



Universidade do Minho
Escola de Ciências

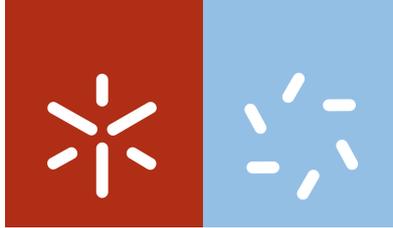
Venceslau Pedro Muiuane

Valorização da Biomassa: Oxidação dos Hidratos de Carbono Utilizando Métodos Eletroquímicos

Venceslau Pedro Muiuane **Valorização da Biomassa: Oxidação dos Hidratos de Carbono Utilizando Métodos Eletroquímicos**

UMinho | 2016

agosto de 2016



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Venceslau Pedro Muiuane

**Valorização da Biomassa: Oxidação dos
Hidratos de Carbono Utilizando Métodos
Eletroquímicos**

Tese de Doutoramento em Ciências
Especialidade em Química

Trabalho efetuado sob orientação do
Professor Doutor Pier Parpot

agosto de 2016

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração da presente tese. Confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri à prática de plágio ou a qualquer forma de falsificação de resultados.

Mais declaro que tomei conhecimento integral do Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Universidade do Minho, 9 de Agosto de 2016

Venceslau Pedro Muiuane



“Com os elevados preços do petróleo, o mundo
não se pode dar ao luxo de não se tornar verde”

Dedico à Jade e aos meus pais e irmãos.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, desejo expressar o meu mais profundo e sincero reconhecimento ao Professor Doutor Pier Parpot, orientador desta dissertação, pelo enorme e incansável acompanhamento científico, pelos imprescindíveis ensinamentos, apoios e incentivos constantemente demonstrados, e também por estar sempre presente e disponível não só ao nível académico, mas também com a sua amizade, ao longo de todo este trabalho.

Ao Professor Doutor Manuel Coimbra, da Universidade de Aveiro, o meu sincero agradecimento pelas valiosas discussões científicas, pelos inúmeros apoios concedidos, indispensáveis para o desenrolar do trabalho, e pela paciência, boa disposição e espírito prático que sempre demonstrou. Queria também agradecer muito sinceramente a amizade e a compreensão em todos os momentos.

À Doutora Joana Sá Ramalho Simões, da Universidade de Aveiro, o meu agradecimento e reconhecimento pelas correções e pelas vezes em que me auxiliou com os “problemas técnicos” no desenvolvimento deste trabalho e pelas valiosas discussões científicas, pelos apoios concedidos e pelo tempo que dispensou a apoiar-me na realização das análises de espectrometria de massa, indispensáveis para o desenrolar do trabalho, e o meu mais sincero reconhecimento pela amizade e hospitalidade aquando do tempo em que trabalhei na Universidade de Aveiro.

Gostaria de alargar este reconhecimento aos restantes membros do Laboratório de Química alimentar da Universidade de Aveiro pela amizade e apoio.

Ao Professor Doutor Carlos Silva, da Universidade do Minho, desejo expressar a minha admiração e o meu sincero agradecimento pelo apoio concedido, pela amizade sempre manifestada.

À Professora Doutora Isabel Correia Neves, da Universidade do Minho, minha conterrânea, pela disponibilidade em ajudar sempre e pelas correções ortográficas deste trabalho.

À Marta Ferreira, não poderia deixar de agradecer, para além da tua amizade e apoio, o estar disponível em todos os momentos e o imenso apoio dado nas injeções das amostras, sempre que eu não podia.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Bruno Xavier, Natália Vilaça, Ana Soares, Zeca Pascoal, Umbelino Infante, Luís Barreiro, Cipriano Nhaule, Catarina Fonseca, Sofia Barata, Jorge Gabriel, Carina Alves, Celso Fulano e muitos outros, pelas conversas e companhia, e em especial por dividirem comigo e tornar estes mais de quatro anos de trabalho mais fáceis e divertidos.

De entre as várias entidades que contribuíram para a realização experimental deste trabalho, às quais é extensível o meu reconhecimento, saliento:

- A Fundação Calouste Gulbenkian, pelo financiamento concedido através de uma bolsa de Doutoramento.
- A Escola de Ciências da Universidade do Minho e nomeadamente o Departamento de Química analítica, por me ter aceite como aluno de Doutoramento, e pelos diversos apoios logísticos concedidos.
- Ao Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biomateriais, centro de Engenharia Biológica-LTEB.

A terminar, desejo expressar de uma forma muito especial o meu profundo e sincero reconhecimento à minha família e amigos e, pelos diversos momentos e

vivência inesquecíveis com reflexo direto na minha vida pessoal e profissional, e também por todos os apoios, que tornam tudo mais fácil.

À Deus, por guiar e iluminar meus passos me mostrando sempre o caminho a seguir, por não me deixar desistir mesmo nos momentos em que eu perdi a esperança.

A todos muito obrigado.

Resumo

A sustentabilidade dos recursos necessários para fornecer energia e matéria prima na escala mundial está a tornar-se um assunto de grande importância. Projeta-se para o futuro o conceito de biorefinarias para produzir simultaneamente combustíveis e matéria-prima para a indústria a partir da biomassa.

A abundante vida vegetal do nosso planeta é armazenadora da energia solar e de substâncias químicas, sendo um recurso renovável que chamamos de biomassa. Os recursos renováveis representam atualmente cerca de 20% do fornecimentos total de energia no mundo, com cerca de 14% proveniente da biomassa.

No que diz respeito a sua definição, biomassa é a fração biodegradável de produtos e resíduos da agricultura (incluindo substâncias vegetais e animais), da floresta e das indústrias relacionadas, bem como a fração biodegradável dos resíduos industriais e urbanos. É desejada a transição para um sistema de produção mais “bio” entretanto, esta transição está, infelizmente, limitada por uma variedade de obstáculos. Atualmente as matérias-primas fósseis são mais económicas, e a tecnologia dos processos para a sua conversão em produtos químicos orgânicos está bem desenvolvida e é muito diferente daquela requerida para transformar por exemplo hidratos de carbono em produtos com perfil para aplicação industrial. De longe, a classe mais importante de compostos orgânicos renováveis, em termos de volume produzido, é constituída pelos hidratos de carbono, que representam cerca de 75 % da biomassa renovável que é de aproximadamente 200 biliões de toneladas anuais. Os hidratos de carbono, são a

matéria-prima para produtos químicos orgânicos básicos. O desafio atual reside em se conseguir uma oxidação direta e eletro-mediada dos hidratos de carbono. Os métodos eletroquímicos podem surgir como uma via alternativa que permite ultrapassar as barreiras tecnológicas existentes. Neste contexto é de relevante interesse a transformação dos hidratos de carbono nos correspondentes compostos com grupos carboxílicos. Neste contexto foi investigada a transformação de alguns compostos poliméricos e não poliméricos disponíveis em larga escala como a maltose, glucose, celobiose, maltotriose, a galactose, amido e celulose em produtos com interesse industrial nos elétrodos de níquel, DSA e carbono vítreo com recurso a uma célula eletroquímica do tipo “filter press” com circulação de eletrólito (FM01-LC).

Os produtos de eletrólise obtidos nestes elétrodos foram analisados utilizando métodos cromatográficos. Os resultados mostraram que na oxidação direta, a distribuição dos produtos dependia do material do eletrodo. A análise dos produtos das eletrólises de polissacarídeos como, amido e celulose foi efetuada utilizando diversos métodos analíticos como FTIR, RMN, SEM, LEX-SEC, ESI-MS, análise elementar, titulação ácido-base, entre outros. Os resultados mostraram uma quantidade significativa de produtos de oxidação acídicos e neutrais que podem constituir-se precursores para futuros compostos de valor acrescentado. A oxidação eletro-mediada do amido e da celulose foi efectuada utilizando o radical TEMPO. Os resultados mostram uma oxidação mais seletiva do grupo do álcool primário neste último caso.

Abstract

The sustainability of resources necessary for energy and raw materials production is becoming a crucial matter. The concept of Biorefinery for the simultaneous production of fuels and raw materials is being designed already.

The wide botanical resources which being part of the biomass allow to store the solar energy in form of chemical products. The renewable resources represent approximately 20 % of total energy supply, with a share of biomass in order of 14 %.

Biomass includes the biodegradable fraction of products and rests of agriculture, forests, domestic and industrial residues. The transition for a more bio orientated economy is expected but also actually limited due to some obstacles. Some of these obstacles have to do with the low price of fossil fuels and difference of technologies for the transformation of fossil fuels and biomass into useful products, fuel and energy. Carbohydrates constitute one of the most important categories of chemical compounds in term of volume produced annually and represent approximately 75 % of terrestrial biomass. One of the challenges is to develop a direct or mediated oxidation of biomass without previous preparation steps. Electrochemical products may constitute an alternative in order to surpass the existing technological barriers. In this context the transformation of carbohydrates into corresponding carboxylic acids and/or aldehydes and ketones is important. For this purpose the electrochemical oxidation of some readily available carbohydrates like maltose, glucose, cellobiose, maltotriose, galactose, starch and cellulose into useful compounds

on Ni electrode and dimensionally stable anode (Ruthenium oxides on Titanium) was investigated. The analysis of products of the non-polymeric compounds was carried out by chromatographic methods. The oxidation products of starch and cellulose were analyzed using several analytical techniques like FTIR, NMR, SEM, LEX-SEC, ESI-MS, Elementary analysis etc... A significant amount of acidic and neutral oxidation products was identified. The electro-mediated oxidation of starch and cellulose was carried out using the radical TEMPO. The results in this case show more selective oxidation concerning the primary alcohol group.

Índice

Agradecimentos	vii
Resumo	xi
Abstract	xiii
Índice	xv
Símbolos e abreviaturas	xxi
Capítulo I	
1. Introdução	1
Capítulo II	
Revisão bibliográfica	7
2.1. Biomassa	7
2.1.1. Amido	9
2.1.1.1. Fontes de amido	12
2.1.1.2. Aplicação do amido na indústria alimentar	13
2.1.2. Celulose	14
2.1.2.1. Hemicelulose	18
2.2. Oxidação química de sacarídeos	19
2.3. Oxidação eletroquímica de sacarídeos	21
2.4. Hidrólise enzimática	23

2.5. Caracterização estrutural de oligossacarídeos por espetrometria de massa	24
2.5.1. Fragmentação padrão de carboidratos	26
Referências	28
2.6. Enquadramento e objetivo do trabalho	33
Objetivos do trabalho	33
Capítulo III	
Técnicas e procedimentos experimentais	35
3.1. Introdução	35
3.2. Condições e procedimentos experimentais	36
3.2.1. Preparação do material e das soluções	36
3.2.1.1. Preparação do material	36
3.2.1.2. Preparação das soluções	36
3.2.2. Células e elétrodos utilizados	39
3.2.3. Material de eletrodo	42
3.3. Métodos eletroquímicos	43
3.3.1. Voltametria cíclica	43
3.3.2. Eletrólito de suporte	48
3.3.3. Eletrólises	48
3.3.4. Detecção e análise dos produtos de reação	52
3.4. Métodos analíticos	53
3.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	55
3.4.2. Cromatografia iônica	57
3.4.3. Cromatografia gás-líquido acoplada a MS (GC-MS)	58
Neutralização	60
Diálise	62
Teste de iodo	62
Liofilização	62
Derivatização	63
3.4.4. Cromatografia líquida da alta eficiência acoplada à espectroscopia de massa (HPLC-MS)	65
3.4.5. Análise das ligações glicosídicas	67
3.4.6. Análise de ácidos urônicos	67

Preparação dos padrões para a curva de calibração	68
3.5. Hidrólise e caracterização estrutural por ESI-MS das amostras eletrolisadas de amilose, amilopectina e celulose	69
3.5.1. Hidrólise enzimática	69
3.5.2. Cromatografia semi-preparativa de exclusão do tamanho/troca do ligando “Semi-preparative ligand-exchange/size exclusion chromatography (LEX/SEC)”	69
3.5.3. Análise estrutural de oligossacarídeos por espectrometria de massa com ionização por Electrospray (ESI-MS e ESI-MS/MS)	70
3.5.4. Espetrometria de infravermelho com transformada de Fourier in situ	70
3.5.5. Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	71
3.5.6. Titulação ácido/base	72
Referências	73
Capítulo IV	
Resultados e discussão	77
4.1. Introdução	77
4.2. Oxidação eletroquímica dos compostos não-poliméricos da biomassa disponível em larga escala	79
4.2.1. Oxidação eletroquímica no eletrodo de níquel na célula FM01-LC	79
4.2.1.1. Oxidação da D-celobiose	79
Análises GC-MS	81
Análise dos produtos da reação por ESI-MS e ESI-MS/MS	83
Distribuição dos Produtos de reação	86
4.2.1.2. Oxidação da D-maltose	89
Análise dos produtos de reação por GC-MS	90
Distribuição dos produtos de reação obtidos após 5 h de eletrólise	101
4.2.1.3. Oxidação da D-maltotriose	103
Distribuição dos produtos da reação	104

4.2.2. oxidação eletroquímica no DSA (Dimensionally stable anode), na célula FM01-LC	110
4.2.2.1. Oxidação da D-glucose	110
Distribuição dos produtos de reação	111
Oxidação da glucose a 0,8 V vs. ECS utilizando um programa de potencial	113
4.2.2.3. Oxidação da D-galactose em meio ácido utilizando um eletrodo de PbO ₂	117
Distribuição dos produtos de reação	118
4.2.2.4. Oxidação da D-celobiose	120
Distribuição dos produtos de reação	122
4.2.2.5. Oxidação da D-maltotriose	124
Distribuição dos produtos de reação	124
4.2.3. Oxidação seletiva da D-celobiose em carbono vítreo em meio NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃ 0,2 M utilizando o mediador TEMPO	128
4.2.4. Conclusões	134
4.3. Oxidação dos compostos poliméricos da biomassa disponível em larga escala	136
4.3.1. Oxidação eletroquímica no eletrodo de níquel na célula FM01-LC	136
4.3.1.1. Oxidação do amido	136
Teste de iodo	144
Microscopia eletrônica de varrimento	146
4.3.1.2. Oxidação do amido puríssimo (Sigma- Aldrich)	148
4.3.1.3. Oxidação da amilose e da amilopectina	152
4.3.1.3.1. Separação de produtos neutros e ácidos por LEX/SEC	154
4.3.1.3.2. Análise de espectros de ESI-MS	156
Análise dos produtos de oxidação da fração neutra da amilose	156
Análise dos produtos de oxidação da fração neutra da amilopectina	157
4.3.1.3.3. Análise de espectros de ESI-MS/MS	158

Análise dos produtos de oxidação da fração neutra (F19) da amilose	158
Análise dos produtos de oxidação da fração neutra (F19) da amilopectina	162
4.3.1.3.4. Análise de espectros de ESI-MS	165
Análise dos produtos de oxidação da fração Neutra (F15) da amilose	165
Análise ESI-MS da amilopectina (F16)	166
4.3.1.3.5. Análise de espectros de ESI-MS/MS	167
Análise dos produtos de oxidação da fração neutra (F16) da amilopectina	167
4.3.1.3.6. Análise de espectros de ESI-MS	169
Análise dos produtos de oxidação da fração Ácida (F10) da amilose	169
Análise dos produtos de oxidação da fração Ácida (F10) da amilopectina	171
4.3.1.3.7. Análise de espectros de ESI-MS/MS	171
Análise dos produtos de oxidação da fração ácida (F10) da amilose	171
Análise dos produtos de oxidação da fração ácida (F10) da amilopectina	173
4.3.1.4. Oxidação da celulose microcristalina	175
4.3.2. Oxidação eletroquímica no elétron de DSA na célula FM01-LC	177
4.3.2.1. Oxidação do amido	177
Teste de iodo	178
4.3.2.2. Oxidação da celulose	179
4.3.3. Oxidação do amido no elétron de nanotubos de carbono modificado com a platina	181
4.3.4. Oxidação do amido utilizando o mediador TEMPO	186
4.3.5. Oxidação da dextrina utilizando o mediador TEMPO	190
4.3.6. Oxidação da celulose microcristalina utilizando o mediador TEMPO	194

LEX/SEC	Separação de produtos de oxidação neutros e ácidos por	196
	Caraterização dos produtos de oxidação por espectrometria de massa, ESI-MS e ESI-MS/MS	197
	Análise dos espectros de ESI-MS dos produtos de oxidação da fração neutra (F19)	197
	Análise dos espectros de ESI-MS/MS dos produtos de oxidação	200
	ESI-MS/MS dos produtos de oxidação da fração neutra (F19) da celulose	201
	ESI-MS/MS dos produtos de oxidação da fração neutra (F17)	213
	ESI-MS dos produtos de oxidação da fração ácida (F10)	216
	ESI-MS/MS dos produtos de oxidação da fração ácida (F10)	218
	Ácidos urónicos	222
	Confirmação das ligações glicosídicas	223
	4.3.7. Conclusões	224
	Referências	225
	Considerações finais	227

Símbolos e abreviaturas

A notação e unidades apresentadas ao longo do texto seguem as orientações da IUPAC descritas em “*Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry*”, (2nd Ed., Blackwell, Oxford, 1993). No entanto, por conveniência, usam-se frequentemente em eletroquímica sub-múltiplos, pelo que muitas vezes as unidades são apresentadas nesta forma.

Os acrónimos utilizados foram mantidos em inglês e em alguns pontos do texto são referidos alguns termos em inglês cuja tradução não está definitivamente estabelecida. A lista de símbolos apresentada não é exaustiva, pelo que os símbolos utilizados apenas num ponto específico do texto são aqui omitidos, sendo o seu significado explicado no texto.

Principais símbolos e respetivas unidades

A	Área (m^2)
C	Concentração (mol m^{-3})
	C_i concentração inicial
	C_f concentração final
	C_i^0 concentração da espécie eletroativa
D	Coefficiente de difusão da espécie ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
ET	Eléctrodo de trabalho

ER	Eléctrodo de referência
E	Potencial de eléctrodo (V)
E_{ads}	Potencial de adsorção
E_{des}	Potencial de desadsorção
E_{ox}	Potencial de oxidação
E^0	Potencial padrão
E_i	potencial inicial
E_f	potencial final
$E_{(t)}$	potencial no tempo
E_p	potencial de pico
$E_{p/2}$	potencial de meia onda
j	Densidade de corrente eléctrica (mA c^{-2})
j_p	densidade de corrente de pico
Q	Carga eléctrica (C)
T	Temperatura (K)
V	Volume (m^3)
V	Velocidade de reacção ($mol\ m^{-3}\ s^{-1}$)
v	velocidade de varrimento de potencial (Vs^{-1})

Abreviaturas

FID	“flame ionization detector”
ESI	“electrospray ionization”
FTIR	“Fourier transform infrared”
HPLC	“high-performance liquid chromatography”
EI	“Electron impact”
IC	“Ion chromatography”
NMR	“nuclear magnetic resonance”
LEX/SEC	“Semi-preparative ligand-exchange/size exclusion chromatography”
DSA	“Dimensionally stable anode”
GC	“gás chromatography”
TCD	“thermal conductivity detector”

Da dalton

% mol percentagem molar

m/z razão massa/carga

MALDI ionização por desorção por laser assistida por matriz

min minutos

MS espectrometria de massa

MS/MS espectrometria de massa em tandem

F fração

h horas

Hex hexose

DP grau de polimerização

TMCS “trimetilclorossilano”

TEMPO “2,6,6-tetrametil-piperidin-1-oxoamónio”

Constante física

F (Constante de Faraday (96480 C mol^{-1}))

I

Introdução

A realização deste trabalho teve como objetivo principal a recolha de informação experimental que pudesse conduzir a uma melhoria do conhecimento do processo de oxidação eletroquímica de alguns hidratos de carbono disponíveis em larga escala, usando vários tipos de elétrodos. Para tal foram utilizadas técnicas experimentais de origem variada tais como a voltametria cíclica, eletrólises, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa, espetrometria de massa, Espetroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier, teste de iodo, titulação ácido/base, Microscopia Eletrônica, Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e análise elementar, com intuito de obter uma visão tão abrangente quanto possível dos produtos obtidos, da cinética e do mecanismo da reação.

Uma vez que se pretendeu investigar o potencial efeito oxidativo de amostras não poliméricas, foram testadas amostras padrão de glucose, galactose, celobiose, maltotriose e maltose para posterior comparação com as amostras dos poliméricos.

O processo de oxidação eletroquímica do amido e da celulose enquadra-se, numa perspetiva global, no domínio da eletrocatalise. Historicamente, o estudo deste processo eletrocatalítico apresenta poucos trabalhos desenvolvidos nesta área ao longo dos últimos anos, cuja essência abrangesse tanto aspetos do ponto de vista fundamental como aplicado.

As fontes de energia renováveis caracterizam-se, em termos gerais, pela sua disponibilidade descentralizada, por apresentarem uma capacidade de se auto-regenerarem em curtos períodos de tempo e pelos reduzidos impactos ambientais

decorrentes da sua utilização. A procura pelos recursos energéticos endógenos poderá dar um importante contributo para a redução do consumo de energia fóssil, com reflexos diretos sobre os preocupantes impactos ambientais a si associados, permitindo assim, a melhoria da qualidade do ar, de saúde das populações, bem como, a redução/controlo da importante e crescente poluição industrial e urbana, permite, para além da redução da dependência energética também a diversificação geográfica da energia primária, ou seja, a possibilidade desta ser produzida numa geografia mais alargada (redução da dependência estratégica). Neste último ponto é usual ouvir falar de produção de energia descentralizada, quer isto dizer que a sua produção é realizada de acordo com a distribuição do recurso, gerando por isso, um desenvolvimento alargado a todo o território, e não apenas às regiões mais industrializadas. Este fato pode assim, contribuir para a promoção da economia local e para a criação de emprego em regiões rurais.

A utilização de fontes renováveis para a produção de energia foi incentivada e fortemente divulgada na Europa e nos Estados Unidos da América a partir dos finais dos anos setenta. Neste contexto, a produção de energia a partir da biomassa vegetal constitui uma componente importante, inicialmente valorizando os resíduos agrícolas, florestais e agro-industriais já existentes, e posteriormente dando cada vez mais importância à produção de biomassa com fins energéticos [1]. No que diz respeito à sua definição Biomassa é a fração biodegradável de produtos e resíduos da agricultura (incluindo substâncias vegetais e animais), da floresta e das indústrias relacionadas, bem como a fração biodegradável dos resíduos industriais e urbanos.

Atualmente o sistema energético internacional é fortemente dependente de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás), pois cerca de 80% do consumo mundial de energia originam dessas fontes: o consumo apresenta um crescimento anual de cerca de 2% (média em 20 anos) e cresceu 3,1% ao ano nos últimos 5 anos. Esta é uma situação que merece mudanças não só pela exaustão gradual das reservas de combustíveis fósseis como também pelos efeitos negativos ao meio ambiente que resultam do seu uso, entre os quais o aquecimento global [2,3].

À medida que as matérias-primas fósseis vão diminuindo irremediavelmente e a pressão sobre o meio ambiente vai aumentando, a transformação progressiva da indústria química de modo a utilizar matérias-primas renováveis será um processo inevitável, pondo-se neste momento a questão: quando estarão esgotados os combustíveis fósseis disponíveis? Ou, apresentando o problema de modo mais

adequando: quando é que as matérias-primas fósseis ficarão tão caras que as matérias-primas renováveis serão uma alternativa economicamente competitiva? Os peritos prevêem o fim do petróleo barato para 2040 [3], um desenvolvimento que nós podemos testemunhar agora, enquanto a indústria química combate os custos crescentes do petróleo e gás natural.

Ironicamente, o domínio do processamento termoquímico na produção e comercialização de combustíveis, produtos químicos e de energia a partir de recursos fósseis há mais de um século pode explicar porquê as vezes é negligenciado como recurso viável para produtos à base bio. Chaminés expelindo produtos de processamento termoquímico de combustíveis fósseis é um ícone indelével do séc. XX que ninguém deseja replicar com a biomassa [4,5]. No entanto, como descrito no relatório divulgado pelo Departamento de Energias dos Estados Unidos em 2008 [6], ciências térmicas e catalíticas oferecem oportunidades avançadas e dramáticas no processamento da biomassa.

A procura por combustíveis alternativos levou alguns países a optar por biocombustíveis devido principalmente ao recente interesse na energia da biomassa, o que gerou combustíveis líquidos tais como o etanol pela fermentação de açúcares extraído, principalmente, da cana de açúcar, do milho, da beterraba, entre outras fontes [2].

É desejada a transição para um sistema de produção “bio” entretanto, esta transição está, infelizmente, limitada por uma variedade de obstáculos. Atualmente as matérias-primas fósseis são mais económicas, e a tecnologia dos processos para a sua conversão em produtos químicos orgânicos está bem desenvolvida e é muito diferente daquela requerida para transformar por exemplo hidratos de carbono em produtos com perfil para aplicação industrial.

Em termos de volume produzido mundialmente os hidratos de carbono constituem a maior categoria dos produtos orgânicos: aproximadamente 95% da biomassa produzida anualmente são hidratos de carbono, que é de aproximadamente 200 biliões de toneladas anuais. Desta, somente uma pequena fração (cerca de 4%) é utilizada pelo Homem, para aplicações fora do uso alimentar [7,8]. Estes dados reforçam a ideia de ser, atualmente necessário que se desenvolvam sequências reacionais na elaboração dos produtos primários com perfil aplicação industrial e com eventual adaptação para uma larga escala, a partir dos hidratos de carbono.

Como principais produtos desta categoria podemos destacar a celulose, a hemicelulose, o amido e os seus produtos de hidrólise (celobiose, maltose, maltotriose etc...). No caso dos produtos poliméricos duas estratégias podem ser consideradas na valorização destes recursos como matéria prima para a indústria química: a transformação em produtos úteis, mantendo a cadeia polimérica ou a obtenção de produtos não-poliméricos através da despolimerização seguida por uma possível etapa de transformação. Na etapa de hidrólise enzimática a quebra das estruturas polimerizadas da celulose, amilose e amilopectina passa a ser realizada por intermédio de enzimas, convertendo-se estas moléculas em açúcares simples.

A utilização não alimentar dos polissacarídeos está atualmente confinada às indústrias têxtil, do papel, e de revestimentos, quer nessa forma quer na forma de ésteres e de éteres simples. Assim, a unidade repetida e constituinte destes polissacarídeos – glucose (celulose, amido), frutose (inulina), xilose (xilano), etc., é barata e disponível numa escala de multi-toneladas. Os hidratos de carbono, são a matéria-prima para produtos químicos orgânicos básicos. Como a oxidação é simplesmente um processo de transferência eletrônica, a oxidação anódica neste tipo de células, parece ser uma alternativa interessante [9].

O desenvolvimento sustentável foi definido, segundo o Relatório Brundtland da Organização das Nações Unidas, como o desenvolvimento que satisfaz as necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras satisfazerem as suas próprias necessidades. A indústria química, sendo um dos setores industriais globalmente mais importante em termos do volume produzido tem uma influência significativa no desenvolvimento sustentável. Neste âmbito, a electroquímica oferece uma série de benefícios nas áreas de química sintética, produção e armazenamento de energia e remediação de poluentes, que permitem classificá-la como uma tecnologia limpa [10]. As transformações eletroquímicas podem ser realizadas em solução aquosa, associando os conceitos e os métodos da eletroquímica interfacial com os da catálise heterogénea. A aplicação de um potencial eletroquímico ou de uma intensidade de corrente pode evitar o uso de temperaturas e pressões elevadas que são muitas vezes necessárias para processos químicos convencionais. O reagente electricidade substitui agentes redox tóxicos ou prejudiciais para o ambiente. A separação dos produtos do meio reaccional pode ser também facilitada neste caso. Estas características podem possibilitar a valorização de alguns componentes de biomassa nomeadamente hidratos de carbono, um recurso renovável, como a matéria-prima para a indústria química

superando as barreiras tecnológicas existentes. A escassez de recursos convencionais como petróleo e gás, no futuro determinarão o desenvolvimento de novas estratégias na valorização de recursos renováveis existentes e a química terá um papel decisivo para enfrentar os desafios relacionados com a sustentabilidade através das tecnologias limpas [11].

Neste contexto, foi investigada a transformação de alguns polissacarídeos como o amido, a celulose e de alguns mono e oligossacarídeos como o maltotriose, a maltose, a galatose e a celobiose utilizando métodos eletroquímicos. Com o objetivo de aproximação às condições industriais foi utilizado neste estudo uma célula eletroquímica do tipo “filter press” com circulação do eletrólito (FM01-LC da ICI).

A presente dissertação, organizada em quatro capítulos, segue uma estrutura que, implicitamente, divide o trabalho em três unidades principais que refletem os aspectos teóricos, técnicos e de análise dos resultados experimentais obtidos.

No capítulo 1, são referidos aspectos de índole geral considerados relevantes no âmbito do trabalho desenvolvido. Neste contexto, no capítulo II são apresentados algumas generalidades sobre polissacarídeos. Simultaneamente, são mencionados alguns trabalhos relacionados com a oxidação eletroquímica de mono e dissacarídeos.

A terceira parte é dedicada à componente experimental do trabalho, nomeadamente, no que diz respeito a técnicas e procedimentos utilizados no decurso do mesmo. Aqui são incluídas algumas observações de carácter geral consideradas relevantes na realização das experiências. Toda esta informação está reunida no capítulo III.

A quarta parte, inteiramente dedicada à apresentação e discussão dos resultados experimentais e em curso de publicação.

A estrutura de cada um dos capítulos é governada pelas particularidades do tipo de estudo em questão. No entanto, todos os capítulos seguem uma estrutura que, globalmente, inclui uma breve introdução, a apresentação e discussão dos resultados experimentais e, por fim, as principais conclusões resultantes do presente trabalho.

II

Revisão bibliográfica

2.1. Biomassa

Na última década tem-se assistido a um interesse renovado pela procura de novas soluções que permitam um desenvolvimento socioeconómico sustentável. Em larga medida esse modelo de desenvolvimento terá de se assentar predominantemente na utilização de recursos renováveis, como fontes de matérias-primas, produtos químicos, materiais, energias e combustíveis, em detrimento de recursos finitos como os recursos fósseis, que se aproximam da exaustão no espaço de algumas décadas. No entanto a biomassa vegetal é inquestionavelmente a matéria-prima de base neste novo paradigma e cuja transformação será levada a cabo nas designadas “Biorrefinarias” . Este conceito abre obviamente grandes horizontes para as áreas em que as principais atividades económicas rodam em torno dos setores agroflorestais.

A abundante vida vegetal do nosso planeta é armazenadora da energia solar e de substâncias químicas, sendo um recurso renovável que chamamos de biomassa.

Biomassa é a matéria prima orgânica, quer seja de origem vegetal quer animal, que pode ser utilizada como fonte de energia. A biomassa, depois do sol, é uma das mais antigas fontes de energia, utilizada pelo Homem, pelo que todos os organismos biológicos que podem ser aproveitados como fontes de energia, são igualmente designados biomassa [1, 2].

A biomassa tem origem na fotossíntese, através da qual os produtos primários fixam o CO₂ da atmosfera, utilizando a energia da radiação solar e o transformam na matéria que compõe as plantas. Podemos considerar a biomassa como energia solar aprisionada. Esta pode ser convertida em várias formas de energia tais como eletricidade, combustível ou calor. As plantas são um produto direto da fotossíntese. Durante o processo da fotossíntese o sol fornece, sob forma de radiação, a energia que as plantas necessitam para transformar a água, o dióxido de carbono e os minerais (nutrientes) em oxigênio e açúcares. Se a biomassa for queimada de modo eficiente, há produção de dióxido de carbono e água e libertação da energia fornecida pela luz do sol. Portanto, o processo é cíclico e dizemos que a biomassa é um recurso renovável constituindo uma matéria-prima renovável para a indústria química [3].

O componente principal da biomassa terrestre é a madeira. Esta pode ser descrita quimicamente como uma mistura de três polímeros interligados, nos quais estão distribuídos os compostos de baixo peso molecular. Os dois primeiros, celulose e hemicelulose que dominam a maior parte dos ecossistemas naturais, são hidratos de carbono. O terceiro componente, a lenhina é um polímero irregular cuja composição depende não apenas do tipo de vegetal, mas também de condições de crescimento. A maioria dos polissacarídeos encontrados em paredes celulares vegetais pertence às celulose, hemiceluloses ou classes de pectinas. Ainda que a celulose funcione como o componente rígido e sustentador de peso da parede celular, a rigidez da microfibrila celulósica é reforçada dentro de uma matriz de hemiceluloses e pectinas [2].

As hemiceluloses são os polissacarídeos extraídos com soluções alcalinas de bases forte como KOH ou NaOH mas não como agentes quelantes; geralmente têm capacidade de se ligar por pontes de hidrogênio à celulose [5]. São geralmente classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal no esqueleto, como, por exemplo, xilanas, mananas e glucanas.

Portanto, os hidratos de carbono são compostos de carbono, hidrogênio e oxigênio que fornecem energia às plantas e aos animais que delas se alimentam formando cadeias de açúcares simples ou complexas. Os alimentos ricos em açúcares são uma boa fonte de energia. Os principais hidratos de carbono utilizados na alimentação humana são: o amido, a sacarose, a lactose e aqueles encontrados nos frutos. De acordo com a sua atuação no organismo são divididos em [2,3]:

- Monossacarídeos, não necessitam sofrer qualquer transformação para serem absorvidos pelo nosso corpo, passando diretamente do intestino para o sangue.

- Dissacarídeos, são compostos por duas moléculas de monossacarídeos associadas, que são separadas por hidrólise.

- Polissacarídeos, originários da condensação de vários mono. Quando sofrem hidrólise, dão origem a várias moléculas de monossacarídeos. São, portanto polímeros naturais.

Com o decorrer dos tempos, a designação de hidratos de carbono foi sendo substituída pelas designações glícidos ou açúcares, devido ao seu sabor doce. Na molécula de um glícido existem alguns grupos característicos como o da função álcool (-OH) e das funções aldeído (HC=O) ou cetona (C=O). O sabor doce, tão característico deste grupo de compostos, não apresenta a mesma intensidade para todos eles.

O amido é a forma de reserva glucídica nos vegetais, está disponível em abundância na natureza. O único outro componente orgânico que ocorre naturalmente em quantidade maior no planeta é a celulose. É encontrado em todas as formas de vegetais de folhas verdes, seja nas suas raízes, caules, cereais, sementes ou frutas. A solubilidade restrita da celulose a alguns solvente específicos limita a sua aplicação. Fortes interações intermoleculares do tipo ligações hidrogênio entre suas cadeias, fazem com que a celulose seja solúvel apenas em determinados solventes.

O amido serve à planta como alimento, proporcionando-lhe energia em épocas de dormência e germinação, tendo papel semelhante no ser humano, nos animais e, até mesmo, em outros organismos e formas de vida. O homem utiliza o amido de muitas outras formas, além de sua finalidade inicial de fonte de energia biológica [4, 5].

Na indústria em geral, mas principalmente na alimentar, o amido é utilizado para alterar ou controlar diversas características, como textura, aparência, humidade, consistência e estabilidade no *shelf life*. O amido ainda pode ser usado como auxiliar em processos, na composição de embalagens e na lubrificação ou equilíbrio do teor de humidade.

2.1.1. Amido

O amido é um carbo-hidrato do tipo α -D e β -D glucose, contendo seis átomos de carbono e formando anéis de forma piranosídica.

Através da condensação enzimática, uma molécula de água dilui-se entre duas moléculas de glucose para formar uma ligação. Esta condensação ocorre

predominantemente entre carbonos 1 e 4 conforme representado na Figura 2.1 e ocasionalmente entre os carbonos 1 e 6.

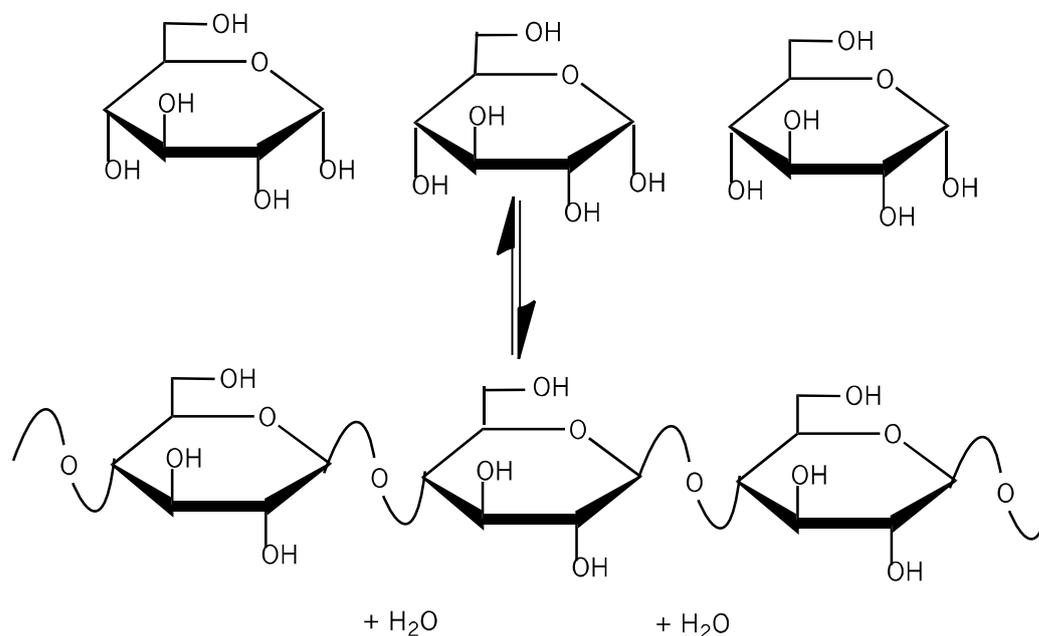


Figura 2.1 - Condensação enzimática.

O amido é um polissacarídeo formado por amilose e amilopectina. Quando somente ligações α 1-4 se desenvolvem e conferem a molécula uma estrutura helicoidal estabilizada por pontes de hidrogénio a macromolécula resultante possui cadeia linear, sendo denominada amilose. O comprimento desta cadeia varia de acordo com a fonte (planta de onde é extraído), mas em geral possui entre 500 e 200 unidades de glicose [5].

O segundo tipo de polímero existente no amido, menos hidrossolúvel que a amilose se desenvolve quando a condensação enzimática entre unidades de glicose ocorre nos carbonos 1 e 6. Esta ligação ocasional que dá uma estrutura ramificada, juntamente com as predominantes ligações glicosídicas 1-4, resulta em uma ramificação e no desenvolvimento de uma molécula muito maior em tamanho do que a amilose, mas com comprimento de cadeias lineares de somente 25 a 30 unidades de glicose. Esta molécula é chamada amilopectina (ver Figura 2.2).

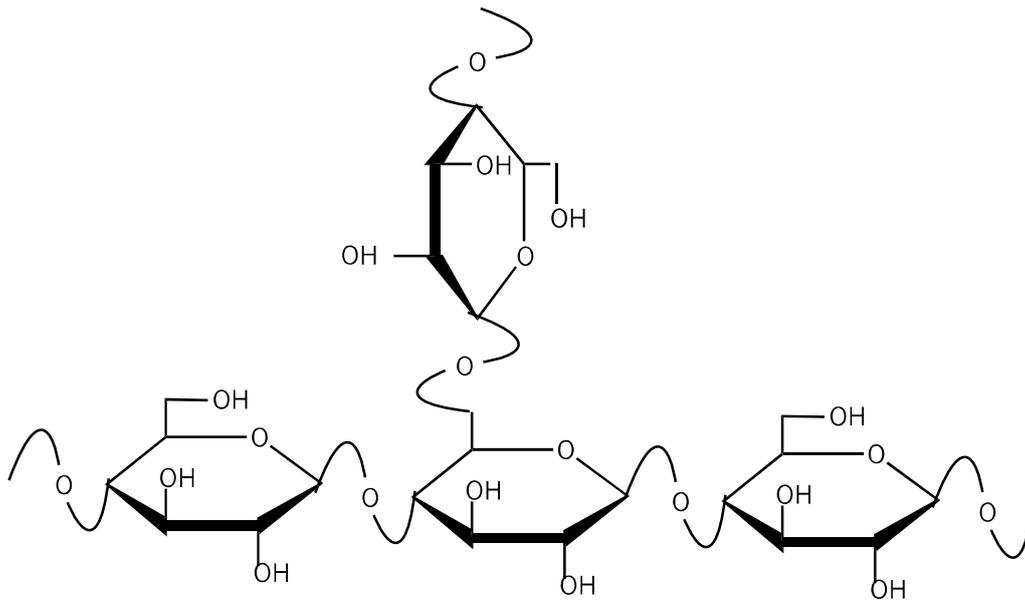


Figura 2.2 - Estrutura ramificada da amilopectina [5,14].

Como já foi mencionado, amido é constituído de amilose e a amilopectina, que somente podem ser evidenciados após solubilização dos grânulos e separação. Mas a percentagem de uma para a outra varia de acordo com a fonte de amido. O milho possui 25 a 28% de amilose com o restante sendo amilopectina. O milho com mais percentagem de amilose pode atingir 80%, a mandioca possui aproximadamente 17% [4].

A unidade estrutural do amido, a glucose, é não só o monossacarídeo mais abundante, como também o de maior importância, pois é um nutriente essencial à célula. Encontra-se em frutos e também nos animais, a fórmula molecular é $C_6H_{12}O_6$; trata-se de uma hexose. Para indicar o sinal do poder rotatório em condições determinadas, é previamente escrito dextro (D) ou levo (L), ou um dos sinais (+) ou (-).

A glucose forma um hemiacetal cíclico que predomina em solução, sobre a forma aldeído. A formação do acetal converte o carbono do aldeído num carbono assimétrico. Levando à formação de dois hemiacetais em equilíbrio com o aldeído em solução, aos quais se dá a designação α e β como se verifica na Figura 2.3 [10].

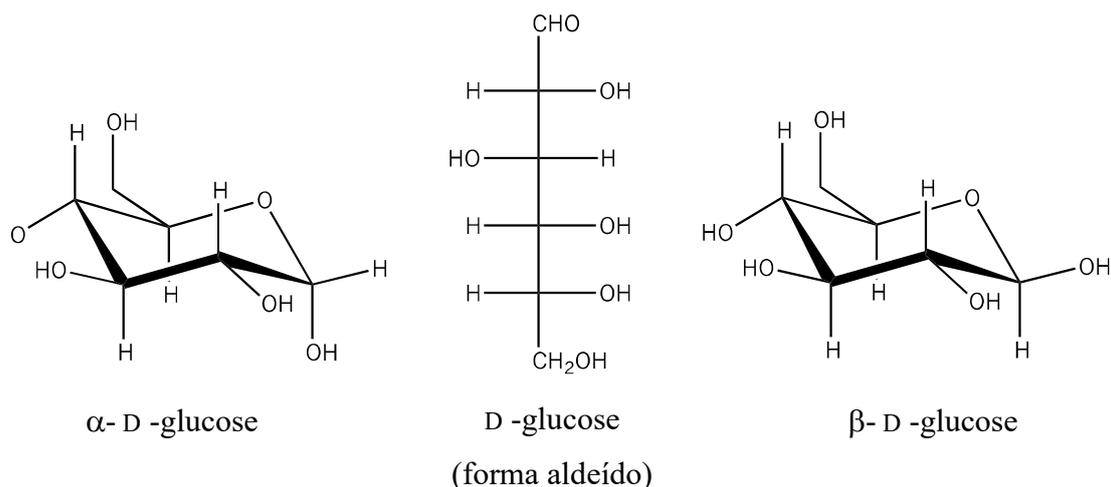


Figura 2.3 - Representação da estrutura da molécula de glucose em cadeia aberta e fechada.

2.1.1.1. Fontes de amido

As fontes mais comuns de amido alimentar são o milho, a batata, o trigo, a mandioca e o arroz. O milho é cultivado em climas mais temperados, sendo 40% da produção mundial proveniente dos Estados Unidos, onde é a principal cultura [5].

A batata é cultivada em zonas com clima mais frio e húmido, como a Europa e a Rússia, regiões responsáveis por cerca de 70% de seu cultivo. A batata é nativa dos Andes peruanos e foi levada pela primeira vez à Europa em meados do século XVI, pelos conquistadores espanhóis.

O amido é classificado em função da sua estrutura físico-química e da sua susceptibilidade a hidrólise enzimática. De acordo com a velocidade com a qual o alimento é digerido *in vitro*, o amido divide-se em rapidamente digerível, quando for submetido à incubação com amilase a uma temperatura de 37°C, converte-se em glucose em 20 minutos; lentamente digerível, se nas condições anteriores é convertido em glucose em 120 minutos; e amido resistente, que resiste à ação das enzimas digestivas [2,10,13].

2.1.1.2. Aplicação do amido na indústria alimentar

Devido ao relativo baixo custo, o amido tem sido muito utilizado pela indústria alimentar como ingrediente calórico e como melhorador de propriedades físico-químicas [5].

O mercado do amido vem crescendo e aperfeiçoando-se nos últimos anos, levando à obtenção de produtos com características específicas que atendam as exigências industriais. Amidos nativos têm sido usados há muito tempo como ingredientes na preparação de diferentes produtos. Entretanto, a sua utilização é limitada em função das condições de processamento, como temperaturas e pH, que restringem a sua aplicação em escala industrial [4].

Diante disso, essas limitações podem ser solucionadas com a modificação química, física ou enzimática do amido. A modificação química dos amidos nativos tem conferido a estes propriedades funcionais peculiares. O grau de modificação do amido é produzido em condições controladas de temperatura e pH e afeta diretamente o seu preço e a sua aplicação [2,10].

A aplicação industrial do amido deve-se a sua característica única de poder ser usado diretamente na forma de grânulos intumescidos, na forma dispersa, como filme obtido da secagem de uma dispersão ou após extrusão, depois da conversão a uma mistura de oligossacarídeos ou a glucose, que pode ser isomerizada enzimaticamente para frutose [9].

As possibilidades de aplicações industriais do amido da batata são praticamente inesgotáveis, bastando haver adequação ou alteração de suas características físico-químicas às necessidades dos processos e produtos, tais como a formação de filmes transparentes ou opacos, elevada ou baixa viscosidade aparente, cromosidade, untuosidade, capacidade de retenção de humidade, dentre outras. O maior desafio aos produtores desse ingrediente é o desenvolvimento e principalmente a venda técnica de seus produtos para as indústrias consumidoras. Desenvolver aplicações para os novos ingredientes, modificados e com propriedades únicas, com baixo custo e excelente performance é um grande desafio para as empresas que produzem o amido da batata ou da mandioca. Esse desafio precisa ser enfrentado para garantir o sucesso deste importante insumo para as indústrias de diversos ramos, com destaque para a alimentar, têxtil e de papel e celulose [4].

2.1.2. Celulose

A celulose e a amilose são muito semelhantes em estrutura, com a simples exceção do arranjo espacial das pontes entre os carbonos anoméricos 1 e 4 tal como ilustra a Figura 2.4. A forma de β -glucose encontrada na celulose resulta em uma molécula rígida com fortes ligações intermoleculares que não é digerível pelos seres humanos [13].

Portanto, a celulose é um polímero orgânico mais abundante na terra, sendo encontrada em todas as plantas terrestres, e mesmo em muitas plantas aquáticas, como algas. A celulose é um homopolissacarídeo formado pela ligação de um conjunto de monómeros de glucose, na forma piranósica, constituído por cadeias lineares muito longas que podem chegar a vários milhares de unidades e unidos por ligações glucosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Este tipo de ligação permite a adopção de uma conformação linear pelo fato de o polímero possuir grupos hidroxilo de ambos os lados dos monómeros, permite a formação de ligações por pontes de hidrogénio entre as moléculas da celulose. Estas ligações permitem agregar estas cadeias em longos feixes formando microfibrilhas, nas quais regiões altamente ordenadas (cristalinas) se alternam com regiões menos ordenadas (amorfas) [15].

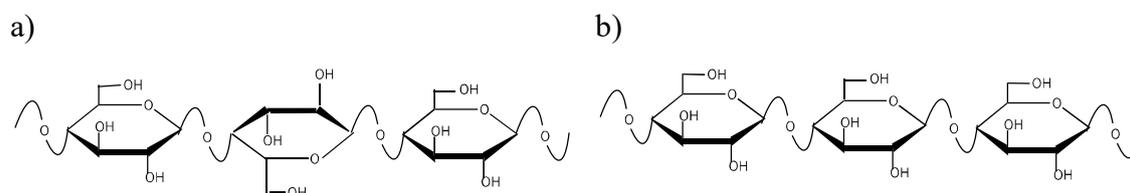


Figura 2.4 - Estrutura da celulose, ligação do tipo $\beta(1,4)$ (a) e amilose, ligação do tipo $\alpha(1,4)$ (b) [13].

Estas cadeias podem encontrar-se estreitamente associadas através de ligações de hidrogénio ou do tipo van der Waals e formar desse modo estruturas complexas, praticamente insolúveis, que consomem a base da utilização industrial da celulose (fibras de papel, tecidos, etc.) [14].

A existência de regiões cristalinas e regiões amorfas faz com que a reatividade da celulose seja heterogênea, existindo como tal diferentes acessibilidades aos reagentes químicos. Não é hidrolisável pelas enzimas presentes no aparelho digestivo do homem ou de outros mamíferos, que não dispõem de celulasas. O monômero estrutural é a celobiose. A função biológica da celulose pensa-se ser unicamente de suporte proporcionando forma e resistência à parede celular ou seja, é um componente da parede celular constituindo cerca de 45% do seu peso seco. Muitas das propriedades da celulose encontram-se dependentes do seu grau de polimerização (DP), isto é, do número de moléculas de glucose que constituem uma molécula de celulose. O grau de polimerização da celulose nas paredes celulares secundárias é de 14000 resíduos; nas paredes celulares primárias a celulose aparenta possuir uma distribuição bifásica do grau de polimerização com uma população de polímeros com cerca de 500 resíduos de glucose e outra que varia entre 2500 e os 4500. A fórmula química da celulose é $C_6nH_{10n+2}O_{5n+1}$ indicando n o grau de polimerização.

A estrutura cristalina da celulose foi primeiramente descrita por Mark e Meyer, em 1928. Desordem e polidispersidade no comprimento da estrutura previne a formação de cristais simples, e estudos de difração de raios-X da estrutura cristalina da celulose têm sido limitados a experiências de difração da fibra. A combinação de difração de raios-X com cálculos de modelos indica que cadeias de celulose cristalina estão em conformação de duplas hélices, achatadas e estendidas; pequenas variações nesta conformação ou no empacotamento das cadeias celulósicas dentro dos cristais levam a um bom número de polimorfos cristalinos, muitos dos quais podem ser interconvertidos por vários processos de tratamento [2]. As microfibrilas compõem fibrilas e estas compõem as fibras celulósicas. Como consequência dessa estrutura fibrosa, a celulose possui alta resistência a tração e é sob condições normais, extremamente insolúvel em água, o que é necessário para sua própria função como sustentação estrutural nas paredes celulares vegetais (cerca de 33% do peso da planta).

As reações mais importantes a serem destacadas para a celulose correspondem a (1) reações das ligações glucosídicas (degradação da celulose) e (2) reações de adição.

(1) Reações das ligações glucosídicas – consistem na quebra da ligação acetal da cadeia de celulose pela ação de um ácido ou base. A Figura 2.5 mostra a hidrólise ácida da celulose. Primeiramente, ocorre a rápida protonação do oxigênio da ligação glicosídica, formando um complexo intermediário entre o próton e o oxigênio

glicosídico. Posteriormente, ocorre lentamente a quebra da ligação glicosídica, seguida da adição de água. Pode ocorrer também, a protonação do oxigênio que se encontra na molécula cíclica, ou de ambos os oxigênios, tanto cíclico quanto o da ligação glicosídica, simultaneamente.

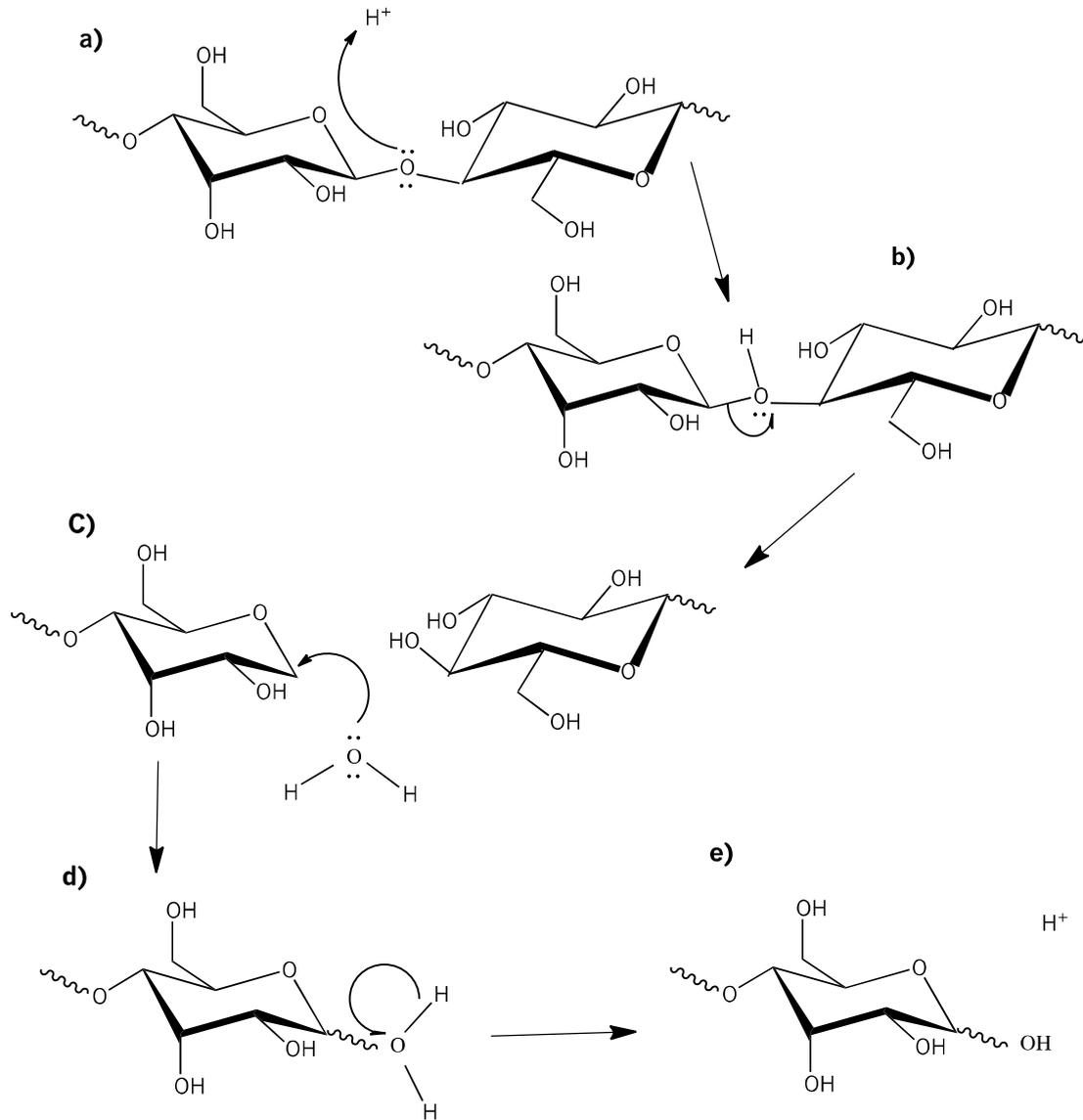


Figura 2.5 - Mecanismo de hidrólise da celulose catalisada por ácido [2].

A degradação hidrolítica pode ser homogênea ou heterogênea, dependendo se a celulose é, respectivamente, solúvel ou não no meio de reação. Na hidrólise heterogênea, com ácido sulfúrico, a celulose mantém sua estrutura fibrosa. Nesta hidrólise em primeiro lugar dá-se o ataque e a solubilização da celulose das regiões amorfas, mais acessíveis à penetração do reagente. Em seguida, a velocidade de

hidrólise diminui, correspondendo esta diminuição à degradação da celulose nas regiões cristalinas ou ordenadas. A fração mais facilmente hidrolisável representa, geralmente, 10 a 12% em peso do conteúdo em celulose [16,17].

Em meio alcalino, utilizando reagentes como NaOH e NH₃, ocorre reações de peeling dos grupos terminais redutores dos polissacarídeos e a hidrólise alcalina das ligações β-glucosídicas e dos grupos acetílicos. A Figura 2.6 apresenta a hidrólise alcalina da celulose.

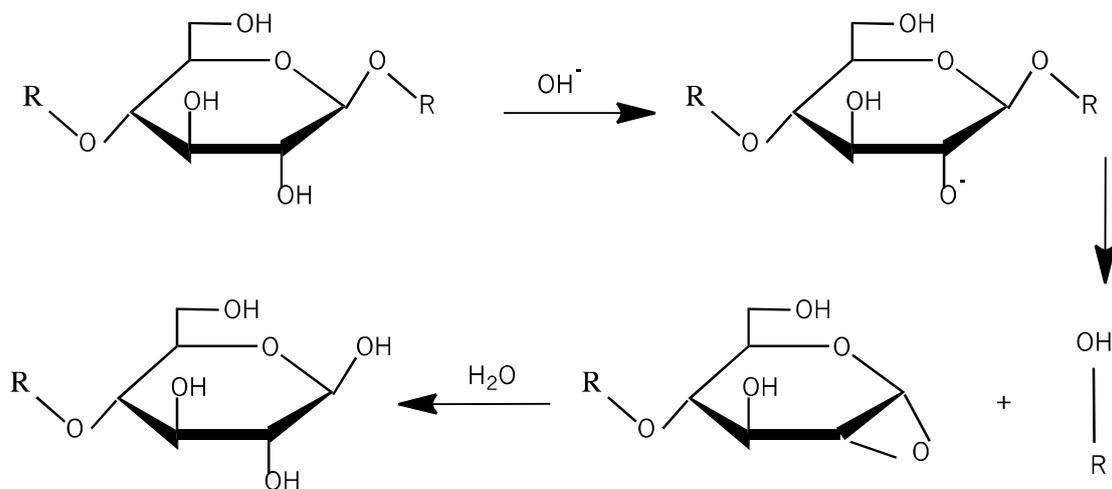


Figura 2.6 - Hidrólise alcalina da celulose a temperaturas superiores a 150 °C [2].

(2) Reações de adição – os componentes químicos que proporcionam a ocorrência de reação de adição com a celulose, em geral, são agentes de inchamento (Swelling). A introdução do agente de adição entre as cadeias de celulose leva ao inchamento da fibra podendo afastar as cadeias de celulose uma das outras, ficando as fibras em solução. O tamanho da molécula do reagente, a concentração aplicada e a temperatura são fatores que condicionam o efeito de Swelling. Note-se que a remoção do reagente causa a regeneração da celulose. A aplicação de tratamentos com NaOH pode provocar, além do efeito de Swelling, uma alteração na estrutura da celulose, levando à formação de uma celulose II, a qual de um ponto de vista termodinâmico é considerada mais estável [16].

2.1.2.1. Hemicelulose

As hemiceluloses, também designadas de polioses, diferem da celulose por serem compostas por diferentes açúcares, com cadeias estruturais mais pequenas e mais ramificadas, o seu DP varia entre 80 e 200. Os açúcares que entram na sua composição podem ser pentoses, como a β -D-xilose, α -D-arabinopiranosose e α -D-arabinofuranose, hexoses como a β -D-glucose, β -D-manose e α -D-galatosose, ácidos urónicos como o ácido β -D-glucurónico, ácido α -D-4-O-metilglucurónico e ácido α -D-galaturónico edesoxioses (α -D-Ramnose e α -L-fucose) [18].

As hemiceluloses possuem a função de interligar a lenhina às fibras de celulose tornando a matriz celulose-hemicelulose-lenhina mais rígida dando origem ao designado complexo Lenhina-polissacarídeos. As hemiceluloses encontradas nas folhas (angiospérmicas) encontram-se por norma parcialmente acetiladas O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano (Glucuronoxilanos – GX), sendo a base da sua constituição um homopolímero de D-xilose na forma piranósica unido por ligações $\beta(1\rightarrow4)$. Dependendo da espécie considerada dentro da angiospérmicas o conteúdo em xilanos pode variar entre 15 a 30% do peso da madeira seca.

Um segundo tipo de hemiceluloses, que pode representar cerca de 2-5% da constituição das madeiras de angiospérmicas, são os glucomananos (GM), formados por uma proporção semelhante de β -D-glucopiranosose e β -D-manopiranosose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$. A proporção de glucose: manose nestas hemiceluloses pode variar entre 1:2 e 1:1. Na Figura 2.7 podemos visualizar a estrutura primária do glucomanano.

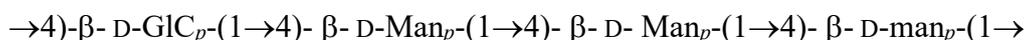


Figura 2.7 - Estrutura primária do glucomanano.

Um terceiro tipo de hemiceluloses que pode estar presente na constituição de algumas angiospérmicas, podendo também aparecer pequenas quantidades em herbáceas, são os Xiloglucanas (XG). Este tipo de hemiceluloses, que pode representar 2-25% do peso seco das angiospérmicas, consiste num esqueleto de unidades de D-glucopiranosose ligadas por ligações β -1,4. Às unidades de D-xilopiranosose podem ainda

estar ligados resíduos de L-arabinose e D-galatose formando cadeias laterais bi ou triglicosídicas [19]

As hemiceluloses contrariamente à celulose são essencialmente amorfas, o que facilita grandemente a acessibilidade aos agentes químicos. No entanto, algumas hemiceluloses podem perder alguns substituintes da sua cadeia e sofrer cristalização induzida, com formação de fortes ligações por pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxílicos de cadeias adjacentes. Desta forma, ocorre a formação de um retículo cristalino, que dificulta o acesso dos agentes químicos e, conseqüentemente as reações químicas [6].

2.2. Oxidação química de sacarídeos

O amido e a celulose podem ser oxidados por diversos agentes como o hipoclorito de sódio e de cálcio, o persulfato de amônia, o permanganato de potássio, o peróxido de hidrogénio, o ácido peracético, o cloridrato de sódio e os perboratos e ácidos hipoclorídicos [20]. A modificação por oxidação é produzida pela reação do polissacarídeo com quantidade específica de reagente em pH e temperatura controlados. Diante disso, apesar da possibilidade de utilização na indústria alimentar, esses polissacarídeos são utilizados preferencialmente na indústria de papel, pois produzem suspensões que podem ser usadas como dispersantes, capazes de formar filmes uniformes, os quais selam os poros e proporcionam melhor impressão. Essas propriedades são resultado da reação de oxidação, na qual alguns grupos hidroxilo das moléculas de amido ou da celulose são primeiramente oxidados a grupos carbóxilos. O número de grupos carbonilo e carbóxilo indicam o grau de oxidação do polissacarídeo, sendo que esses grupos provêm dos álcoois dos carbonos nas posições dois, três e seis. A reação de oxidação do amido e da celulose é acompanhada de quebra de ligações glicosídicas, com parcial despolimerização do polissacarídeo [4,20]. As propriedades físico-químicas do amido dialdeído (DAS), obtidas pela oxidação do amido com periodato, foram estudadas por Veelaert *et al.* [21].

Em Zhu *et al.*, [22], é relatada a caracterização estrutural dos produtos de reação do amido gerados pela oxidação com reagentes hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogénio. A estrutura de malto-oligómeros com grupos ácidos dicarboxílicos provenientes da oxidação do amido da batata utilizando hipoclorito foi igualmente

estudada por Teleman *et al.* Análises pelo método espectroscópico de ^{13}C -RMN permitiram identificar numerosos produtos com grupos ácido carboxílicos, alguns dos quais na posição C2 e C3 da unidade de glucose [23]. Os ácidos carboxílicos, resultantes da oxidação do amido da batata com NO_2 foram caracterizados por Kochkar *et al.*, [24] Segundo estes autores, a análise de ^{13}C -RMN mostrou a oxidação do amido principalmente no carbono C6.

Rong Zhang *et al.*, estudaram as propriedades do amido transformado com alto grau de oxidação com CuSO_4 e H_2O_2 , utilizando técnicas como FTIR, TGA, DSC e XRD. Foi observada uma diminuição na viscosidade intrínseca e na estabilidade termal para produto de oxidação quando comparado com o amido inicial.

A degradação oxidativa do amido do trigo nativo com bromato foi estudada por Kamulainen *et al.*. Este estudo mostrou um aumento dos grupos ácidos dependentes da quantidade inicial do amido e do tempo de reação [25].

A oxidação dos hidratos de carbono utilizando o radical TEMPO na presença de oxidantes primários como hipoclorito e brometo de sódio pode ser também utilizada para uma transformação mais seletiva dos grupos álcool primário dos sacarídeos, tal como descrito por Bragd *et al.*. Este tipo de oxidação seletiva em diversos materiais de eletrodos (Au, Pt, Ni e carbono vítreo) com o TEMPO continua a despertar interesse, na medida em que estes podem ser utilizados em vários estudos no campo da eletrossíntese. Devido a este fato, Bragd *et al.* investigaram a oxidação de alguns mono, di e polissacarídeos incluindo ciclodextrinas e amido com o mediador o TEMPO. Os autores confirmaram com este estudo a aplicabilidade desta técnica a uma grande variedade de hidratos de carbono [26].

A oxidação do amido com o TEMPO foi também estudado por Kato [27]. A quantidade de NaClO e o tempo de reação, foram determinados neste como os fatores mais importantes no controlo do grau de oxidação do álcool primário. Zhang e colaboradores estudaram a oxidação do carbono C6 do amido do milho utilizando o TEMPO [28]. O conteúdo em amido parcialmente oxidado foi testado como retardador de chamas e os resultados foram encorajadoras. Tahiri *et al.*, publicaram trabalhos sobre a oxidação catalítica da celulose com o TEMPO, com o objetivo de sintetizar poliglucuronas. Segundo estes autores, amostras da celulose na forma celulose-I são difíceis de oxidar com o sistema TEMPO- NaBr - NaClO . Um aumento de amorficidade permite aumentar o grau de oxidação [29,30].

A oxidação da celulose com o TEMPO para preparar o ácido poliurónico foi efetuado por Isogai *et al.*, [31]. No caso da celulose regenerada e mercerizada, a percentagem dos grupos álcool primário oxidados foi bastante elevada ao contrário da celulose nativa que apresentava no fim da reação um grau de oxidação relativamente pequeno. Perez *et al.*, efetuaram, investigações sobre a oxidação da celulose III com o TEMPO, onde evidenciam a influência do tratamento com amônia líquida na reatividade e acessibilidade da celulose [32].

2.3. Oxidação eletroquímica de sacarídeos

A oxidação eletroquímica, mais do que a oxidação química permite uma grande seletividade e meios de controlo. Deste modo, estudos eletroquímicos podem permitir uma melhor compreensão da degradação dos polímeros (celulose e amido) e desidrogenação oxidativa dos monómeros constituintes da celulose e do amido. A eletroquímica pode também ter um papel importante no estudo dos mecanismos.

Os processos eletroquímicos sujeitos pela biomassa são uma sequência complexa de reações eletroquímicas frequentemente combinadas com reações químicas. Estas reações são uma nítida função do solvente e sistema de eletrólito de suporte, do material do eléctrodo e do potencial da interface, bem como das outras variáveis. Em adição, para transformações simples, as quais podem ser anódicas (oxidação) ou catódicas (redução), envolvendo grupos funcionais, uma série de outras reações é possível (anódicas ou catódicas): substituição, adição, acoplamento e clivagem usualmente acompanhada pela formação de novas ligações. Por vezes, ocorrem reações nas quais a reação parcial anódica e catódica originam produtos vantajosos (proveitosos) em pares ou sínteses combinadas [9,33].

A glucose é uma das moléculas mais importantes pertencentes ao grupo dos monossacarídeos (açúcares). O processo de oxidação eletroquímica desta molécula tem sido intensivamente estudado nos últimos anos, no sentido de desenvolver biossensores (detecção de glucose no sangue) e células de combustível passíveis de serem utilizadas no corpo humano (por exemplo como fonte de energia em “pacemakers” cardíacos). Os eléctrodos metálicos de platina [34-40] e ouro [41-45] são eléctrodos à base de metais nobres mais estudados para a oxidação de hidratos de carbono e poliois. A eletroreatividade elevada dos hidratos de carbono no eléctrodo de ouro através dos sítios

catalíticos de Au-OH, é bem conhecida [36,46-48]. A relação estrutura/reatividade da oxidação dos hidratos de carbono no eletrodo de ouro foi investigado por Parpot *et al.*, os autores estabelecem uma relação entre reatividade e a susceptibilidade do carbono C1 para um ataque nucleofílico. Foi também determinada uma relação entre reatividade e a orientação espacial dos grupos OH.

Para além destes estudos, relacionados com aplicações práticas do processo de oxidação eletroquímica da glucose, também têm sido efetuadas investigações de índole fundamental essencialmente no sentido de esclarecer o papel da estrutura superficial dos catalisadores, recorrendo à utilização de superfícies monocristalinas de ouro e platina [1]. A reação de oxidação da glucose no eletrodo monocristalino de ouro, mostrou ser extremamente sensível à estrutura do metal.

A oxidação eletrocatalítica dos compostos não-poliméricos e dos poliméricos foi efetuada com eletrodos de Ni, DSA, PbO₂ e carbono vítreo, em meio alcalino, tampão carbonato e em meio ácido [40,49,50]. Estes eletrodos têm uma elevada atividade eletrocatalítica. Análises cromatográficas das soluções eletrolisadas destes eletrodos metálicos permitiram identificar numerosos ácidos monocarboxílicos, alguns dos quais resultantes da quebra da ligação C-C. O comportamento eletroquímico dos hidratos de carbono nestes eletrodos, incluindo o carbono vítreo continuam a despertar interesse, na medida em que aqueles podem ser utilizados em sistemas de deteção nas áreas da cromatografia eletroforense capilar e eletrocromatografia capilar. A informação existente sobre os processos que ocorrem no eletrodo não está em total acordo. Isto pode ser percebido tendo em conta a complexidade de química dos hidratos de carbono. Em condições estáveis, qualquer hexose por enolização, epimerização, recombinação ou desaldolização, origina uma diversidade de outras estruturas químicas.

Os processos de oxidação eletrocatalítica da glucose, do amido e da celulose no eletrodo de Ni e DSA apresentam vários pontos em comum, ao nível mecanístico e de sensibilidade face à estrutura superficial dos eletrodos [51,52], que serão evidenciados ao longo deste trabalho.

2.4. Hidrólise enzimática

A estrutura e configuração da parede celular na biomassa foi concebida pela natureza de modo a tornar extremamente difícil a decomposição da celulose e hemiceluloses. Celulase é um complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente e estão subdivididas em três classes. As diferentes arquiteturas das paredes celulares requerem a existência de uma variedade de enzimas para a sua degradação [53,54]. Durante o ataque enzimático, a enzima, mais especificamente as endoglucanases (EC 3.2.1.4) celulase, atua preferencialmente nas regiões amorfas da celulose quebrando aleatoriamente as ligações β -1,4 da cadeia glicosídica formando como produto, moléculas de celulose com menor grau de polimerização (DP). Na sua atuação esta enzima, expõe as microfibrilas ao ataque subsequente de outras enzimas, além de aumentarem o número de oligossacarídeos com terminações suscetíveis ao ataque das exoglucanase [2].

As exoglucanase (EC 3.2.1.91), designadas especificamente por exo-1,4- D-glucanase ou celobiohidrolases (CBH), atuam movendo-se progressivamente a partir das extremidades da cadeia de celulose libertando como produto da sua ação a celobiose.

Finalmente, as β -glucosidases (EC 3.2.1.21) ou mais especificamente 1,4- β -D-glucosidases hidrolisam a celobiose e celo-oligossacarídeos nas extremidades não redutoras da celobiose formando glucose como produto. A Figura 2.8 apresenta esquematicamente o mecanismo de ação destes três tipos de enzimas.

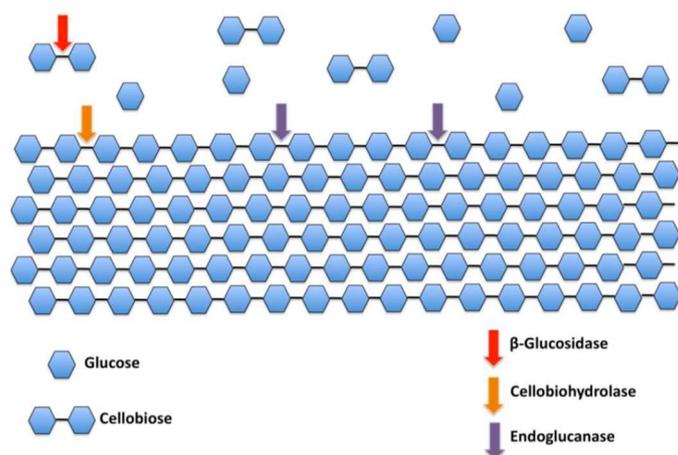


Figura 2.8 – Representação esquemática do ataque enzimática à celulose sobre a celulose com formação de glucose [55].

A hidrólise das hemiceluloses devido à sua heterogeneidade, com diferentes esqueletos e grupos laterais, requer sistemas enzimáticos ainda mais complexos.

Em geral, a hidrólise do amido requer a atividade conjunta de hidrolases que rompem as ligações glucosídicas com intervenção da água. As hidrolases tanto são endoenzimas (como a α -amilase) que podem promover a hidrólise quer em pontos internos quer em pontos mais externos da cadeia e provocar assim uma rápida despolimerização, ou exoenzimas que, provocam a ruptura a partir da extremidade não redutora (mas podem não atuar logo na primeira ligação). Tratando-se de uma endo-hidrólase, os produtos de hidrólise são, numa fase inicial, maltodextrinas, que são oligossacarídeos de glucose, ramificados e não ramificados, de elevada massa molecular. Numa fase seguinte e mais demorada a α -amilase hidrolisa as maltodextrinas (excepto) junto às ligações α -1,6 originando maltose (além de pequenas quantidades de glucose, maltotriose e oligossacarídeos com 5 a 8 resíduos).

A reação de hidrólise pode ser encarada como um caso particular das reações catalisadas por transferases, onde a molécula de água é um aceitador. Efetivamente, as transferases subtraem um grupo químico de uma molécula, transferindo-o para outra molécula que pode ser de água no caso das hidrólases. Esse é por exemplo o caso α -amílase que hidrolisa o amido e o celulase que hidrolisa a celulose.

A amilopectina, limitada pela sua estrutura ramificada, são menos firmemente ligados que os da amilose conferindo a esta última uma maior resistência à hidrólise enzimática.

As enzimas como catalisadores biológicos, apresentam diversas vantagens relativamente aos seus congéneres químicos, em particular a régio-e estéreo-seletividades que conduzem a formação de produtos enantiomericamente puros.

2.5. Caraterização estrutural de oligossacarídeos por espetrometria de massa

A espetrometria de massa tornou-se uma técnica útil com diversas aplicações em campos químicas e biológicas [56] e é hoje um dos mais sensíveis métodos para a caraterização estrutural de biomoléculas.

Um espetrômetro de massa é um instrumento que envolve três etapas gerais: ionização; separação no analisador de acordo com a relação massa/carga (m/z); e

deteção dos iões formados. A complexidade dos polissacarídeos torna a sua caracterização estrutural muito difícil. Esta requer a aplicação de métodos combinados de diferentes técnicas, de modo a obtenção detalhada de informação estrutural primária dos polissacarídeos [57]. Na fonte de ionização, as moléculas da amostra são ionizadas, e os iões são produzidos na fase gasosa. As fontes de ionização mais comuns são o eletrospray (ESI), e a ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI) e o impacto eletrónico (EI). Por vezes estas técnicas estão associadas a métodos de separação prévios tais como cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de troca iónica [58 - 60]. Esta associação é muito vantajosa na análise de misturas complexas. A espetrometria de massa é uma ferramenta importante na análise estrutural de polissacarídeos pois oferece resultados preciosos, versatilidade analítica e elevada sensibilidade, característica esta muito importante considerando que as amostras são obtidas por extração de fontes naturais, muitas vezes implicando uma quantidade limitada de amostra obtida [61].

O ESI, tal como o MALDI, são conhecidas como técnica de ionização suave devido à quantidade de energia depositada na amostra durante o processo de ionização, permitindo a observação do ião molecular no espectro de massa e ausência de iões-fragmento [62,63]. Isto é uma vantagem uma vez que permitem identificar a massa molecular de todas as moléculas presentes nas amostras. Os espectros de ESI-MS resultantes são de complexos e de difícil interpretação e, por este motivo, os métodos de ionização por ESI e MALDI têm sido aplicados na análise de misturas de biopolímeros [58,64] e, mais especificamente, na análise de misturas de oligossacarídeos [60,63]. ESI é usado para estudar oligossacarídeos com peso molecular inferior a 2000 Da. MALDI tem a vantagem de permitir a análise das moléculas de maior peso molecular (>700 Da), devido à presença de iões formados durante a ionização da matriz.

A análise dos espectros de massa permite a identificação da massa molecular dos oligossacarídeos que, quando combinado com a composição em açúcares, permite propor uma série de estruturas. No entanto, informação detalhada da certeza na identificação destas estruturas só é conseguida por análise usando a espetrometria de massa Tandem (MS/MS). A caracterização de oligossacarídeos por espetrometria de massa é realizada, então, através não só da determinação da massa molecular (espectros de ESI-MS), mas também através da fragmentação (espectros de MS/MS).

A identificação dos íons fragmento no espectro de MS/MS permite obter informação sobre a composição em monossacarídeos, informação quanto ao padrão de ramificação e em alguns casos quanto ao tipo de ligações presentes na estrutura [63].

Existem diversos trabalhos publicados sobre a caracterização estrutural de oligossacarídeos por MALDI-MS/MS e ESI-MS/MS [63,65].

2.5.1. Fragmentação padrão de carboidratos

A espectrometria de massa, nomeadamente o estudo dos espectros de massa permite a identificação da massa molecular do oligossacarídeo. Esta informação quando combinada com a composição do açúcar e análise por metilação permite propor uma série de estruturas possíveis para o sistema em estudo. No entanto, a informação da sequência e firmeza sobre a identificação destas estruturas só é conseguida por espectrometria de massa tandem (MS/MS). O MS/MS consiste no isolamento de um íon selecionado, denominado íon precursor, que é então fragmentado e os íons dos produtos resultantes são analisados. A fragmentação dos íons precursores ocorre principalmente na ligação glicosídica, embora alguma fragmentação do anel possa ser também observada, gerando assim uma informação estrutural valiosa como sequência de monossacarídeos e tipo de ramificação [39,44]. A diferenciação dos isômeros também pode ser obtida.

A espectrometria de massa em tandem (MS/MS) é uma ferramenta útil para melhorar o conhecimento estrutural do polímero, e em alguns casos é possível realizar múltiplas de fases de análise de massa (MSⁿ).

A análise de polissacarídeos na sua forma nativa é difícil devido ao seu elevado peso molecular, assim, para análise de polissacarídeos por MS, estes devem ser em primeiro lugar convertidos a oligossacarídeos por hidrólise enzimática, afim de se obter oligossacarídeos analisáveis por MS [59]. O hidrolisado obtido é, em seguida fraccionado por exclusão molecular, e as frações são selecionadas para serem analisadas por MS [58]. A degradação enzimática tem a vantagem de ser específica para um polímero específico e poder ser aplicada a uma mistura de polissacarídeos, eliminando a necessidade de purificação, o que muitas vezes remove modificações, portanto a informação obtida pode ser útil na elucidação da estrutura. A parte mais importante na análise do sistema operacional é encontrar fragmentos de MS que são específicos para uma estrutura e permitem a eliminação de alternativas.

ESI-MS dá informação sobre a massa molecular, mesmo quando presente em misturas e, em combinação com a composição de resíduos de açúcares [63]. Domon e Costello (1988), introduziram uma designação de nomenclatura para os produtos resultantes da fragmentação de oligossacarídeos [66]. A nomenclatura de fragmentação de oligossacarídeos utilizada na espectrometria de massa é mostrada na Figura 2.9. Os iões que têm uma extremidade não redutora estão marcados com as letras maiúsculas, do início do alfabeto (A,B,C), e aqueles que têm a extremidade redutora estão marcados com letras do fim do alfabeto (X,Y,Z). Os iões A e X são produzidos por clivagem glicosídica entre o anel e são rotulados pela atribuição de cada ligação do anel e um número de contagem no sentido horário. Os outros iões (B, C, Y, Z) resultam de clivagens glicosídicas. Todos os iões dos produtos são denominados com um número para identificar o número de açúcar residual retido na fragmentação de iões.

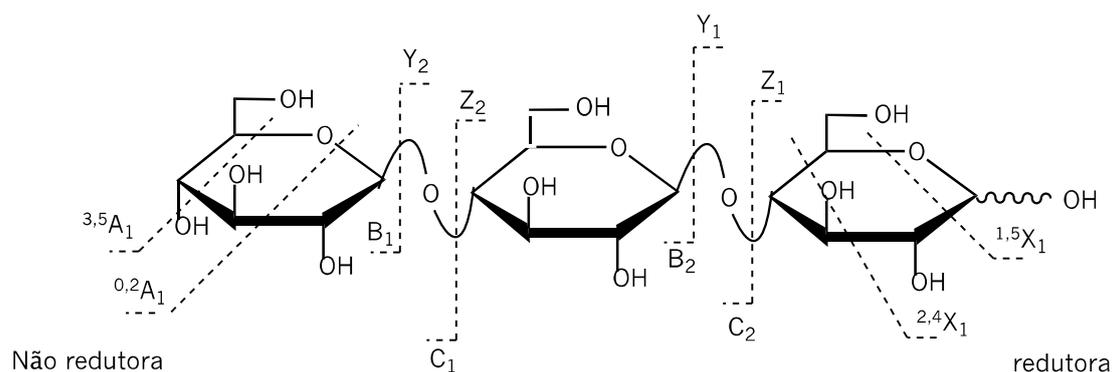


Figura 2.9 – Nomenclatura para os iões fragmentados de oligossacarídeos [66].

A fragmentação de oligossacarídeo dada pelo espectro MS/MS resulta principalmente das clivagens glicosídicas (por exemplo -162 Da e -180 Da) para as hexoses, devido à perda de uma unidade glucose entre dois resíduos de açúcar e da clivagem cruzada dentro do anel do açúcar. A clivagem dentro do anel dá-nos informação sobre o tipo de ligação presente no dissacarídeo. Os dissacarídeos de hexoses em ligação (1→6) fragmentam pela perda de $C_2H_4O_6$ (-60 Da), $C_3H_6O_3$ (-90 Da) e $C_4H_8O_4$ (-120 Da), Os dissacarídeos em ligação (1→3) fragmentam pela perda de $C_3H_6O_3$ (-90 Da) e os dissacarídeo em ligação (1→2) fragmentam por perda de $C_4H_8O_4$ (-120 Da). Os dissacarídeos em ligação (1→4) para além da perda de $C_2H_4O_6$ (-60 Da) apresentam perdas de $C_4H_8O_4$ (-120 Da) [57].

Referências

- [1] V. P. Muiuane, “Valorização da Biomassa: Transformação Selectiva de Hidratos de Carbono em Produtos com Aplicação Comercial”, Tese de Mestrado em Ciências do Ambiente, Universidade do Minho (2009).
- [2] T. L. Ogeda and D. F. S. Petri, *Quim. Nova* **33**, 1549 (2010).
- [3] F. W. Lichtenthaler and S. Peters, *Comptes Rendus Chim.*, **7**, 65 (2004).
- [4] E. Sjöstrom, "Fundamentals and Applications-", 2^a Ed., Academic Press, Inc, London, (1993).
- [5] B. . Jenkins, L. . Baxter, T. . Miles, and T. . Miles, *Fuel Process. Technol.* **54**, 17 (1998).
- [6] G. Huber, “Breaking the Chemical and Engineering Barriers to Lignocellulosic Biofuels: Next Generation Hydrocarbon Biorefineries” (2008).
- [7] F. W. Lichtentaler, S. Immel, D. Martin, and V. Müller, “Some Disaccharide-Derived Building Blocks of Potential Industrial Utility”, *Carbohydrate as Organic Raw Materials II*, ed. G. Descotes, VCH, (1993).
- [8] E. B. Mano, É. B. A. V. Pacheco, and C. M. C. Bonelli, “Meio Ambiente, Poluição e Reciclagem,” 1^a edição, Editora Edgard Blucher, (2005).
- [9] H. L. Chum and M. M. Baizer, “The Electrochemistry of Biomass and Derived Materials”, *ACS Monogr*, Washington DC, (1985).
- [10] F. M. Nunes and M. A. Coimbra, *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1773 (2001).
- [11] P. Parpot. "Eletroquímica: uma tecnologia limpa para desenvolvimento sustentável". *Correio do Minho*, p. 30, (2014, 21 de novembro).
- [12] T. Fuchigami, M. Atobe, and S. Inagi, “Fundamentals and Applications of Organic Electrochemistry”, Willey, Japan, (2014).
- [13] B. M. Jenkins, “Thermochemical Processing of Biomass - Conversion into Fuels, Chemicals and Power”, Willey (2011).
- [14] L. S. Campos, “Entender a Bioquímica” 5^a edição, Editora, Escolar, (2009).
- [15] A. M. Das, M. P. Hazarika, M. Goswami, A. Yadav, and P. Khound, *Carbohydr. Polym.* **141**, 20 (2016).
- [16] U. Klock, G. Muñiz, J. Hernandez, and E. Andrade, “Química da Madeira”, Universidade Federal do Paaná, Sector de Ciências Agrárias, 3^a Ed., Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal, Brasil, (2005).

- [17] R. E. Lapointe, "Précis de Chemie de La Cellulose", 2^{ème} édi, Canada, 2000).
- [18] R. C. Sun, *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels—Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose* (2010).
- [19] B.-L. R. Gírio FM1, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte LC, Marques S, *Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review. Bioresource Technology* 101, (2010).
- [20] M. A. T. Fuchigami and S. Inagi, "Fundamentals and Applications of Organic Electrochemistry", Willey, Japan, (2014).
- [21] S. Veelaert, D. de Wit, K. F. Gotlieb, and R. Verhé", *Carbohydr. Polym.* **33**, 153 (1997).
- [22] Q. Zhu, R. Sjöholm, K. Nurmi, and E. Bertoft, *Carbohydr. Res.* **309**, 213 (1998).
- [23] A. Teleman, K. Kruus, E. Ammalahiti, J. Buchert, and K. Nurmi, **315**, 286 (1999).
- [24] H. Kochkar, M. Morawietz, and W. F. Hölderich, **210**, 325 (2001).
- [25] S. Komulainen, C. Verlackt, J. Pursiainen, and M. Lajunen, *Carbohydr. Polym.* **93**, 73 (2013).
- [26] P. L. Bragd, H. Van Bekkum, and A. C. Besemer, *Top. Catal.* **27**, (2004).
- [27] Y. Kato, R. Matsuo, and A. Isogai, *Carbohydr. Polym.* **51**, 69 (2003).
- [28] S. Zhang, F. Liu, H. Peng, X. Peng, S. Jiang, and Junsheng Wang, *Ind. Eng. Chem. Res.* **54**, 11944 (2015).
- [29] C. Tahiri and M. R. Vignon, *Cellul.* 7 177 (2000).
- [30] C. Delattre, L. Rios, C. Laroche, N. H. T. Le, D. Lecerf, L. Picton, J. Y. Berthon, and P. Michaud, *Int. J. Biol. Macromol.* **45**, 458 (2009).
- [31] A. Isogai and Y. Kato, *Cellul.* 5 153 (1998).
- [32] D. da S. Perez, S. Montanari, and M. R. Vignon, *Biomacromolecules* (2003).
- [33] K. B. Kokoh, "Oxydation Regioselective du D-Glucose Par Voice Electrocatalytique", These Pour L'obtention du Grade de Docteur de L'Université de Poitiers (1991).
- [34] C. Brett and A. Brett, *Electrochemistry: "Principles, Methods, and Applications"*, (1993).
- [35] L. F. A. Proença, "Oxidação Electroquímica do D-Sorbitol Em platina", Tese de Doutoramento em Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa,

- (1998).
- [36] Yu.B.Vassilyev, O.A.Khazova, and N.N.Nikolaeva, *Electroanal. Chem.*, **196**, 127 (1985).
- [37] Yu.B.Vassilyev, O.A.Khazova, and N.N.Nikolaeva, *Electroanal. Chem.*, **196**, 105 (1985).
- [38] L. D. Burke and T.G.Ryan, *Electrochim. Acta* **37**, 1363 (1992).
- [39] K.B.Kokoh, J.M.Léger, B.Beden, H.Huser, and C.Lamy, *Electrochim. Acta* **37**, 1909 (1992).
- [40] P. Parpot, P. R. B. Santos, and A.P.Bettencourt, *Electroanal. Chem.* **610**, 154 (2007).
- [41] M. W. Hsiao, R. R. Adzic, and E. B. Yeager, *Electrochim. Acta* **37**, 357 (1992).
- [42] R. R. Adzic, M. W. Hsiao, and E. B. Yeager, *Electrochim. Acta* **260**, 475 (1989).
- [43] L. A. Larew and D. C. Johnson, *Electroanal. Chem.* **262**, 167 (1989).
- [44] S. Ben Aoun, G. S. Bang, T. Koga, Y. Nonaka, T. Sotomura, and I. Taniguchi, *Electroanal. Commun.* **5**, 317 (2003).
- [45] H. Druliolle, K.B.Kokoh, F. Hahn, C. Lamy, and B. Beden, *Electroanal. Chem.* **426**, 103 (1997).
- [46] P. Parpot, K. B. Kokoh, B.Beden, and C. Lamy, *Electrochim. Acta* **38**, 1679 (1993).
- [47] P. Parpot, S. G. Pires, and A. P. Bettencourt, *Electroanal. Chem.* **566/2**, 401 (2004).
- [48] L. A. Larew and D. C. Johnson, *Electroanal. Chem.* **262**, 167 (1989).
- [49] V. P. Muiuane, M. Ferreira, P. Bignet, A. P. Bettencourt, and P. Parpot, *J. Environ. Chem. Eng.* **1**, 1237 (2013).
- [50] A. Delahaye-Vidal, B. Beaudoin, N. Sac-Epée, K. Tekaia-Elhsissen, A. Audemer, and M. Figlarz, *Solid State Ionics* **84**, 239 (1996).
- [51] Y. Sugano, R. M. Latonen, M. Akieh-Pirkanniemi, J. Bobacka, and A. Ivaska, *ChemSusChem* **7**, 2240 (2014).
- [52] A. S. Vaze, S. B. Sawant, and V. G. Pangarkar, *J. Appl. Electrochem.* **25**, 279 (1995).
- [53] D. Voet, J. G. Voet, and C. W. Pratt, "Fundamentals of Biochemistry-Life At The Molecular Level", 2^a Ed., Wiley, (2006).
- [54] R. Gupta and Y. Lee, 8185 (2010).

- [55] W. R. Souza, “Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. In Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization” (2013).
- [56] L. Sleno and D. A. Volmer, *J. Mass Spectrom.* **39**, 1091 (2004).
- [57] J. S. Ramalho and Simões, “Extração e Estrutura dos Polissacarídeos do Resíduo do Café com Atividade Imunoestimuladora”, Tese de Doutoramento em Química-Universidade de Aveiro (2012).
- [58] A. S. P. Moreira, E. V. Da Costa, D. V. Evtuguin, M. A. Coimbra, F. M. Nunes, and M. R. M. Domingues, *J. Mass Spectrom.* **49**, 280 (2014).
- [59] M. R. Asam and G. L. Glish, **8**, 10 (1997).
- [60] J. Tudella, F. M. Nunes, R. Paradela, D. V. Evtuguin, P. Domingues, F. Amado, M. A. Coimbra, A. I. R. N. A. Barros, and M. R. M. Domingues, *Carbohydr. Res.* **346**, 2603 (2011).
- [61] S. O. Prazil, E. V. Costa, D. V. Evtuguin, L. P. C. Lopes, and M. R. M. Domingues, *Carbohydr. Res.* **356**, 252 (2012).
- [62] J. S. R. Simões, “Caraterização Estrutural das Mananas do Resíduo de Café como Fonte de Compostos com Atividade Imunomoduladora”, Tese de Mestrado-Universidade de Aveiro (2007).
- [63] J. Zaia, “Mass Spectrometry of Oligosaccharides”, (2004).
- [64] V. M. F. Gonçalves, D. V. Evtuguin, and M. R. M. Domingues, *Crabohydrate Res.* **343**, 256 (2008).
- [65] D. J. Harvey, *Mass Spectrom. Rev.* 595 (2006).
- [66] A. Reis, P. Pinto, D. V. Evtuguin, C. P. Neto, P. Domingues, A. J. Ferrer-Correia, and M. R. M. Domingues, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19**, 3589 (2005).

2.6. Enquadramento e objetivo do trabalho

Tendo em conta a abundância dos recursos renováveis, e a semelhança que chamamos de biomassa, é desejada a transição para um sistema de produção mais “bio” . O desafio atual reside em se conseguir uma oxidação direta ou mediada do amido e da celulose em meio aquoso sem uma estratégia preliminar. Os métodos eletroquímicos podem surgir como uma via alternativa que permite ultrapassar as barreiras tecnológicas existentes.

Objetivos do trabalho:

Neste trabalho propõe-se como objetivo geral estudar a oxidação dos hidratos de carbono disponíveis em larga escala utilizando métodos eletroquímicos diretos ou mediados com o 2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-oxoamónio (TEMPO) em meio aquoso. Estudar a oxidação utilizando vários elétrodos (níquel, DSA e carbono vítreo), utilizar fundamentalmente os métodos espectrométricos e cromatográficos para explicar as várias estruturas propostas no sentido de otimizar as condições para melhor conversão e eficiências faradaicas.

III

Técnicas e procedimentos experimentais

3.1. Introdução

Este capítulo é inteiramente dedicado aos aspetos experimentais subjacentes à realização deste trabalho. Para além de considerações de carácter geral relacionadas com a preparação das experiências (reagentes, limpeza do material, células, eléctrodos, etc.) é dada uma especial ênfase às técnicas propriamente ditas, nomeadamente no que diz respeito ao seu *modus operandi* e informação que podem fornecer.

As técnicas experimentais utilizadas no decurso deste trabalho podem ser divididas em dois grandes grupos: as técnicas puramente eletroquímicas (voltametria cíclica e eletrólise a corrente controlada e a potencial controlado) e as técnicas analíticas. As técnicas do primeiro grupo pressupõem um controlo eletroquímico efetivo das experiências, daí a importância dada neste Capítulo a todos os aspetos relacionados com a componente eletroquímica. No entanto, e para além disso têm características próprias ao nível do procedimento e instrumentação que importa realçar. Por outro lado as técnicas analíticas são essenciais para a determinação de parâmetros como a conversão, seletividade, eficiência farádica entre outros.

Os resultados experimentais apresentados foram obtidos em dois laboratórios distintos: Laboratório de Química Analítica (Universidade do Minho) e Laboratório de Química alimentar (Universidade de Aveiro).

3.2. Condições e procedimentos experimentais

O estudo e caracterização de processos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo/eletrólito exige um controlo rigoroso das condições experimentais e da qualidade dos reagentes e materiais empregues, já que os métodos utilizados para esse fim (como por exemplo, a voltametria cíclica) são particularmente sensíveis à presença de impurezas, mesmo em quantidades vestigiais.

3.2.1. Preparação do material e das soluções

3.2.1.1. Preparação do material

Todo o material de vidro, incluindo as células eletroquímicas, foi periodicamente lavado, segundo metodologias próprias de cada laboratório que normalmente incluem diversas etapas: lavagem com uma solução de permanganato de potássio (KMnO_4) em meio ácido para remover possíveis substâncias orgânicas que nele estivessem depositadas. Em seguida procedeu-se a lavagem abundante com H_2O_2 (10%) e finalmente com água ultrapura em ebulição e depois à temperatura ambiente. Um especial cuidado é tomado durante o manuseamento do material de vidro de modo a evitar o contacto com as superfícies diretamente expostas à solução.

3.2.1.2. Preparação das soluções

Na preparação das soluções para as eletrólises utilizou-se como solvente água ultrapura, de resistividade de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, à temperatura ambiente, purificada através de um sistema Millipore (Milli-Q), da Barnsted.

Todas as soluções foram preparadas a partir de reagentes de elevado grau de pureza, atestada pela marca comercial e estão apresentados na Tabela 3.1. Antes de cada eletrólise, as soluções são desoxigenadas por borbulhamento com argon (N50), sempre sob agitação mecânica. No decorrer das eletrólises, utilizando células de dois compartimentos, foi mantida uma corrente de gás sobre a solução.

O eletrólito de suporte utilizado, ao longo da maioria das experiências, foi uma solução de hidróxido de sódio (0,5 M). Para a sua preparação usou-se hidróxido de

sódio da Panreac, com um grau de pureza de 98%. Outro eletrólito de suporte também utilizado, neste trabalho foi uma solução tampão 0,2 M constituída por hidrogenocarbonato de sódio e carbonato de sódio, com um grau de pureza de 99,7% e 99,9%, respetivamente.

Todas as experiências foram efetuadas à temperatura ambiente e as pesagens de reagentes realizadas numa balança analítica, com uma tolerância de 0,01 mg.

A limpeza do conjunto célula-elétrodo-solução eletrolítica é testada sempre, antes de cada série de experiências, pelo registo de um voltamograma cíclico na solução eletrólito de suporte previamente desarejada.

Foram utilizados dois tipos de amidos comerciais da batata respetivamente do analítico (Fluka) e “puríssimo” (Sigma-Aldrich). A celulose microcristalina (Sigma-Aldrich) e dextrina (Tackidex B 167, Roquette) utilizados neste estudo foram do grau reagente. Os outros compostos químicos estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Características de reagentes e gases utilizados no decorrer do trabalho.

Reagentes	Fórmula	M (g mol ⁻¹)	%	Marca
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	98	98	Sigma-Aldrich
Ácido acético	CH ₃ COOH	60,5	99	Sigma-Aldrich
Ácido clorídrico	HCl	36,46	99,9	Sigma-Aldrich
3-Metil fenil fenol	C ₁₂ H ₁₀ O	170,21	99	Sigma-Aldrich
Celobiose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	343,3	98	Sigma-Aldrich
Maltose mono-hidratada	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ H ₂ O	360,32	90	Merck
Glucose	C ₆ H ₁₀ O ₆	188	99,9	Sigma-Aldrich
Xilose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150,3	99	Fluka
Hidróxido de sódio	NaOH	40,0	98	Panreac
Carbonato de Sódio mono-hidratado	Na ₂ CO ₃ H ₂ O	124,0	99,9	Panreac
Hidrogeno carbonato de sódio	NaHCO ₃	84,4	99,7	Merck
Hélio	He	4,0	99,9 9	Air Liquide
Ácido D. sacárico potássio	C ₆ H ₁₀ O ₈ K	248,24	99	Sigma-Aldrich
Ácido lactobiônico	C ₁₂ O ₂₂ O ₁₂	358,80	97	Sigma-Aldrich
Ácido glucurónico	C ₆ H ₁₀ O ₇	194,14	98	Sigma-Aldrich
Ácido tartrónico	C ₃ H ₄ O ₃	120,1	99	Sigma-Aldrich
Ácido glicoxílico mono-hidratado	HCOCO ₂ H.H ₂ O	92,5	98	Sigma-Aldrich
Ácido tartárico	HO ₂ CCH(OH)C H(OH)CO ₂ H	150,09	99	Sigma-Aldrich
Ácido oxálico	HO ₂ CCO ₂ H	90,04	98	Sigma-Aldrich
Ácido fórmico	HCO ₂ H	46,03	96	Sigma-Aldrich
Ácido glicólico	HOCH ₂ CO ₂ H	76,05	99	Sigma-Aldrich
Ácido poligalacturônico	(C ₆ H ₈ O ₆) _n		90	Sigma-Aldrich
Borato de sódio	Na ₂ B ₄ O ₇ 10 H ₂ O	381,37	99,5	Sigma-Aldrich

3.2.2. Células e eléctrodos utilizados

Para a oxidação do amido no eléctrodo Pt-CNT/CT foi utilizado uma célula eletroquímica laboratorial de três eléctrodos, de dois compartimentos idênticos separados por uma membrana permutadora de iões (IONAC-MA 3475 ou Nafion 17) e um volume aproximado de 250 cm³ do tipo da apresentada na Figura 3.1.

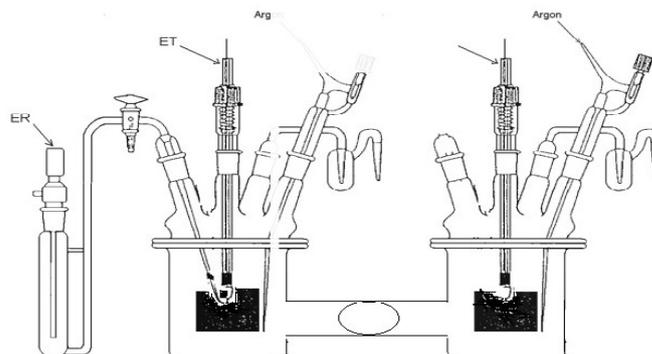


Figura 3.1 - Esquema de uma célula eletroquímica utilizada em experiências voltamétricas e electrólises exaustivas.

Para a realização das electrólises exaustivas foi utilizada uma célula com dois compartimentos iguais (Figura 3.1) com volume aproximado de 250 cm³. Num dos compartimentos da célula temos o eléctrodo de trabalho (ET), o capilar de Luggin que, permite a ligação do eléctrodo de referência à célula, um tubo de desarejamento e um borbulhador para saída de gás.

A solução contendo a espécie eletroativa é colocada no compartimento do eléctrodo de trabalho, ao passo que o outro compartimento contém apenas o electrólito de suporte. A membrana permite a separação dos dois compartimentos limitando, simultaneamente, a migração das moléculas orgânicas formadas no eléctrodo de trabalho e a ocorrência de reacções indesejáveis ao nível do eléctrodo secundário.

O eléctrodo comercial do tipo $\text{Hg}|\text{Hg}_2\text{Cl}_2|\text{KCl}(\text{sat.})$, ou seja, eléctrodo calomelano saturado (ECS) foi o eléctrodo de referência (ER) utilizado e encontra-se num compartimento exterior à célula (cheio com solução saturada de cloreto de potássio) ligado por uma ponte salina ao corpo principal da célula. O contacto com a

solução é assegurado por um capilar de Luggin, colocado o mais próximo possível da superfície do eletrodo de trabalho, de modo a minimizar a queda ôhmica em solução.

O outro compartimento contém uma rede de platina como eletrodo secundário (ES), assegurando, no entanto, uma área superficial suficientemente elevada. Este compartimento contém, ainda um tubo de desarejamento com argon e um borbulhador para saída de gás tal como no primeiro compartimento.

Para a eletrólise do amido foi utilizado o eletrodo Pt-NTC/CT. Este eletrodo foi preparado com a deposição de 2 mg de catalisador para uma superfície de carbono Toray de 8 cm² utilizando uma mistura de Nafion/água.

A Figura 3.2 apresenta a imagem de uma outra célula utilizada em eletrólises à corrente constante, a célula de fluxo (FM01-LC). Conforme se pode ver da Figura, é composto por eletrodos de placas separados por juntas que formam compartimentos para o eletrólito. O níquel e o DSA foram utilizados como ânodo para a oxidação de compostos orgânicos e o eletrodo de aço inoxidável foi utilizado como eletrodo secundário. A área das placas do eletrodo foi de 0,0064 m². As soluções eletrolíticas circulam utilizando uma bomba peristáltica (Watson Marlow). Entre o cátodo e o ânodo existe uma membrana permutador de iões (IONAC-MA 3475 ou Nafion 117) [1,2].

O sistema é controlado por um computador, que através de um programa informático apropriado (Labview) e placa de aquisição PCI-M10-16E-4 que permite registar um conjunto de dados experimentais em função do tempo de eletrólise: valores de potencial aplicado, intensidade de corrente em função da variação de potencial, carga associada a cada um dos patamares de potencial.

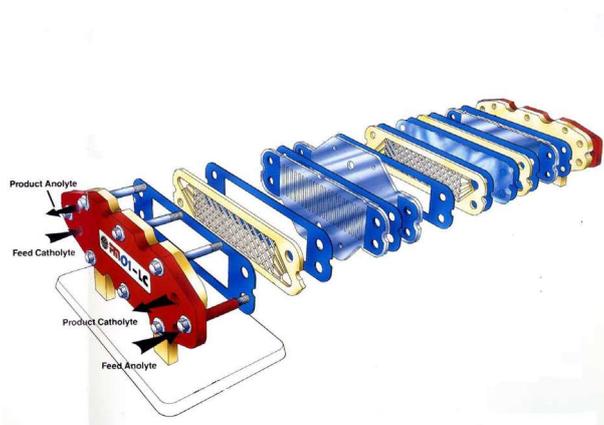


Figura 3.2 - Célula de fluxo utilizada nas eletrólises a corrente constante [2].

As eletrólises foram efetuadas utilizando os hidratos de carbono dissolvidos em solução aquosa de hidróxido de sódio como eletrólito ou em tampão carbonato conforme o tipo de eletrólise realizada. Colocou-se num balão a mistura reacional (eletrólito de suporte + espécie eletroactiva) e foi bombeado através do circuito fechado do compartimento do eléctrodo de trabalho.

Depois de cada eletrólise, a célula foi aberta para verificar que não está depositada nenhum composto químico no ânodo de níquel ou do DSA.

A Figura 3.3 apresenta a célula utilizada para as eletrólises utilizando o radical TEMPO. O eléctrodo de trabalho foram placas de carbono vítreo. O AgCl/Ag foi utilizado como eléctrodo de referência. O cátodo foi envolvido com uma membrana de permuta iónica, a fim de evitar a redução de compostos orgânicos sobre a sua superfície. Este envolvimento do cátodo foi obtido aquecendo cuidadosamente os lados de dois pedaços de membrana, que foram cortados de acordo com a dimensão da placa de carbono.

A instrumentação electroquímica consistiu de um potenciostato/galvanostato de Instrumentos Amel acoplados a um computador. O software LabVIEW (National Instruments) e um módulo PCI-MIO-16E-4- I/O foram usados para gerar e aplicar o programa de potencial bem como a aquisição de dados, tais como intensidade de corrente e a quantidade de electricidade.

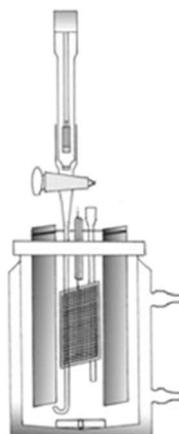


Figura 3.3 - Célula de vidro de três eléctrodos usada na oxidação de hidratos de carbono utilizando o TEMPO como radical [3].

A identificação dos produtos de reação foi efetuada por GC-MS, ESI-MS e HPLC-ESI-MS.

3.2.3. Material de eletrodo

A importância do material de eletrodo como fator determinante na cinética e mecanismo de reações eletroquímicas tem sido um dos principais sujeitos de estudo em eletrocatalise desde a sua definição como ramo da eletroquímica. O esclarecimento do papel do eletrodo (catalisador) sobre o desenvolvimento de uma reação eletrocatalítica implica um conhecimento efetivo da sua composição, daí a necessidade de se obterem superfícies de estruturas cristalina superficial bem definida.

Quando se decide por um determinado material de eletrodo, a opção é feita em função da zona de potenciais úteis deste no solvente a utilizar. Estas zonas de potenciais úteis está limitada por fatores, como, a dissolução do eletrodo, formação de uma camada na sua superfície de uma substância isoladora, decomposição do eletrólito de suporte e decomposição do solvente.

Os materiais mais utilizados como eletrodos em voltametria são os metais, o carbono, óxidos metálicos e sais orgânicos condutores, tendo sido no passado o mercúrio, o material de eletrodo mais usado. Os metais que são mais utilizados são a platina, o ouro e a prata. Estes metais apresentam vantagens como a elevada condutividade, reprodutibilidade, e simplicidade de construção do suporte do eletrodo, assim como a facilidade de polimento. Como desvantagem teremos o elevado custo. Relativamente ao carbono, as reações eletroquímicas são normalmente mais lentas em eletrodos deste elemento do que em eletrodos metálicos. Existem vários tipos de carbono que são usados como eletrodos. Como por exemplo temos fibras de carbono, carbono vítreo, grafite e pasta de carbono [4].

3.3. Métodos eletroquímicos

3.3.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica [4–8] é, provavelmente, a técnica eletroquímica mais utilizada no estudo de reações eletrocatalíticas, já que para além da sua versatilidade é extremamente sensível a processos de superfície. É uma técnica relativamente simples e que permite caracterizar o comportamento eletroquímico das substâncias.

As experiências de voltametria cíclica consistem em aplicar ao elétrodo de trabalho um varrimento linear cíclico de potencial (a uma velocidade v) entre dois limites determinados, E_i e E_f , (Figura 3.4) registando-se a corrente elétrica obtida, I , em função do potencial aplicado, E . Esta resposta voltamétrica, sob a forma de uma curva $I(E)$, denomina-se voltamograma cíclico. O potencial aplicado ao elétrodo de trabalho varia linearmente com o tempo, podendo ser variado anodicamente ou catodicamente de acordo com a seguinte expressão:

$$E_{(t)} = E_i \pm v_t \quad (3.1)$$

onde E_i é o potencial inicial, $E_{(t)}$ o potencial no tempo e v a velocidade de varrimento do mesmo.

O potencial aplicado ao elétrodo de trabalho varia como uma onda triangular, como podemos ver na Figura 3.4, de E_i até E_f e volta novamente para o E_i . O registo de voltamogramas cíclicos permite caraterizar a natureza de processos interfaciais e obter informação relativa a processos de oxidação e de superfície, através da análise das suas caraterísticas (forma dos picos e respetiva dependência da velocidade de varrimento).

Durante a variação do potencial observam-se picos anódicos e/ou catódicos correspondentes à oxidação ou redução do produto em estudo, originando uma curva do tipo $i = f(E)$. Os elétrodos podem ser planares, em forma de discos, gotas de mercúrio estacionárias, etc. [3, 4, 6, 9].

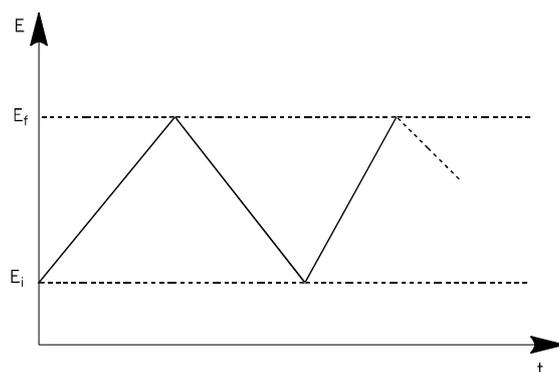


Figura 3.4 - Programa de potencial utilizado em experiências de voltametria cíclica [10].

A forma do voltamograma cíclico vai depender de vários fatores tais como a velocidade de transferência eletrônica, de transporte de massa fenômenos de adsorção e desadsorção e ainda outras reações que possam ocorrer, conforme se pode observar na Figura 3.5.

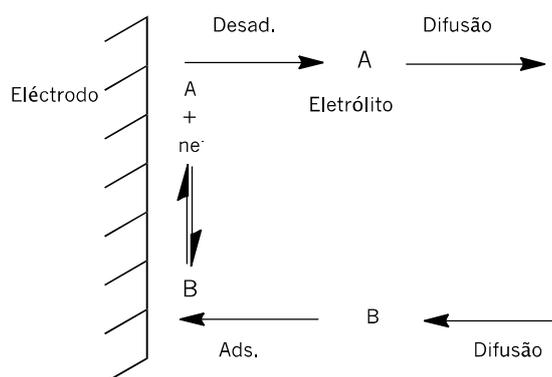


Figura 3.5 - Representação esquemática das possíveis etapas que podem ocorrer numa experiência de voltametria cíclica [10].

Uma vez que a forma do voltamograma está ligada à velocidade de transferência eletrônica, é importante considerar os dois processos baseados em transferência eletrônica que são:

- ✓ Transferência eletrônica reversível (rápida)
- ✓ Transferência eletrônica irreversível (lenta)

Num sistema reversível existe uma diferença nos potenciais dos picos anódicos e catódicos que se pode representar por:

$$\Delta E = E_p^a - E_p^c = \frac{0,058}{n} (V) \quad (3.2)$$

em que E_p^a é o potencial do pico anódico e E_p^c , corresponde ao potencial de pico catódico.

Se a transferência eletrônica for lenta, os picos anódicos e catódicos estão mais separados ao longo do eixo de potencial e quanto mais baixa for a velocidade de transferência maior será a separação. A reação é irreversível quando a velocidade do processo de transferência de carga é baixa quando comparada com a velocidade de transporte de massa.

Consideremos a seguinte reação eletroquímica, em que inicialmente existe apenas a espécie B em solução:



As concentrações das espécies eletroativas, na vizinhança do eléctrodo, dependem do tempo, por consequência das suas renovações limitadas por transporte de massa (difusão) ou por reações superficiais (adsorção) [11].

Quando a velocidade de transferência de carga é elevada, o transporte de massa da espécie eletroativa A é o único processo que determina o fluxo à superfície do eléctrodo. Assim sendo, as concentrações das espécies eletroativas A e B junto ao eléctrodo, são dadas pela lei de Nernst:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_A(0, t)}{C_B(0, t)} \quad (3.4)$$

sendo:

E^0 – potencial de redução padrão (V);

$C_A(0,t)$ – concentração à superfície do eléctrodo da espécie A no instante t;

$C_B(0,t)$ – concentração à superfície do eléctrodo da espécie B no instante t.

No caso das transferências eletroquímicas serem controladas ora por difusão, ora por adsorção, as expressões matemáticas correspondentes ao potencial do pico e à

densidade de corrente são diferentes. A Tabela 3.2 apresenta as expressões correspondentes ao potencial de pico e à densidade de pico, para um processo controlado por difusão.

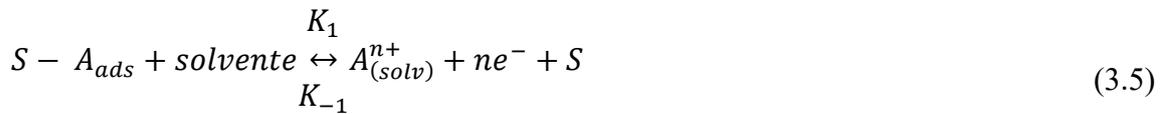
Tabela 3.2 - Resumo das expressões correspondentes ao potencial de pico e densidade de corrente de pico para uma transferência eletrónica controlada por difusão [11, 12].

Transferência	E_p	j_p
Reversível	$E^0 + \frac{0,0285}{n}$	$0,44nF \sqrt{\frac{nFD_B}{RT}} \sqrt{vC_B^0}$
Irreversível	$E^0 + \left[\frac{RT}{\alpha nF} \ln \left(\frac{\alpha nFD_B}{RT} \cdot \frac{\sqrt{v}}{K_s} \right) + 0,780 \right]$	$0,49nF \sqrt{\frac{\alpha nFD_B}{RT}} \sqrt{vC_B^0}$

Nestas expressões matemáticas E_p corresponde ao potencial de pico (V), E^0 representa o potencial formal de redução (V), J_p corresponde à densidade de corrente de pico ($A \text{ cm}^{-2}$), n representa o número de eletrões envolvidos no processo. F é a constante de Faraday (96480 C.mol^{-1}). T corresponde à temperatura absoluta (K), v corresponde à velocidade de varrimento de potencial ($V.s^{-1}$), C_B^0 corresponde à concentração da espécie B na solução (mol.dm^{-3}) D_B corresponde ao coeficiente de difusão da espécie B ($\text{cm}^2.s^{-1}$), K_s representa a constante de velocidade padrão (cm.s^{-1}) e α representa o coeficiente de transferência anódica.

Pela análise da Tabela 3.2, podemos concluir que no caso de uma cinética governada por difusão, tanto para um processo de transferência eletrónica reversível como para um processo de transferência eletrónica irreversível, a densidade de corrente de pico (j_p) é diretamente proporcional à raiz quadrada da velocidade de varrimento (v) e à concentração da espécie eletroativa no seio da solução (C_B). No entanto, os dois processos diferem no facto de no processo reversível, o potencial de pico (E_p) ser independente da velocidade de varrimento de potencial (v) e no processo irreversível o potencial ser uma função linear do logaritmo da velocidade de varrimento de potencial (v).

Consideremos uma reação de transferência de carga a partir de uma espécie adsorvida A_{ads} :



em que S corresponde ao sítio de adsorção.

As expressões matemáticas correspondentes ao potencial de pico e à densidade de corrente de pico, para um processo controlado por adsorção, encontram-se resumidas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Resumo das expressões correspondentes ao potencial de pico e densidade de corrente de pico para uma transferência eletrônica controlada por adsorção [11, 12].

Transferência de carga	E_p	J_p
Reversível	E^0	$0,25 \frac{n^2 F^2}{RT} C_B^0 v$
Irreversível	$E^0 + \frac{RT}{\alpha nF} \ln\left(\frac{\alpha nF}{RT} \frac{v}{K_s}\right)$	$0,366 \frac{\alpha n^2 F^2}{RT} C_B^0 v$

Analisando a Tabela anterior, podemos verificar que no caso de um processo controlado por adsorção para ambos os processos de transferência eletrônica, a densidade de corrente de pico (J_p) é diretamente proporcional à velocidade de varrimento (v) e também à concentração da espécie eletroativa (C_B). No entanto, os dois processos diferem no facto de no primeiro, processo reversível, o potencial de pico (E_p) ser independente da velocidade de varrimento de potencial (v), e no segundo, processo irreversível, o potencial ser uma função linear do logaritmo da velocidade de varrimento de potencial (v).

3.3.2. Eletrólito de suporte

O eletrólito de suporte obtém-se adicionando à solução uma concentração elevada de eletrólito inerte. Este eletrólito de suporte, tem como função minimizar o fenómeno da migração dos iões eletroativos, causada pelo campo elétrico e atribuir a diferença de potencial interfacial de maior aproximação de iões solvatados ao eléctrodo.

Relativamente à concentração de eletrólito de suporte, geralmente esta é pelo menos cem vezes maior do que as espécies eletroativas, uma vez que este eletrólito é a fonte de espécies iónicas eletricamente condutoras. Geralmente a concentração de eletrólito de suporte varia entre 0,01 M e 1,0 M, sendo a concentração das espécies eletroativas de 10 mM ou menos.

Para escolher um eletrólito de suporte devem ser considerados alguns fatores, incluindo as propriedades do solvente empregue. Este eletrólito pode ser um sal inorgânico ou orgânico, um ácido ou uma base, ou ainda uma solução tampão como acetato, citrato, carbonato ou fosfato [4].

3.3.3. Eletrólises

A eletrólise tem um papel importante na indústria, permite a conversão de energia eléctrica em energia química de modo a converter substâncias por oxidação ou por redução, em que os produtos são formados como o elemento ou na forma de um composto apropriado [7, 10].

Com o fim de se alcançar um bom rendimento é necessário uma área do contacto relativamente elevada entre o eléctrodo e o eletrólito, sendo ainda algumas vezes necessário aplicar potenciais bastante elevados para ultrapassar a resistência da solução. Como consequência os eléctrodos utilizados devem ser de áreas também consideravelmente maiores.

A eletrólise pode ser dividida em duas categorias:

- Eletrólise a corrente constante;
- Eletrólise a potencial constante ou controlado.

A eletrólise a corrente constante pode ser efetuada utilizando um galvanostato. Apesar da ausência do controlo de potencial que permite o domínio do mecanismo eletroquímico e por consequência melhor seletividade este método é mais fácil de

aplicar numa escala industrial uma vez que não necessita de potenciostato. Outra vantagem deste método é a diminuição do efeito de passivação do eléctrodo. Pois o deslocamento do potencial pode permitir uma reativação da superfície. Por outro lado, considerando a intensidade de corrente como dependente da área do eléctrodo, do coeficiente da difusão e da concentração da espécie eletroativa, uma diminuição da concentração da espécie ao longo da electrólise pode levar a um aumento da contribuição de reações alternativas como a oxidação do solvente na intensidade de corrente, o que pode constituir uma limitação. O consumo de energia necessário neste caso pode ser calculado facilmente através da seguinte equação 3.6.

$$(KWh) = IxVxt \quad (3.6)$$

sendo I, V e t, intensidade de corrente, a voltagem da célula e o tempo de electrólise, respetivamente.

A electrólise a potencial controlado [9, 10, 13] é um método electroquímico que permite estudar a oxidação electrocatalítica de moléculas orgânicas a potencial fixo e ao mesmo tempo minimizar a desativação progressiva do catalisador por espécies fortemente adsorvidas à superfície do eléctrodo (“venenos”). A formação destas espécies provoca o rápido decréscimo e conseqüente anulação da corrente de oxidação quando se realiza uma electrólise a potencial fixo, mas com ajuda de um programa de potencial pré-estabelecido é possível reativar o eléctrodo *in situ* e desse modo obviar o problema da desativação progressiva do catalisador ou seja, é possível controlar simultaneamente o potencial e o tempo de adsorção [14].

Neste trabalho as electrólises realizadas a corrente controlada, as reações químicas ocorrem num eléctrodo cuja corrente é controlada à custa de um aparelho, o potenciostato, e também se utilizou a electrólise a potencial controlado onde o potencial é mantido constante.

É de salientar que na electrólise a potencial controlado à medida que a conversão aumenta, isto é, que a concentração de substrato inicial diminui, a intensidade de corrente diminui geralmente até aproximadamente zero no final da electrólise. Este tipo de electrólise apresenta um grande número de vantagens em vários aspetos. Assim, os mecanismos sobre os processos que ocorrem no eléctrodo são estudados principalmente

neste tipo de eletrólise. O processo a corrente constante é o mais adequado para um processo industrial devido a ausência do potenciostato neste caso [9].

As espécies B e A da equação 3.7 são ambas solúveis. E^0 corresponde ao potencial padrão do par redox. Podemos considerar que a espécie A está inicialmente ausente e C_B é a concentração de B no início. Se x é a fracção de B oxidado a A, o potencial E e V_s corresponder ao volume da solução, o número de moles de B no equilíbrio será igual a $V_s C_B (1-x)$ e o número de moles de A no equilíbrio será de $V_s C_B x$.

A uma temperatura de 25 °C, temos:

$$E = E^0 + \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln\left(\frac{x}{1-x}\right) \quad (3.7)$$

e

$$X = \left(\frac{1 + 10^{-(E-E^0)n}}{0,0059}\right)^{-1} \quad (3.8)$$

Considerando a eletrólise da espécie B, com concentração inicial C_B^0 , a equação 2.9 dá-nos a expressão da intensidade de corrente.

$$i(t) = nFAm_B C_B^0(t) \quad (3.9)$$

sendo A a área do elétrodo e m_B o coeficiente de transporte de massa.

No caso de 100% de eficiência, pode-se calcular a corrente a partir da velocidade de consumo B, (dN_B/S conforme a seguinte expressão:

$$i(t) = -nF \left[\frac{dN_B(t)}{dt} \right] \quad (3.10)$$

em que N_B é o número total de moles de B, no sistema.

Considerando a solução como completamente homogênea teremos:

$$C_B^0(t) = \frac{N_B(t)}{V} \quad (3.11)$$

onde V é o volume total da solução.

$$i = -nFV \left[\frac{dC_B^0(t)}{dt} \right] \quad (3.12)$$

$$\frac{dC_B^0(t)}{dt} = - \left(\frac{m_B A}{v} \right) C_B^0(t) = p C_B^0(t) \quad (3.13)$$

Em casos simples a intensidade de corrente elétrica diminui durante a eletrólise de acordo com a seguinte relação [9]:

$$i = i_0 \cdot \exp(-pt) \quad (3.14)$$

onde p é dado por,

$$p = \frac{m_B A}{V} \quad (3.15)$$

i é a corrente eletrolítica no tempo t , i_0 é a corrente eletrolítica no instante $t=0$, A é a área do eletrodo de trabalho e V o volume da solução.

Uma maior eficiência da eletrólise pode ser conseguida aumentando o valor de p . Um aumento da área o eletrodo de trabalho e uma diminuição do volume permite que isto ocorra. Também pode ser conseguida com um aumento da concentração do substrato e com o grau de eficiência de agitação da solução.

A carga total consumida, $Q(t)$, em Coulomb, durante a eletrólise é dada pela expressão seguinte, correspondente à área da curva $i-t$.

$$Q(t) = \int_0^t i dt \quad (3.16)$$

3.3.4. Detecção e análise dos produtos de reação

Para a maioria das reações electrocatalíticas, envolvendo espécies orgânicas com mais do que um átomo de carbono, o número de produtos de reação é relativamente elevado. Para além disso, os diferentes produtos da reação são frequentemente espécies com propriedades físico-químicas similares e que se formam em quantidades vestigiais, o que torna a sua detecção e separação difíceis. Os métodos cromatográficos “on-line”, particularmente úteis na análise qualitativa e quantitativa de espécies com estas características, têm sido aplicados com êxito na identificação de produtos de reações electroquímicas, tanto em fase gasosa (por intermédio de cromatografia gasosa) [6, 8, 12, 14] como na solução. Neste último caso, a cromatografia líquida de alta “performance” (HPLC, do inglês “High Performance Liquid Chromatography”) tem sido a técnica mais utilizada na detecção de produtos formados durante processos de eletrólise de moléculas orgânicas.

Para os compostos não poliméricos a análise quantitativa dos produtos da reação foi efetuada, a intervalos regulares (normalmente de 60 em 60 minutos) durante toda a eletrólise. A montagem cromatográfica utilizada para este fim é constituída por uma bomba e uma coluna permutadora de iões Aminex® HPX-87H (Bio-Rad). A fase estacionária da coluna é constituída por uma resina permutadora de catiões (copolímero divinilbenzeno-estireno sulfonato). A separação faz-se, simultaneamente, por exclusão e permuta de iões. Com este tipo de resina, em meio ácido, os ácidos orgânicos separam-se por ordem de pK_a crescente. O eluente é uma solução diluída de ácido sulfúrico ($7,2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) com um débito de $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O registo dos cromatogramas é efetuado por um computador equipado por um dialogger e Software LabView. A determinação dos produtos orgânicos faz-se por comparação do seu tempo de retenção com o tempo de retenção de referências comerciais (produtos puros), nas mesmas condições de análise.

3.4. Métodos analíticos

Realizaram-se análises de identificação e quantificação aos produtos obtidos nas eletrólise. Duas das técnicas utilizadas para tal foram a cromatografia iónica e a cromatografia líquida de alta eficiência, que são técnicas muito importantes em análises químicas. Permitem separar e analisar um grande número de compostos orgânicos e inorgânicos em tempo de análises curtos. Estas técnicas consistem em preparar a amostra a analisar para ser transportada por uma fase móvel, através de uma fase estacionária, de grande área superficial. Se os componentes individuais da mistura se moverem através da fase estacionária com diferentes velocidades, pode ocorrer a sua separação. O grau de separação vai depender da diferença entre as velocidades de migração, provocada pela diferença de afinidades estabelecidas entre várias partículas (soluto e solvente) e a fase estacionária. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuem entre a fase móvel e a fase estacionária de modos diferentes. A fase estacionária pode ser um sólido adsorvente, um líquido imobilizado num suporte sólido estável, ou um gel, podendo esta fase ser empacotada numa coluna de metal ou vidro, distribuída como um filme, etc... A fase móvel pode ser um gás ou um líquido. Se for um gás esta técnica é conhecida cromatografia gasosa, se for um líquido, chama-se cromatografia líquida [16].

Cada técnica pode ainda ser dividida em outras de acordo com a natureza da fase estacionária.

A eficiência de uma coluna cromatográfica para separar dois solutos depende das velocidades relativas, às quais as duas espécies são eluídas e estas velocidades são por sua vez determinadas pela razão de partição dos solutos entre as duas fases.

O coeficiente de partição ou a razão de partição é definido do seguinte modo:

$$K = \frac{C(E)}{C(M)} \quad (3.17)$$

em que:

$C(E)$ -concentração molar do soluto na fase estacionária;

$C(M)$ -concentração molar da fase móvel.

Outro parâmetro de identificação dos componentes de uma mistura é o tempo de retenção. A velocidade linear média do soluto é dada por:

$$\bar{v} = \frac{L}{t_r} \quad (3.18)$$

sendo:

t_r o tempo de retenção para o soluto e L o comprimento da coluna cromatográfica.

A eficiência de uma coluna cromatográfica pode ainda ser quantificada através de dois parâmetros que se relacionam pela seguinte expressão:

$$N = \frac{L}{H} \quad (3.19)$$

em que:

H-altura do prato;

N-número de pratos teóricos

A eficiência de uma coluna cromatográfica aumenta quando aumenta o número de pratos desta e quando a altura do prato diminui [16].

A análise quantitativa que se pode obter na cromatografia, baseia-se na comparação de alturas ou áreas dos picos do cromatograma da amostra com os correspondentes valores padrão. As alturas e as áreas são proporcionais à concentração do componente.

As velocidades de migração devem ser baixas para se poder estabelecer o equilíbrio entre o soluto, e fase estacionária. Quanto mais retidos forem os compostos, pela fase estacionária, mais tempo demoram a atravessar a coluna e como tal, mais tarde emergem da mesma. Ao emergirem da coluna os compostos entram no detector, escolhido tendo em conta as propriedades dos compostos a analisar, e são registados, tendo em conta o seu tempo de retenção, sob a forma de uma série de picos acima de uma linha de base, constituindo assim um cromatograma.

A escolha das duas fases deve ser realizada de modo a que os componentes da amostra se distribuam entre a fase móvel e a estacionária de forma variável. Aqueles componentes que sofrem forte retenção pela fase estacionária deslocam-se lentamente com o fluxo da fase móvel. Em contraste, os componentes que são fracamente retidos pela fase estacionária deslocam-se rapidamente. Em consequência destas diferenças de mobilidade, ocorre a separação dos componentes da amostra em bandas discretas

passíveis de análise qualitativa e quantitativa. A análise qualitativa indica-nos a presença ou ausência de determinados compostos na amostra a analisar. Esta análise é feita através do conhecimento do tempo de retenção (t_r) dos vários compostos da amostra, ou seja, através do tempo decorrido desde a injeção da amostra até ao máximo do pico cromatográfico correspondente ao composto analisado [17].

A análise quantitativa que é feita através dos valores obtidos de altura ou área dos vários picos do cromatograma, permite saber a composição quantitativa da mistura e a proporção de um dado composto na amostra. No entanto, esta técnica tem uma limitação. Não permite, por si só, determinar a composição elementar dos constituintes da amostra, sendo necessário então associar outras técnicas como a espectrometria de massa, espectroscopia de infravermelho ou de ressonância magnética nuclear, análise elementar e a microscopia electrónica.

A cromatografia é uma técnica que permite a separação de compostos existentes em misturas complexas, constituindo uma ferramenta essencial para a química de análise. Nas separações cromatográficas, a amostra é dissolvida numa fase móvel, que pode ser líquida, gasosa ou um fluido supercrítico. Esta fase móvel circula ao longo de uma fase estacionária imiscível, que se encontra fixa numa coluna ou numa superfície sólida [17].

Entre o grupo dos açúcares solúveis, que são essencialmente polihidroxi álcoois, contendo um grupo carbonilo, encontram-se os açúcares neutros, que são basicamente a glucose, arabinose, xilose, manose e galactose, e os açúcares ácidos (ácidos urônicos), que apresentam o grupo carbóxico, sendo um dos principais componentes o ácido galaturônico.

3.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Este método foi utilizado para quantificar todos os produtos resultantes das oxidações regioselectivas, nas várias eletrólises.

A cromatografia líquida moderna, denominada “Cromatografia Líquida de alta Resolução” ou “Cromatografia Líquida de alta Pressão” (HPLC) apresenta, em relação à cromatografia líquida clássica ou convencional que tinha como princípio um fluxo devido à gravidade, a possibilidade de separações com elevada resolução e em tempos relativamente curtos (em geral, desde alguns minutos até uma hora). Esta

técnica permite também analisar amostras pouco voláteis e susceptíveis de decomposição térmica, ao contrário da cromatografia gasosa.

Para aumentar o poder de resolução, esta técnica utiliza fases estacionárias constituídas por micropartículas de sólidos porosos ou de suportes sólidos revestidos por um líquido. O aumento da resistência ao movimento da fase móvel que se verifica na presença destas micropartículas obriga à utilização de bombas de alta pressão. O sistema de cromatografia líquida de alta resolução dispõe ainda de um injetor e um detector. O sinal eléctrico produzido pelo detector é transmitido a um sistema registado, obtendo-se o produto final da análise cromatográfica: o cromatograma, onde cada pico deve idealmente corresponder a um composto [17].

Na análise por HPLC, após vários ensaios com outros eluentes e colunas, no sentido de otimizar a separação dos vários produtos, utilizou-se como eluente uma solução aquosa de H_2SO_4 de concentração $7,2 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$. Após a preparação, o eluente foi desarejado num aparelho de ultra-sons durante aproximadamente 30 min para retirar todo o ar dissolvido que pudesse interferir na análise cromatográfica. As análises foram feitas com um fluxo de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$ e um comprimento de onda de 210 nm. A coluna utilizada era uma coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm), com um número de pratos teóricos superior a 11000. Foi utilizada uma bomba de marca Jasco modelo PU-980. Combinado com um detector UV (Jasco 875-UV) utilizou-se um computador com a placa e Software de aquisição para registar o valor da área e altura dos picos dos vários cromatogramas.

A Figura 3.6 apresenta a imagem de um cromatógrafo líquido de alta pressão. O aparelho consiste num reservatório de fase móvel, numa bomba capaz de atingir pressões até 4000 psi ou mesmo mais elevadas, numa válvula de injeção (20 μL de amostra), a coluna cromatográfica (por vezes termostaticada), um detector e um registador.



Figura 3.6 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência.

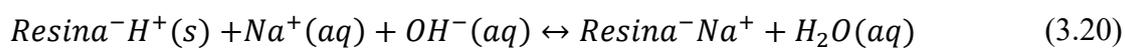
3.4.2. Cromatografia iônica

A cromatografia iônica (sigla inglesa IC) é uma técnica relativamente nova, e que emprega, de maneira nova, alguns princípios bem estabelecidos da troca iônica e permite que a condutância elétrica seja usada para a detecção e a determinação quantitativa dos iões em solução, depois da separação. Em virtude de a condutância elétrica ser uma propriedade comum a todas as espécies iônicas em solução, um detetor de condutividade tem, como é evidente, o potencial de ser um monitor universal de todas as espécies e, regra geral, responde de uma forma previsível a alterações de concentração [7]. Para além disso é simples, barato de construir e de manter, facilmente miniaturizável e, normalmente duram muito tempo sem problemas. Contudo uma limitação atrasou o seu uso geral: a alta concentração do eletrólito necessária para eluir a maioria dos analitos num intervalo de tempo razoável, que originava uma condutividade tal que encobria a dos analitos, reduzindo a sensibilidade deste detetor. Mas em 1975, o problema da elevada condutância da fase móvel foi resolvido através da introdução de uma coluna supressora de eluente, a seguir à coluna analítica de troca iônica, cujo empacotamento assenta numa segunda resina de troca iônica que efetivamente converte os iões do solvente numa espécie molecular de ionização limitada sem afetar os iões do analito [17,18]. A coluna supressora tem a função de converter os iões do eluente em espécies que contribuam para uma condutância baixa ou nula. O supressor de fibra oca, desenvolvido pela Dionex Ltd, possibilita a operação contínua do cromatógrafo iônico [7].



Figura 3.7 - Cromatógrafo iônico usado para identificar os produtos das eletrólises.

Uma característica da cromatografia iônica é, naturalmente, a de se usarem soluções iônicas como eluentes, de modo que as espécies eluídas estejam presentes num eletrólito de suporte. No presente trabalho foi usado como eluente o NaOH, pelo que o supressor de IC possuía uma resina de troca catiônica, na qual ocorre a seguinte reação.



A IC tem sido aplicada a uma variedade de sistemas orgânicos e bioquímicos, incluindo medicamentos e seus metabólitos, conservantes alimentares, misturas vitamínicas, açúcares e preparações farmacêuticas [18].

3.4.3. Cromatografia gás-líquido acoplada a MS (GC-MS)

Sob a definição geral de cromatografia em fase gasosa agrupam-se todos os métodos cromatográficos nos quais a fase móvel é um gás quimicamente inerte (por exemplo, N₂, H₂, He) em relação a fase estacionária e aos componentes da mistura analisada, sendo estes transportados por ele na forma de gases ou vapores. Como a fase móvel é um gás, a amostra a analisar também deve estar no estado gasoso. Para tal ela deve ser suficientemente volátil para poder ser vaporizada sem sofrer decomposição sofrer decomposição em moléculas mais simples ou podem reagir com outras constituindo situações indesejáveis numa análise cromatográfica.

Na cromatografia gás-líquido, a fase estacionária é um líquido de elevado ponto de ebulição, normalmente assente sobre um suporte sólido, e a fase móvel é um gás inerte. Fundamenta-se na diferente solubilidade que possuem os componentes de uma mistura sob a forma de gases ou vapores, numa dada fase líquida [1, 6, 17].

Com a utilização de colunas capilares, facilmente preparáveis e termostatáveis, de eficiência de separação elevada, que não se baseiam em empacotamento da fase estacionária como as clássicas, as análises tornaram-se melhores e mais rápidas sendo esta técnica cada vez mais utilizada em análises químicas.

O programa de temperatura utilizado na análise GC das várias soluções eletrolisadas apresenta-se na figura 3.8.

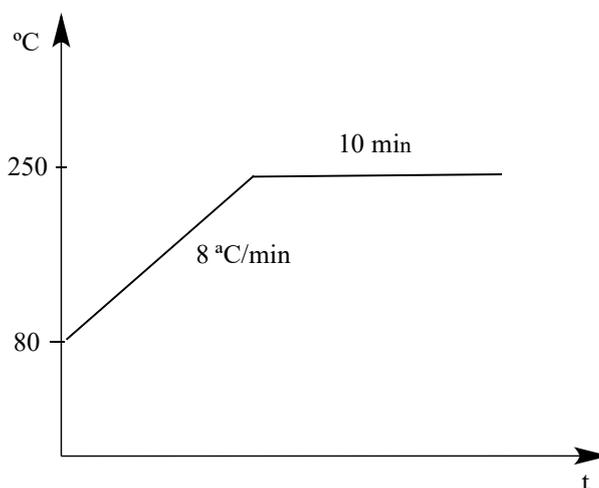


Figura 3.8 - Programa de temperatura utilizado nas análises de cromatografia gasosa.

Os espetros de GC-MS foram obtidos, utilizando um equipamento de marca Varian, modelo 4000 Performance, com detetor de massa acoplado e injetor “Split-splitless”, uma coluna capilar de sílica fundida. O gás de arraste utilizado foi hélio (99,999%), com fluxo constante de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, modo de análise SCAN (varrimento de espetros), modo de ionização utilizado foi o Impacto Eletrónico (IE) de baixa resolução a 70 eV. Os dados são apresentados pela razão massa/carga (m/z) e a sua atribuição a um fragmento da molécula. É também indicado o pico base.

Antes da análise por cromatografia gasosa, a amostra liofilizada foi derivatizada (timetilsililada). Por isso, o liofilizado foi dissolvido em piridina e derivatizado com a adição de Hexametildissilano, HMDS (Supelco) e

Trimetilclorossilano, TMS (Supelco). Após trimetilsililação, a amostra é injetada. As amostras foram introduzidas para o injetor no modo “Split” com um “vent” de 50 ml/minuto.

O produto da eletrólise para poder ser analisado, nas melhores condições, por cromatografia gasosa teve que previamente passar por alguns processos químicos que envolveram várias etapas:

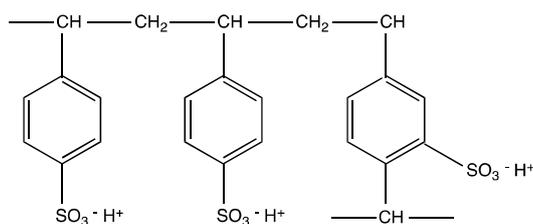
- **Neutralização**

Nesta etapa, após o término da eletrólise, o produto foi recolhido e fez-se passar através de uma resina de troca iônica, na forma de H^+ , para ocorrer a troca do íon Na^+ do eletrólito de suporte (NaOH), com esse íon e assim neutralizar o meio alcalino inicial da solução proveniente da eletrólise. Esta resina de troca iônica regenerada com a passagem de 250 mL de uma solução de ácido sulfúrico 10% e de seguida com uma mesma quantidade de água ultra-pura.

A técnica utilizada nesta etapa foi a da cromatografia de troca, que envolve a substituição de uma espécie iônica por outra, proveniente da troca iônica. A fase estacionária é um sólido, uma resina que contém cargas positivas ou negativas originando locais de troca iônica, onde existem íons de carga contrária, os contra íons, associados para poderem serem trocados por íons de carga igual da fase móvel.

Dentro de uma variedade de trocadores iônicos podemos salientar os que são baseados em poliestireno. Na Figura 3.9 exemplifica-se a estrutura de um trocador catiônico e de um aniônico.

a)



b)

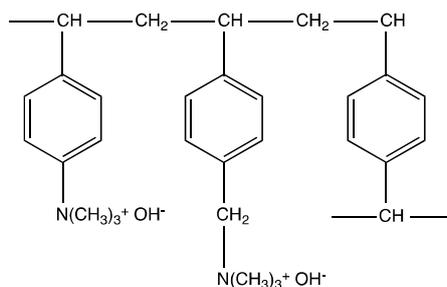
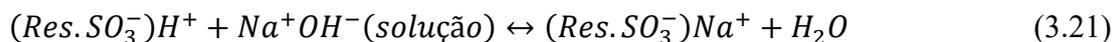


Figura 3.9 - Estrutura de alguns trocadores iônicos baseados em poliestireno (a-trocador catiónico, b-trocador aniônico) [1, 6, 10].

Estes compostos, são muito ionizáveis nas suas formas de iões H^+ ou HO^- e nos sais correspondentes.

Por vezes em certas análises de química orgânica ou bioquímica utilizam-se preferencialmente trocadores iônicos na forma de ácidos ou bases mais fracos.

Neste trabalho a resina utilizada continha como contra-ião o ião hidrogénio. E o ião que foi trocado, foi o ião sódio (Na^+) proveniente do eletrólito de suporte utilizado nas eletrólises ($NaOH$). Com esta troca foi assim possível neutralizar o meio inicial da solução proveniente da eletrólise. Na reação 3.21 encontra-se uma representação da troca catiónica, com a resina utilizada, ou seja, uma resina com grupos funcionais SO_3H e na forma de H^+ . A resina utilizada neste trabalho foi uma resina, DOWEX 50 x 8-200 (100-200 mesh). Esta resina foi inicialmente regenerada e de seguida neutralizou-se a solução de eletrólise. Posteriormente, removeu-se a água da solução por liofilização.



- ***Diálise***

A solução alcalina do fim de eletrólise foi neutralizada com ácido acético glacial antes da diálise (limite de exclusão médio das membranas de diálise: 12000-14000 Da) a 4 °C durante pelo menos 4 dias e pelo menos 8 mudas de água, com adição de algumas gotas de clorofórmio e tolueno para evitar o crescimento microbiológico. Através da diálise foram eliminadas todas as moléculas de baixo peso molecular. Depois da diálise e concentração a pressão reduzida, a uma temperatura compreendida entre 30 e 40 °C de forma a evitar reações que pudessem degradar ou alterar a estrutura dos polissacarídeos, foram congelados e liofilizados.

- ***Teste de iodo***

Preparou-se uma solução de iodo pesando-se 0,15 g de KIO_3 e dissolveu em 25 mL de água destilada fervida. De seguida adiciona-se 2 g de KI e 5 mL de H_2SO_4 . Esta solução de iodo foi diluída 20 vezes e tinha que ser preparada imediatamente antes da adição do padrão.

Para a elaboração da curva de calibração foram preparados tubos com 800, 1600, 2400, 3200 e 4000 μL de uma solução padrão de NaOH $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ em amido e adicionou-se para cada tubo 5 mL da solução de iodo anteriormente preparada. Esta solução assim como as amostras de eletrólises também foram diluídas 20 vezes e leu-se as absorvâncias a 546 nm. Foi selecionada esta gama de concentrações por ser próxima da esperada encontrar nas amostras de amido.

Uma relação linear entre a concentração do amido e a absorvância da amostra de eletrólise permitiu obter a concentração do amido na amostra.

- ***Liofilização***

O liofilizador é um equipamento constituído fundamentalmente por uma câmara de secagem, onde se coloca o material a ser liofilizado, um condensador que deve ter uma temperatura inferior à do produto, para que a água, que for retirada deste se deposite sob a forma de gelo e uma bomba de vácuo que pode ser de difusão (aparelhos maiores), rotativa ou ambas.

Utilizou-se como liofilizador um aparelho iShin Freeze Dryer, modelo FD 5505, de dimensões 805W x 750 D x 885 H e com uma bomba de vácuo de capacidade 120 L/min.

Como já se referiu, a solução resultante de neutralização é congelada para posteriormente ser liofilizada, isto é, para se retirar toda a água do produto obtido. Daí a liofilização ser definida como sendo um processo de secagem pelo qual a água contida no produto é removida por sublimação, ou seja, partindo-se de um material previamente congelado e submetendo-se ao alto vácuo a água passa diretamente do estado sólido ao estado de vapor. O produto, após a liofilização apresenta um teor de humidade residual muito baixo e torna-se mais estável quimicamente. O processo é conduzido a temperaturas bem mais baixas (-50 °C) do que aquelas exigidas pelos processos comuns de secagem, evitando-se os problemas causados pelas altas temperaturas. A degradação do produto por oxidação é reduzida, pois a liofilização processa-se sob vácuo.

- ***Derivatização***

A volatilidade e estabilidade térmica das amostras são dois requisitos essenciais em análise cromatográfica gasosa (GC) e cromatográfica gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS). A derivatização (transformação química em derivados mais facilmente separáveis ou detectáveis) torna-se indispensável no caso de compostos polares (-OH, =COOH, =NH, -NH₂, -SH e outros grupos funcionais) e termolábeis [20].

Para as amostras poderem ser analisadas por cromatografia gasosa, elas têm de ser termicamente estáveis e voláteis. Para se evitar a formação de pontes de hidrogénio, devido ao elevado número de grupos hidroxilo presentes nestas moléculas, o produto obtido anteriormente, antes de ser analisado por GC, passou por uma última etapa, a derivatização.

A escolha de um agente derivatizante baseia-se no grupo funcional que requer a derivatização, na presença de outros grupos funcionais na molécula, e na razão para proceder à derivatização. A estrutura química e propriedades do analito influenciam a escolha do agente derivatizante [21].

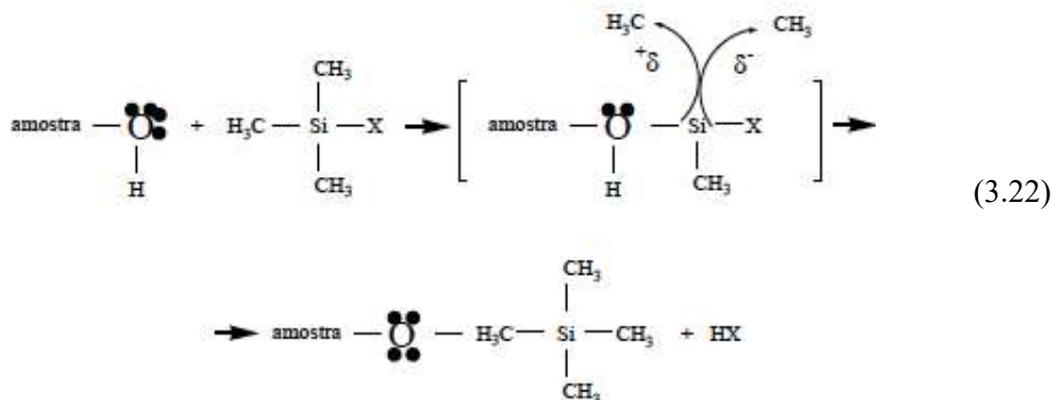
Considera-se que uma reação foi realizada com sucesso quando:

- ✓ um composto produz um único derivado
- ✓ a reação de derivatização é simples, rápida e ocorre em condições pouco severas
- ✓ o derivado do analito é estável no meio reacional e o rendimento da reação que lhe deu origem é elevado e reprodutível.

As reações de derivatização prosseguem mais rapidamente quando o HMDS (hexametildissilano) é usado em combinação com TMCS (trimetilclorossilano) e piridina, da Supelco. Por isso é utilizado para derivatizar álcoois, ácidos, fenóis, esteroides (excepto os 3-cetoesteróides), e açúcares que não são completamente derivatizados por HMDS.

A sililação é o processo de derivatização mais utilizado em GC. Numa reação de sililação ocorre a substituição de um átomo de hidrogénio reativo por um grupo alquilsilílico, na maioria das vezes, trimetilsilílico (TMS). Os derivados sililados apresentam, geralmente, maior volatilidade, menor polaridade e maior estabilidade térmica do que os compostos originais. Neste caso os derivados de sililo são formados por substituição do protão activo nos grupos hidroxilo (OH) e carbóxico (COOH). A reação consiste num ataque nucleofílico no átomo de Si do doador silílico (X) exige-se que possua fraca basicidade, a capacidade de estabilizar carga negativa no estado de transição e pouca ou nenhuma tendência para estabelecer uma ligação pi (p-d) entre ele mesmo e o átomo de silício [19]. A reação química 3.22, traduz a formação do trialquilsililo.

O HMDS tem a vantagem de reagir mais seletivamente com umas substâncias do que outras. Quando combinado com TMCS e piridina as reações, onde intervém, são bastante mais rápidas, e aumenta também o seu poder de sililação.



em que:

para HMDS, $X = \text{NHSi}(\text{CH}_3)_3$

para TMCS, $X = \text{Cl}$

na piridina, $X = \text{C}_5\text{H}_5\text{N}$

Uma vez que a formação do estado de transição é reversível, a derivatização só será completa se a basicidade do grupo de saída (X) exceder a do grupo que ele substitui. A facilidade de derivatização dos vários grupos funcionais, para um dado agente sililante, segue a ordem álcool > fenol > ácido carboxílico > amina > amida.

3.4.4. Cromatografia líquida da alta eficiência acoplada à espectroscopia de massa (HPLC-MS)

A espectrometria de massa pode estar acoplada a outros métodos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC), entre outros [21].

Neste relatório é apresentado também a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectroscopia de massa, (HPLC-MS) que foi utilizada neste trabalho e é considerada uma técnica analítica adequada à análise de misturas complexas e aplicável a uma grande diversidade de moléculas. O método HPLC por si só, não consegue identificar todos os compostos numa mistura, uma vez que compostos diferentes podem apresentar o mesmo tempo de retenção, enquanto que a espectrometria de massa não consegue separar os compostos da mistura. O acoplamento deste dois métodos, permite separar e identificar os compostos numa mistura, aliando as características de cada um dos métodos.

Uma das maiores dificuldades associadas a esta combinação é a diferença entre as condições de funcionamento da cromatografia líquida e da espectrometria de massa, em que os fluxos de fase móvel do cromatógrafo são normalmente incompatíveis com o sistema de vácuo do espectrômetro de massa (da ordem de 10^{-3} a 10^{-6} Pa). Esta técnica também apresenta algumas limitações, como a velocidade de separação dos compostos, a resolução do pico, o tamanho do sistema e custo, e na impossibilidade de detectar e resolver moléculas muito grandes [20].

Em algumas situações a informação obtida por HPLC-MS, nomeadamente os tempos de retenção e a informação retirada do espectro de massa são insuficientes para identificar todos os componentes presentes na amostra. Assim, é necessário obter mais informação sobre a molécula alvo, a qual não pode ser obtida por uma simples análise dos iões moleculares. Neste ponto, recorre-se a uma análise por LC/MS/MS em que ocorre a fragmentação por colisão do ião molecular, produzindo fragmentos filhos, resultantes de clivagem e rearranjos. Pode assim estimar-se a estrutura dos fragmentos filhos formados e analisar os intervalos de massa entre iões produzidos.

O equipamento de HPLC-MS (Thermo Electron Corporation modelo Finnigan LxQ Linear Ion Trap), utilizado tem uma interface “electrospray”. Esta interface requer um constante fornecimento de líquido, pelo que é facilmente acoplada à cromatografia líquida. Existem diversos parâmetros que afetam a estabilidade do spray, nomeadamente a tensão superficial, a constante dielétrica, a viscosidade, a condutividade e a velocidade de fluxo do solvente. Conseguem-se condições estáveis do spray com uma grande gama de solvente, mesmo com misturas complexas e com velocidades de fluxo da ordem de 1-10 mL/min.

Atualmente, a técnica de LC-MS é aplicada à análise de amostras provenientes de áreas diversas, permitindo obter, tanto informações qualitativas como quantitativas. As amostras analisadas são muito variadas incluindo polímeros sintéticos, biopolímeros, amostras ambientais, produtos técnicos, produtos farmacêuticos (medicamentos e seus metabolitos) e produtos naturais. Em síntese, é usado para análise de qualquer composto presente nas matrizes complexas, para as quais a HPLC é o método de separação escolhido e onde o espectrômetro de massa fornece a sensibilidade e a seletividade necessária para fornecer informações quantitativas e/ou estruturais que não podem ser obtidas por outros detectores [20].

3.4.5. Análise das ligações glicosídicas

Foi realizada a análise das ligações nos açúcares por metilação, permitindo a sua análise por GC-MS [23, 26, 28].

A amostra foi dissolvida em 1 mL de dimetilsulfóxido anidro (DMSO) seco com peneiros moleculares 3 °A e deixado em agitação durante a noite toda para dissolução completa da amostra. Em seguida foi adicionado NaOH em pó (40 mg) à solução.

Adicionou-se lentamente CH₃I (80 µL) com uma seringa e deixou-se reagir durante 20 min com agitação vigorosa. De seguida foi adicionado 2 mL de água destilada e neutralizado com uma solução de HCl 1 mol.dm⁻³. Por fim adicionou-se 3 mL de diclorometano, agitando-se muito bem para a separação das duas fases. A fase contendo o diclorometano foi lavada três vezes por adição 2 mL de água destilada. A fase orgânica foi evaporada até à secura na speed vacuum e o material foi remetido utilizando o mesmo procedimento [23, 26].

O material metilado foi hidrolisado com TFA 2 M incubado a 121 °C durante 1 h, e em seguida, reduzido e acetilado como anteriormente descrito para a análise de açúcares neutros. Os acetatos de alditol parcialmente metilados foram separados e analisados por espectrometria de massa (GC-MS) em um Agilent Technologies 6890N. O GC tinha uma coluna capilar DB-1 de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,15 µm de espessura (J&W Scientific, Folsom, CA, EUA). As amostras foram injetadas com o injetor a uma temperatura de 220 °C, e com o seguinte programa de temperaturas: 45 °C durante 5 min com um aumento linear de 10 °C/min até aos 140 °C, e mantido a esta temperatura durante 5 minutos seguido por um aumento linear de 0,5 °C/min até os 170 °C mantido por 1 min a esta temperatura. Finalmente um aumento linear de 15 °C/min até aos 280 °C.

3.4.6. Análise de ácidos urónicos

Pesou-se cerca de 2 mg de amostra para tubos de cultura, adicionaram-se 200 µL de H₂SO₄ a 72% (41 mL de H₂SO₄ a 96 % + 25 mL de água) e incubou-se à temperatura ambiente durante 3 h.

A este conjunto adicionou-se 2,2 mL de água destilada e a concentração de H₂SO₄ passa a ser de 1 mol.cm⁻¹. De seguida hidrolisamos num bloco de aquecimento

a 100 °C durante 1 h. Os tubos são depois arrefecidos num banho de gelo e transferiu-se uma alíquota de 0,5 mL para um tubo e dilui-se com 3 mL de água destilada [27].

- **Preparação dos padrões para a curva de calibração**

A acompanhar as amostras foram sempre feitos padrões de ácido galaturónico (200 µg/mL). Para tal, preparou-se 3 tubos (1 branco e 2 réplicas) com cada um dos seguintes padrões:

Padrão 0: 500 µL de água destilada

Padrão 20: 50 µL de padrão ácido galaturónico e 450 µL água destilada

Padrão 40: 100 µL de padrão ácido galaturónico e 400 µL água destilada

Padrão 60: 150 µL de padrão ácido galaturónico e 350 µL água destilada

Padrão 80: 200 µL de padrão ácido galaturónico e 300 µL água destilada

Preparou-se igualmente para cada amostra 3 tubos, sendo 1 branco e 2 réplicas com 0,5 mL de amostra. Colocou-se os tubos da amostra e dos padrões num banho de gelo e adiciona-se a cada um 3 mL de borato de sódio 50 mM preparado em ácido sulfúrico concentrado, agitando-se muito bem e com cuidado. Taparam-se os tubos com papel de alumínio e colocaram-se num banho a 100 °C durante 10 min. Teve-se o cuidado de usar um banho suficientemente grande para não haver uma grande diminuição da temperatura com a colocação das amostras.

Arrefeceram-se os tubos e adicionou-se, no escuro (para desenvolvimento de cor), 100 µL de MFF (m-fenilfenol 0,15 % (m/v) em 0,5 % (m/v) NaOH a 2 dos 3 tubos contendo a mesma amostra, num banho de gelo. O branco tem tudo com exceção do MFF.

Finalmente agitaram-se manualmente os tubos para homogeneizar a solução e leram-se as absorvâncias. A absorvância foi determinada a 520 nm, tendo as soluções sido lidas contra o ar. O valor da absorvância para cada amostra foi dado pela média dos valores dos dois tubos contendo 3-fenilfenol subtraída ao valor registado para o tubo em branco. A solução de 3-fenilfenol é estável durante 1 mês se for mantida no escuro e a 4 °C.

A quantidade de ácido urónico na amostra é determinada por interpolação gráfica, com correlação linear entre 0 e 40 µg.

3.5. Hidrólise e caracterização estrutural por ESI-MS das amostras eletrolisadas de amilose, amilopectina e celulose

3.5.1. Hidrólise enzimática

A hidrólise específica das amostras liofilizadas da amilose, amilopectina e da celulose foi realizada por hidrólise enzimática com uma α -amilase (bacillus subtilis da Fluka) e uma β -celulase que hidrolisam polissacarídeos de amido e celulose [29, 30]. A hidrólise foi feita para a obtenção da quebra das ligações glicosídicas para posterior análise por Cromatografia semi-preparativa de exclusão do tamanho/troca do ligando “Semi-preparative ligand-exchange/size exclusion chromatography (LEX/SEC)” e espectrometria de massa.

A hidrólise foi realizada por adição de 1 U de enzima a 10 mg de amostra em 10 mL de tampão de hidrogeno carbonato de amônia 5 mM pH 7 para as amostras de amilose e amilopectina. A temperatura condiciona a velocidade da reação tal como em qualquer outro processo químico pelo que este processo operou a uma temperatura moderada de 37 °C durante 48 h com agitação lenta. Não podem ser temperaturas muito elevadas pois provocaríamos a desnaturação da proteína. Após hidrólise o material foi congelado.

3.5.2. Cromatografia semi-preparativa de exclusão do tamanho/troca do ligando “Semi-preparative ligand-exchange/size exclusion chromatography (LEX/SEC)”

Os produtos de oxidação das eletrólises de amilose, amilopectina e celulose foram separados por uma LEX/SEC, usando uma cromatografia em fase líquida equipada com uma coluna Shodex sugar KS 2002 (300 milímetros de comprimento e 20 milímetros de diâmetro) da Showa Denko K.K. (Tóquio, Japão). A coluna foi mantida a 30 °C, o volume de amostra injetada foi de 500 μ L e foi utilizado como eluente água ultrapura com um fluxo de 2,80 mL/min.

Foram recolhidas frações de 1,0 mL e a detecção dos oligossacarídeos foi realizada usando um detector de índice de refração (RI) Knauer K-2401 (Berlim, Alemanha). Todas as frações recolhidas foram diluídas em 100 μ l de água ultrapura e congelados a 20 °C até que fossem analisadas por MS [26].

3.5.3. Análise estrutural de oligossacarídeos por espectrometria de massa com ionização por Electrospray (ESI-MS e ESI-MS/MS)

Para estudar as características estruturais dos polissacarídeos, os oligossacarídeos obtidas após hidrólise enzimática e fracionados por LEX/SEC, foram analisados por espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS e ESI-MS/MS) [22,32,33].

Frações representativas, obtidas das amostras amilose (AL), amilopectina (AP) e celulose (CEL) por hidrólise enzimática e após fracionamento por LEX-SEC, foram selecionadas para análise por espectrometria de massa. As amostras foram dissolvidas em água miliQ e 4-6 μL desta solução foram diluídos em 200 μL de uma solução 1:100:1, v/v/v, de água:metanol:ácido fórmico e introduzido a fonte de electrospray, com um caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Esta experiência foi realizada no modo positivo usando um espectrômetro de massa Q-TOF 2 (Micromass, Manchester, Reino Unido). A Temperatura da fonte foi de 80 °C e a temperatura de dessolvatação de 150 °C.

Os espectros ESI-MS e ESI-MS/MS foram obtidos a m/z 100 a 1500 usando árgon como gás de colisão. Os dados foram processados usando um Software MassLynx (versão 4.0).

A identificação dos novos iões foi confirmada pela medição e determinação exata da massa e composição elementar utilizando espectros ESI-MS obtidos para as frações LEX/SEC para frações F10, F15, F16 e F19, calculada para o ião mais abundante a $[M + \text{Na}]^+$ de um não modificado do oligossacarídeo [22].

3.5.4. Espetrometria de infravermelho com transformada de Fourier in situ

Esta técnica foi efetuada para confirmar a configuração anomérica das ligações glicosídicas dos polissacarídeos amido e celulose.

A principal região de interesse das análises de infravermelho (FTIR) é entre os 4000-400 cm^{-1} . Esta técnica baseia-se no princípio de as moléculas, átomos ou grupos atômicos estarem em contínuo movimento uns em relação aos outros (vibrações moleculares). Quando estes são sujeitos a radiação com energia semelhante à correspondente a essas vibrações (radiação vermelha), as moléculas podem alterar o

seu estado de vibração (excitação), absorvendo a radiação correspondente à diferença de energia entre o estado inicial e o estado excitado. Como não é possível a uma molécula vibrar de qualquer modo, mas apenas de alguns modos, a absorção da radiação ocorre apenas para determinados valores da energia, valores estes que são característicos das moléculas. Assim, através da comparação dos valores da energia da radiação infravermelha para os quais há absorção, é possível identificar as moléculas ou os grupos funcionais presentes nas amostras [33, 34].

No nosso primeiro contato com espectros do infravermelho observamos bandas devido às vibrações das ligações de C-H e C-C. Estas bandas reaparecem constantemente em todos os espectros que encontramos, pois, juntamente com outros grupos, a generalidade dos compostos de carbono contém carbono e hidrogénio.

As características mais saliente do espectro do infravermelho de um álcool com hidroxilo envolvido em ligação de hidrogénio é uma banda larga, forte, na região de 3200-3600 cm^{-1} , devida a distensão de O-H [27, 33].

Os resultados de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (apresentados no capítulo 4), foram obtidos com recurso a um espectrômetro de infravermelho ABB modelo FTLA 2000-104. Os polissarídeos (1,0 mg), em 250 mg de pastilhas de KBr, foram analisados na forma de micropartículas. Os espectros foram obtidos entre os números de onda (λ) de 4000 e 400 cm^{-1} com resolução de cm^{-1} .

3.5.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear RMN de ^1H e ^{13}C dos polissacarídeos em estudo, (amido e celulose), foram utilizados para identificar as alterações estruturais causadas pela oxidação destas espécies. Para tal, os espectros das amostras em estudo foram comparados com os espectros padrões das espécies primárias. Os espectros foram efetuados num espectrômetro Varian Unity Plus 300, a operar na seguinte frequência: ^{13}C RMN: 100,62 MHz e 400,13 MHz em relação ao núcleo de ^1H . Os espectros foram obtidos à temperatura normal de funcionamento do espectrômetro (25 °C).

Os polissacarídeos em estudo (15 a 25 mg) foram analisados utilizando-se como solvente a água deuterada (D_2O) ou em solução DMSO deuterada. As amostras foram dissolvidas em 0,5 mL de solvente. Os desvios químicos (δ) são descritos em

partes por milhão (ppm) do campo magnético total aplicado usando-se o sinal do sal de sódio do ácido sulfônico 3-trimetilsil-1 propano (DSS) ($\delta=0$ ppm) como referência interna nos espectros de ^{13}C RMN. Devido à baixa eletronegatividade do silício, a proteção dos prótons no silano é maior do que na maior parte das moléculas orgânicas; conseqüentemente a maioria dos sinais da RMN aparecem do mesmo lado do sinal do DSS: para compostos mais baixos [33, 35].

3.5.6. Titulação ácido/base

A titulação ácido/base é utilizada para determinação do conteúdo total de grupos ácidos e dos valores de pKa. O equipamento necessário para a titulação é simples e barato, e inclui um eletrodo indicador e um dispositivo de medida de potencial.

Para análise, pesa-se 25 mg de amostra liofilizada, adicionado algumas gotas do indicador fenolftalaina e, em seguida titulada com uma solução de NaOH 0.005 mol dm⁻¹.

A vantagem deste método em relação aos demais é que além de ele determinar o conteúdo total de grupos carboxílicos, também determina a constante de ionização (K_a).

Foram também efetuadas titulações ácido-base e condutimétricas utilizando o acetato de cálcio. No método condutimétrico os produtos da eletrólise liofilizados foram deixados em suspensão numa solução de HCl 0,01 M durante 10 min. Após este período a solução foi titulada com NaOH 0,01 M. As curvas de titulação que consistem num gráfico de condutividade em função do volume de NaOH adicionado permitiram visualizar a presença do excesso do ácido forte e do ácido fraco [33].

Para o método que usa a complexação dos ácidos carboxílicos com cálcio, foi preparada uma suspensão das amostras numa solução de acetato de cálcio. Após 24 h de agitação o ácido acético libertado foi titulado com NaOH 0,1 M [34].

Referências

- [1] A. S. Vaze, S. B. Sawant, and V. G. Pangarkar, *J. Appl., Electrochem.* **25**, 279 (1995).
- [2] V. P. Muiuane, M. Ferreira, P. Bignet, A. P. Bettencourt, and P. Parpot, *J. Environ. Chem. Eng.* **1**, 1237 (2013).
- [3] P. Parpot, K. Servat, A. P. Bettencourt, H. Huser, and K. B. Kokoh, *Cellulose* **17**, 815 (2010).
- [4] C. Brett and A. Brett, *Electrochemistry: "Principles, Methods, and Applications"* (1993).
- [5] L. F. A. Proença, "Oxidação Electroquímica do D-Sorbitol Em platina", Tese de Doutorado em Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, (1998).
- [6] A. J. Bard and L. R. Faulkner, "Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications", Wiley, (2001).
- [7] J. H. Jeffery, J. Bassett, J. Mendham, and R. C. Denney, "Vogel-Análise Química Quantitativa", 6ª Ed., Guanabara Koogan, (2002).
- [8] Y. Sugano, T. Saloranta, J. Bobacka, and A. Ivaska, *Phys. Chem.* **17**, 11609 (2015).
- [9] J. Volk and F. Liska, "Electrochemistry in Organic Synthesis", Springer-V (1994).
- [10] S. M. G. Pires, "Oxidação Regiosselectiva de D-Galactose Em Meio Alcalino Utilizando Métodos Electroquímicos", Tese de Mestrado em Química, Universidade do Minho (2002).
- [11] J. S. Leger, *Influence de La Structure de l'Électrode Sur Ses Propriétés Electrocatylytiques: Étude Comparative de l'Adsorption et de l'Oxidation du Méthanol et de l'Acide Formique*", Tese de Doutorado, Poitiers: Universidade de Poitiers (1982).
- [12] P. C. F. L. Cunhas, "Oxidação Electrocatalítica de Hidratos de Carbono Utilizando Complexos de Metais de Transição", Tese de Mestrado em ensino de Química, Universidade do Minho (2005).
- [13] E. M. Belgsir, E. Bouhier, H. Essis Yei, K. B. Kokoh, B. Beden, H. Husser, J. M. Léger, and C. Lamy, 1105 (1991).

- [14] M. Tominaga, M. Nagashim, K. Nishiyama, and I. Taniguchi, *Electroanal. Commun.*, **1892–1898**, (2007).
- [15] P. Tundo, A. Perosa, and F. Zecchini, *Methods and Reagents for Green Chemistry*, Venice, Italy, (2007).
- [16] D. A. Skoog, F. J. Holler, and S. R. Crouch, "Principles of Instrumental Analysis", 6th ed. (2007).
- [17] H. C. das Neves, "Introdução à Prática da Cromatografia Gás-Líquido", Universidade Nova de Lisboa-FCT, 1ª Edição, Lisboa (1980).
- [18] J. Thompson, S. A. Robrish, S. Immel, F. W. Lichtenthaler, B. G. Hall, and A. Pikis, *Carbohydr. Res.*, **149** (2001).
- [19] J. Segura, R. Ventura, and C. Jurado, *J. Chrom.*, **713**, 61 (1998).
- [20] O. D. Sparkman, Z. E. Penton, and F. G. Kitson, "Gás Chromatography and Mass Spectrometry-A Pratical Guide", 2ª edição (2011).
- [21] M. A. Coimbra, I. Delgadillo, K. W. Waldron, and R. R. Selvendran, **17**, 19 (1996).
- [22] I. Ciucanu and F. Kerek, *Crabohydrate Res.*, **131**, 209 (1984).
- [23] M. a Coimbra, A. Barros, M. Barros, D. N. Rutledge, and I. Delgadillo, *Carbohydr. Polym.*, **37**, 241 (1998).
- [24] L. S. Campos, "Entender a Bioquímica," 5ª edição (Editora, Escolar, 2009).
- [25] D. Voet, J. G. Voet, and C. W. Pratt, "Fundamentals of Biochemistry-Life at the Molecular Level", 2ª Ed., Wiley, (2006).
- [26] A. S. P. Moreira, E. V. Da Costa, D. V. Evtuguin, M. A. Coimbra, F. M. Nunes, and M. R. M. Domingues, *J. Mass Spectrom.*, **49**, 280 (2014).
- [27] J. Tudella, F. M. Nunes, R. Paradela, D. V. Evtuguin, P. Domingues, F. Amado, M. A. Coimbra, A. I. R. N. A. Barros, and M. R. M. Domingues, *Carbohydr. Res.*, **346**, 2603 (2011).
- [28] A. Reis, P. Pinto, D. V. Evtuguin, C. P. Neto, P. Domingues, A. J. Ferrer-Correia, and M. R. M. Domingues, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 3589 (2005).
- [29] R. Morrison and R. Boyd, "Química Orgânica", 9ª Ed., Fundação Calouste Gulbenkian, (1990).
- [30] R. Chang and K. A. Goldsb, "Química", 11ª Ed., Mc Graw Hil.
- [31] F. M. Nunes and M. A. Coimbra, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1773 (2001).
- [32] M. de M. Campos, "Fundamentos de Química Orgânica" (2004).

- [33] D. da S. Perez, S. Montanari, and M. R. Vignon, *Biomacromolecules* (2003).
- [34] K. Tihlárík and K. Babor, *Chem. Zvesti* **37**, 677 (1983).

IV

Resultados e discussão

4.1. Introdução

Os processos de oxidação eletroquímica de moléculas orgânicas em elétrodos de metais nobres têm sido objeto de numerosos estudos nas últimas décadas, tanto do ponto de vista fundamental (esclarecimento de mecanismos e cinética de reação), como aplicado a células de combustível, eletro-síntese orgânica e outros processo [1].

Apesar do desenvolvimento de técnicas experimentais cada vez mais poderosas nomeadamente técnicas óticas de aplicação in situ, a voltametria cíclica tem mantido um papel de relevo no estudo e na caraterização deste tipo de sistemas eletroquímicos, dado que alia a simplicidade de utilização a uma grande polivalência.

Antes de cada eletrólise um estudo voltamétrico foi realizado com o objetivo de determinar a eletroreatividade dos mono e dissacarídeos, em meio alcalino. Este estudo constitui uma etapa preliminar na escolha do material de elétrodo para as eletrólises prolongadas e permitiu de algum modo, estabelecer uma base de conhecimento para a posterior aplicação de técnicas analíticas avançadas [2].

Ao longo deste capítulo iremos apresentar os resultados dos estudos voltamétricos cujos voltamogramas foram registados à temperatura ambiente, com uma velocidade de varrimento de 50 mVs^{-1} . Estes estudos foram realizados em meio alcalino (NaOH 0,1 M e 0,5 M) e em meio tampão carbonato ($\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, 0,2 M). Os produtos das

eletrólises foram liofilizados e caracterizados por diferentes métodos, com o objetivo de determinar a sua composição.

Para o estudo de oligossacarídeos, a espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI) foi muito utilizada. A caracterização estrutural destes, nomeadamente a identificação da sua composição em monossacarídeos, identificação do tipo de ligação e ramificações presentes na cadeia principal, foi obtida por espectrometria de massa Tandem (MS/MS) de iões formados em ESI.

Neste capítulo iremos também apresentar e discutir os resultados obtidos da caracterização estrutural, por ESI-MS e ESI-MS/MS, dos produtos não poliméricos e poliméricos.

4.2. Oxidação eletroquímica dos compostos não-poliméricos da biomassa disponível em larga escala

4.2.1. Oxidação eletroquímica no eletrodo de níquel na célula FM01-LC

Com este eletrodo foram efetuadas eletrólises para a oxidação da celobiose, maltose e maltotriose em meio NaOH 0,5 M, utilizando uma intensidade de corrente de 0,5 A.

4.2.1.1. Oxidação da D-celobiose

O estudo voltamétrico da oxidação eletroquímica da celobiose (Figura 4.1) no eletrodo de níquel, em meio alcalino, foi efetuado considerando o sistema base Ni | 0,5 M NaOH + 0,01 M celobiose, a uma velocidade de varrimento de 0,05 Vs⁻¹.

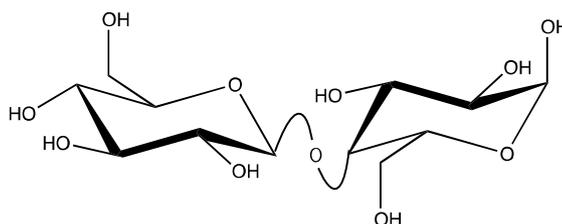
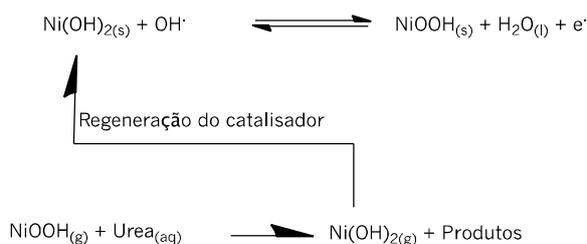


Figura 4.1 – Estrutura da molécula de D-celobiose.

A oxidação da celobiose ocorre na região de oxi-hidróxido de níquel (NiOOH). Nesta região de potenciais, o par Ni³⁺/Ni²⁺ atua como agente redox para oxidação de espécies eletroativas. Assim, a superfície catalítica regenera-se de uma maneira contínua conforme as seguintes etapas reacionais [3]:



Esquema 4.1 - Etapas reacionais que ocorrem na superfície catalítica.

Indica-se na Figura 4.2, a resposta voltamétrica típica do eletrodo de níquel no eletrólito de suporte em presença de celobiose em NaOH 0,5 M, antes e depois da eletrólise.

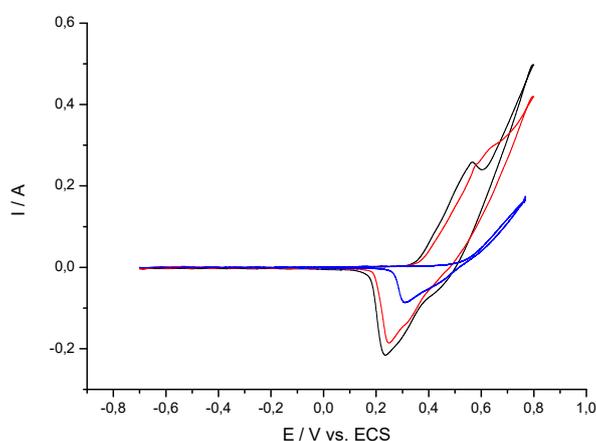


Figura 4.2 - Voltamogramas cíclicos num eletrodo de níquel, em meio NaOH 0,5 M, correspondentes à eletrólise da celobiose (0,01 M), traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} , sem espécie eletroativa (—); no início (—) e (—) no fim da eletrólise.

A eletrólise da celobiose foi efetuada com a aplicação de uma intensidade constante correspondente a 0,5 A. Após 6 h de eletrólise a solução eletrolisada foi neutralizada utilizando resina de troca iónica na forma de H^+ , para neutralizar o excesso de NaOH. Por troca de Na^+ por H^+ e assim se obter uma solução constituída pelos produtos de eletrólise com celobiose residual em água. A água existente foi removida através da liofilização. Para identificar os produtos de reação, o liofilizado obtido foi analisado por GC-MS e HPLC-ESI-MS. A quantificação dos produtos de eletrólise foi efetuada utilizando-se o HPLC-UV e a cromatografia iónica (IC).

Análises GC-MS

Antes da análise por GC-MS, os produtos obtidos na eletrólise foram derivatizados com o intuito de os tornar mais voláteis e mais estáveis termicamente, como foi referido no capítulo anterior. Na Figura 4.3 apresenta-se o cromatograma obtido por GC-MS, para os derivados TMS do produto de oxidação da celobiose no níquel (a) e da celobiose primária (b) onde podemos verificar a presença de dois grupos de picos cromatográficos, bem demarcados com o tempo de retenção (t_R) para o primeiro entre 2 e 12 minutos que abrange compostos com o número de carbonos $C \leq 6$ e o segundo, entre os 15 e 18 min, correspondente à compostos com o número de carbonos $6 \leq C \leq 12$. A presença de celobiose foi confirmada com o padrão comercial que foi preparado para análise seguindo o mesmo procedimento experimental.

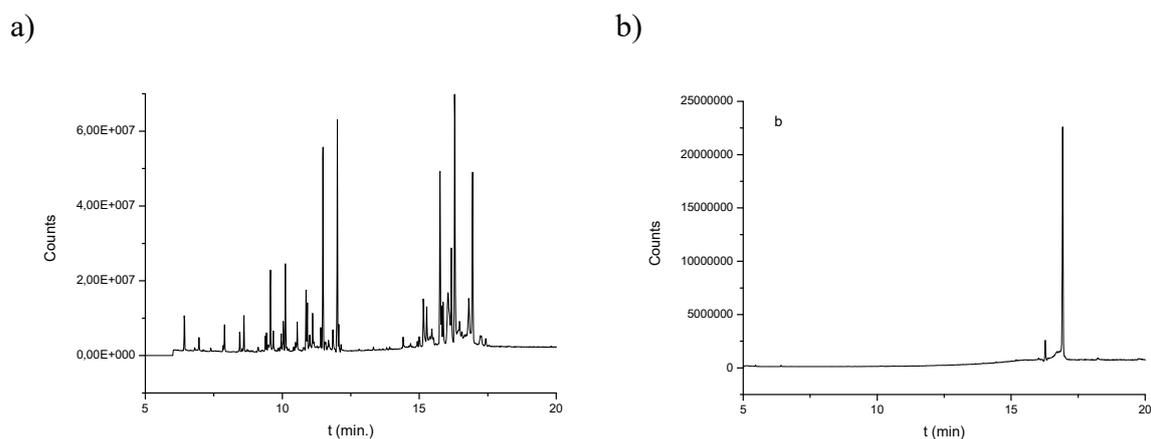


Figura 4.3 – Cromatograma GC-MS (a) dos produtos sililados (TMS) da eletrólise de celobiose no elétrodo de níquel e (b) da celobiose-TMS.

Vários compostos foram identificados através da biblioteca espectral (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library), conforme pode-se constatar pela Tabela 4.1 e a título de exemplo o espectro de um dos compostos identificados (ácido xilónico) está apresentado na Figura 4.4.

Os resultados de GC-MS mostraram a presença de vários produtos de oxidação com e sem ligação glicosídica. Estes resultados confirmam a facilidade de clivagem das ligações C-C no ânodo de níquel. A variedade de produtos de oxidação permitem sugerir que neste caso, uma oxidação seletiva do grupo aldeído livre não é favorecida, fortalecendo assim a hipótese de uma aproximação planar da molécula e posteriormente uma oxidação dos grupos do álcool secundário.

Como já foi referido o método HPLC-UV por si só, não consegue identificar todos os compostos numa mistura, uma vez que compostos diferentes podem apresentar o mesmo tempo de retenção, enquanto que a espectrometria de massa não consegue separar os compostos da mistura. A interface elimina o excesso de solvente sem eliminar os compostos.

Análise dos produtos da reação por ESI-MS e ESI-MS/MS

As análises de HPLC-MS e da introdução direta-ESI-MS foram realizadas utilizando um cromatógrafo Thermo Surveyor e detetor de massa Thermo LxQ. A Figura 4.5 apresenta os espectros obtidos para a ionização positiva ESI(+) e ionização negativa ESI(-) dos produtos de eletrólise de celobiose em meio alcalino no eletrodo de níquel.

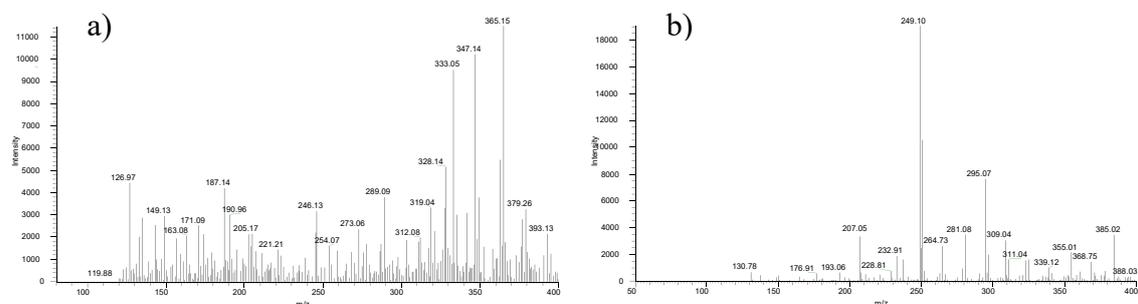


Figura 4.5 – Espectros de massa para a) (ESI+) e b) (ESI-) dos produtos de oxidação da celobiose.

De acordo com a Figura 4.5, o espectro de massa correspondente a (ESI+) (a), mostra a existência de picos de m/z 365, 379, 393 e 409 atribuídos a celobiose, aos ácidos mono (oxidação pelo C6), di (oxidação pelos C6 e C6') e tricarboxílicos (oxidação pelos C6, C6' e C1), respetivamente da celobiose. A presença dos ácidos pode ser confirmada no espectro (b) ESI(-) através dos iões de m/z de 355, 369 e 385. Os principais iões foram identificados utilizando os espectros de MS/MS ou ainda MS/MS/MS. Os outros iões encontrados na ionização positiva e negativa estão indicados na Tabela 4.2. Há diferença de 24 unidades de massa entre os iões obtidos pela ionização positiva e negativa correspondente a $[\text{Na}^+] + [\text{H}^+]$.

Tabela 4.2 – Outros iões encontrados na ionização positiva e negativa.

Iões	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z
ESI(+)	333	319	273	207	305
ESI(-)	309	295	249	193	281

Alguns espectros MS/MS de alguns iões estão apresentados a na Figura 4.6.

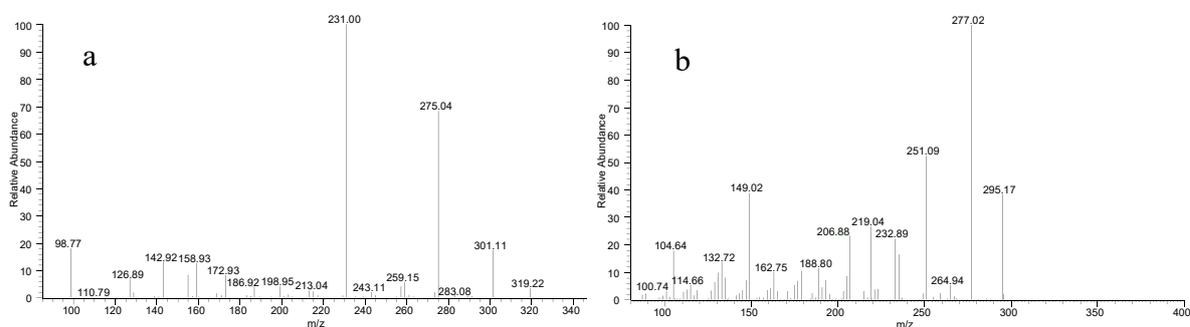


Figura 4.6 – Espectros MS/MS para a) (ESI+) do ião de m/z 319 e para b) (ESI-) do ião de m/z 295.

A Figura 4.7 apresenta a estrutura ramificada de hexose proposta, correspondente do íon de m/z 295 e às respectivas fragmentações. Nesta estrutura podemos observar a presença de íons de m/z 251; 233; 207; 219 e 178, resultantes da perda de -44 Da acompanhado da perda de uma molécula de água; -88 Da; -58 Da com perda de uma molécula de água e -117 Da, respetivamente.

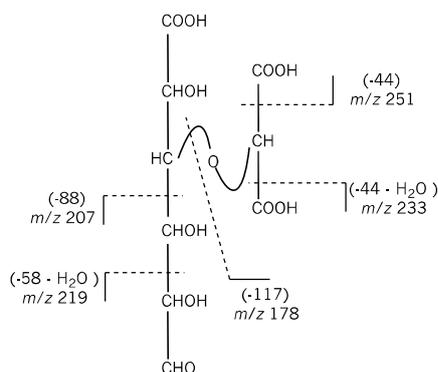


Figura 4.7 – Fragmentos do íon de m/z 295 e a estrutura proposta.

Outras estruturas sugeridas estão apresentadas na Figura 4.8.

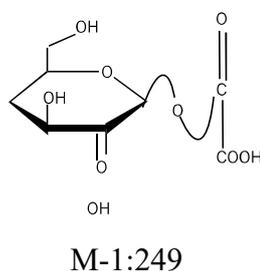
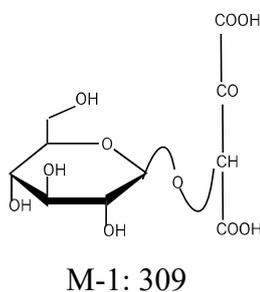


Figura 4.8 – Estruturas propostas para o íon de m/z 309 e 249.

O íon de m/z 127 (ESI(+)) foi atribuído ao 1-oxo, 2-hidroxi propiónico utilizando os espectros MS/MS apresentados na Figura 4.9.

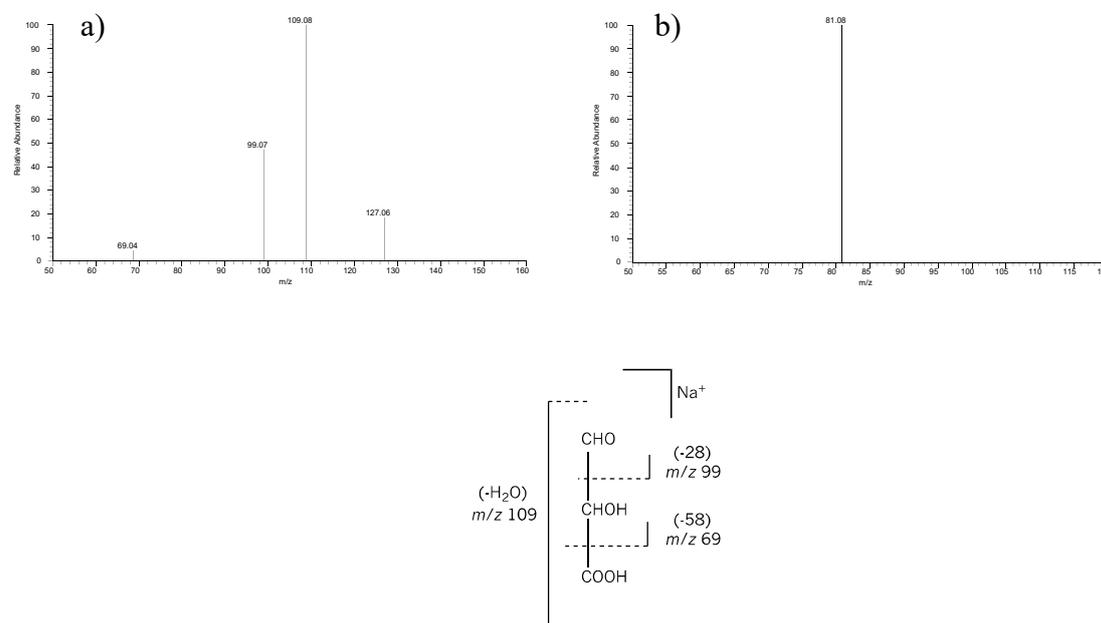


Figura 4.9 – Espetro MS/MS a) do íon de m/z 127; b) MS/MS/MS do íon de m/z 109 e estrutura proposta.

Distribuição dos Produtos de reação

Na tabela 4.3 estão indicados os produtos de reação identificados em solução após a eletrólise de celobiose realizada em meio alcalino no elétrico de níquel. Apresenta-se ainda a percentagem em celobiose inicial. A percentagem em celobiose transformada foi calculada usando a equação 4.1:

$$\% C_{celob.} = \frac{C_{x/celobiose}}{C_{celobiose}^i - C_{celobiose}^f} \times 100 \quad (4.1)$$

sendo $C_{x/celobiose}$ dada por (equação 4.2):

$$C_{x/celobiose} = C_x x \left(\frac{n}{12} \right) \quad (4.2)$$

em que C_x é a concentração do composto em análise no fim da eletrólise e n o seu número de átomos de carbono.

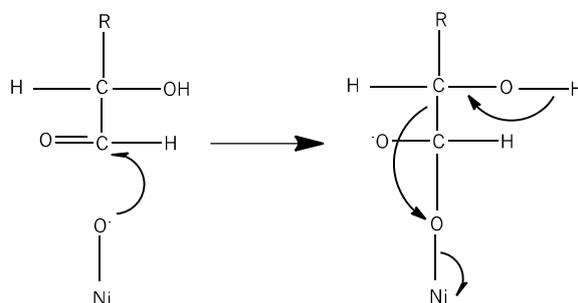
O ácido oxálico e o ácido fórmico foram os principais produtos da reação de oxidação da celobiose.

Tabela 4.3 – Produtos de eletrólise de celobiose no ânodo de níquel.

Composto	Percentagem de celobiose transformada (%)
Ácido fórmico	14
Ácido oxálico	17
Ácido tartrónico	6
Ácido 1-oxo, 2 hidroxil propiónico	5
2-Keto d-glicónico	4
Ácido tartárico	4
Ácido xilónico ou Arabinónico (C5)	4
Ácido glucosil glucurónico	6
Glucose	5
Celobiose diácido (C6, C6')	6
Celobiose triácido	4
Carbonatos	2

Para a formação do ácido fórmico, é necessário a adsorção e posterior oxidação do carbono C1 ou C(n), onde $n=12$ para dissacarídeos. Esta afirmação é sustentada pelas análises cromatográficas que mostraram que o ácido fórmico é um produto primário. Dois mecanismos são propostos, primeiro sem, e o segundo com adsorção dissociativa do hidrato de carbono de acordo com o esquema 4.2. Na primeira hipótese do mecanismo, pode ocorrer a adsorção da molécula de açúcar pelo único carbono C1, tendo em conta a interação entre este átomo e a espécie oxigenada na superfície do eletrodo. A transferência

de carga consecutiva deve levar à formação do ácido fórmico e ao hidrato de carbono com um número de carbono N-1.



Esquema 4.2 – Possíveis hipóteses de mecanismo de formação do ácido fórmico.

Na segunda hipótese e tendo em conta as espécies oxigenadas disponíveis na superfície, para a adsorção dissociativa, pode-se considerar um ataque nucleofílico no C1 e C2. De uma maneira geral o carbono do grupo carbonilo (C1) é o átomo mais susceptível para este tipo de interação, seguido do C2. O ácido fórmico é portanto formado resultado da clivagem da ligação C1-C2.

4.2.1.2. Oxidação da D-maltose

A eletrólise da maltose com concentração de 0,01 M (Figura 4.10) no níquel em NaOH 0,5 M foi efetuada com uma intensidade de corrente aplicada de 0,5 A. Após 5 h de eletrólise foi obtida uma conversão correspondente a 80 % do substrato inicial.

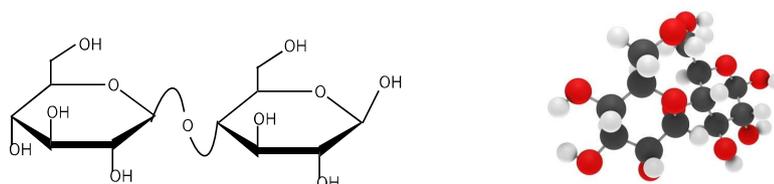


Figura 4.10 – Estrutura da molécula da D-maltose.

Os voltamogramas cíclicos registados sem espécie eletroativa, no início e após o fim de eletrólise da maltose estão apresentados na Figura 4.11. De igual modo como foi referido para a celobiose, nota-se um aumento da intensidade de corrente na região de oxihidróxido de níquel. A diminuição significativa da intensidade de corrente no fim da eletrólise pode estar relacionada, provavelmente com o consumo do substrato inicial. Deste modo, os voltamogramas registados, demonstram de uma forma clara a evolução da reação de oxidação eletroquímica da maltose no níquel.

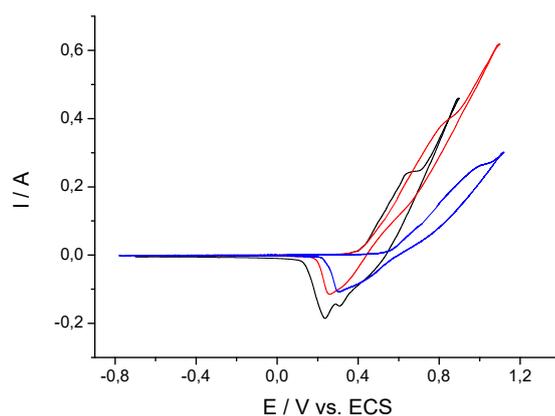


Figura 4.11 - Voltamogramas cíclicos num elétrodo de níquel, em meio NaOH 0,5 M, correspondentes à eletrólise de maltose (0,01 M), traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s⁻¹, sem espécie eletroativa (—), na presença (—) e no fim da eletrólise (—).

Análise dos produtos de reação por GC-MS

Após liofilização e formação dos derivados TMS para identificar as espécies resultantes da oxidação da maltose, recorreu-se à espectrometria de massa (GC-MS). Os cromatogramas, assim obtidos, encontram-se apresentados na Figura 4.12. Os produtos principais identificados através da biblioteca de base de dados espectrais estão apresentados na Tabela 4.4.

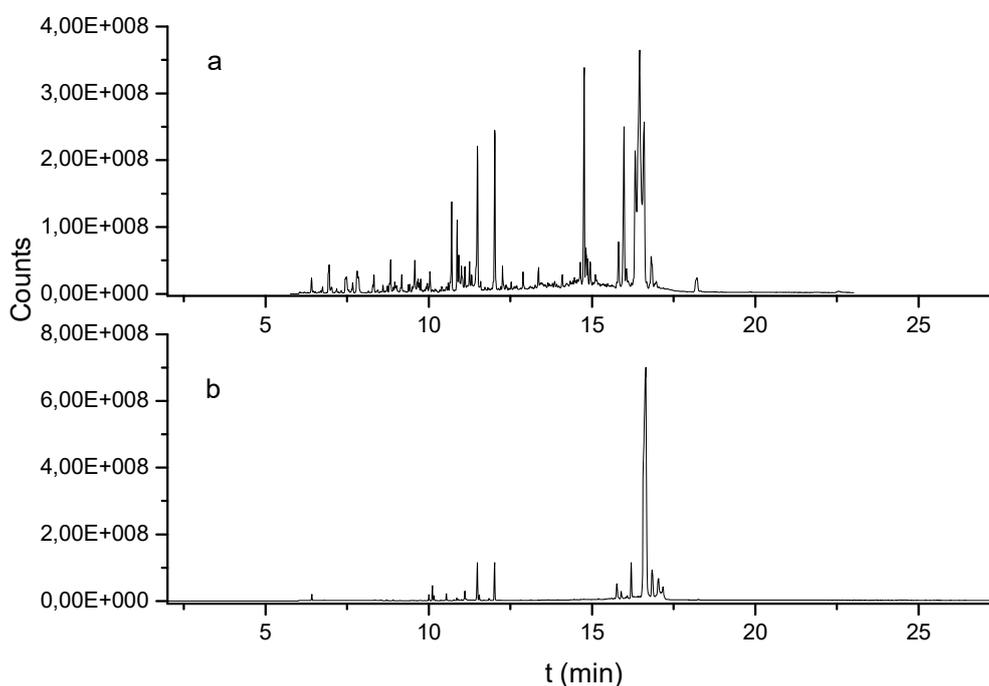


Figura 4.12 – Cromatogramas de corrente iónica total (TIC) de análise GC-MS de a) maltose e b) solução da eletrólise de maltose no níquel.

Tabela 4.4 –Produtos de reação de oxidação da maltose (10 mM) em níquel, após 5 h de eletrólise (I= 0,5 A) utilizando a biblioteca de base de dados espectrais.

Compostos identificados
Ácido oxálico
Ácido tartrônico
Ácido tartárico
Ácido 2,3,4 trihidroxi butírico
Ácido succinico
Ácido xilônico
Ácido dihidroxi butanoíco
Ácido 3-deoxi D-eritro pentônico
Ácido glucónico
Ácido glucurónico
Ácido 2-keto glucónico
Ácido glucárico
Xilose
Glucose
Maltose

Nas Figuras 4.13 e 4.14 apresentam-se os espectros correspondentes aos derivados TMS dos produtos de eletrólise da tabela 4.4.

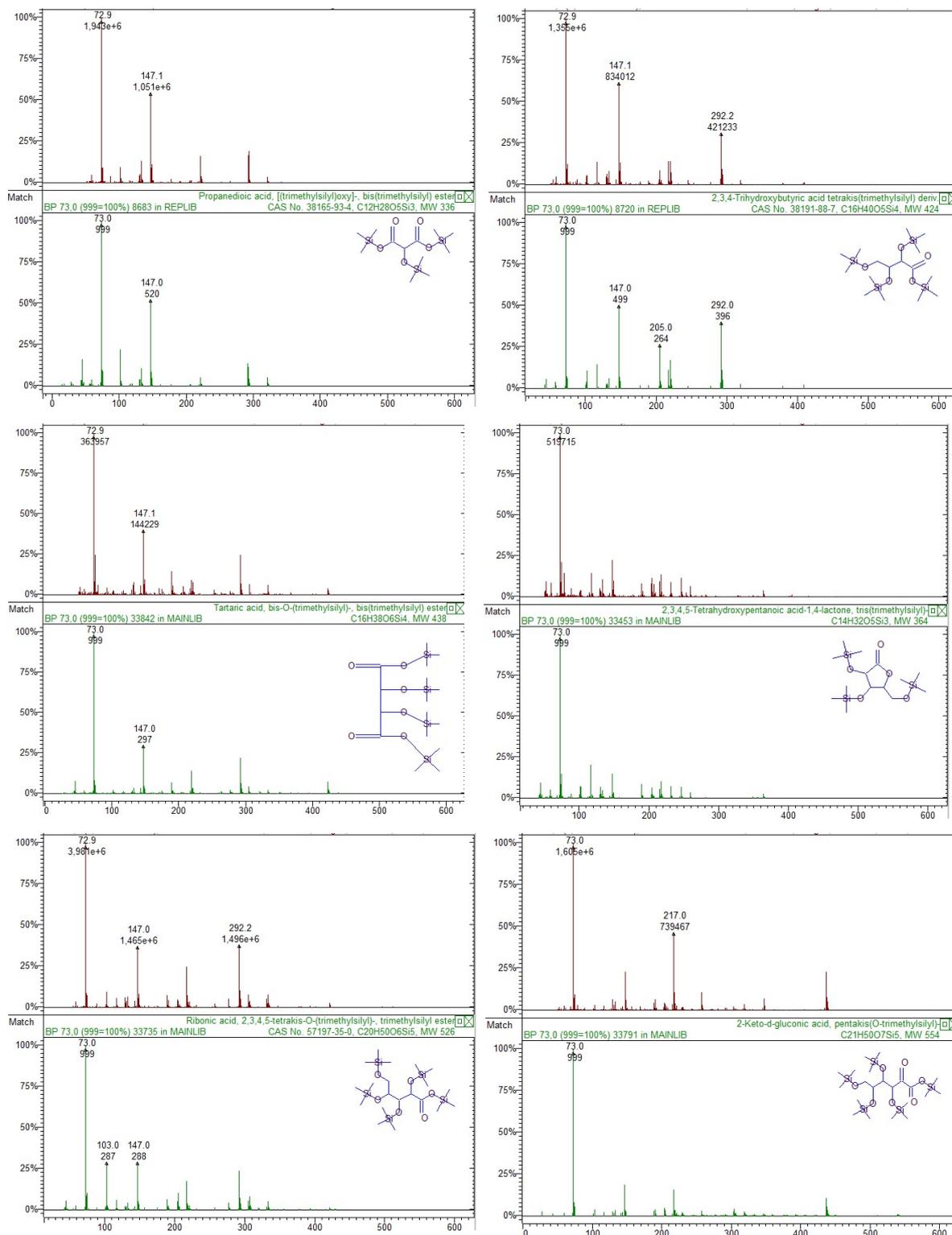


Figura 4.13 - Espectros correspondentes aos derivados TMS de produtos de eletrólise de maltose identificados pelos espectros da biblioteca espectral e respectivas estruturas.

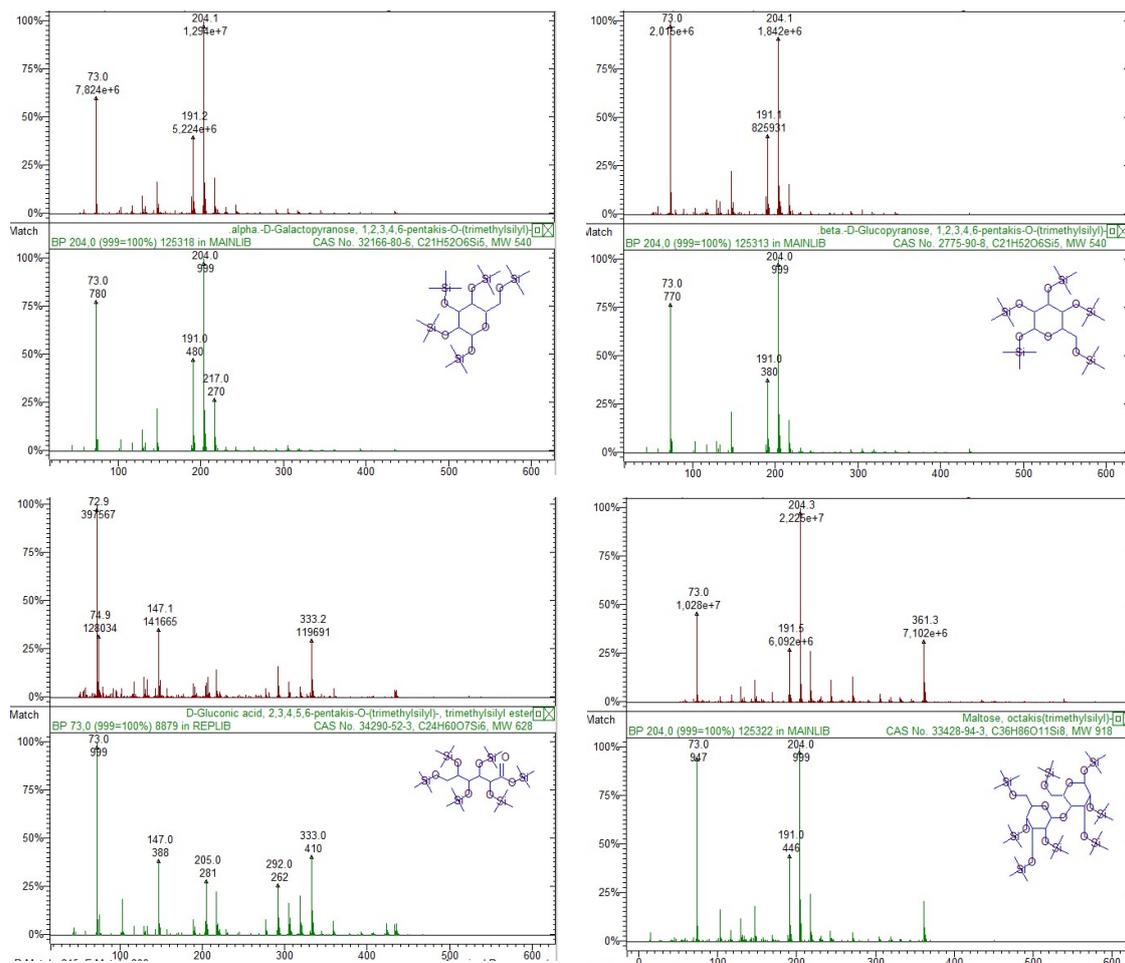


Figura 4.14 - Espectros correspondentes aos derivados TMS de produtos de eletrólise de maltose identificados pelos espectros da biblioteca espectral e respectivas estruturas.

O espectro de massa do pico com o tempo de retenção de 18,17 min apresenta um íon de m/z 539 que pode ser atribuído ao ácido maltobiónico. A estrutura proposta e as principais fragmentações para este pico estão igualmente apresentadas na Figura 4.15.

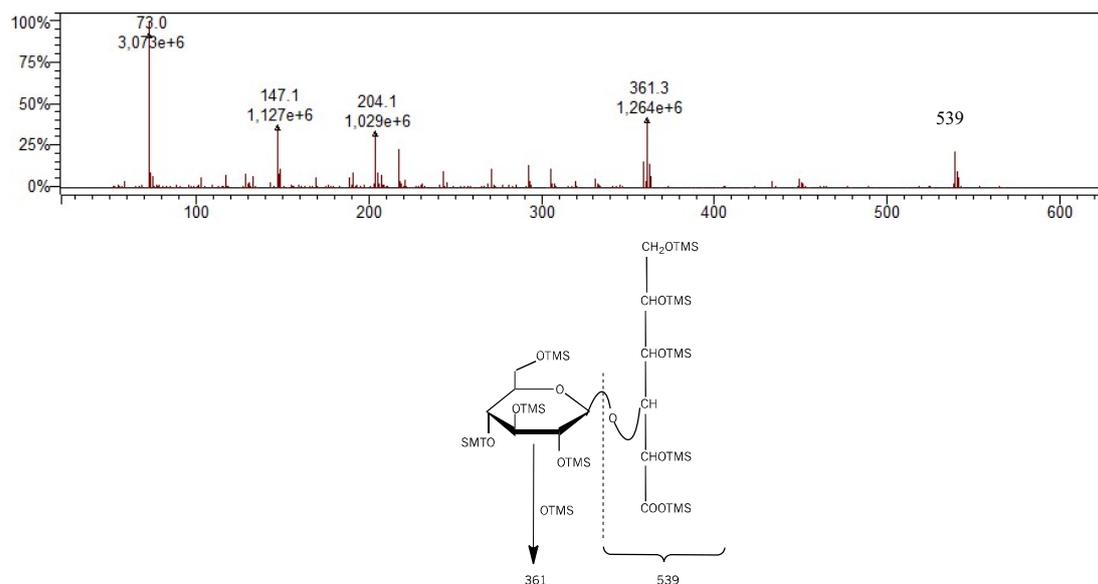


Figura 4.15 – Espetro de massa do pico com o tempo de retenção de 18,17 e esquema genérico das principais fragmentações do ácido maltobiônico.

Foi também identificado nos espectros dos picos não identificados (Figura 4.16) pela biblioteca espectral a presença de alguns iões que podem ser atribuídos às estruturas apresentadas na Figura 4.17.

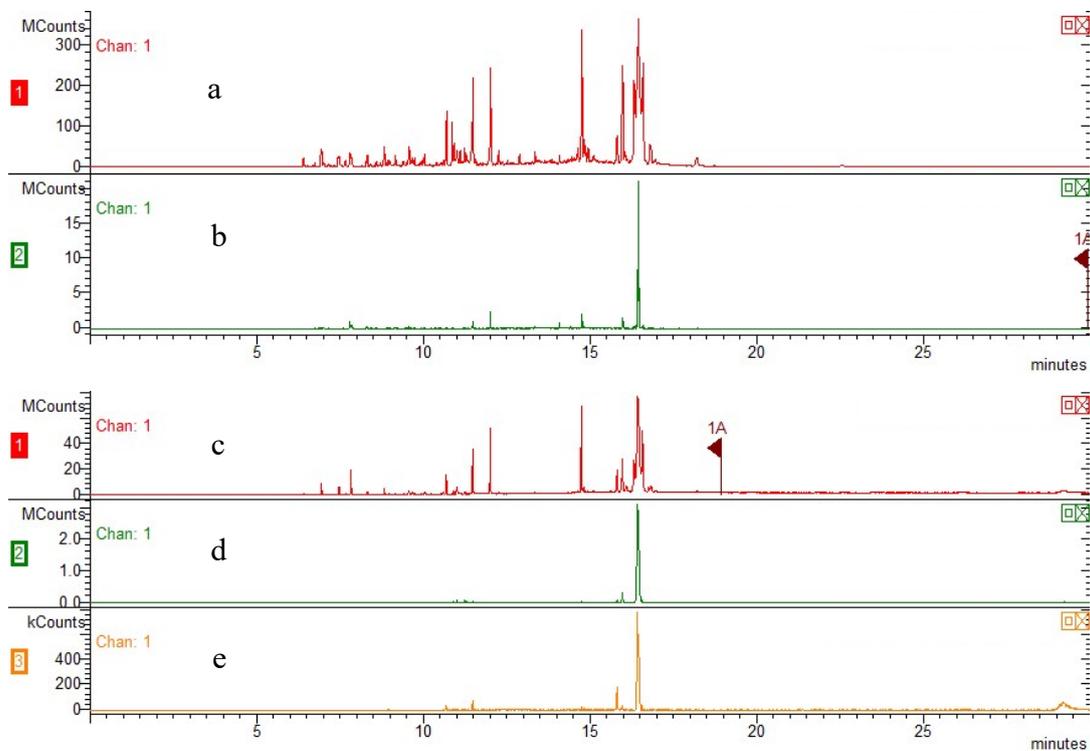


Figura 4.16 - Cromatogramas GC-MS (a e c) do produto de electrólise de maltose e cromatogramas obtidos pela extração dos iões 351, 262, 234 (b); 347 (d); 393 (e).

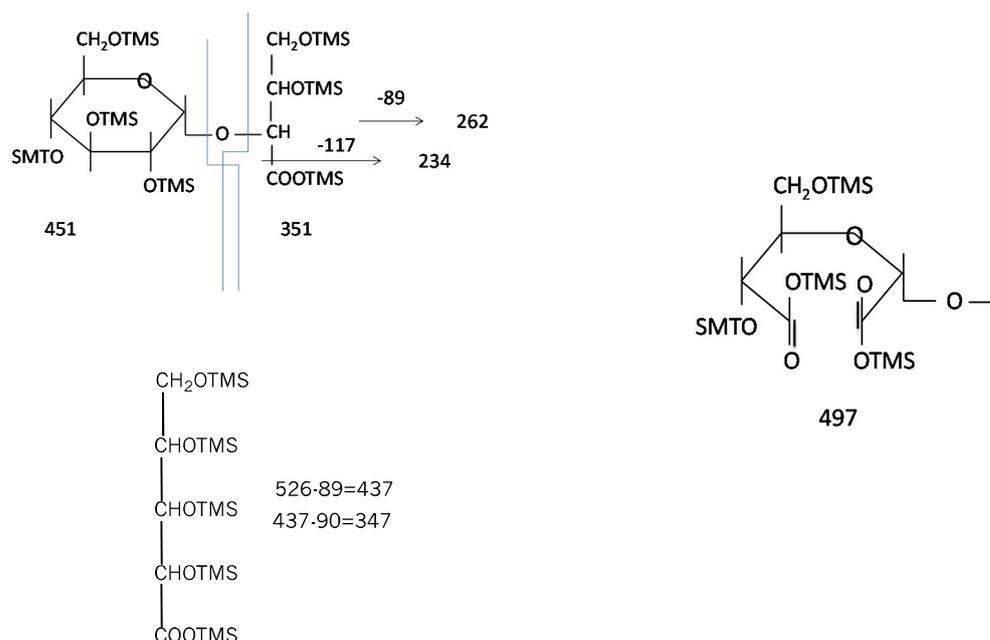


Figura 4.17 – Estruturas e fragmentações propostas para os picos não identificados pela biblioteca espectral.

A identificação de estruturas do tipo ésteres metílicos do ácido glucopiranudironico no liofilizado pode indicar a clivagem de ligações de um dos ciclos, mantendo o outro intacto. Nesta eletrólise a amostra foi também caracterizada pelo método espectroscópico de ^{13}C -RMN. Com recurso a esta técnica espectroscópica, foi obtido o espectro apresentado na Figura 4.18. O primeiro aspeto a realçar, é a complexidade do espectro RMN que confirma também a existência de um número elevado de produtos de eletrólise.

O principal aspecto a realçar nos espectros da Figura 4.19, tem a ver com a presença de um pico com maior abundância relativa correspondente ao ião de m/z 321. O espectro de MS/MS do ião de m/z 321 e a respetiva estrutura proposta apresentados na Figura 4.20 mostram a fragmentação resultante da clivagem glicosídica, -162 Da devido à perda de uma unidade de glucose com formação do ião de m/z 158,9.

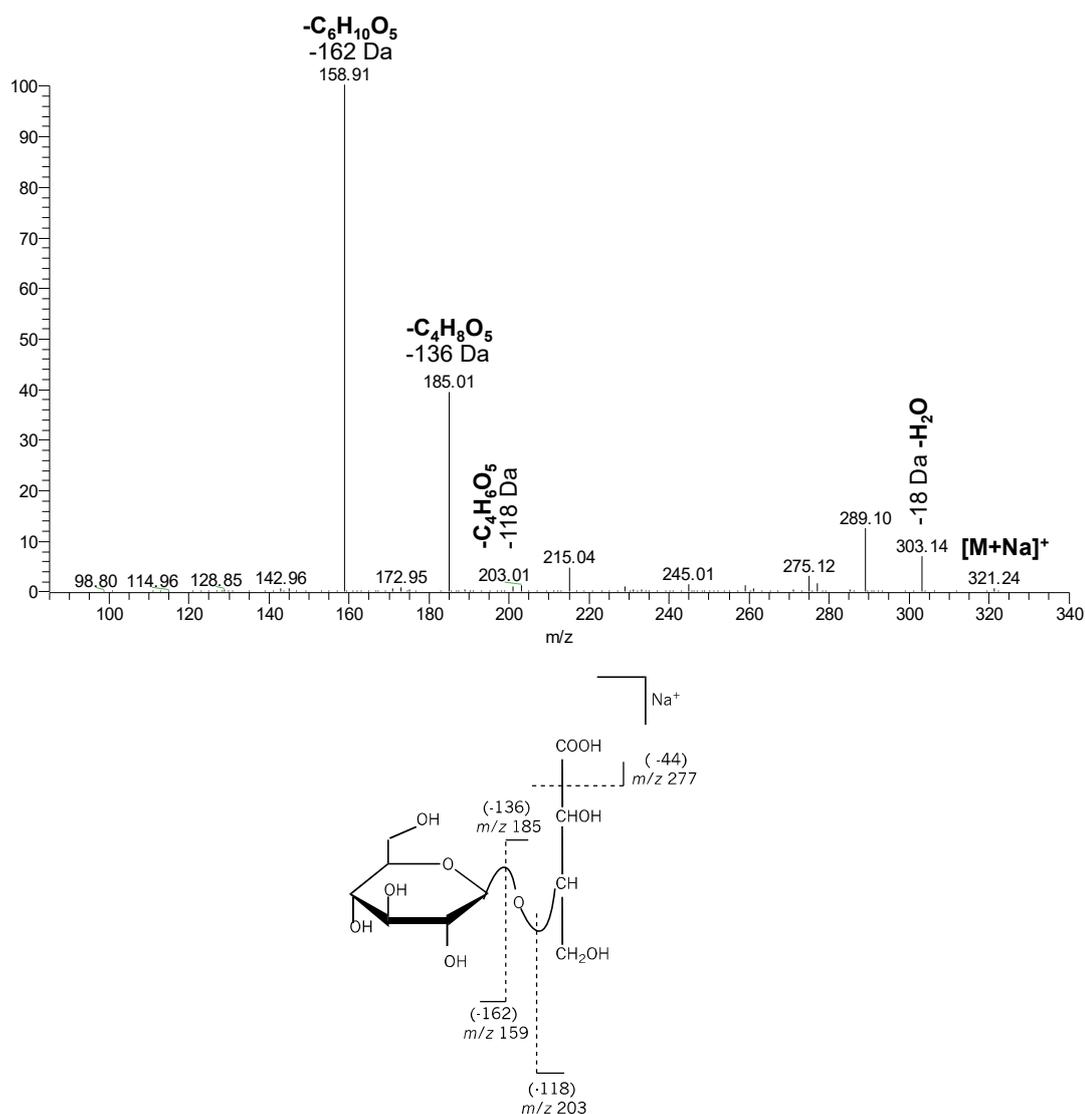


Figura 4.20 - Espectro de MS/MS do ião de m/z 321 e a respetiva estrutura proposta.

No estudo de estabilidade de maltose efetuado utilizando a análise cromatográfica observou-se, após 5 h uma diminuição da área do pico da maltose equivalente a 28 % do inicial. Os espectros ESI-MS das soluções de maltose estão apresentados na Figura 4.21. Não foram observados os iões encontrados nas soluções eletrolisadas. Este resultado

confirma também que os iões encontrados nos espectros correspondentes a solução eletrolisada pertencem aos produtos de oxidação da maltose.

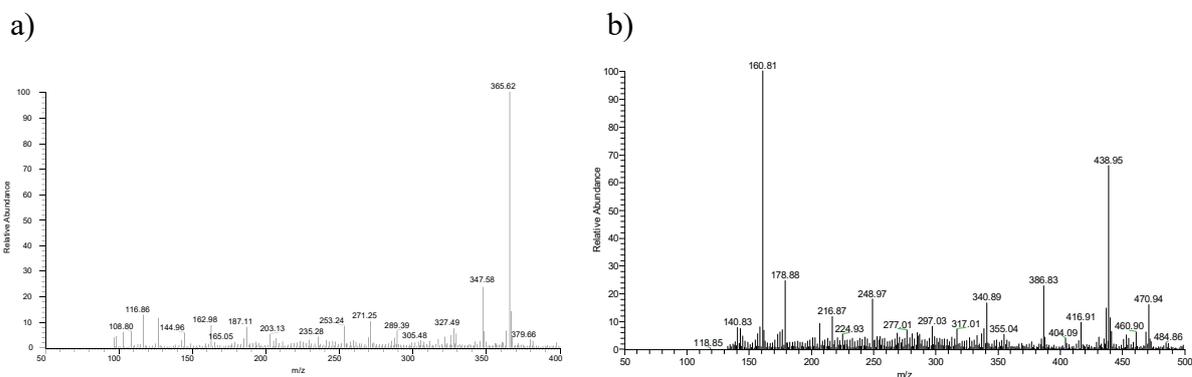


Figura 4.21 - Espectros a) ES(+)-MS e b) ESI(-)-MS obtidos nas soluções de maltose em NaOH 0,5 M.

Nas Figuras 4.22, 4.23 e 4.24 estão apresentados os cromatogramas RI, UV e CI da solução eletrolisada. O cromatograma HPLC-RID (Figura 4.22) mostra claramente uma diminuição da área do pico da maltose ($R_t=8,1$ min) durante a eletrólise deste composto conforme ao que era esperado.

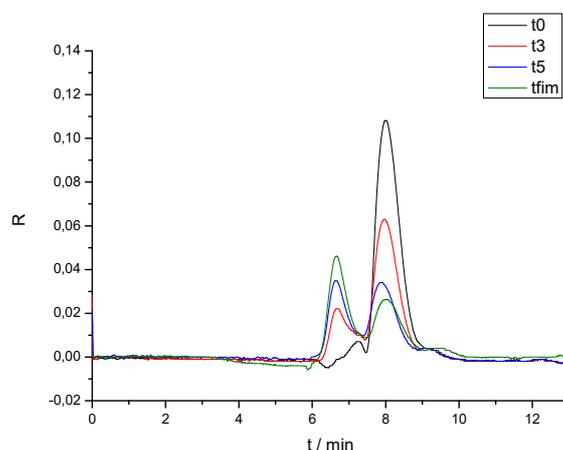


Figura 4.22 – Cromatograma obtido pela análise HPLC-RID da solução eletrolisada da maltose.

O elevado número de picos cromatográficos observados nos cromatogramas HPLC-UV (Figura 4.23) e CI (Figura 4.24) confirmaram a diversidade observada nos produtos de reação.

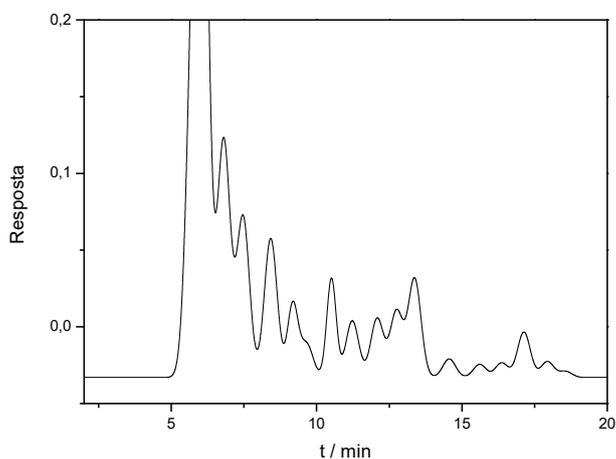


Figura 4.23 – Cromatograma obtido pela análise HPLC-UV da solução eletrolisada de maltose.

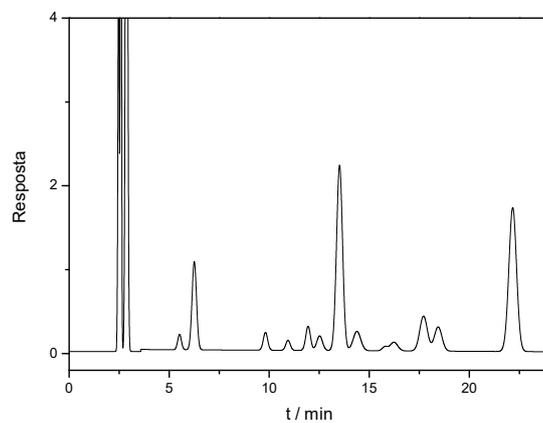


Figura 4.24 – Cromatograma obtido pela análise IC da solução eletrolisada de maltose.

Distribuição dos produtos de reação obtidos após 5 h de eletrólise

A análise quantitativa dos produtos de reação mostra uma quantidade significativa de produtos de clivagem. Tal fato permite demonstrar que para este caso, a seletividade é baixa. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.5.

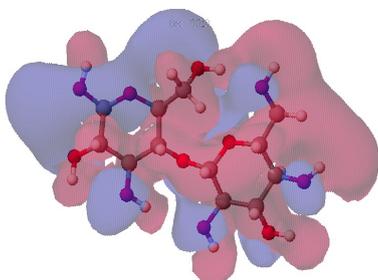
Tabela 4.5 –Produtos de reação de oxidação de maltose (0,01 M) em níquel, após 5 h de eletrólise (I= 0,5 A).

Compostos	Porcentagem de maltose transformada (%)
Ácido fórmico	15,1
Ácido oxálico	19,8
Ácido 1-oxo, 2-hidroxi propiónico	4,6
Ácido tartrónico	3,9
2-keto d-glucónico	1,4
Ácido tartárico	2,2
Ácido glucónico	1,1
Ácido glucosil glucurónico	6,5
Glucose	3,4
Maltobiónico	2,1
Maltose diácido	3,7
Carbonatos	3,4

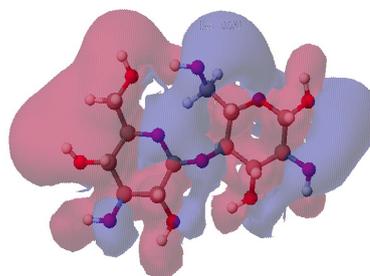
Os modelos moleculares (Figura 4.25) identificados utilizando o Software Cache permitem distinguir as partes eletropositivas e eletronegativas da molécula, apresentados com as cores vermelha e azul, respetivamente (a e b). Uma aproximação da molécula ao elétrodo de níquel pela parte eletropositiva pode ser contemplada, uma vez que a superfície do elétrodo nestas condições deve estar coberta com cargas negativas provenientes dos grupos NiO⁻. Uma região contínua de carga positiva correspondente a ligação glicosídica pode permitir a adsorção da molécula pelos carbonos C1 e C4' com a possibilidade de clivagem das ligações C-C. A densidade eletrónica superficial (Figura 4.25 c) pode estar relacionada com a susceptibilidade de ataque nucleofílico ou eletrofilico. Deste modo, as

regiões em branco e vermelho constituem as partes da molécula com maior susceptibilidade para um ataque nucleofílico.

a)



b)



c)

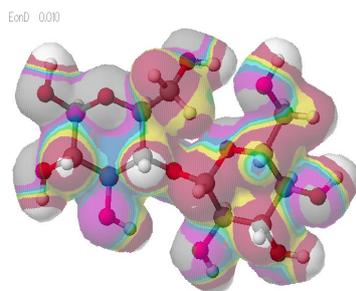


Figura 4.25 - Modelos moleculares, visualizados utilizando o Software Cache (Oxford Molecular).

4.2.1.3. Oxidação da D-maltotriose

Por fim, foi efetuada a eletrólise de maltotriose com concentração de 0,01 M (Figura 4.26) no elétrodo de níquel em meio NaOH 0,5 M com uma intensidade de corrente aplicada de 0,5 A.

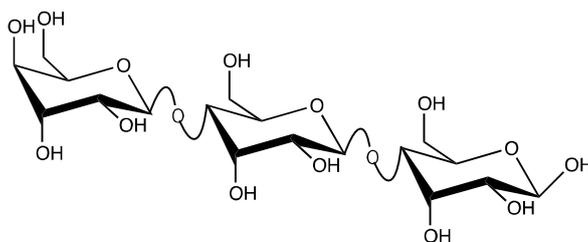


Figura 4.26 – Estrutura da molécula de D-maltotriose.

Após 6 h de eletrólise a solução foi neutralizada e a água foi removida por meio da liofilização. Os produtos de eletrólise foram identificados e quantificados utilizando métodos cromatográficos. A ausência de contaminantes de baixo peso molecular na maltotriose foi demonstrada pelo ESI-MS.

Os voltamogramas correspondentes a oxidação eletroquímica da maltotriose no elétrodo de níquel antes da eletrólise, após o fim da eletrólise e para o eletrólito de suporte (NaOH 0,5 M), estão representados na Figura 4.27. A oxidação da maltotriose inicia-se na região de oxi-hidróxido de níquel. A espécie oxi-hidróxido de níquel adsorvido à superfície do elétrodo possui propriedades catalíticas para reações de oxidação de vários compostos, incluindo poliálcoois e hidratos de carbono numa gama de potenciais próximo da oxidação da água.

O voltamograma obtido no fim de eletrólise evidencia um decréscimo da intensidade de corrente correspondente a esta última região de potenciais, indicando provavelmente o consumo do substrato inicial.

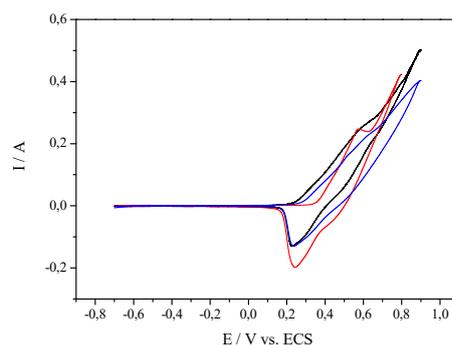


Figura 4.27 – Voltamogramas cíclicos de níquel (—) no eletrólito de suporte; (—) no início; (—) e no fim de eletrólise de 0,01 M de maltotriose.

Distribuição dos produtos da reação

Na Tabela 4.6 estão indicados os produtos de oxidação detetados por CI e HPLC-UV-RID, em solução após a eletrólise em meio alcalino. Apresenta-se ainda a percentagem em maltotriose inicial. Os ácidos de baixo peso molecular constituem uma parte importante dos produtos da reação de maltotriose, conforme está indicado na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Produtos de eletrólise de maltotriose em níquel.

Compostos	Percentagem em
	maltotriose transformado (%)
Ácido fórmico	8
Ácido oxálico	22
Ácido tartrónico	5
2-keto d-glucónico	2
Ácido tartárico	1,2
Ácido glucónico	4
Ácido glucárico	2
Ácido glucosil glucurónico	8
Glucose	6
Maltose	4

Recorrendo-se a equação 4.3, calculou-se a conversão do substrato inicial de maltotriose, após 6 h de eletrólise em níquel que foi de 65%.

$$\text{Conversão} = \frac{[\text{maltotriose}]_{\text{inicial}} - [\text{maltotriose}]_{\text{final}}}{[\text{maltotriose}]_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (4.3)$$

Foram identificados alguns produtos resultantes da oxidação da maltotriose recorrendo-se às análises GC-MS, ESI-MS e ESI-MS/MS em modo de ionização positiva e negativa. Além do íon de m/z 527 correspondente ao maltotriose não consumido observou-se também a formação de outros ácidos com um número de carbonos inferior a doze, o que demonstra que a molécula de maltotriose sofreu fragmentação. A Figura 4.28 apresenta os espectro de ESI-MS dos produtos de oxidação obtidos para a eletrólise de maltotriose em meio alcalino.

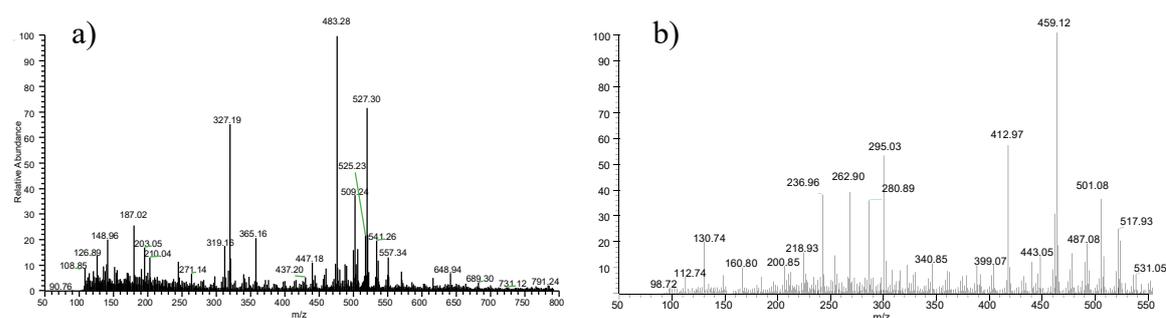
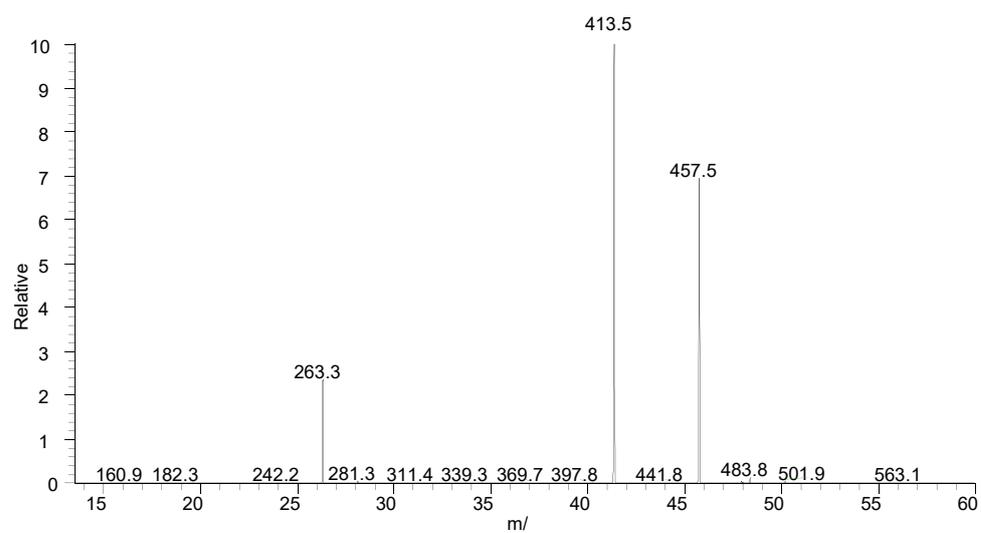


Figura 4.28 - Espectro a) de ESI(+)-MS e b) ESI(-)-MS dos produtos de oxidação da maltotriose em níquel em meio NaOH 0,5 M.

A Figura 4.29 a) e b) apresenta o espectro de MS/MS obtido para o íon de m/z 501 e o espectro de MS/MS/MS do íon de m/z 413, respetivamente. As fragmentações encontradas levaram-nos a propor uma estrutura possível para o íon 501 (Figura 4.30). Observa-se a perda de uma molécula de água -18 Da, a perda de -44 Da, -88 Da e -238 Da (corresponde às quebras do anel de hexose).

a)



b)

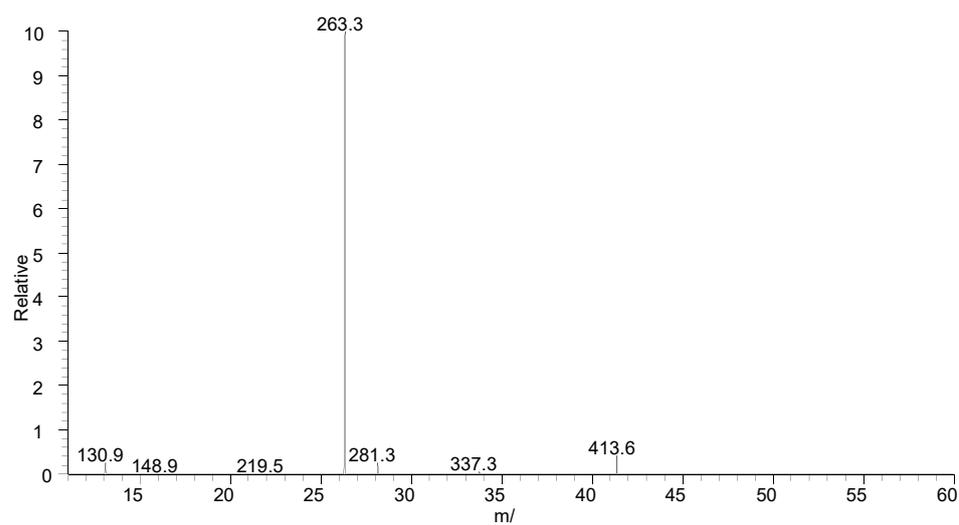


Figura 4.29 – Espectro a) de MS/MS do íon 501 e b) de MS/MS/MS do íon 413.

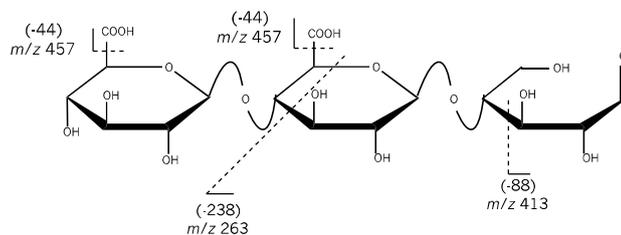


Figura 4.30 – Estrutura proposta com base no espectro da Figura 4.29 do íon de m/z 501.

O espectro de massa obtido utilizando condições de ESI que favoreçam a ionização dos compostos de baixo peso molecular encontra-se apresentado na Figura 4.31.

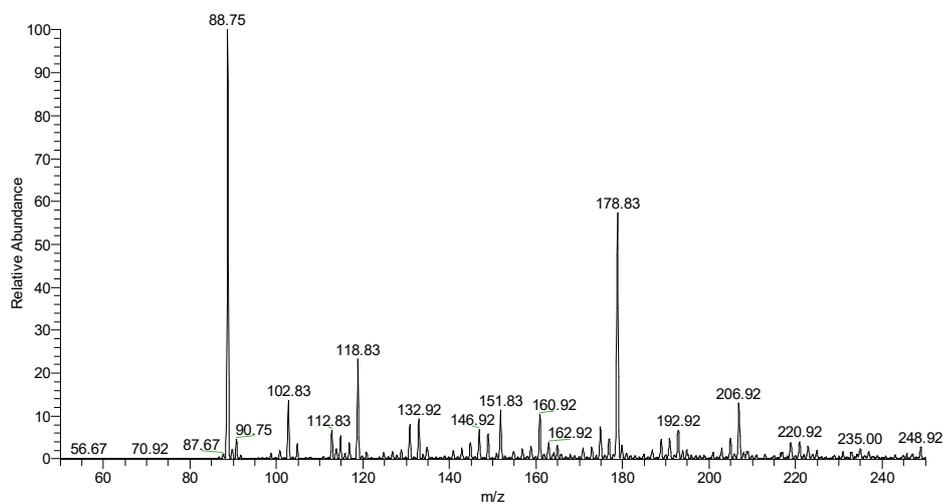


Figura 4.31 - Espectro de ESI dos compostos de baixo peso molecular.

Na Figura 4.32 mostra o cromatograma GC-MS dos produtos de eletrólise de maltotriose no elétron de níquel.

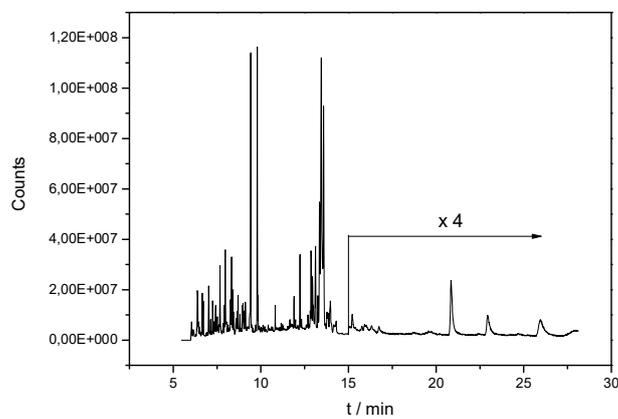


Figura 4.32 - Cromatograma GC-MS dos produtos de eletrólise de maltotriose no elétron de níquel.

A Figura 4.33 mostra o espectro de ESI-MS dos produtos de oxidação da maltotriose em níquel.

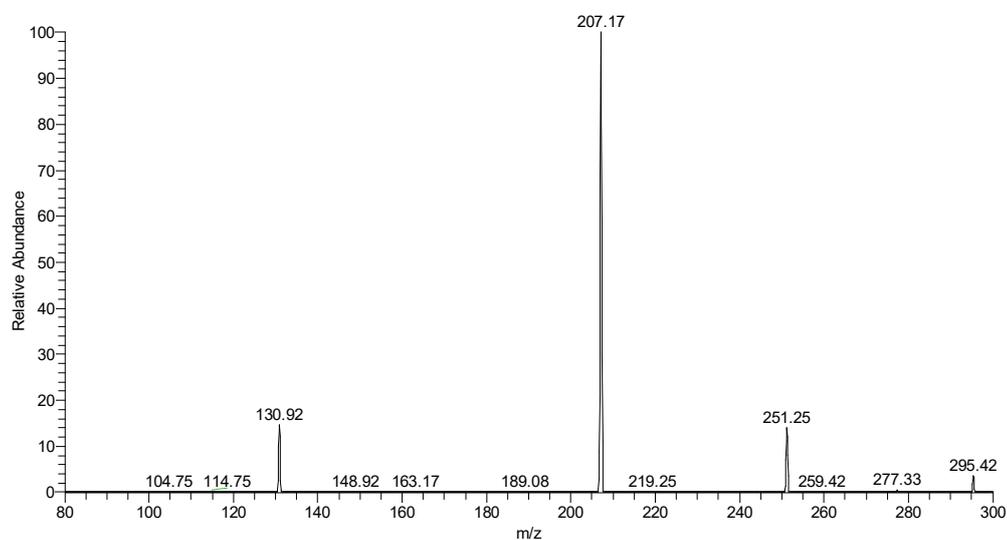


Figura 4.33 – Espectro de ESI-MS do íon de m/z 295 da oxidação da maltotriose no eletrodo de níquel.

O espectro de MS/MS do íon 459 apresentado na Figura 4.34 corresponde ao oligossacarídeo com duas hexoses e uma ramificação. A presença da hexose é inferida pelo íon de m/z 297, resultante da perda de -162 Da. É possível observar na Figura 4.35, a estrutura proposta possível para o íon 459. Observa-se também a perda de uma molécula de água (-18 Da) e a perda de -60 Da, que pode também corresponder a quebra do anel de hexose em ligação 1-4.

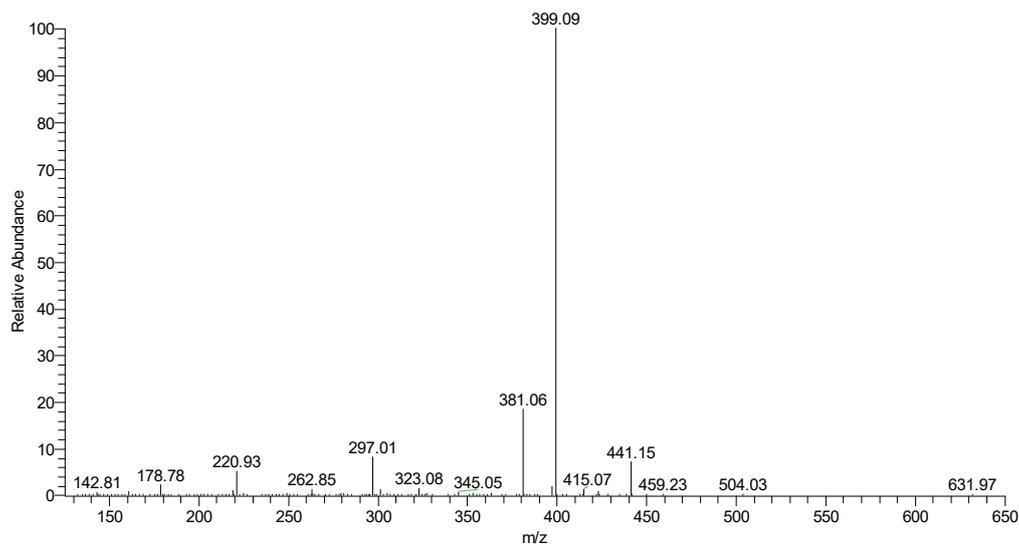


Figura 4.34 – Espectro de ESI-MS/MS do ião de m/z 459 da oxidação da maltotriose em níquel.

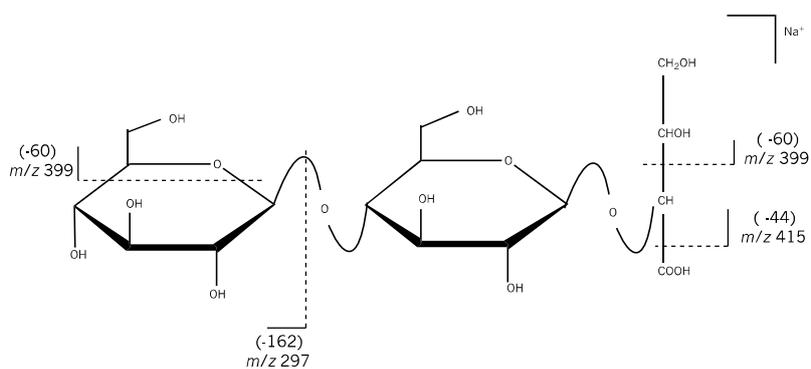


Figura 4.35 – Estrutura proposta para o ião de m/z 459 da eletrólise de maltotriose no elétrodo de níquel.

4.2.2. oxidação eletroquímica no DSA (Dimensionally stable anode), na célula FM01-LC

Neste elétrodo DSA foram efetuadas no total cinco eletrólises, sendo duas para a oxidação da glucose e as restantes para a galactose, celobiose e maltotriose diferindo cada uma delas se foi a corrente controlada ou a potencial controlado.

4.2.2.1. Oxidação da D-glucose

A glucose como monossacarídeo tem muitos grupos funcionais reativos em carbonos adjacentes e apresenta cinco grupos hidroxilo e um grupo aldeído (Figura 4.36).

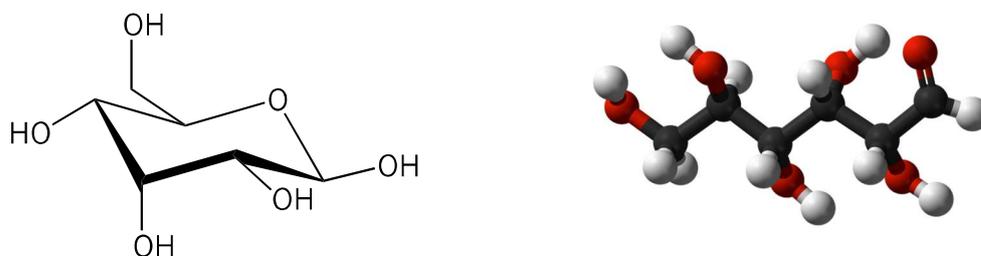


Figura 4.36 – Estrutura da molécula de D-glucose.

Foram efetuadas duas eletrólises da glucose, sendo uma com intensidade de corrente constante e outra a potencial controlado.

Antes das eletrólises foi realizado um estudo voltamétrico com o objetivo de se verificar se a célula e/ou o elétrodo se encontravam prontos para a eletrólise. O voltamograma cíclico correspondente, em meio NaOH 0,5 M, registado a 50 mV s^{-1} na célula FM01-LC é apresentado na Figura 4.37. Os voltamogramas do níquel registados no início e no fim de eletrólise de 0,01 M de glucose, mostram uma diminuição ligeira da intensidade de corrente na gama de potenciais de 0,7 a 1,2 V vs ECS no fim de eletrólise, confirmando deste modo o consumo da glucose.

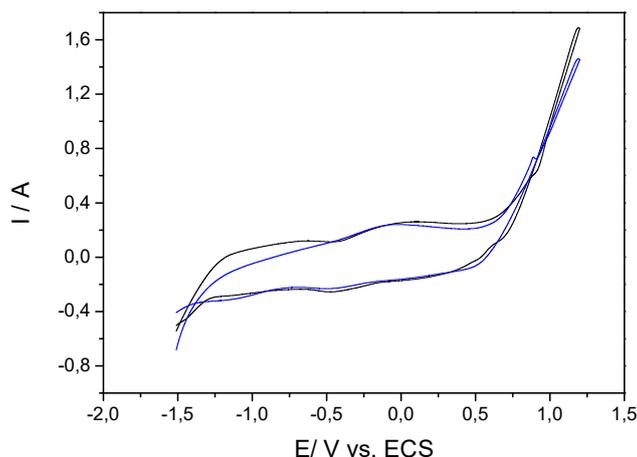


Figura 4.37 – Voltamograma obtido numa célula de fluxo FMO1-LC utilizando um eletrodo de DSA, em meio NaOH 0,5 M, correspondente à eletrólise de glucose (0,01 M), traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} . (—) no início e (—) no fim da eletrólise.

Distribuição dos produtos de reação

Tendo por objetivo a identificação e a quantificação dos produtos de eletrólise de glucose no DSA prepararam-se soluções padrão individuais dos ácidos glucurónico, tartárico, tartrónico, fórmico, oxálico, glicólico, glicérico e analisaram-se por HPLC, com detetor de UV e por IC com detetor de condutividade.

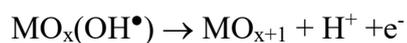
Por análise GC-MS e HPLC-MS e por comparação dos tempos de retenção dos picos cromatográficos presentes nos cromatogramas registados ao longo da eletrólise e com os tempos de retenção dos padrões, foi possível identificar a maioria dos produtos da reação e a glucose que não reagiu. As percentagens em glucose oxidada dos principais produtos da reação estão apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Distribuição dos produtos de reação de oxidação de D-Glucose (0,01 M) em DSA, após 6 h de eletrólise; (I= 0,5 A).

Compostos	Percentagem em glucose oxidada (%)
Ácido glucónico	7
Ácido tartárico	8
Ácido tartrónico	2
Ácido fórmico	38
Ácido oxálico	14
Ácido glicólico	3
Ácido glicérico	3
Carbonatos	9

O ácido fórmico foi o produto maioritário da reação de oxidação da glucose para o valor de intensidade de corrente estudado. Utilizando-se a expressão 4.3, calculou-se a conversão do substrato inicial da glucose. A conversão da glucose após 6 h de eletrólise foi de 65 %, ficando por reagir apenas 35 % do monossacarídeo inicial.

O consumo de energia por unidade de ácido fórmico (FA) produzido neste caso, foi de 14,7 kWh/Kg de FA. Observou-se a formação de outros ácidos com um número de carbonos inferior a seis, o que demonstra que a molécula da glucose sofreu fragmentação. Neste caso, o DSA atua como um ânodo ativo cujo numa primeira fase do processo o radical adsorvido interage com o ânodo para formar óxidos com maior estado de oxidação MO_{x+1} . Assim, o par redox MO_{x+1}/MO_x age como mediador para a oxidação dos compostos orgânicos com base no seguinte mecanismo (Esquema 4.3):



Esquema 4.3 – Mecanismo para a oxidação de compostos orgânicos.

A eletrólise galvanostática apesar de ser um processo mais fácil de aplicar em larga escala, não permite o controle de potencial elétrico durante a oxidação. Para estudar o efeito de potencial na distribuição dos produtos, foi efetuada uma eletrólise a potencial controlado.

Oxidação da glucose a 0,8 V vs. ECS utilizando um programa de potencial

A glucose foi também oxidada no DSA utilizando um programa de potencial de 0,8 V vs. ECS. Os voltamogramas cíclicos obtidos no início e no fim de eletrólise para a oxidação da glucose 0,01 M no RuO₂/Ti (DSA), estão apresentados na Figura 4.38. A diminuição significativa de intensidade de corrente na região de potenciais entre 0,3 e 0,7 V vs. ECS observada no fim de eletrólise pode ser atribuída ao consumo de glucose durante a eletrólise.

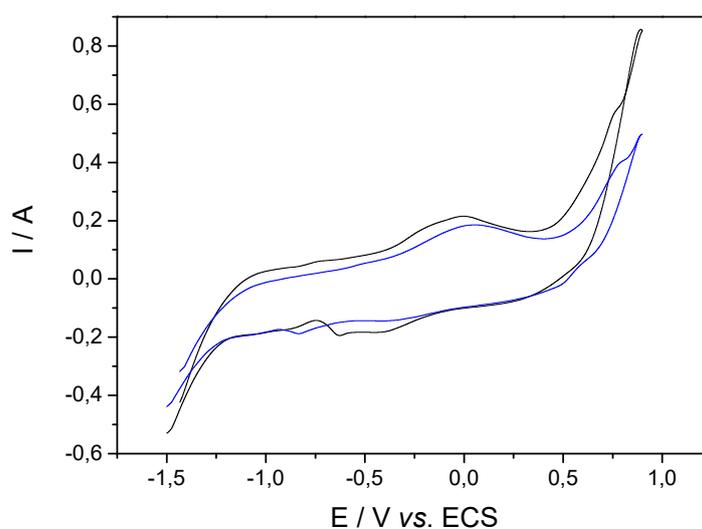


Figura 4.38 – Voltamogramas cíclicos num eletrodo de DSA, em meio NaOH 0,5 M, correspondentes à eletrólise da glucose (0,01 M), traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s⁻¹, no início (—) e no fim da eletrólise (—).

O valor de potencial de oxidação das eletrólises é conhecido como sendo um fator de seletividade no processo de oxidação de moléculas orgânicas. Portanto, foi efetuada uma eletrólise utilizando um programa de potencial constituído por três pulsos de potencial. O pulso de oxidação foi estabelecido em 0,8 V vs. ECS com uma duração de 60 s. Assim, pode-se constatar que se seguiu um procedimento de reativação que consistiu em dois pulsos de potencial de duração muito curta de 1 s a 2,0 V e -1,5 V vs. ECS, respetivamente. Este pulso permitiu a oxidação das espécies que inibem a atividade catalítica “venenos”, formadas durante o patamar de oxidação e são caracterizados pela adsorção irreversível na superfície onde promovem a adsorção e oxidação da glucose. O perfil de potencial utilizado na eletrólise da glucose em NaOH no DSA é apresentado na Figura 4.39.

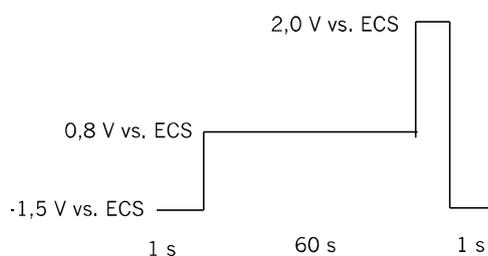


Figura 4.39 – Perfil de potencial aplicado na eletrólise de glucose em meio alcalino.

A eletrólise foi realizada, durante um período de 6 h, tendo sido retiradas amostras de solução de hora em hora que foram posteriormente analisadas por cromatografia e por técnicas acopladas (HPLC, GC-MS, LC-MS e IC).

A distribuição de produtos da oxidação encontrados no fim de eletrólise estão apresentados na Tabela 4.8. A conversão do substrato inicial foi de 56 %.

Tabela 4.8 – Produtos de eletrólise D-glucose (0,01 M) com pulsos de potencial; (E_{ox} 0,80 V vs. ECS).

Compostos	Percentagem em glucose oxidada (%)
Ácido glucónico	61
Ácido glucárico	11
Ácido oxálico	8
Ácido fórmico	10
Carbonatos	2

Nesta eletrólise, correspondente a uma conversão de 56%, o produto gerado em maior quantidade foi o ácido glucónico. Foram encontrados em menor quantidades produtos de degradação. Contudo, esta eletrólise foi efetuada aplicando um potencial relativamente baixo o que promove uma oxidação mais seletiva.

Na Figura 4.40 apresenta-se os perfis de concentração do ácido glucónico e de glucose, em função do tempo, para esta eletrólise. Durante as 6 h de eletrólise de glucose (0,01 M) em NaOH 0,5 M registaram-se intervalos de tempo regulares, valores de concentração da glucose e dos ácidos glucónico, glucárico, oxálico e fórmico. A concentração da glucose apresenta um valor máximo no início da eletrólise, diminuindo progressivamente ao longo das cerca de 6 h de experiência. Pelo contrário, pela análise quantitativa do principal produto de eletrólise, o ácido glucónico, ao longo da eletrólise, pode-se constatar que a sua concentração aumenta durante a experiência. Foi observado a mesma evolução para os restantes produtos da oxidação, ainda que em alguns casos com um aumento ligeiro. Confirmou-se assim o resultado previsto, uma vez que a quantidade do ácido glucónico neste último caso foi superior ao observado na eletrólise galvanostática.

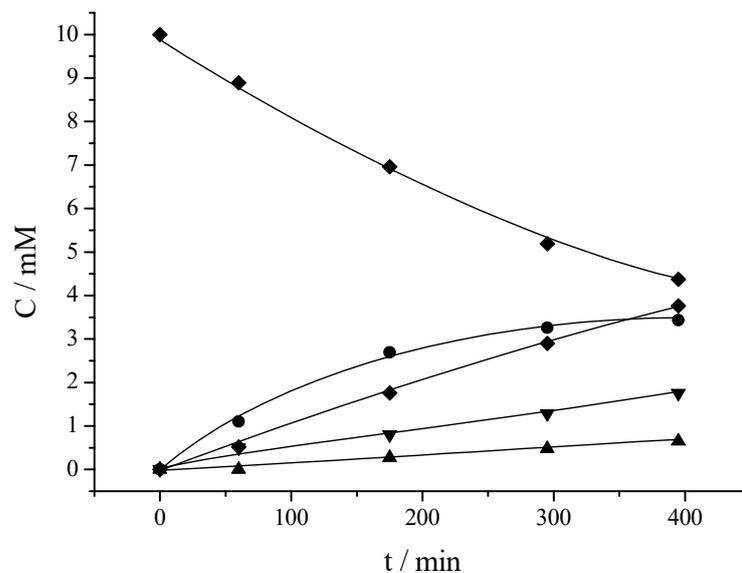


Figura 4.40 – Perfis de concentração de glicose (■), ácido glucônico (●), ácido fórmico (◆), ácido glucárico (▲), ácido oxálico (▼), resultantes da oxidação da glicose (0,01 M) em meio NaOH 0,5 M no elétrodo de DSA.

4.2.2.3. Oxidação da D-galactose em meio ácido utilizando um eletrodo de PbO₂

A D-galactose é uma aldo-hexose. Como todos monossacarídeos, aldo-hexose, a D-galactose reduz o reagente de Fehling ou o reagente de Tollens, pelo que é um açúcar redutor. A maioria dos monossacarídeos e dissacarídeos são redutores, exceto a sacarose que é um açúcar não redutor [4,5]. A D-galactose como todos os monossacarídeos tem muitos grupos funcionais reativos em carbonos adjacentes. Esta apresenta cinco grupos hidroxilo e um grupo aldeído (Figura 4.41).

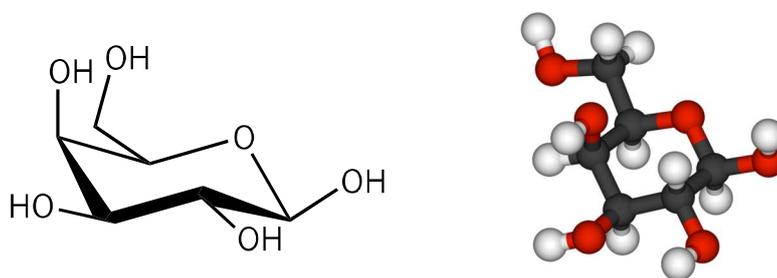


Figura 4.41 – Estrutura da molécula de D-galactose.

O ânodo PbO₂ é conhecido como promotor de radicais OH quando se aplicam potenciais elevados e por consequência é considerado como um ânodo passivo. A oxidação da D-galactose, um açúcar que pode ser obtido da parte hemicelulósica da madeira foi efetuado no eletrodo de PbO₂ em meio H₂SO₄ 0,5 M, aplicando um potencial de 2,0 V *vs.* ECS. Os voltamogramas cíclicos correspondentes ao início e ao fim de eletrólise estão apresentados na Figura 4.42. A partir de um potencial de 1,8 V *vs.* ECS, os valores de corrente elétrica obtidos na presença da D-galactose são superiores para os mesmos valores de potencial relativamente ao voltamograma obtido na ausência da D-galactose.

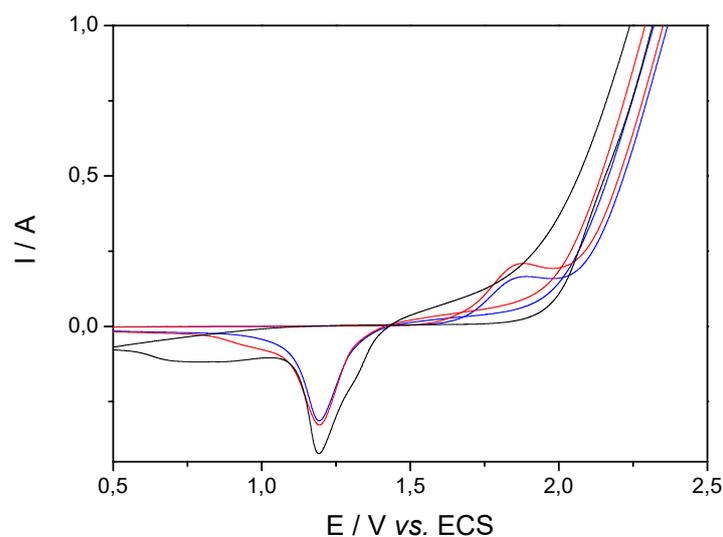


Figura 4.42 - Voltamogramas cíclicos num eléctrodo de PbO_2 , em meio H_2SO_4 0,5 M, correspondentes à electrólise da galactose (0,05 M), traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} , sem espécie eletroativa (—) no início (—) e no fim da electrólise (—).

Após 6 h de electrólise, as amostras dos produtos recolhidas ao longo da electrólise foram analisados utilizando o HPLC-UV-RI e o IC, tendo sido assim possível quantificar o consumo da espécie eletroativa D-galactose e a produção dos ácidos obtidos provenientes da sua oxidação electroquímica. Se a oxidação ocorrer no grupo aldeído e no álcool primário, forma-se o ácido galactárico. Se a oxidação ocorrer no álcool primário, forma-se o ácido galacturónico e se ocorrer no grupo aldeído, forma-se o ácido galactónico.

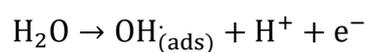
Distribuição dos produtos de reacção

Os resultados das análises estão apresentados na Tabela 4.9. Analisando os resultados confirma-se assim o esperado, visto que o principal produto de electrólise resultante da oxidação é o ácido galactónico.

Tabela 4.9 – Produtos de eletrólise D-galactose (0,05 M); (E_{ox} 2,0 V vs. ECS).

Compostos	Percentagem em galactose oxidada (%)
Ácido galactónico	34
Ácido galactárico	4
Ácido galacturónico	4
Ácido glicérico	8
Ácido glicólico	12
Ácido fórmico	14
Ácido glioxílico	4
Ácido oxálico	2
Carbonatos	9

Foi também observada uma quantidade significativa de ácido dicarboxílico no fim de eletrólise. De igual modo, recorrendo-se a equação 4.3 determinou-se a conversão de galactose que foi de 52 %. A oxidação inicia-se neste caso, provavelmente com a produção de radicais OH na superfície do eletrodo. Numa segunda fase os radicais produzidos reagem com a espécie eletroativa para formar os produtos de oxidação, de acordo com as reações apresentadas.



4.2.2.4. Oxidação da D-celobiose

O voltamograma cíclico obtido, correspondente ao eléctrodo de DSA em meio alcalino (NaOH 0,5 M) na ausência e na presença de celobiose 0,01 M apresentado na Figura 4.43, mostra um aumento ligeiro da intensidade de corrente em toda a gama de potenciais na variação positiva de potencial. Nota-se ainda, um aumento significativo da intensidade de corrente nos potenciais próximos ao início da produção de oxigénio. Isto indica que, para este caso a oxidação da molécula ocorre nos potenciais relativamente anódicos.

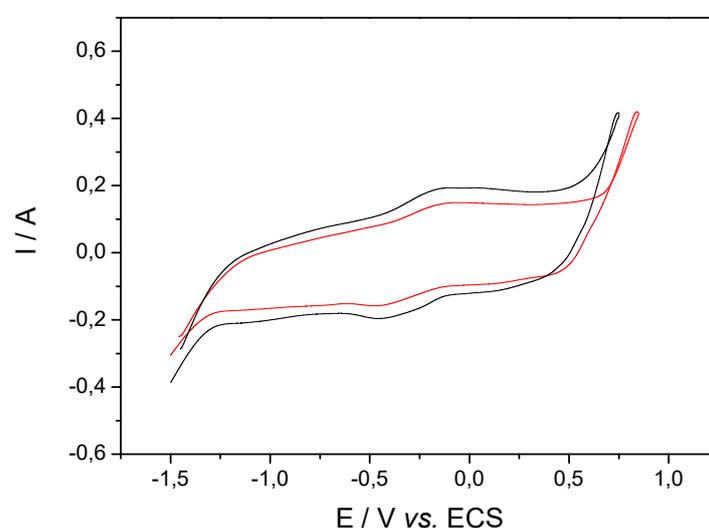


Figura 4.43 - Voltamogramas cíclicos num eléctrodo de DSA, em meio NaOH 0,5 M, correspondentes à eletrólise da celobiose (0,01 M), traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} , sem espécie eletroativa (—) e na presença de 0,01 M de celobiose (—).

A celobiose foi também oxidada no ânodo de óxidos de ruténio (DSA) com uma intensidade de corrente de 0,5 A em meio NaOH 0,5 M. Após neutralização e após liofilização e derivatização com reagentes sililantes (HMDS + TMCS), os produtos de eletrólise foram identificados por ESI-MS e HPLC-MS e por GC-MS. Os resultados das análises ESI-MS e HPLC-MS estão apresentados na Figura 4.44.

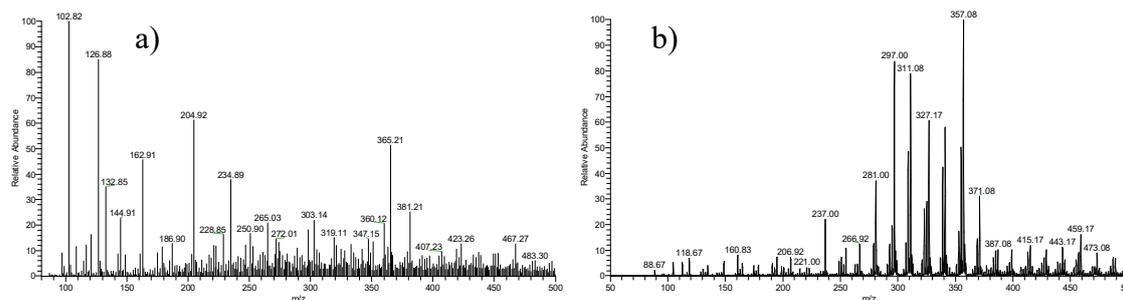


Figura 4.44 – Espetros dos iões encontrados para a análise de a) ESI-MS(+) e b) ESI-MS(-).

Os resultados obtidos mostram que, para este caso ao contrário do que se verificou na eletrólise da celobiose no eléctrodo de níquel, a oxidação do grupo aldeído é favorecida, quando comparada com a oxidação do grupo álcool primário. O espetro MS/MS do ião de m/z 303 e respetiva estrutura proposta são apresentados na Figura 4.45. Observa-se a perda de um resíduo de glucose (-162 Da) e também a perda de uma molécula de água (-18 Da).

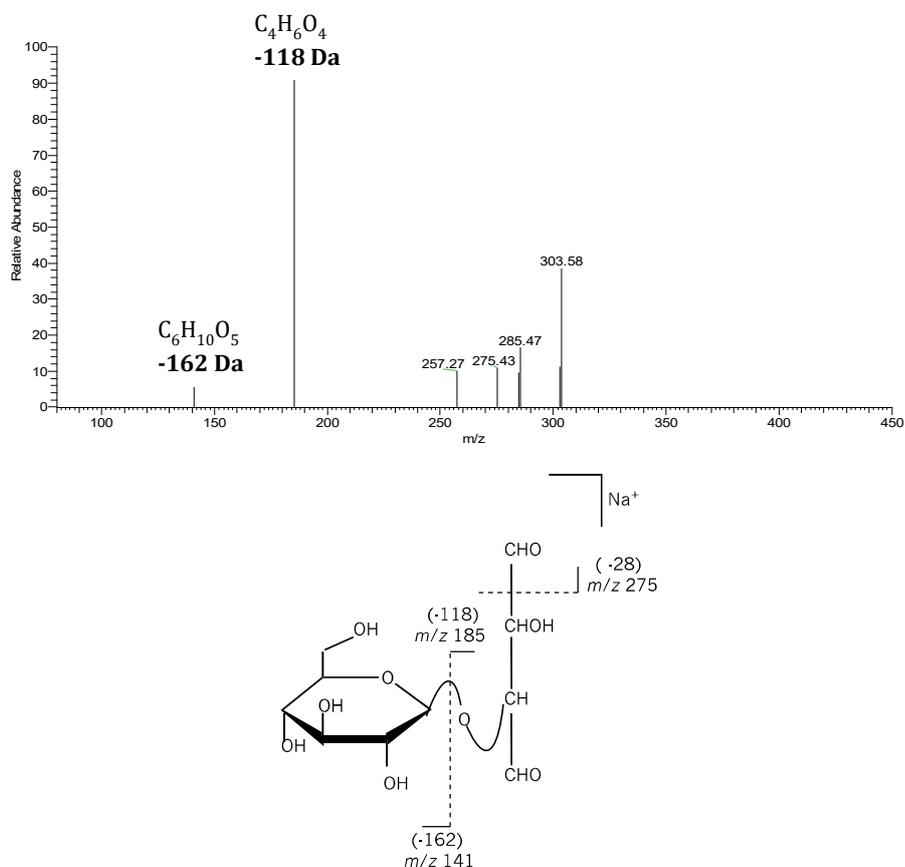


Figura 4.45 – Espetro de MS/MS do ião de m/z 303 e respetiva estrutura proposta.

Analisando o espectro de MS/MS da Figura 4.46 pode-se identificar o pico de m/z 357 correspondente ao ácido celobiônico. Observa-se ainda, os fragmentos de m/z 195 e no espectro MS/MS/MS do ião 161 que podem ser atribuídos ao ácido glucónico e a glucose, respetivamente acompanhada de perda de uma molécula de água (-18 Da).

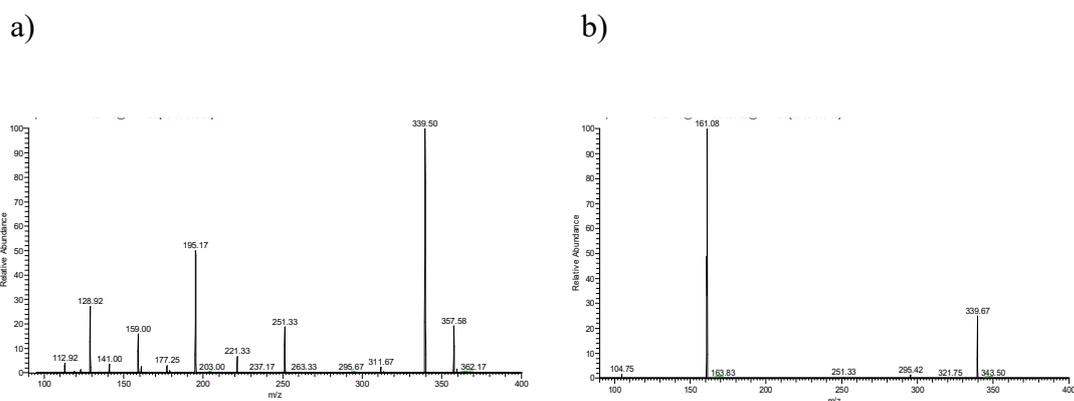


Figura 4.46 – Espectro de a) MS/MS do ião de m/z 357 e b) MS/MS/MS do ião de m/z 339 correspondentes ao ácido celobiônico.

Distribuição dos produtos de reação

Recorrendo-se a equação 4.3 calculou-se a conversão que foi de 70%. Na tabela 4.10 estão indicados os produtos de reação detetados em solução após a eletrólise de celobiose realizada aplicando 0,5 A no elétrodo de DSA.

Tabela 4.10 – Produtos de eletrólise de celobiose no DSA.

Compostos	Percentagem de celobiose transformada (%)
Ácido fórmico	18,2
Ácido oxálico	3,1
Ácido tartrónico	8,9
Ácido 1-oxo, 2-hidroxi propiónico	6,0
2-keto d-glucónico	2,1
Ácido tartárico	6,8
Ácido glucónico	5,8
Ácido glucosil glucurónico	1,1
Ácido celobiónico	11,8
Ácido dicarboxílico de celobiose	2,1
Glucose	4,2

Constata-se que no caso de DSA há uma maior quantidade de ácido fórmico e do ácido celobiónico formados quando comparado com a oxidação no eléctrodo de níquel. Estes resultados reforçam a hipótese de uma oxidação principalmente pelo carbono anomérico.

4.2.2.5. Oxidação da D-maltotriose

O estudo de estabilidade em meio NaOH 0,5 M efetuado, mostrou uma diminuição da área do pico equivalente a 18 % de maltotriose inicial em 5 h. Conforme foi referido, para a maltotriose foram realizadas duas eletrólises, utilizando o mesmo programa de potencial, diferindo apenas no eletrodo do ânodo utilizado. Na Figura 4.47 apresenta-se o voltamograma cíclico registado. Pode observar-se uma sobreposição das respostas voltamétricas obtidas para o sistema em estudo antes da eletrólise e após o fim de eletrólise no eletrodo DSA, aplicando uma intensidade de corrente de 0,5 A.

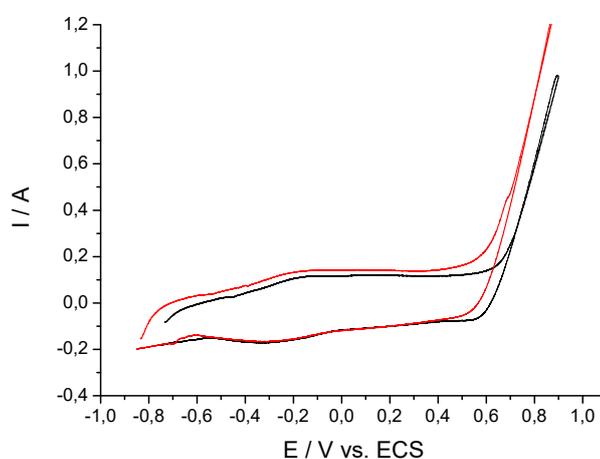


Figura 4.47 – Voltamograma cíclico do eletrodo de DSA, em NaOH 0,5 M, correspondente a eletrólise da maltotriose (0,010 M), traçado à velocidade de varrimento de 50 mV/s (—) do eletrólito de suporte e (—) do início de eletrólise.

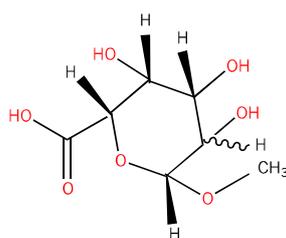
Distribuição dos produtos de reação

Para identificar as espécies resultantes da oxidação da maltotriose recorreu-se à espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida (LC-MS) que é considerada uma técnica analítica adequada a análise de misturas complexas e aplicável a uma grande diversidade. Tal como quando se usou o ânodo de níquel, o ácido fórmico foi também o produto primário da reação da maltotriose (Tabela 4.11).

Tabela 4.11 – Produtos de eletrólise de maltotriose no DSA.

Composto	Percentagem em maltotriose transformado (%)
Ácido fórmico	12,1
Ácido oxálico	5,2
Ácido tartrónico	5,8
2-keto d-glucónico	1,8
Ácido tartárico	2,3
Glucónico	7,9
Ácido glucosil glucurónico	1,0
Glucose	2,9
Ácido maltobiónico	8,7
Ácido maltotriónico	10,8
Glucosil maltobiónico	4,1
Maltose	5,7

Foram também identificados por análise de GC-MS, o ácido metil-glucopiranosidurónico (Figura 4.48) e o ester correspondente.

**Figura 4.48** - Estrutura do ácido metil-glucopiranosidurónico.

Os espectros de massa, no modo de ionização positiva e negativa, estão apresentados na Figura 4.49. Mais uma vez, os principais picos encontrados nos espectros de ESI-MS do produto de eletrólise não se observam no espectro da maltotriose tratado com NaOH 0,5 M (branco).

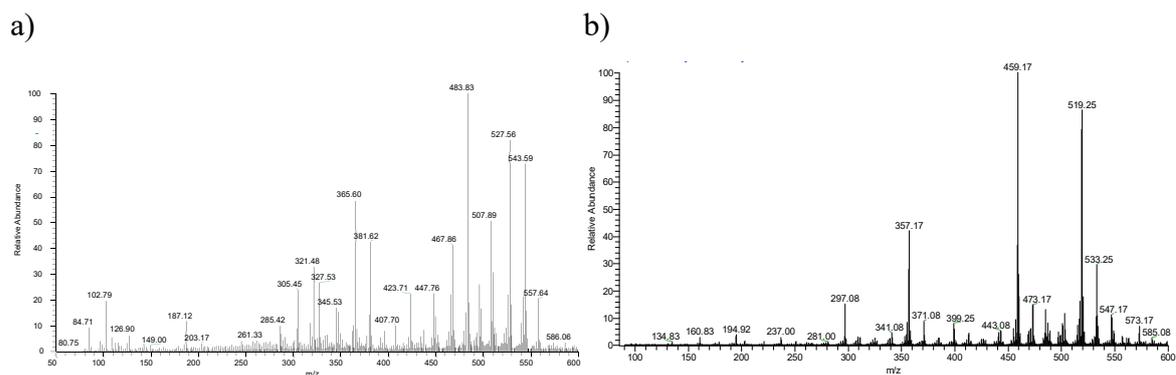


Figura 4.49 - Espectro de ESI-MS da eletrólise de maltotriose no DSA a) no modo ESI(+) e b) no modo ESI(-).

A Figura 4.50 mostra o espectro de MS/MS do ião de m/z 519 correspondente ao ácido maltotriónico.

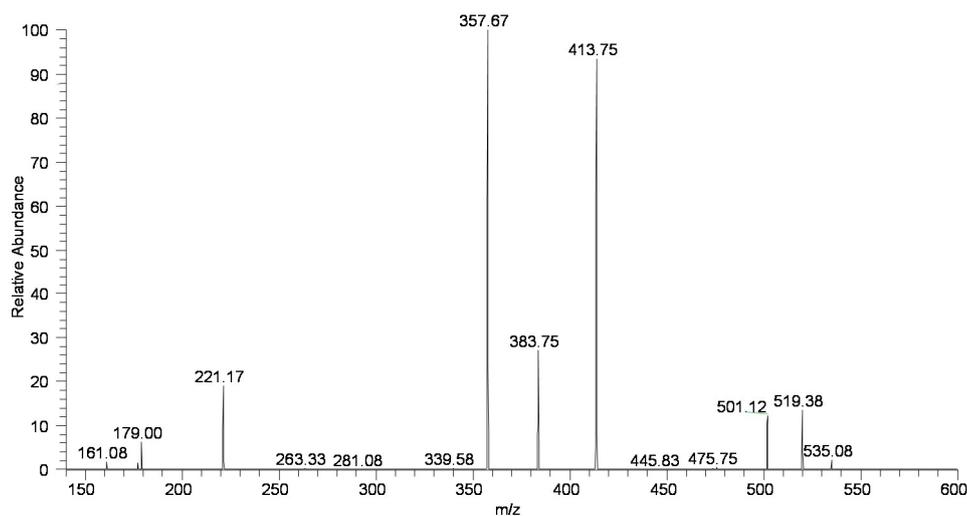


Figura 4.50 – Espectro de MS/MS do ião de m/z 519.

Na Figura 4.51 está apresentado o espectro MS/MS do ião de m/z 357 atribuído ao ácido maltobiónico. A presença do ião de m/z 177 correspondente ao ácido glucónico com perda de uma molécula de água (-18 Da) e confirma também a presença do ácido maltotriónico e do ácido maltobiónico proveniente deste último.

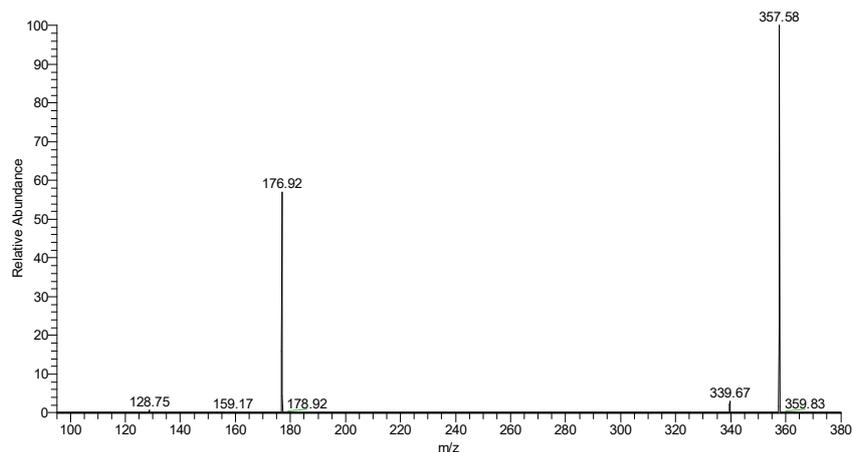


Figura 4.51 – Espectro de MS/MS/MS do íon de m/z 357 correspondente a eletrólise da maltotriose no DSA.

O espectro MS/MS/MS do íon de m/z 413 está apresentado na Figura 4.52. Observa-se a perda de -44 Da, correspondente a eliminação do grupo ácido carboxílico.

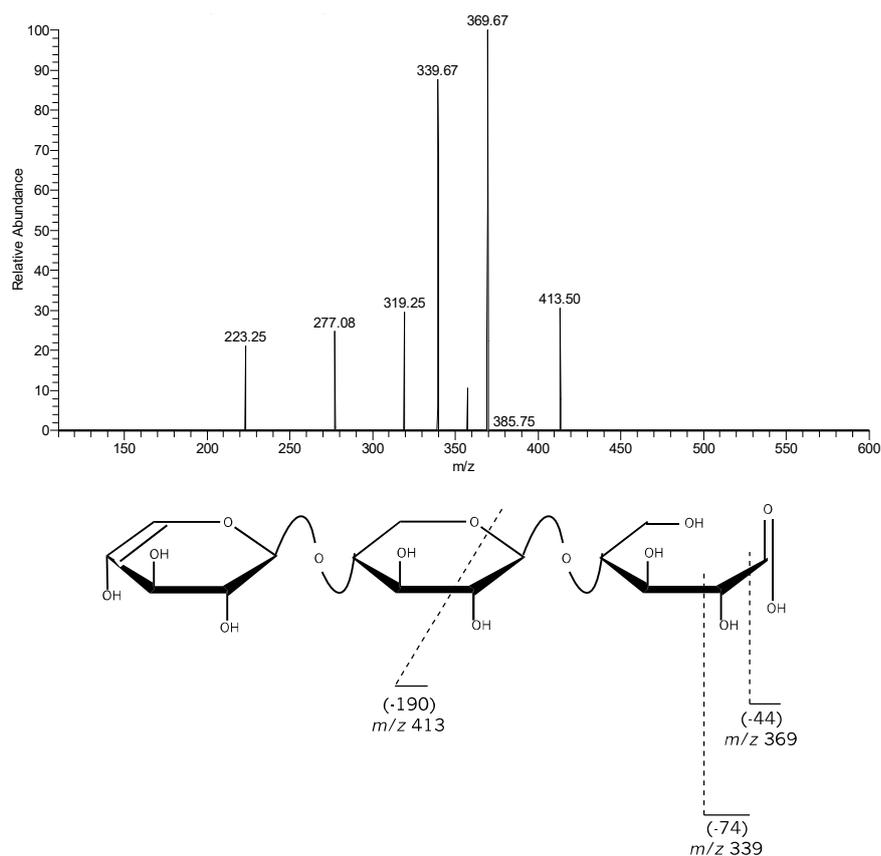


Figura 4.52 – Espectro de MS/MS/MS do íon de m/z 413 e a estrutura proposta.

4.2.3. Oxidação seletiva da D-celobiose em carbono vítreo em meio $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,2 M utilizando o mediador TEMPO

A existência de centros de quiralidade de hidratos de carbono é muitas vezes utilizada como base para a síntese de novos compostos. A transformação seletiva da função primária na molécula do sacarídeo no correspondente ácido proporciona um composto que pode servir como um intermediário útil para inúmeras aplicações. Para alcançar este objetivo foi estudada a oxidação seletiva de compostos modelos utilizando o 2,6,6-tetrametil-piperidin-1-oxoamónio (TEMPO). Existem vários trabalhos sobre a oxidação de álcoois primários utilizando o mediador TEMPO associada aos reagentes redox [6,7]. A regeneração eletroquímica da forma oxidada do mediador abriu recentemente novos horizontes nesta área. O uso da eletricidade permite evitar o uso de reagentes químicos perigosos e tóxicos e facilita a purificação dos produtos. Outra vantagem é a possibilidade de recuperação do TEMPO depois da eletrólise através da extração com o diclorometano permitindo deste modo a sua reutilização. A regeneração eletroquímica do ião oxoamónio (forma ativa), apresentada na Figura 4.53 foi realizada utilizando um elétrodo de carbono vítreo em meio alcalino.

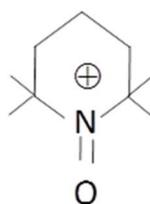


Figura 4.53 – Forma oxidada do radical TEMPO [8].

O método mais comumente utilizado na oxidação dos grupo OH com o TEMPO encontra-se esquematizado na Figura 4.54.

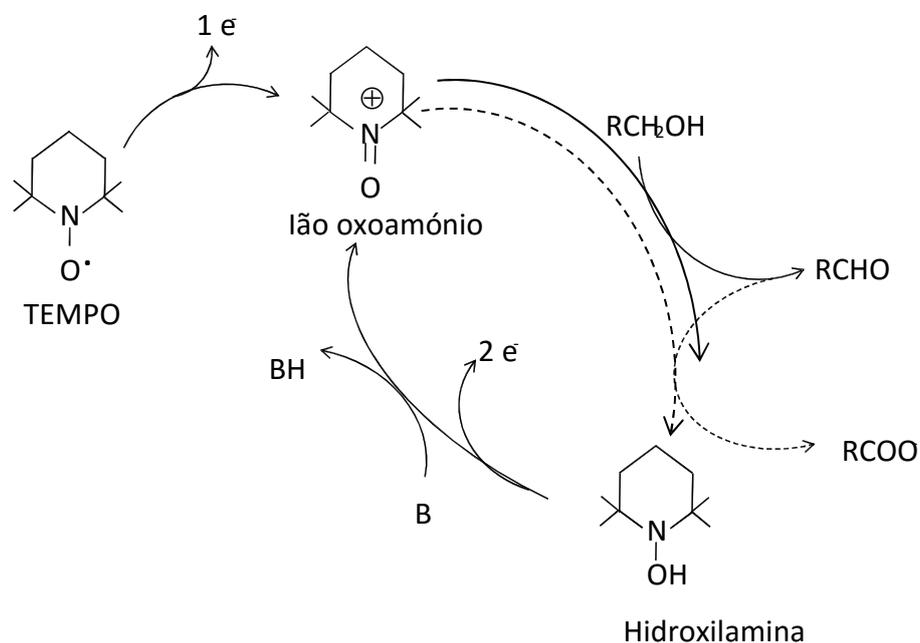


Figura 4.54 – Oxidação dos grupos OH primários e aldeído com TEMPO [9].

Na Figura 4.55 estão apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação da celobiose no TEMPO (5 mM), na ausência da espécie eletroativa, no início e no fim da eletrólise no eletrodo de carbono vítreo em tampão carbonato. Na ausência da celobiose obtém-se um voltamograma típico de um sistema reversível, observando-se um pico anódico relativo à oxidação reversível do TEMPO ao correspondente íon oxoamônio ($TEMPO^+$) e no varrimento catódico um pico correspondente à redução do íon $TEMPO^+$ na sua forma hidroxilamina. Na presença da celobiose há diferenças significativas no voltamograma obtido observando-se o desaparecimento do pico catódico e um aumento significativo da densidade de corrente anódica indicativo de um processo de oxidação catalítico.

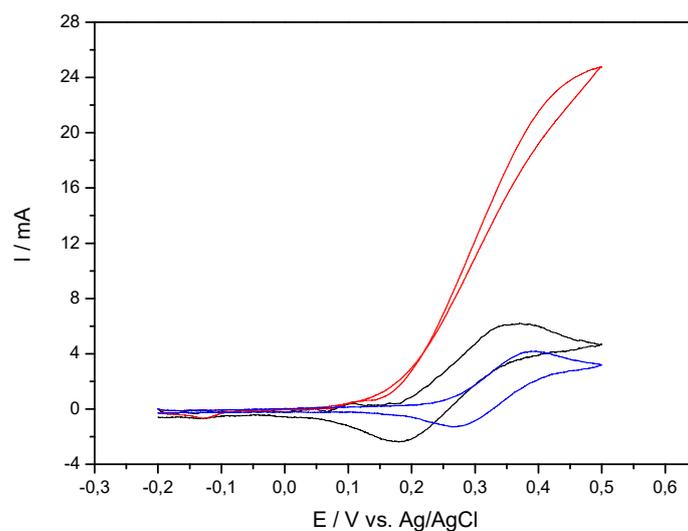


Figura 4.55 – Voltamogramas cíclicos num eléctrodo de carbono vítreo, em meio $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,2 M, correspondentes à eletrólise da celobiose, traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} (—) eletrólito de suporte; (—) início e (—) fim da eletrólise.

A representação gráfica de intensidade de corrente e da quantidade de eletricidade em função do tempo, para a eletrólise de celobiose (0,01 M), está apresentada na Figura 4.56. A intensidade de corrente inicial de 18 mA, diminui ao longo da eletrólise, atingindo valores próximo de zero. O que indica que a espécie eletroativa foi oxidada durante a eletrólise quase na totalidade, em contraste com o verificado para a quantidade de eletricidade, cujo valor aumenta gradualmente, atingindo no fim da eletrólise uma quantidade de 120 coulombs. Este valor, ultrapassa ligeiramente a quantidade teórica de eletricidade necessária para transformar todos os grupos de álcool primário em ácido carboxílico.

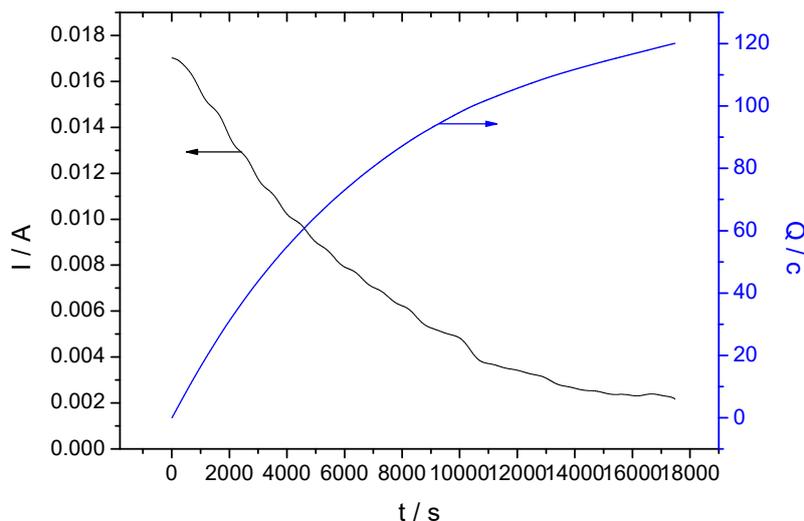


Figura 4.56 – Representação gráfica da intensidade de corrente e da quantidade de corrente em função do tempo para a eletrólise de celobiose com TEMPO em meio $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,2 M.

Após tratamento, a solução eletrolisada foi analisada por ESI-MS e HPLC-MS. A análise foi efetuada utilizando a ionização negativa e positiva. Nas Figuras 4.57 a 4.60 estão apresentados os espectros de massa obtidos.

Analisando o espectro de massa obtido por ionização positiva da Figura 4.57, verifica-se que o íon com maior intensidade é o que apresenta uma razão m/z de 409. Este íon é atribuído ao ácido tricarboxílico da celobiose que resulta da oxidação dos carbonos C1, C6 e C6' da molécula de celobiose. No espectro da Figura 4.59 obtido por ionização negativa, verifica-se que o íon de maior intensidade apresenta uma razão m/z 385 que corresponde ao ácido tricarboxílico de celobiose. O íon com m/z 209 corresponde provavelmente a $[\text{M}-\text{H}]^-$ do ácido glucárico. Verifica-se também o pico de m/z 179 que corresponde à molécula de glucose. Na solução existe alguma celobiose que não foi oxidada, cuja presença é confirmada pelo íon com m/z 365 na ionização positiva. Estes resultados indicam que a celobiose em presença do mediador TEMPO^+ foi oxidada, obtendo-se como produto maioritário o ácido tricarboxílico de celobiose.

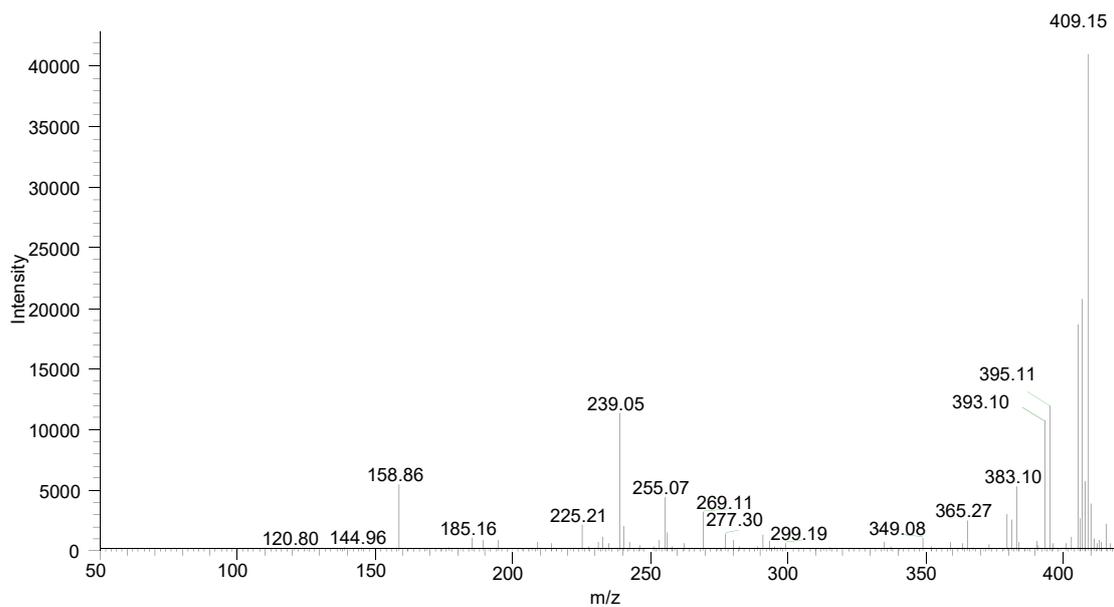


Figura 4.57 - Espectro ESI (+)-MS dos produtos de oxidação da celbiose utilizando o mediador TEMPO.

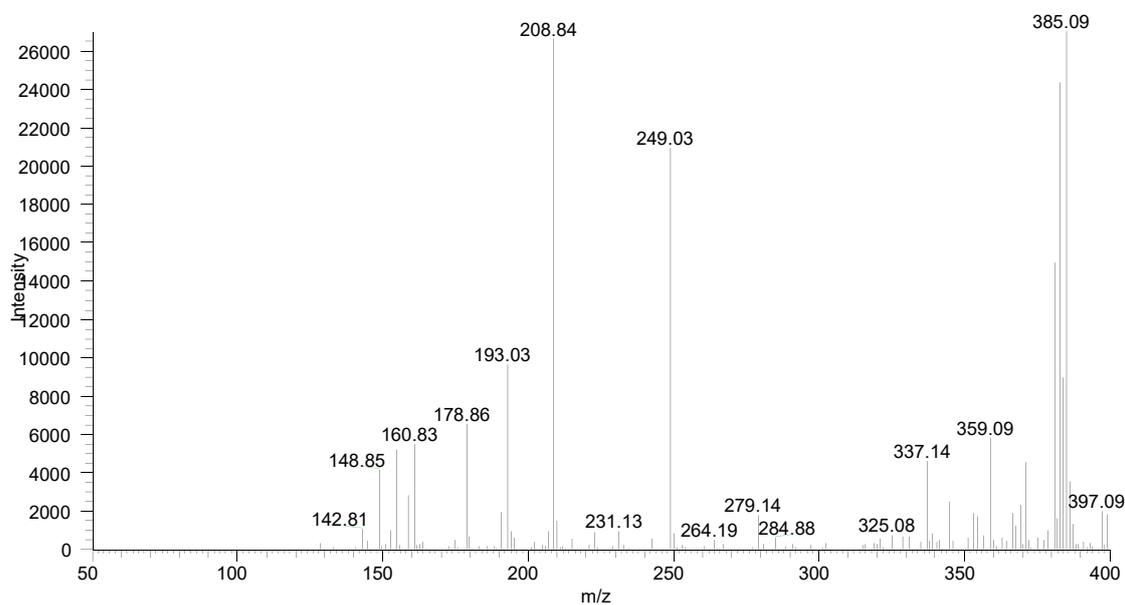


Figura 4.58 - Espectro ESI (-)-MS dos produtos de oxidação da celbiose utilizando o mediador TEMPO.

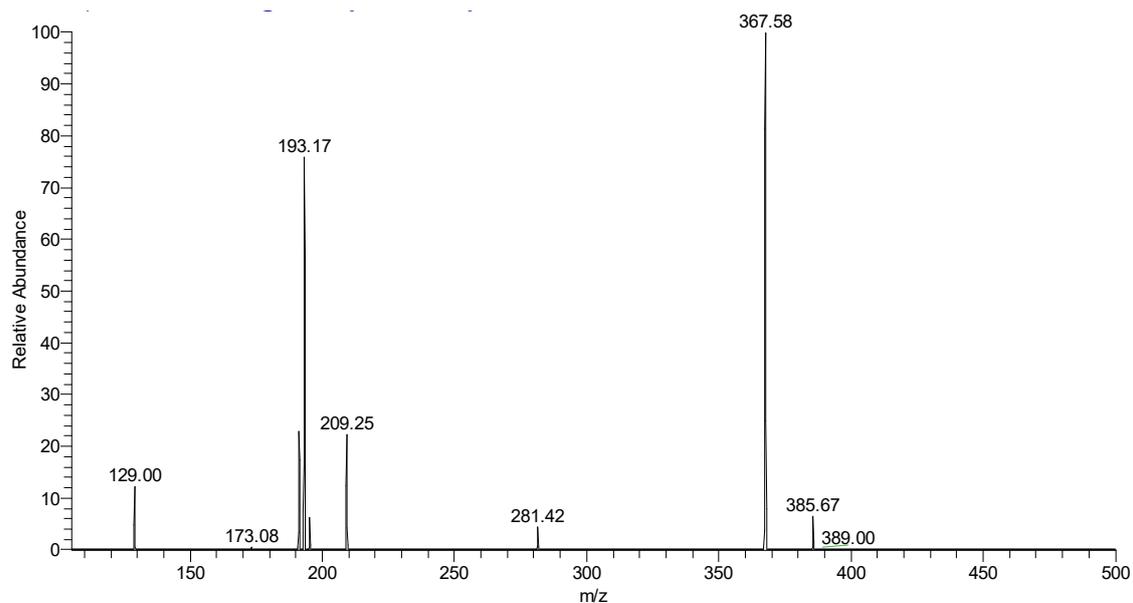


Figura 4.59 – Espectro de ESI-MS/MS do íon de m/z 385.

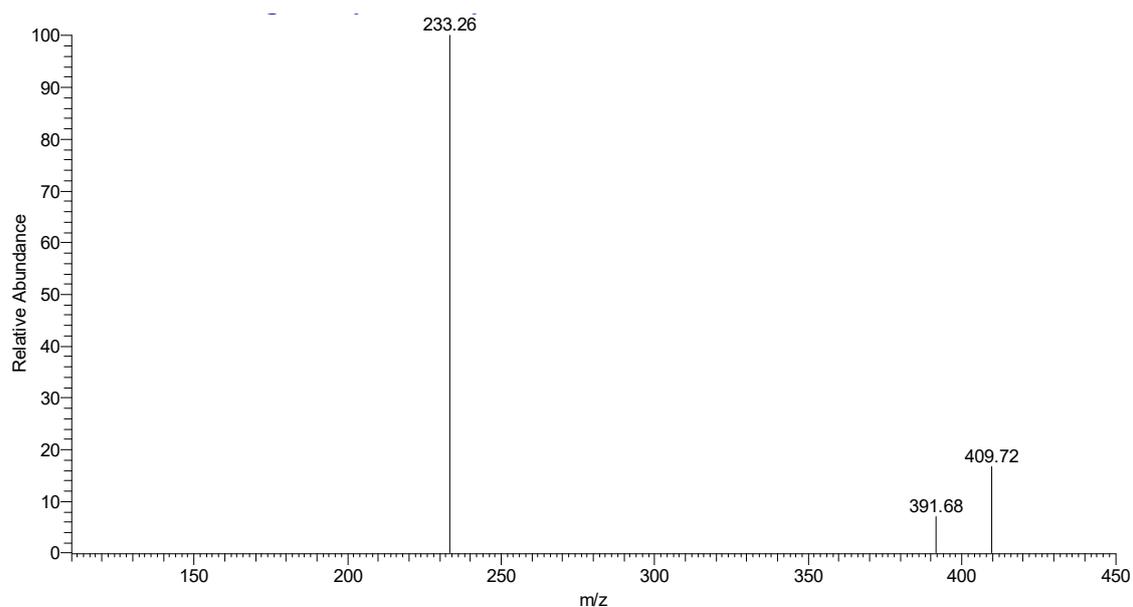


Figura 4.60 – Espectro de ESI-MS/MS do íon de m/z 409.

Estes espectros MS/MS confirmaram a formação de cetonas a partir dos álcoois secundários. Foram também observados alguns produtos de degradação como os ácidos glucurónico (m/z 193) e tartárico (m/z 149) que sugerem a possibilidade de clivagem das ligações C-C.

4.2.4. Conclusões

Com base nos estudos das eletrólises de D–celobiose, D-maltose e D-maltotriose no eletrodo de níquel com eletrólito de suporte de NaOH 0,5 M, com aplicação de uma intensidade de corrente 0,5 A, conclui-se que ocorre uma conversão do substrato na ordem de 65-70%. Os produtos de reação foram identificados por HPLC, IC, GC-MS e HPLC-MS. De entre os produtos quantificados por HPLC-UV, correspondentes a aproximadamente 60-65% do sacarídeo transformado, os ácidos de baixo peso molecular como o ácido oxálico e fórmico apresentam uma percentagem importante indicando assim, a facilidade das clivagens das ligações C-C. Os resultados mostraram que o Ni parece iniciar uma oxidação dos grupos OH vicinais (presença de uma quantidade elevada de ácido oxálico) e dos grupos álcool primário, pois a quantidade do ácido urónico parece ser superior ao ácido correspondente à oxidação do carbono do aldeído livre (C1).

Os voltamogramas obtidos no final das experiências evidenciam um decréscimo da corrente, prova da ocorrência da oxidação do álcool primário. Com efeito, no decorrer das eletrólises a concentração inicial do substrato em solução diminui e, simultaneamente há formação de outras espécies eletroativas resultantes do processo de oxidação.

Efetuuou-se também estudos das eletrólises de D–glucose (conversão de 65%), D-galactose (conversão de 52%), D-celobiose (conversão de 70 %) e D-maltotriose no eletrodo de DSA com eletrólito de suporte de NaOH 0,5 M, aplicando uma intensidade de corrente de 0,5 A com exceção da eletrólise de galactose que foi efetuada a potencial controlado (2 V vs. ECS). Para a glucose foram efetuadas duas eletrólises, uma a 0,5 A e outra a 0,8 V.

Para as eletrólises efetuadas a 0,5 A e considerando o número de produtos quantificados utilizando os padrões, foi determinado o ácido fórmico como produto principal da eletrólise. A eletrólise de glucose efetuada a potencial controlado apresenta o ácido glucónico, como produto principal de eletrólise. De igual modo, os voltamogramas obtidos no final das experiências evidenciam um decréscimo da corrente, prova da ocorrência da oxidação do açúcar inicial.

Relativamente à eletrólise da galactose em meio ácido, utilizando um potencial de 2 V, podemos verificar que o ácido galactónico é o principal produto de reação apesar de apresentar uma percentagem relativamente baixa. Verifica-se ainda que a conversão de galactose foi de 52 %, mas com uma seletividade inferior em relação às restantes eletrólises. O voltamograma obtido após o fim da experiência confirmou que no fim da

eletrólise a intensidade de corrente é inferior a que foi observada no início como nos casos anteriores.

Os resultados mostram que o eletrodo de DSA, ao contrário do eletrodo de níquel, permite uma oxidação sobretudo do grupo aldeído livre. Estes resultados podem ser explicados por uma aproximação planar da molécula no caso do eletrodo de níquel.

Observa-se ainda, mais ácido oxálico nos produtos de oxidação no eletrodo de níquel do que no eletrodo de DSA. O aumento no número de unidades de glucose anidro aumenta ligeiramente a proporção ácido oxálico/ácido fórmico nos produtos de oxidação quantificados.

A celobiose foi igualmente oxidada no eletrodo de carbono vítreo em meio $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,2 M, utilizando o mediador TEMPO. O produto principal da eletrólise é o ácido tricarbóxico de celobiose embora, alguma oxidação dos grupos álcool secundário também foi observada. Obtiveram-se alguns produtos de degradação, como o ácido glucónico e tartárico que sugerem a possibilidade de clivagem das ligações C-C. Observa-se, de acordo com o previsto, um decréscimo da intensidade de corrente ao longo das 5 horas de experiência e o correspondente aumento da quantidade de eletricidade.

A complexidade de oxidação na célula de fluxo FM01-LC utilizando o eletrodo de Ni e DSA está patente na quantidade significativa de produtos de clivagem. Isto mostra que nestes casos a seletividade é baixa pois, a quantidade de ácido oxálico detetada mostra que o processo de oxidação em NiOOH resulta em clivagem das ligações C-C.

4.3. Oxidação dos compostos poliméricos da biomassa disponível em larga escala

4.3.1. Oxidação eletroquímica no eletrodo de níquel na célula FM01-LC

4.3.1.1. Oxidação do amido

Foram utilizados para este estudo dois produtos comerciais: amido da batata da marca Fluka e amido puríssimo da marca Sigma-Aldrich. A quantidade total de açúcares redutores com massas moleculares inferior a 2000 Da foi determinada utilizando-se a análise de ESI-MS após filtração da solução de amido (2 g/L) preparada. A percentagem calculada foi inferior a 0,4 % (m/m).

A Figura 4.61 mostra os voltamogramas do eletrólito de suporte, da solução de amido antes e depois da eletrólise. O voltamograma obtido após fim da experiência evidencia um decréscimo da intensidade de corrente. Este resultado confirma a oxidação do amido.

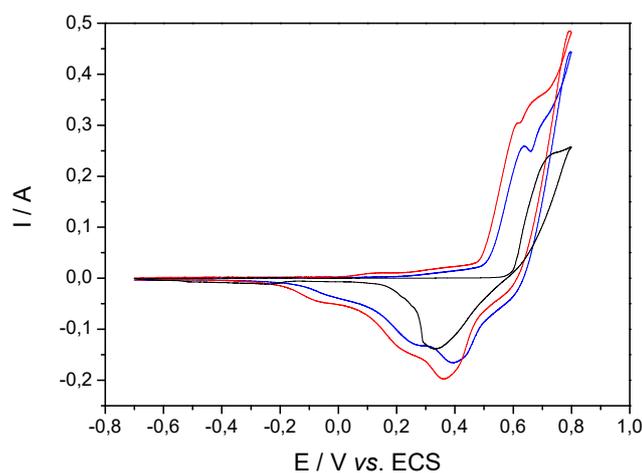


Figura 4.61 – Voltamogramas cíclicos num eletrodo de níquel, em meio NaOH 0,5 M, correspondentes à eletrólise do amido, traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} . (—) eletrólito de suporte; (—) início e (—) fim da eletrólise.

A Figura 4.62 apresenta os espectro de FTIR para o amido primário e para o amido eletrolisado.

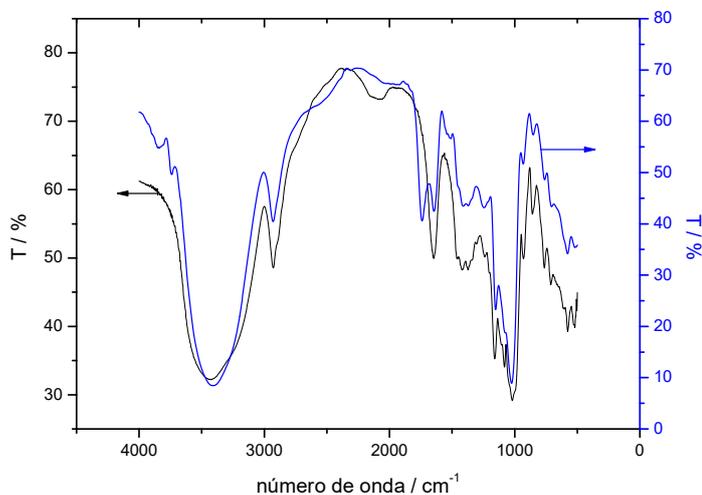


Figura 4.62 – Espectros de infravermelho do amido primário (—) e do amido eletrolisado (—).

Em ambos os espectros foi detetada uma banda intensa e larga, na região de 3200-3600 cm^{-1} , devido a distensão das ligações O-H. Não se observa uma diferença significativa entre os dois espectros para as bandas de absorção entre 960 e 1160 cm^{-1} correspondentes ao alongamento de C-O dos álcoois e éteres. Assim, estes resultados sugerem que não houve uma clivagem significativa das ligações glicosídicas. O outro aspeto a realçar da Figura 4.62 tem a ver com a banda de distensão C=O a 1738 cm^{-1} que é consistente com a estrutura de um ácido carboxílico. Esta conclusão é reforçada pela presença de uma banda larga de absorção entre 2300-2700 cm^{-1} e uma outra banda de fraca intensidade entre 1160-1300 cm^{-1} [10].

Entretanto, fez-se circular na célula de fluxo e nas mesmas condições que as da eletrólise, uma solução de amido sem aplicação da intensidade de corrente. Esta solução será designada como solução do branco e foi neutralizada, liofilizada e caracterizada por espectroscopia de FTIR. Os espectros do branco e do amido primário são apresentados na Figura 4.63. À semelhança do sucedido para a solução eletrolisada, como seria de esperar, em ambos os espectros é observado uma banda intensa e larga, na região de 3200-3600 cm^{-1} , que corresponde claramente à distensão das ligações O-H. Entretanto, como apenas fez-se circular a solução sem aplicarmos nenhum potencial ou corrente, nota-se para o caso do branco a

ausência da banda de distensão C=O a cerca de 1738 cm^{-1} consistente da estrutura dos ácidos carboxílicos.

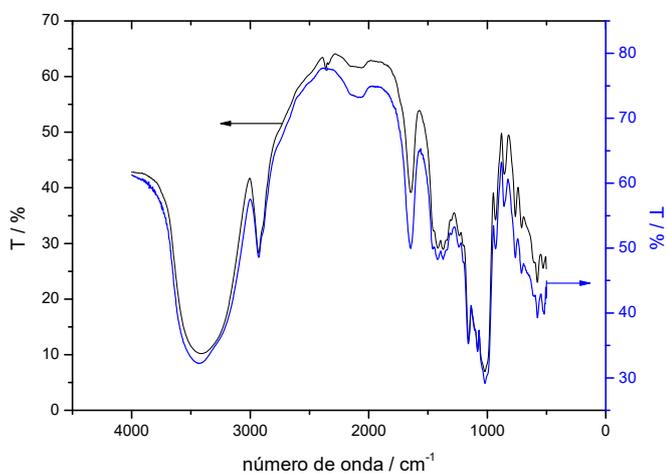


Figura 4.63 – Espectros de infravermelho do (—) branco e (—) do amido primário.

Foi traçada uma curva de calibração para FTIR utilizando padrões preparados com diferentes percentagens do ácido latobioníco comercial em KBr. A representação gráfica da curva de calibração dos resultados de FTIR obtidos está apresentada na Figura 4.64. A concentração dos grupos de ácido carboxílicos na amostra correspondente ao produto de eletrólise foi determinada utilizando a equação da reta. Esta concentração expressa em percentagem dos grupos glucosilos oxidados foi de 38 %.

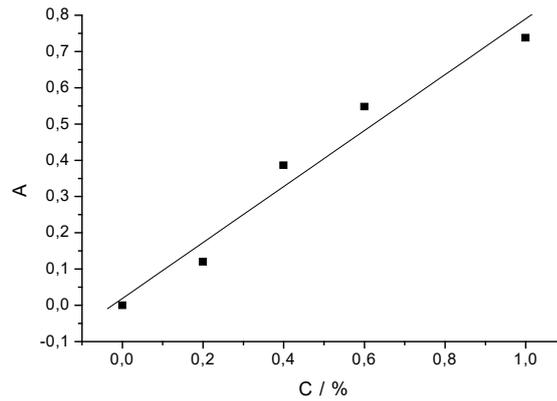
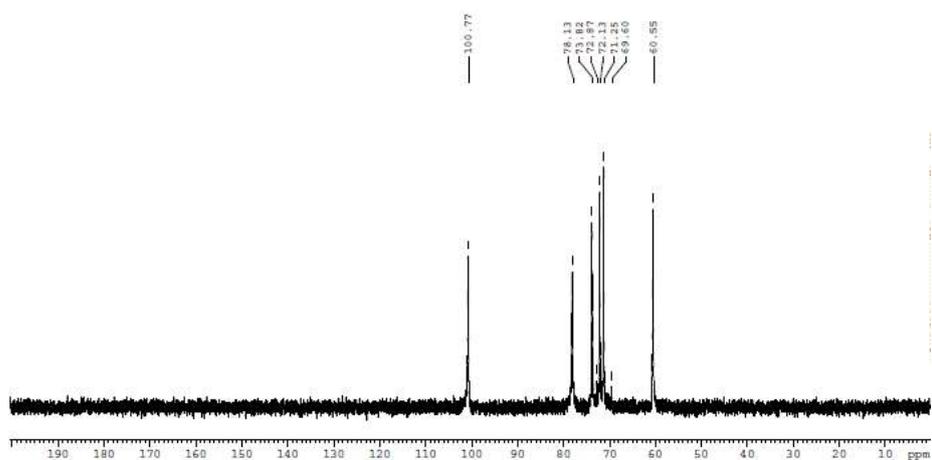


Figura 4.64 – Curva de calibração do ácido latobiônico obtido por FTIR.

As amostras do amido primário (que foram usadas como referência) e do amido eletrolisado, foram também caracterizadas pelo método espectroscópico de ^{13}C -RMN e os respectivos espectros são apresentados na Figura 4.65 a e b.

a)



b)

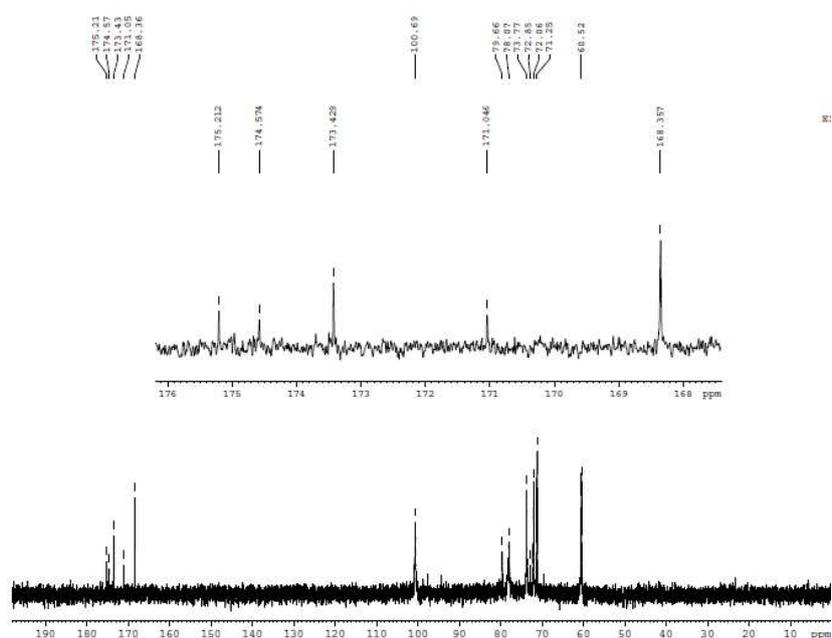


Figura 4.65 – Espectros ^{13}C -RMN em D_2O (+ NaOD) do a) amido primário e do b) amido eletrolisado com a intensidade de corrente de 0,5 A.

O espectro correspondente aos produtos de eletrólise mostra sinais com desvios químicos entre 168 e 175 ppm que podem ser atribuídos aos ácidos carboxílicos e ésteres. De acordo com a Figura 4.65 podemos constatar uma diminuição nos sinais com desvios químicos de 100,7; 78,1 e 72,1 ppm que podem ser atribuídos aos átomos de carbono de C1, C4 e C2, respetivamente [11]. Estes resultados, estão de acordo com a sugestão apresentada anteriormente que envolve a oxidação dos grupos álcool secundário.

No espectro ^{13}C -RMN do branco apresentado na Figura 4.66. Constata-se, neste caso a ausência de sinais na região dos ácidos carboxílicos e ésteres.

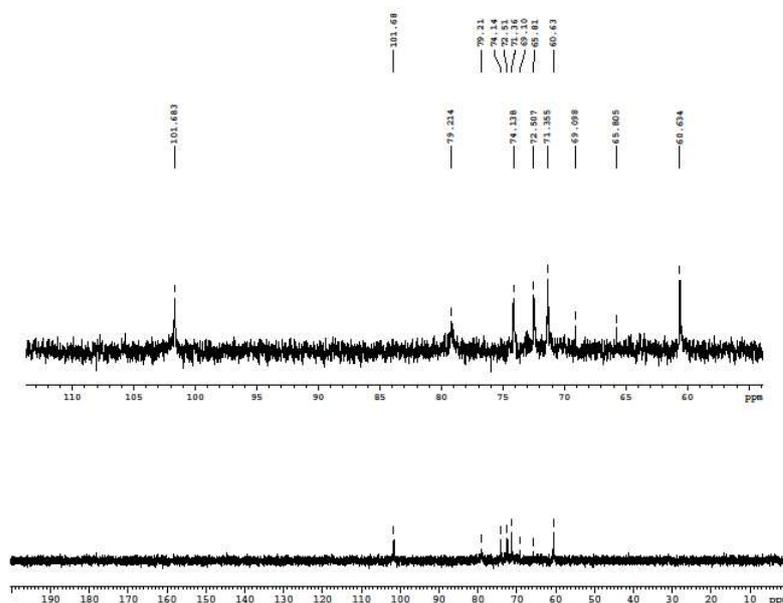


Figura 4.66 – Espectro ^{13}C -RMN em D_2O (+ NaOD) do branco.

Na Figura 4.67 apresenta-se a curva da titulação ácido/base. A partir das curvas das derivadas foi determinado o volume necessário para atingir-se o ponto de equivalência. O número de moles total dos grupos ácidos foi determinado através do número de moles de NaOH gastos na titulação. Este número corresponde a 30 % dos glicósidos disponíveis. Foi também titulado o amido não transformado com o objetivo de corrigir o volume gasto na titulação da amostra da eletrólise.

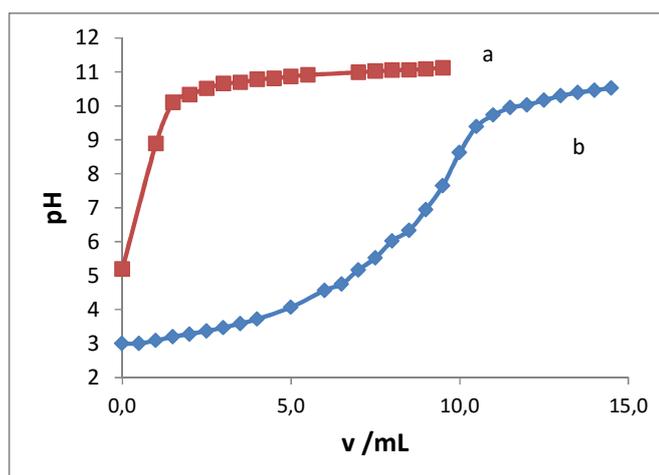


Figura 4.67 - Curva da titulação ácido/base. a) do amido primário e b) do amido eletrolisado.

Foi também efetuada uma eletrólise do amido aplicando uma intensidade de corrente de 2 A para estudar o efeito da intensidade de corrente sobre o grau de oxidação do amido. O espectro FTIR do liofilizado desta eletrólise sobreposto ao espectro relativo à oxidação com uma intensidade de corrente de 0,5 A e correspondente ao mesmo tempo de eletrólise apresenta-se na Figura 4.68. Analisando a Figura 4.68, pode-se concluir que um aumento de intensidade de corrente causa um aumento do pico a 1738 cm^{-1} atribuído ao grupo do ácido carboxílico.

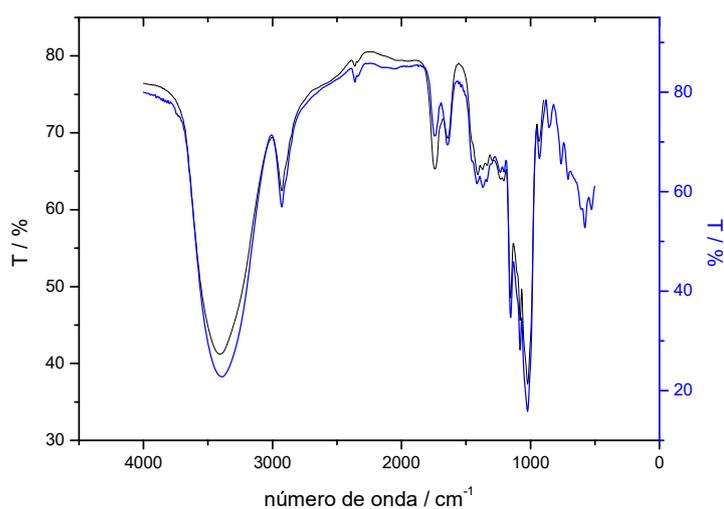


Figura 4.68 – Espectros de infravermelho do (—) amido eletrolisado a 0,5 A e (—) do amido eletrolisado a 2 A.

A análise ^{13}C -RMN dos produtos de oxidação com aplicação de uma intensidade de corrente de 2 A (Figura 4.69) reforça a hipótese de uma oxidação mais exaustiva neste caso. Nota-se também para este caso um maior número de sinais no espectro de ^{13}C -RMN, quer seja na região dos grupos ácidos carboxílicos quer na região dos álcoois.

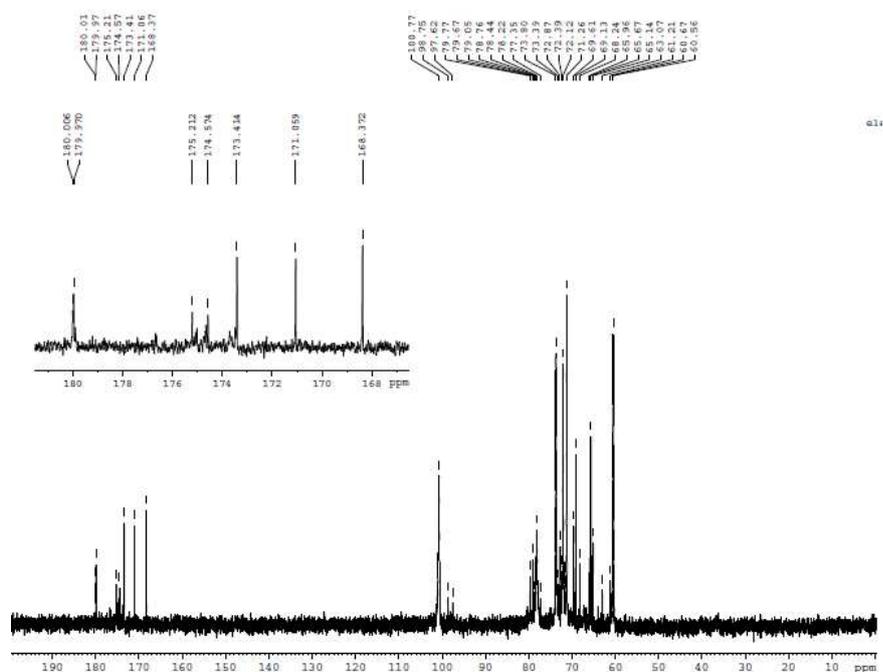


Figura 4.69 - Espectro ^{13}C -RMN em D_2O com NaOD dos produtos de oxidação do amido no elétrodo de níquel com a aplicação de uma intensidade de corrente de 2 A.

Em relação aos sinais relativos à região com desvios químicos superiores a 160 ppm, pode-se observar um pico a 180 ppm que pode neste caso corresponder a um grupo carbonilo adjacente às ligações insaturadas. O aparecimento de sinais na região dos álcoois primários leva-nos a sugerir a formação de novos grupos de álcool primário em simultâneo com a formação de um grupo ácido carboxílico na posição alfa, a partir de uma reação de Canizzaro interna que pode ocorrer após a formação de dialdeídos vicinais. O aparecimento de sinais com desvios químicos ligeiramente superiores ao sinal correspondente ao C4 é ligeiramente inferior ao que é atribuído ao C1 e está em concordância com esta sugestão [11,12].

O aparecimento de sinais entre 4,4 e 4,6 ppm no espectro ^{13}C -RMN (Figura 4.70) correspondente aos produtos de oxidação reforça também a hipótese de uma oxidação nos grupos álcool secundário [11].

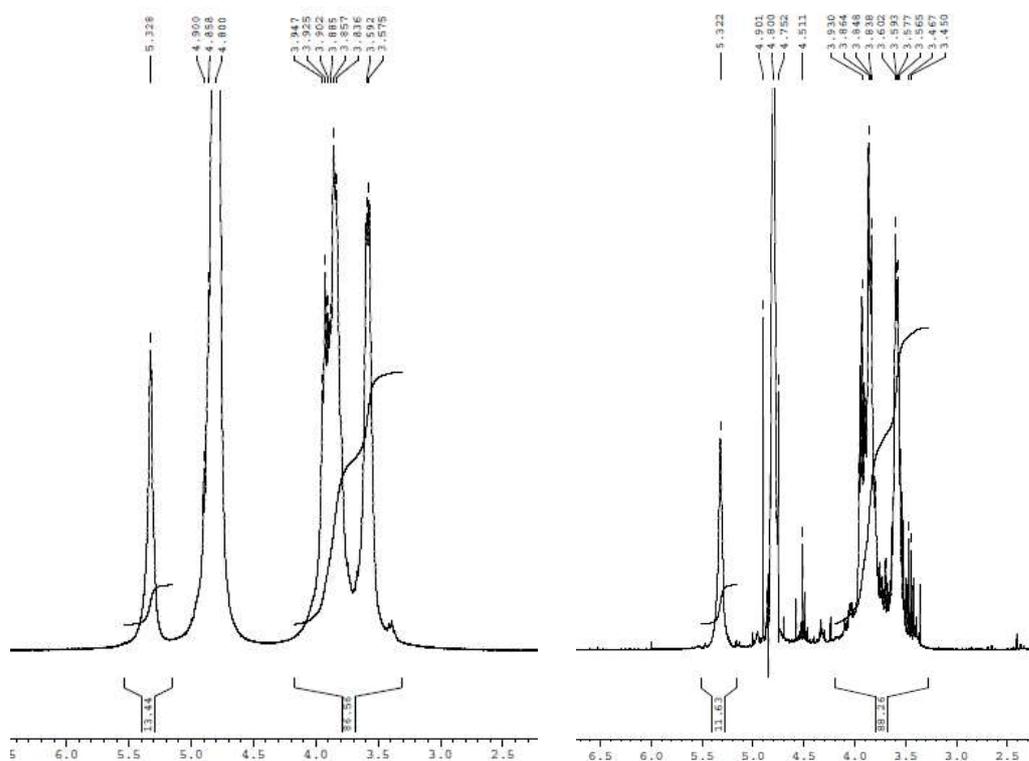


Figura 4.70 - Espectro ^{13}C -RMN em $\text{D}_2\text{O} + \text{NaOD}$, a) do amido primário e b) do amido electrolisado.

- **Teste de iodo**

Um teste importante para detetar a presença do amido na solução eletrolisada é a adição do iodo, I_2 , castanho, o qual resulta uma cor azul escura intensa na presença do amido. Na Tabela 4.12 apresenta-se os resultados do teste de iodo para amostras da eletrólise do amido tiradas em vários intervalos de tempo ao longa da eletrólise e amostras do branco após 5 horas de circulação. Verifica-se no caso da solução eletrolisada, que à medida que a eletrólise avança no tempo, a concentração inicial do amido diminui. Notou-se também como era de se esperar, no caso do branco a concentração no fim não se alterou. A partir do valor obtido para o declive da reta, apresentada na Figura 4.71, pode-se calcular o valor da concentração final (C1) do amido.

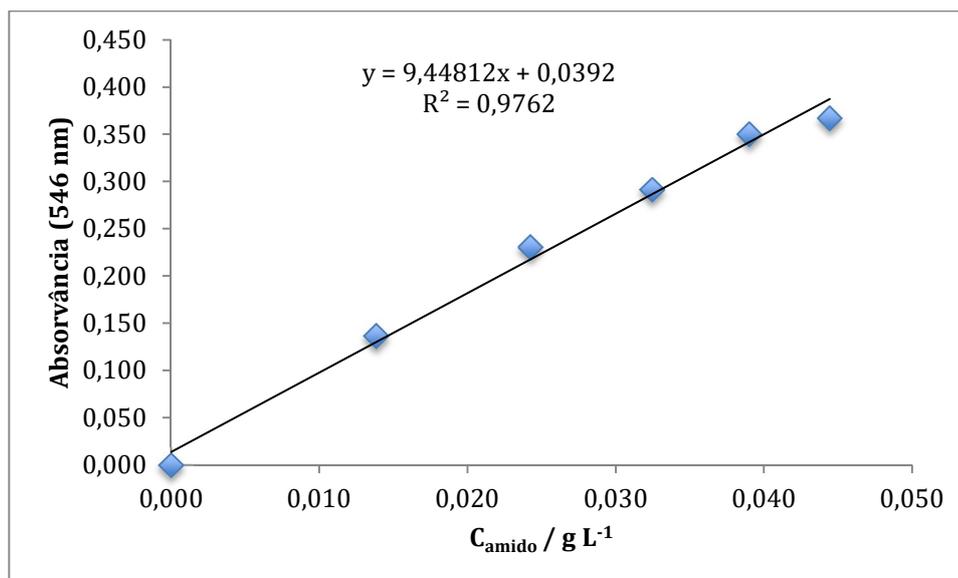


Figura 4.71 – Representação gráfica da absorvância em função da concentração do amido.

Tabela 4.12 - Resultados do teste de iodo para a eletrólise do amido.

Amostras (horas)	Volume iodo (mL)	Volume amido/NaOH 0,5 M (μL)	Absorvância (546 nm)					Média Abs.	Concentração (C1)	Vt (mL)	$C_f = \frac{C_1 \times V_t}{2,4}$	$C_f = C_2 \times 20^*$
t0	5	2400	0,391	0,390	0,389	0,390	0,390	0,037	7,4	0,114	2,28	
t3	5	2400	0,172	0,311	0,309	0,309	0,309	0,028	7,4	0,088	1,76	
t5	5	2400	0,294	0,293	0,293	0,293	0,293	0,027	7,4	0,082	1,65	
FIM	5	2400	0,278	0,278	0,277	0,277	0,278	0,025	7,4	0,077	1,55	
Neutralizado	5	2400	0,244	0,243	0,244	0,244	0,244	0,021	7,4	0,066	1,33	

A tonalidade azul que se verificou com a adição do iodo nas amostras de eletrólise acontece porque o iodo se aloja no interior das hélices do amido. Todos os tubos apresentaram um resultado positivo para o amido, pois apresentavam uma coloração azul. Com efeito, da Tabela 4.12, verifica-se que no decorrer da eletrólise a concentração do amido diminui. No fim da eletrólise a concentração do amido foi de 1,5 g/L que corresponde a uma oxidação de 32 % em relação ao valor inicial. Este resultado demonstra de uma forma clara a diminuição da concentração do amido devido ao efeito oxidativo da eletrólise pois, verificou-se que para o caso do branco o valor da absorvância no início e no fim da eletrólise foi praticamente o mesmo.

- **Microscopia eletrônica de varrimento**

Para a análise morfológica da forma e tamanho do amido oxidado e do branco, recorreu-se à microscopia eletrônica de varrimento (SEM). A microscopia é uma das ferramentas importantes na caracterização de propriedades texturais. A Figura 4.72 mostra as microfotografias obtidas do amido. As imagens da Figura 4.74 a), b) e c) estão com um aumento de 500x e as a'), b') e c') com aumento de 5000x, respectivamente.

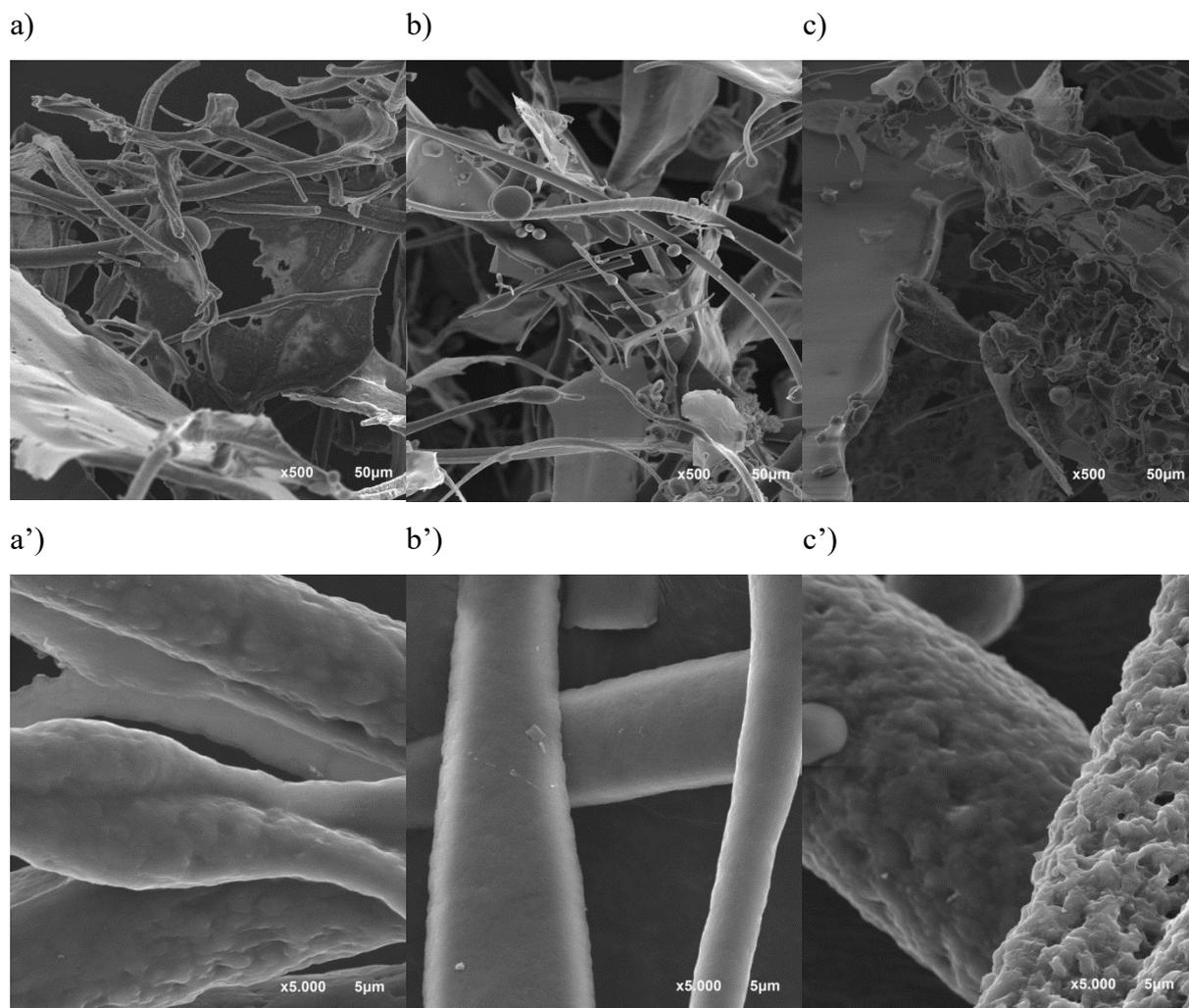


Figura 4.72 – Microscopia eletrônica do a) branco; b) amido eletrolisado a 0,5 A e c) amido eletrolisado a 2 A com diferentes ampliações 500x e 5000x.

Os resultados obtidos, mostraram diferentes propriedades texturais para o amido oxidado e para o amido submetido ao tratamento com NaOH sem etapa da oxidação. A imagem correspondente ao amido oxidado com uma intensidade de corrente de 0,5 A apresenta uma estrutura fibrosa mais fina. Por sua vez o amido eletrolisado aplicando uma intensidade de corrente de 2 A mostra uma maior porosidade e maior efeito de desgaste. Este último ponto pode ser provavelmente devido à maior quantidade de oxigênio produzido neste caso durante a eletrólise.

A análise elementar mostrou uma diminuição nas percentagens de carbono e do hidrogênio em 7,0 e 2,8 %, respetivamente. Esta variação corresponde a um aumento de oxigênio na ordem de 5,5 %, o que equivale a uma oxidação com adição de um átomo de oxigênio em 30 % dos glucosilos anidros existentes no amido inicial.

Por outro lado, a confirmação da ausência de ácidos de baixo peso molecular ($MM \leq 2000$ Da), foi obtida com ESI(-)-MS após a dissolução/suspensão do produto liofilizado em água. O único produto de baixo peso molecular detetado e quantificado na IC foi o ácido oxálico com uma percentagem inferior a 5 % em equivalente dos grupos glucósilos inicialmente disponíveis.

4.3.1.2. Oxidação do amido puríssimo (Sigma- Aldrich)

O amido puríssimo utilizado tem como indicação do fabricante uma quantidade de açúcares redutores inferior a 0,7 % em maltose. A ausência de açúcares redutores ($MM \leq 2000$ Da) foi também confirmada recorrendo-se ao ESI-MS depois da filtração da solução do amido preparada e a quantidade total de açúcares redutores foi inferior a 0,5%.

A oxidação eletroquímica do amido puríssimo foi efectuada em meio alcalino, aplicando uma intensidade de corrente de 2 A. Os voltamogramas do eléctrodo de níquel registados no início e no fim de eletrólise estão apresentados na Figura 4.73.

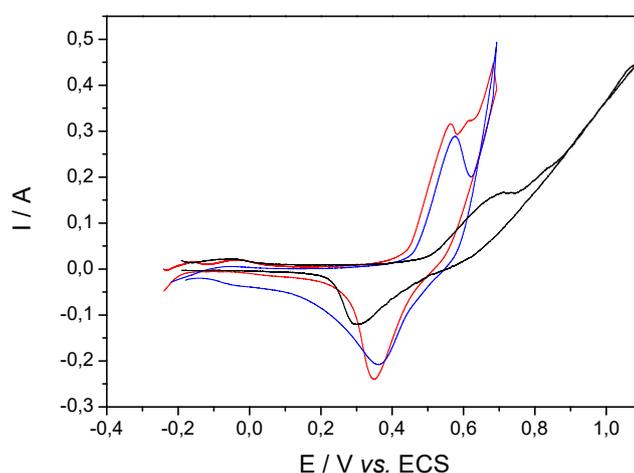


Figura 4.73 - Voltamogramas cíclicos do eléctrodo de níquel, em meio NaOH 0,5 M, correspondente ao (—) eletrólito de suporte, (—) ao início e (—) ao fim da eletrólise do amido puríssimo, traçado à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} .

Na Figura 4.74 está apresentado o espectro de FTIR do amido puríssimo eletrolisado no ânodo de níquel com uma intensidade de corrente de 2 A.

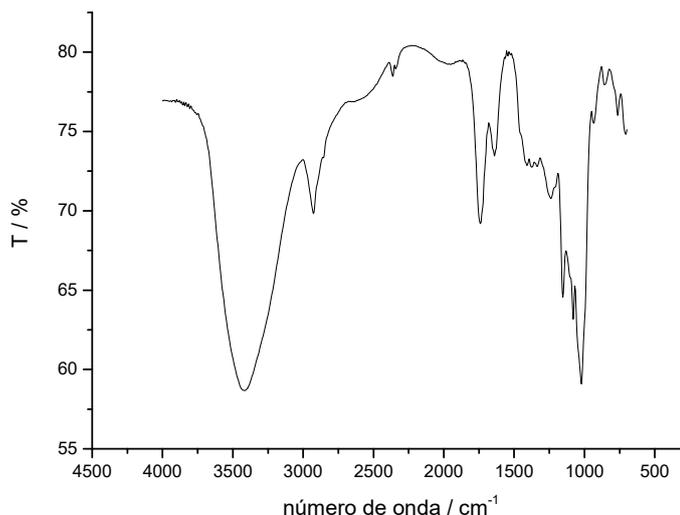


Figura 4.74 – Espectro de infravermelho do amido puríssimo eletrolisado a 2 A, no elétrodo de níquel.

Da análise dos espectros apresentados na Figura 4.74, à semelhança do que foi observado no espectro FTIR dos produtos de oxidação do amido, é possível identificar o mesmo tipo de bandas de absorvâncias significativas nomeadamente, as bandas correspondentes aos ácidos carboxílicos. O principal aspeto a realçar tem a ver com o fato da intensidade destas bandas a 1738 cm^{-1} ser superior à obtida no caso anterior nas mesmas condições. Uma maior intensidade da banda correspondente ao número de onda de 1738 cm^{-1} em comparação com o que foi observado para o caso anterior indica uma maior oxidação em ácido carboxílico neste caso.

A Figura 4.75 apresenta o espectro ^{13}C -RMN obtido para o produto liofilizado da eletrólise do amido puríssimo (Sigma-Aldrich) no elétrodo de níquel com uma intensidade de corrente de 2 A.

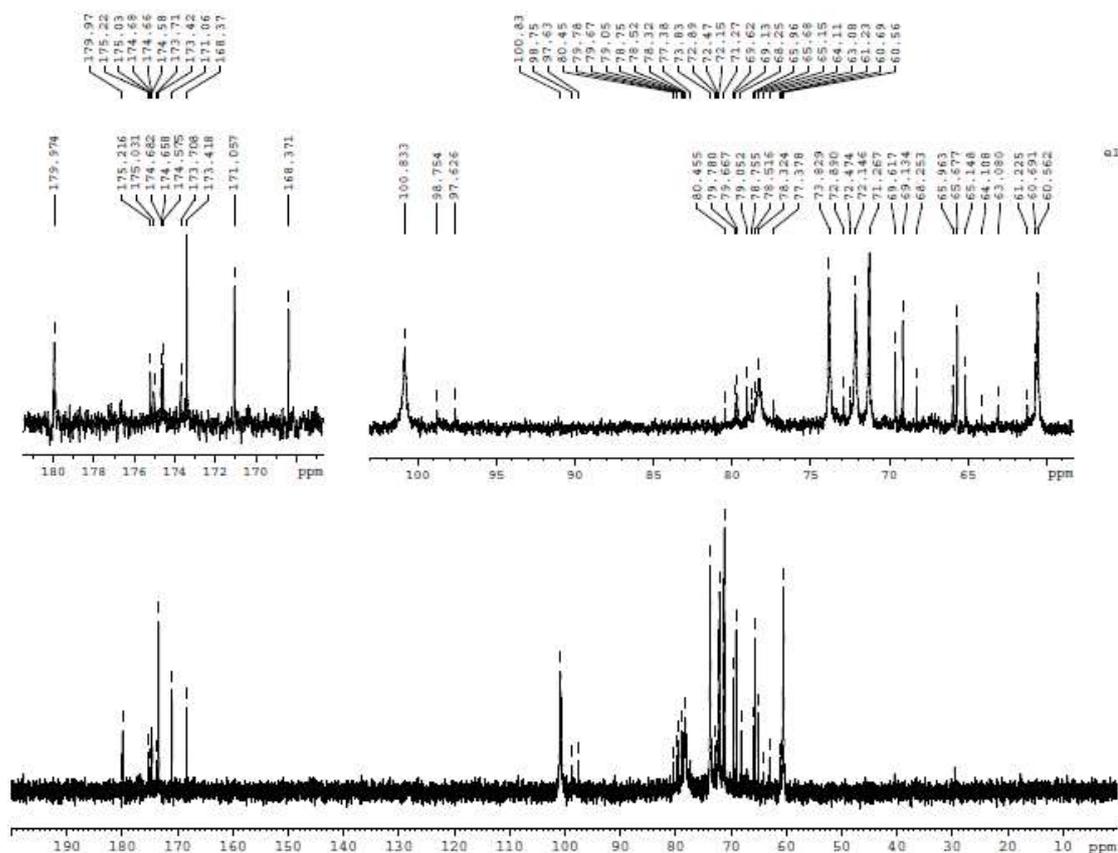


Figura 4.75 – Espectro ¹³C-RMN da amostra eletrolisada do amido puríssimo a 2 A.

A semelhança do que foi observado no espectro ¹³C-RMN do produto de eletrólise do amido, nota-se também neste caso a diminuição das intensidades dos picos com deslocamento de 72,1, 80 e 100 ppm em relação ao amido puríssimo inicial e o aparecimento de sinais na região de desvios químicos entre 168 e 180 ppm. As conclusões são análogas as que foram apresentadas no subcapítulo 4.3.1.1.

Foi também efetuado a titulação ácido-base do produto de eletrólise do amido puríssimo com NaOH 0,005 M (Figura 4.76).

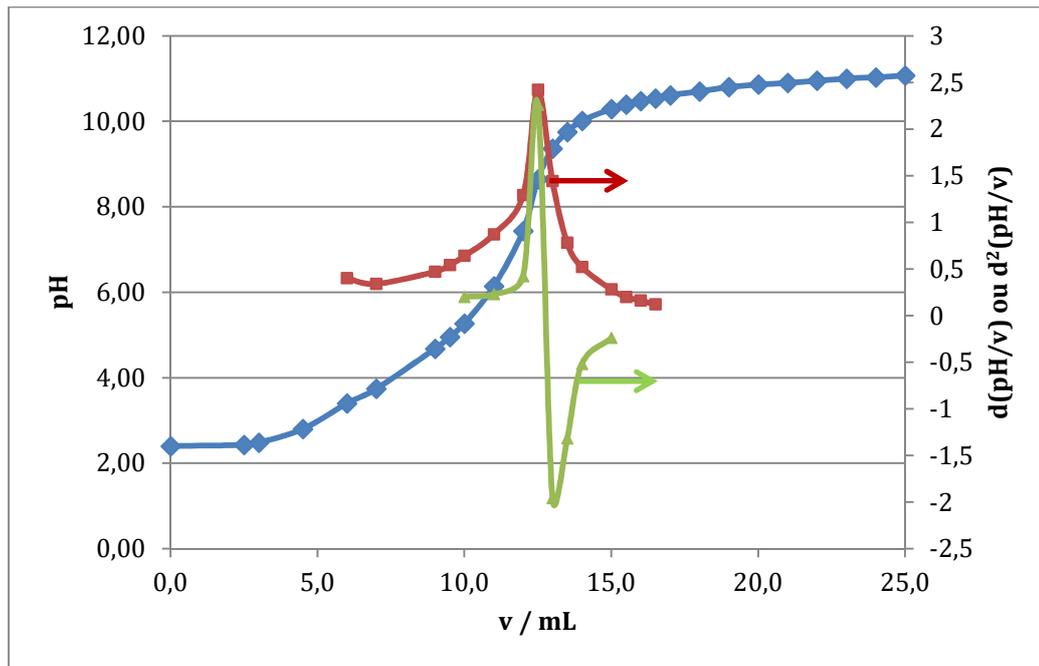


Figura 4.76 - Curva da titulação ácido/base do amido primário puríssimo (—) curva da primeira derivada (—) e curva da segunda derivada (—).

Estes resultados que sugerem uma oxidação significativa, podem ser confirmados com os resultados obtidos no teste de iodo, uma vez que foi determinada uma diminuição na concentração do amido na ordem de 55 % após fim da eletrólise.

4.3.1.3. Oxidação da amilose e da amilopectina

Foi efetuada uma eletrolise a 0,5 A em meio alcalino das soluções da amilose e da amilopectina. Na Figura 4.77 estão apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para a oxidação da amilose e da amilopectina.

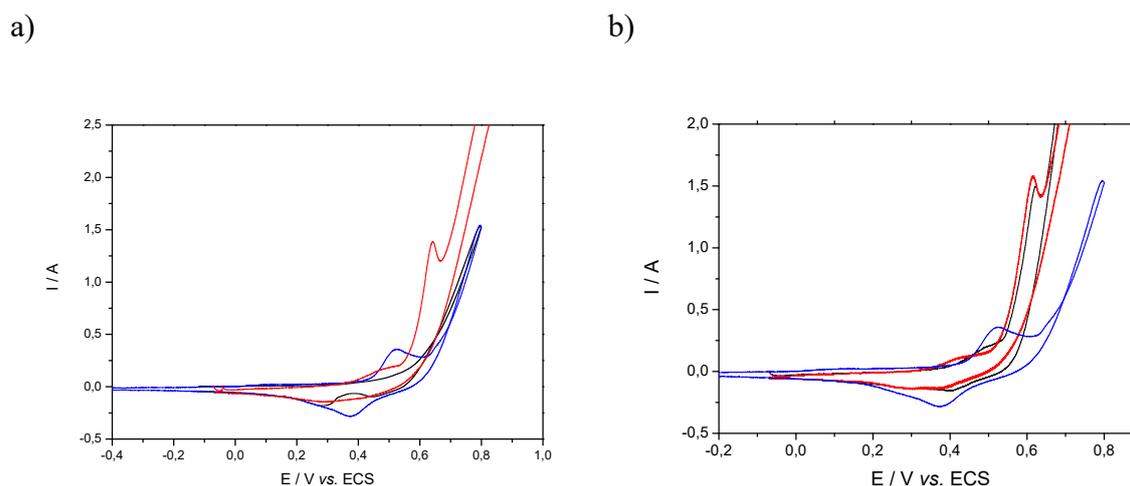


Figura 4.77 - Voltamogramas cíclicos no elétrico de níquel, em meio NaOH 0,5 M, correspondentes à eletrolise da a) amilose e da b) amilopectina traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} (—) eletrólito de suporte; (—) início e (—) fim de eletrolise.

A intensidade de corrente da oxidação da amilose, assim como da amilopectina registada na região de NiOOH é superior ao que foi observado para o amido. Após o fim da eletrolise, a intensidade de corrente mantém-se praticamente constante no caso da amilopectina, ao contrário do que foi observado com a amilose. Este fato pode ser explicado, por um lado com a eventualidade de uma oxidação menos completa e por outro com a acumulação de produtos de reação primários com maior facilidade para posterior oxidação.

As soluções de eletrolise para estes dois casos foram também neutralizadas, liofilizadas e caracterizadas por espectroscopia de FTIR e os respectivos espectros são apresentados na Figura 4.78.

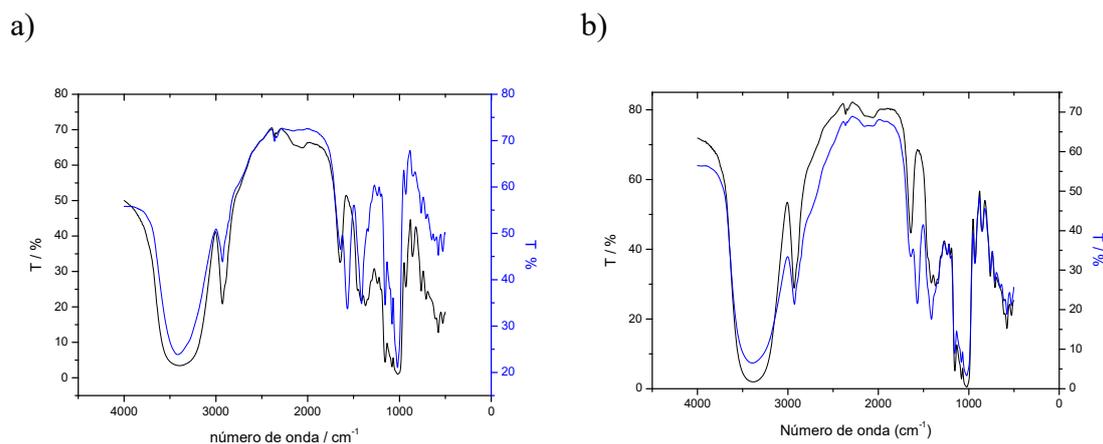


Figura 4.78 – Espectros de infravermelho a) da amilose primária (—) e do eletrolisado da amilose (—) e b) da amilopectina primária (—) e do eletrolisado da amilopectina (—).

O primeiro aspeto a realçar, consiste no fato de nos dois casos ser detetada a banda intensa e larga na região espectral $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, devido à distensão das ligações O-H. Entretanto, no caso da amilose eletrolisada, nota-se a ausência da banda de distensão correspondente à frequência relativa de vibração da ligação C=O do grupo carbonilo de aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, latonas entre outros, a cerca de 1738 cm^{-1} . Este resultado pode ser devido ao facto do grupo ácido carboxílico encontrar-se na forma do sal caboxilato em vez da forma protonada devido a neutralização através da dialise neste último caso. A banda da absorvância a 1580 cm^{-1} que pode ser atribuída ao modo de vibração assimétrica do grupo carboxílate, também confirma esta hipótese [1]. A outra banda visível a 1418 cm^{-1} também é característica de sais carboxílatos como pode ser observado no espectro do sal poliglucuronato de sódio que se encontra apresentado na Figura 4.79. O espectro correspondente ao carboxilato comparado com o ácido carboxílico confirma a hipótese mencionada anteriormente.

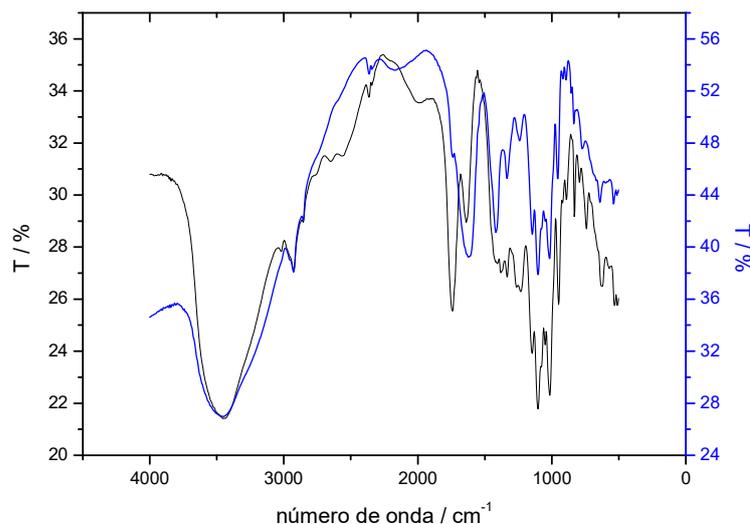
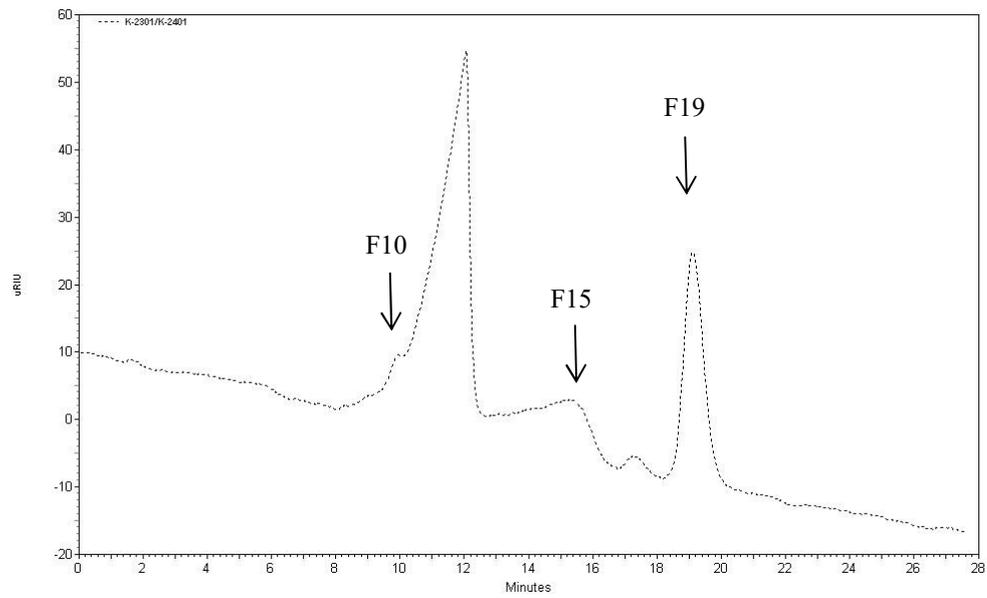


Figura 4.79 - Espectros de infravermelho do ácido poligalaturónico (—) e do sal poligalaturonato de sódio (—).

4.3.1.3.1. Separação de produtos neutros e ácidos por LEX/SEC

Após hidrólise enzimática da amilose e da amilopectina com a amilase, os oligossacarídeos formados foram fracionados por LEX/SEC de modo a obter misturas mais simples e mais fáceis de analisar por ESI-MS. Obtiveram-se várias frações como se mostra na Figura 4.80, que representa os cromatogramas LEX/SEC da amilose e da amilopectina obtidos após hidrólise enzimática. Verificou-se a eluição dos oligossacarídeos em três picos principais [13–16]. Nos dois casos, o pico com o tempo de eluição mais baixo (10-12 min; F10) no cromatograma foi designado para os produtos ácidos. Além disso, considerando o tempo de eluição da amilose e da amilopectina (máximo do pico a 19 min), a fração eluída entre 18-20 min foi atribuída principalmente aos dissacarídeos neutros. Por fim, as frações a 15 e 16 min foram atribuídas aos oligossacarídeos não modificados (mono, di e trissacarídeos).

a)



b)

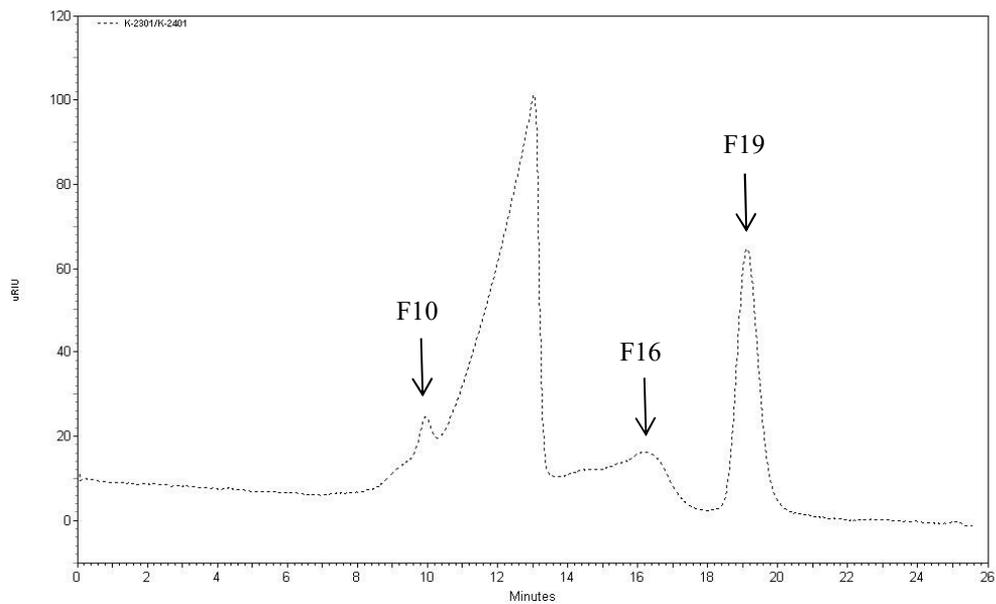


Figura 4.80 – Cromatograma LEX(SEC da a) amilose eletrolisada e da b) amilopectina eletrolisada obtido após a hidrólise enzimática com α -amilase.

4.3.1.3.2. Análise de espectros de ESI-MS

Análise dos produtos de oxidação da fração neutra da amilose

Nos espectros de ESI-MS das frações analisadas observaram-se os iões $[M+Na]^+$ dos diferentes oligossacarídeos presentes nas diferentes frações. A formação dos iões $[M+Na]^+$ é característica da ionização de oligossacarídeos quer pelo método de ionização ESI quer por MALDI [17]. Os espectros de ESI-MS das frações neutras (F19), da amilose e da amilopectina estão apresentados nas Figuras 4.81 e 4.82, respetivamente.

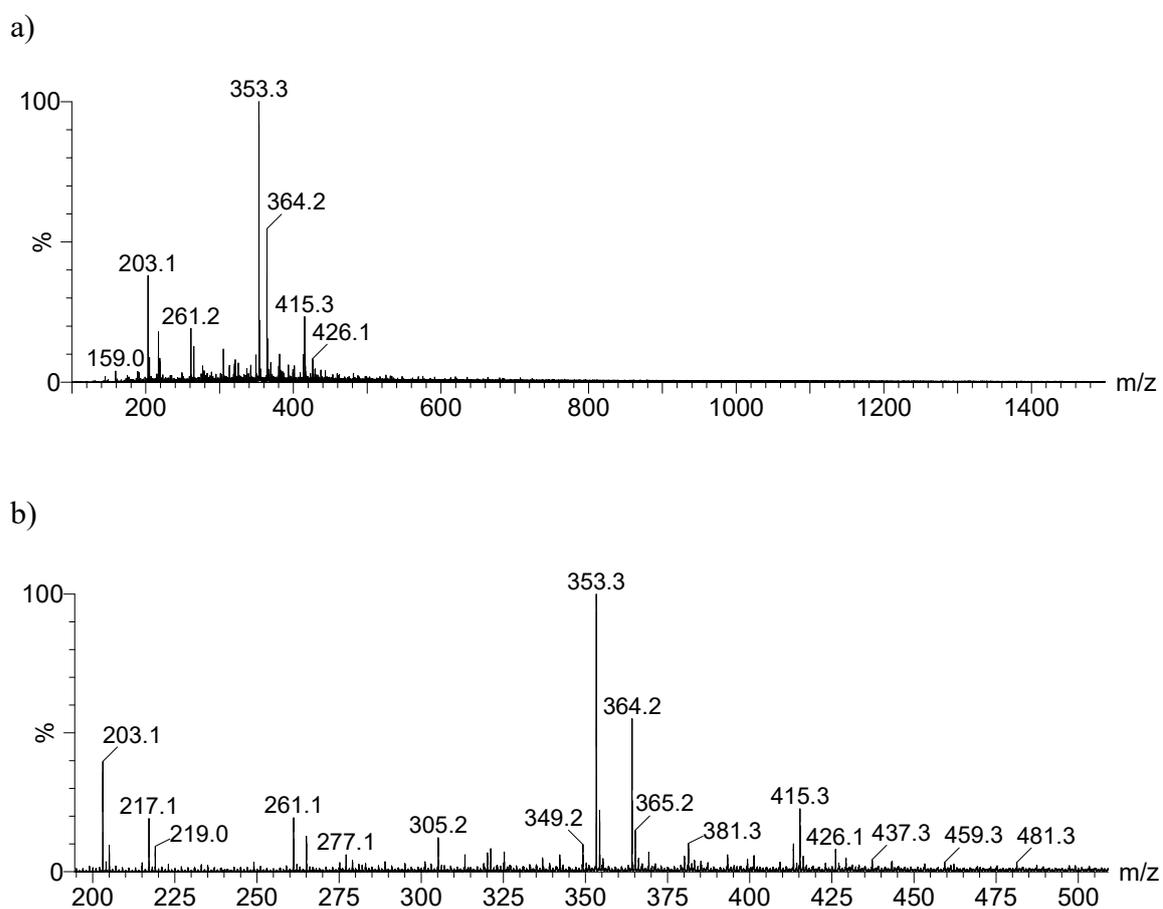


Figura 4.81 – Espectros de ESI-MS da fração neutra (F19) da amilose (a) espectro MS completo e (b) espectro MS da área ampliadas. [m/z : 200-475].

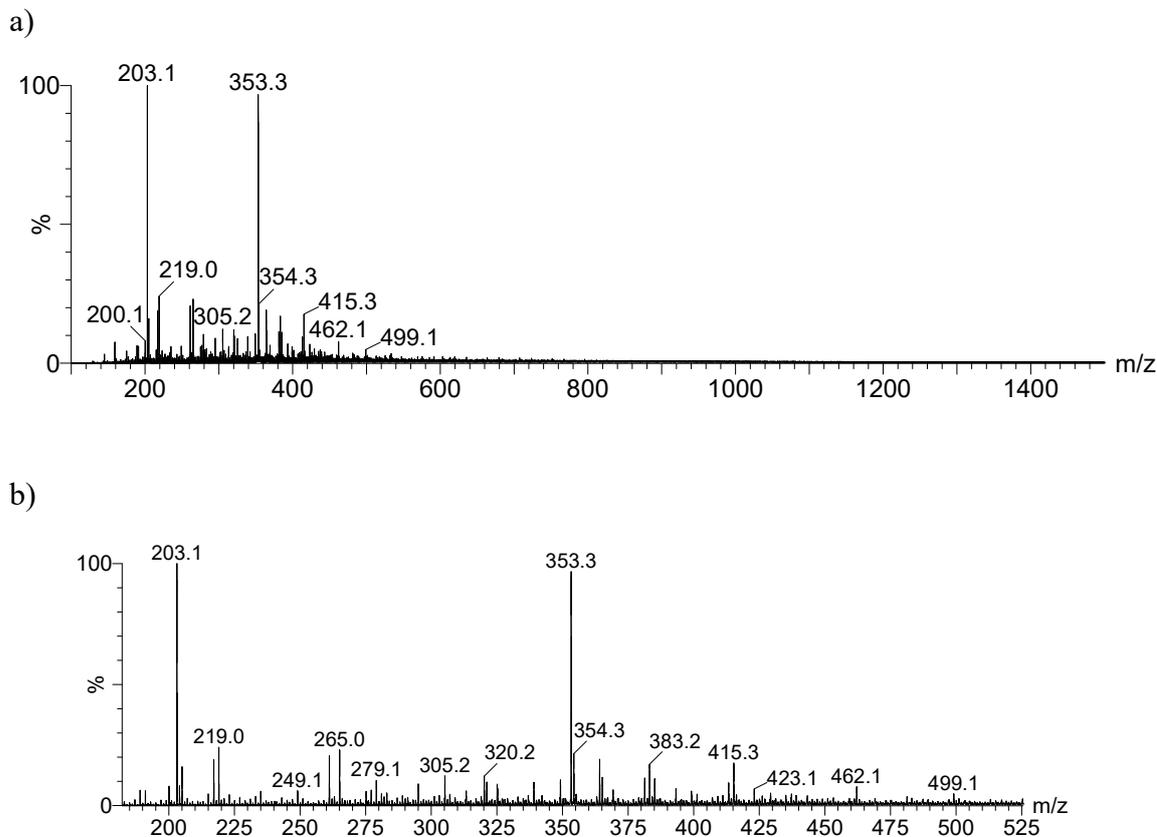
Análise dos produtos de oxidação da fração neutra da amilopectina

Figura 4.82 – Espetros de ESI-MS da fração neutra (F19) da amilopectina **(a)** espectro MS completo **(b)** espectro MS da área ampliadas. [m/z : 175-500].

Os iões observados e identificados nos espectros de ESI-MS da fração neutra (F19) da amilose e da amilopectina estão resumidos na Tabela 4.13, com indicação m/z dos adutos de sódio, $[M+Na]^+$ bem como a sua possível identificação atribuída com base no peso molecular e no estudo dos espectros de ESI-MS/MS. Na Tabela 4.13 os iões encontram-se agrupados em séries de iões diferentes de acordo com o tipo de produto, como por exemplo: (1) Hex₂ e Hex₃ e os produtos despolimerizados; (2) derivados resultantes da clivagem C1-C2 ou da C2-C3. Os espectros de todos os produtos obtidos para os di e trissacarídeos de carácter neutro permitiram confirmar as atribuições propostas, tal como será descrito mais adiante.

Tabela 4.13 - Resumo dos iões observados nos espectros de ESI-MS da fração neutra (F19), de oxidação da amilose e da amilopectina com os respectivos valores de m/z dos respectivos iões $[M+Na]^+$, respectivas identificações e frações em que foram encontrados.

		Amilose	Amilopectina
		m/z	
Derivados com adição de grupos Ceto, -OH			
Hex ₂ +2O	(+32)	397	397
Hex ₂ +2O -4H	(+28)	393	393
Derivados da clivagem C1-C2			
Hex ₂ -CO	(-28)		499
Hex ₂ -CO +O	(-12)	353	353
Hex ₂ -CO +3O	(+20)		385
Hex ₂ -CH ₂ O+2O -2H	(+0)	365	365
Derivados da clivagem C2-C3			
Hex ₂ -C ₂ H ₂ O ₂ +2O	(-26)		339
Hex ₂ -C ₂ H ₄ O ₂	(-60)	305	305
Hex ₂ -C ₂ H ₄ O ₂ +O	(-44)	321	321

4.3.1.3.3. Análise de espectros de ESI-MS/MS

Análise dos produtos de oxidação da fração neutra (F19) da amilose

Foram adquiridos os espectros de ESI-MS/MS de todos os iões desta série. Os espectros de ESI-MS/MS dos iões atribuídos a derivados neutros (F19) dos produtos de oxidação da amilose (Tabelas 4.13), com iões $[M+Na]^+$ identificados nos espectros de ESI-MS da fração, destacam a importância da análise MS/MS, confirmando deste modo as estruturas possíveis propostas para os iões observados por MS. Na Figura 4.84 encontra-se o espectro de MS/MS do ião de m/z 353 correspondente ao ião $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) e a estrutura proposta para o mesmo. Podemos observar a perda principal de uma hexose (-180 Da) com formação do ião muito intenso de m/z 173. Observa-se também a perda de uma molécula de água -18 Da (H₂O), -120 Da (C₄H₈O₄) e a perda -90 (C₃H₆O₃) correspondente a perda do anel pirânico da hexose terminal 1→4. Com

base nestes dados propomos que o ião de m/z 353 corresponde a um monossacarídeo de hexose ramificada com possível estrutura, conforme apresentado na Figura 4.83.

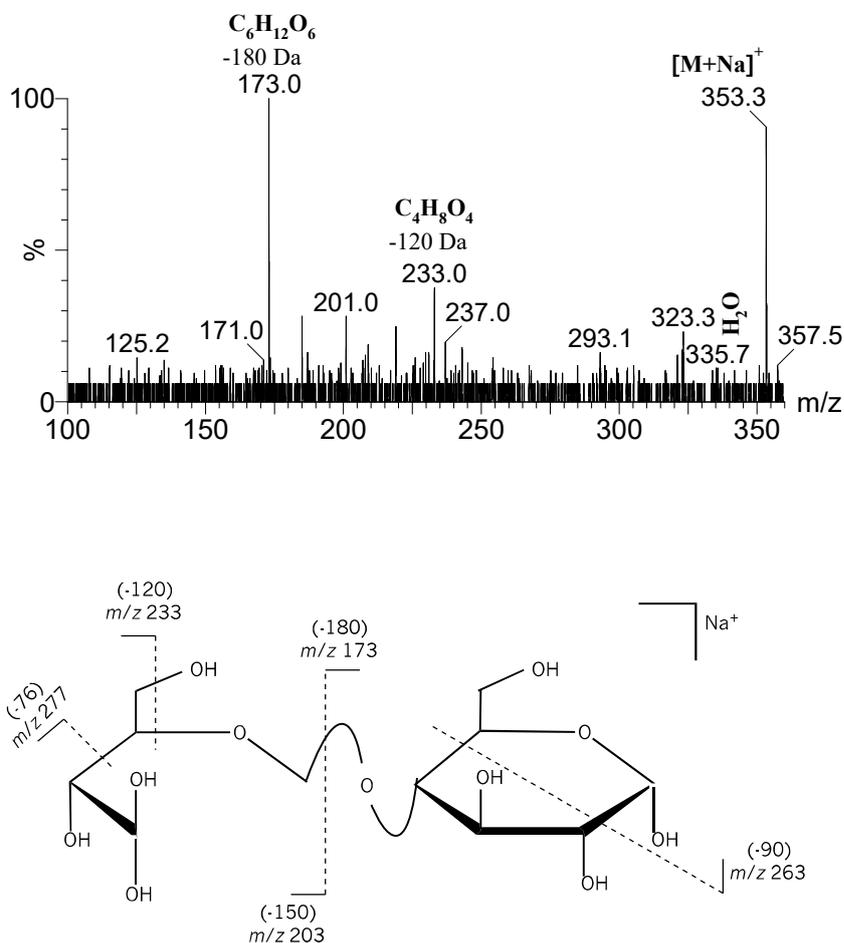


Figura 4.83 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 353 ($[Hex_2-CO + Na]^+$) correspondente ao ião $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da amilose.

Na Figura 4.84 podemos observar as perdas principais do acetilo (-60 Da) sob a forma de ácido acético com formação do ião de m/z 305, perda de -120 Da com formação do ião de m/z 245. Esta perda pode também corresponder à quebra do anel da hexose em ligação 1-4 da cadeia principal. Observa-se também a perda de uma molécula de água (-18 Da). Observa-se a perda de hexose (-180 Da) com formação do ião de m/z 185 e a perda de resíduo de hexose (-162 Da) com formação do ião de m/z 203. Estas fragmentações sugerem a presença de isómeros em terminais ou ramificações de hexoses que não têm grupos acetilo.

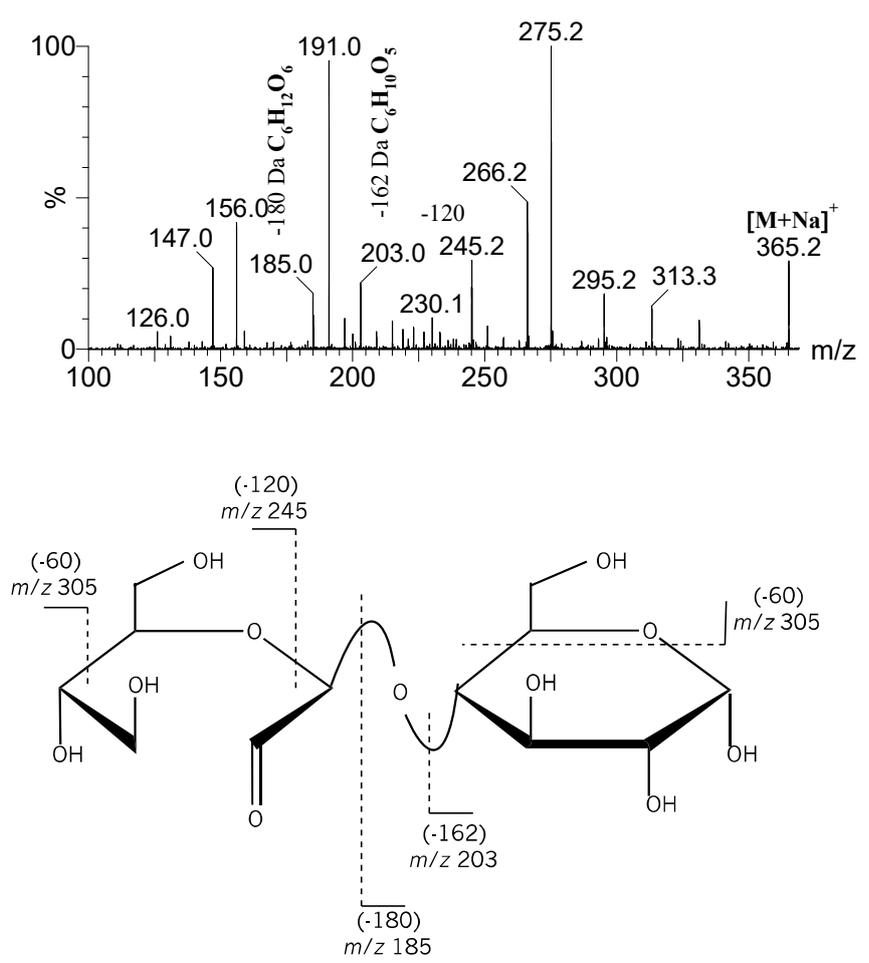


Figura 4.84 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião m/z 365 ($[Hex_2-CH_2O+2O +Na]^+$) correspondente ao ião $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da amilose.

Na Figura 4.85 podemos ver o espectro de ESI-MS/MS correspondente ao ião de m/z 321 e a respetiva estrutura.

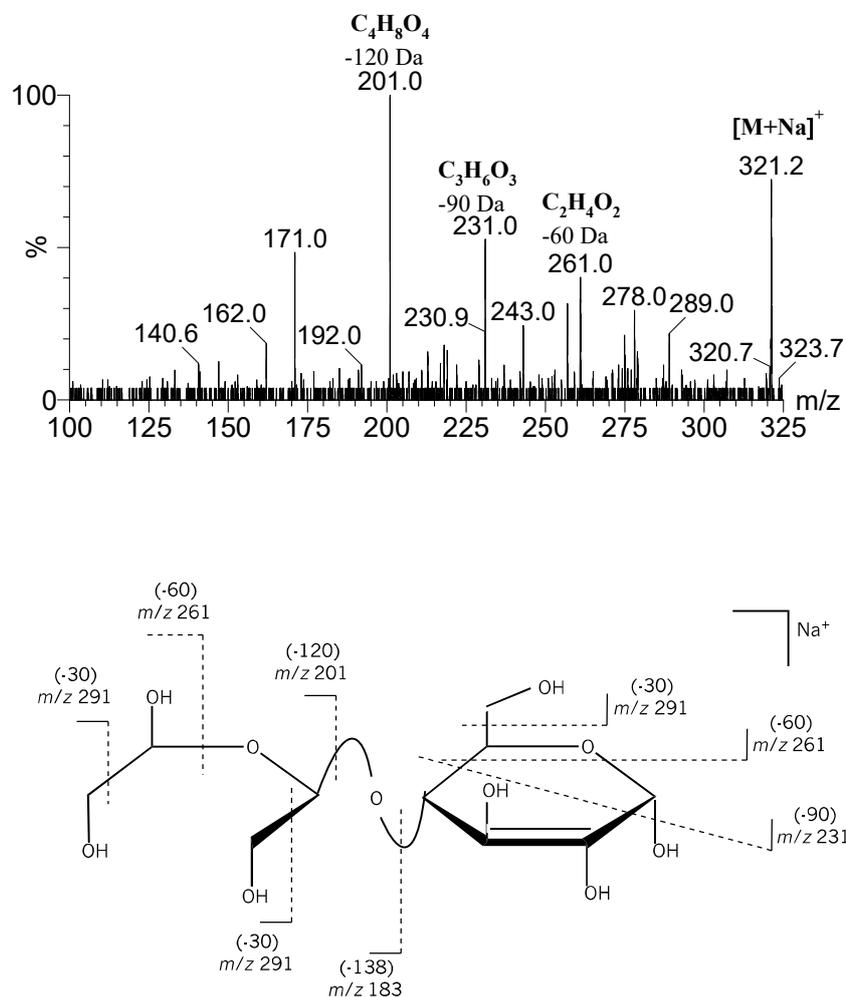


Figura 4.85 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta para o ião de m/z 321 ($[Hex_2-C_2H_2O + Na]^+$) correspondente ao ião $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da amilose e TEMPO.

Neste espectro podemos observar a perda principal de -120 Da com formação do ião de m/z 201 e a perda de -30 Da com formação do ião de m/z 291. Observa-se também a perda do grupo acetilo (-60 Da) sob a forma de ácido acético com formação do ião de m/z 261. A perda -60 Da também pode corresponder à quebra do anel resultante das hexoses em ligação 1-4 da cadeia principal.

Análise dos produtos de oxidação da fração neutra (F19) da amilopectina

A figura 4.86 apresentado o espectro de MS/MS do ião de m/z 353 correspondente ao ião $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) e a estrutura proposta para o mesmo. Podemos observar a perda principal de uma hexose (-180 Da) com formação do ião de m/z 173. Observa-se também a perda de -120 Da ($C_4H_8O_4$) e a perda -90 ($C_3H_6O_3$) correspondente à quebra do anel pirânico da hexose terminal 1→4. Com base nestes dados propomos que o ião de m/z 353 corresponde a um monossacarídeo de hexose ramificada com possível estrutura, conforme apresentado na Figura 4.86.

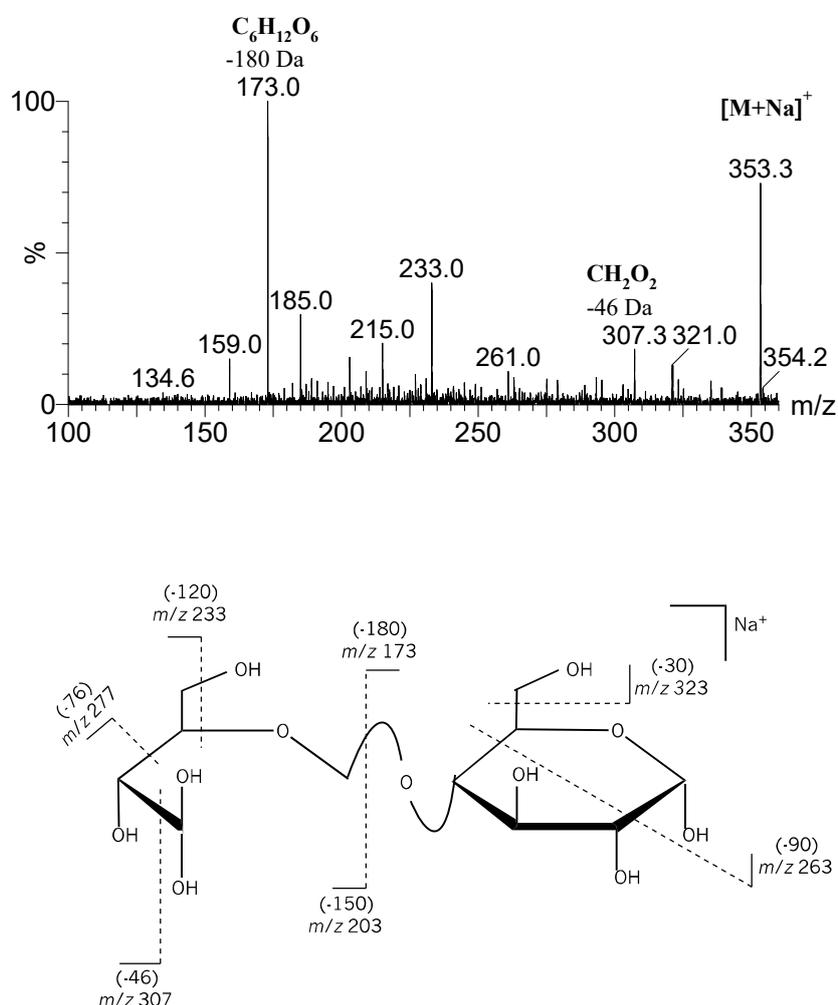


Figura 4.86 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do o ião m/z 353 ($[Hex_2-CO+Na]^+$) correspondente ao ião $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da amilopectina.

Na Figura 4.87 observa-se as perdas principais do acetilo (-60 Da) sob a forma de ácido acético com formação do íon de m/z 305. A perda de -120 Da e a perda de -90 Da com formação do íon de m/z 245 e 275, respectivamente. Estas perdas podem também corresponder à quebra do anel da hexose em ligação 1-4 da cadeia principal. Observa-se também a perda de hexose (-180 Da) com formação do íon de m/z 185 e a perda de resíduo de hexose (-162 Da) com formação do íon m/z 203.

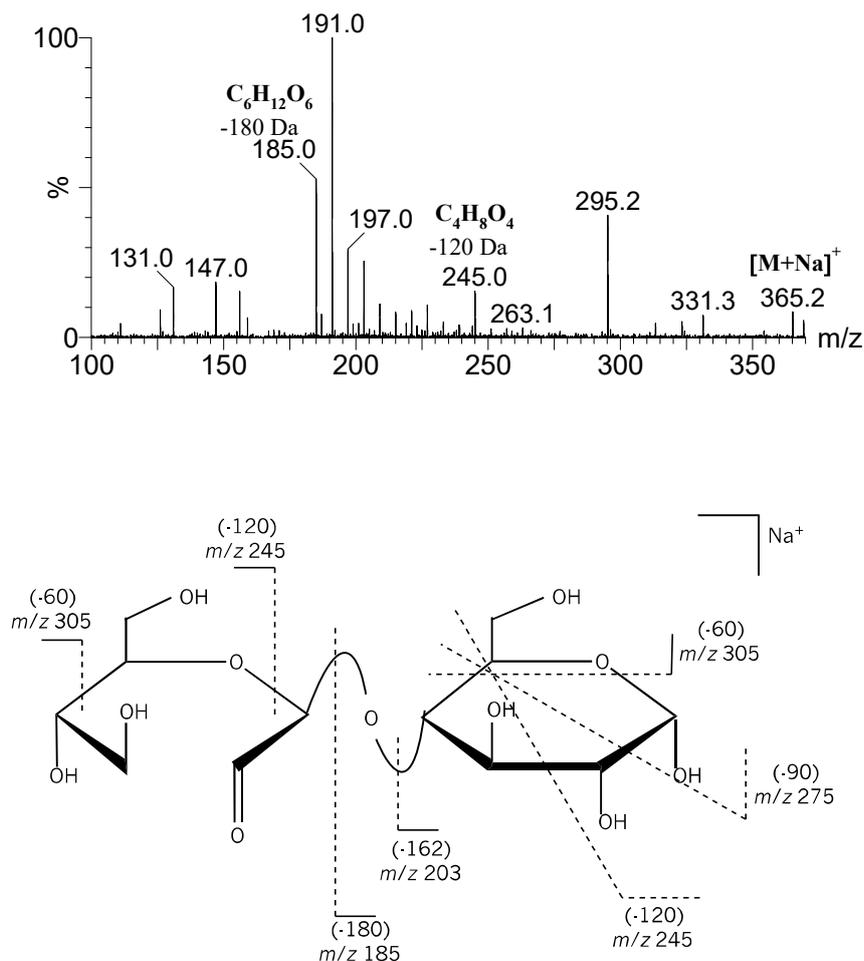


Figura 4.87 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do íon de m/z 365 ([Hex₂-CH₂O+2O +Na]⁺) correspondente ao íon [M+Na]⁺ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da amilopectina.

Na Figura 4.88 podemos ver o espectro de ESI-MS/MS correspondente ao ião de m/z 397 e a respetiva estrutura proposta. Observa-se neste espectro a perda de -120 Da com formação do ião de m/z 277, perda de hexose (-180 Da) com formação do ião de m/z 217 e a perda de resíduo de hexose (-162 Da) com formação do ião m/z 235. Observa-se também a perda de -90 Da com formação do ião de m/z 307, a perda do grupo acetilo (-60 Da) sob a forma de ácido acético com formação do ião de m/z 337 que são quebras do anel resultante das hexoses em ligação 1-4 da cadeia principal. Podemos também observar a perda de uma molécula de água (-18 Da).

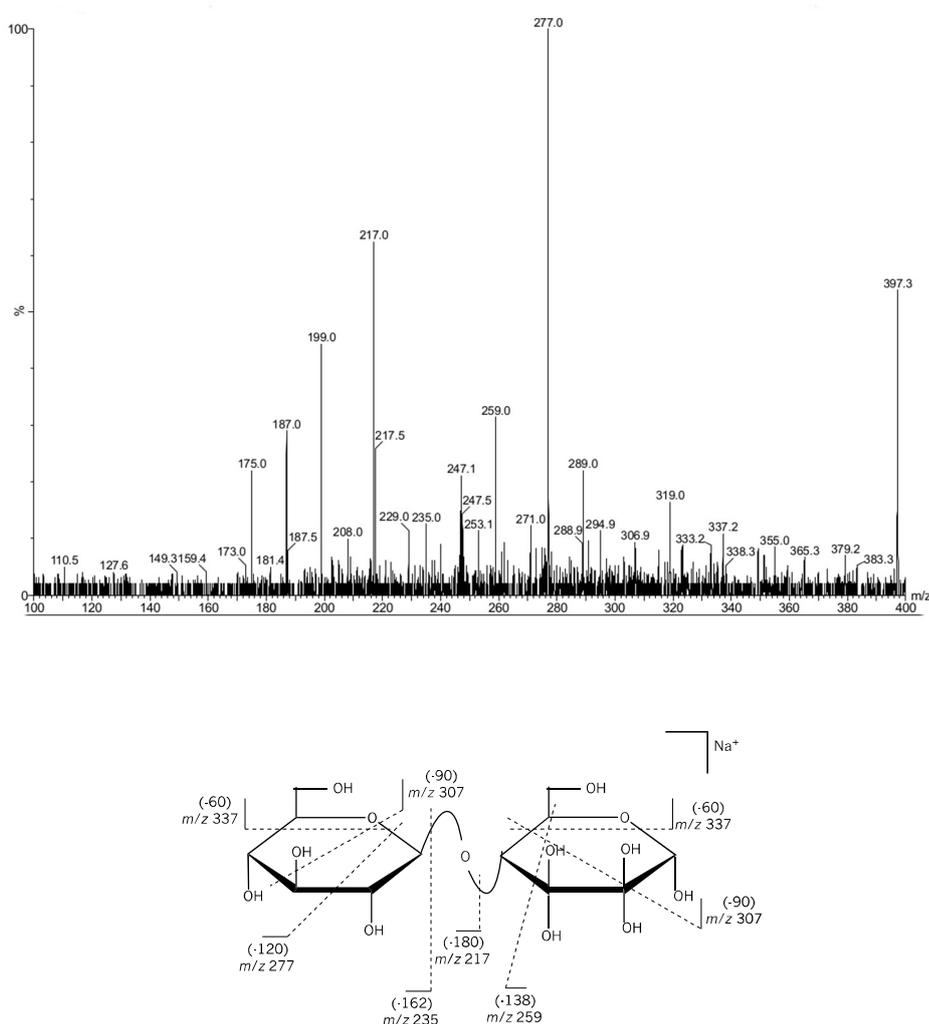


Figura 4.88 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 397 ($[\text{Hex}_2+2\text{O}+\text{Na}]^+$) correspondente ao ião $[\text{M}+\text{Na}]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da amilopectina.

4.3.1.3.4. Análise de espectros de ESI-MS

Análise dos produtos de oxidação da fração neutra (F15) da amilose

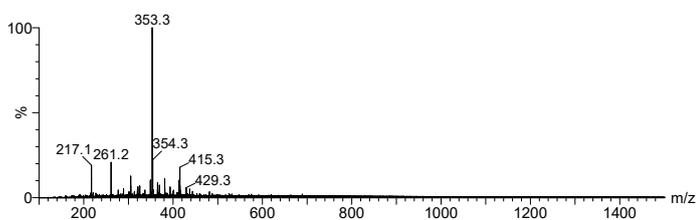
Outra série de compostos resultantes da fração F15 e fração F16 da amilose e amilopectina, respetivamente foram também identificados como sendo não modificados, conforme apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 - Não modificados da amilose (F15) e amilopectina (F16) identificados por ESI-MS com respetivos valores m/z dos iões $[M+Na]^+$.

n	2	1	2	3
	Amilose		Amilopectina	
	m/z			
Hex _n	365	203	365	527

O espectro de ESI-MS correspondente a amilose é apresentado na Figura 4.89.

a)



b)

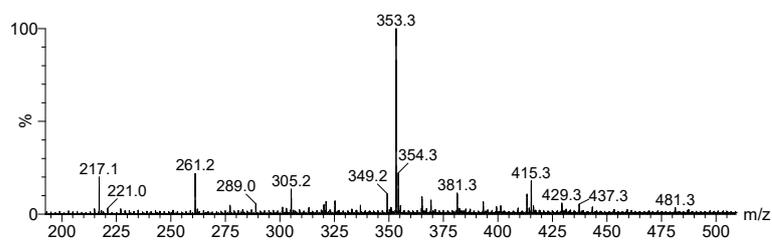
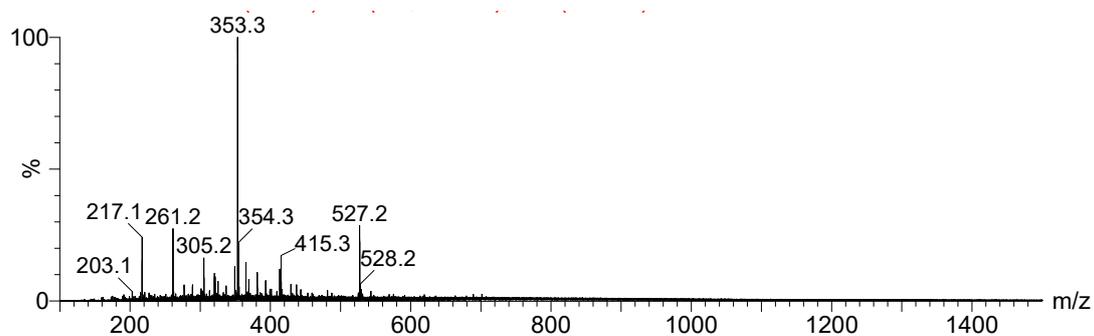


Figura 4.89 – Espectros de ESI-MS da fração neutra (F15) da amilose **(a)** espectro MS completo **(b)** espectro MS da área ampliadas. [m/z : 175-500].

Análise ESI-MS da amilopectina (F16)

O espectro de ESI-MS correspondente a amilopectina é apresentado na Figura 4.90.

a)



b)

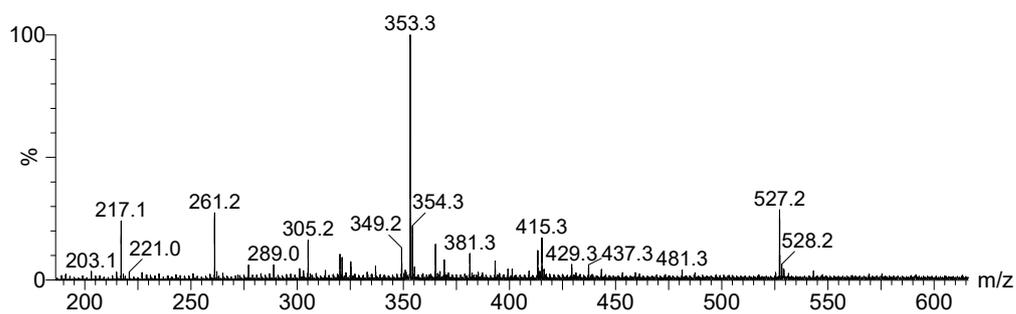


Figura 4.90 – Espectros de ESI-MS da fração neutra (F16) da amilopectina **(a)** espectro MS completo **(b)** espectro MS da área ampliadas. [m/z : 175-500].

4.3.1.3.5. Análise de espectros de ESI-MS/MS

Análise dos produtos de oxidação da fração neutra (F16) da amilopectina

A Figura 4.91 apresenta o espectro MS/MS do ião correspondente ao oligossacarídeo não modificado com duas hexose. A presença de hexoses é inferida pelos iões de m/z 203 e 185, resultantes da perda de -162 Da e -180 Da, respectivamente. Estas fragmentações levaram-nos a propor uma estrutura possível para este dissacarídeo.

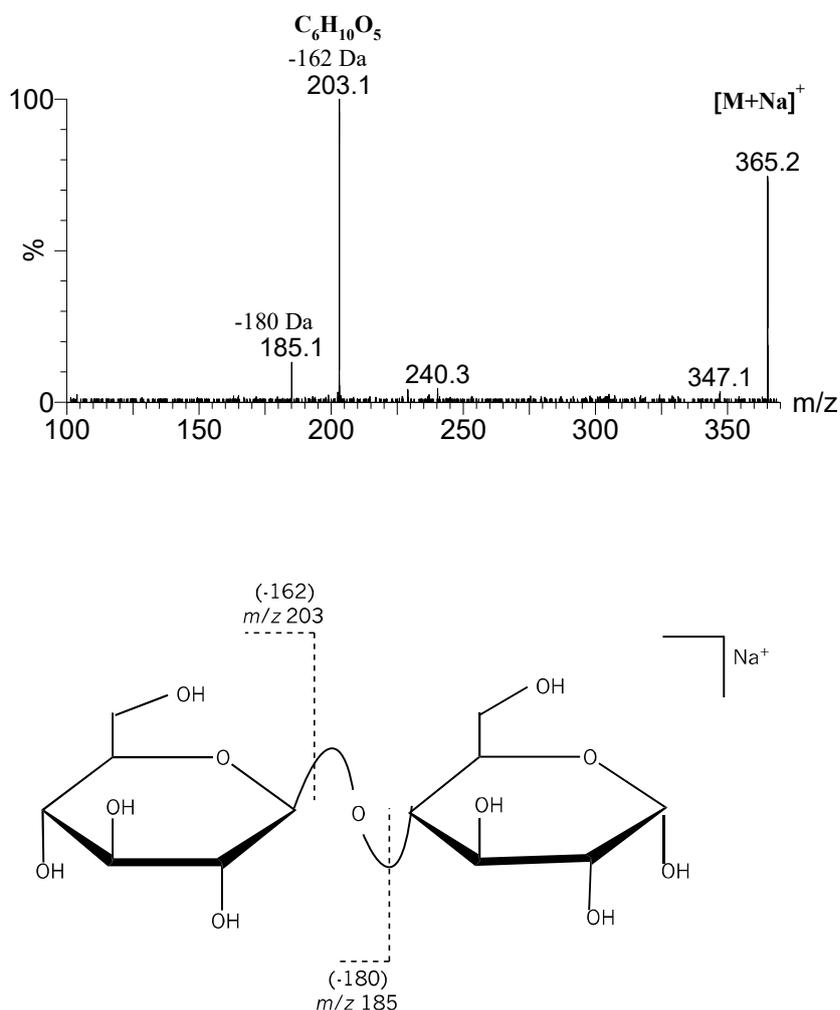


Figura 4.91 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 365 ($[\text{Hex}_2 + \text{Na}]^+$) correspondente ao ião $[\text{M} + \text{Na}]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F16) da amilopectina.

O espectro de MS/MS do ião 527 correspondente ao oligossacarídeo com três hexoses é apresentado na Figura 4.93. A presença de hexoses é inferida pelos iões de m/z 365, 347 e 185, resultantes da perda de -162 Da, -180 Da e -342, respectivamente. Observam-se ainda perdas de -60 Da e -120 Da, correspondentes à quebra do anel. Há ainda a perda de uma molécula de água (-18 Da).

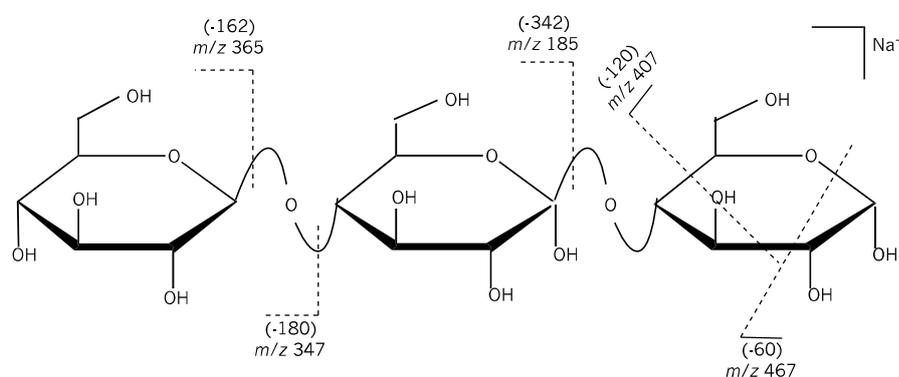
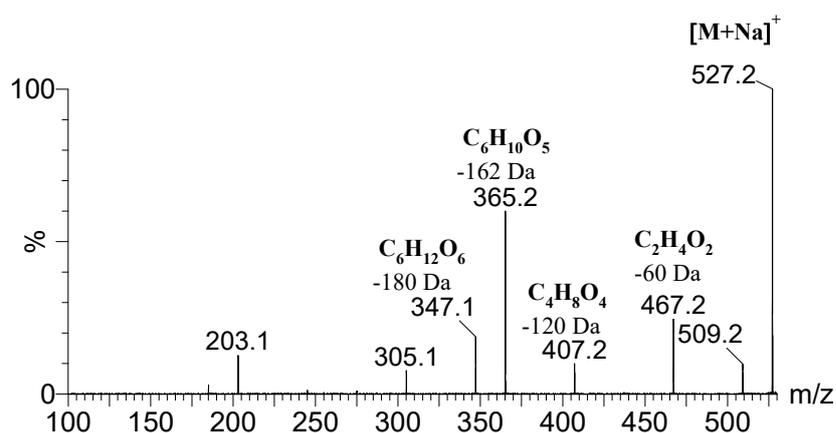


Figura 4.92 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 527 ($[\text{Hex}_3 + \text{Na}]^+$) correspondente ao ião $[\text{M} + \text{Na}]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F16) da amilopectina.

4.3.1.3.6. Análise de espectros de ESI-MS

Análise dos produtos de oxidação da fração ácida (F10) da amilose

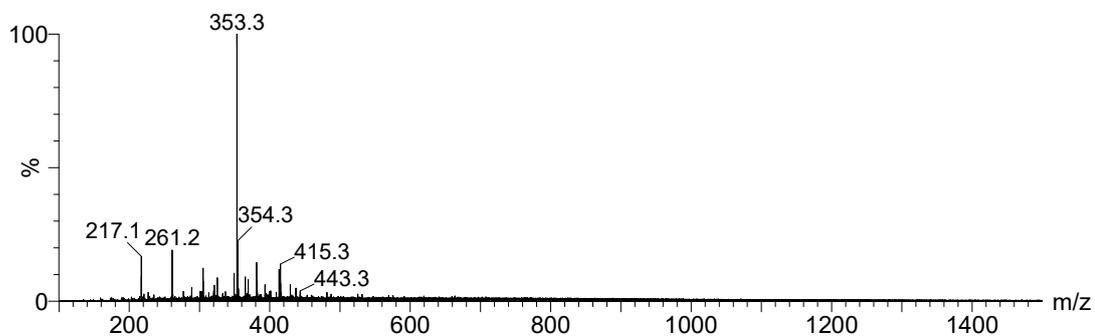
Outra série de compostos resultantes das frações ácidas F10 foram também identificados como sendo ácidos, conforme apresentados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15 - Ácidos da amilose (F10) e amilopectina (F10) identificados por ESI-MS com respectivos valores m/z dos iões $[M+Na]^+$.

		Amilose	Amilopectina
		m/z	
Séries do ácido Glucurónico			
Hex ₂ +O	(+16)	381	381
Hex ₂ +2O -4H	(+28)	393	393
Séries do ácido Glicérico (clivagem do C1-C2)			
Hex ₂ -CH ₂ O +O -2H	(-16)	349	349
Hex ₂ -CH ₂ O +2O -2H	(+0)	365	365
Séries do ácido Glicólico (clivagem do C2-C3)			
Hex ₂ -C ₂ H ₄ O ₂ +O	(-44)	321	

Os espectros de ESI-MS para a fração ácida (F10) da amilose são apresentados na Figuras 4.93.

a)



b)

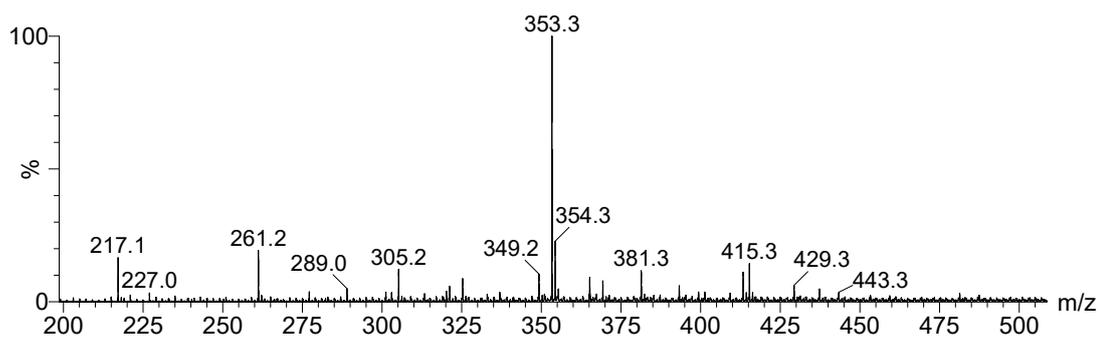
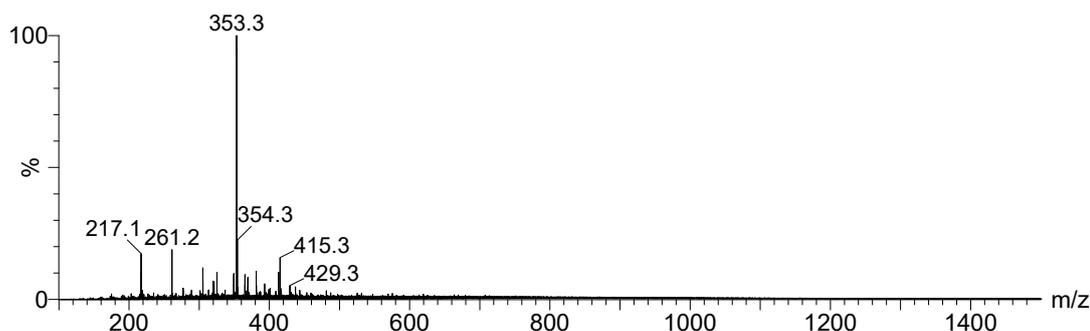


Figura 4.93 – Espectros de ESI-MS da fração ácida (F10) da amilose **(a)** espectro MS completo **(b)** espectro MS da área ampliadas. [m/z : 200-500].

Análise dos produtos de oxidação da fração ácida (F10) da amilopectina

Os espectros de ESI-MS para a fração ácida (F10) da amilopectina são apresentados na Figuras 4.94.

a)



b)

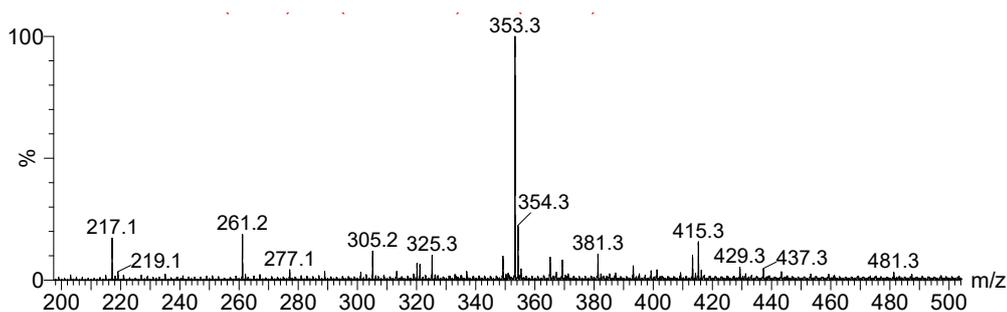


Figura 4.94 – Espectros de ESI-MS da fração ácida (F10) da amilopectina (a) espectro MS completo (b) espectro MS da área ampliadas. [m/z : 200-500].

4.3.1.3.7. Análise de espectros de ESI-MS/MS

Análise dos produtos de oxidação da fração ácida (F10) da amilose

Nas estruturas propostas, em alguns casos verifica-se perdas de moléculas de água e quebras de anel do açúcar que resultam principalmente da fração neutra de $C_2H_4O_2$ (-60 Da) e $C_3H_6O_3$ (-90 Da). As clivagens transversais do anel ocorrem predominantemente no resíduo do terminal redutor.

A Figura 4.95 apresenta o espectro de ESI-MS/MS do ião 365 onde se pode evidenciar o ião predominante de m/z 203, resultante da perda de -162 Da. Observa-se ainda, as perdas de uma molécula de água (-18 Da) e perdas de -180 Da, -58 Da com formação dos iões de m/z 185 e 307, respetivamente. Observa-se também a perda de -60 Da que corresponde à quebra do anel.

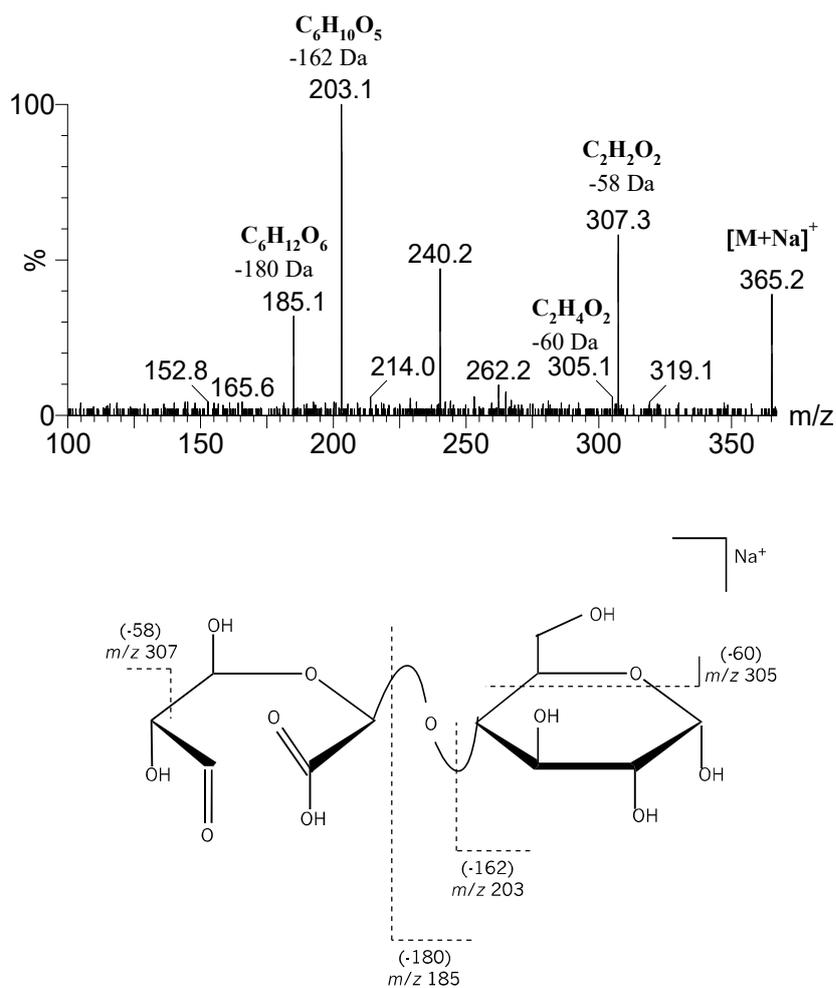


Figura 4.95 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 365 ($[Hex_3 + Na]^+$) correspondente ao ião $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração ácida (F10) da amilose.

Análise dos produtos de oxidação da fração ácida (F10) da amilopectina

O espectro de ESI-MS/MS apresentado na Figura 4.96 permitiu confirmar a estrutura proposta para o íon de m/z 381, em alta abundância relativa. Podemos observar o íon de m/z 219 resultante da perda principal de um resíduo de hexose -162 Da, a quebra do anel com perda de -60 Da ($C_2H_4O_2$) e -120 Da ($C_4H_8O_4$), sugere que o oxigênio adicionado está localizado no C1 ou C2 da extremidade redutora. Embora em baixa abundância, observa-se a perda de uma hexose (-180 Da) com formação do íon de m/z 201, a perda -277 Da e a perda de uma molécula de água (-18 Da).

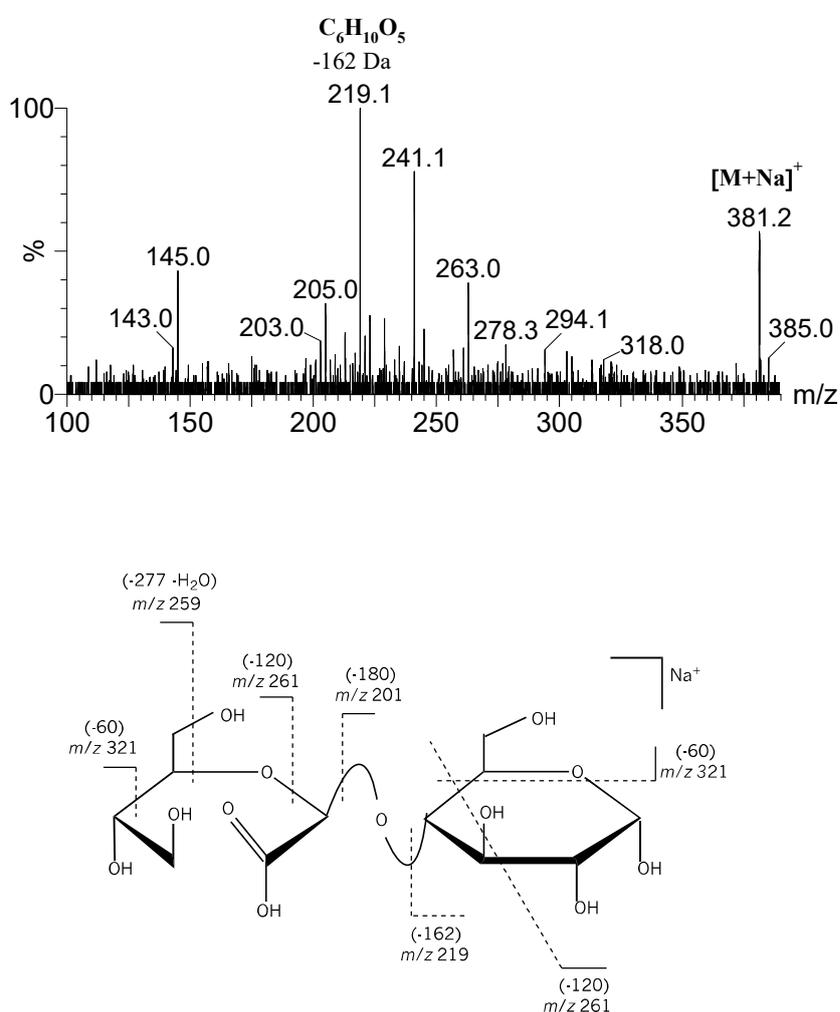


Figura 4.96 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do íon de m/z 381 ($[Hex_3 + Na]^+$) correspondente ao íon $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração ácida (F10) da amilopectina.

A Figura 4.97 apresenta o espectro de MS/MS do ião de m/z 365, no qual podemos observar a perda principal de um resíduo de hexose (-162 Da) com formação do ião de m/z 203 e a perda de uma hexose (-180) com formação do ião de m/z 185. Observa-se também, ainda que seja em baixa abundância relativa a perda -305 Da e a -120 Da acompanhada de perda de uma molécula de água a partir do terminal não redutor.

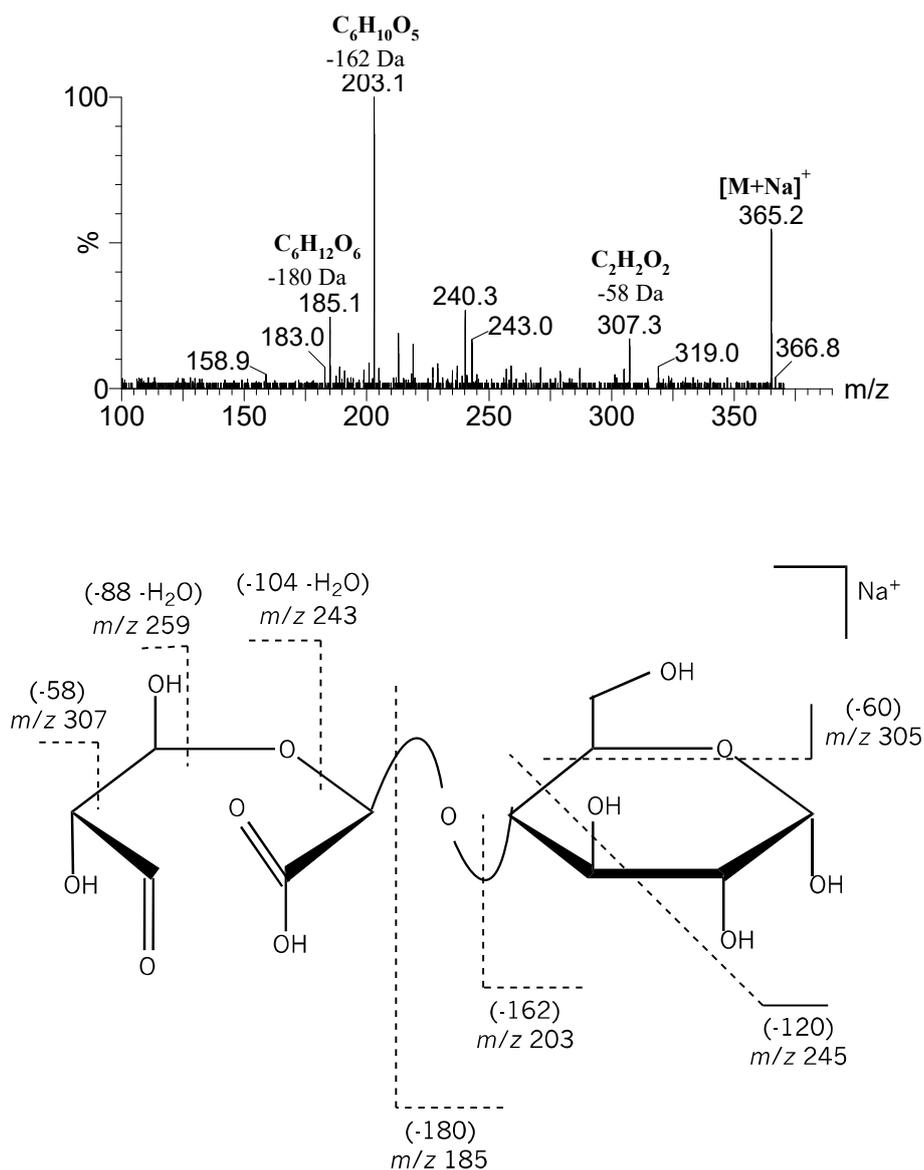


Figura 4.97 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 365 ($[Hex_3 + Na]^+$) correspondente ao ião $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração ácida (F10) da amilopectina.

4.3.1.4. Oxidação da celulose microcristalina

A estrutura da molécula da celulose é apresentada na Figura 4.98.

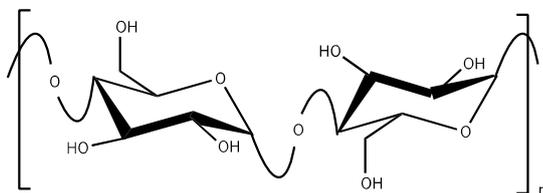


Figura 4.98 – Estrutura da molécula da celulose.

Os voltamogramas do eléctrodo de níquel em meio 0,5 M NaOH na ausência da espécie eletroativa, no início e no fim da eletrólise de 2 g/L da celulose microcristalina estão apresentados na Figura 4.99. A partir desta análise é possível observar como referido, no caso do amido, um aumento de intensidade de corrente na presença da celulose na região de NiOOH. No entanto, é possível também identificar uma diferença substancial na forma geral do voltamograma registado no fim da eletrólise, que evidencia uma diminuição de intensidade de corrente. Tal fato pode estar relacionado com a oxidação da celulose.

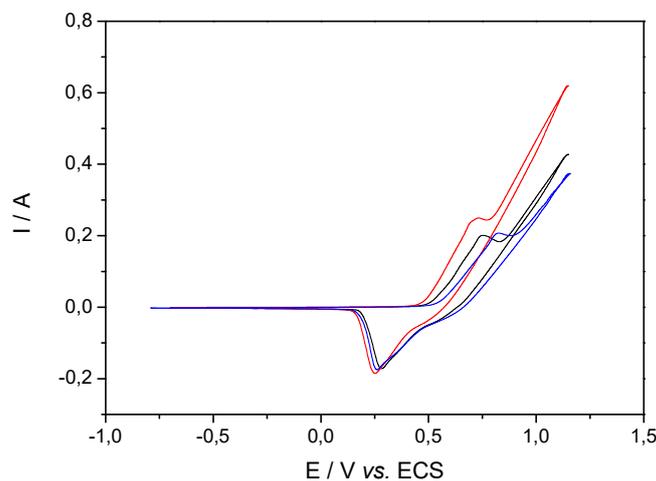


Figura 4.99 – Voltamogramas cíclicos num eléctrodo de níquel, em meio NaOH 0,5 M, correspondentes à eletrólise da celulose, traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s⁻¹ (—) eletrólito de suporte; (—) no início e (—) no fim de eletrólise.

Após 6 horas de eletrólise os produtos liofilizados foram analisados por espectroscopia de FTIR. No espectro FTIR registado (Figura 4.100) observa-se o aparecimento de bandas na região espectral 1650–1800 cm^{-1} , de que fazem parte as frequências relativas à vibração da ligação C=O do grupo carbonilo de aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, entre outros. Considera-se a região espectral 1000–1200 cm^{-1} , região da vibração (“stretching”) da ligação C-O dos grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ e $-\text{CHOH}$ (função álcool primário e secundário, respetivamente) [12] e da ligação glicosídica que sugere alguma degradação da molécula neste caso.

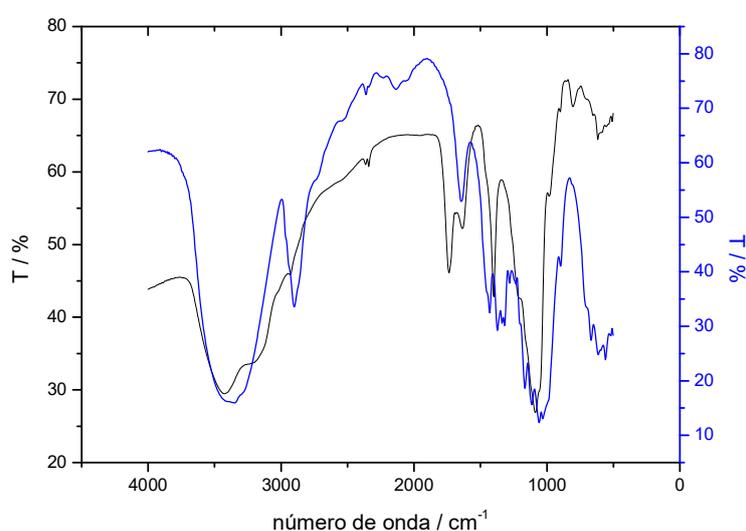


Figura 4.100 - Espectros de infravermelho da celulose microcristalina primária (—) e do eletrolisado da celulose (—).

4.3.2. Oxidação eletroquímica no eletrodo de DSA na célula FM01-LC

4.3.2.1. Oxidação do amido

O eletrodo de óxido de rutênio (DSA) foi outro ânodo utilizado para oxidar os polissacarídeos. A Figura 4.101 mostra os voltamogramas em DSA registrados no eletrólito de suporte (NaOH 0,5 M), no início e no fim da eletrólise do amido (2 g/L), aplicando uma intensidade de corrente de 2 A.

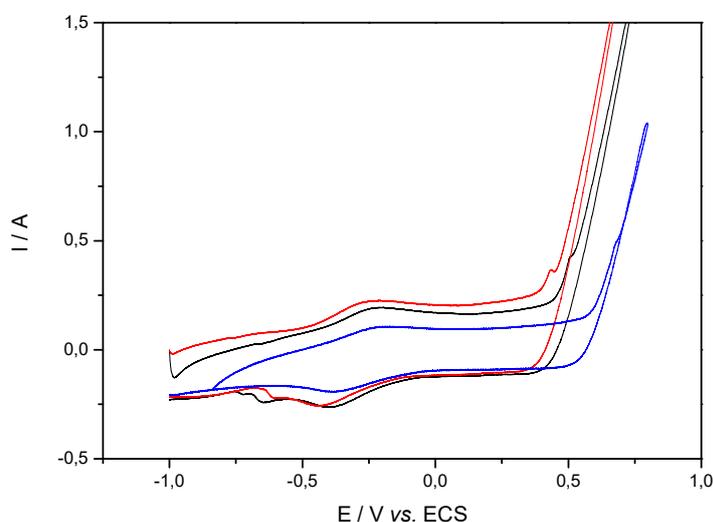


Figura 4.101 – Voltamogramas cíclicos em DSA, (—) em meio NaOH 0,5 M, (—) no início e (—) no fim da eletrólise do amido, traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} , intensidade de corrente aplicada de 2 A.

O amido foi eletrolisado utilizando o eletrodo de DSA com intensidades de corrente de 2 e 5 A. Após 5 horas de eletrólise as soluções foram neutralizadas e a água foi removida por liofilização. Os produtos de oxidação nos dois casos foram analisados utilizando a espectroscopia de infravermelhos (FTIR) e os correspondentes espectros apresentados na Figura 4.102.

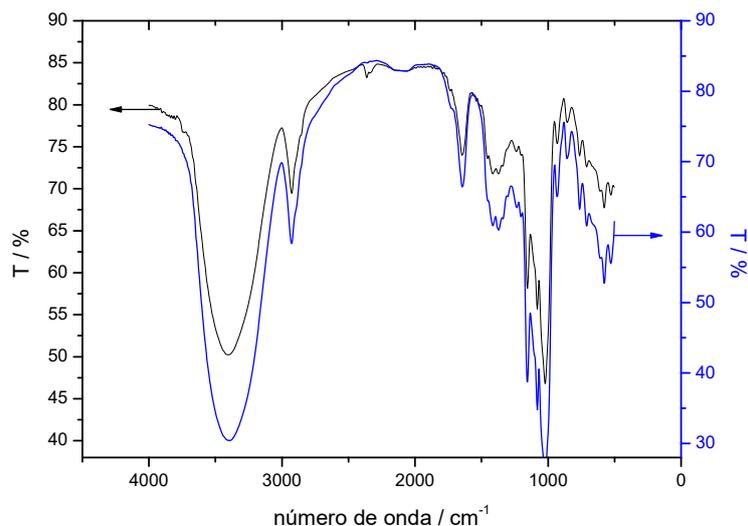


Figura 4.102 - Espectros de infravermelho do amido eletrolisado a 2 A (—) e do amido electrolisado a 5 A (—).

As principais diferenças observadas na forma geral dos espectros de FTIR tem a ver com o desaparecimento da banda intensa localizada a 1735 cm^{-1} , que corresponde à vibração da ligação C=O do grupo carbonilo de duas espécies [1,10] quando se aplica uma intensidade de corrente de 2 A. Em relação ao espectro correspondente à intensidade de corrente de 5 A foi observado bandas de absorção com intensidades muito reduzidas em comparação com o espectro registado para o ânodo de níquel.

- **Teste de iodo**

Os valores de absorvância determinados pelo teste de iodo não sofrem mudanças significativas durante a eletrólise, indicando assim a estabilidade química do amido nestas condições.

4.3.2.2. Oxidação da celulose

A Figura 4.103 apresenta os voltamogramas cíclicos registados para o eletrólito de suporte e na presença de 2g/L de celulose microcristaline no elétrodo de DSA, em meio NaOH 0,5 M.

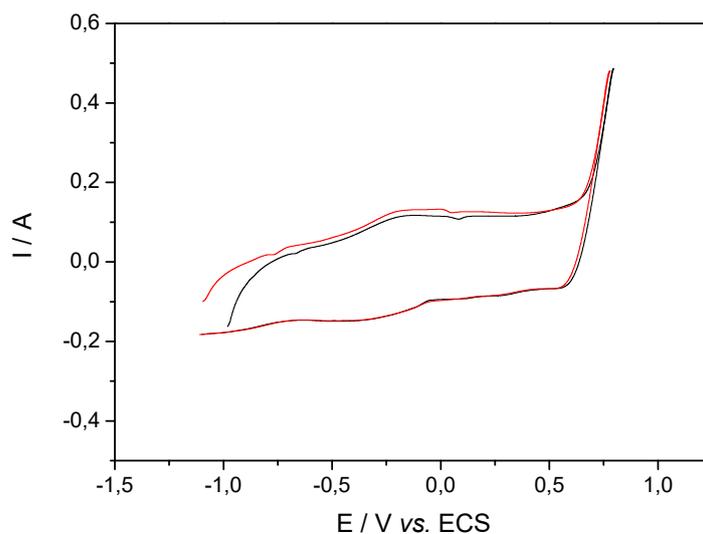


Figura 4.103 – Voltamogramas cíclicos no elétrodo de DSA, em meio NaOH 0,5 M, correspondentes à eletrolise da celulose, traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} (—) eletrólito de suporte e (—) no início.

A celulose microcristalina foi oxidada no elétrodo de DSA aplicando uma intensidade de corrente de 5 A. Após 6 horas de eletrolise a solução eletrolisada foi filtrada utilizando filtros de membrana de Nylon (diâmetro 47 mm; tamanho dos poros $0.45 \mu\text{m}$). O filtrado foi neutralizado, liofilizado e posteriormente analisado por espectroscopia FTIR (Figura 4.104). No espectro FTIR do liofilizado podem ser identificadas as bandas de absorção localizadas a 1735 cm^{-1} , e na região espectral $2600\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$ correspondentes ao grupo ácido carboxílico. Uma diminuição das bandas entre $920\text{-}990 \text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída a uma diminuição de ligações glicosídicas que indica alguma degradação da cadeia polimérica [18].

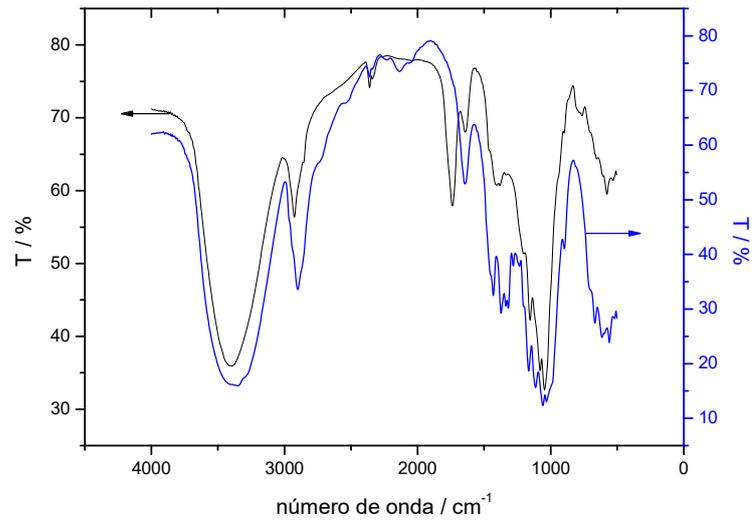


Figura 4.104 - Espectros de FTIR da celulose primária (—) e do eletrolisado da celulose (—).

4.3.3. Oxidação do amido no eléctrodo de nanotubos de carbono modificado com a platina

O amido foi eletrolisado utilizando um eléctrodo de nanotubos de carbono (CNT) modificado com a platina (Pt-CNT). Os catalisadores Pt-CNT foram previamente preparados por impregnação, inicialmente na Universidade do Porto utilizando como suporte uma amostra comercial de nanotubos de carbono de parede múltipla: Nanocyl – 3100 (CNT). Após a impregnação da Pt, os catalisadores foram secos na estufa durante 24 h a 100 °C, posteriormente calcinados em azoto a 200 °C durante 1 h e reduzidos em hidrogénio a 200 °C durante 3 h. Por último, após este tempo as amostras foram arrefecidas em azoto até a temperatura ambiente. Os catalisadores foram caracterizados por TEM. A Figura 4.105 apresenta a distribuição de tamanho das partículas de platina e a imagem obtida por TEM.

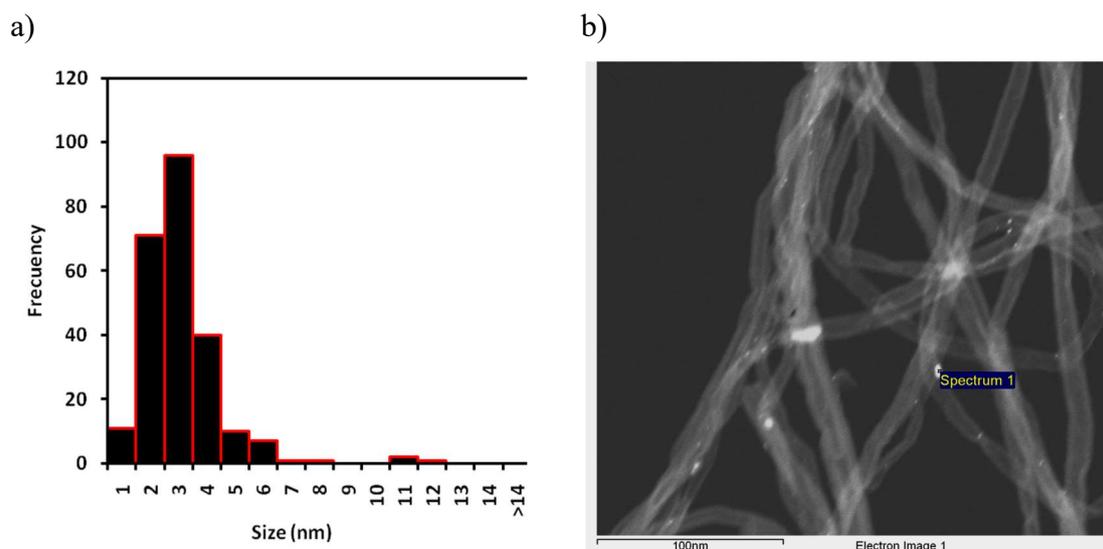


Figura 4.105 - Distribuição de tamanho das partículas de platina (a) e imagem obtida TEM (b).

Para preparar o eletrodo foi cortado um quadrado de 2,5 cm² da folha de carbono Toray (CT). De seguida, foi colado a um fio de platina, com uma cola condutora de carbono, tendo o cuidado de verificar que o fio de platina não estava visível. Depois foi colocado a secar à temperatura ambiente durante 24 h. Após este período procedeu-se à deposição da suspensão do catalisador Pt-CNT, que foi preparada com 0,002 g de catalisador adicionados a 180 µL de água ultra-pura e 180 µL de Nafion 117. Para uma melhor dispersão, esta mistura, foi levada ao ultrasons durante aproximadamente 8 min. Depois foi depositada sobre a folha de carbono Toray, em ambos os lados de modo equivalente, com a ajuda da micropipeta. O eletrodo foi seco à temperatura ambiente durante 12 h, para que os solventes existentes na cola condutora de carbono, fossem evaporados. Antes de se utilizar o eletrodo, este foi mergulhado num copo com água ultra-pura, para verificar se a suspensão estava corretamente depositada na folha de carbono Toray.

O voltamograma cíclico correspondente ao sistema Pt-CNT| amido + 0,5 NaOH 0,5 M, é apresentado na Figura 4. 106. Este voltamograma cíclico foi registado sob as mesmas condições (velocidade de varrimento e limites de potencial) em que foram obtidos os outros voltamogramas, apesar das condições experimentais particulares em que foi preparado o eletrodo. O voltamograma cíclico apresenta uma forma geral semelhante aos obtidos para o mesmo sistema, utilizando a célula eletroquímica clássica de dois compartimentos idênticos separados por uma membrana permutadora de iões (IONAC-MA 3475) e um volume aproximado de 250 cm³ (ver Figura 3.1 do capítulo III). O voltamograma obtido após o fim da eletrólise evidencia um decréscimo de corrente, prova da ocorrência do consumo de amido.

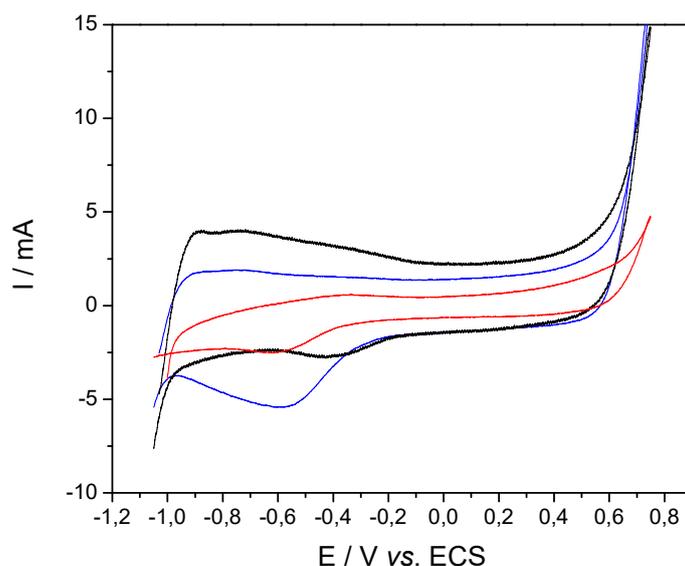


Figura 4.106– Voltamograma cíclico do eletrodo Pt-NTC/CT, em meio NaOH 0,5 M, correspondente a eletrólise do amido, traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} (—) no eletrólito de suporte; (—) no início e (—) no fim da eletrólise.

Na Fig. 4.107 representa-se graficamente a variação do valor de intensidade de corrente máxima em função do tempo da eletrólise. Os valores de intensidade de corrente, que apresentam um máximo nesta região decrescem linearmente à medida que a eletrólise decorre. Pelo contrário, observa-se um aumento da quantidade de eletricidade, sendo este aumento mais notório no início da eletrólise. A quantidade de eletricidade atinge o valor de 280 coulombs no fim de eletrólise. Este valor corresponde aproximadamente a 30 % do valor teórico esperado para a transformação total dos grupos de álcool primário em ácido carboxílico.

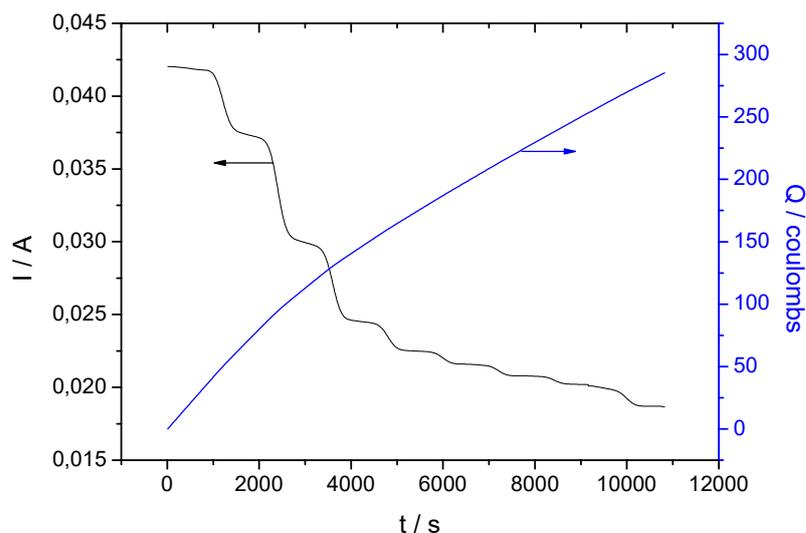


Figura 4.107 - Representação gráfica de intensidade de corrente e da quantidade de eletricidade em função do tempo para a eletrólise do amido no elétrodo Pt-NTC/CT, em meio NaOH 0,5M.

Da mesma forma, as soluções resultantes foram analisadas por FTIR. Apresenta-se na Figura 4.108 o espectro de IV para o amido primário e para o amido eletrolisado.

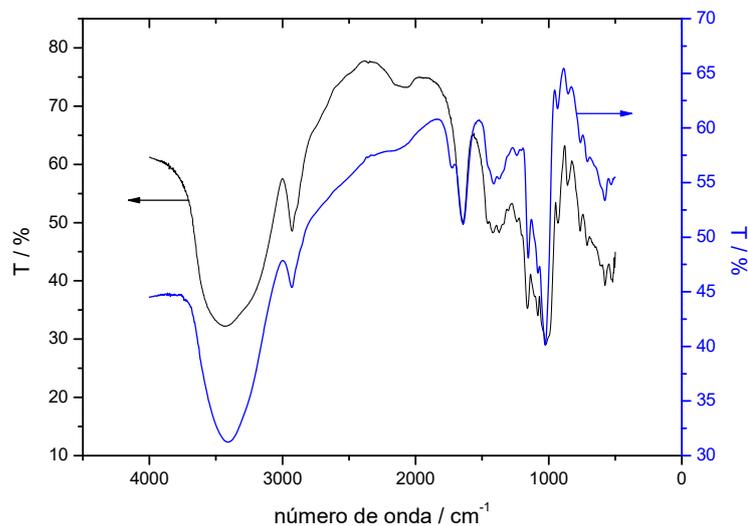


Figura 4.108 – Espectros de infravermelho do (—) amido primário e (—) amido eletrolisado em Pt-NTC/CT.

Como seria de esperar, nos dois espectros são visíveis as bandas intensas e largas na região de 3200-3600 cm^{-1} , correspondentes à espécie que é devido à distensão das ligações O-H. O principal aspeto a realçar da Figura 4.109 tem a ver com a banda de distensão C=O a cerca de 1738 cm^{-1} que é consistente com a estrutura de um ácido carboxílico. Este aspeto mostra ter havido oxidação do aldeído a ácido carboxílico.

Nesta eletrólise a amostra foi também caracterizada por espectroscopia de ^{13}C -RMN e o respetivo espectro é apresentado na Figura 4.110.

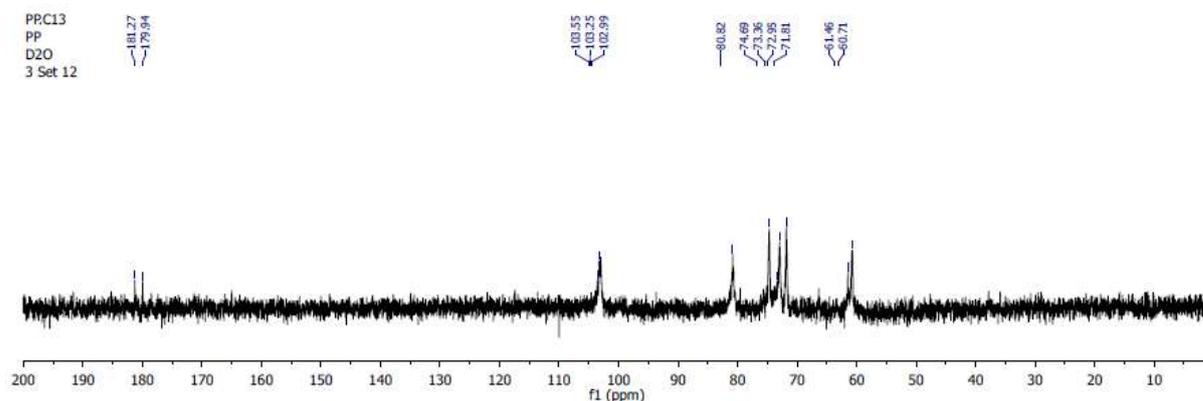


Figura 4.1109 – Espectro ^{13}C -RMN da solução eletrólizada de amido puríssimo no eletrodo de Pt-NTC/CT.

Nota-se uma diminuição no sinal correspondente ao álcool primário (C6) e a presença de sinais na região de grupos carboxílico livre e/ou latona, o que prova a hipótese da oxidação do álcool primário a ácido carboxílico (no carbono C6).

Estas evidências espectroscópicas confirmam os resultados obtidos pela análise de GC-MS, que mostraram ausência de produtos de degradação.

4.3.4. Oxidação do amido utilizando o mediador TEMPO

Foi efetuado o estudo voltamétrico da oxidação eletroquímica do amido utilizando o mediador TEMPO em meio tampão carbonato, a uma velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} . Os voltamogramas do eletrodo de grafite no eletrólito de suporte, em presença de TEMPO no início e no fim da eletrólise do amido (4 g/L) aplicando $0,5 \text{ V}$ são apresentados na Figura 4.110.

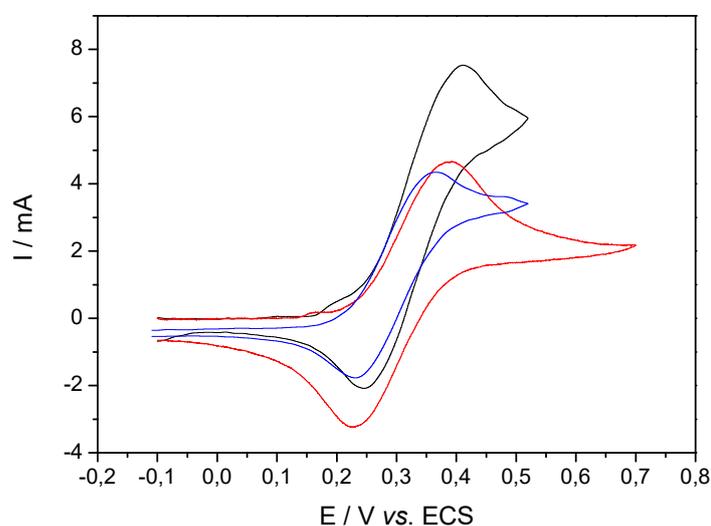


Figura 4.110 – Voltamogramas cíclicos num eletrodo de carbono vítreo, em meio $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ $0,2 \text{ M}$, correspondentes à eletrólise do amido com o mediador TEMPO, traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} (—) eletrólito de suporte; (—) início e (—) no fim.

Na Figura 4.111 representa-se graficamente a variação do valor de intensidade de corrente máxima em função do tempo da eletrólise.

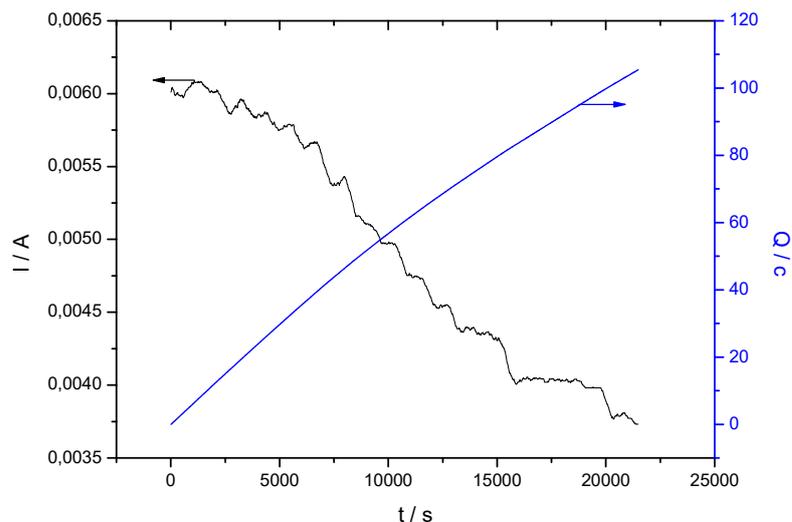


Figura 4.111 - Representação gráfica de intensidade de corrente e da quantidade de eletricidade em função do tempo para a eletrólise do amido em tampão $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, utilizando o mediador TEMPO.

Ao fim de 5 h de eletrólise a quantidade de eletricidade experimental obtida foi ligeiramente superior ao teórico que corresponde aos 90 coulombs.

À semelhança do ocorrido para a celulose, nota-se uma diminuição de intensidade de corrente durante a eletrólise. A diminuição observada neste último caso (Figura 4.111), não foi tão acentuada como a que foi verificada na oxidação dos produtos não poliméricos. Este fato pode estar relacionado à solubilidade limitada dos substratos neste último. A intensidade de corrente diminui durante a eletrólise (Figura 4.111).

O espectro FTIR é apresentado na Figura 4.112. Na região espectral $1700\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$, característica dos modos de vibração da ligação C-O de CO adsorvido (CO_{ads}), é visível numa banda muito intensa a 1735 cm^{-1} do produto eletrolisado, correspondente à espécie CO dos grupos ácidos carboxílicos. Esta conclusão é reforçada pela presença de uma banda larga de absorção na região espectral $2300\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ e uma outra de fraca intensidade entre $1160\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, região da vibração (“stretching”) da ligação C-O dos grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ e $-\text{CHOH}$ (função álcool primário e secundário, respetivamente). Não se notam outras diferenças significativas no espectro do amido oxidado em comparação com o espectro do amido primário. O fato de o espectro relativo à região de impressão digital (fingerprint region) permanecer inalterado para o amido eletrolisado e amido primário, confirma

também que este último não sofreu degradação durante a eletrólise. Esta observação reforça a sugestão de uma oxidação seletiva nos grupos de álcool primário.

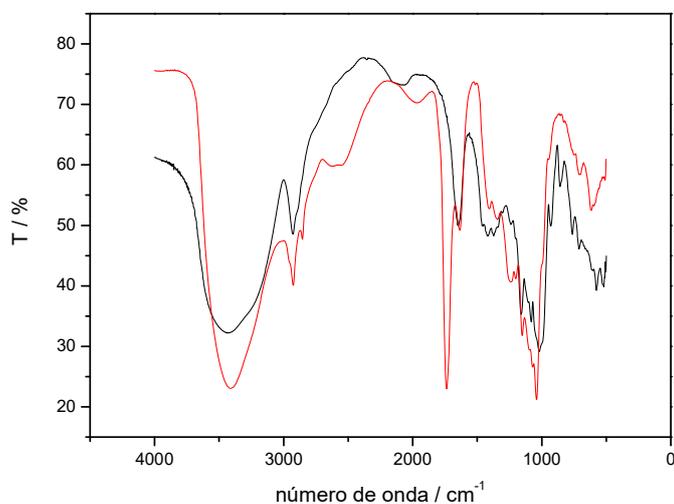


Figura 4.112 - Espectros de infravermelho do (—) amido primário e do (—) eletrolisado de amido.

A Figura 4.113 mostra, a título comparativo, o espectro ¹³C-RMN da amostra eletrolisada do amido.

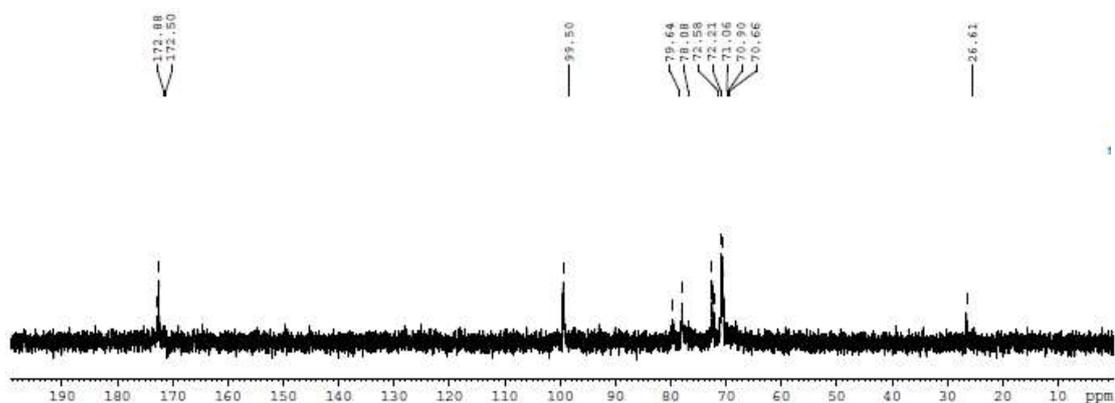


Figura 4.113 – Espectro ¹³C-RMN da amostra eletrolisada do amido a 0,5 V vs. ECS.

Observa-se no espectro ^{13}C -RMN da amostra eletrolisada a ausência de sinal correspondente ao C6 e a presença de sinais na região dos ácidos carboxílicos (172 ppm). Estes resultados analíticos estão de acordo com os resultados de Kato *et al.*, [7] e confirmam a transformação total dos grupos álcoois primários em ácidos carboxílicos.

O número de grupos de ácido carboxílico no produto de eletrólise foi determinado, recorrendo-se a titulação ácido base (Figura 4.114), com uma solução de NaOH 0,005 M. Determinou-se um número de moles do ácido correspondente ao número de grupos glucosilos inicial. Este resultado confirma também, a oxidação total dos grupos álcool primário em ácido carboxílico neste caso.

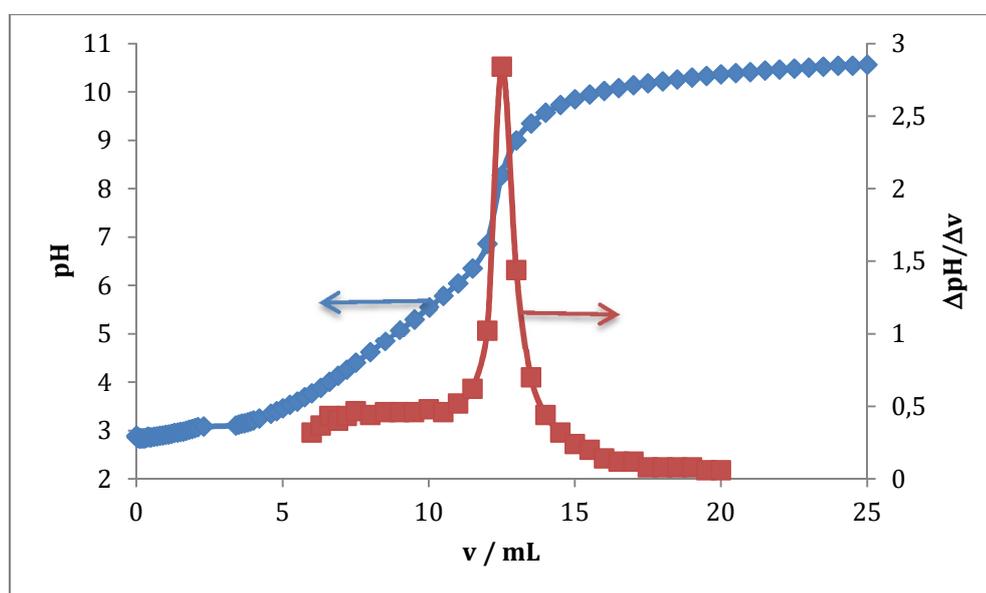


Figura 4.114 - Curva da titulação ácido/base do amido eletrolisado (—) e curva da segunda derivada (—).

4.3.5. Oxidação da dextrina utilizando o mediador TEMPO

A dextrina (4 g/L) foi oxidada em meio tampão carbonato ($\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,2 M) utilizando o mediador TEMPO regenerado no elétrodo de carbono vítreo aplicando um potencial de 0,5 V vs. Ag/AgCl. Na Figura 4.115, apresentam-se os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrólito de suporte, início e fim da eletrólise.

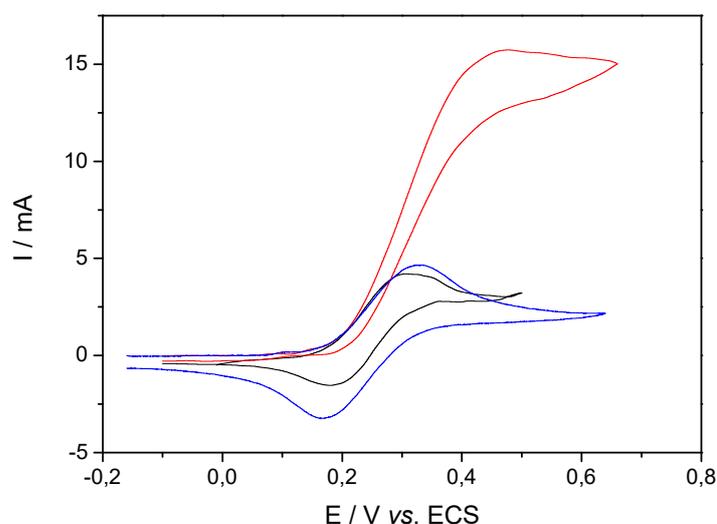


Figura 4.115 – Voltamogramas cíclicos num elétrodo de carbono vítreo, em meio $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,2 M (—), no início (—) e no fim da eletrólise (—) da dextrina, traçados a velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} .

Na Figura 4.116 representa-se graficamente a variação do valor de intensidade de corrente máxima em função do tempo.

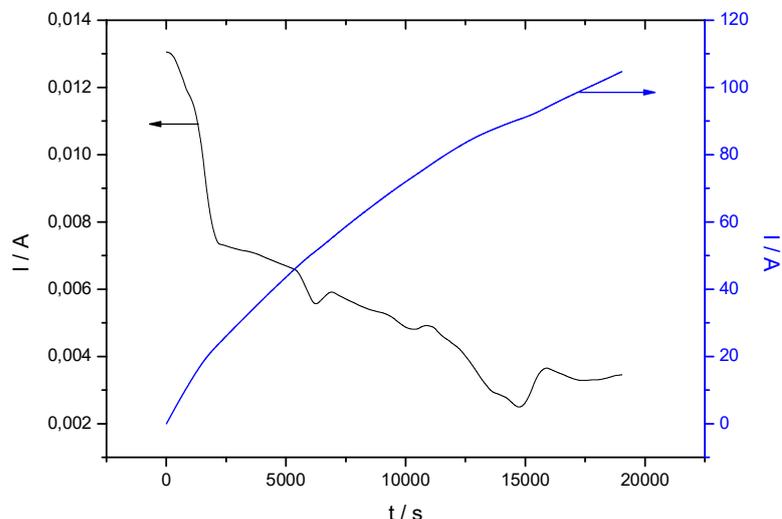


Figura 4.116 - Representação gráfica da intensidade de corrente e da quantidade de eletricidade em função do tempo para a eletrólise da dextrina em tampão $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ utilizando o mediador TEMPO.

O valor da quantidade de eletricidade, no fim de eletrólise atinge 100 coulombs. Este valor corresponde ao valor teórico que contempla uma transformação total dos grupos álcool primário em ácido carboxílico. Este comportamento é semelhante ao observado durante a oxidação eletroquímica do amido nas mesmas condições.

O espectro FTIR, do produto de eletrólise da dextrina, é apresentado na Figura 4.117 e abrange o intervalo espectral entre 4000 e 500 cm^{-1} , evidenciando o efeito da estrutura superficial do eletrodo sobre a natureza das espécies fortemente adsorvidas formadas durante o processo de eletrólise. A presença de uma banda a 1580 e outra a 1418 cm^{-1} , corresponde ao modo de vibração assimétrica dos grupos carboxílatos formados a partir da oxidação dos álcoois primários da dextrina. Estas evidências espectroscópicas confirmaram os resultados obtidos por ^{13}C -NMR de uma oxidação dos grupos álcool primário.

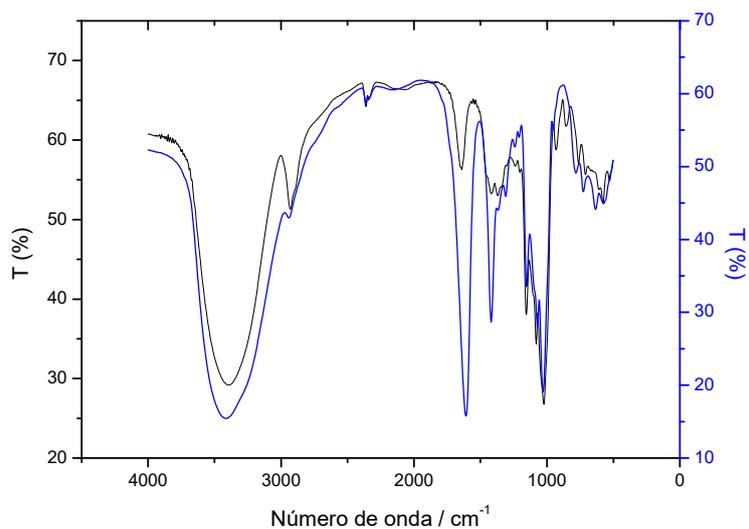
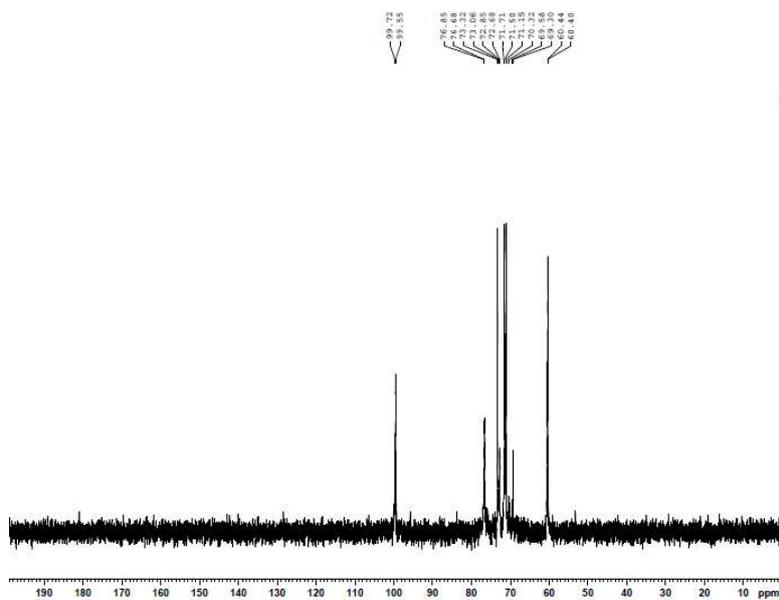


Figura 4.117 - Espectros de infravermelho da dextrina primária (—) e do eletrolisado da dextrina (—).

Foi também efectuada uma análise ¹³C-NMR para determinar-se a posição do grupo ácido carboxílico no produto de oxidação da dextrina (Figura 4.118). As soluções foram preparadas com óxido de deutério (água deuterada – D₂O), para evitar interferências e deixar a zonas dos ácidos livre de ruído, facilitando a interpretação do espetro.

a)



b)

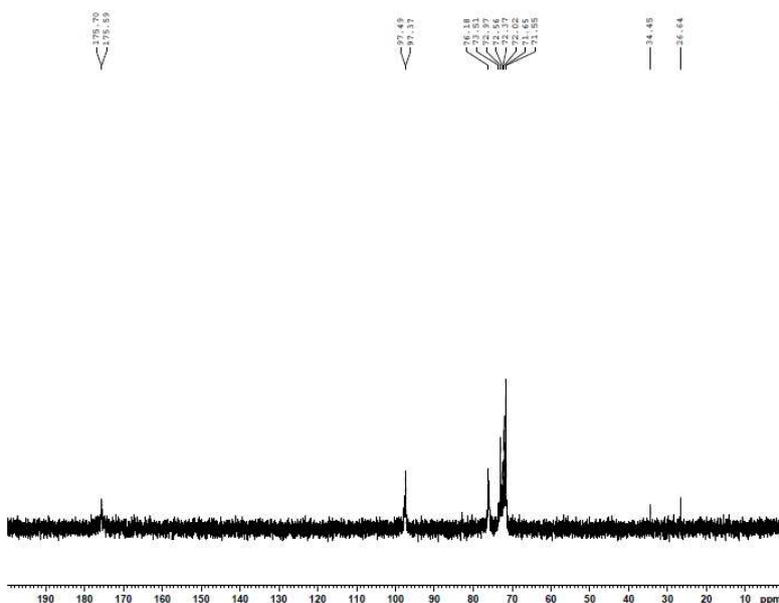


Figura 4.118 – Espectro ^{13}C -RMN da amostra em D_2O da a) dextrina primária e da b) eletrolisado da dextrina a 0,5 V.

À semelhança do que foi observado para o amido, também neste caso nota-se o aparecimento de um sinal na região dos ácidos e o desaparecimento do sinal correspondente ao carbono C6, após a oxidação com o TEMPO [19]. Este resultado confirma a oxidação seletiva e completa dos grupos de álcool primário.

4.3.6. Oxidação da celulose microcristalina utilizando o mediador TEMPO

Uma molécula da celulose tem um arranjo linear de unidades de D-glucose ligadas por ligação β -1,4 e possui muitos grupos hidroxílicos disponíveis para participarem nas ligações de hidrogénio entre as cadeias moleculares da celulose adjacente (Figura 4.119).

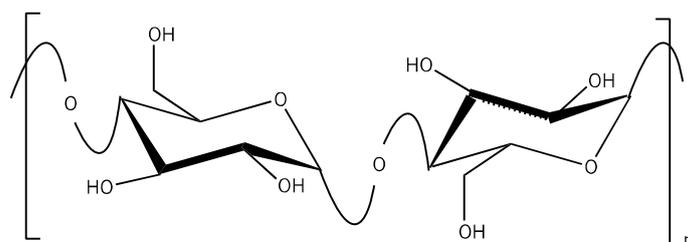


Figura 4.119 – Estrutura da molécula da celulose.

Foi efetuada uma eletrólise no elétrodo de carbono vítreo (a potencial $E = 0,5 \text{ V vs. ECS}$) de soluções da celulose em presença de quantidade catalítica (5 % em moles por álcool primário e/ou aldeído) do mediador tempo.

Na Figura 4.120 estão apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para o TEMPO e para a oxidação do TEMPO em presença da celulose num elétrodo de carbono vítreo em tampão carbonato. Na ausência da celulose obtém-se um voltamograma típico de um sistema reversível, observando-se um pico anódico relativo a oxidação reversível do TEMPO ao correspondente ião oxoamónio (TEMPO^+) e no varrimento catódico um pico correspondente à redução do ião TEMPO^+ à sua forma hidroxilamina. Em presença da celulose há diferenças significativas no voltamograma obtido, observando-se o desaparecimento do pico catódico e um aumento significativo da densidade de corrente anódica, indicativo de um processo de oxidação catalítico.

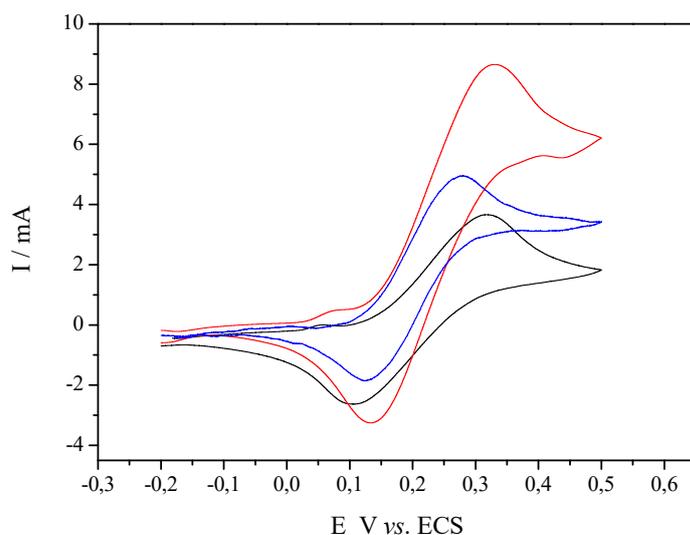


Figura 4.120 – Voltamogramas cíclicos num eléctrodo de carbono vítreo, em meio $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,2 M, correspondentes à eletrolise de celulose, traçados à velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} . (—) eletrólito de suporte; (—) início e (—) no fim.

Apresenta-se na Figura 4.121, os espetros de FTIR para o eletrolisado da celulose microcristalina e para o ácido poligalaturónico comercial.

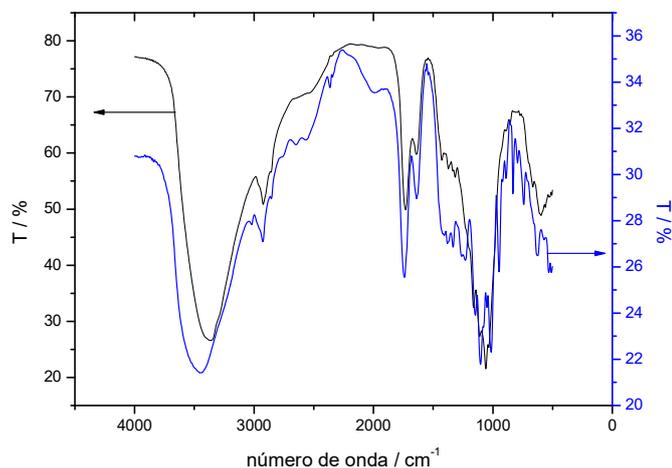


Figura 4.121 – Espectro de infravermelho de (—) eletrolisado da celulose microcristalina e (—) ácido poligalaturónico.

De igual modo ao que foi observado para a oxidação no eletrodo de níquel. No espectro da Figura 4.121, verifica-se a existência de bandas correspondentes ao grupo de ácido carboxílico embora, com maior intensidade para a oxidação com o TEMPO. É o caso da banda intensa localizada a 1738 cm^{-1} , que corresponde à vibração da ligação C=O do grupo carbonílo de uma espécie ácido carboxílico/latona. Esta espécie saturada, de estrutura cíclica, possui um anel de seis membros (δ – latona). Esta conclusão é reforçada pela presença de uma banda larga de absorção entre $2300\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ e uma outra de fraca intensidade na região espectral de $1160\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ [10]. A região do espectro designada por região de impressão digital não se nota grandes diferenças quando comparada com o espectro de celulose microcristalina primária (Figura 4.101).

Separação de produtos de oxidação neutros e ácidos por LEX/SEC

Após hidrólise enzimática da celulose e TEMPO com a β -celulase, os oligossacarídeos formados foram fracionados por LEX/SEC de modo a obter misturas mais simples e mais fáceis de analisar por ESI-MS. Obtiveram-se várias frações como se mostra na Figura 4.122 que representa o cromatograma LEX/SEC da celulose e TEMPO obtido após hidrólise enzimática. Verificou-se a eluição dos oligossacarídeos em três picos principais. De acordo com os resultados dos estudos anteriores [1,2,3,4], o pico com o tempo de eluição mais baixo (10-12 min; F10) no cromatograma foi designado para os produtos ácidos da celulose. Além disso, considerando o tempo de eluição da celulose (máximo do pico a 19 min), a fração eluída entre 18-20 min foi atribuído principalmente aos dissacarídeos neutros. Por fim, a fração a 17 min foi atribuída aos oligossacarídeos não modificados (mono, di e trissacarídeos).

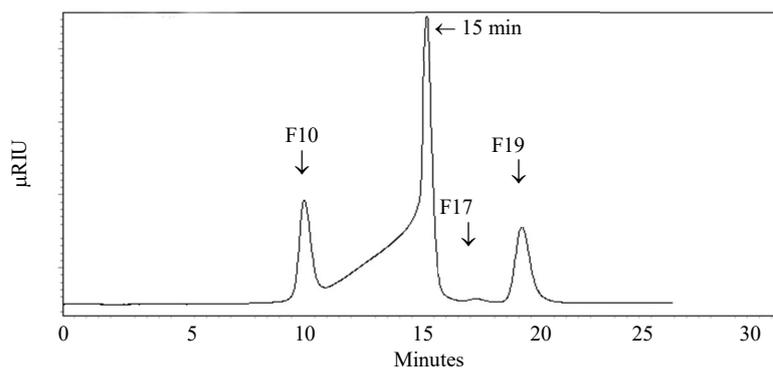


Figura 4.122 – Cromatograma LEX(Sec) da celulose e TEMPO obtida após hidrólise enzimática com a β -celulase.

Caraterização dos produtos de oxidação por espectrometria de massa, ESI-MS e ESI-MS/MS

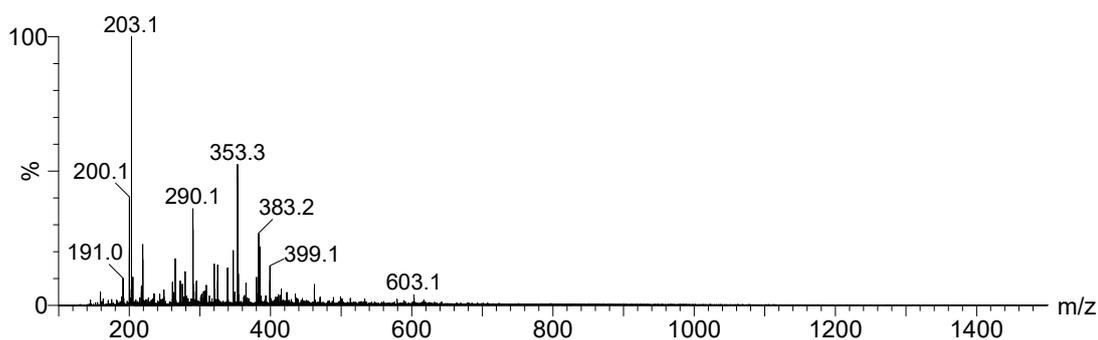
Para o estudo de oligossacarídeos a espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI) é muito utilizada. A caraterização estrutural destes, nomeadamente com a identificação da sua composição em monossacarídeos, identificação do tipo de ligação e ramificações presentes na cadeia principal, é conseguida por Espectrometria de Massa Tandem (MS/MS de iões formados em ESI).

De seguida iremos apresentar os resultados obtidos da caraterização estrutural, por ESI-MS e ESI-MS/MS.

Análise dos espectros de ESI-MS dos produtos de oxidação da fração neutra (F19)

Nos espectros ESI-MS das frações analisadas observaram-se os iões $[M+Na]^+$ dos diferentes oligossacarídeos presentes nas diferentes frações. Como já foi referido, a formação dos iões $[M+Na]^+$ é característica da ionização de oligossacarídeos pelo método de ionização ESI. Os espectros ESI-MS da fração neutra (F19) são apresentados na Figura 4.123.

a)



b)

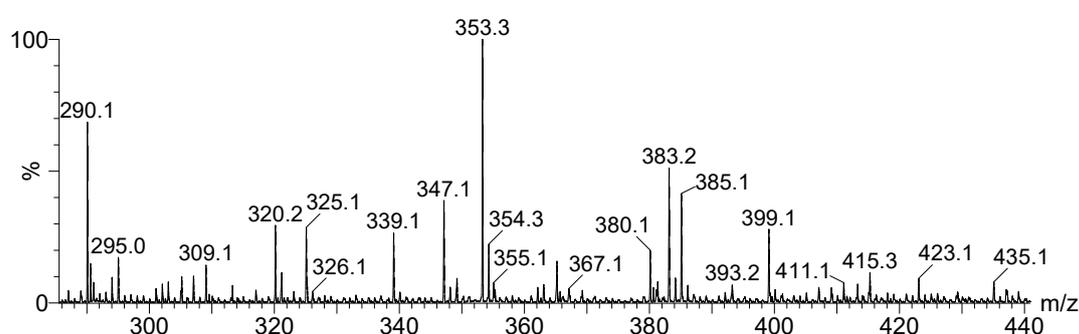


Figura 4.123 – Espectros de ESI-MS da fração neutra (F19) da celulose e TEMPO **(a)** espectro MS completo **(b)** espectro MS da área ampliadas [m/z : 290-430].

Os iões observados e identificados nos espectros de ESI-MS da fração neutra (F19) da celulose e TEMPO estão resumidos na Tabela 4.16, com indicação m/z dos adutos de sódio, $[M+Na]^+$ bem como a sua possível identificação atribuída com base no peso molecular e no estudo dos espectros de ESI-MS/MS.

Na Tabela 4.16 os iões encontram-se agrupados em séries de iões diferentes de acordo com o tipo de produto, como por exemplo: (1) Hex₂ e Hex₃ e os produtos despolimerizados; (2) derivados com adição de grupos ceto e -OH. Os espectros de todos os produtos obtidos para os di e trissacarídeos de carácter neutro permitiram confirmar as atribuições propostas, tal como será descrito mais adiante.

Tabela 4.16 - Resumo dos iões observados nos espectros de ESI/MS da fração neutra (F19), de oxidação da celulose e TEMPO com os respectivos valores m/z dos respectivos iões $[M+Na]^+$, identificações e frações em que foram encontrados.

n		2	3
		m/z	
Derivados com adição de grupos Ceto, -OH			
Hex _n -2H	(-2)	363	
Hex _n +2(OH)	(+34)	399	
Derivados da clivagem C1 -C2			
Hex _n -CO	(-28)		499
Hex _n -CO +O	(-12)	353	
Hex _n -CO +3O	(+20)	385	
Hex _n +2H	(+2)	367	
Hex _n -CH ₂ O +2O -2H	(+0)	365	
Derivados da clivagem C2 -C3			
Hex _n -C ₂ H ₂ O ₂	(-58)	307	
Hex _n -C ₂ H ₂ O	(-42)	323	
Hex _n -C ₂ H ₂ O ₂ +2O	(-26)	339	
Hex _n -C ₂ H ₄ O ₂	(-60)	305	
Hex _n -C ₂ H ₂ O -2H	(-44)	321	

É também importante notar que alguns dos neutros apresentados (Tabela 4.16) e dos ácidos (Tabela 4.18) podem ser isômeros. Como se esperava, considerando o tempo de eluição LEX/SEC, o ião identificado mais abundante no espectro ESI-MS da F19 foi o ião de m/z 353 ($[Hex_2 -CO +O]$), que permitiu confirmar a presença da He₂, não modificados. Além disso, este oligossacarídeo pode corresponder à estrutura linear da celulose onde a enzima não atuou ou pode corresponder ao oligossacarídeo que possui na sua cadeia principal resíduos de glucose. Estes oligossacarídeos de hexoses também podem corresponder a estruturas ramificadas, ligadas ao resíduo de glucose. Isto está de acordo com a análise dos açúcares constituintes desta amostra que mostrou a presença de glucose.

Derivados da adição de grupos Ceto e -OH das séries de iões com -2 e +34 Da foram identificados como sendo $[\text{Hex}_2-2\text{H} + \text{Na}^+]$ e $[\text{Hex}_2+2(\text{OH}) + \text{Na}^+]$, respetivamente contendo um e dois grupos Ceto adicionados. Por outro lado, os produtos neutros de oxidação contendo um grupo -OH adicional, podem resultar do ROOH formando hidratos.

Semelhante aos produtos ácidos de oxidação, vários derivados neutros foram identificados como resultado da clivagem da ligação C-C, mencionado na Tabela 4.15. Foi identificado um ião com -28 Da do que $[\text{Hex}_n + \text{Na}]^+$, atribuído como sendo $[\text{Hex}_3 - \text{CO} + \text{Na}^+]$. Este produto foi identificado como sendo resultado da clivagem da ligação C1-C2 da extremidade redutora. Uma série com adição de grupos -OH e Ceto foi também identificada: $[\text{Hex}_2-\text{CO}+\text{O} + \text{Na}]^+$, $[\text{Hex}_2-\text{CO} + 3\text{O} + \text{Na}]^+$, $[\text{Hex}_2+2\text{H}-\text{CH}_2\text{O} + 2\text{O} + \text{Na}]^+$ e $[\text{Hex}_2-\text{CH}_2\text{O} + 2\text{O} - 2\text{H} + \text{Na}]^+$.

Foram também identificados oligossacarídeos compostos por iões com -58, -42, -26, -60 e -44 Da do $[\text{Hex}_n + \text{Na}]^+$, designados como sendo $[\text{Hex}_2 - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Na}]^+$, $[\text{Hex}_2 - \text{C}_2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$, $[\text{Hex}_2 - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{O} + \text{Na}]^+$, $[\text{Hex}_2 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + \text{Na}]^+$ e $[\text{Hex}_2-\text{C}_2\text{H}_2\text{O} - 2\text{H} + \text{Na}]^+$. Estes produtos são resultado da clivagem da ligação C2-C3 do resíduo do açúcar localizado na extremidade do correspondente oligossacarídeo não modificado. É importante referir que alguns destes derivados neutros foram também identificados após a oxidação da amilose e da amilopectina.

A composição dos diferentes iões foi proposta de acordo com os dados obtidos por espectrometria de massa Tandem, utilizando um espectrómetro de massa trapa de iões (do inglês Ion Trap). Este espectrómetro de massa permite a realização de espectros de ESI-MS/MS o que nos permite obter informações sobre a sequência em monossacarídeos.

Análise dos espectros de ESI-MS/MS dos produtos de oxidação

A fragmentação de oligossacarídeos sob condições de ESI-MS/MS resulta em quebras de ligações glicosídicas entre dois resíduos de açúcar e em quebras do anel, conforme se ilustra na Figura 4.124.

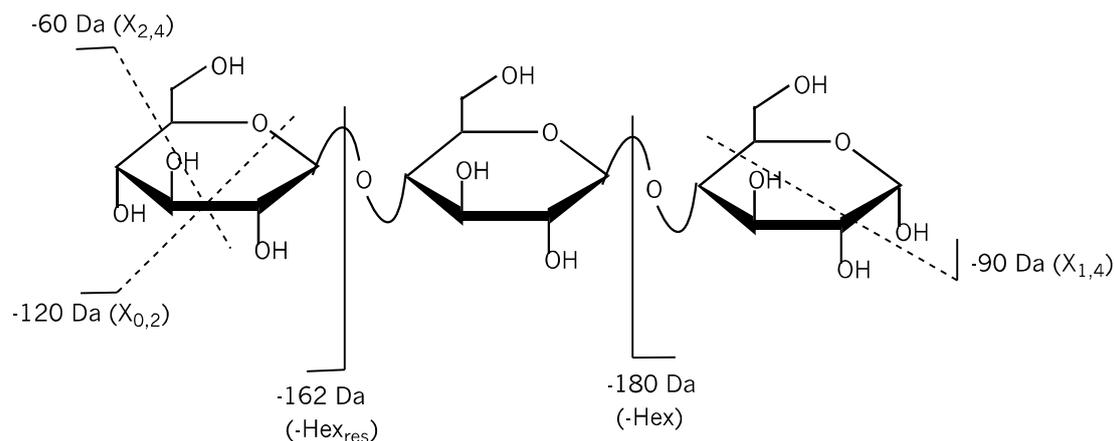


Figura 4.124 – Formação de íons fragmentados de um trissacarídeo de maltotriose em ligação β -(1 \rightarrow 4).

Os fragmentos resultantes das quebras das ligações glicosídicas dão informação sobre a composição em monossacarídeos. A fragmentação observada para as quebras do anel permite concluir acerca do tipo de ligação presente, pela perda de $C_2H_4O_2$ (-60 Da), $C_3H_6O_3$ (-90 Da), $C_4H_8O_4$ (-120 Da) para dissacarídeos ligados por (1 \rightarrow 6); pela perda de $C_2H_4O_2$ (-60 Da), $C_4H_8O_4$ (-120 Da) para dissacarídeos ligados por (1 \rightarrow 4); pela perda de $C_3H_6O_3$ (-90 Da) para dissacarídeos ligados por (1 \rightarrow 2) [9]. Os espectros de ESI-MS/MS foram obtidos para todos os íons identificados.

ESI-MS/MS dos produtos de oxidação da fração neutra (F19) da celulose

Foram adquiridos os espectros de ESI-MS/MS de todos os íons desta série. Os espectros de ESI-MS/MS dos íons atribuídos a derivados neutros e ácidos dos produtos de oxidação da celulose e TEMPO (Tabelas 4.16), com íons $[M+Na]^+$ identificados nos espectros ESI-MS de ambas as frações, destacam a importância da análise MS/MS, confirmando deste modo as estruturas propostas para os íons observados por MS. Na Figura 4.125 encontra-se apresentado o espectro de MS/MS do íon de m/z 353 corresponde ao íon $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) e a estrutura proposta para o mesmo. Podemos observar a perda principal de uma hexose (-180 Da) com formação do íon de m/z 173. Observa-se também a perda de -120 Da ($C_4H_8O_4$) e a perda -90 ($C_3H_6O_3$)

correspondente à perda do anel pirânico da hexose terminal 1→4. Com base nestes dados propomos que o ião m/z 353 corresponde a um monossacarídeo de hexose ramificada com possível estrutura, conforme é apresentado na Figura 4.125.

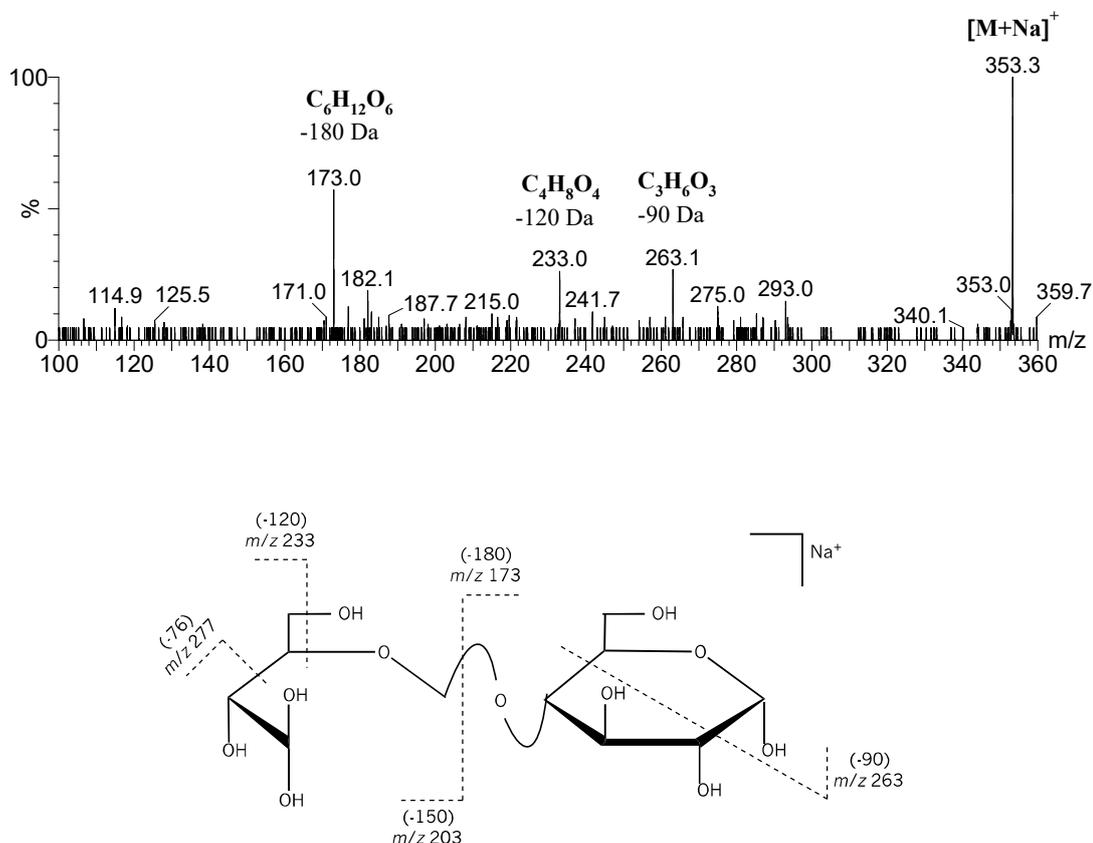


Figura 4.125 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do o ião m/z 353 ($[Hex_2-CO+Na]^+$) correspondente ao ião $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da celulose e TEMPO.

A Figura 4.126 apresenta o espectro de MS/MS do ião m/z 385 e a estrutura proposta para o mesmo. Neste espectro podemos observar a perda principal do grupo acetilo (-60 Da) sob a forma de ácido acético com formação do ião de m/z 325. Observa-se ainda a perda de água a partir do terminal redutor (-18 Da) e a perda de hexose (-180 Da) com formação do ião m/z 205 e a perda de um resíduo de hexose (-120 Da) com formação do ião m/z 365.

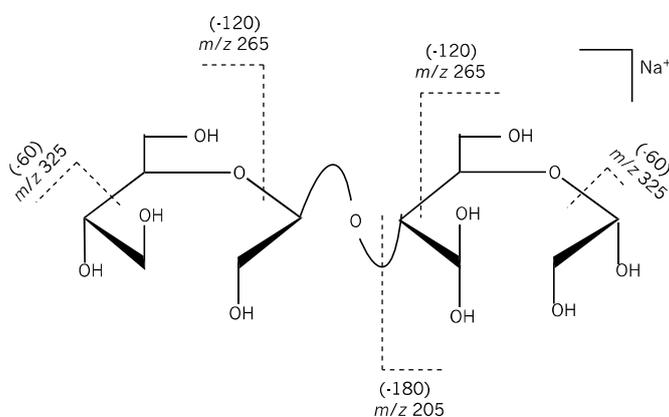
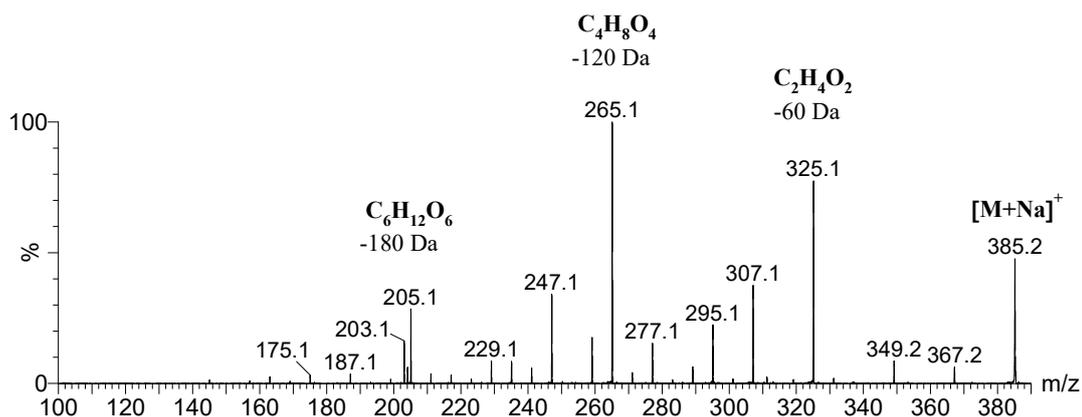


Figura 4.126 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do íon m/z 385 ($[\text{Hex}_2\text{-CO}+3\text{O}+\text{Na}]^+$) correspondente ao íon $[\text{M}+\text{Na}]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da celulose e TEMPO.

A Figura 4.127 representa o espectro de MS/MS do íon de m/z 307 e a estrutura proposta para o mesmo. Neste espectro podemos observar a perda de -120 Da com formação do íon de m/z 187. Observa-se ainda a perda principal do grupo acetilo (-60 Da) sob a forma de ácido acético com formação do íon de m/z 247. Observa-se também a perda de água a partir do terminal redutor (-18 Da).

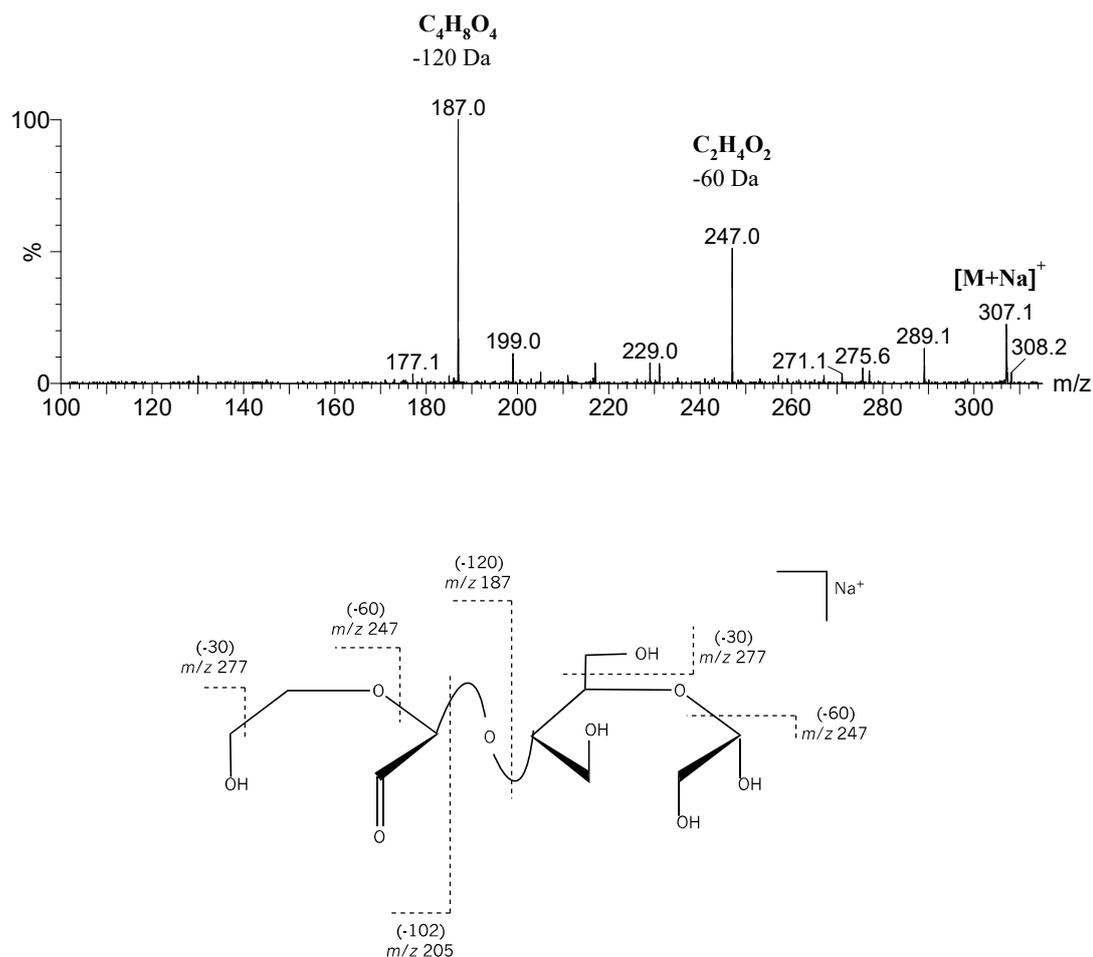


Figura 4.127 – Espetro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do íon m/z 307 ($[\text{Hex}_2\text{-C}_2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Na}]^+$) correspondente ao íon $[\text{M} + \text{Na}]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da celulose e TEMPO.

A Figura 4.128 apresenta o espectro de MS/MS do íon de m/z 323. Podemos observar a perda de $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ (-90 Da) a perda de água a partir do terminal redutor (-18 Da) e a perda de -60 Da ($-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) e -120 Da ($-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4$). A perda -60 Da, -90 Da e 120 Da também pode corresponder à quebra do anel resultante das hexoses em ligação 1-4 da cadeia principal. Observa-se ainda a perda da hexose (-180 Da) com formação do íon de m/z $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.

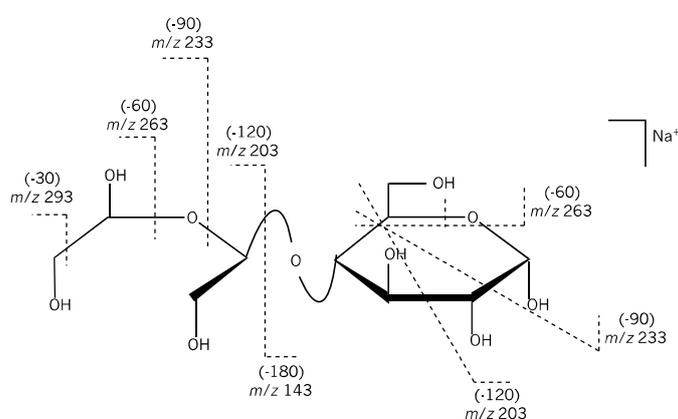
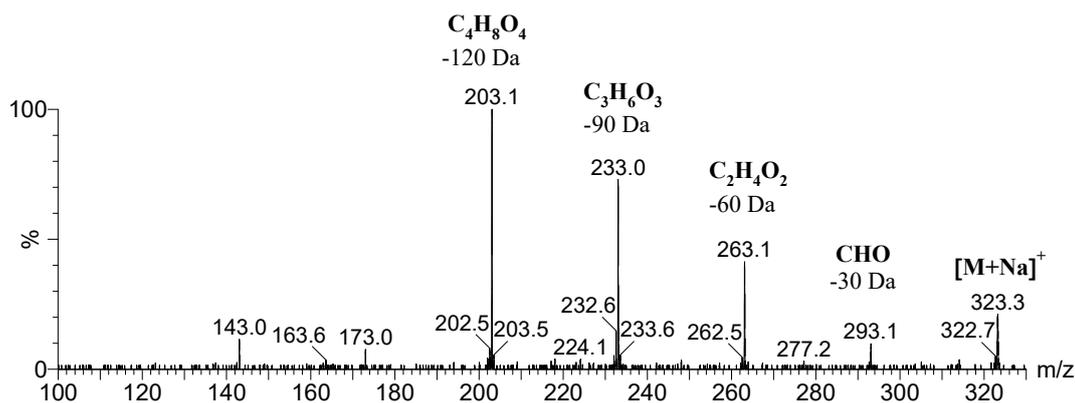


Figura 4.128 - Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do íon de m/z 323 ($[\text{Hex}_2\text{-C}_2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O} + \text{Na}]^+$) correspondente ao íon $[\text{M} + \text{Na}]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da celulose e TEMPO.

A Figura 4.129 mostra o espectro de MS/MS do íon de m/z 339 da fração F19. Este mostra o íon de m/z 159, o íon de m/z 219 (com abundância relativa muito acentuada), o íon de m/z 249 e o íon de m/z 279 correspondente a perda à perda principal do grupo acetilo (-60 Da) sob a forma de ácido acético.

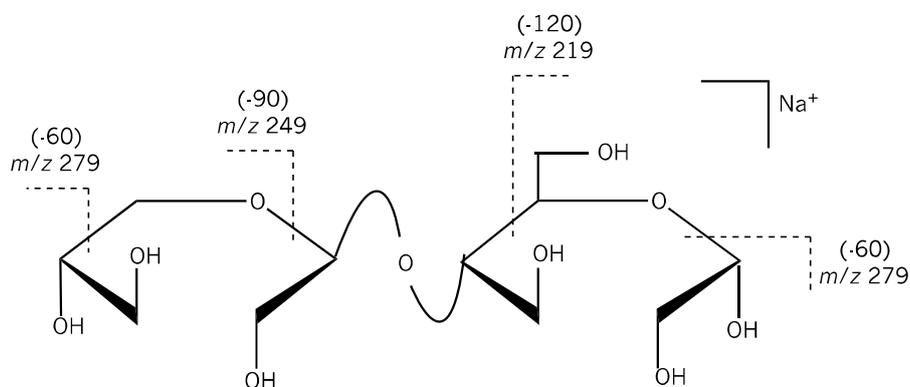
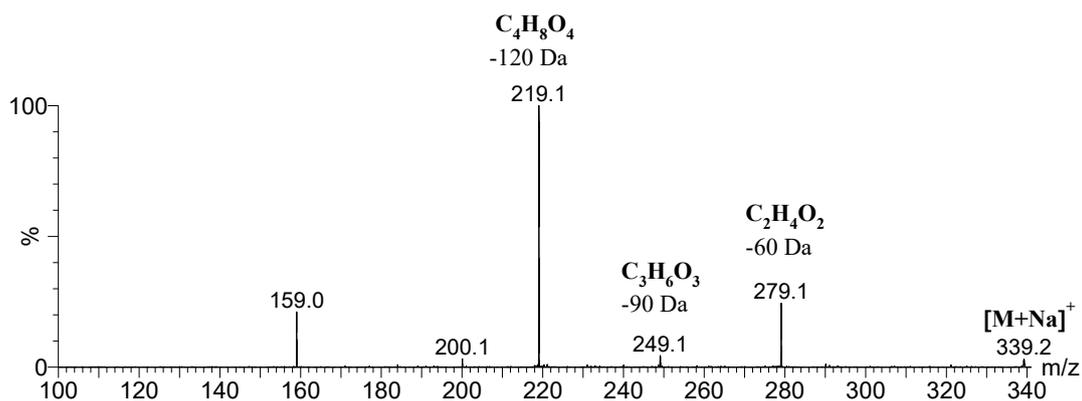


Figura 4.129 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do íon de m/z 339 ($[\text{Hex}_2\text{-C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + 2\text{O} + \text{Na}]^+$) correspondente ao íon $[\text{M} + \text{Na}]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da celulose e TEMPO.

Na Figura 4.130 que representa o espectro de MS/MS do íon de m/z 399, podemos observar a perda principal de uma hexose (-180 Da) com formação do íon com maior abundância relativa de m/z 219, observa-se também a perda de -60 Da ($-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), -120 Da ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4$) e -90 Da ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) correspondentes à quebras do anel de uma hexose terminal em ligação 1-4.

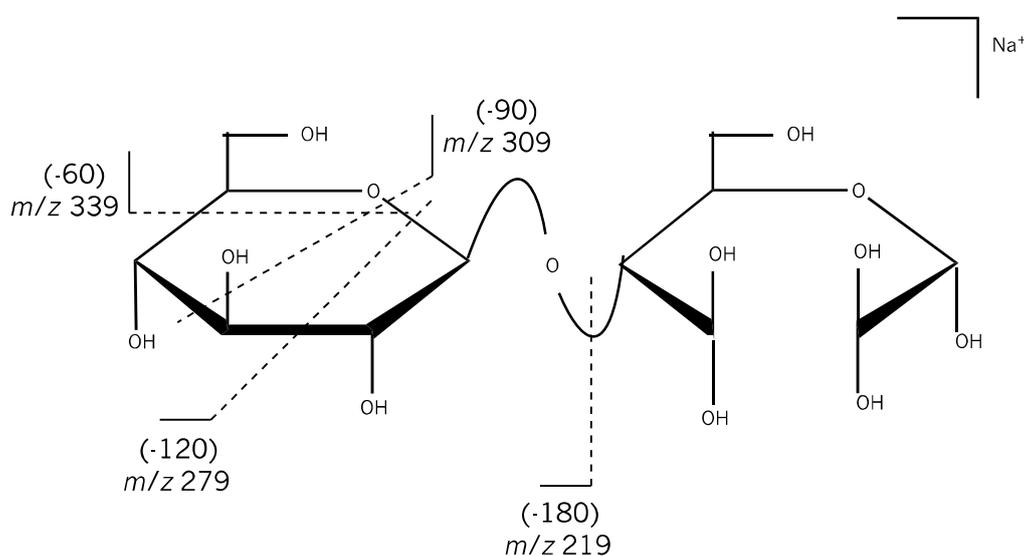
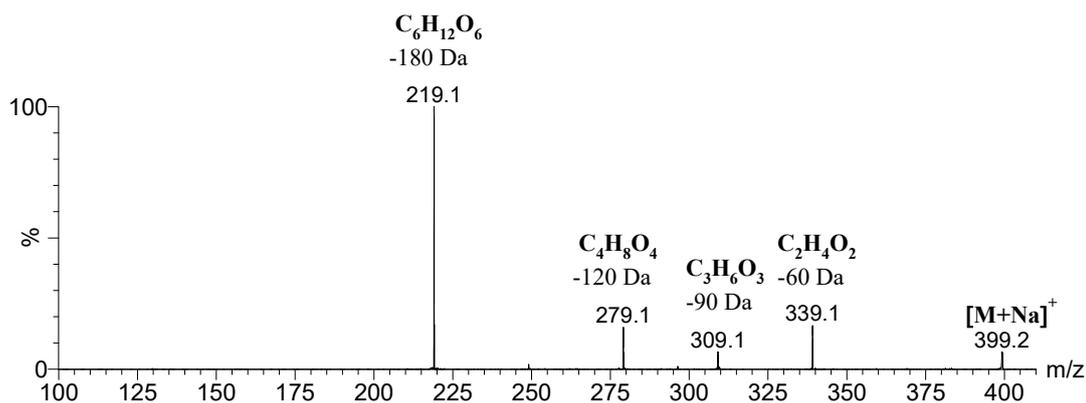


Figura 4.130 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do íon de m/z 399 ($[\text{Hex}_2+2\text{OH}+\text{Na}]^+$) correspondente ao íon $[\text{M}+\text{Na}]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da celulose e TEMPO.

A Figura 4.131 apresenta o espectro de MS/MS do íon de m/z 363, que corresponde ao oligossacarídeo com perda principal de -120 Da com formação do íon de m/z 243 e a perda principal do grupo acetilo (-60 Da) sob a forma de ácido acético com formação do íon de m/z 303. Observa-se a perda de hexose (-180 Da) com formação do íon m/z 183 e observa-se também a formação do íon de m/z 273 que corresponde à perda de -90 Da ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$).

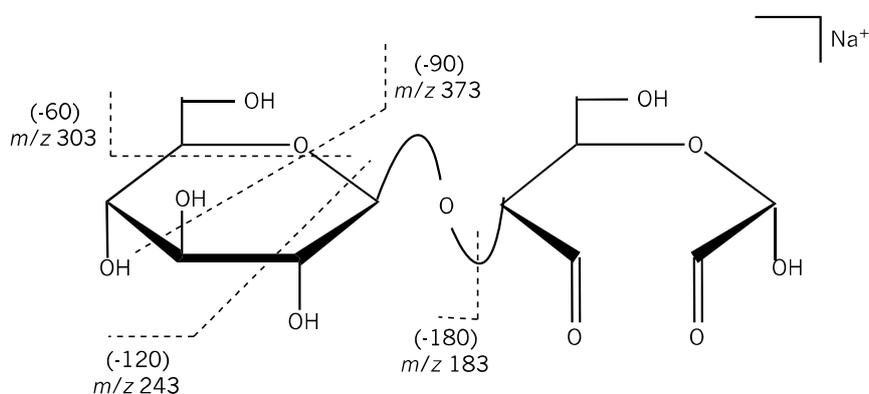
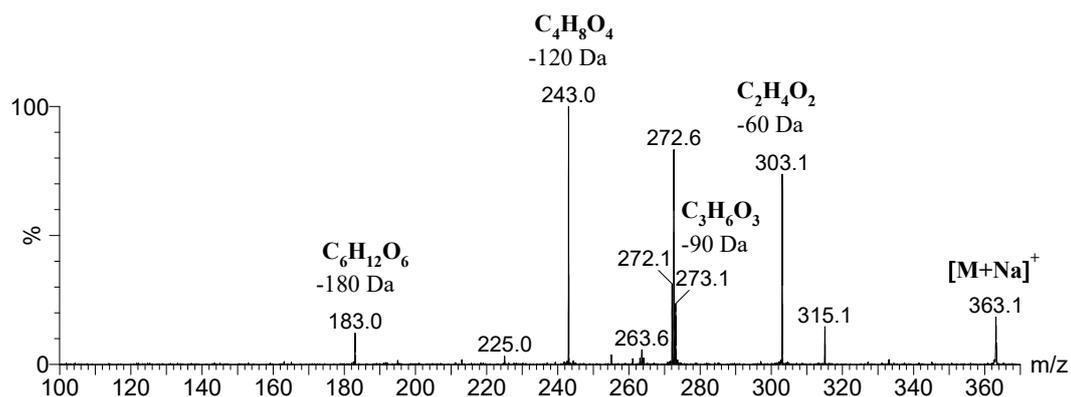


Figura 4.131 – Espetro de ESI-MS/MS e estrutura proposta para o íon de m/z 363 ($[\text{Hex}_2\text{-2H} + \text{Na}]^+$) correspondente ao oligossacarídeo ao íon $[\text{M} + \text{Na}]^+$ da fração neutra (F19) da celulose e TEMPO.

O espectro de MS/MS correspondente ao íon de m/z 321 é apresentado na Figura 4.132 onde podemos observar a perda principal de um resíduo de -90 Da com formação do íon de m/z 231 e a perda de -120 Da (C₄H₈O₄). Observa-se ainda a perda de -30 Da (-CH₂O) com formação do íon de m/z 291 e a perda de -60 Da que pode corresponder igualmente à quebra do anel terminal em ligação 1-4.

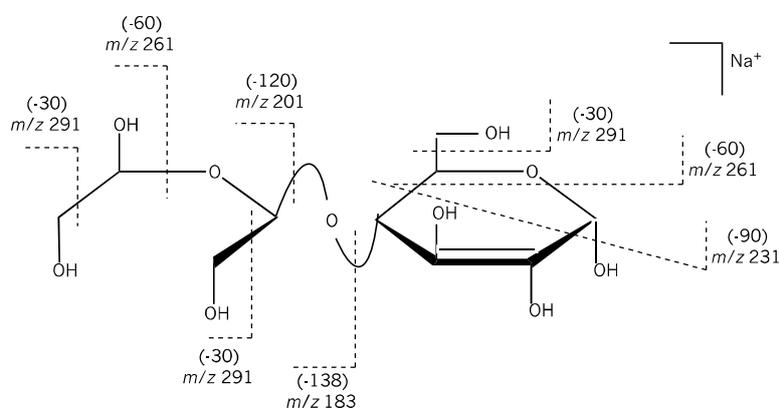
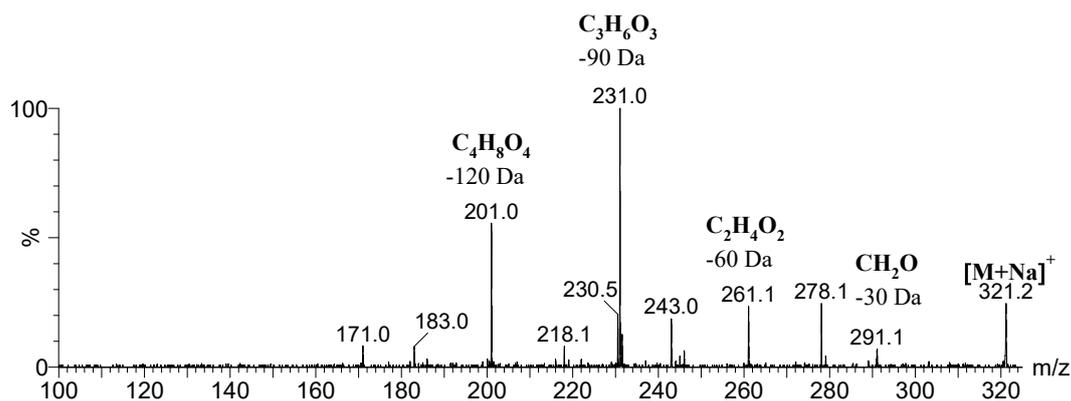


Figura 4.132 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta para o íon de m/z 321 ($[\text{Hex}_2\text{-C}_2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$) correspondente ao íon $[\text{M} + \text{Na}]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da celulose e TEMPO.

No espectro de MS/MS do íon m/z 499 apresentado na Figura 4.133 podemos observar as perdas de -60 Da, -90 Da e -120 Da correspondentes à quebra do anel resultantes da hexoses em ligação 1-4 da cadeia principal. Observa-se também a perda da hexose (-180 Da) com formação do íon de m/z 319.

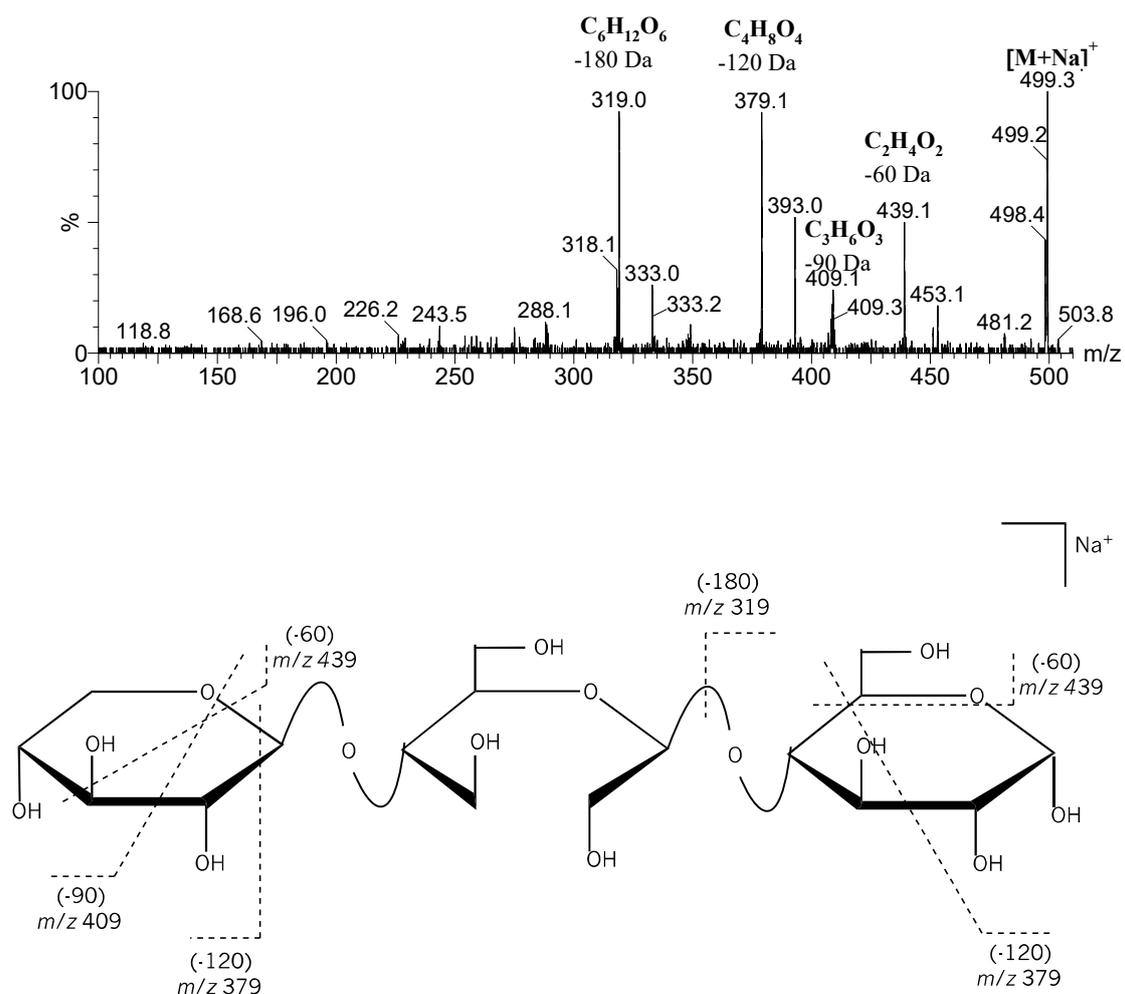


Figura 4.133 – Espetro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 499 ($[Hex_3-CO + Na]^+$) correspondente ao ião $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da celulose e TEMPO.

Na Figura 4.134 podemos observar as perdas principais do acetilo (-60 Da) sob a forma de ácido acético com formação do ião de m/z 305, perda de -120 Da e a perda de -90 Da com formação do ião de m/z 275. Estas perdas podem também corresponder à quebra do anel da hexose em ligação 1-4 da cadeia principal. Observa-se a perda de hexose (-180 Da) com formação do ião de m/z 185 e a perda de resíduo de hexose (-162 Da) com formação do ião m/z 162. Estas fragmentações sugerem a presença de isómeros em que terminais ou ramificações de hexoses que não têm grupos acetilo.

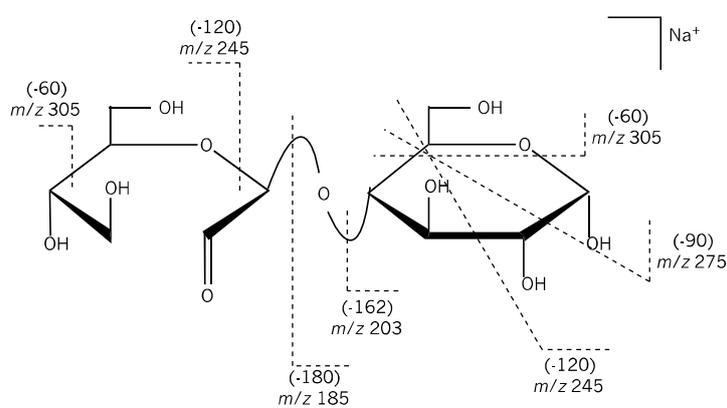
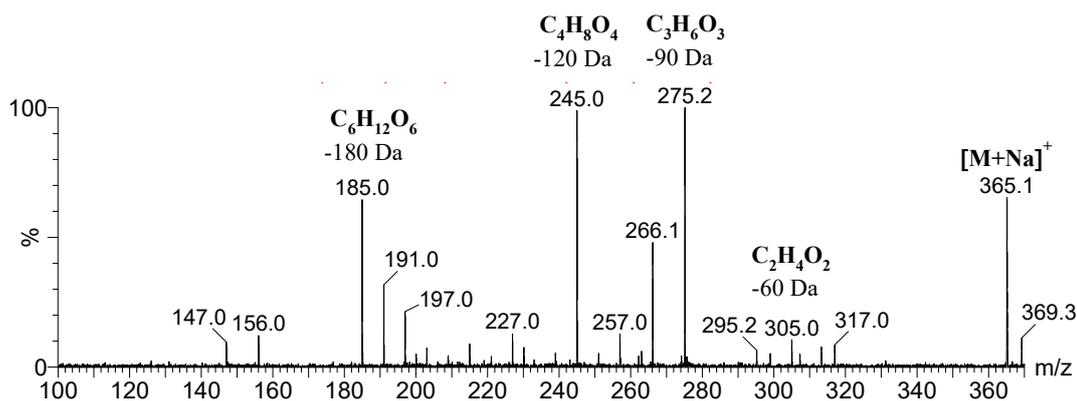


Figura 4.134 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 365 ($[\text{Hex}_2\text{-CH}_2\text{O}+2\text{O} + \text{Na}]^+$) correspondente ao ião $[\text{M}+\text{Na}]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da celulose e TEMPO.

A Figura 4.134 apresenta o espectro de MS/MS do ião de m/z 367. Neste espectro podemos observar a perda principal do grupo acetilo (-60 Da) e a perda -120 Da com formação do ião de m/z 247. Estas perdas também podem corresponder à quebra do anel resultante da hexose em ligação 1-4 da cadeia principal. Observa-se igualmente a perda -90 Da correspondente à quebra do anel com formação do ião de m/z 277. Pode-se confirmar ainda que a fragmentação de oligossacarídeos com -180 Da mostram que a clivagem ocorre preferencialmente entre o carbono anomérico e o oxigênio glucosídico.

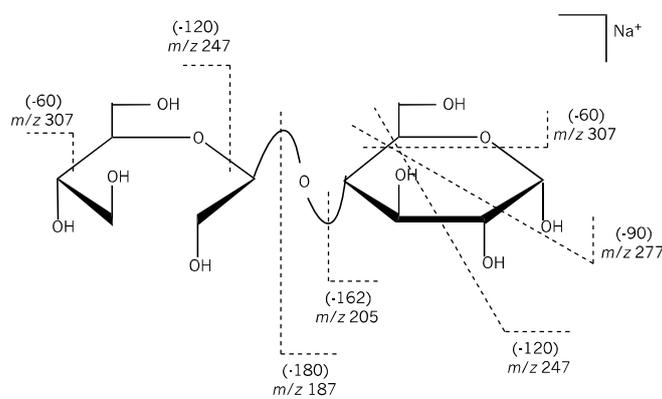
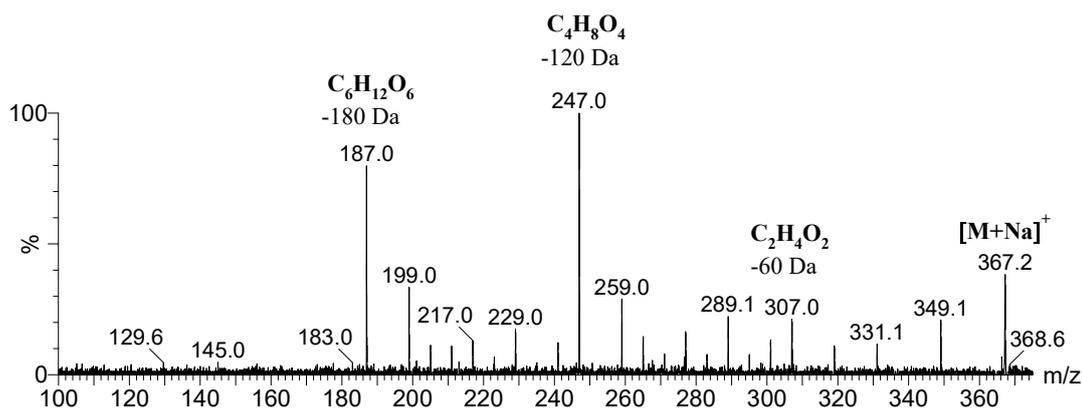


Figura 4.134 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 367 ($[\text{Hex}_2+2\text{H}+\text{Na}]^+$) correspondente ao ião $[\text{M}+\text{Na}]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F19) da celulose e TEMPO.

Outra série de compostos resultantes da fração F17 foram também identificados como sendo não modificados e são apresentados na Tabela 4.17.

Tabela 4.17. Não modificados da celulose e TEMPO (F17) identificados por ESI-MS com respectivos valores m/z dos iões $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

n	2	3
	m/z	
Hex _n	365	527

O espectro de ESI-MS correspondente a fração F 17 é apresentado na Figura 4.135.

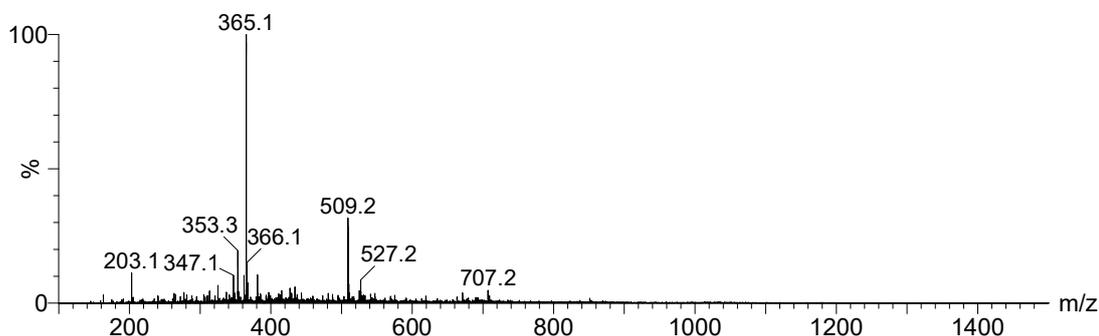


Figura 4.135 – Espectro de ESI-MS da fração neutra (F17) da celulose e TEMPO.

ESI-MS/MS dos produtos de oxidação da fração neutra (F17)

A Figura 4.136 apresenta o espectro MS/MS do ião correspondente ao oligossacarídeo não modificado com duas hexose. A presença de hexoses é inferida pelos iões de m/z 203 e 185 resultantes da perda de -162 Da e -180 Da, respetivamente. Os iões dos fragmentos de m/z 305, 275 e 245 correspondem a quebras do anel. Estas fragmentações levaram-nos a propor uma estrutura possível para este dissacarídeo. Observa-se também a perda de uma molécula de água (-18 Da).

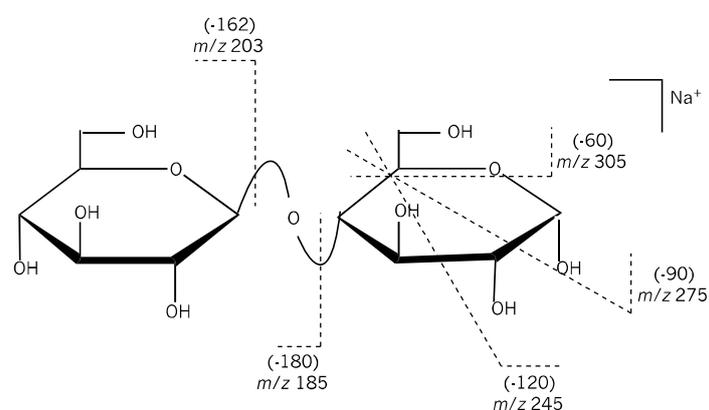
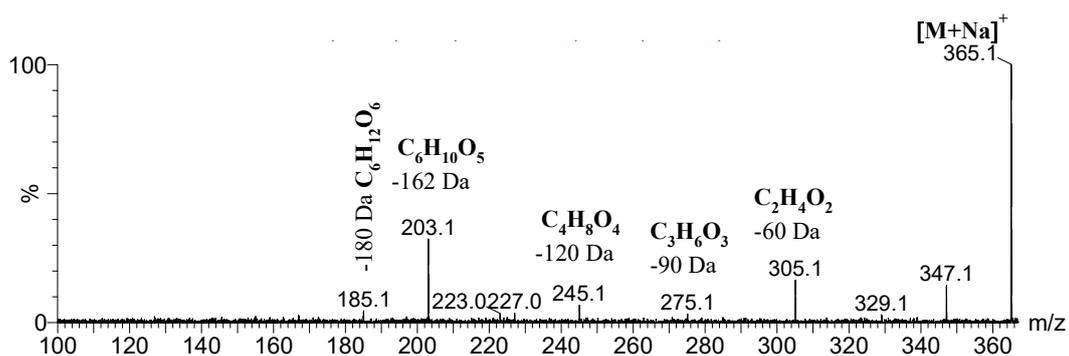


Figura 4.136 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 365 ($[\text{Hex}_2 + \text{Na}]^+$) corresponde ao ião $[\text{M} + \text{Na}]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F17) da celulose e TEMPO.

O espectro de MS/MS do ião de 527 (Figura 4.137) corresponde ao oligossacarídeo com três hexoses. A presença de hexoses é inferida pelos iões de m/z 365, 347 e 185, resultantes da perda de -162 Da, -180 Da e -342, respectivamente.

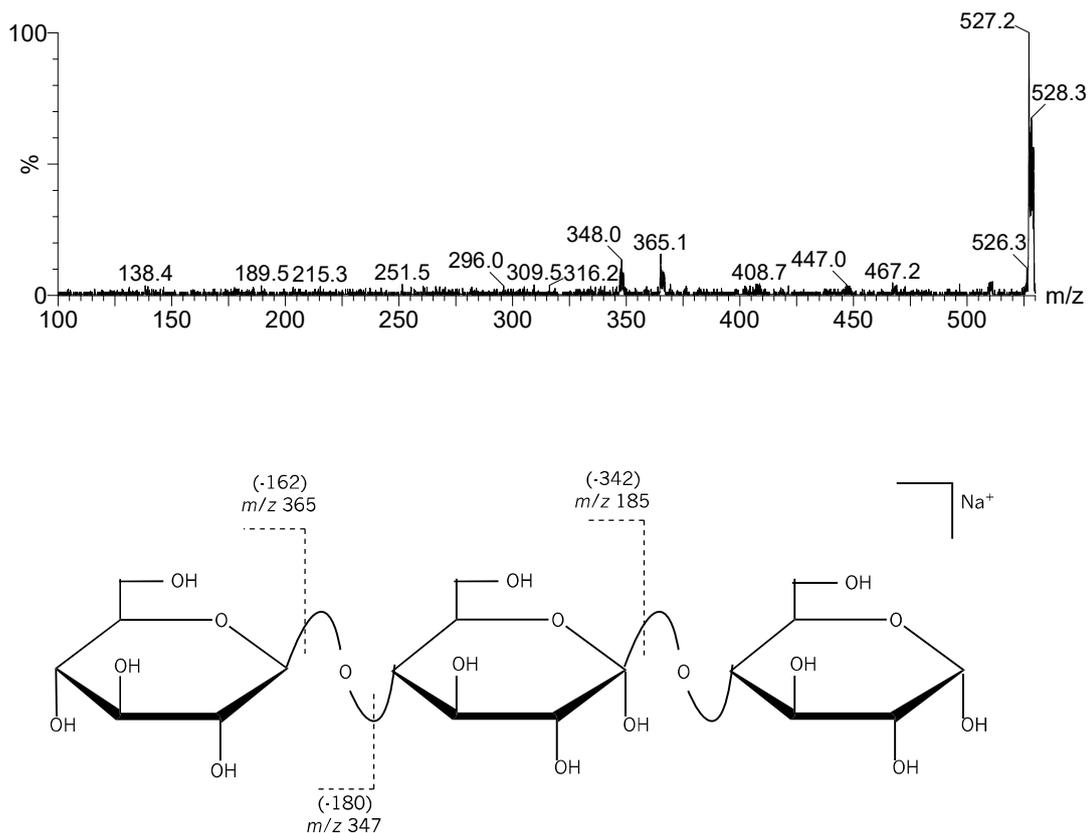


Figura 4.137 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 527 ($[\text{Hex}_3 + \text{Na}]^+$) correspondente ao ião $[\text{M} + \text{Na}]^+$ do oligossacarídeo da fração neutra (F17) da celulose e TEMPO.

ESI-MS dos produtos de oxidação da fração ácida (F10)

O espectro de ESI-MS para a fração ácida (F10) da celulose e TEMPO é apresentado na Figura 4.138.

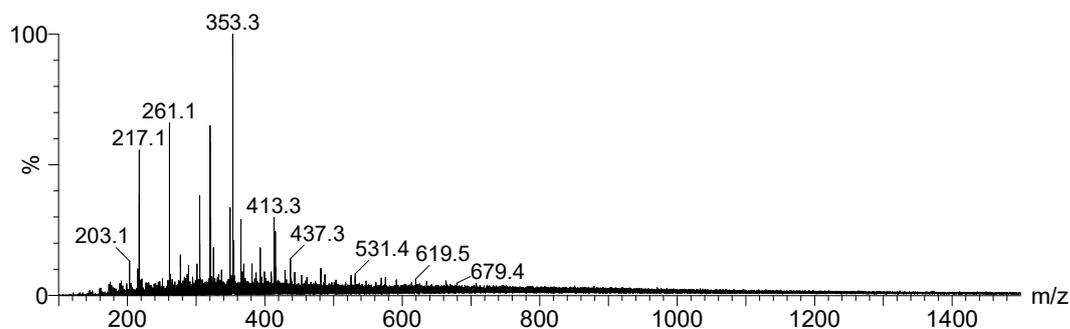


Figura 4.138 – ESI-MS espectro da fração ácida (F10) da celulose e TEMPO como mediador.

Os produtos de oxidação atribuídos a partir deste espectro $[M+Na]^+$ encontram-se resumidos na Tabela 4.18. Todos os iões propostos foram confirmados pela determinação da massa exata correspondente.

Tabela 4.18 - Produtos da oxidação da fração ácida de celulose e TEMPO (F10), identificados por ESI-MS com respetivos valores m/z dos iões $[M+Na]^+$.

		m/z
Séries do ácido Glucurónico		
Hex ₂ +O	(+16)	381
Hex ₂ +2O-4H	(+28)	393
Séries do ácido Glicérico (clivagem C1-C2)		
Hex ₂ -CH ₂ O +O-2H	(+0)	365
Séries do ácido Glicólico (clivagem C2-C3)		
Hex ₂ -C ₂ H ₄ +2O	(+4)	369

Todos os iões atribuídos aos produtos de oxidação da celulose e TEMPO apresentados na tabela anterior, onde se encontram agrupados em diferentes séries de iões conforme o resíduo ácido proposto são descritos a seguir: 1) série do ácido glucurónico; 2) série do ácido glicérico (clivagem C1-C2) e 3) série do ácido glicólico (clivagem C2-C3). Podemos, através de um esquema (Figura 4.139) demonstrar a formação das principais fragmentações dos produtos de oxidação da forma ácida, sem outro tipo de modificações.

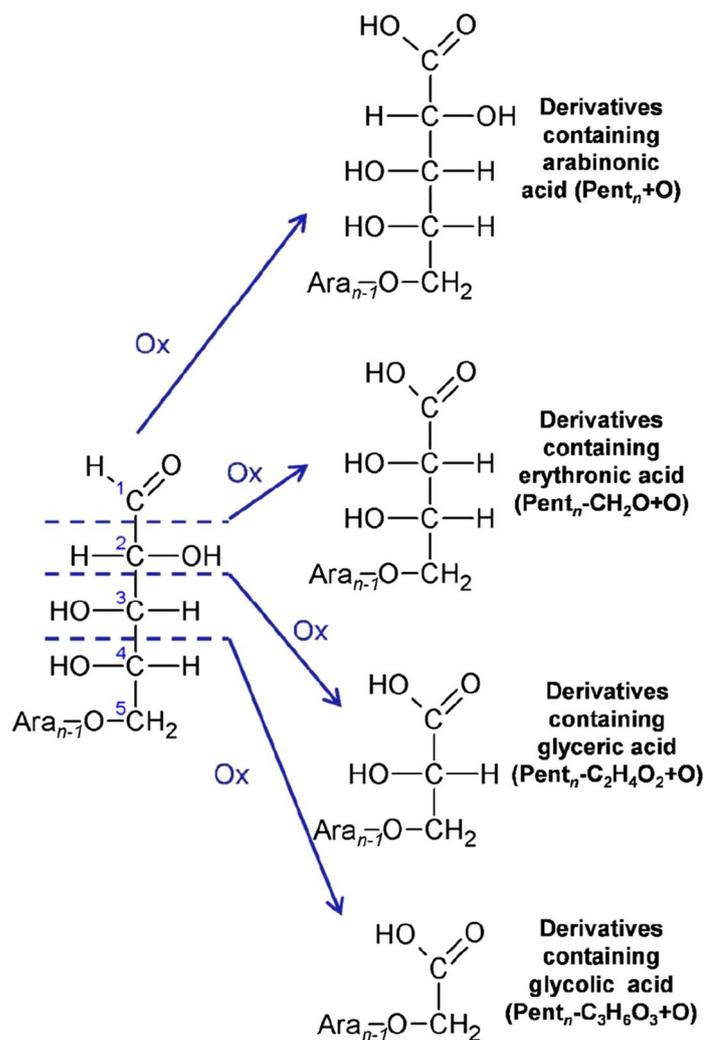


Figura 4.139 – Produtos de oxidação que contêm a forma ácida correspondente a arabinose [5].

ESI-MS/MS dos produtos de oxidação da fração ácida (F10)

De seguida apresenta-se a análise dos espectros de ESI-MS/MS da fração ácida, bem como as estruturas propostas para cada ião identificado. Nas estruturas propostas, em alguns casos verifica-se perdas de moléculas de água e quebras do anel do açúcar que resultam principalmente da fração neutra de $C_2H_4O_2$ (-60 Da) e $C_3H_6O_3$ (-90 Da). As clivagens transversais do anel ocorrem predominantemente no resíduo do terminal redutor.

Na Figura 4.140 apresenta-se o espectro de ESI-MS/MS do ião de 393 onde se pode evidenciar o ião predominante de m/z 241, resultante da perda de -134 Da. Esta perda pode também corresponder à quebra do anel.

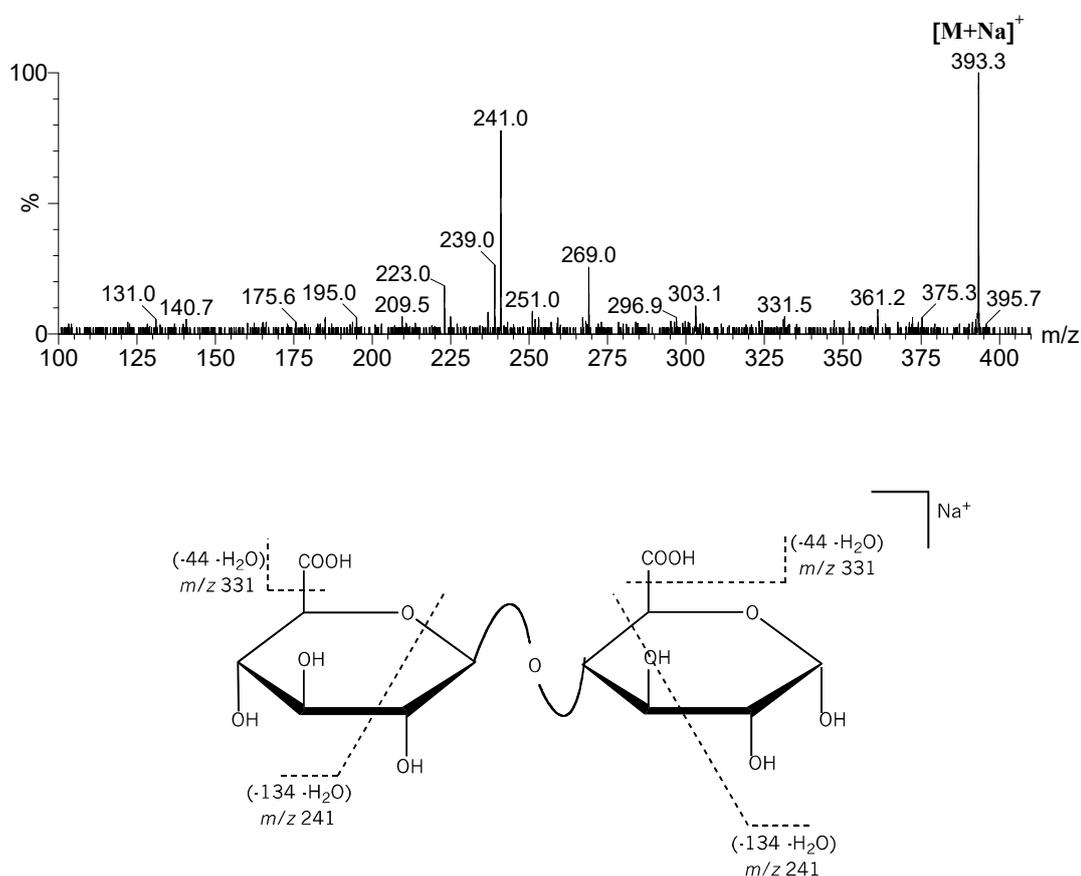


Figura 4.140 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 393 ($[Hex_3 + Na]^+$) correspondente ao ião $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração ácida (F10) da celulose e TEMPO.

O espectro de ESI-MS/MS apresentado na Figura 4.141 permitiu confirmar a estrutura proposta para o ião de m/z 381, embora em baixa abundância relativa, podemos observar que o ião de m/z 291, resultante da quebra do anel com perda -90 Da ($C_3H_6O_3$), sugere que o oxigénio adicionado está localizado no C1 ou C2 da extremidade redutora. Observa-se também a perda principal de um resíduo de hexose (-162 Da) com formação do ião de m/z 219, a perda de uma hexose (-180 Da) com formação do ião de m/z 201 e a perda -30 Da, -44 Da e -277 Da com perda de uma molécula de água.

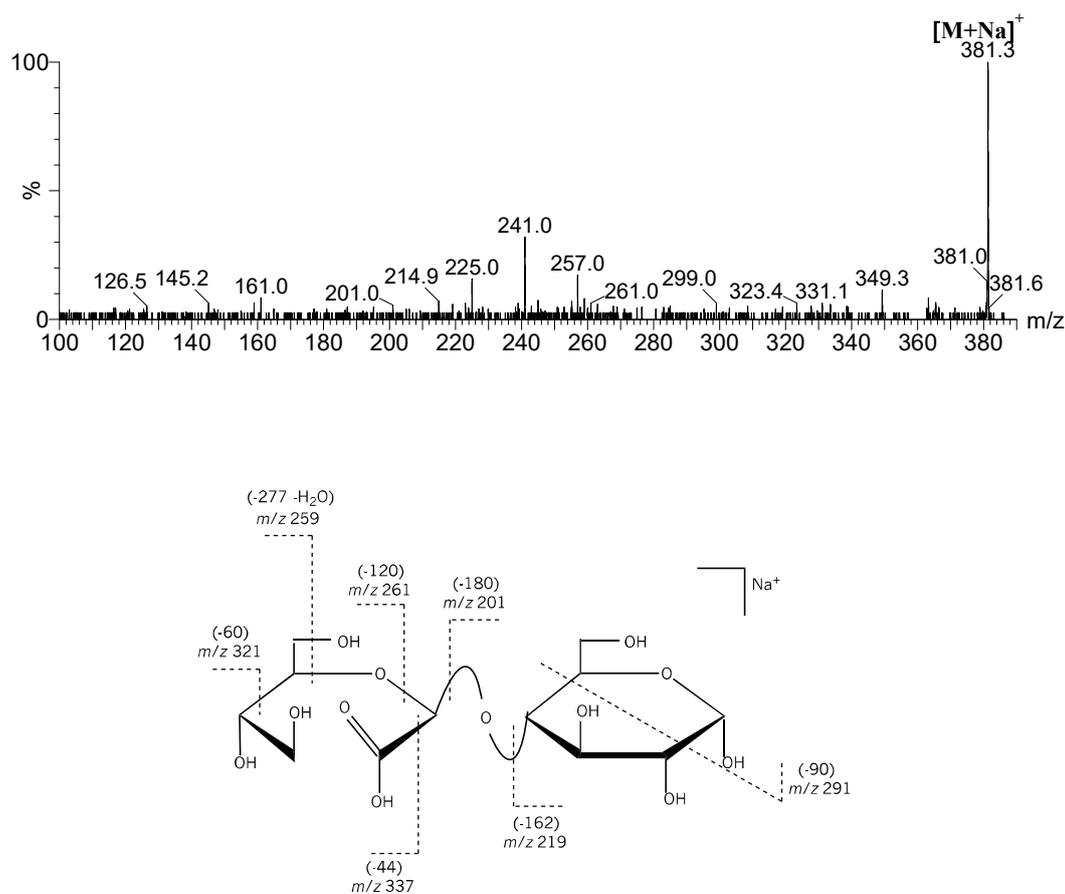


Figura 4.141 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 381 ($[Hex_3+Na]^+$) correspondente ao ião $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração ácida (F10) da celulose e TEMPO.

A Figura 4.142 apresenta o espectro de MS/MS do ião de m/z 365 onde podemos observar a perda principal de um resíduo de hexose (-162 Da) com formação do ião de m/z 203 e a perda de uma hexose (-180) com formação do ião de m/z 185. Observa-se também ainda que seja em baixa abundância relativa a perda -88 Da e -104 Da acompanhada da perda de uma molécula de água a partir do terminal não redutor.

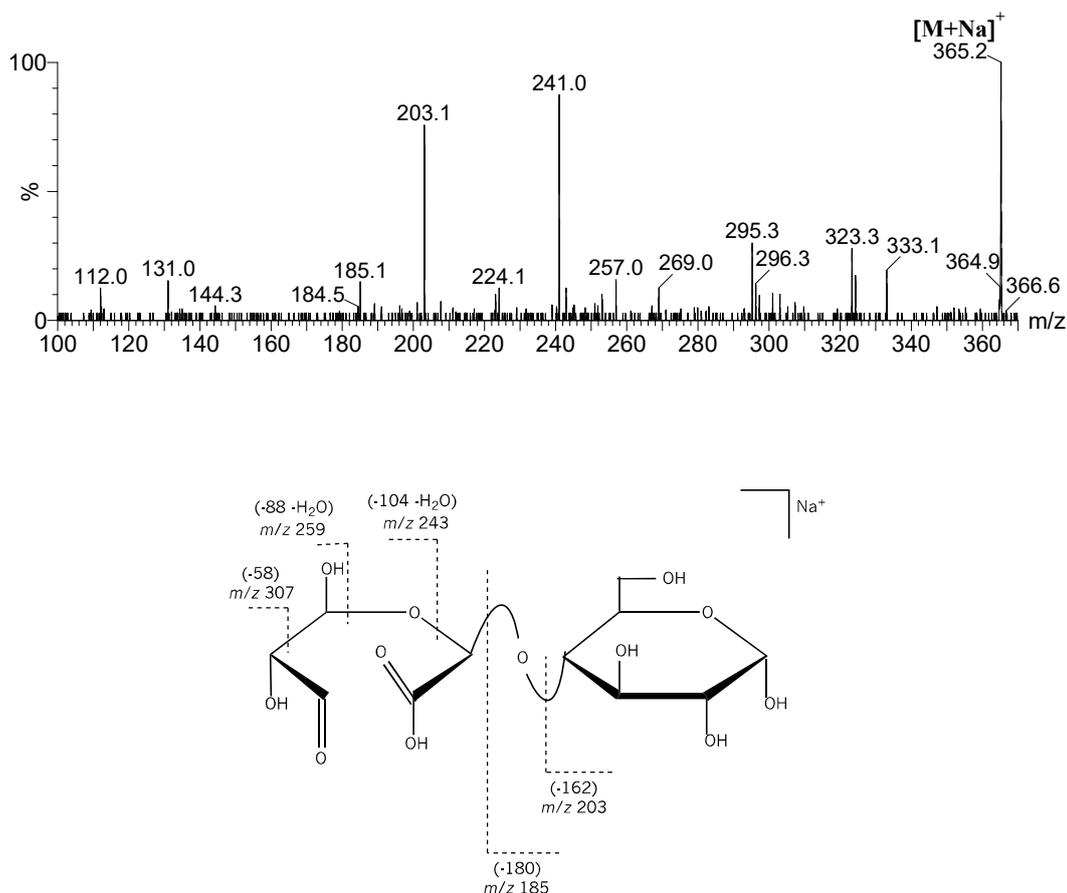


Figura 4.142 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 365 ($[Hex_3 + Na]^+$) correspondente ao ião $[M+Na]^+$ do oligossacarídeo da fração ácida (F10) da celulose e TEMPO.

No espectro de ESI-MS/MS da Figura 4.143 podemos observar que o ião de m/z 305, formado pela perda -46 Da (HCOOH) corrobora a presença de um grupo ácido carboxílico. Observa-se a perda -92 Da acompanhadas da perda de uma molécula de água com formação do ião de m/z 259. Observa-se também as perdas -74 Da e -76 Da.

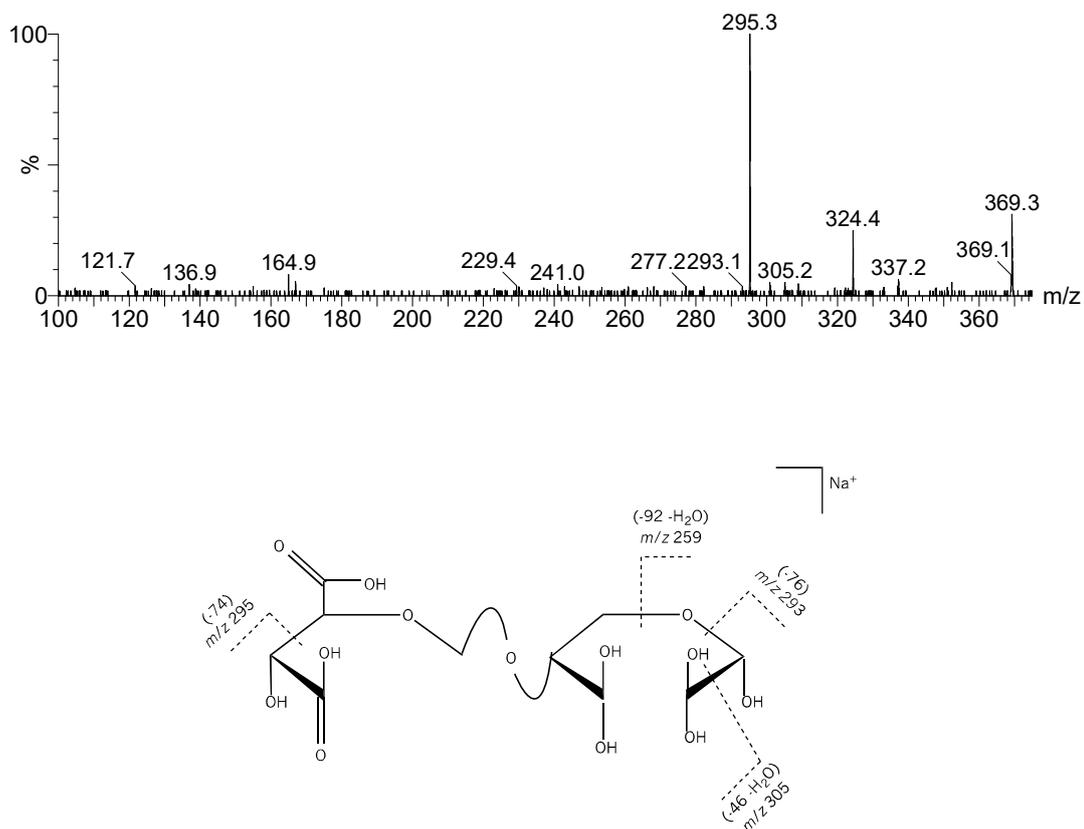


Figura 4.143 – Espectro de ESI-MS/MS e estrutura proposta do ião de m/z 369 ($[\text{Hex}_3 + \text{Na}]^+$) correspondente ao ião $[\text{M} + \text{Na}]^+$ do oligossacarídeo da fração ácida (F10) da celulose e TEMPO.

A presença de produtos provenientes da oxidação dos álcoois secundários que foi verificado na oxidação dos compostos não poliméricos com o TEMPO está em concordância com as estruturas propostas. Nesta eletrólise foi também feita a análise dos ácidos urónicos e os resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.19.

Os resultados da titulação ácido/base dos produtos de eletrólise corresponde a oxidação dos grupos glucosídicos na ordem de 60%.

- *Ácidos urônicos*

A análise dos ácidos urônicos confirmou os resultados da análise LEX/SEC, proporcionando informação adicional acerca das estruturas propostas. Na Figura 4.144 apresenta-se graficamente a variação do valor da absorvância em função da concentração do padrão ácido galacturónico. Os valores da absorvância, crescem linearmente com o aumento da concentração.

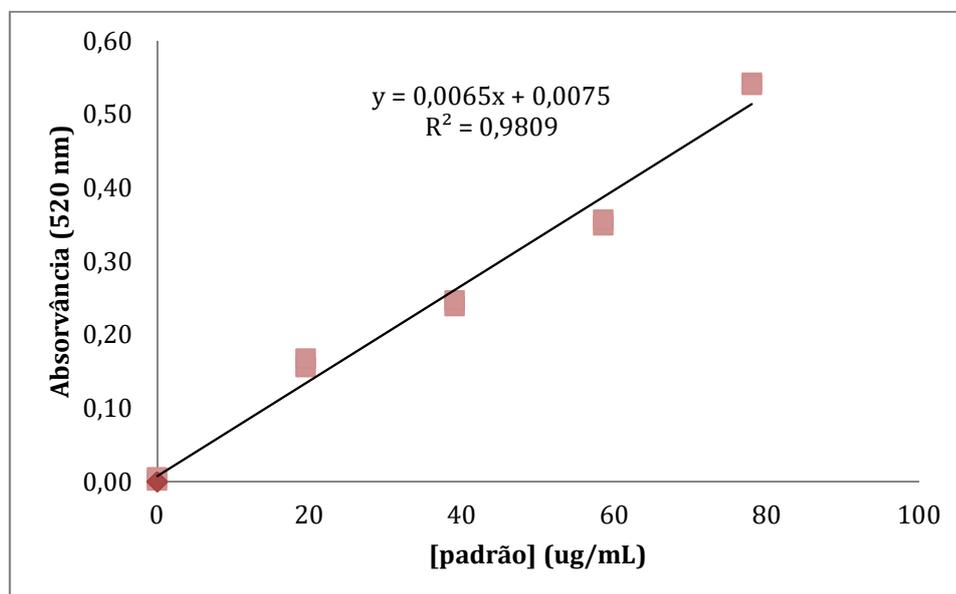


Figura 4.144 – Curva de calibração dos padrões do ácido galacturónico.

A Tabela 4.20 apresenta os resultados obtidos para os ácidos urónicos resultantes da análise LEX/SEC. Os valores totais foram calculados após a soma das quantidades encontradas nas frações correspondentes ao sobrenadante, ao precipitado e à água de diálise.

Tabela 4.20 – Resultados obtidos para os ácidos urónicos.

Produto	Total [AU] ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
oxidação da amilose no níquel	59
oxidação da amilopectina no níquel	54
oxidação da celulose com mediador TEMPO	248

Confirmação das ligações glicosídicas

As análises efetuadas para o amido e o amido eletrolisado no níquel em meio NaOH 0,5 M com uma intensidade de corrente de 0,5 A, mostraram uma diminuição de ligações glicosídicas do tipo 4-Glcp na ordem de 4 % e um aumento de grupos terminais T-Glcp na mesma ordem (4%). As ligações 4,6-Glcp permaneceram inalteradas. Estes dados apoiam a hipótese de não terem ocorrido clivagens significativas das ligações glicosídicas durante a eletrólise do amido no níquel.

4.3.7. Conclusões

Os resultados apresentados neste capítulo põem em evidência o papel determinante do eletrocatalisador na oxidação eletroquímica de compostos poliméricos.

Na análise dos espectros de FTIR dos produtos de reação do amido Fluka bem como do amido puríssimo nas eletrólises utilizando 0,5 A no ânodo de níquel, identifica-se o mesmo tipo de bandas significativas correspondentes aos ácidos carboxílicos (banda a 1735 cm^{-1}). Estas análises associadas às análises de RMN mostram uma oxidação significativa do substrato inicial. A banda correspondente ao alongamento CO do ácido carboxílico, apresenta uma intensidade superior quando a eletrólise é efetuada utilizando uma intensidade de corrente de 2 A. A análise RMN reforçou a hipótese de uma oxidação mais exaustiva neste caso. As análises dos produtos de oxidação da amilose e da amilopectina, utilizando a técnica LEX/SEC mostram, além de produtos com grupos ácidos, uma quantidade significativa de produtos de oxidação neutros. Para a celulose microcristalina, foram obtidos resultados similares pela análise FTIR, sugerindo também neste caso, uma oxidação significativa. A oxidação do amido e da celulose no eletrodo DSA parece ser mais difícil de se alcançar, provavelmente devido à necessidade de se ter grupos aldeídos livres para iniciar a oxidação, conforme o que foi observado para os compostos não-poliméricos. Esta sugestão pode explicar a diferença de comportamento entre este eletrodo e o eletrodo de níquel que parece privilegiar uma oxidação dos grupos álcool primário e secundário.

A oxidação seletiva dos grupos álcool primário com o mediador TEMPO para o amido e dextrose foi obtida com conversão e eficiências farádica. Pelo contrário, para a celulose a conversão e a seletividade correspondentes à oxidação com o TEMPO, não foram tão elevadas como o que foi observado nos casos anteriores. A análise ESI-MS após a separação com a técnica LEX-SEC, mostra vários produtos de eletrólise com ou sem grupos ácidos carboxílicos provenientes da oxidação dos grupos de álcool secundário. Esta diferença é provavelmente devido à estrutura cristalina mais rígida da celulose relativamente ao amido e a dextrina que faz com que um ataque do reagente aos grupos susceptíveis de oxidação ou acessibilidade ao eletrodo seja mais difícil neste caso.

Referências

- [1] L. F. A. Proença, “Oxidação Electroquímica do D-Sorbitol em platina”, Tese de Doutoramento em Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, (1998).
- [2] V. P. Muiuane, “Valorização da Biomassa: Transformação Selectiva de Hidratos de Carbono em Produtos com Aplicação Comercial”, Tese de Mestrado em Ciências do Ambiente, Universidade do Minho, (2009).
- [3] V. Vedharathinam and G. G. Botte, *Electrochim. Acta* **81**, 292 (2012).
- [4] R. Morrison and R. Boyd, “Química Orgânica”, 9^a Ed., Fundação Calouste Gulbenkian, (1990).
- [5] L. S. Campos, “Guia dos Compostos Orgânicos e Bioquímicos”, Europress, Editores e Distribuidores de Publicações., (1987).
- [6] P. L. Bragd, H. Van Bakkum, and A. C. Besemer, *Top. Catal.*, **27**, (2004).
- [7] Y. Kato, R. Matsuo, and A. Isogai, *Carbohydr. Polym.*, **51**, 69 (2003).
- [8] P. L. Bragd, H. Van Bakkum, and A. C. Besemer, *Top. Catal.*, **27**, (2004).
- [9] P. Parpot, K. Servat, A. P. Bettencourt, H. Huser, and K. B. Kokoh, *Cellulose* **17**, 815 (2010).
- [10] H. Kochkar, M. Morawietz, and W. F. Hölderich, **210**, 325 (2001).
- [11] A. Teleman, K. Kruus, E. Ammalahti, J. Buchert, and K. Nurmi, **315**, 286 (1999).
- [12] G. Socrates, “Infrared Characteristic Group Frequencies,” 2nd ed., Wiley, (1994).
- [13] J. Tudella, F. M. Nunes, R. Paradela, D. V. Evtuguin, P. Domingues, F. Amado, M. A. Coimbra, A. I. R. N. A. Barros, and M. R. M. Domingues, *Carbohydr. Res.*, **346**, 2603 (2011).
- [14] V. M. F. Gonçalves, D. V. Evtuguin, and M. R. M. Domingues, *Carbohydrate Res.*, **343**, 256 (2008).
- [15] S. O. Prazil, E. V. Costa, D. V. Evtuguin, L. P. C. Lopes, and M. R. M. Domingues, *Carbohydr. Res.*, **356**, 252 (2012).
- [16] A. Reis, P. Pinto, D. V. Evtuguin, C. P. Neto, P. Domingues, A. J. Ferreira Correia, and M. R. M. Domingues, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 3589 (2005).

- [17] D. J. Harvey, *Mass Spectrom. Rev.*, **25**, 595 (2006).
- [18] M. Kacurálová and M. Mathlouthin, *Carbohydr. Res.*, **284**, 145 (1996).
- [19] D. da S. Perez, S. Montanari, and M. R. Vignon, *Biomacromolecules*, (2003).

Considerações finais

Como foi sublinhado na introdução deste manuscrito, num futuro próximo os hidratos de carbono que constituem um dos componentes principais da biomassa vão desempenhar um papel central na produção de matérias-primas para a indústria química. Neste contexto, com este trabalho pretendeu-se contribuir para um melhor conhecimento na temática da oxidação eletroquímica de hidratos de carbono. Os resultados aqui apresentados mostram que a oxidação de hidratos de carbono pode ser alcançada utilizando a oxidação direta no eletrodo de níquel e no DSA.

O estudo analítico dos produtos de oxidação dos mono di e trissacarídeos com o apoio de varias técnicas avançadas, mostrou que ocorrem clivagens das ligações C-C e os compostos de baixo peso molecular apresentavam uma percentagem significativa dos produtos totais da reação. A análise dos produtos de reação por espectrometria de massa permitiu determinar as diferenças no modo de oxidação destes substratos nos dois eletrodos, que foram objetos deste estudo.

A oxidação, provavelmente inicia com a oxidação dos grupos álcool primário e secundário no níquel em contrapartida, no DSA a oxidação do aldeído livre parece ser favorecida. Este ponto, pode explicar as diferenças observadas na oxidação dos polissacarídeos nestes eletrodos que se traduz numa maior facilidade de oxidação no níquel quando comparado com o DSA.

A oxidação dos hidratos de carbono com o mediador TEMPO permitiu obter conversões e seletividades em ácidos urónicos ou poliurónicos elevadas.

Em ciência nenhum estudo se pode considerar concluído existindo sempre áreas que podem ser mais aprofundadas ou abordadas sob outra perspetiva. Com esta

tese foram realizados alguns avanços na área de oxidação eletroquímica de sacarídeos, no entanto, tal como a maioria da investigação, representa um trabalho em curso e não uma meta alcançada. Alguns aspetos, que não ficaram totalmente esclarecidos, deverão ser objeto de um estudo mais aprofundado no futuro. Com base nos resultados aqui apresentados, considera-se que este trabalho poderá constituir um ponto de partida para o estudo de processos de oxidação eletroquímica de hidratos de carbono.

Um estudo analítico mais detalhado deste processo, com o apoio de outras técnicas experimentais espectroscópicas ou cromatográficas, permitirá estabelecer as etapas reaccionais com o objetivo de otimizar as condições experimentais para se atingir elevados rendimentos e eficiências farádicas.