



CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE BAGAÇO E PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

NOVEMBRO DE 2019

SOBRE O LNBR

O Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) integra o Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), organização social qualificada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTIC). O LNBR emprega a biomassa e a biodiversidade brasileiras para resolver desafios relevantes para o País por meio de soluções biotecnológicas que promovam o desenvolvimento sustentável de biocombustíveis avançados, bioquímicos e biomateriais. O Laboratório possui diversas Instalações Abertas a Usuários, incluindo a Planta Piloto para Desenvolvimento de Processos, estrutura singular no país para escalonamento de tecnologias.

SOBRE O CNPEM

O Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) é uma organização social supervisionada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC). Localizado em Campinas-SP, gerencia quatro Laboratórios Nacionais – referências mundiais e abertos às comunidades científica e empresarial. O Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) opera a única fonte de luz síncrotron da América Latina e está, nesse momento, finalizando a montagem do Sirius, o novo acelerador de elétrons brasileiro; o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) atua na área de biotecnologia com foco na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos; o Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) pesquisa soluções biotecnológicas para o desenvolvimento sustentável de biocombustíveis avançados, bioquímicos e biomateriais, empregando a biomassa e a biodiversidade brasileira; e o Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) realiza pesquisas científicas e desenvolvimentos tecnológicos em busca de soluções baseadas em nanotecnologia. Os quatro Laboratórios têm, ainda, projetos próprios de pesquisa e participam da agenda transversal de investigação coordenada pelo CNPEM, que articula instalações e competências científicas em torno de temas estratégicos. O Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR) integra o Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), organização social qualificada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTIC). O LNBR emprega a biomassa e a biodiversidade brasileiras para resolver desafios relevantes para o País por meio de soluções biotecnológicas que promovam o desenvolvimento sustentável de biocombustíveis avançados, bioquímicos e biomateriais. O Laboratório possui diversas Instalações Abertas a Usuários, incluindo a Planta Piloto para Desenvolvimento de Processos, estrutura singular no país para escalonamento de tecnologias.

DIRETOR-GERAL DO CNPEM

ANTONIO JOSÉ ROQUE DA SILVA

DIRETOR DO LNBR

EDUARDO DO Couto e SILVA

REALIZAÇÃO E TEXTOS

GEORGE JACKSON DE MORAES ROCHA

TATIANE TARLEY PEREIRA

VIVIANE MARCOS NASCIMENTO VICENTE

DIAGRAMAÇÃO

VIVIANE CELENTE



CNPEM

MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1 LITERATURA DE SUPORTE.....	6
1.2 BASE TEÓRICA.....	6
2. ESCOPO.....	7
3. ABREVIACIONES	7
4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	7
5. REAGENTES.....	7
6. RISCOS ENVOLVIDOS.....	7
7. EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL.....	8
8. AMOSTRAGEM E CUIDADOS.....	8
9. PROCEDIMENTO.....	8
9.1 CHECK LIST INICIAL	8
9.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE	8
9.3 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS DA BIOMASSA	9
9.4 DETERMINAÇÃO DE EXTRATIVOS	10
9.5 HIDRÓLISE ÁCIDA DA AMOSTRA LIVRE DE EXTRATIVOS	12
9.6 QUANTIFICAÇÃO DOS CARBOIDRATOS, ÁCIDO ACÉTICO E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	15
9.7 DETERMINAÇÃO DE LIGNINA INSOLÚVEL E CINZAS INSOLÚVEIS.....	15
9.8 DETERMINAÇÃO DE LIGNINA SOLÚVEL EM MEIO ÁCIDO.....	18
9.9 MODELO DE CÁLCULO DE CELULOSE E HEMICELULOSES.....	19

1. INTRODUÇÃO

A metodologia para a caracterização química do bagaço e da palha de cana-de-açúcar permite a determinação da composição química do material lignocelulósico, com relação aos teores de celulose, hemiceluloses, lignina, cinzas e extrativos, tornando possíveis os estudos e a comparação entre distintos processos de conversão de biomassas a produtos.

1.1 LITERATURA DE SUPORTE

ASTM D1105-84. Method for Preparation of Extractive-Free Wood. In 1993 Annual Book of ASTM Standards, Volume 04.09. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.

ASTM E1755-01. Standard Method for the Determination of Ash in Biomass In 2003 Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.05. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, International.

GOUVEIA, E.R. et al., 2009. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*. 32, pp. 1500-1503.

HYMAN, D., et al., 2007. Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis Spectroscopy. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-13.

SLUITER, A., et al., 2005a. Determination of Ash in Biomass. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-8.

SLUITER, A., et al., 2005b. Determination of Extractives in Biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1-12.

SLUITER, A., et al., 2005c. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1-12.

SLUITER, A., et al., 2005d. Determination of Total Solids in Biomass. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-6.

SLUITER, A., et al., 2005. Preparation of Samples for Compositional Analysis. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-12.

SLUITER, A., et al., 2008. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-16, 2008.

SLUITER, J.B. et al., 2016. Evaluation of Brazilian Sugarcane Bagasse Characterization: An Inter-laboratory Comparison Study. *Journal of AOAC International*, 99(1):7.

1.2 BASE TEÓRICA

A metodologia de caracterização química do bagaço e da palha de cana-de-açúcar se baseia em uma hidrólise ácida realizada em duas etapas, visando à fragmentação da biomassa em frações de mais fácil quantificação.

A hidrólise ácida da celulose e das hemiceluloses gera monômeros solúveis em água como a glicose, celobiose, xilose, ácido acético, além de produtos de degradação como o furfural e o hidroximetilfurfural (HMF), que pode ser convertido a ácido fórmico e levulínico. Após a hidrólise os carboidratos são quantificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A lignina, por sua vez, sofre reações de hidrólise e condensação que geram, no final do processo, uma fração de lignina solúvel, determinada por análise espectroscópica na região do ultravioleta e do visível, e uma fração insolúvel, determinada como massa residual.

2. ESCOPO

Esse procedimento é aplicável ao bagaço e à palha de cana-de-açúcar.

3. ABREVIACIONES

HMF - 5-hidroximetilfurfural

FUR - furfural

CLAE/HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Banho termostatizado
- Mufla
- Balança analítica
- CLAE
- Espectrofotômetro UV/VIS
- Béquer
- Bastão de teflon
- Cronômetro
- Erlenmeyer
- Extrator Soxhlet
- Autoclave
- Cadinho de fundo poroso para filtração (4-5 μm)
- Cadinhos de porcelana para calcinação com tampa
- Dessecador
- Manta de aquecimento
- Balão de fundo redondo
- Pérolas de vidro
- Condensador
- Papel alumínio
- Pipeta volumétrica de 15 mL
- Balão volumétrico de 100 mL
- Tubo para hidrólise ácida

5. REAGENTES

- Solução de NaOH 6,5 mol.L⁻¹
- Ácido sulfúrico 72% m/m

6. RISCOS ENVOLVIDOS

Os riscos envolvidos estão relacionados à manipulação dos produtos químicos empregados.

7. EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL

- Óculos de segurança
- Protetor auricular (para moagem da biomassa)
- Luvas nitrílicas para a manipulação de solução ácida ou básica
- Luva para altas temperaturas
- Jaleco

8. AMOSTRAGEM E CUIDADOS

Deve-se tomar a precaução de utilizar uma amostra representativa do material a ser caracterizado. Para isso é necessário um quarteamento eficiente da amostra para garantir que todas as frações apresentem a mesma composição química.

9. PROCEDIMENTO

9.1 CHECK LIST INICIAL

- A amostra deve ser moída a $\leq 0,8$ mm (≥ 20 mesh);
- O procedimento requer a utilização de amostras com umidade máxima de 10%;
- O ácido sulfúrico de 72 % $\pm 0,5$ (m/m) deve ser preparado e padronizado.

9.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE

O teor de umidade pode ser determinado utilizando-se o método tradicional de secagem do material em estufa a 105°C até peso constante ou por meio da utilização de uma balança de infravermelho.

9.2.1 Pesar em torno de 2g de amostras homogeneizadas de bagaço ou palha de cana-de-açúcar em béqueres (os ensaios devem ser realizados em triplicata).

9.2.2 Inserir as amostras em estufa a 105°C e secar até peso constante (mudança de $\pm 0,1\%$ na umidade atual em cima de 1 hora de aquecimento).

9.2.3 Após este período, retirar as amostras da estufa e colocar em um dessecador até que atinjam a temperatura ambiente.

9.2.4 Pesar os béqueres contendo o material seco.

9.2.5 Cálculos

$$\% \text{ Umidade} = \left(1 - \left(\frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \right) \right) * 100$$

Sendo:

M_1 : Massa do béquer vazio (g);

M_2 : Massa do béquer mais amostra úmida (g);

M_3 : Massa do béquer mais amostra seca até peso constante (g).

Obs: O teor de umidade deve ser determinado previamente à caracterização físico-química da biomassa, visto que este pode sofrer alterações durante o período de armazenagem.

9.3 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS DA BIOMASSA

9.3.1 Identificar os cadinhos de porcelana para calcinação e calcinar em mufla por 3 horas a 800°C.

9.3.2 Após a calcinação, deixar a temperatura da mufla atingir 100°C e remover os cadinhos, mantendo em dessecador até atingir a temperatura ambiente. Pesar os cadinhos (M_C).

9.3.3 Pesar aproximadamente 2g da amostra, base seca, e colocar nos cadinhos de porcelana previamente tarados registrando a massa da amostra (M_{BS}).

9.3.4 Calcinar as amostras em mufla tomando a precaução de deixar as tampas dos cadinhos semi abertas (Figura 1).



Figura 1. Cadinho de porcelana previamente tarado com amostra a ser calcinada para determinação de cinzas totais.

9.3.5 O aquecimento é feito utilizando-se uma rampa de temperatura

- Aguardar a mufla atingir 105°C e cronometrar 12 minutos;
- Aquecer até 250°C com uma taxa de 10°C/ minuto; e cronometrar 30 minutos;
- Aquecer até 575°C e cronometrar 180 minutos;
- Após o tempo, desligar a mufla, esperar a temperatura atingir 105°C.

9.3.6 Colocar os cadinhos no dessecador para esfriar até temperatura ambiente.

9.3.7 Pese e registre a massa do cadinho com as cinzas (M_{CC}).

9.3.8 Cálculos

$$\text{Cinzas totais (\%)} = \left(\frac{M_{CC} - M_C}{M_{BS}} \right) \times 100$$

Sendo:

M_C : Massa do cadinho de porcelana tarado (g) (item 9.3.2);

M_{BS} : Massa da amostra inicial (base seca) (g) (item 9.3.3);

M_{CC} : Massa do cadinho de porcelana + cinzas totais (g) (item 9.3.7).

Obs1: O agente dessecante (sílica) presente no dessecador deve estar adequadamente seco, garantindo assim que o material ao ser colocado no dessecador não absorva umidade.

Obs2: Caso as cinzas contidas no cadinho apresentem aspecto visual de conteúdo de material orgânico, retornar o cadinho para a mufla e deixar o tempo necessário para a total digestão da matéria orgânica residual (coloração de cinzas - Figura 2).

9.4 DETERMINAÇÃO DE EXTRATIVOS

A remoção de extrativos é uma etapa fundamental para caracterização química de materiais lignocelulósicos “*in natura*”. Este processo deve ser realizado antes da hidrólise com ácido sulfúrico 72% (m/m) para evitar que componentes presentes nos extrativos interfiram nas análises subsequentes (como, por exemplo, determinação de lignina insolúvel), gerando resultados superestimados.

9.4.1 Preparo do cartucho de extração.

9.4.1.1 Utilizando papel de filtro qualitativo fazer um retângulo de 14 cm de comprimento por 10 cm de largura.

9.4.1.2 Dobrar e grampear as laterais do retângulo, conforme Figura 3.

9.4.1.3 Pesar de 2 a 5g, em base seca, de material moído e adicionar nos saquinhos de papel tarados ou no cartucho extrator (vendido comercialmente) (M_{BSM}).

9.4.1.4 Registrar a massa. A altura da biomassa dentro do cartucho extrator não pode exceder a altura do sifão do extrator Soxhlet.

9.4.1.5 Realizar o procedimento em triplicata.

9.4.2 MONTAR O SISTEMA DE REMOÇÃO DE EXTRATIVOS

9.4.2.1 Colocar o balão de vidro de 1 L na manta de aquecimento.

9.4.2.2 Adicionar 400 mL de uma solução ciclohexano-etanol na proporção 1:1 no balão de fundo redondo e colocar na manta de aquecimento.

9.4.2.3 Adicionar as pérolas de vidro dentro do balão de fundo redondo.

9.4.2.4 Colocar os 3 cartuchos de extração, contendo o material previamente pesado, dentro do Soxhlet (Figura 4).

9.4.2.5 Acoplar o extrator Soxhlet no balão de fundo redondo de 1 L e ao condensador.

9.4.2.6 Ajustar o fluxo de água no condensador.

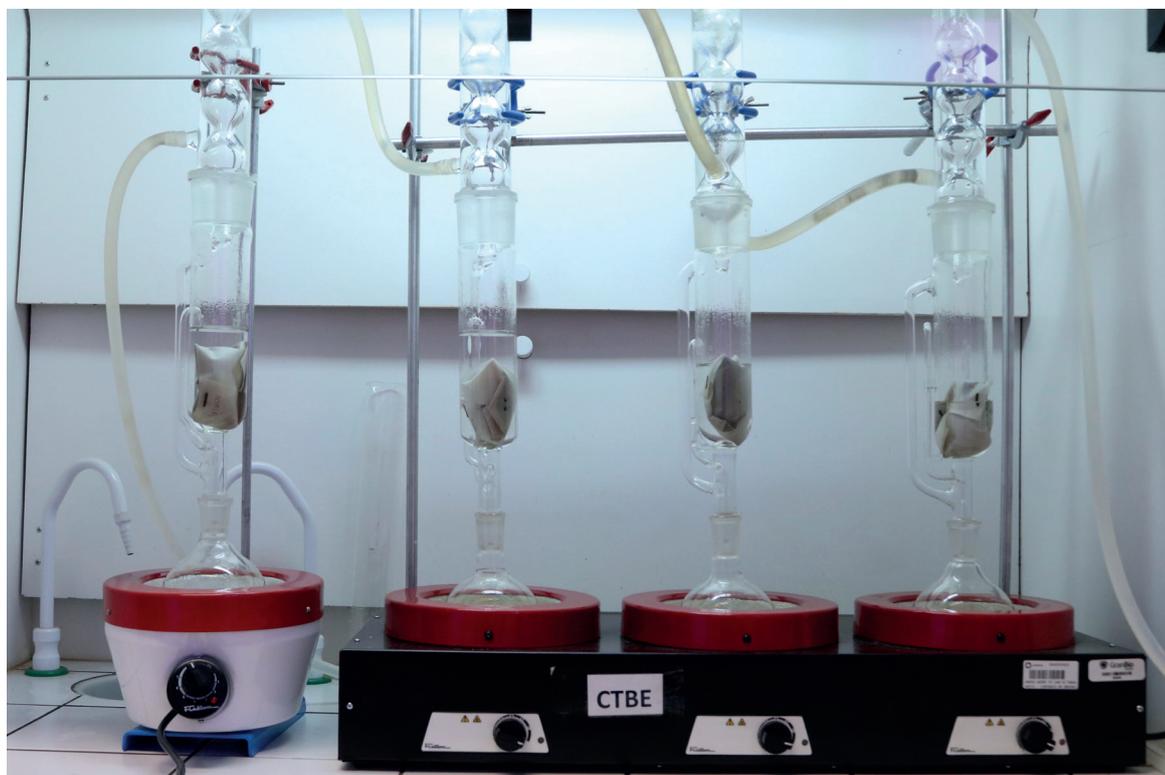


Figura 2.
Cadinho de porcelana contendo as cinzas totais da amostra.



Figura 3.
Cartucho de extração confeccionado com papel de filtro.

Figura 4.
Aparatos
para o
procedimento
de remoção
de extrativos.



9.4.2.7 Ligar a manta de aquecimento a fim de que ocorra de 4 a 5 ciclos no sifão por hora. Após o primeiro ciclo de extração, proceder à extração do material por um período de 8 horas.

9.4.2.8 Ao término das 8 horas, desligar a manta de aquecimento e trocar a solução de ciclohexano-etanol presente no balão de fundo redondo por água (até a metade do volume nominal do balão - aproximadamente 500 mL).

9.4.2.9 Após o primeiro ciclo de extração, proceder à extração do material por um período de 24 horas, realizando a troca da água a cada 8 horas.

9.4.2.10 Após a extração retirar o material presente dentro do saquinho de papel de filtro ou do cartucho de extração e filtrar em um funil de Büchner. Utilizar o mínimo de água necessária para a transferência quantitativa da massa para o funil.

9.4.2.11 Após a filtração colocar a amostra em estufa a 105°C e acompanhar a secagem até massa constante.

9.4.2.12 Registrar a massa encontrada (M_{BE}).

9.4.2.13 Cálculos

$$E (\%) = \left(\frac{M_{BSM} - M_{BE}}{M_{BSM}} \right) \times 100$$

Sendo:

E = O teor de extrativos da biomassa expresso em %;

M_{BSM} = massa de biomassa seca e moída (g) (item 9.4.1.3);

M_{BE} = massa de biomassa livre de extrativos (base seca) (g) (item 9.4.2.12).

9.5 HIDRÓLISE ÁCIDA DA AMOSTRA LIVRE DE EXTRATIVOS

9.5.1 PREPARO DO CADINHO DE PLACA POROSA PARA FILTRAÇÃO

9.5.1.1 Separar um cadinho de placa porosa (4-5 μm) para cada amostra a ser caracterizada, conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 5.
Cadinho de
fundo poroso
para filtração
(4-5 μm).



9.5.1.2 Identificar os cadinhos com uma numeração de fácil reconhecimento posterior.

9.5.1.3 Realizar a secagem dos cadinhos em estufa a 105° C até massa constante.

9.5.1.4 Após esse período retirá-los da estufa e colocá-los no dessecador até temperatura ambiente.

9.5.1.5 Registrar massa do cadinho de placa porosa seco (M_{cp}).

9.5.2 HIDRÓLISE DO MATERIAL COM ÁCIDO SULFÚRICO

9.5.2.1 A amostra deve apresentar granulometria \leq a 0,8 mm (\geq 20 mesh).

9.5.2.2 Determinar a umidade do material moído. Esse procedimento requer amostras com umidade máxima de 10% (amostras com alta umidade alteram a concentração do ácido utilizado durante o processo de hidrólise ácida).

9.5.2.3 Pesar 0,3 g (\pm 0,02) do material previamente extraído, moído e seco (M_{BE}), nos tubos de hidrólise ácida (Figura 6a), tomando a precaução de não deixar o material ficar retido na parede do recipiente.

9.5.2.4 Identificar a amostra com o mesmo código presente no cadinho de fundo poroso.

9.5.2.5 Ajustar o banho termostatizado em 30°C.

9.5.2.6 Adicionar cuidadosamente 3 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) ao tubo de hidrólise e incubar o mesmo no banho termostático (Figura 6b).



Figura 6a.
Tubo para
hidrólise
contendo
a amostra



Figura 6b.
Processo de hidrólise
ácida a 72% (m/m)



9.5.2.7 Com o auxílio de um bastão agitar a suspensão a cada 5 - 10 minutos sem remover o tubo do banho. Solubilizar a amostra friccionando o material com o bastão (Figura 7).

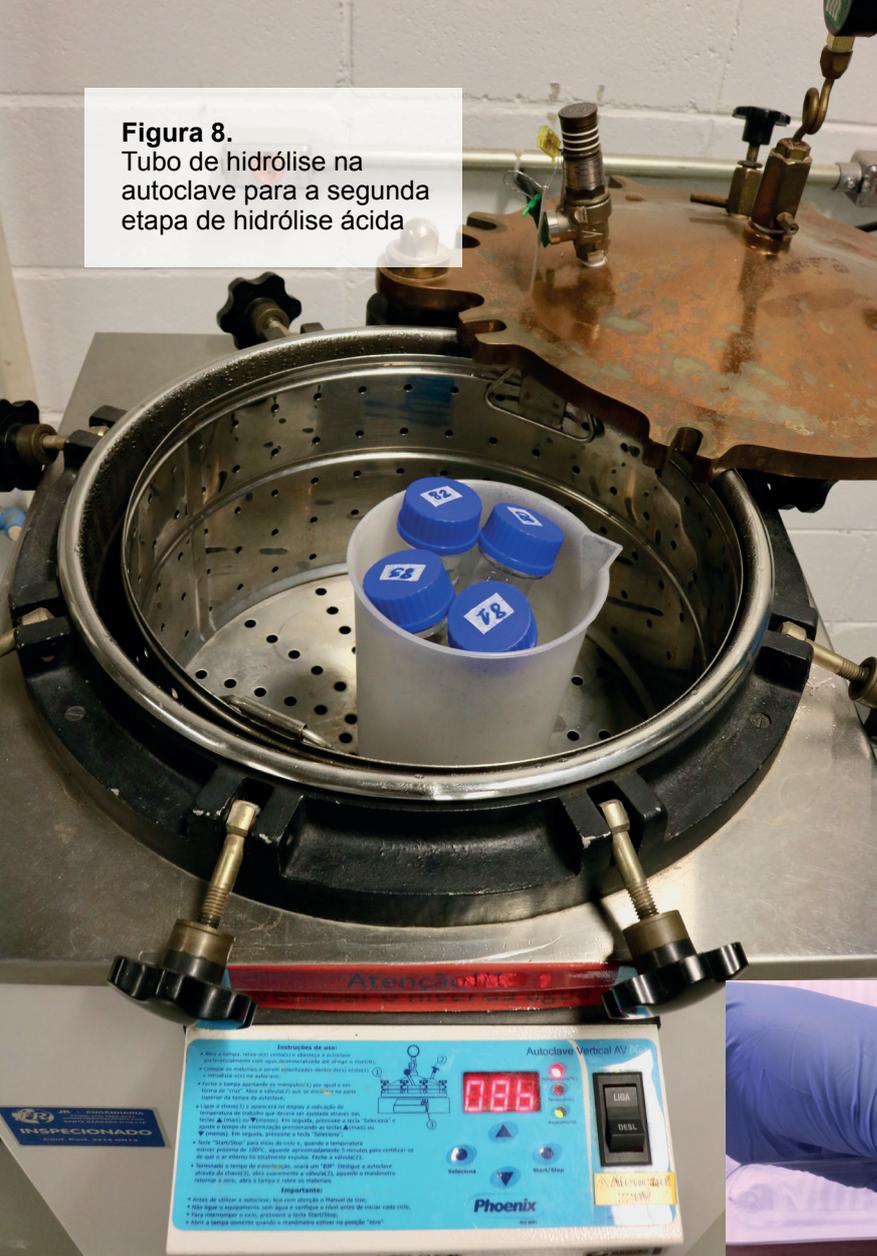
9.5.2.8 Após 1 hora de hidrólise, adicionar 84 mL de água destilada. Utilizar esse volume para retirar todo o resíduo de amostra presente no bastão e nas paredes do tubo.

9.5.2.9 Fechar e agitar suavemente, em movimentos circulares, o material contido no fundo do tubo de hidrólise.

9.5.2.10 Alocar o tubo na autoclave, fechar e autoclavar as amostras a 121°C por 60 min (Figura 8).

Figura 7. Tubo de hidrólise após o processo de hidrólise com ácido 72% (m/m)

Figura 8.
Tubo de hidrólise na autoclave para a segunda etapa de hidrólise ácida



9.5.2.11 Após a decompressão da autoclave, retirar os frascos e deixar resfriar até a temperatura ambiente.

9.5.2.12 Filtrar a vácuo a amostra autoclavada no cadinho de fundo poroso previamente tarado e pesado (item 9.5.1.5).

9.5.2.13 Recolher o filtrado em um kitassato (Figura 9).

9.5.2.14 Retirar e reservar o volume filtrado para posterior determinação de lignina solúvel, carboidratos, ácido acético e produtos de degradação.

9.5.2.15 Após a remoção do kitassato contendo o filtrado, lavar o cadinho contendo os sólidos remanescentes com água destilada até pH neutro da água.

Obs: Fazer o acompanhamento desta etapa através da verificação do pH do meio

9.5.2.16 Transferir o cadinho de filtração contendo os sólidos lavados para a estufa a 105°C para secagem até massa constante.



Figura 9.
Aparato para filtração a vácuo da solução obtida após autoclavagem do material a ser caracterizado



Figura 10.
Cadinhos de placa porosa
contendo o resíduo úmido de
lignina + cinzas estruturais.

9.6 QUANTIFICAÇÃO DOS CARBOIDRATOS, ÁCIDO ACÉTICO E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

9.6.1 Retirar uma alíquota de aproximadamente 20 mL da solução obtida no passo 9.5.2.14 e utilizar para a quantificação por CLAE.

9.6.2 Preparar os padrões

de calibração contendo os carboidratos, ácido acético e produtos de degradação dos carboidratos que serão quantificados.

9.6.3 As concentrações de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico e ácido acético presentes na fração solúvel são determinadas por CLAE utilizando-se uma coluna de troca iônica BIORAD HPX87H a 35°C ou similar como fase estacionária, uma solução de ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹ como fase móvel e índice de refração como detector. Uma alíquota da amostra deve ser filtrada em filtro de seringa membrana PVDF ou similar de 0,45µm antes do procedimento analítico.

9.6.4 A concentração de FURF e HMF pode ser determinada utilizando-se uma coluna de fase reversa Thermo Acclain C-18 ou similar, com uma fase móvel composta por uma solução de acetonitrila-água 1:8 % contendo 1% de ácido acético, utilizando-se um detector de UV-vis (274 nm) a 25°C. Uma alíquota da amostra deve ser filtrada em filtro de seringa membrana PVDF ou similar de 0,45µm antes do procedimento analítico.

9.6.5 As concentrações de glicose, celobiose, ácido fórmico e HMF são convertidas em celulose e as concentrações de xilose, arabinose, ácido glicurônico, ácido acético e FURF são convertidas em hemiceluloses empregando-se os fatores de conversões (Cálculos no item 9.9).

9.7 DETERMINAÇÃO DE LIGNINA INSOLÚVEL E CINZAS INSOLÚVEIS

9.7.1 Remover o cadinho contendo os sólidos remanescentes (obtido no item 9.5.2.16), da estufa e deixar atingir a temperatura ambiente dentro de um dessecador (Figura 11).

9.7.2 Registrar a massa do cadinho de filtração contendo o resíduo sólido seco (MCpR).

9.7.3 Colocar o cadinho contendo o resíduo em uma mufla (Figura 12).

9.7.4 O aquecimento é feito utilizando-se uma rampa de temperatura

- Aguardar a mufla atingir a 105°C e cronometrar 12 minutos;
- Aquecer até 250°C com uma taxa de 10°C/ minuto; e cronometrar 30 minutos;
- Aquecer até 575°C e cronometrar 180 minutos;
- Após o tempo, desligar a mufla, esperar a temperatura atingir 105°C;



Figura 11.
Cadinhos de placa porosa contendo o resíduo de lignina + cinzas estruturais.

Figura 12.
Cadinho de fundo poroso contendo o resíduo de lignina + cinzas estruturais da hidrólise ácida para ser calcinado em mufla.



Figura 13.
Cadinho de fundo poroso contendo cinzas estruturais.



9.7.5 Colocar os cadinhos no dessecador para esfriar até temperatura ambiente.

9.7.6 Pesar e registrar a massa do cadinho de filtração e das cinzas (M_{CpC}).

Obs1: Observar que o teor de cinzas insolúveis em meio ácido é distinto do conteúdo total de cinzas presente na biomassa.

Obs2: Caso seja necessário deixar para atingir 105°C de um dia para o outro, voltar novamente o cadinho contendo as cinzas para a estufa e então deixar esfriar dentro do dessecador.

Figura 14.
Dessecador contendo cadinhos de placa porosa + cinzas estruturais.



9.7.7 Cálculos

- Massa de cinzas na fração sólida ou cinzas insolúveis em meio ácido.

$$M_{Cinzas} (g) = M_{CpC} - M_{Cp}$$

Sendo:

M_{CpC} : Massa do cadinho de placa porosa (g) com as cinzas (item 9.7.6);

M_{Cp} : Massa do cadinho de placa porosa (g) (item 9.5.1.5).

- O teor de lignina insolúvel em meio ácido:

$$L_I (\%) = \left[\frac{M_{CpR} - (M_{Cinzas} + M_{Cp})}{M_{BE}} \right] \times \left[1 - \left(\frac{E}{100} \right) \right] \times 100$$

Sendo:

L_I : teor de lignina insolúvel em %.

M_{CpR} : Massa do cadinho de placa porosa com os resíduos sólidos (g) (item 9.7.2)

M_{Cinzas} : Massa de cinzas insolúveis em meio ácido (g);

M_{Cp} : Massa do cadinho de placa porosa (g) (item 9.5.1.5);

M_{BE} : Massa de biomassa livre de extrativos (bs) (g) (item 9.5.2.3)

E: teor de extrativos obtidos no item 9.4.2.13 (%)

9.8 DETERMINAÇÃO DE LIGNINA SOLÚVEL EM MEIO ÁCIDO

9.8.1 Branco: adicionar a um frasco 84 mL de água e 3 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m). Utilizar essa solução para fazer diluições na mesma proporção das amostras analisadas.

9.8.2 Retirar uma alíquota da solução obtida no item 9.5.1.14 para medir a absorvância.

9.8.3 Utilizando NaOH 6,5 mol.L⁻¹ ajustar o pH entre 12-12,5.

9.8.4 Fazer a diluição necessária da solução, seguindo a Lei de Lambert-Beer. Anotar o fator de diluição (*fd*). (A absorvância deve estar entre 0,2 e 0,8).

9.8.5 Efetuar a medida de absorvância em 280 nm em um espectrofotômetro UV-vis.

9.8.6 Cálculos:

A absorvância total da solução é a soma da absorvância da lignina e dos produtos de degradação furânicos (HMF e FURF) que absorvem na mesma região. Sendo assim:

$$A_{280} = [(\varepsilon_L \times C_{LS}) + (\varepsilon_{HMF} \times C_{HMF}) + (\varepsilon_{FUR} \times C_{FUR})]$$

$$A_{pd280} = [(C_{FUR} \times \varepsilon_{FUR}) + (C_{HMF} \times \varepsilon_{HMF})]$$

$$C_{LS} = \left[\frac{(A_{280} - A_{pd280})}{\varepsilon_L} \right]$$

$$C_{LS} \text{ (g/L)} = (4,187 \times 10^{-2} * (A_{280} - A_{pd280}) - 3,279 \times 10^{-4})$$

Sendo:

C_{LS} : concentração de lignina solúvel em g/L.

A_{280} : Absorvância total da solução obtida da hidrólise (lignina e os produtos de degradação) em 280 nm.

A_{pd280} : Absorvância, em 280nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (FUR e HMF), cujas concentrações C_{FUR} e C_{HMF} foram determinadas previamente por HPLC e ε_{FUR} e ε_{HMF} são absorvâncias e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L g⁻¹ cm⁻¹, conforme determinado experimentalmente por Rocha et al., 1997.

ε_L : Absorvância da lignina determinada em meio alcalino em 280 nm. O valor da absorvância para a lignina do bagaço é de 23,7 g⁻¹ cm⁻¹ e para palha é de 19,6 g⁻¹ cm⁻¹.

Obs1: A leitura da lignina solúvel deve ser realizada no mesmo dia, com no máximo até 6 h após a abertura da amostra.

Obs2: Corrigir os cálculos com as devidas diluições realizadas para a medida da absorvância.

As equações analíticas resumidas apresentadas abaixo são utilizadas para determinação da concentração de lignina solúvel (g/L) para a palha e o bagaço de cana de açúcar respectivamente.

- Equação analítica para a palha de cana-de-açúcar:

$$C_{LSpalha} = \frac{[A_{280} * fd - [(C_{FUR} \times \varepsilon_{FUR}) + (C_{HMF} \times \varepsilon_{HMF})]] - 0,031}{\varepsilon_L}$$

- Equação analítica para o bagaço de cana:

$$C_{LSbagaço} = \frac{[A_{280} * fd - [(C_{FUR} \times \epsilon_{FUR}) + (C_{HMF} \times \epsilon_{HMF})]] - 0,018}{\epsilon_L}$$

- Determinação do percentual de lignina solúvel:

$$L_S(\%) = \left[\frac{C_{LS} \left(\frac{g}{L} \right) \times V(L)}{M_{BE}} \right] \times \left[1 - \left(\frac{E}{100} \right) \right] \times 100$$

L_S (%) é o teor de lignina solúvel, expresso em porcentagem massa por massa (% m/m);
 C_{LS} (g/L) é a concentração de lignina solúvel, expressa em grama por litro (g/L);
 fd é o fator de diluição utilizado em 9.8.3;
 V (L) é o volume final da filtração (0,087L), expresso em litro (L);
 M_{BE} é a massa de biomassa livre de extrativos (bs); (item 9.5.2.3) expressa em grama (g);
 E é o teor de extrativos totais, expresso em porcentagem massa por massa (% m/m). (item 9.4.2.13)

- Lignina total:

O valor de lignina total é a soma dos teores de lignina insolúvel e solúvel.

$$L_T(\%) = L_I(\%) + L_S(\%)$$

9.9 MODELO DE CÁLCULO DE CELULOSE E HEMICELULOSES

Com os dados do item 9.5 e os resultados no item 9.6, determinados por CLAE proceder com os cálculos:

Cel (%)

$$= \left[\frac{((0,90 \times C_{Gli}) + (0,95 \times C_{Celo}) + (1,29 \times C_{HMF}) + (3,53 \times C_{\acute{A}c. F\acute{o}rm})) * V(L)}{M_{BE}} \right] \times \left[1 - \left(\frac{E}{100} \right) \right] \times 100$$

Hemi (%)

$$= \left[\frac{((0,88 \times C_{Xil}) + (0,88 \times C_{Arab}) + (0,72 \times C_{\acute{A}c. Ac\acute{e}t}) + (1,37 \times C_{FUR})) * V(L)}{M_{BE}} \right] \times \left[1 - \left(\frac{E}{100} \right) \right] \times 100$$

Onde:

C_{Cel} (%) é o teor de celulose da biomassa, expresso em %.

C_{Gli} é a concentração de glicose, expressa em grama por litro (g/L);

C_{Celo} é a concentração de celobiose, expressa em grama por litro (g/L);

C_{HMF} é a concentração de HMF, expressa em grama por litro (g/L);

$C_{\text{Ác. Fórm}}$ é a concentração de ácido fórmico, expressa em grama por litro (g/L);

$Hemi$ (%) é o teor de hemiceluloses da biomassa, expresso em %.

C_{Xil} é a concentração de xilose, expressa em grama por litro (g/L);

C_{Arab} é a concentração de arabinose, expressa em grama por litro (g/L);

$C_{\text{Ác. Acét}}$ é a concentração de ácido acético, expressa em grama por litro (g/L);

C_{FUR} é a concentração de furfural, expressa em grama por litro (g/L);

$V(L)$: volume final da filtração (0,087L);

M_{BE} : Massa de biomassa livre de extrativos (bs)(g) (Item 9.5.2.3).

Obs: Os fatores de conversão são calculados baseando-se na adição de água nos polissacarídeos durante a hidrólise ácida. Para mais informações, consulte as referências listadas no presente documento (Item 1.1).