). É uma técnica desenvolvida como alternativa para métodos de extração tradicionais, como o Soxhelt e a maceração, tendo em vista que oferece vantagens no que diz respeito ao tempo de extração, consumo de solventes e reprodutividade (KAUFMANN; CHRISTEN, 2002).

A amostra é embalada com material inerte (terra diatomácea) em uma célula de extração de aço inox (Figura 8) para evitar que a amostra se agregue e acabe por bloquear o sistema de tubos. (AZWANIDA, 2015). A técnica consiste em uma aplicação de alta pressão para que o solvente a ser utilizado permaneça em seu estado líquido a uma temperatura acima do seu ponto de ebulição (AZMIR et al., 2013).

Figura 8: Célula de extração do ASE



Fonte: Autor

O processo de extração consiste em 5 etapas: (1) “filling and pressuring cell” ou etapa de pressurização, onde o solvente em questão é pressurizado; (2) “heating cell” ou etapa de aquecimento da célula, nesse momento a célula (Figura 8) é aquecida até a temperatura selecionada; (3) “static extration” extração que ocorre a pressão e temperatura constante; (4) lavagem da célula com solvente para total recuperação de produtos e (5) etapa de purga com nitrogênio (purge) (CONTE et al., 1997).

A combinação da alta pressão e a temperatura faz com que o ASE seja uma excelente alternativa para processos de extração, visto que esses fatores produzem uma extração mais rápida. A temperatura de extração mais alta pode ocasionar (1) o aumento da solubilidade do analito e, conseqüentemente, o aumento da massa extraída e (2) a diminuição da viscosidade de solventes, melhorando assim a taxa de extração e rendimento em menor tempo de análise (AZMIR et al., 2013).

2.6.2 SOXHLET

Os compostos de plantas podem ser extraídos por diferentes técnicas clássicas. O princípio básico fundamenta-se no poder de extração de diferentes solventes, ou misturas, e sua combinação com calor. O soxhlet foi primeiramente projetado para extração de lipídeos, hoje carrega grande importância para extração de materiais bioativos valiosos de fontes naturais. É utilizado como fonte de comparação para outros métodos de análise e validação de novos métodos (AZMIR et al., 2013).

Figura 9: Imagem esquemática do Soxhlet



Fonte: Autor

O método baseia-se no sistema de refluxo. Uma pequena quantidade amostra seca é colocada em um dedal. Esse dedal é acoplado a um balão que contém o solvente de interesse. Esse solvente é aquecido e ao entrar em ebulição condensa sobre o dedal que contem a amostra. Após passar pelo dedal, a solução é recolhida num porta dedal e ao chegar a um nível suficiente de transbordamento é aspirado para dentro de um balão (AZMIR et al., 2013; ROUTRAY; ORSAT, 2012).

O uso do método de extração soxhlet em comparação com outros métodos modernos como os que utilizam solventes pressurizadas é bastante discutido por diversos autores. A combinação de longas horas de extração, altas temperaturas, além de grandes quantidades de solventes levam a levantar questões atuais como a química verde (AZMIR et al., 2013).

Os métodos de extração de lignina são estudados principalmente como forma de melhorar e acelerar os processos de deslignificação. Extrações mais eficientes convergem para buscar métodos mais específicos como o uso de solventes pressurizados. No entanto métodos como Soxhlet ainda são utilizados, pois são capazes de retirar compostos importantes presentes nos vegetais (ARNI, 2018).

2.7 MÉTODOS DE ANÁLISE

2.7.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN fundamenta-se na absorção de ondas de radiofrequência por um núcleo interno a um campo magnético externo forte (300 a 900 MHz) ou de campo fraco (1 a 23 MHz). A diferença contida nesses dois aparelhos está relacionada à sensibilidade, ou seja, quanto maior o campo aplicado ao núcleo maior a resolução espectral do equipamento (LIMA et al., 2012).

O uso em conjunto do RMN ^1H e ^{13}C passou a permitir uma determinação mais precisa de inúmeros parâmetros estruturais, tais como percentual de substituição do sistema e fração de carbono aromático. Devido a isso, a ressonância magnética nuclear vem nas últimas décadas sendo amplamente utilizada como fonte de caracterização de misturas além de auxiliar na confirmação de análises complexas não possíveis por outros métodos (OLIVEIRA, 2013).

2.7.2 Análise Estatística

Modelos lineares são aplicados para determinação de inúmeros fatores de efeitos, como o erro experimental de conjunto de amostras. Vem sendo amplamente utilizado para o estudo de aspectos teóricos de várias complexidades. No presente trabalho foram aplicados a análise de modelos considerados mistos, ou seja, são considerados modelos que apresentam peculiaridades que devem ser reconhecidos. A escolha do método linear misto residia no conhecimento de que deveria ser prescrito efeitos aleatórios, como erros associados a amostra (ANTONIO; FILHO, 2003).

Para o auxílio no método de modelos lineares mistos são utilizados programas específicos de computador para atribuição de valores importantes, exemplificando-se o software R com auxílio do pacote lme4 na estimativa dos variáveis e parâmetros inerentes ao modelo desenvolvido.

3 OBJETIVOS

Otimizar o método de extração de lignina de mandioca utilizando sistema acelerado por solvente (ASE).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as ligninas obtidas pelo ASE com as ligninas do método tradicional de extração de ligninas (Sohxlet)
- Analisar por ressonância magnética nuclear (RMN) a qualidade das ligninas através da relação siringil e guaiacil presentes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EXTRAÇÃO DE LIGNINA POR ASE

Amostras de várias origens foram reunidas (Dourada I, Dourada II , 2009 09-05 I, 2009 09-05 II , Eucalipto I, Eucalipto II, 2009 02-13 I e 2009 02-13 II, Saracura I, Saracura II, 2009 12-20 I, 2009 12-20 II e Brasil) e homogeneizadas resultando em uma amostra padrão com peso total de 328,85 g. As extrações foram realizadas em equipamento Dionex ASE 350, em ciclos únicos por tempo predeterminado.

4.1.1 Otimização da concentração de solvente.

Nesta etapa foram utilizadas duas concentrações de solventes para extração. A primeira com 60% etanol/água (v/v) e a segunda com 50% etanol/água (v/v). Para ambas as extrações foram utilizadas células de 100 mL, massa de mandioca contida na Tabela 3, utilizando-se uma proporção 5:2 de mandioca e terra diatomácea, 30 mM H₂SO₄, tempo de 75 minutos e temperatura de 180 °C.

Tabela 3: Condições utilizadas na otimização da concentração de etanol

Massa Mandioca (g)	Concentração	Temperatura (°C)	Tempo (min)
20,0115	60% Etanol	180	75
20,0166	50% Etanol	180	75

Fonte: Autor

4.1.2 Otimização da temperatura e quantidade de amostra.

Nesta etapa utilizou-se o solvente de extração 50% etanol/água (v/v), bem como a mesma proporção 5:2 de massa de mandioca e terra diatomácea. Foram utilizados dois tamanhos de células, duas temperaturas de extração e um tempo de 60 minutos, conforme Tabela 4.

Tabela 4: Condições utilizadas na otimização da temperatura e quantidade de amostra

Célula	Massa Mandioca (g)	Concentração	Temperatura (°C)	Tempo (min)
100 mL	20,0115	50% Etanol	180	60
100 mL	20,0414	50% Etanol	190	60
34mL	5,7522	50% Etanol	190	60

Fonte: Autor

4.1.3 Otimização do tempo de extração.

Foram pesadas massas de amostra de mandioca utilizando-se da mesma metodologia do item 4.1.2 para as células de 34 mL, realizando-se triplicatas para cada 15 minutos de extração conforme a Tabela 5. O Fluxograma 1 mostra a rota de otimização do processo.

Tabela 5: Amostras em triplicatas para otimização de tempo de análise

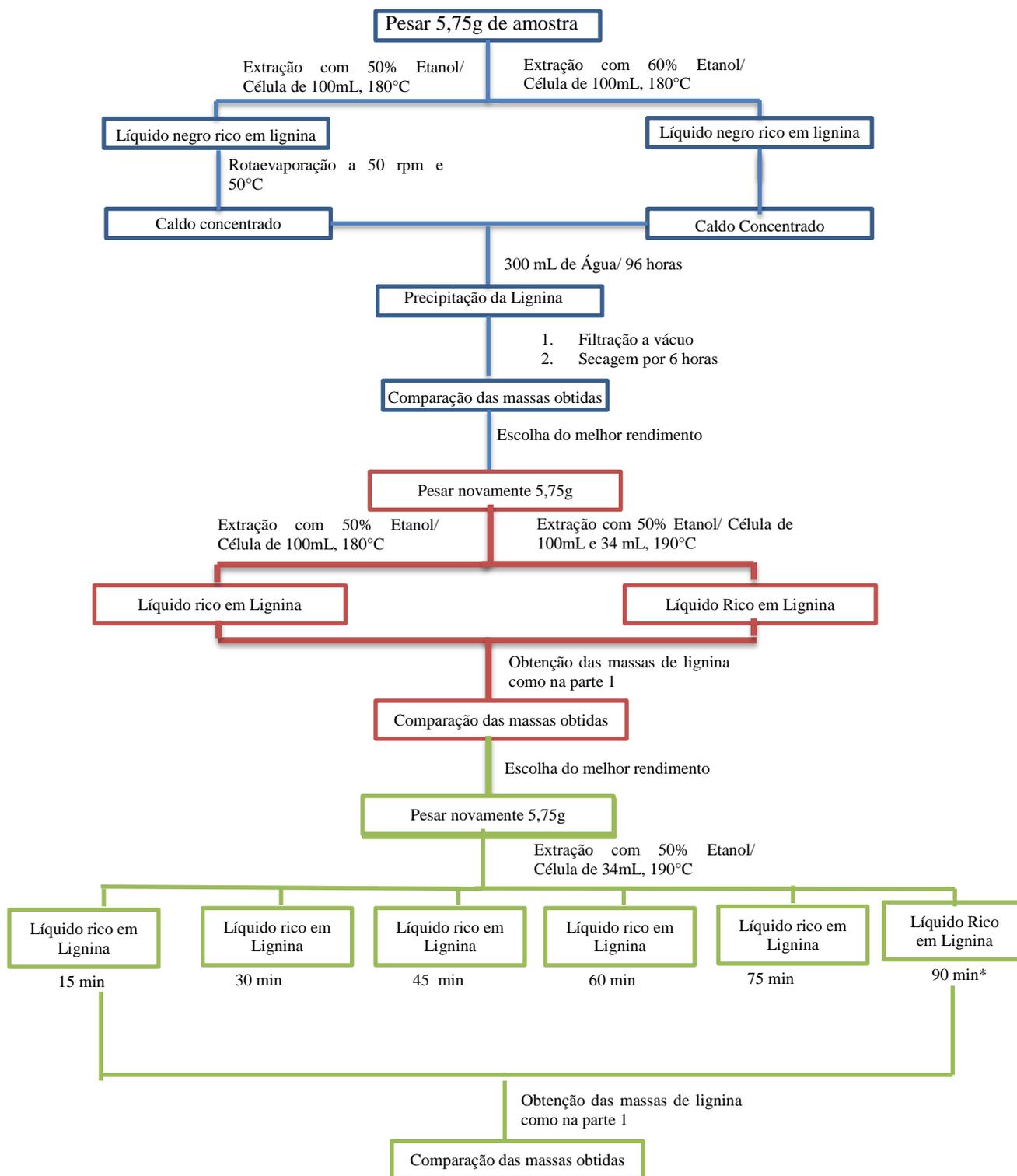
Amostra	Massa Mandioca (g)	Concentração (v/v)	Tempo (min)	Temperatura (°c)
1	5,7507	50% Etanol	15	190
2	5,7523	50% Etanol	15	190
3	5,7497	50% Etanol	15	190
4	5,7509	50% Etanol	30	190
5	5,7514	50% Etanol	30	190
6	5,7501	50% Etanol	30	190
7	5,7520	50% Etanol	45	190
8	5,7558	50% Etanol	45	190
9	5,7501	50% Etanol	45	190
10	5,7528	50% Etanol	60	190
11	5,7531	50% Etanol	60	190
12	5,7525	50% Etanol	60	190
13	5,7515	50% Etanol	75	190
14	5,7515	50% Etanol	75	190
15	5,7521	50% Etanol	75	190
16	5,7527	50% Etanol	90	190

17	5,7516	50% Etanol	90	190
18	5,7520	50% Etanol	90	190
19	5,7501	50% Etanol	120	190
20	5,7504	50% Etanol	120	190
21	5,7506	50% Etanol	120	190

Fonte: Autor

Para as ligninas de até 30 minutos não foi possível obter-se precipitado. Esse comportamento não se repetiu nas demais extrações, uma vez que as ligninas dessas extrações apresentavam-se mais propícias a formar grãos. Devido a esse fato, apenas as ligninas com tempo de extração superior a 30 minutos foram analisadas por RMN.

Fluxograma 1: Otimização da extração de lignina



*Caso não ocorra grande variação entre as massas de 75 e 90 min, realizar ultima extração por 120 min

Legenda: **Azul** → Otimização da concentração; **Vermelho** → Otimização da temperatura; **Verde** → Otimização do tempo

4.2 MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR SOXHLET

Pesaram-se 15 g de amostra da mesma amostra de mandioca utilizada em 4. Nesta etapa utilizou-se solvente 93% ácido acético (m/m), 0,1% ácido clorídrico, em um sistema de refluxo, tempo de 3 horas e temperatura de 110°C, utilizando da metodologia presentes em RODR et al., 1999. Essa extração foi realizada em triplicata e os dados estão presentes na Tabela 6.

Tabela 6: Massa de Madioca utilizado no processo de extração por Soxhlet

Massa (g)	Temperatura (°C)
15,8015	110
15,7704	110
15,8050	110

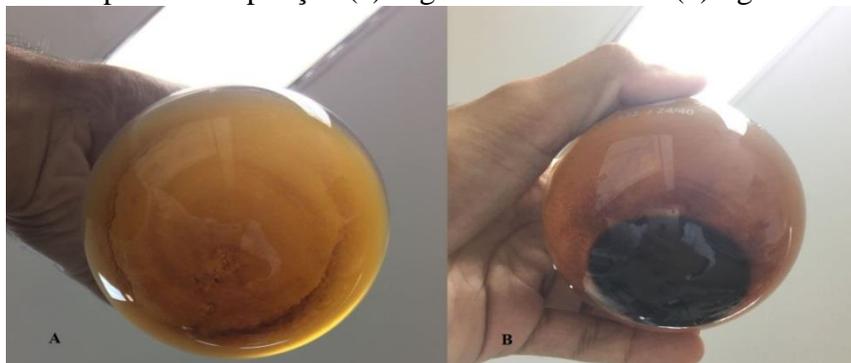
Fonte: Autor

4.3 PRECIPITAÇÃO DA LIGNINA

Todos os extratos feitos nos itens 4.1 e 4.2 foram condicionados em geladeira para conservação. Posteriormente utilizou-se evaporador rotativo Buchi R-215 à pressão reduzida, a 50° C e 50 rotações por minuto até a quase evaporação total do solvente.

Nesta etapa aos extratos foram adicionadas 300 mL de água destilada para todos os extratos obtidos, sendo deixadas em repouso por 96 horas (4 dias) para a maior eficiência de precipitação da lignina. Posteriormente os extratos foram filtradas a vácuo com auxílio de 2 papéis de filtro pesados.

Figura 10: Etapa de Precipitação (a) Lignina 15 minutos e (b) lignina 60 minutos



Fonte: Autor

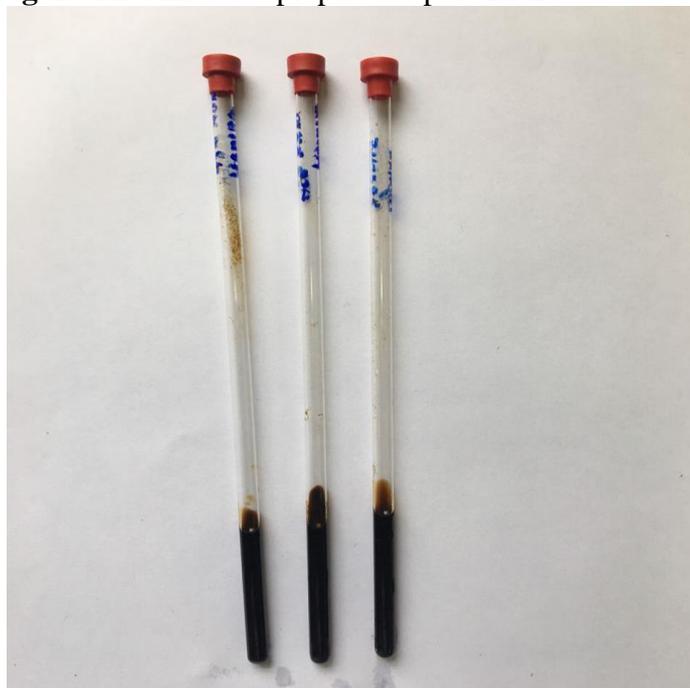
4.4 PREPARAÇÃO DA LIGNINA PARA ANÁLISE POR RMN

Pesou aproximadamente 40 mg de lignina obtidas em 4.1 e 4.2. Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleo de ^1H) e equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (H-F/15N-31P) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”.

As amostras foram preparadas dissolvendo cerca de 40 mg da lignina em uma solução de DMSO-*d*₆, com auxílio de um banho ultrassônico por 4 dias. Para auxiliar na atribuição dos sinais dos constituintes de lignina, foram realizados experimentos bidimensionais heteronucleares de gHSQC. Para o gHSQC foram adquiridos 128 transientes, com um tempo de espera em cada aquisição de 0,5 s, janela em F1 de 200 ppm e em F2 de 16 ppm, com números de pontos em F1 de 164 e F2 de 962. Os sinais do DMSO, com o ^1H em 2,5 ppm e o ^{13}C em 39,51, foram utilizados como referência para a atribuição dos sinais.

O espectro unidimensional de ^1H foram obtidos a 26°C, com um tempo de espera entre cada aquisição de 2 s, aquisição de 32 transientes em uma janela espectral de 16 ppm e 32k de número de pontos.

Figura 11: Amostras preparadas para RMN



Fonte: Autor

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISE DAS MASSAS DE LIGNINA NOS METODOS DE COMPARAÇÃO

5.1.1 Resultado de extração para diferentes concentrações de solvente

Um bom solvente para deslignificação deve conter partes nucleofílicas tanto para produzir a quebra da lignina, quanto para solubilizar os fragmentos gerados. Solventes orgânicos como etanol, ácido acético e ácido fórmico são relatados como solventes capazes de produzir a deslignificação da madeira (AZWANIDA, 2015; DA SILVA et al., 2013). Os resultados obtidos no teste estão contidos na Tabela 7.

Tabela 7: Resultado dos extratos de lignina para diferentes concentrações de etanol

Massa Mandioca (g)	Massa de Lignina (g)	Temperatura (°C)	Concentração
20,0115	0,7495	180	50 % Etanol
20,0166	-	180	60 % Etanol

Fonte: Autor

Estruturalmente a lignina pode se apresentar com diferenças dependendo do processo de isolamento. Extrações que usam solventes orgânicos são uma alternativa para obtenção de uma lignina com alta pureza e reatividade, sendo utilizado para extração de várias biomassas lignocelulósicas. No processo organosolv são quebradas as ligações éter da lignina e são formadas estruturas menores, menos complexas e mais solúveis (PINHEIRO et al., 2017).

Para extrações com etanol, a deslignificação é bastante vista quando combinada com água na razão 1:1. Nesse caso, a adição da água aumenta as reações de deslignificação, mas diminui o poder de solubilização das ligninas. A razão 1:1 demonstrou-se em estudos da literatura como sendo a solução cujo comportamento que melhor atendeu os objetivos da extração (PASQUINI et al., 2005).

Apesar de serem feitas 6 células com solvente 60% etanol, não se obteve nenhum extrato devido aos vazamentos constantes apresentados pela célula não sendo possível a comparação dos extratos. Devido a utilização de grande quantidade de massa, optou-se pela concentração de 50% etanol para otimização do método.

5.1.2 Comparação dos extratos das células de 100 mL e 34 mL com relação à temperatura de extração.

Tabela 8: Massa de lignina extraída nas células de 100 e 34 mL

Célula	Massa Mandioca (g)	Massa de Lignina (g)	Temperatura (°C)	% p/p
100 mL (1)	20,0115	0,7469	180	3,75
100 mL (2)	20,0414	1,6841	190	8,40
34mL (3)	5,7522	0,2669	190	4,64

Fonte: Autor

Como visto na Tabela 8, as ligninas 2 e 3 apresentaram-se com porcentagem de extração superior a lignina 1. O aumento de temperatura levou a maior taxa de extração de lignina, fator atrelado a estrutura da lignina. Por ser bastante complexa, a retirada da lignina das estruturas celulares torna-se difícil, sendo necessárias condições mais bruscas como o aumento de temperatura e altas pressões. Os maiores valores de extração corroboram com resultados já discutidos por Pasquini et al. (PASQUINI et al., 2005)

Comparando-se o efeito comportamental dos extratos de lignina leva-se a aceitar que a temperatura de 190°C aumenta o processo de deslignificação. Importante afirmar que 190°C configurava-se como o máximo indicado pelo manual do equipamento, sendo assim não possível o teste ou outras temperaturas. Combinado com menores custos de extração, nesse presente trabalho, utilizou-se como base também a célula de 34 mL cuja taxa de 4.64% atende ao objetivo final. Os valores de porcentagem p/p foram obtidos pela seguinte expressão 1:

$$(1) \frac{\text{Massa de lignina obtida}}{\text{massa de mandioca pesada}} \times 100$$

5.1.3 Análise dos resultados das ligninas extraídas em células de 34 mL com tempos de extração diferentes.

Os resultados contidos na Tabela 9 mostram que as quantidades extraídas de lignina variam conforme o tempo de extração. A fragmentação da lignina irá depender do tempo de interação com o solvente, como visto em 5.1.1. Além disso, a maior

porcentagem de lignina a 190°C em maiores tempos de extração (12-13) está relacionada a maior degradação da parede celulósica (PASQUINI et al., 2005).

Tabela 9: Variação da porcentagem de extração de lignina com o tempo

Amostra	Massa Mandioca (g)	Massa de Lignina (mg)	Porcentagem de Extração (%p/p)	Tempo de Extração (min)
1	5,7507	34,7	0,603	15
2	5,7523	9,6	0,17	15
3	5,7497	62,5	1,09	15
4	5,7509	113,1	1,96	30
5	5,7514	152,5	2,65	30
6	5,7501	126,6	2,20	30
7	5,7520	175,4	3,05	45
8	5,7558	180,0	3,13	45
9	5,7501	173,7	3,02	45
10	5,7528	198,5	3,45	60
11	5,7531	192,2	3,35	60
12	5,7525	189,6	3,29	60
13	5,7515	301,7	5,24	75
14	5,7515	310,6	5,40	75
15	5,7521	309,6	5,39	75
16	5,7527	384,2	6,68	90
17	5,7516	397,5	6,91	90
18	5,7520	388,6	6,76	90
19	5,7501	376,9	6,55	120
20	5,7504	426,7	7,41	120
21	5,7506	413,5	7,19	120

Fonte: Autor

As médias das massas e os desvios padrões foram calculados e postos na Tabela 10. Esses resultados sozinhos não esclarecem o comportamento de extração nas amostras, sendo necessário então um estudo estatístico para comprovar a proximidade dos materiais extraídos e posterior comprovação dos valores.

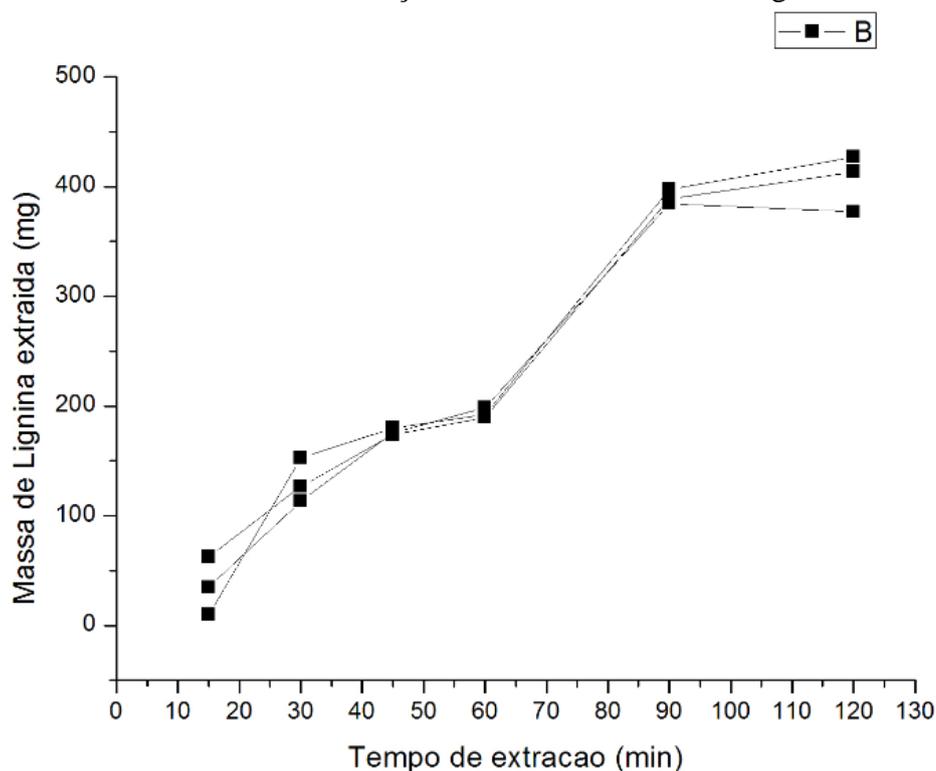
Tabela 10: Média e desvio padrão relacionado as extrações de lignina

Tempo de Extração (min)	Média	Desvio Padrão
15	35,6	21,60
30	130,73	16,30
45	176,36	2,67
60	193,43	3,74
75	307,3	3,98
90	379,9	5,53
120	405,7	21,06

Fonte: Autor

Os dados seguem uma lógica matemática que justifique esse comportamento. O Gráfico 1 mostra que as massas extraídas sugerem que a extração ocorre igualmente para todas as amostras, exceto as de tempo $t=15\text{min}$ e $t=120\text{ min}$. Além disso pode-se observar que as mostras devem manter uma correlação de composição parecidas, visto que as linhas presentes se sobrepõem do tempo $t=60\text{ min}$ a $t=90\text{ min}$.

Gráfico 1: Variação de massa de lignina com tempo, utilizando-se temperatura de 190°C e concentração de solvente 50% etanol/água



Fonte: Autor

Como é esperado uma taxa de diminuição ao longo do tempo, um modelo logarítmico parece apropriado. O modelo ajustado foi o seguinte:

$$\log(m_{ij}) = \beta_i (75 - T_{ij})^2 + \beta \log(t_{ij}) + \varepsilon_{ij}$$

onde $i= 1,2,3$ e $j= 1,2,3,\dots$; em que (m_{ij}) representa as massas extraídas da amostra até a j -enésima observação, ε_{ij} representa uma fonte de erro aleatório e β_i é uma fonte adicional de erro que busca explicar o quão diferentes são essas amostras.

O ajuste do modelo foi feito em R através da função `lme` do pacote `lme4`. Os resultados obtidos estão presente na tabela 11.

Tabela 11: Resultados de fonte adicional de erro

Variáveis	Estimativa	Erro Padrão	Significância
$\hat{\beta}$	0,065150	0,05881	≈ 0

Fonte: Autor

Para o modelo o desvio padrão (σ^2) e a variância (γ^2) foram de 3,069090 e 23,37, respectivamente, onde $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$ e $\beta_i \sim N(0, \gamma^2)$. A taxa de significância é aproximadamente zero, sendo assim o modelo está bem ajustado.

O modelo faz-se significativo já que comprova análises devem então seguir modelo matemático levando-se a propor que resultados de futuras análises podem ser previamente determinadas desde que seja desenvolvido um modelo padrão para extração. A variável $\hat{\beta}$ corrobora com o esperado, visto que se bem homogeneizadas as amostras possuiriam alta taxa de similaridades tratando-se, portanto, de mesmo material.'

Para esse caso não foi possível a determinação de um tempo ótimo de extração, uma vez que seriam necessárias inúmeras outras extrações nos mesmos tempos propostos para confirmar que o comportamento se mantém o mesmo no decorrer das análises. Além disso, a escolha do tempo também deve está relacionada ao melhor custo benefício.

É possível afirmar que os máximos de extração ocorrem por volta de 75 e 90 minutos e que nesse período devem ser obtidas ligninas com maior grau de parentesco (variável $\hat{\beta}$) devido a sobreposição das linhas obtidas do Gráfico 1. Espera-se que após 120 minutos, para esse caso específico, a massa de lignina extraída venha a diminuir.

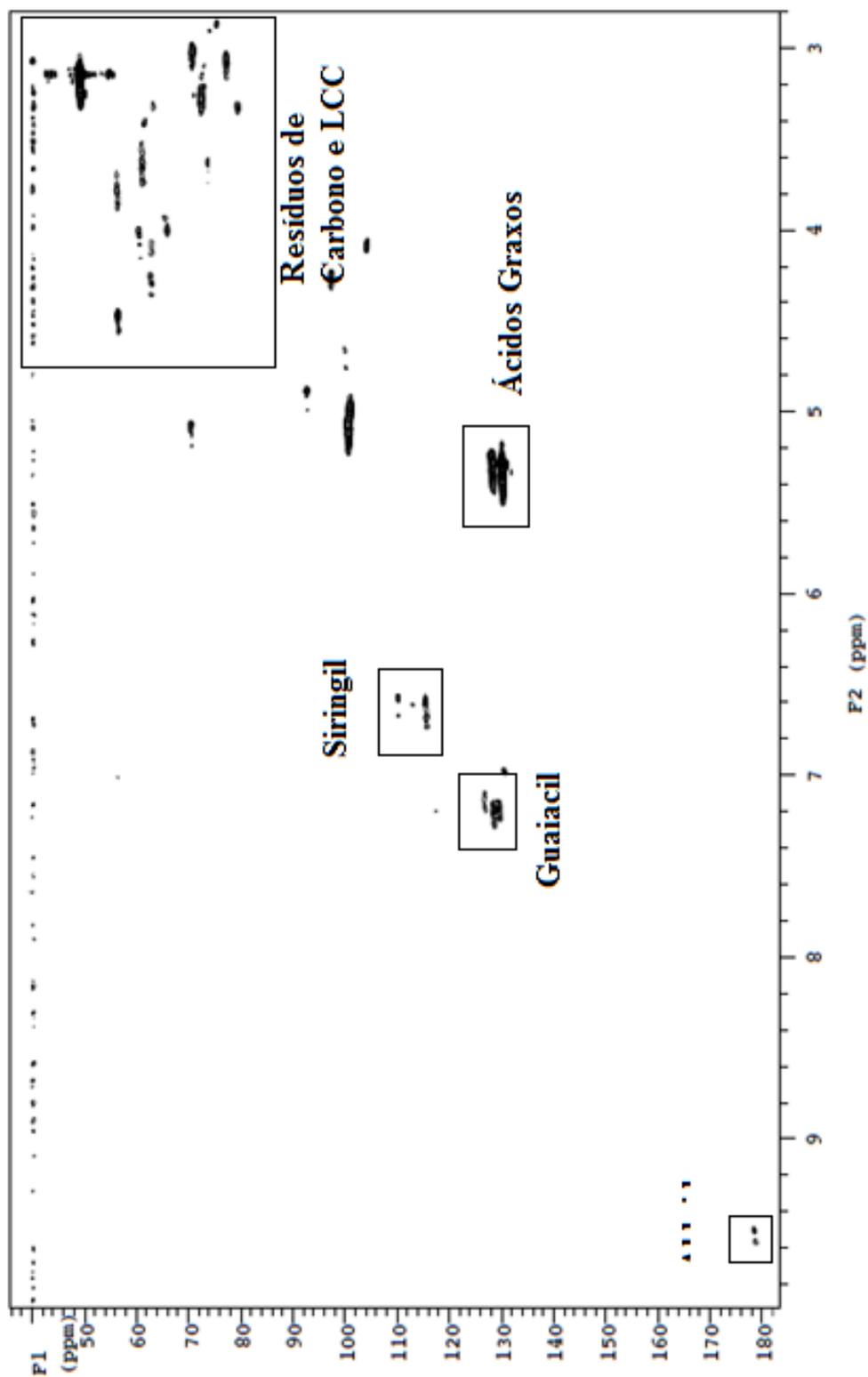
5.1.4 Análise de espectros HSQC das amostras de lignina extraídas do ASE

A mandioca é considerada uma angiosperma e devido ao processo de biossíntese de formação, a lignina presente nesse tipo de madeira é rica em siringil e guaiacil unidades (BURANOV; MAZZA, 2008). Os sinais característicos foram reconhecidos no espectro da Figura 12.

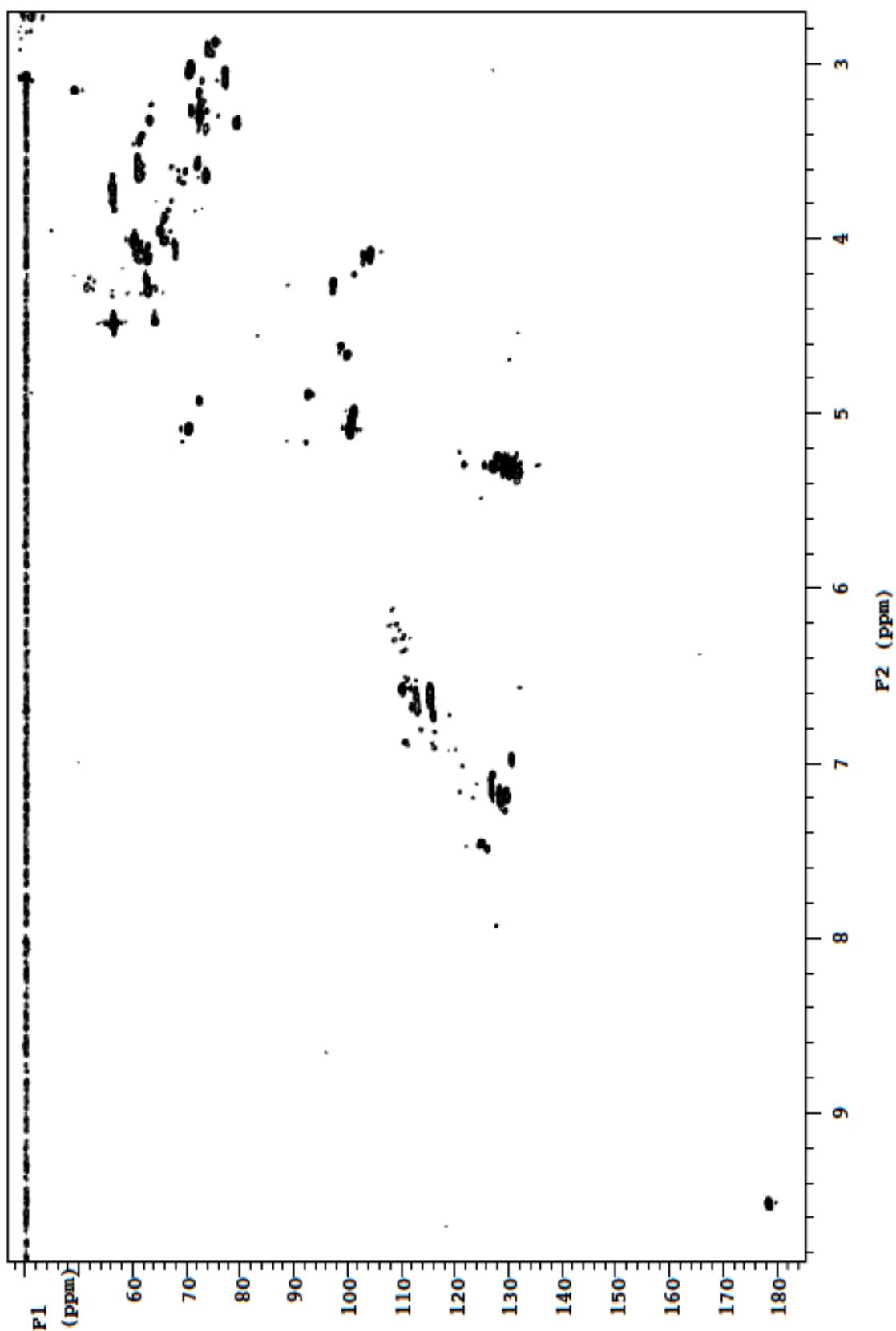
As porcentagens de siringil/guaiacil são muito estudadas devido ao crescimento da indústria de papel. A predominância de siringil ou guaiacil irá influenciar no gasto energético relacionado a quebra das ligações por elas geradas. Espera-se que a predominância dos monômeros de guaiacil na lignina proporcione uma maior resistência a degradação térmica devido a elevada estabilidade das ligações aromática em C5 (Figura 17), a qual fica durante a biossíntese. (CAVALCANTE et al., 2016; GUTIÉRREZ; RODRÍGUEZ; DEL RÍO, 2006)

Em contrapartida ligninas com maior quantidade de siringil são

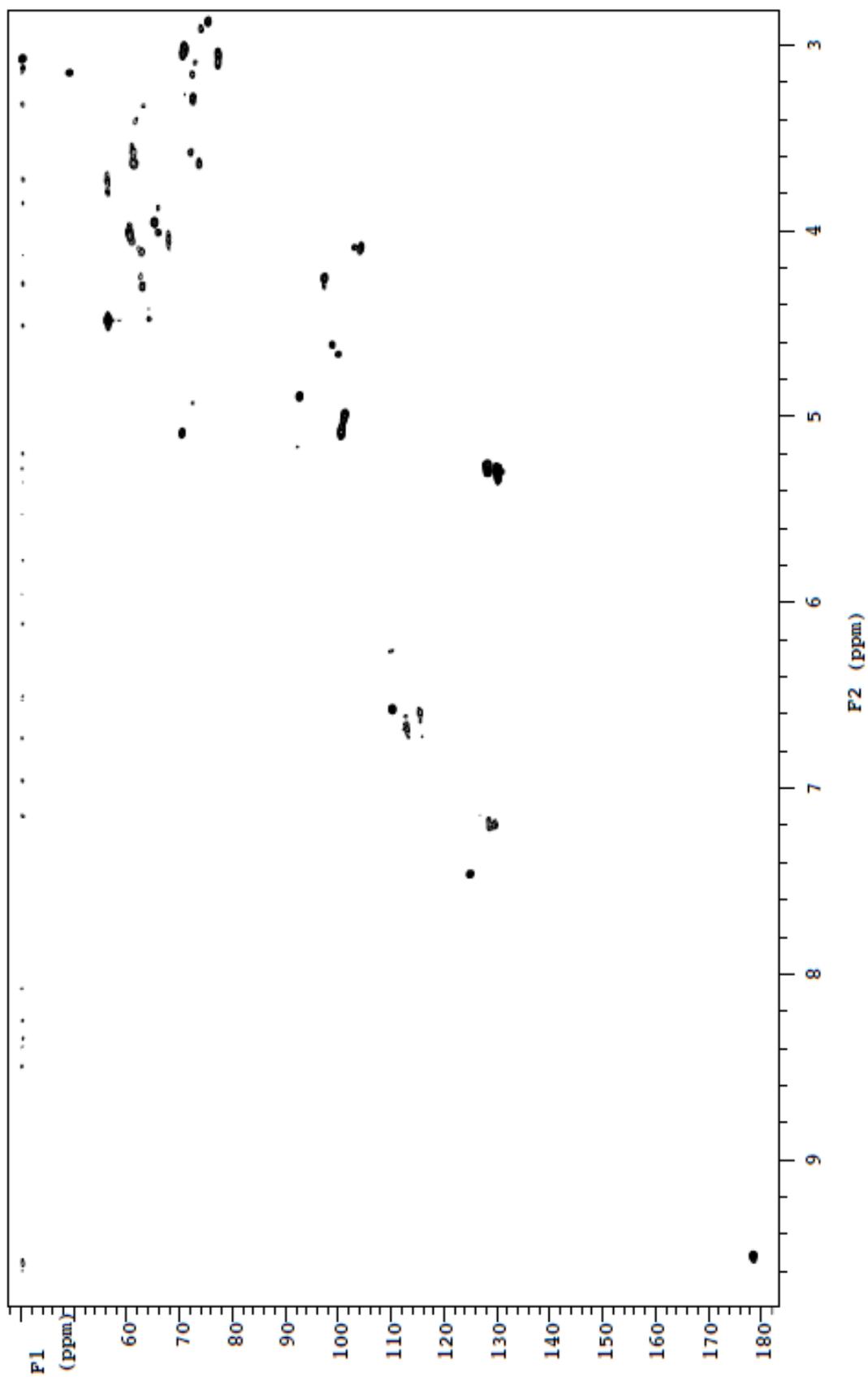
consideradas mais favoráveis ao processo de deslignificação (GUTIÉRREZ; RODRÍGUEZ; DEL RÍO, 2006). Ao contrário do observado com o monômero guaiacil, a não reatividade do carbono aromático C5 implique em uma estrutura menos condensada e de maior solubilidade (SETTE; WECHSELBERGER; CRESTINI, 2011). Na Tabela 12 estão contidas as porcentagens de S/G presentes nas amostras de lignina extraídas.

Figura 12: Espectro HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de lignina de mandioca ASE/T=45min

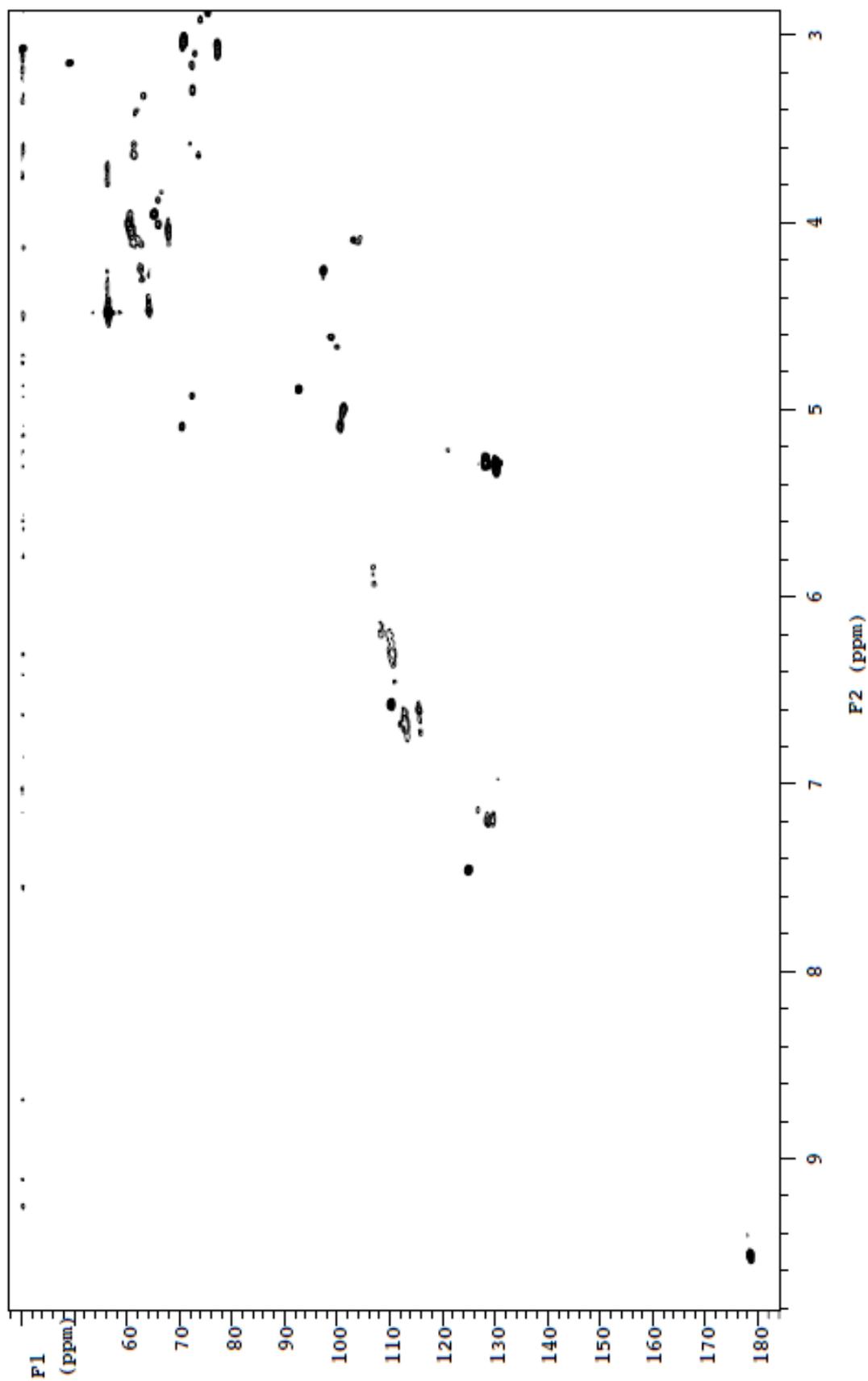
Fonte: Autor

Figura 13: Espectro HSQC 1H – 13C de lignina de mandioca ASE/T=60 min

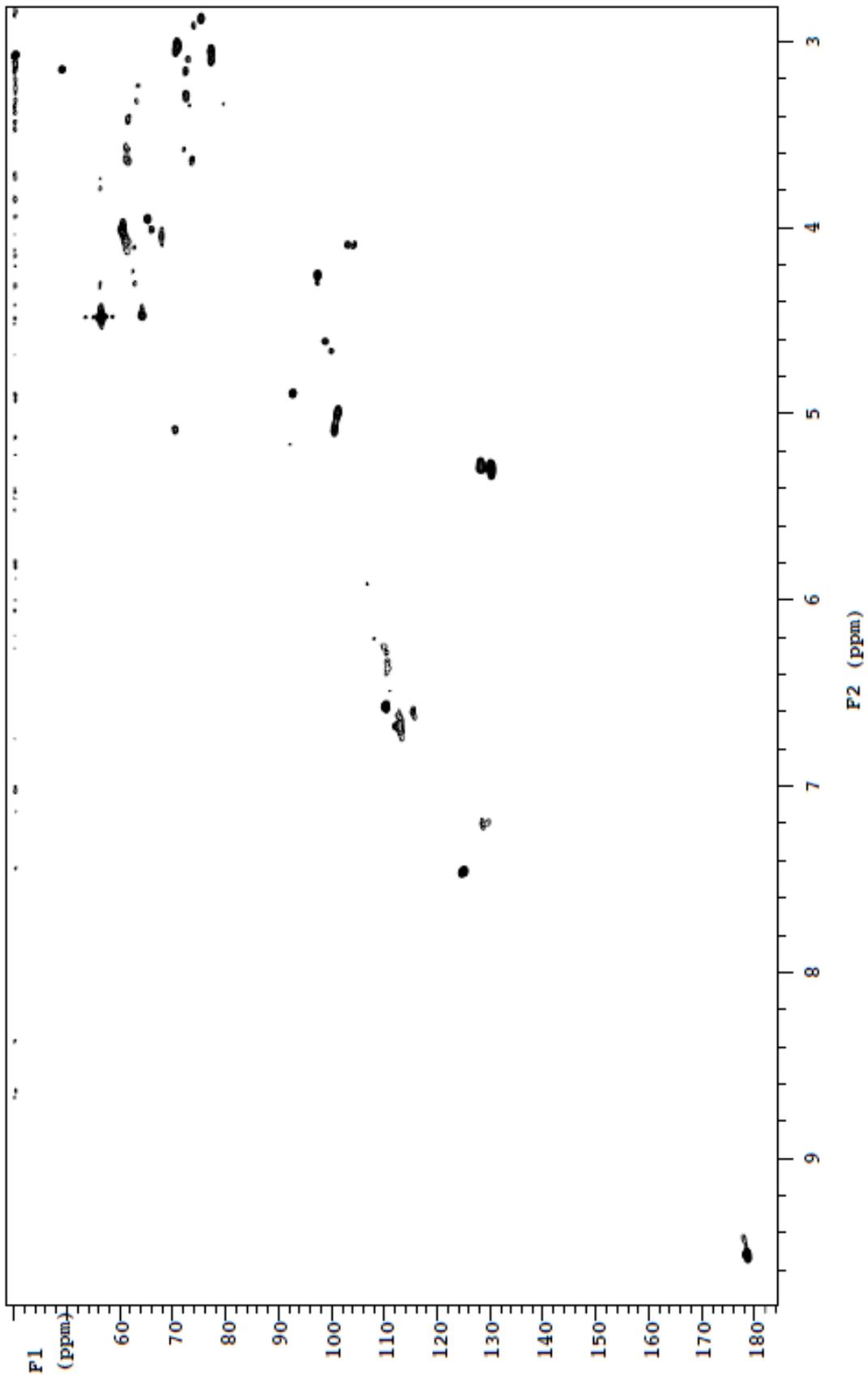
Fonte: Autor

Figura 14: Espectro HSQC ^1H - ^{13}C de lignina de mandioca ASE/T=75 min

Fonte: Autor

Figura 15: Espectro HSQC ^1H - ^{13}C de lignina de mandioca ASE/T=90 min

Fonte: Autor

Figura 16: Espectro HSQC ^1H - ^{13}C de lignina e mandioca ASE/T=120 min

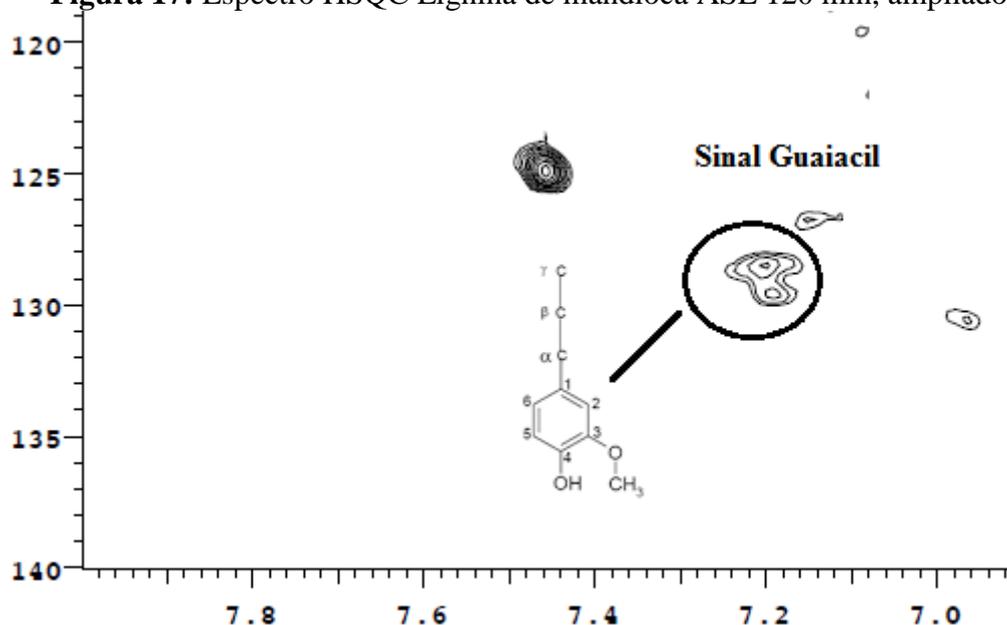
Fonte: Autor

Tabela 12: Porcentagem de S/G nas ligninas extraídas

Tempo de Extração (min)	S	G	S/G
45	163,7	100	1,637
60	237,9	100	2,379
75	229,3	100	2,293
90	208,9	100	2,089
120	221,7	100	2,217

Fonte: Autor

Os resultados da Tabela 12 foram obtidos a partir de uma abordagem que utiliza integração dos espectros de HSQC das ligninas assumindo quantidades totais dos sinais do guaiacil como 100%. Em muitos casos citados na literatura, esse método de análise semiquantitativo é válido, desde que seja atribuído sinais próprios e imutáveis como padrão interno. Em trabalhos específicos o sinal de guaiacil é tido como padrão interno devido a não substituição do carbono C2 (Figura 17), portanto ele refletiria as unidades totais de aromáticos na lignina (SETTE; WECHSELBERGER; CRESTINI, 2011).

Figura 17: Espectro HSQC Lignina de mandioca ASE 120 min, ampliado

Fonte: Autor

A presença de muitos componentes no HSQC nas regiões (δ_H/δ_C 4-3/80-50 ppm) esta relacionada as ligações de lignina com carboidratos. A lignina juntamente com os polissacarídeos são os principais polímeros vegetais. Evidências apontam que esses dois polímeros são ligados covalentemente formando um complexo Lignina-Carboidrato (LCC) que apesar de poucas ligações em madeira, elas desempenham importante no fortalecimento da estrutura. Além disso o LCC gera problemas de separação seletiva e isolamento de lignina e carboidratos (BALAKSHIN et al., 2011).

Embora a informação obtida utilizando técnicas de análise espectroscópicas para as estruturas do LCC seja muito valiosa, obtenção de métodos que possam observar a estrutura direta do LCC é primordial. As análises por HSQC é dificultada devido ao fato que nessa região ocorre sobreposição proveniente de sinais muito fortes de vários espectros (BALAKSHIN et al., 2011).

5.1.5 Análise dos espectros de ^1H do ASE

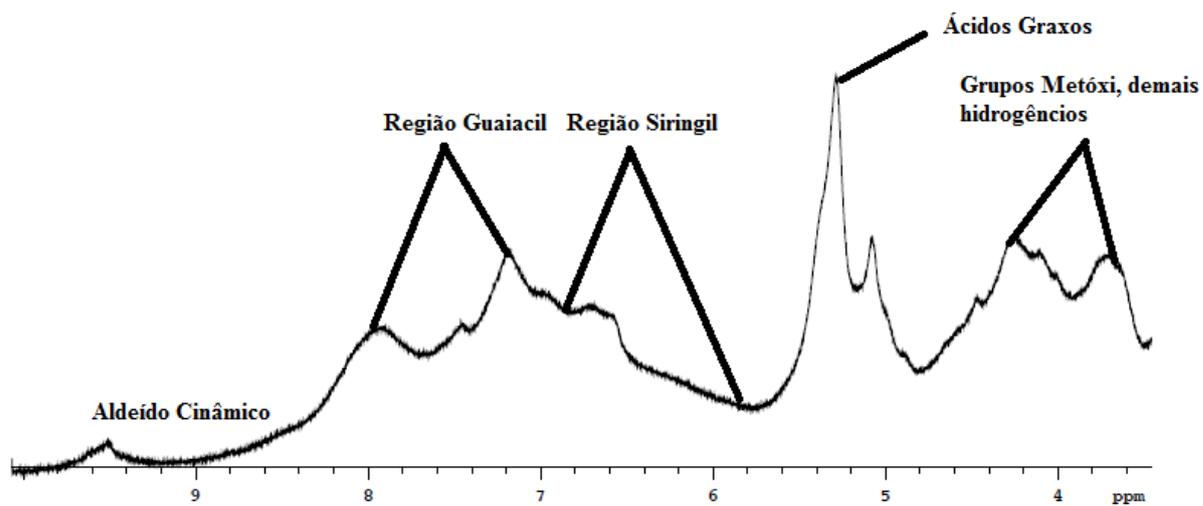
A RMN de ^1H é aplicada ao estudo de ligninas uma vez que tem a vantagem de fornecer, a partir do espectro, o número total de hidrogênios ligados a cadeia e diferenciá-los como na Tabela 13 (BALAKSHIN et al., 2011).

Tabela 13: Tabela de deslocamento químico de hidrogênio

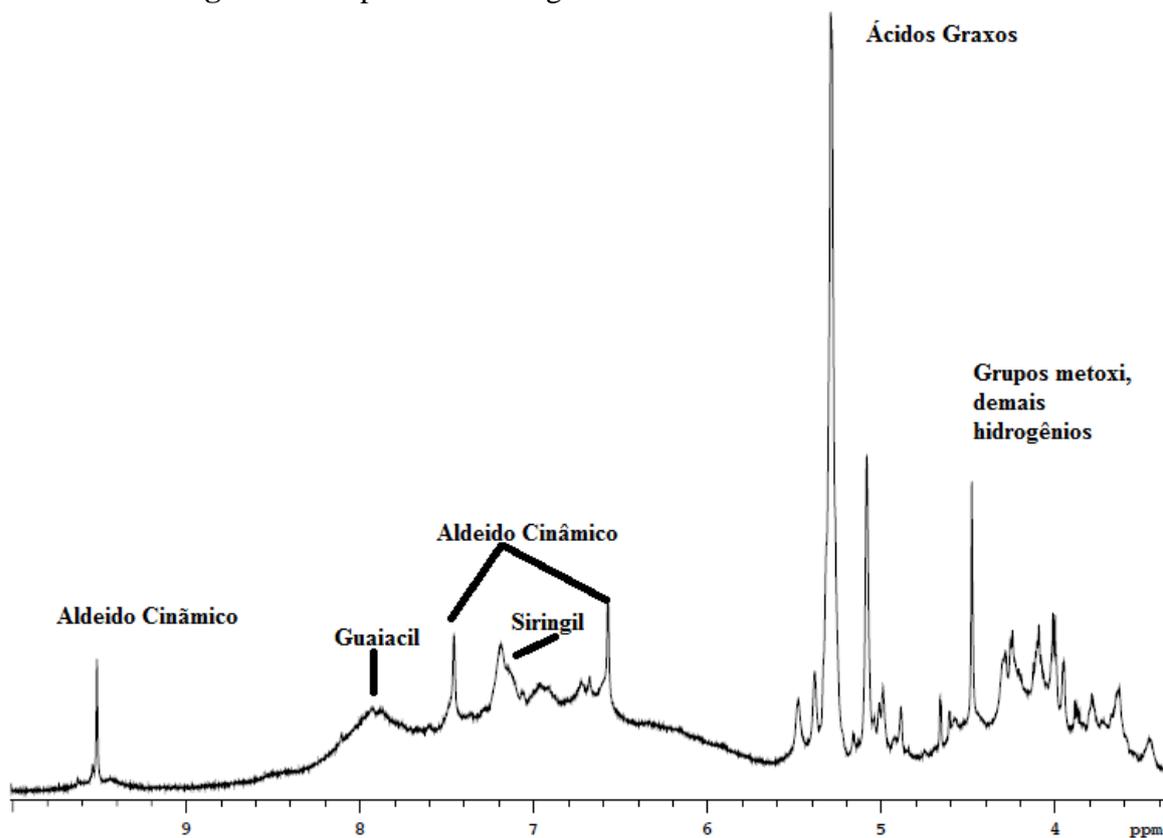
Região	Deslocamento químico	Tipo de hidrogênio
1	8,00 – 11,50	Carboxílicos e aldeídos
2	6,28 – 8,00	Aromáticos e vinílicos
3	5,74 – 6,28	B-vinílicos e benzílicos
4	5,18 – 5,74	Benzílicos
5	2,50 – 5,18	Metoxílicos e muitos outros hidrogênios que podem ser α, β e γ

Fonte: BALAKSHIN et al., 2011. Adaptado

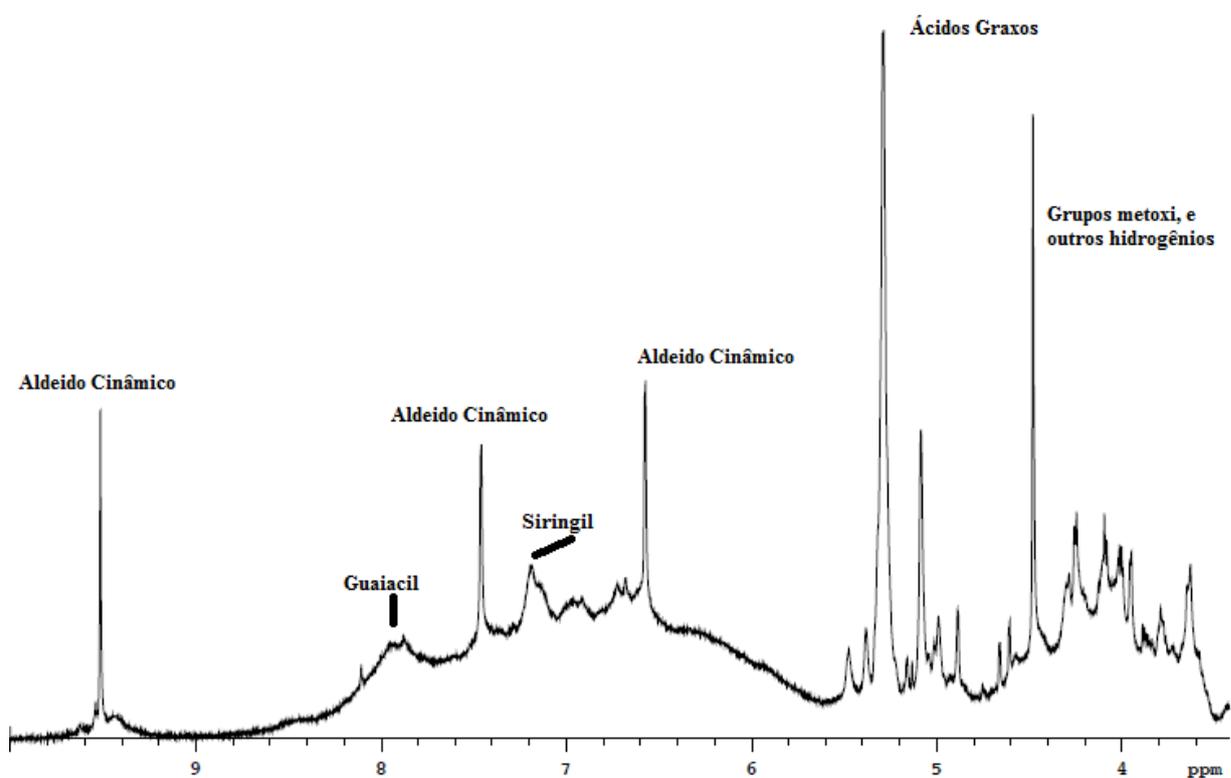
Para as ligninas extraídas foram retiradas seus espectros de ^1H com o objetivo de visualizar se ocorriam mudanças nos picos específicos e característicos de algumas ligações dos monômeros da lignina. Os resultados obtidos estão presentes nas figuras 18-22. Os picos e regiões foram devidamente marcados para facilitar a visualização.

Figura 18: Espectro ^1H da lignina de mandioca ASE/ 45 min

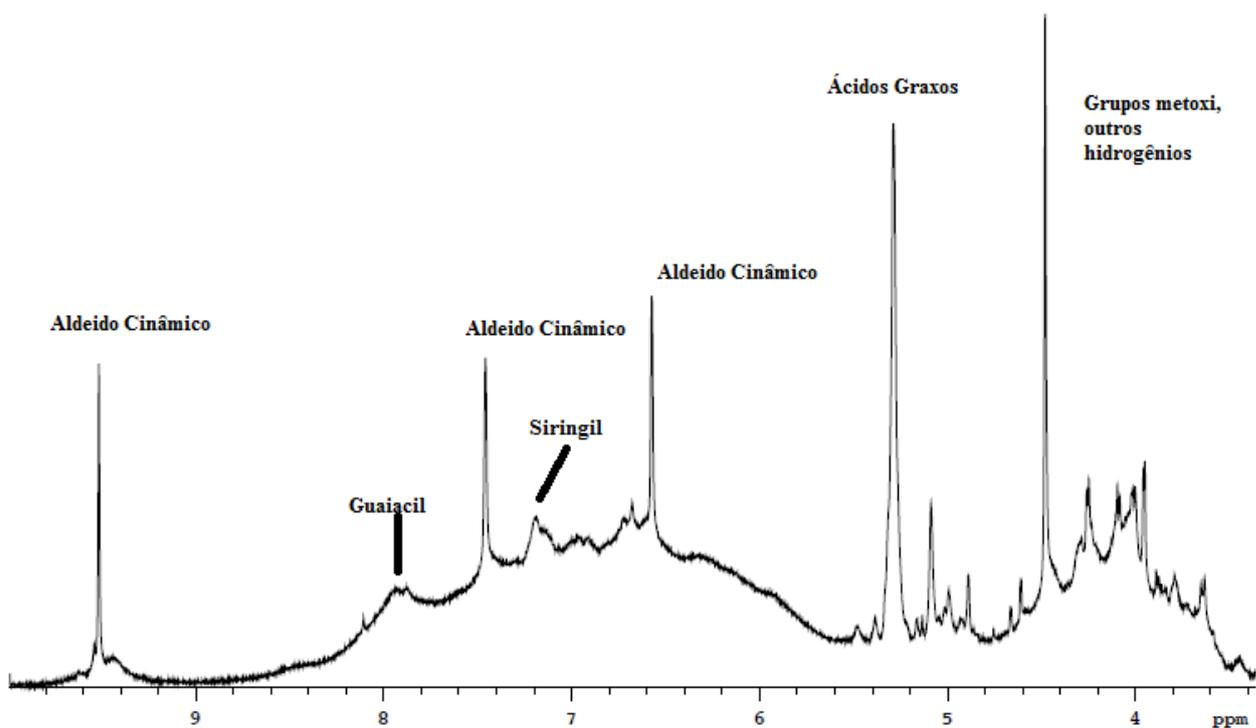
Fonte: Autor

Figura 19: Espectro ^1H da lignina de mandioca ASE/60 min

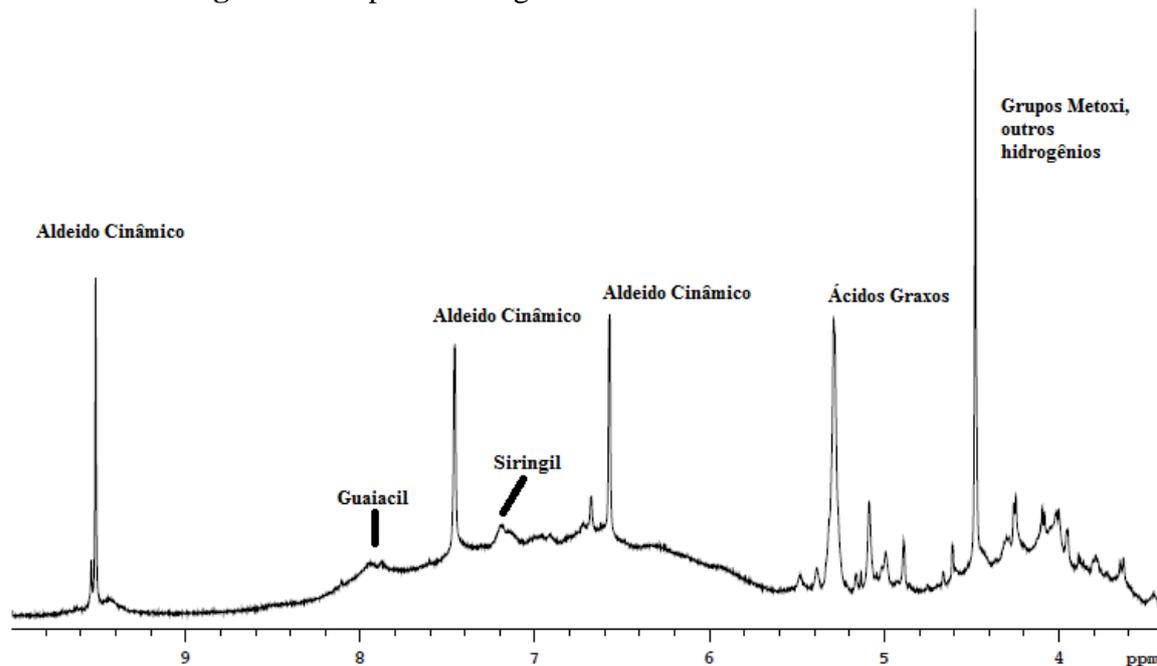
Fonte Autor

Figura 20: Espectro de ^1H de lignina de mandioca ASE/75min

Fonte: Autor

Figura 21: Espectro ^1H da lignina de mandioca ASE/90 min

Fonte: Autor

Figura 22: Espectro da lignina de mandioca ASE/ 120 min

Fonte: Autor

As ligninas são macromoléculas de alto peso molecular. A formação de conteúdo viscoso e de pouca mobilidade fazem com que o em alguns casos não se obtenham bons sinais (Figura 18). Seus espectros formam bandas largas e de difícil identificação devido a maior blindagem de grupos químicos presentes na molécula (SALIBA et al., 2001).

Nas Figuras 19-22 observa-se uma maior diferenciação dos hidrogênios presentes na molécula, juntamente com um aumento da razão sinal/ruído, o que torna possível visualizar hidrogênios característicos da amostra de lignina. Nas figuras citadas os compostos também mantem uma correlação de similaridade de sinal e intensidade, corroborando o proposto em 5.1.3 e Tabela 12.

O aumento do sinal de hidrogênios presente nas figuras acompanha o crescente sinal do espectro de ^{13}C . Uma das possíveis razões seria a maior taxa de degradação da lignina (formação de monômeros) devido ao maior tempo de contato com o solvente organosolv (DA SILVA et al., 2013; PASQUINI et al., 2010).

Além disso, ocorre um crescente aumento da participação dos grupos metoxi e hidrogênios benzílicos ($\delta = 3,5 - 4,0 / 5,18 - 5,74$ respectivamente) (BALAKSHIN et al., 2011). Em contrapartida uma diminuição do sinal de ácidos graxos a medida que se aumento tempo de extração, é verificada.

5.1.6 Análise comparativa entre os métodos de ASE e Soxhlet

Assim como já discutido, os solventes organosolv são capazes de gerar meios de romper ligações e formar compostos mais solúveis, levando a deslignificação. Assim como o ASE, o soxhlet também é uma opção para que seja obtido lignina de boa qualidade para análise. (ARNI, 2018; PINHEIRO et al., 2017). Na tabela 14, estão contidos os valores de lignina extraídos pelo método.

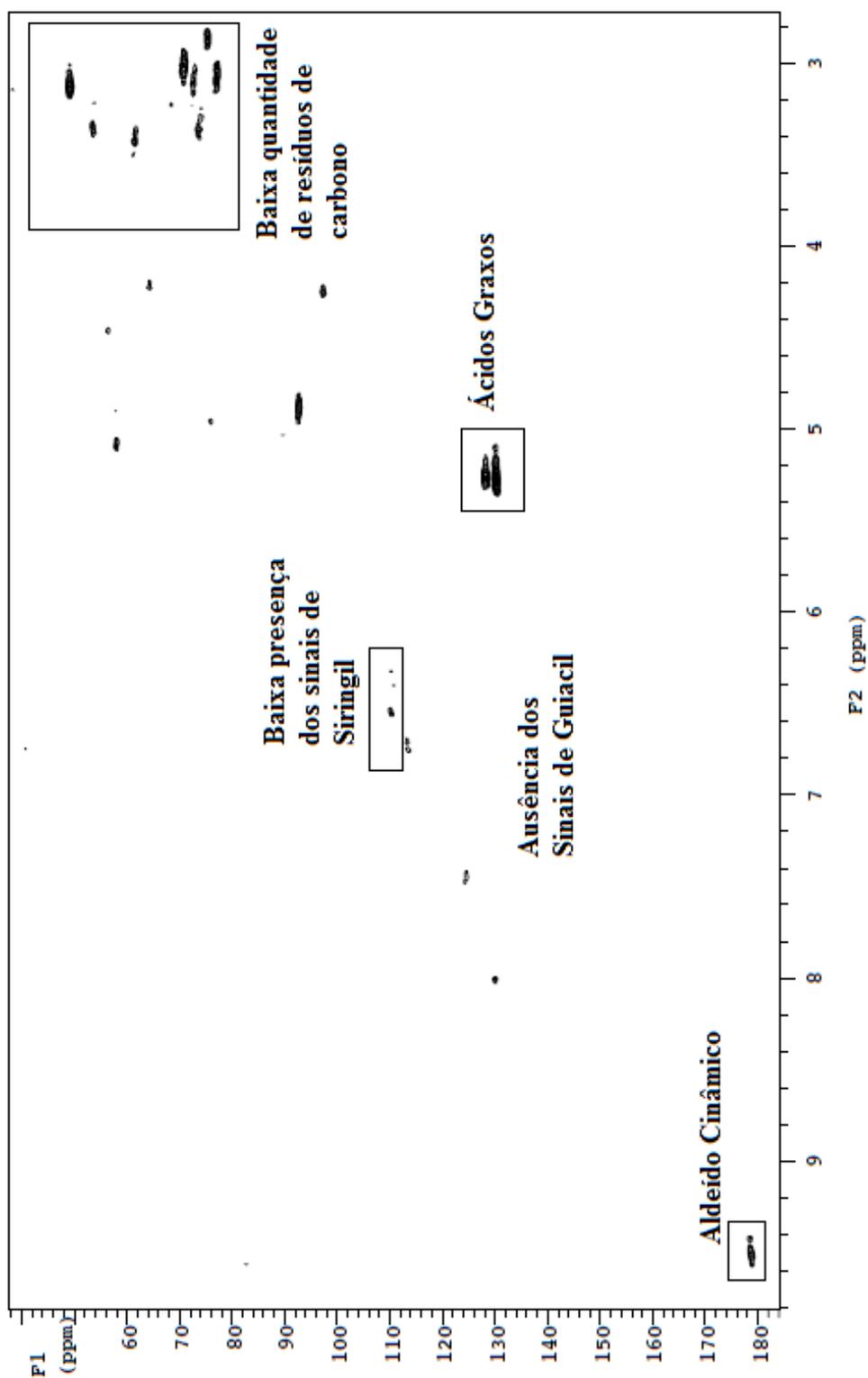
Tabela 14 Tabela de rendimento dos extratos obtidos por Soxhlet

Massa (g)	Massa de lignina (g)
15,8015	0,4952
15,7704	0,3548
15,8050	0,3975

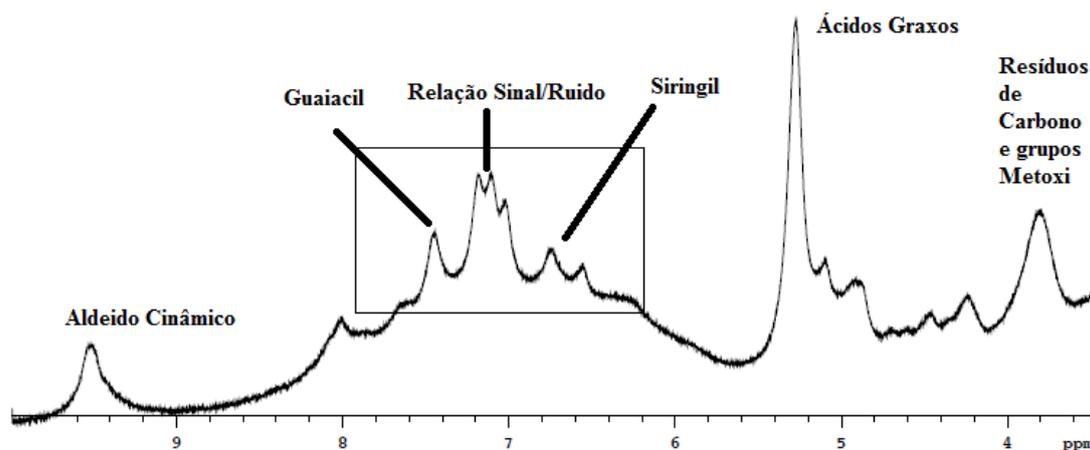
Fonte: Autor

Os espectros de HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ e ^1H foram obtidos e os resultados são mostrados nas figuras 23 e 24. Assim como os dados provenientes das ligninas do ASE, os sinais característicos foram identificados para melhoraria da visualização.

Figura 23: HSQC da lignina Soxhlet



Fonte: Autor

Figura 24: Espectro de ^1H da lignina Soxhlet

Fonte: Autor

Os dados obtidos levam a questionar a literatura consultada. Para a obtenção dos espectros a amostra deve estar bem solubilizada no solvente, esse fator pode ter sido um grande influenciador nos resultados finais obtidos. Na amostra do Soxhlet foi observado uma baixa solubilidade da lignina em $\text{DMSO}-d_6$. Sendo assim, nem todos os componentes puderam ser identificados nos picos. Apesar disso, alguns picos comuns podem ser correlacionados com as ligninas do ASE, como o ácido cinâmico.

Apesar das massas de lignina (Tabela 14) para esses dados também não foi possível uma determinação da relação S/G presente na amostra devido a uma pequena relação sinal/ruído que sobrepõem no intervalo comum aos deslocamentos químicos dos hidrogênios provenientes dos monômeros siringil e guaiacil ($\delta_{\text{H}} = 8-6$ ppm) (Figura 24).

6 CONCLUSÕES

O método otimizado através do sistema acelerado por solvente (ASE) atendeu aos objetivos do presente trabalho, chegando-se as condições de 50% etanol/água (v/v), 30mM de catalisador ácido, temperatura de 190°C e tempos que variem entre 75 e 90 minutos. Observou-se que a extração de lignina está ligada diretamente ao tempo em que o material lignocelulósico permanece em contato com o solvente, refletindo diretamente na composição química final do extrato.

Nas amostras feitas com diferentes tempos de extração, observa-se uma maior definição dos picos de ^1H , obtendo-se entre os tempos de $t=75$ e $t=90$ minutos uma grande similaridade, valores que corroboram com o proposto estatisticamente. Observou-se entre os tempos $t=60$ min a 120 min as ligninas extraídas apresentam-se com a relação S/G quase constantes. Os teores de siringil superiores ao guaiacil sugerem que a amostra preparada possuiria maior quantidade de mandiocas ricas em teores de siringil, e portanto mais solúveis.

Não foi possível obter uma comparação com o método tradicional Soxhlet devido a não solubilização total do material no solvente deuterado. Outros fatores podem ter sido responsáveis pelo pouco sucesso dessa extração, os quais devem ser estudados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELKAFI, F. et al. Structural analysis of alfa grass (*Stipa tenacissima* L.) lignin obtained by acetic acid/formic acid delignification. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 11, p. 3895–3902, 2011.
- ANTONIO, J.; FILHO, C. Nota Metodológica sobre Modelos Lineares Mistos. **Dados**, p. 32, 2003.
- ARNI, S. AL. Extraction and isolation methods for lignin separation from sugarcane bagasse: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 115, n. May 2017, p. 330–339, 2018.
- AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.
- AZWANIDA. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 04, n. 03, p. 3–8, 2015.
- BALAKSHIN, M. et al. Quantification of lignin-carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy. **Planta**, v. 233, n. 6, p. 1097–1110, 2011.
- BATISTA, R.; CHAVES, G. **Rotas Químicas de Pirólise e Combustão Direta para o Aproveitamento de Resíduos Orgânicos Agrícolas Ciência e Tecnologia de Alimentos Produção e Sustentabilidade**. [s.l: s.n.].
- BAUCHER, M. et al. **Biosynthesis and genetic engineering of lignin** *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1998.
- BENAR, P. **Polpação Acetosolv de Bagaço de Cana e madeira de Eucáipto**, 1992.
- BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, v. 28, n. 3, p. 237–259, 2008.
- CAVALCANTE, R. et al. Influência das propriedades químicas e da relação

siringil/guaiacil da madeira de eucalipto na produção de carvão vegetal. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 2, p. 657–669, 2016.

CLARA, A. N. A.; ARAÚJO, C. D. E. COMPOSIÇÃO QUÍMICA MONOMÉRICA DA LIGNINA DA MADEIRA DE *Eucalyptus* spp . **Dissertação de Mestrado**, 2015.

CONAB. MANDIOCA: RAIZ, FARINHA E FÉCULA Janeiro de 2017 1. 2017.

CONTE, E. et al. Comparison between accelerated solvent extraction and traditional extraction methods for the analysis of the herbicide diflufenican in soil. **Journal of Chromatography A**, v. 765, n. 1, p. 121–125, 1997.

DA SILVA, C. G. et al. Adding value to lignins isolated from sugarcane bagasse and *Miscanthus*. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 87–95, 2013.

ERDOCIA, X. et al. Effect of different organosolv treatments on the structure and properties of olive tree pruning lignin. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 1103–1108, 2014.

FAO. Produzir mais com menos. 2013.

FIGUEIREDO, D.M.; CZAMANSKI, R.T; BARCELOS, M. F. P. **Abordagem geral sobre a presença de Glicosídeos cianogênicos na alimentação**. Disponível em: <<https://www.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/educacao/abordagem-geral-sobre-a-presen231a-de-glicos237deos-cianog234nicos-na-alimenta231227o/10513>>.

FIGUEIREDO, P. G. MORFO-ANATOMIA DE RAÍZES TUBEROSAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) cultivar IAC 576-70 EM DIFERENTES PREPAROS DO SOLO. p. 86, 2012.

GONZALES, P. F. et al. Componentes de produção e morfologia de raízes de mandioca sob diferentes preparos do solo. **Bragantia**, v. 73, n. 4, p. 357–364, 2014.

GUTIÉRREZ, A.; RODRÍGUEZ, I. M.; DEL RÍO, J. C. Chemical characterization of

lignin and lipid fractions in industrial hemp bast fibers used for manufacturing high-quality paper pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2138–2144, 2006.

JONOBI, M. et al. Different preparation methods and properties of nanostructured cellulose from various natural resources and residues: a review. **Cellulose**, v. 22, n. 2, p. 935–969, 2015.

KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 2, p. 105–113, 2002

LIMA, B. N. B. et al. Estudo do amido de farinhas comerciais comestíveis. **Polímeros**, v. 22, n. 5, p. 486–490, 2012.

LOSADA VALLE, T. et al. Conteúdo cianogénico em progénies de mandioca originadas do cruzamento de variedades mansas e bravas. **Bragantia**, v. 63, n. 2, p. 221–226, 2004.

LUZ, G.; MOREIRA, P.; CARDOSO, S. ISSN 2240 - 4436 Avaliação de variedades de mandioca tipo indústria Adriana Dias Cardoso ; Anselmo Eloy Silveira Viana ; Welber Freire Muniz ; Juliano Silva de. p. 456–466, 2014.

MATSUI, K. N. et al. **Utilização do resíduo de mandioca na produção de bandejas descartáveis** *Revista Ceres*, 2003.

MONTAGNAC, J. A.; DAVIS, C. R.; TANUMIHARDJO, S. A. Nutritional value of cassava for use as a staple food and recent advances for improvement. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 3, p. 181–194, 2009.

OGATA, B. H. Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias. **Dissertação de Mestrado**, p. 109, 2013.

OLIVEIRA, D. R. DE et al. Ecofriendly modification of acetosolv lignin from oil palm biomass for improvement of PMMA thermo-oxidative properties. v. 45498, p. 1–8, 2017.

OLIVEIRA, E. C. . Estudo de Agregação em Asfaltenos por Ressonância Magnética Nuclear de Alto Campo. p. 132, 2013.

PASQUINI, D. et al. Extraction of lignin from sugar cane bagasse and Pinus taeda wood chips using ethanol-water mixtures and carbon dioxide at high pressures. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 36, n. 1, p. 31–39, 2005.

PASQUINI, D. et al. Extraction of cellulose whiskers from cassava bagasse and their applications as reinforcing agent in natural rubber. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 486–490, 2010.

PINHEIRO, F. G. C. et al. Optimization of the acetosolv extraction of lignin from sugarcane bagasse for phenolic resin production. **Industrial Crops and Products**, v. 96, p. 80–90, 2017.

REGINA ÁLVARES MALTHA, C. et al. DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO SIRINGILA/GUAIACILA EM LIGNINAS DE Eucalyptus spp. POR PIRÓLISE ASSOCIADA À CROMATOGRÁFIA GASOSA E À ESPECTROMETRIA DE MASSAS. **Dissertação de Mestrado**, 2007.

RINALDI, M. M.; VIEIRA, E. A. Efeito de diferentes formas de congelamento sobre raízes de mandioca Effect of different freezing forms on cassava roots. p. 93–101, 2015.

RODR, C. et al. Acetosolv pine lignin as copolymer in resins for manufacture of exterior grade plywoods. v. 70, p. 209–214, 1999.

ROUTRAY, W.; ORSAT, V. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 409–424, 2012.

SALIBA, E. DE O. S. et al. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917–928, out. 2001.

SETTE, M.; WECHSELBERGER, R.; CRESTINI, C. Elucidation of lignin structure by quantitative 2D NMR. **Chemistry - A European Journal**, v. 17, n. 34, p. 9529–9535, 2011.

SHIGAKI, T. **Cassava: The Nature and Uses**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2016.

SILVA, N. L. C. Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. **Universidade Federal Do Rio De Janeiro**, p. 123, 2010.

VALDIR CARNEIRO SILVA. Intoxicação experimental por resíduo de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (MANIPUEIRA) em ovinos. 2016.

YUAN, T. Q. et al. Characterization of lignin structures and lignin-carbohydrate complex (LCC) linkages by quantitative ^{13}C and 2D HSQC NMR spectroscopy.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, n. 19, p. 10604–10614, 2011.

ZHU, F. Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 456–480, 2015.