Karen Marabezi

Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Aprigio Da Silva Curvelo

São Carlos

2009

A minha família, pelo apoio incondicional, amizade, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Química de São Carlos – IQSC/USP, em especial ao Departamento de Físico-Química, pela oportunidade;

Ao Prof. Dr. Aprigio pela amizade, paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho;

Aos colegas do grupo Leandro, Thais, Fernanda, Guilherme e Luizão pela contribuição no meu desenvolvimento científico e pessoal, em especial ao Leandro, pela amizade e discussões que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e elaboração de novas idéias;

Á Márcia, pela paciência com as análises cromatográficas;

Ao Luis pela amizade, ajuda durante as análises termogravimétricas e discussões dos resultados;

Ao Prof. Dr. Tito José Bonagamba e seu aluno André Souza pela realização e discussões das análises de RMN;

Aos amigos pelos momentos de alegria e descontração que tanto auxiliaram no meu amadurecimento e na certeza de que amizades valem mais do que tudo.

Ao CNPq pela bolsa concedida;

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS i
LISTA DE TABELAS vi
RESUMO xi
ABSTRACT xii
1- INTRODUÇÃO 1
1.1- Biomassa 1
1.2- Bioenergia e Biocombustíveis 3
1.3- Cana-de-Açúcar 6
1.4- Composição Química do Bagaço de Cana-de-Açúcar 13
1.4.1- Celulose 13
1.4.2- Polioses 16
1.4.3- Ligninas 18
1.4.4- Extrativos e Cinzas 23
1.4.5- Associação de Celulose, Polioses, e Ligninas nos Tecidos Vegetais 24
1.5- Métodos de Determinação Qualitativa de Lignina 25
1.6- Métodos de Determinação Quantitativa de Lignina 29
1.7- Isolamento da Lignina 32
1.8- Reações em Meio àcido 34
1.8.1- Reações de Polissacarídeos 34
1.8.2- Reações da Lignina 38
2- OBJETIVOS 42
3- PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS 43
3.1- Matéria-Prima 43
3.2- Amostragem 44
3.3- Caracterização do Bagaço e da Palha de Cana-de-Açúcar 44
3.3.1- Teor de Umidade 44
3.3.2- Teor de Cinzas 45
3.3.3- Teor de Extrativos 45
3.4- Determinação do Conteúdo de Lignina 46
3.5- Determinação de Lignina Solúvel 48
3.6- Determinação do Teor de Polissacarídeos 49

3.7- Extração de Lignina pelo Método Pepper 50
3.8- Métodos de Caracterização 51
3.8.1- Espectroscopia na Região do Infravermelho 52
3.8.2- Espectroscopia na Região do UV-visível 54
3.8.3- Espectroscopia de RMN C^{13} 55
3.8.4- Análise Termogravimétrica 57
3.8.5- Análise Elementar 58
3.8.6- Cromatografia de permeação em Gel 58
3.9- Análise de Polissacarídeos e Derivados 59
3.9.1- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 59
4- RESULTADOS e DISCUSSÕES 60
4.1- Caracterização do Bagaço e da Palha de Cana-de-Açúcar 60
4.2- Determinação de Cinzas 61
4.3- Teor de Extrativos 62
4.4- Determinação Gravimétrica da Lignina 63
4.5- Caracterização das Ligninas Obtidas nas diferentes Concentrações de Ácido sulfúrico 70
4.5.1- Análise Elementar 70
4.5.2- Análise Termogravimétrica 78
4.5.3- Análise de UV-visível 85
4.5.4- Análise de RMN C^{13} 94
4.5.5- Análise de Infravermelho 102
4.5.6-Análise de Massas molares por Cromatografia de Permeação em Gel(GPC) 107
4.5.7- Determinação dos Teores de Celulose e Polioses 114
4.5.8-Determinação Gravimétrica dos Polissacarídeos (Holocelulose) 121
5- CONCLUSÕES 130
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 135

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rotas para produção de etanol 2

Figura 2. Secção transversal do talo da cana-de-açúcar. 7

Figura 3. Imagens da fração (A) fibra e (B) medula, componentes do bagaço de cana-de-açúcar 9

Figura 4. Elementos constituintes da madeira de folhosa: A, B, C – elementos de vasos largos; D, E, F – elementos de vasos estreitos; G- traqueóide; H – fibrotraqueóide; I – fibra libriforme; J – células de parênquima radial; K – células de parênquima axial 12

Figura 5. Representação da molécula de celulose..... 14

Figura.6.Ligações de hidrogênio intra e intermolecular na celulose..... 15

Figura 7. Açúcares componentes das polioses 17

Figura 8. Precursores primários das ligninas: álcool p-cumarílico (I), álcool coniferílico (II) e álcool sinapílico (III) 18

Figura 9. Modelo estrutural de lignina de folhosa *(Fagus sylvatica)* proposto por Nimz 21

Figura 10. Desidrogenação enzimática do álcool coniferílico 22

Figura 11. Modelos de associação dos componentes celulares macromoleculares. [FENGEL e WENEGER, 1984]. a) Preston (1962); b) Marchessault (1964); c) Kerr e Göring (1975); d) Fengel (1970). 25

Figura 12. Mecanismo de hidrólise ácida de ligações glicosídicas 34

Figura 13. Formação de furfural e HMF pela degradação de polissacarídeos em meio ácido 36

Figura 14. Formação oxidativa de diferentes unidades de açúcares de polissacarídeos 37

Figura 15. Sítios reativos em unidades fenilpropânicas 38

Figura 16. Sítios de alta e baixa densidade eletrônica, em meio ácido ou neutro, em unidades arilpropano (a) e arilpropeno (b) 39

Figura 17. Conversão dos grupos α-éter para carbocátion-oxônio 40

Figura 18. Reações de condensação da lignina com ácidos minerais concentrados. (a) com H_2SO_4 concentrado e (b) com HCl 40

Figura 19. Degradação oxidativa de unidades fenólicas da lignina por dióxido de cloro 41

Figura 20. Fotografias das frações (A) fibra e (B) medula do bagaço de cana-de-açúcar. Medula, Fibra 61

Figura 21. Gráfico do teor de lignina insolúvel (expresso como resíduo) em função da concentração de ácido sulfúrico 66

Figura 22. Gráfico do teor de lignina insolúvel (expresso como resíduo) em função da concentração de ácido sulfúrico 69

Figura 23. Estruturas moleculares das unidades monoméricas da celulose (β-D-glicopiranose) e de um açúcar típico de polioses (□-D-xilopiranose). 71

Figura 24. Reação de unidades de lignina em ácido sulfúrico 74

Figura 25. Gráfico de lignina insolúvel (% Resíduo) e do teor de carbono em função da concentração do ácido para o bagaço integral, sua frações (fibra e medula) e para palha de cana-de-açúcar 78

Figura 26. Análise termogravimétrica da lignina obtida pelo método Pepper em atmosfera de N_2 80

Figura 27. Análise termogravimétrica de ligninas obtidas com ácido sulfúrico nas concentrações de (—) 60%,(—) 65%, (—) 68%, (—) 70%, (—) 72%, (—) 80%, da fração medula do bagaço em atmosfera de N_2. 82

Figura 28. Análise termogravimétrica de ligninas obtidas com ácido sulfúrico nas concentrações de (—) 60%,(—) 65%, (—) 68%, (—) 70%, (—) 72%, (—) 80%, da fração fibra do bagaço em atmosfera de N_2. 82

Figura 29. Análise termogravimétrica de ligninas obtidas com ácido sulfúrico nas concentrações de (—) 60%,(—) 65%, (—) 68%, (—) 70%, (—) 72%, (—) 80% da palha de cana-de-açúcar em atmosfera de N_2. 83

Figura 30. Análise termogravimétrica de ligninas obtidas com ácido sulfúrico nas concentrações de (—) 60%,(—) 65%, (—) 68%, (—) 70%, (—) 72%, (—) 80% do bagaço integral em atmosfera de N_2. 83

Figura 31. Análise termogravimétrica da fibra, medula, palha e do bagaço integral em atmosfera de N_2. 84

Figura 32. Espectro de UV-vis das ligninas obtidas nas diferentes concentrações de ácido. (A) Fibra, (B) medula, (C) Palha e (D) Bagaço Integral. 87

Figura 33. Espectro de UV-vis das ligninas das amostras de madeira obtidas nas diferentes concentrações de ácido. (A) *Eucalyptus Grandis* e (B) *Pinus Taeda.* 88

Figura 34. Gráfico do teor de lignina total (solúvel + insolúvel) em função da concentração de ácido sulfúrico. 92

Figura 35. Gráfico do teor de lignina total (solúvel + insolúvel) em função da concentração de ácido sulfúrico. 94

Figura 36. Análise de RMN das ligninas insolúveis obtidas com diferentes concentrações de ácido e Lignina Pepper 96

Figura 37. Análise de RMN ^{13}C da lignina obtida pelo método Pepper em solução de DMSO. 102

Figura 38. Espectros de infravermelho das ligninas obtidas da (—) Fibra, (—) Medula, (—) Bagaço integral, (—) Palha, (—) Pepper. 106

Figura 39. Cromatogramas de análise de GPC das ligninas obtidas com ácido 72%. Detector de Índice de Refração. 109

Figura 40. Cromatogramas de análise de GPC das ligninas obtidas com ácido 72%. Detector de UV -254 nm. 110

Figura 41. Cromatogramas dos padrões utilizados nas análises dos polissacarídeos dos materiais hidrolisados. (A) Determinação de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico e ácido acético, (B) Determinação de furfural e HMF. 115

Figura 42. Espectros de infravermelho das amostras de (—) Celulose, (—) Lignina Pepper, e das holoceluloses obtidas da fibra. (—) Norma, (—) 4 horas de reação e (—) aumento de 25% de clorito.. 126

Figura 43. Espectros de infravermelho das amostras de (—) Celulose, (—) Lignina Pepper, e das holoceluloses obtidas da medula. (—) Norma, (—) 4 horas de reação e (—) aumento de 25% de clorito.. 127

Figura 44. Espectros de infravermelho das amostras de (—) Celulose, (—) Lignina Pepper, e das holoceluloses obtidas do bagaço integral. (—) Norma, (—) 4 horas de reação e (—) aumento de 25% de clorito..... 128

Figura 45. Espectros de infravermelho das amostras de (—) Celulose, (—) Lignina Pepper, e das holoceluloses obtidas da palha. (—) Norma, (—) 4 horas de reação e (—) aumento de 25% de clorito.. 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de lignina no bagaço de cana-de-açúcar. **6**

Tabela 2. Toneladas de cana-de-açúcar processadas pelas usinas brasileiras. **7**

Tabela 3. Modos de acoplamentos do radica fenóxido do álcool p-cumarílico (Glasser 1980). **22**

Tabela 4. Bandas de absorção características das ligninas. **53**

Tabela 5. Teores de cinzas nas amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar. **62**

Tabela 6. Teores de extrativos do bagaço e da palha de cana-de-açúcar. **63**

Tabela 7. Valores de lignina insolúvel (expresso como massa residual) para o bagaço de cana-de-açúcar e suas frações (fibra e medula). **64**

Tabela 8. Valores de lignina insolúvel (expresso como massa residual) para a palha de cana-de-açúcar. **66**

Tabela 9. Valores de lignina insolúvel obtidos para a madeira de *Eucaliptus* e *Pinus.* **67**

Tabela 10. Análise elementar de amostras de lignina de bagaço e palha de cana-de-açúcar **72**

Tabela 11. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas da fração de fibra do bagaço **73**

Tabela 12. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas da fração de medula do bagaço **73**

Tabela 13. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas da fração de palha **73**

Tabela 14. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas do bagaço integral **74**

Tabela 15. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas da fração de fibra do bagaço. **75**

Tabela 16. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas da fração de medula do bagaço **75**

Tabela 17. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas da fração de palha **75**

Tabela 18. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas do bagaço integral **76**

Tabela 19. Teor de metoxila para algumas proporções de unidades constituintes de ligninas. **77**

Tabela 20. Valores de absorção das ligninas em meio ácido. **88**

Tabela 21. Valores de absorção das ligninas das madeiras de *Pinus Taeda* e *Eucalyptus Grandis* em meio ácido. **89**

Tabela 22. Valores de lignina total (solúvel + insolúvel) obtidos para a fração fibra do bagaço. **90**

Tabela 23. Valores de lignina total (solúvel + insolúvel) obtidos para a fração medula do bagaço **90**

Tabela 24. Valores de lignina total (solúvel + insolúvel) obtidos para a palha **91**

Tabela 25. Valores de lignina total (solúvel + insolúvel) obtidos para o bagaço integral **91**

Tabela 26. Valores de lignina insolúvel obtidos para a madeira de *Eucaliptus* **93**

Tabela 27. Valores de lignina insolúvel obtidos para a madeira de *Pinus* **93**

Tabela 28. Tabela com os valores de picos de ^{13}C RMN atribuídos a lignina da fibra obtidos neste trabalho e picos atribuídos a lignina de bagaço moído (MBL). **98**

Tabela 29. Teor de metoxilas determinados por RMN ^{13}C para as ligninas insolúveis, da fração fibra, obtidas no tratamento com ácido sulfúrico em diferentes concentrações. **99**

Tabela 30. Determinação das unidades C_9 para as ligninas insolúveis, da fração fibra, obtidas no tratamento com ácido sulfúrico em diferentes concentrações. **100**

Tabela 31. Tabela com valores e atribuições dos picos característicos em ligninas. **105**

Tabela 32. Valores de massas molares médias e polidispersividade das ligninas da fibra. **111**

Tabela 33. Valores de massas molares médias e polidispersividade das ligninas da medula. **111**

Tabela 34. Valores de massas molares médias e polidispersividade das ligninas da palha. **112**

Tabela 35. Composição química da fração fibra do bagaço de cana. **116**

Tabela 36. Composição química da fração medula do bagaço de cana. **117**

Tabela 37. Composição química do bagaço de cana. **117**

Tabela 38. Composição química da palha de cana-de-açúcar. **118**

Tabela 39. Valores de HMF e Furfural dos hidrolisados da fibra quantificados por HPLC. **119**

Tabela 40. Valores de HMF e Furfural dos hidrolisados da medula quantificados por HPLC. **120**

Tabela 41. Valores de HMF e Furfural dos hidrolisados da palha quantificados por HPLC. **120**

Tabela 42. Valores de HMF e Furfural dos hidrolisados do bagaço integral quantificados por HPLC. **121**

Tabela 43. Valores da primeira determinação de holocelulose e lignina das frações do bagaço e da palha de cana-de-açúcar. **122**

Tabela 44. Valores de lignina total (solúvel + insolúvel) obtidos para o bagaço e palha de cana-de-açúcar em meio ácido. **123**

Tabela 45. Valores de holocelulose e lignina das frações do bagaço e da palha de cana-de-açúcar, com aumento na quantidade de clorito em 25. **123**

Tabela 46. Valores de holocelulose e lignina das frações do bagaço e da palha de cana-de-açúcar, com aumento no tempo de reação. **124**

RESUMO

Os métodos analíticos empregados atualmente para a caracterização química de materiais lignocelulósicos foram desenvolvidos para a madeira e são empregados com pequenas modificações ao bagaço e à palha da cana-de-açúcar. A não existência de metodologia específica para estes materiais leva a obtenção de resultados inadequados e dificultam tanto o planejamento quanto a interpretação de resultados. Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho é desenvolver metodologias analíticas específicas para a caracterização química da palha e do bagaço de cana-de-açúcar. A determinação de lignina foi estudada a partir da hidrólise e solubilização da celulose e hemiceluloses em solução de ácido sulfúrico. A fração insolúvel foi analisada por análise elementar, espectroscopia no infravermelho, espectrometria de ressonância magnética nuclear de C^{13} no estado sólido e análise termogravimétrica (TGA). Os açúcares hidrolisados e produtos derivados destes foram analisados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi realizada uma análise de holocelulose que é complementar à determinação de lignina. O procedimento consiste no tratamento do material lignocelulósico (pré-extraído com cicloexano/etanol) com solução de clorito de sódio em meio ácido. Os resultados obtidos não apresentaram similaridade nas correlações entre os métodos analíticos, entretanto mostraram que o bagaço integral e suas frações separadamente apresentam comportamentos diferentes, frente ao tratamento ácido, o que ressalta a necessidade de métodos analíticos específicos.

ABSTRACT

The analytical methods currently used for chemical characterization of lignocellulosic materials were developed for wood and are applied with minor modifications for sugar cane bagasse and straw analysis. The lack of specific methodology for these materials leads to inadequate results and hamper both the planning and the interpretation of results. Thus, the main aim of this work is to develop specific analytical methodologies to the chemical characterization of sugar cane bagasse and straw. The determination of lignin was studied by the hydrolysis and dissolution of the polysaccharide fraction in sulfuric acid solution. The insoluble fraction was analyzed by elemental analysis, Fourier Transform Infrared (FT-IR), Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{13}C NMR), Gel permeation chromatography (GPC) and Thermogravimetric analysis (TGA). The sugars and derivatives of these hydrolysates were analyzed by High performance liquid chromatography (HPLC). It was also performed a complementary analysis from the holocellulose content determinations in order to check the values obtained by the klason procedure. The results showed the dependence of sulfuric acid concentration on lignin content determinations and the role of condensation reactions in the lignin characteristics. Despite the similarities in chemical composition, klason lignins obtained from straw exhibited very low molar masses. Preliminary results obtained from holocellulose determinations showed also the need for optimized oxidation procedures in order to be successful applied to sugar cane bagasse analysis.

1- INTRODUÇÃO

1.1- BIOMASSA

Petróleo, gás natural e seus derivados respondem por 55% do consumo mundial de energia [BNDES, *et al*., 2008]. São esses combustíveis que permitem boa parte das atividades industriais e possibilitam o desenvolvimento econômico dos países. Entretanto, como combustíveis de origem fóssil, as suas reservas são finitas, e o seu uso é um dos principais responsáveis pela emissão de gases poluentes que estão provocando mudanças climáticas e o aquecimento global.

No início deste século, com a conscientização a nível mundial da necessidade de fontes renováveis de energia e de preservação do meio ambiente, surge uma nova perspectiva de produzir combustíveis a partir de matéria orgânica renovável (biomassa). Essa biomassa acumula energia química que, para os vegetais, provem da conversão de energia luminosa graças à fotossíntese. Capaz de aliviar preocupantes problemas ambientais, a energia fotossintética traz uma nova dinâmica ao mundo agroindustrial e oferece uma alternativa à evolução industrial em um contexto mais racional e sustentável.

A produção de biocombustíveis com base em matérias-primas vegetais pode ser efetuada por distintas rotas tecnológicas, com diferentes vantagens e limitações. Entre os biocombustíveis líquidos, destacam-se o etanol e o

biodiesel. O bioetanol, também conhecido como etanol celulósico, representa a segunda geração de biocombustíveis. Enquanto a primeira geração requer a utilização de produtos agrícolas como matéria-prima (sacarose de cana-de-açúcar, por exemplo), a segunda geração utiliza resíduos agrícolas e agroindustriais (celulose do bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo) como insumo na produção de biocombustíveis. O bietanol pode ser produzido a partir de qualquer biomassa que contenha quantidades significativas de amido (como trigo, milho e outros grãos), açúcares (como cana e beterraba) ou celulose. A Figura 1 sintetiza as rotas tecnológicas para produção de bioetanol, considerando as diferentes matérias-primas de interesse.

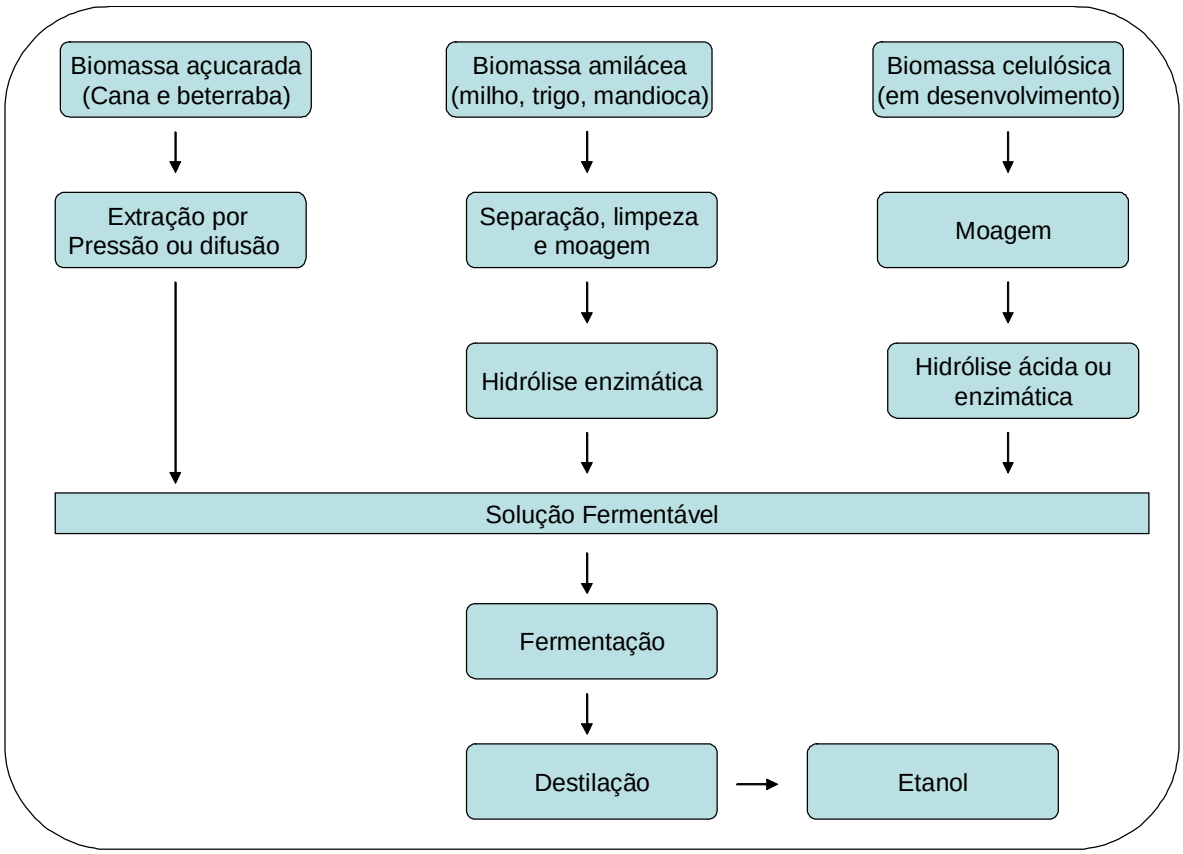


Figura 1. Rotas para produção de etanol.

O biodiesel é uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos, obtidos a partir de matérias ricas em ácidos graxos, caso dos óleos vegetais e das gorduras animais. Os processos atuais de produção de biodiesel estão centrados fortemente na reação de transesterificação de óleos vegetais usando etanol anidro como reagente e catálise básica homogênea usando hidróxidos ou alcoóxidos de metais alcalinos. Quando queimado em substituição total ao óleo diesel, libera 50% a menos de material particulado e 98% a menos de enxofre. Além disso, é biodegradável e não tóxico (BOEHMAN, 2005).

1.2- BIOENERGIA E BIOCOMBUSTÍVEIS

O interesse mundial pelo desenvolvimento dos biocombustíveis aumentou em meados dessa década em virtude de uma preocupação maior com o desenvolvimento de fontes renováveis de energia e problemas ambientais causados pela queima de combustíveis fósseis. Nesse cenário, destaca-se o Brasil onde o programa de bioetanol apresenta bons resultados. O etanol, produzido da cana-de-açúcar, já substitui hoje metade da gasolina que seria consumida e seu custo é competitivo sem os subsídios que viabilizaram o programa no seu início.

O setor sucroalcooleiro brasileiro passou por profundas alterações nos últimos 30 anos. Em meados da década de 70, com a necessidade de redução de importações, o governo Brasileiro criou o Proálcool (Programa Brasileiro de

Álcool), o qual provocou o primeiro grande impacto no setor sucroalcooleiro brasileiro, gerando a primeira grande onda transformista.

O Proálcool teve por objetivo criar uma fonte alternativa de combustível para veículos providos de motor a explosão com ciclo Otto e promover a criação de emprego no Brasil. Este programa, apesar de suas falhas, injetou considerável soma de capital no setor, o inicio do desenvolvimento tecnológico em todos os segmentos econômicos relacionados com a produção de álcool a partir da cana de açúcar, principalmente.

Embora o uso do álcool combustível, iniciado há mais de três décadas, tenha sofrido uma crise de desabastecimento nos anos 80 e 90, as pesquisas nessa área têm continuamente avançado no país, tanto nas instituições públicas quanto na esfera privada. E ganharam um novo impulso com o sucesso dos carros bicombustíveis no mercado. A cada ano, surgem novas espécies de cana mais resistentes a pragas ou a seca e com maior produtividade de açúcar e álcool. A maior promessa para um futuro próximo é aproveitar também a palha e o bagaço resultante da moagem da cana – hoje usado para geração de energia térmica ou alimentação animal – para produzir álcool combustível.

O Brasil produz atualmente cerca de 16 bilhões de litros de etanol combustível, o que representa 35% do total mundial. [ERENO, D , 2007]. Como hoje apenas um terço da biomassa contida na planta cana é aproveitado para a produção de açúcar e de etanol, o grande desafio é transformar a celulose, presente no bagaço e na palha (descartada na colheita), em álcool combustível.

O aproveitamento do bagaço e da palha de cana ainda merece muitos estudos. Para que esta biomassa possa ser utilizada como matéria-prima para os processos químicos e biológicos de produção de álcool são necessários à realização de pré-tratamentos para desorganizar o complexo lignocelulósico, sendo o principal desafio a remoção seletiva e quantitativa da lignina. Além de não levar à produção de álcool, a presença de lignina inibe o processo de fermentação dos açúcares.

A deslignificação dos materiais lignocelulósicos e as análises (qualitativa e quantitativa) destes materiais envolvem particularidades morfológicas e estruturais dos diferentes tecidos vegetais. Os métodos atualmente empregados para a realização destas etapas foram desenvolvidos para aplicação em estudos de árvores e suas respectivas madeiras e não produzem, necessariamente, os melhores resultados quando aplicados ao bagaço e à palha da cana-de-açúcar. Os valores de lignina encontrados na literatura, para o bagaço e palha de cana-de-açúcar, apresentam uma variação de cerca de 10 pontos percentuais, como pode ser observado na Tabela 1.

O crescimento da importância da alcoolquímica e a particularidade química e morfológica da cana-de-açúcar (e seus subprodutos agroindustriais) demandam o desenvolvimento de métodos específicos, tanto para sua caracterização química como para seu processamento industrial.

Tabela 1. Valores de lignina no bagaço de cana-de-açúcar.

	Fibra	**Medula**	**Bagaço Integral**	**Referências**
Lignina (%)	17,7	16,1	—	SANJUÁN, R. *et a.l*
	—	—	25,3	HOAREAU, W. *et a.l*
	—	—	23,8	VIERA, R. G. P. *et a.l*
	—	—	18,1	MARTÍN, C. *et a.l*
		—	18,6	KELLY, S. S. *et a.l*
	20,8	18,9	—	WIDYORINI, R *et a.l*
	—	—	24,6	AGUIAR, C.L. *et a.l*
	—	—	18,9	ROWELL, R. M. *et a.l*
	—	—	24,5	PASQUINI, D. *et a.l*
	—	—	18,5	NASSAR, M. M. *et a.l*
	—	—	13,0	SMITH, N. G. J. *et a.l*

1.3- CANA-DE-AÇÚCAR

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido por Índia e Austrália. Planta-se cana no Centro-Sul e no Norte-Nordeste do país, o que permite dois períodos de safra no ano. A produção de cana-de-açúcar no Brasil tem crescido nos últimos anos, atingindo na safra 2007/2008 um total de aproximadamente 500.000.000 toneladas (Tabela 2). [UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar, 2007]**.**

A cana-de-açúcar é composta pela epiderme, capa fina que recobre e protege o talo, atuando como impermeabilizante, a casca, composta de fibras bastante lignificadas que protegem o talo dos efeitos mecânicos externos, dando sustentação à planta, e na parte interior do talo se encontra o tecido parenquimatoso, cuja função é armazenar o suco açucarado (Figura 2). Imerso dentro desse tecido aparecem feixes de fibras e vasos que juntos possuem a

função de conduzir os nutrientes e produtos produzidos pela planta [ICIDCA, 1990].

Tabela 2. Toneladas de cana-de-açúcar processadas pelas usinas brasileiras.

Safra / Região	03/04	04/05	05/06	06/07	07/08
Centro-Sul	299.120.591	328.697.362	337.714.418	372.285.061	431.184.748
Norte-Nordeste	60.194.968	57.392.755	49.727.458	53.250.700	62.199.804
Brasil	359.315.559	386.090.117	387.441.876	425.535.761	493.384.552

Fonte: União da Indústria de Cana-de-Açúcar, 2007.

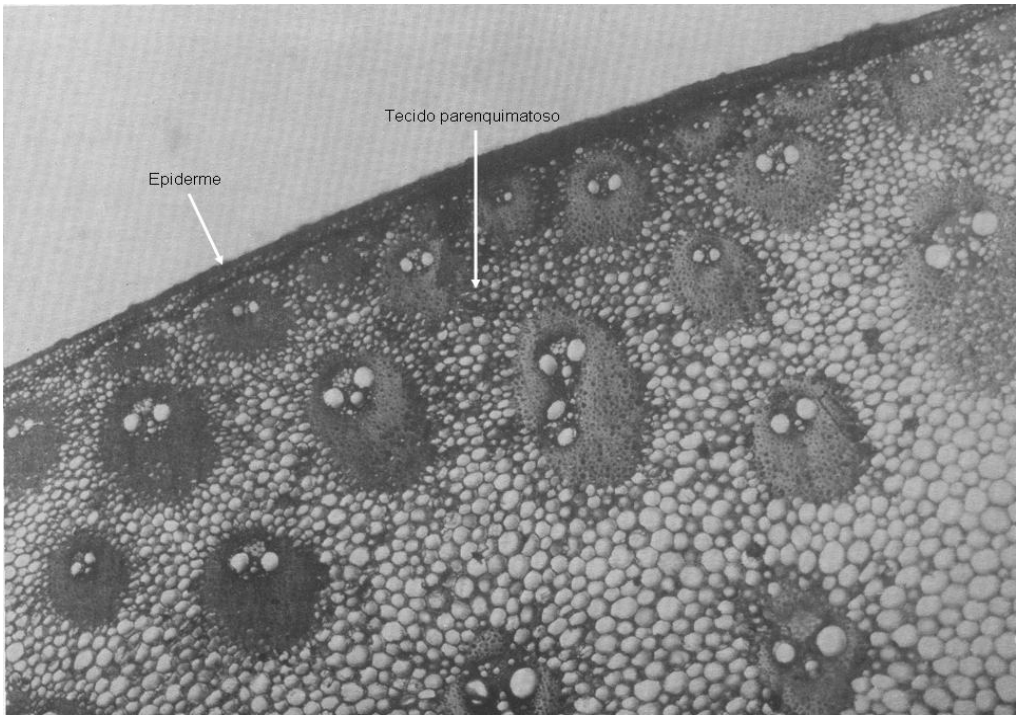


Figura 2. Secção transversal do talo da cana-de-açúcar.

O bagaço de cana-de-açúcar é um material lignocelulósico fibroso que se obtêm após a moagem da cana-de-açúcar. É formado por um conjunto de fragmentos bastante heterogêneo com dimensões que oscilam de 1 a 25 mm. A granulometria do bagaço depende do trabalho de moagem e da variedade da cana. Do ponto de vista físico, o bagaço industrial é constituído por cerca de 50% de umidade, 45% de estruturas fibrilares e 5 % de extrativos e componentes inorgânicos. Esta fração de estruturas fibrilares é composta por 55 a 60% de fibras (células fibrilares), 30 a 35% de medula (células de parênquima) (Figura 3) e 10 a 15% de outros componentes [ICIDCA, 1990].

A composição química do bagaço apresenta pequenas variações em função da variedade da cana empregada e da localização geográfica dos locais de cultivo. O bagaço é composto por celulose, polioses (hemiceluloses) e lignina, como principais componentes macromoleculares. A celulose é o principal componente da parece celular e representa 41 a 44% do bagaço, a lignina representa de 20 a 22%, as polioses representam 25 a 27% e o restante, cerca de 10%, são componentes minoritários de baixo peso molecular, extrativos e substâncias minerais. [ICIDCA, 1990].

A principal dificuldade encontrada na análise de composição química de materiais lignocelulósicos é o fato de que as macromoléculas presentes na parede celular (celulose, polioses e lignina), se encontram intimamente associadas. Nas diferentes etapas empregadas nos processos analíticos, porções de ligninas e de polissacarídeos permanecem como resíduos junto às frações isoladas de holocelulose (celulose + polioses) e de lignina, respectivamente. Como resultado, o balanço de massas destas análises dificilmente alcança 100%, especialmente se o número de etapas ou análises

individuais é elevado, causando lapsos ou sobrepondo resultados, combinados com a adição de erros individuais. Valores entre 98 e 102% para o balanço de massa são geralmente considerados aceitáveis.

Figura 3. Imagens da fração (A) fibra e (B) medula, componentes do bagaço de cana-de-açúcar.

A utilização industrial da madeira para fabricação de papel já conta com mais de 100 anos e foi acompanhada do desenvolvimento de metodologias analíticas e de processamento. Atualmente as normas brasileiras (NBR) da ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas - já dispõem sobre vários métodos aplicados a determinações da composição química quantitativa e qualitativa da madeira. Na indústria de papel e celulose, a determinação de lignina é uma análise muito importante para caracterizar a matéria prima, avaliar efeitos dos tratamentos químicos, físicos e biológicos aplicados à madeira, monitorar a liberação de efluentes e estimar a quantidade de reagentes em reações de branqueamento.

No caso particular da cana-de-açúcar, a utilização industrial concentrou-se em produtos derivados da sacarose: açúcar e álcool. Por outro lado, a utilização do bagaço de cana-de-açúcar, que tem se limitado a produção de polpas celulósicas em alguns poucos países, utilização em ração animal e, mais recentemente, na geração de energia pela sua queima em caldeiras, vem sendo alvo de pesquisas para produção de bioetanol e produtos com maior valor agregado. Em todas estas aplicações e em maior ou menor extensão, foram utilizados métodos de caracterização originalmente desenvolvidos para a madeira.

Comparando a morfologia da cana-de-açúcar com a madeira podemos observar diferenças significativas. As madeiras de coníferas (softwood) são compostas por 90-95% de traqueóides, que são células longas e delgadas com arestas fechadas achatadas ou cônicas, já as madeiras de folhosas (hardwood) apresentam o tecido básico de sustentação constituído por fibras libriformes, fibro-traqueóides e vasos de condução. A cana é composta em grande parte

por células de parênquima que são menores e compactas. Na Figura 4 são apresentadas estruturas vários tipos de fibras. A espessura das paredes de fibras ou traqueóides, o número e o diâmetro de vasos, bem como o número de células de parênquima, determinam a densidade das madeiras. E apesar da ampla utilização da cana-de-açúcar e de suas características morfológicas que a diferenciam das madeiras, os métodos de caracterização da fração lignocelulósica do bagaço e da palha da cana-de-açúcar seguem os procedimentos estabelecidos para a madeira. O desenvolvimento de novas espécies de cana de açúcar e o uso da fração de polissacarídeos, em especial a celulose, presentes no bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol celulósico reforça a demanda por métodos específicos de caracterização.

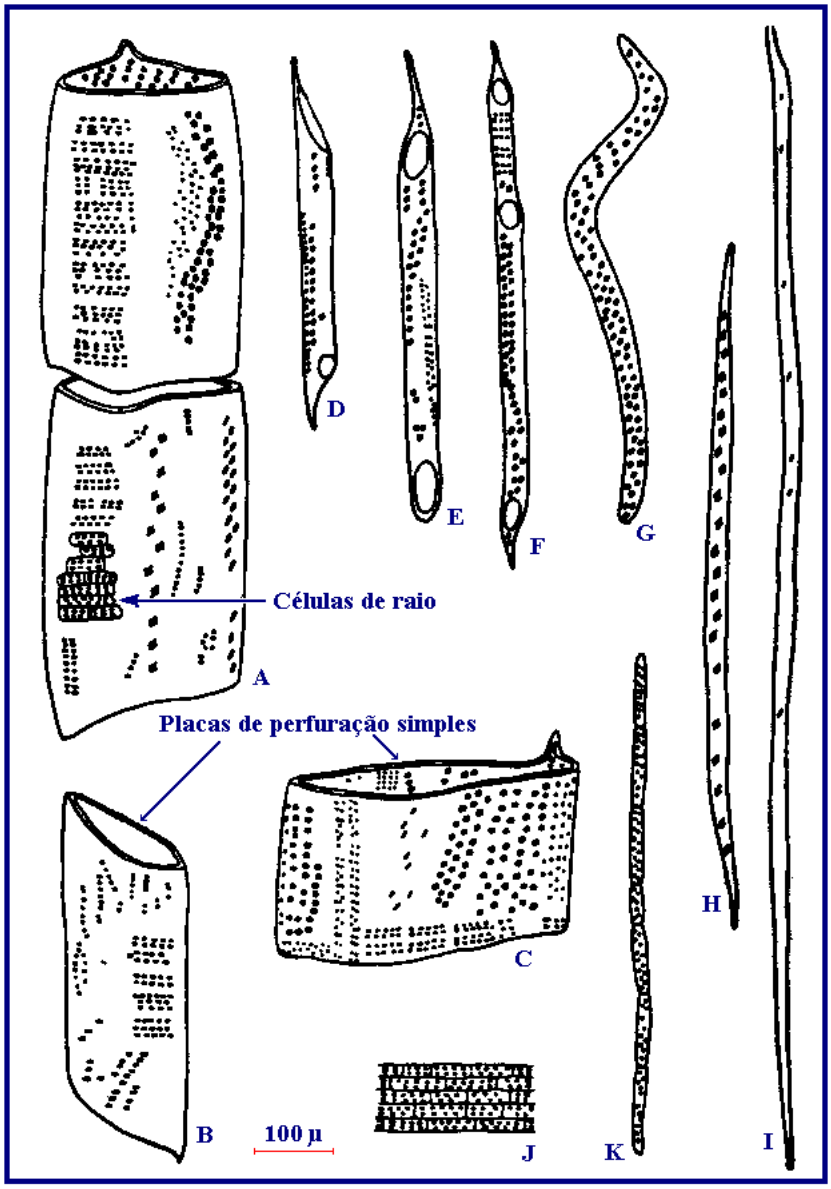


Figura 4. Elementos constituintes da madeira de folhosa: A, B, C – elementos de vasos largos; D, E, F – elementos de vasos estreitos; G- traqueóide; H – fibrotraqueóide; I – fibra libriforme; J – células de parênquima radial; K – células de parênquima axial.

1.4 - COMPOSIÇÕES QUÍMICAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

1.4.1 – CELULOSE

A celulose, representada na Figura 5, é o polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo base estrutural das células das plantas, é a mais importante substância natural produzida pelos organismos vivos. A porcentagem de celulose nas plantas varia dependendo da origem. O isolamento da celulose é fortemente influenciado pelas substâncias que acompanham a celulose na parece celular. Compostos como gorduras, ceras, proteínas e pectina podem ser facilmente removidos por extração com solventes orgânicos e álcalis diluídos. Sua cadeia se constitui de unidades de anidroglicose, unidas através de ligações β-1,4-glicosídicas, resultando num polímero de alto peso molecular. As cadeias de celulose nas paredes celulares das plantas são arranjadas compactamente, de modo que suas fibras apresentam regiões nitidamente cristalinas, uma conseqüência do número grande de ligações de hidrogênio que resulta numa forte interação entre suas moléculas. Os grupos funcionais da cadeia de celulose responsáveis por essas interações são grupos hidroxilas.

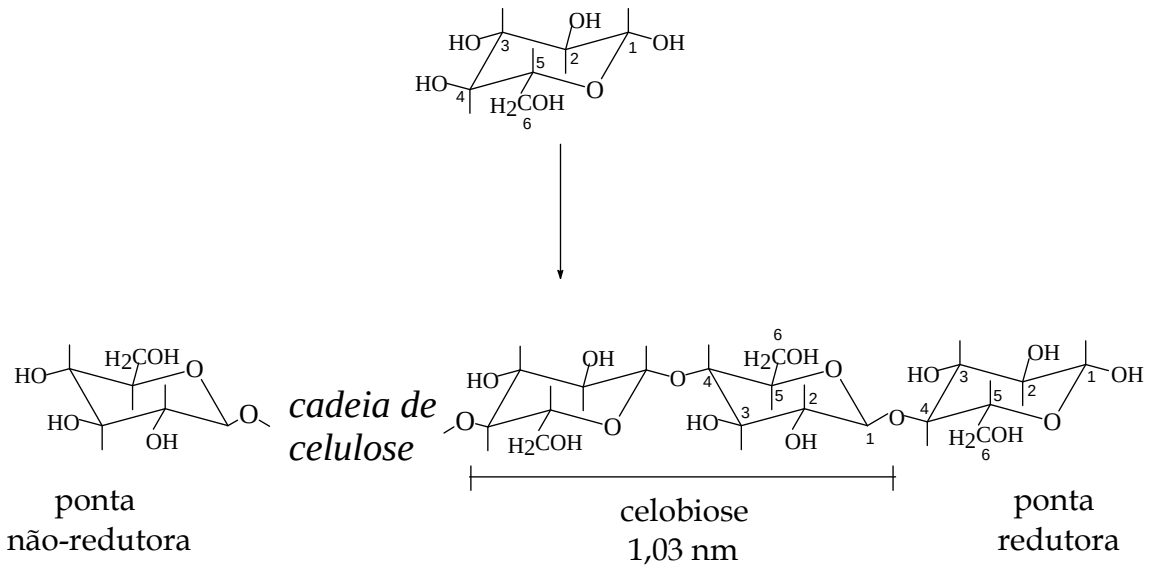


Figura 5. Representação da molécula de celulose.

Os grupos OH das moléculas de celulose são capazes de formar dois tipos de ligações de hidrogênio (Figura 6). Há ligações de hidrogênio entre unidades de glicose adjacentes formando ligações intramoleculares, e ligações de hidrogênio entre unidades de glicose de cadeias de celulose adjacentes formando ligações intermoleculares.

A dissolução da celulose é possível por meio de conversões heterogêneas em ésteres (celulose nitrato e celulose acetato) ou éteres (metilceluloses, caboximetilceluloses) solúveis. Pode também ser diretamente dissolvida em ácidos concentrados. Contudo, o tratamento com ácidos pode conduzir a uma clivagem hidrolítica das cadeias de celulose, gerando produtos de degradação como ésteres ou adição de compostos. [FENGEL; WEGENER, 1984].

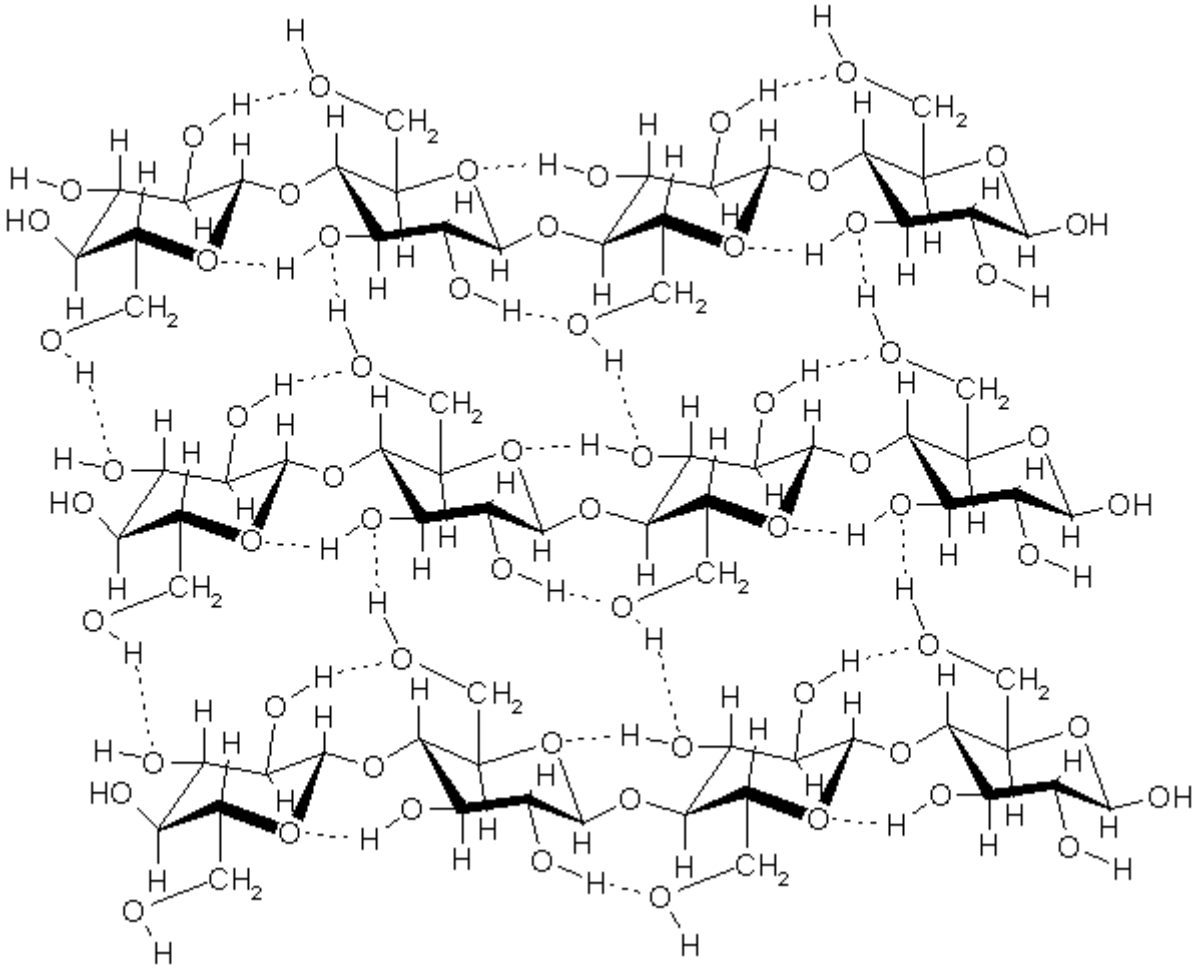


Figura 6. Ligações de hidrogênio intra e intermolecular na celulose**.**

Os processos de dissolução da celulose começam com a degradação das fibras e estruturas fibrilares e resulta na completa desintegração modificando o comprimento das cadeias. A degradação da estrutura supramolecular ocorre pela inserção de grupos químicos que quebram as ligações intermoleculares e solvatam as moléculas deslocadas da cadeia.

1.4.2 - POLIOSES

Polioses são polissacarídeos não celulósicos também denominados hemiceluloses, seu peso molecular varia entre 25.000 a 35.000. Estão associadas à celulose e à lignina nos tecidos vegetais.

As polioses diferem da celulose pela composição de várias unidades de açúcar, com cadeias moleculares menores e ramificadas. Enquanto a celulose, como substância química, contém exclusivamente a D-glicose como unidade fundamental, as polioses são polímeros, em cuja composição podem aparecer condensadas em proporções variadas, as seguintes unidades de açúcar: β-*D*-xilose, β- *D*-manose, β-*D*-glicose, α-*L*-arabinose, α-*D*-galactose, ácido β-*D*-glicourônico, ácido β-*D*-galactourônico e ácido α-*D*-*4*-metilglicourônico. As estruturas dos principais açúcares estão mostradas na Figura 7.

Como observado na Figura 7, algumas das unidades de açúcares que compõem as polioses possuem cinco átomos de carbono, sendo denominadas pentoses, outras, porém, possuem seis átomos de carbono, sendo denominadas hexoses. Os polímeros formados pela condensação de pentoses são chamados pentosanas, e os formados por hexoses, hexosanas. As polioses não são, portanto um composto químico definido, mas sim uma classe de compostos poliméricos presentes em vegetais fibrosos, possuindo cada um destes componentes propriedades características.

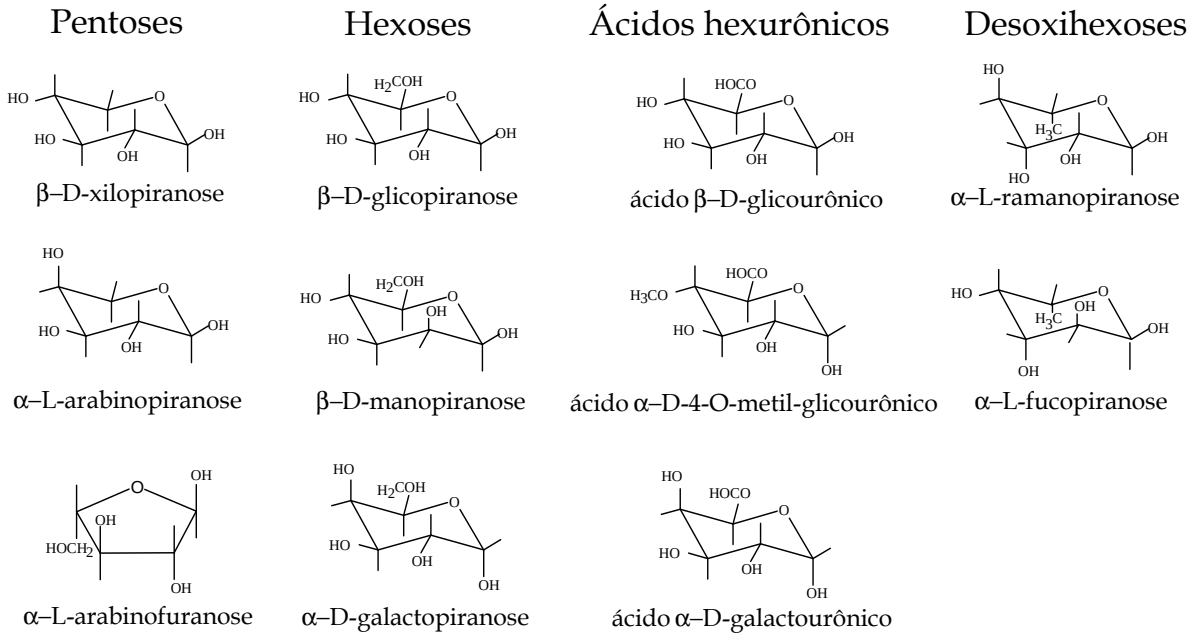


Figura 7. Açúcares componentes das polioses.

Madeiras de folhosas e coníferas diferem não só na porcentagem do total de polioses, mas também na porcentagem individual de cada açúcar que compõem as polioses. Coníferas possuem uma maior proporção de unidades de manose e galactose quando comparado às folhosas. Estas, por sua vez, apresentam uma maior proporção de unidades de xilose e grupos acetila que o encontrado em coníferas. No caso específico do bagaço de cana, o principal açúcar constituinte das polioses é a xilose [FENGEL; WEGENER, 1984].

1.4.3-LIGNINAS

A lignina é um dos principais componentes da biomassa vegetal, possuindo natureza aromática e muito complexa. Estão presentes em muitas espécies vegetais com teores que variam de 15 a 36%, e não possuem a mesma estrutura química em todas elas. É um polímero derivado de unidades fenilpropânicas (unidades-C9) que têm sua origem na polimerização desidrogenativa dos álcoois: cumarílico (unidade p-hidroxifenila), coniferílico (unidade guaiacila) e sinapílico (unidade siringila) (Figura 8).

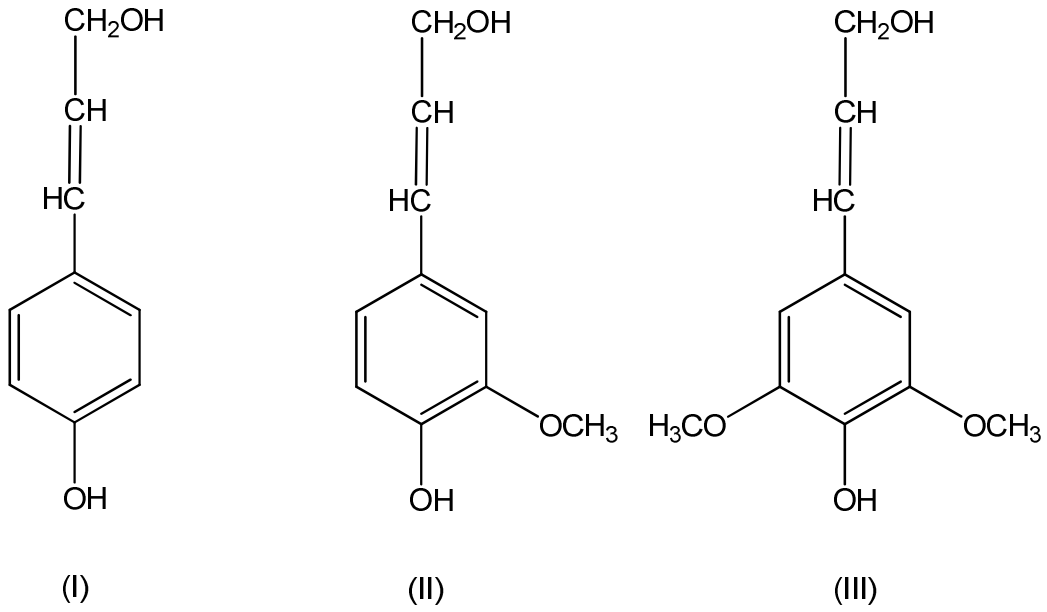


Figura 8. Precursores primários das ligninas: álcool p-cumarílico (I), álcool coniferílico (II) e álcool sinapílico (III).

Do ponto de vista morfológico a lignina é uma substância amorfa localizada na lamela média, bem como na parede secundária. Durante o desenvolvimento das células, a lignina é incorporada como o último componente na parede, interpenetrando as fibrilas e assim fortalecendo e enrijecendo as paredes celulares. Tem um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo responsável pela resistência mecânica de vegetais, além de proteger os tecidos contra o ataque de microorganismos. [FENGEL; WEGENER, 1984].

Devido ao seu alto conteúdo na madeira, a lignina é um produto secundário da produção de polpa celulósica, por via química. Embora a quantidade de lignina extraída nas operações de polpação em todo o mundo seja estimada em mais de 70 milhões de toneladas por ano, menos de 2% são efetivamente recuperadas para utilização como produtos de mercado. [GANDINI, A.; BELGACEM, M, 2008]. Este número é maior que aquele correspondente à produção de polímeros sintéticos.

A principal utilização da lignina nos dias atuais ainda é como fonte de energia. A maior parte da lignina obtida no processo Kraft é utilizada para geração de energia, pois os processos químicos de recuperação estão baseados na incineração do licor negro obtido ao final do processo de polpação, sendo assim, um importante fator econômico. No caso do processo sulfito de polpação a combustão do licor negro só é possível se sódio, magnésio ou amônia são utilizados como bases. Devido à maior dificuldade de utilização do licor negro como fonte de energia nesse processo, a lignina (lignossulfonatos) obtida, tem encontrado novos campos de aplicação. Sua utilização é geralmente baseada nas propriedades dispersantes e adesivas,

sendo aplicada como dispersante para pigmentos, produtos cerâmicos, pesticidas, como emulsificante de óleos e látex, aditivo em concreto e cimento, entre outros. Uma das principais razões para a lignina ainda ser utilizada, em sua maior parte, como fonte de energia está associada à sua estrutura química complexa.

A presença de diferentes unidades precursoras e o elevado número de combinações possíveis entre as unidades precursoras faz com que a estrutura da macromolécula de lignina seja bem mais complexa que a apresentada pela celulose e pelas polioses. Os estudos visando esclarecer a estrutura da lignina empregam métodos de isolamento suaves procurando preservar ao máximo as ligações presentes na protolignina. [LIN; DENCE, 1992].

Uma das classificações possíveis para a lignina é estabelecida em função das espécies vegetais e dos padrões aromáticos de substituição, como segue:

- Lignina de Coníferas: São mais homogêneas, contendo quase que exclusivamente unidades guaiacila (Ligninas-G);

- Ligninas de Folhosas: Apresentam quantidades equivalentes de grupos guaiacila e siringila, e pequenas unidades p-hidroxifenila (Ligninas-GS);

- Ligninas de Gramíneas: Apresentam maior quantidade de unidades p-hidroxifenila que o encontrado em madeiras (coníferas ou folhosas), mas sempre em proporção menor que as outras unidades (Ligninas-GSH).

Na literatura há uma série de modelos de ligninas, todos construídos a partir de análises de grupos funcionais e espectroscópicas. Na Figura 9 é apresentado modelo estrutural da lignina proposto por Nimz.

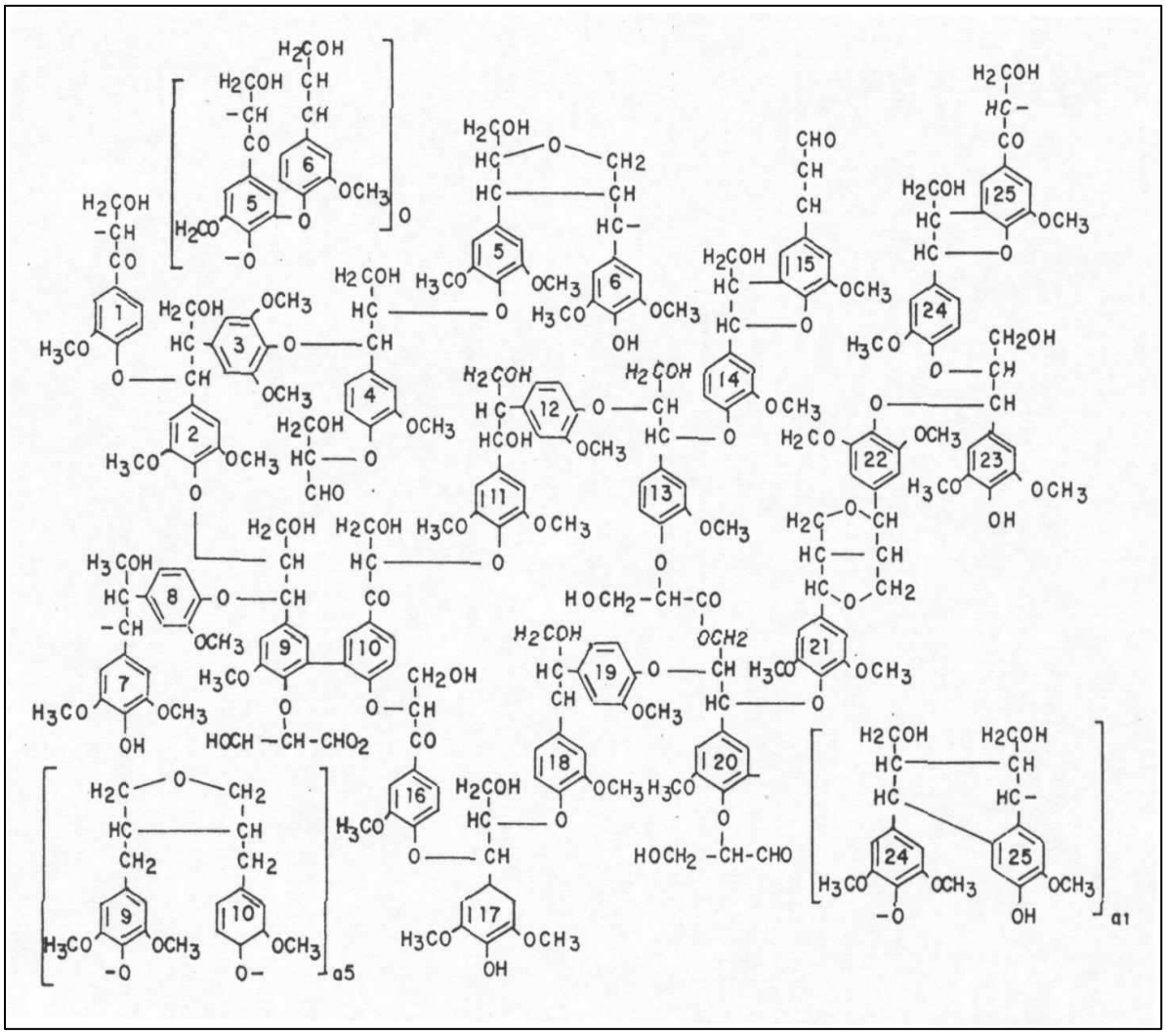


Figura 9. Modelo estrutural de lignina de folhosa *(Fagus sylvatica)* proposto por Nimz.

O comportamento químico da lignina é governado, principalmente, pela presença de diferentes grupos funcionais encontrados na macromolécula. A Figura 9 revela a presença de éteres (alifáticos e aromáticos), álcoois alifáticos e benzílicos, fenóis e em menor proporção grupos carbonila (aldeídos, cetonas e ésteres).

Ainda, as diferentes ligações como ligações do tipo éter ou tipo carbono-carbono determinam a escolha das condições experimentais a serem utilizadas quando se deseja o isolamento, a caracterização e o estudo das propriedades químicas das ligninas. [CURVELO, 1992; FENGEL, 1984].

A biossíntese da lignina envolve o radical fenóxido estabilizado, que pode ser representado por 05 híbridos de ressonância (Figura 10). Os principais modos de acoplamento desse radical estão mostrados na Tabela 3. As densidades eletrônicas relativas determinam a freqüência com que os diferentes sítios participam da formação das ligações na lignina.

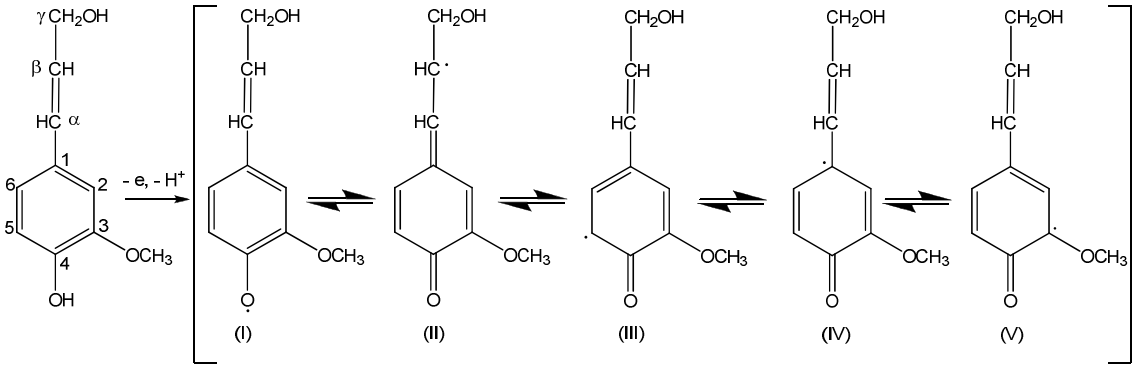


Figura 10. Desidrogenação enzimática do álcool coniferílico

Tabela 3. Modos de acoplamentos do radica fenóxido do álcool p-cumarílico (Glasser 1980).

	I	II	III	IV
I	Peróxido instável	β-O-4	4-O-5	1-O-4
II	β-O-4	β-β	β-5	β-1
III	4-O-5	β-5	5-5	1-5
IV	1-O-4	β-1	1-5	1-1

A determinação de grupos funcionais, como hidroxilas alifáticas e aromáticas, grupos éter, grupos carbonila e metoxila, para a elucidação da estrutura da lignina, pode ser feita por vários métodos químicos e físicos, como espectroscopia na região do ultravioleta visível, espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN de 1H e RMN de ^{13}C), espectrometria de massas, em combinação com cromatografia gasosa, pirólise acoplada à espectrometria de massa, e também os métodos químicos como acetilação para determinação de hidroxilas alifáticas e totais e determinação de grupos carbonila pela reação com cloridrato de hidroxilamina. [FENGEL; WENEGER, 1984; LIN; DENCE, 1992].

1.4.4-EXTRATIVOS E CINZAS

Junto aos componentes da parede celular existem numerosas substâncias de baixo peso molecular pertencentes a classes muito diferentes em termos de composição química e, portanto há dificuldades em se encontrar um sistema claro e compreensivo de classificação.

Uma classificação simples pode ser feita dividindo-se estas substâncias em material orgânico e inorgânico. O material orgânico é comumente chamado de extrativos, e a parte inorgânica é sumariamente obtida como cinzas.

Os principais grupos químicos que compreendem as substâncias orgânicas de baixo peso molecular são: compostos aromáticos (fenólicos), terpenos, ácidos graxos saturados e insaturados, proteínas e flavonóides. Os

constituintes inorgânicos (cinzas) em maior quantidade sais e óxidos de Ca, K e Mg seguidos de Mn e Na.

1.4.5- ASSOCIAÇÃO DE CELULOSE, POLIOSES E LIGNINA NOS TECIDOS VEGETAIS.

A partir de uma série de estudos relacionados, por exemplo, à degradação oxidativa e microscopia eletrônica, foram propostos vários modelos para a associação de celulose, lignina e polioses nos tecidos vegetais, sendo que em todos eles, as polioses aparecem como uma fase intermediária entre regiões altamente organizadas de celulose e regiões amorfas de lignina (Figura 11).

A existência de cristalinidade na celulose demonstra a relação intermolecular entre estas moléculas; as similaridades químicas e estruturais entre os diferentes polissacarídeos seriam os responsáveis pela íntima associação entre a celulose e as polioses (por intermédio de pontes de hidrogênio); o caráter amorfo das polioses e sua menor massa molar permitiriam, por sua vez, a posterior deposição de lignina [CURVELO, 1992].

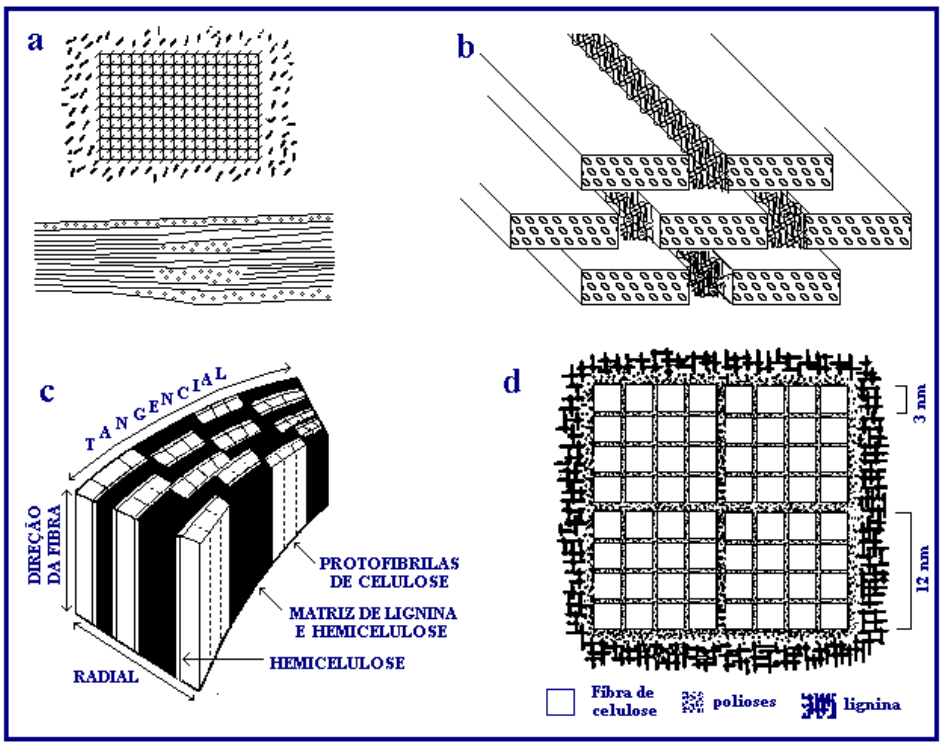
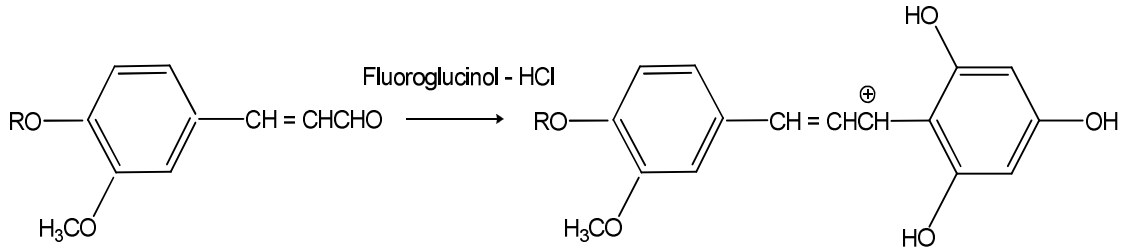


Figura 11. Modelos de associação dos componentes celulares macromoleculares. [FENGEL e WENEGER, 1984]. a) Preston (1962); b) Marchessault (1964); c) Kerr e Göring (1975); d) Fengel (1970).

1.5- MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE LIGNINA

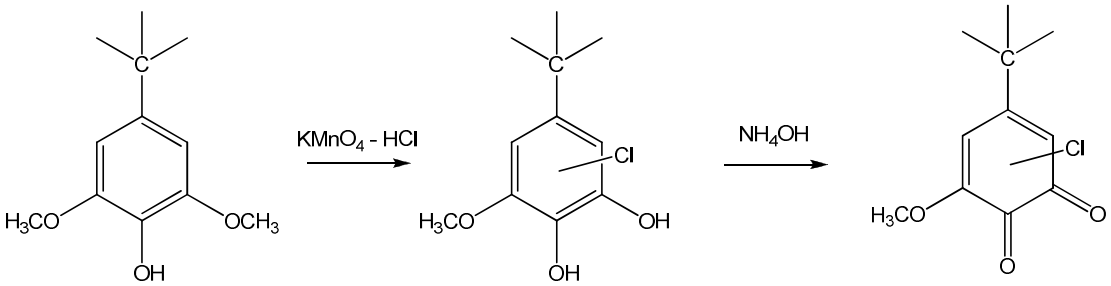
Algumas reações que produzem produtos coloridos (reações de cor) são utilizadas para detecção e identificação de lignina e muitas delas são também aplicadas na determinação quantitativa de lignina. Reação de Wiesner: Os grupos coniferaldeído (1) da lignina são os grupos que reagem com fluoroglucinol – HCl formando uma estrutura quinona-metídeo (2) (ou metileno

quinona) via um íon carbônio. As reações que levam a formação da coloração nas reações de fluoroglucinol foram estudas por Adler et al. (1948).



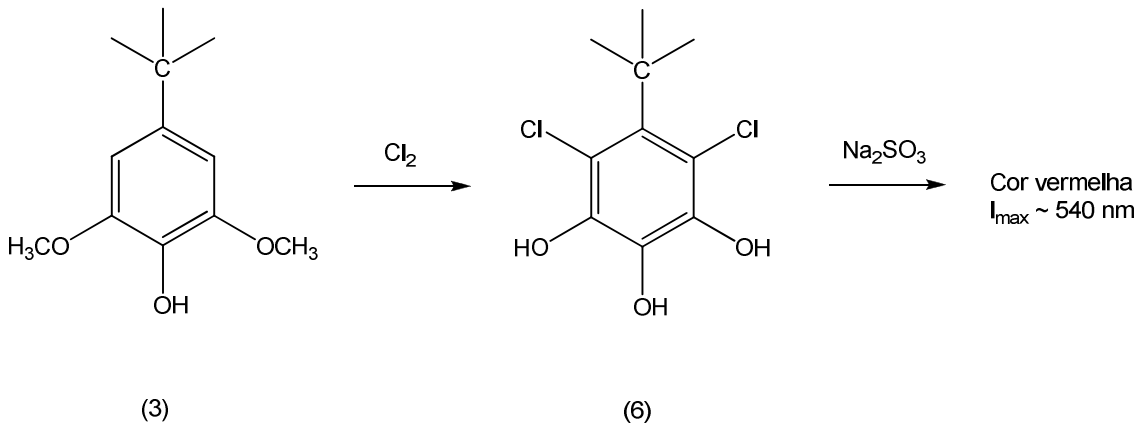
(1) R = H ou Alquil (2) l_{max} ~ 550 nm

<u>Reação de Mäule</u>: As unidades siringila (3) são convertidas em metoxicatecol (4) pelo tratamento com permanganato e ácido clorídrico, em seguida a amostra é tratada com hidróxido de amônio resultando em uma estrutura metoxi-quinona (5) que fornece uma coloração rosa intensa.

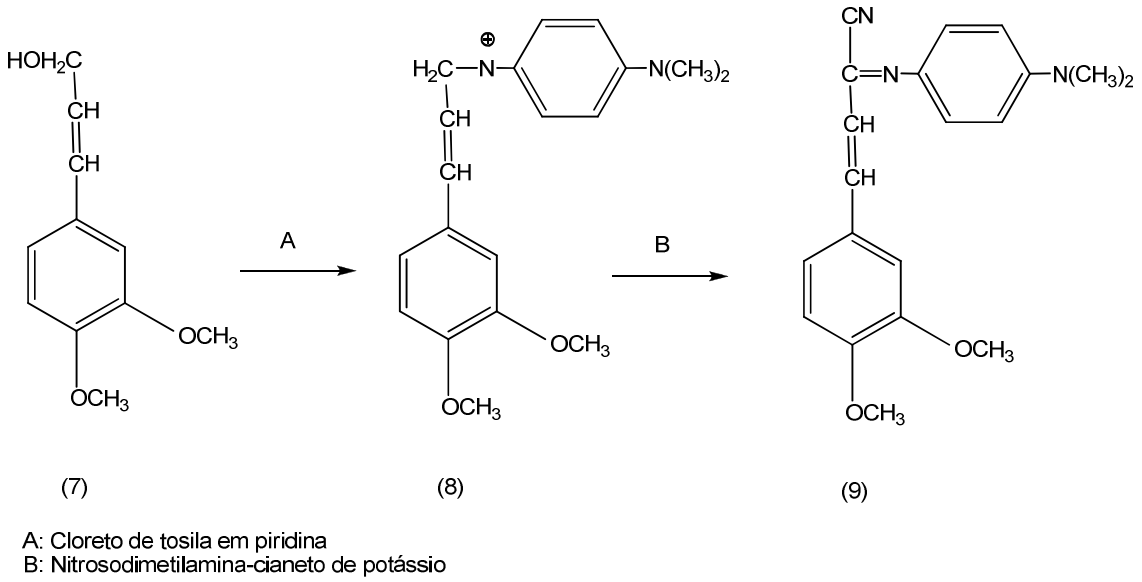


(3) (4) (5) l_{max} ~ 515 - 517 nm

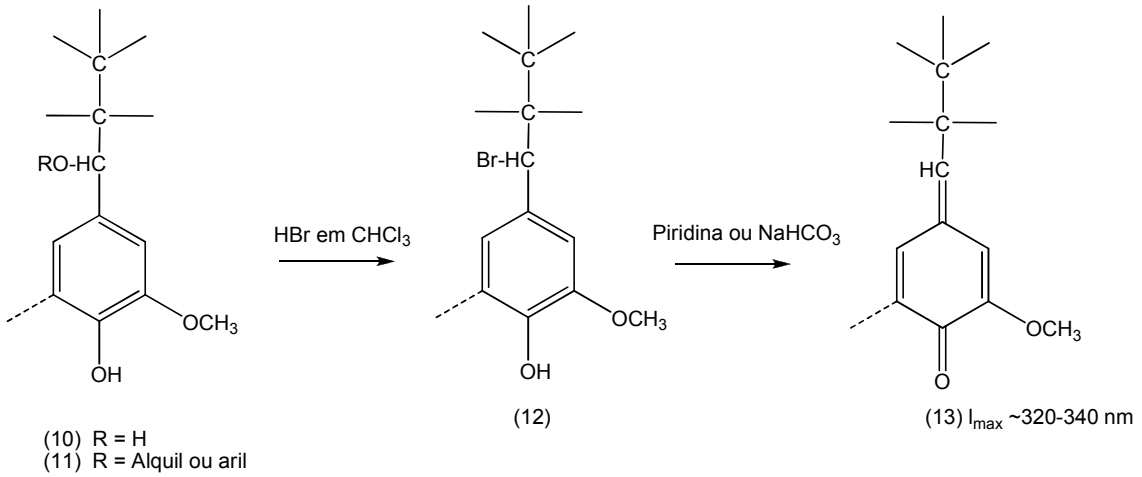
<u>Reação com solução de cloro (ou reação de Cross e Bevan):</u> Quando unidades siringila são cloradas pelo tratamento com solução de cloro ocorre a formação de 2,6–dicloropirogenol (6) que na presença de uma solução de sulfito de sódio fornece uma cor vermelha. No caso de unidades guaiacila ocorre a formação de uma coloração marrom. Isto significa que no caso de madeira de conífera somente uma cor marrom pálida é obtida que não é muito característica. Mas no caso de madeiras de folhosas a cor é mais intensa.



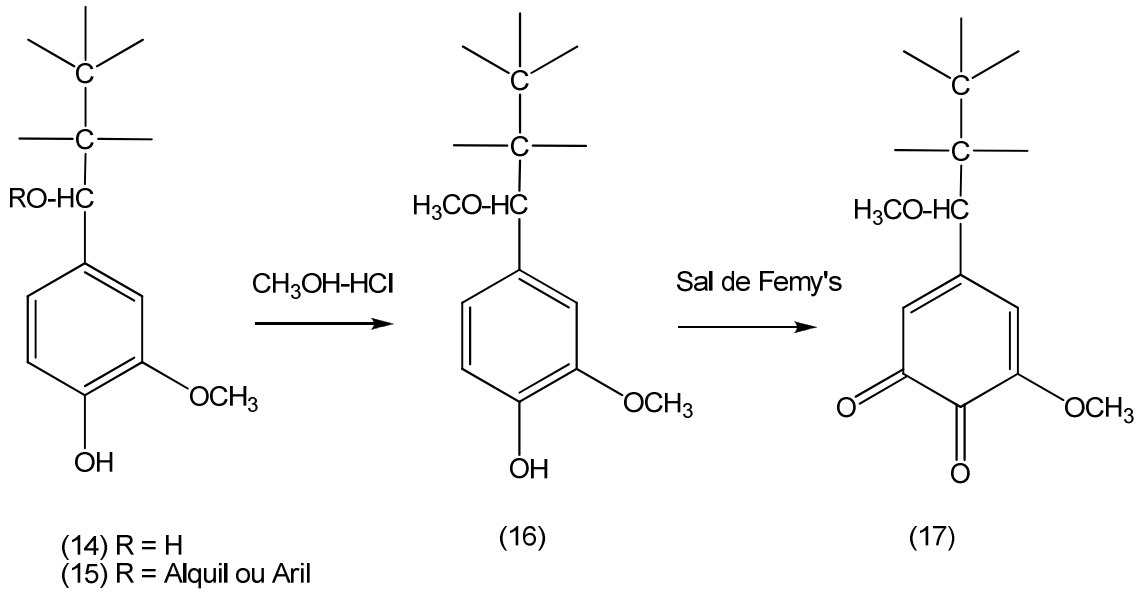
Reação com Cloreto de Tosila em piridina (ou reação de Lindgren e Mikawa): Unidades de álcool coniferílico (7) podem ser transformadas em cromóforos avermelhados (9) através da reação com cloreto de tosila em piridina seguido do tratamento com p-nitrosodimetilamina em solução de cianeto de potássio.



Reação com Monocloramida quinona: Os álcoois p-hidroxibenzil (10) e p-hidroxibenzil alquil e aril éteres (11) são convertidos em quinonametideos (ou metilenoquinonas (13) através de sucessivos tratamentos com brometo de hidrogênio em clorofórmio e piridina ou bicarbonato de sódio.



<u>Reação com Nitrosodissulfonato de potássio:</u> Unidades fenólicas não condensadas em lignina podem ser estimadas pela reação de cor baseada na oxidação com nitrosodissulfonato de potássio (sal de Fremy's).



Para eliminar a interferência dos grupos carbonila e hidroxilas da posição *α*, a lignina é previamente reduzida com boroidreto e alquilada com metanol em meio ácido clorídrico para converter esses grupos em *o*-quinona.

1.6- MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE LIGNINA

A determinação quantitativa de lignina é uma análise utilizada freqüentemente para caracterizar materiais lignocelulósicos, para avaliar os efeitos dos tratamentos químicos, físicos e biológicos de madeira e polpa, para monitorar efluentes de processos industriais e, no caso de polpas químicas, para estimar a quantidade de agente oxidante utilizado no processo de branqueamento. (LIN; DENCE, 1992).

Em consideração aos vários métodos propostos para determinação de lignina, é importante ter em mente que nenhum pode ser considerado totalmente satisfatório. Isso se deve ao fato de que a lignina precisa ser isolada em uma condição pura ou sem modificação, e todos os métodos aplicados para o isolamento da lignina geram alguma modificação na estrutura, proporcionando uma lignina diferente da nativa (*in situ*). Como resultado, não há uma fórmula estrutural definida da lignina disponível que baseie o desenvolvimento de uma medida racional e quantitativa ou que assegure a viabilidade de um método disponível.

Os métodos de determinação de lignina podem ser divididos em métodos diretos e métodos indiretos. Nos métodos diretos a lignina é obtida como um resíduo e nos métodos indiretos a lignina pode ser calculada pela diferença entre 100% e a quantidade de polissacarídeos presentes em amostras livres de extrativos ou, mais comumente, por medidas de algumas características de funcionalidade estrutural ou propriedades químicas que possibilitem uma determinação da concentração de lignina.

Métodos diretos

- Hidrólise ácida: O método tem por base a hidrólise e solubilização total ou parcial dos polissacarídeos (celulose e polioses) presentes nos tecidos vegetais, obtendo a lignina como um resíduo que é determinado gravimetricamente. A eliminação desses polissacarídeos pode ser realizada por hidrólise em ácidos minerais concentrados, principalmente ácido sulfúrico 72%, que é chamada de lignina Klason, ácido clorídrico concentrado conhecida como lignina Willstäter ou periodato de sódio em meio ácido.

O método klason consiste basicamente de duas etapas: tratamento do material lignocelulósico com ácido sulfúrico 72% à temperatura ambiente seguido de uma diluição do ácido para 3%, com aquecimento até completa hidrólise. Esse procedimento é um método oficial das normas TAPPI - T222 om-93 (Technical Association of the Pulp and Paper Industry 1983). Cabe ressaltar que o método Klason é a base de outras normas, tais como as normas ABTCP M 10/71 (ABTCP, 1968) e ABNT NBR 7989 (ABNT, 2003) para determinação de lignina insolúvel em madeira e polpa.

Métodos Indiretos

-Métodos espectrométricos: Esses métodos estão baseados na capacidade da lignina de absorver radiação correspondente a várias regiões do espectro eletromagnético. O método espectral consiste essencialmente na total dissolução da amostra em um solvente e a medida da absorbância da solução em um comprimento de onda característico da lignina, usualmente 280 nm. Dentre os métodos que utilizam análises espectroscópicas, o brometo de acetila parece ter a maior aceitação. Esse reconhecimento é devido algumas

vantagens no procedimento, pois é rápido, simples, utiliza pequenas quantidades de amostra e gera uma pequena modificação química da amostra. O método consiste no tratamento do material com brometo de acetila 25% em ácido acético glacial [JOHNSON *et al*. 1961]. Segundo Fukushima e Hatfield (2001) as lignina obtidas com brometo de acetila apresentaram alta contaminação por carboidratos. Essa contaminação também foi observada por Fukushima e Dohority (2000) que obtiveram teores elevados de carboidratos variando de 7,3% a 29,7% em ligninas de diversas plantas.

-Métodos baseados no consumo de oxidante: Esses métodos, utilizados exclusivamente em análise de polpas foram desenvolvidos para estimar a quantidade de lignina residual para controle de qualidade em processos de polpação e/ou branqueamento comerciais. Os procedimentos estão baseados no princípio de que a lignina reage com o agente oxidante mais rapidamente que os carboidratos presentes nos materiais lignocelulósicos. A concentração de lignina é expressa como a quantidade de oxidante consumido pela massa de polpa (número Kappa). Esses valores de número Kappa podem ser convertidos em teores de lignina Klason aplicando alguns fatores de conversão obtidos empiricamente. Esses fatores de conversão dependem da amostra e do processo, para madeiras a norma (TAPPI T236 cm-85) utiliza o fator 0,15.

1.7 - ISOLAMENTOS DA LIGNINA

O isolamento da lignina envolve inicialmente o preparo de amostras livres de extrativos, para evitar que estes sejam extraídos juntos com a lignina e também minimizar os problemas de interferência entre a lignina *in situ* e outros fenólicos solúveis. A obtenção de lignina com elevado rendimento causa alterações de natureza química, ocasionando mudanças estruturais, em que a lignina resultante difere da original presente no vegetal, chamada *protolignina* [CURVELO, 1992].

Os principais métodos empregados para obtenção de ligninas podem ser divididos em: isolamento por extração, e isolamento como derivado solúvel. [CURVELO, 1992]

O isolamento por extração consiste no emprego de um solvente quimicamente inerte que dissolva uma fração da lignina. Os principais tipos de ligninas obtidas por extração são:

- Lignina de Brauns: A lignina é extraída com o uso de etanol à temperatura ambiente. O rendimento em lignina dessa extração é muito baixo, representando de 2 a 4% da lignina total presente na madeira.
- Lignina liberada enzimaticamente: O material é, primeiramente, extraído com éter e água, em seguida é submetido a uma cultura de determinados tipos de fungos (*Phanerocheate chrysosporium*, por exemplo), com enzimas que atacam somente os polissacarídeos (como celulases), propiciando sua hidrólise enzimática e liberando a lignina intacta. A lignina é, então, extraída do meio

com etanol 95% e purificada. Este método pode levar a rendimentos da ordem de 15% do teor da lignina total da madeira.

- Lignina de madeira moída: Esta é uma das técnicas mais empregada para a análise estrutural de ligninas, pois a estrutura da lignina não sofre grandes transformações químicas durante o processo, representando assim, uma lignina padrão com a mesma estrutura encontrada no vegetal. O procedimento consiste na trituração do material, livre de extrativos, em um moinho de bolas por dois ou três dias. Esta moagem é importante para facilitar a penetração do solvente e obter um maior rendimento na extração. Faz-se, então, a extração desse pó com mistura dioxano-água ou acetona-água. Por este método, é possível extrair até cerca de 50% da lignina total do vegetal (FENGEL; WEGENER, 1984).

- Método PEPPER (ou Lignina Dioxano): Esta lignina é separada tratando o material lignocelulósico com uma solução de dioxano e ácido clorídrico aquoso. Algumas ligações são quebradas por este procedimento sendo que a lignina obtida apresenta uma estrutura molecular modificada.

A solubilização da lignina é outra possibilidade empregada para o isolamento destes materiais. A solubilidade em água é conseguida com a introdução de grupos polares na estrutura da lignina, acompanhado de reações que levam a diminuição da massa molar da lignina, facilitando assim sua solubilização.

A solubilidade em solventes orgânicos exige somente a escolha do solvente adequado e uma hidrólise parcial da lignina; podem ser realizados na presença de ácidos ou bases e constituem a base dos processos de polpação organossolve de deslignificação / polpação.

1.8- REAÇÕES EM MEIO ÁCIDO

1.8.1- REAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS

Além da degradação por ataque enzimático, a hidrólise ácida é uma típica reação de degradação de ligações glicosídicas em glicosídeos, di-, oligo- e polissacarídeos. O principal mecanismo molecular de hidrólise ácida, que foi confirmado por modelos e estudos, é ilustrado na Figura 12. [FENGEL; WENEGER, 1984]. A hidrólise ácida ocorre com a quebra das ligações glicosídicas e o mecanismo compreende três etapas.

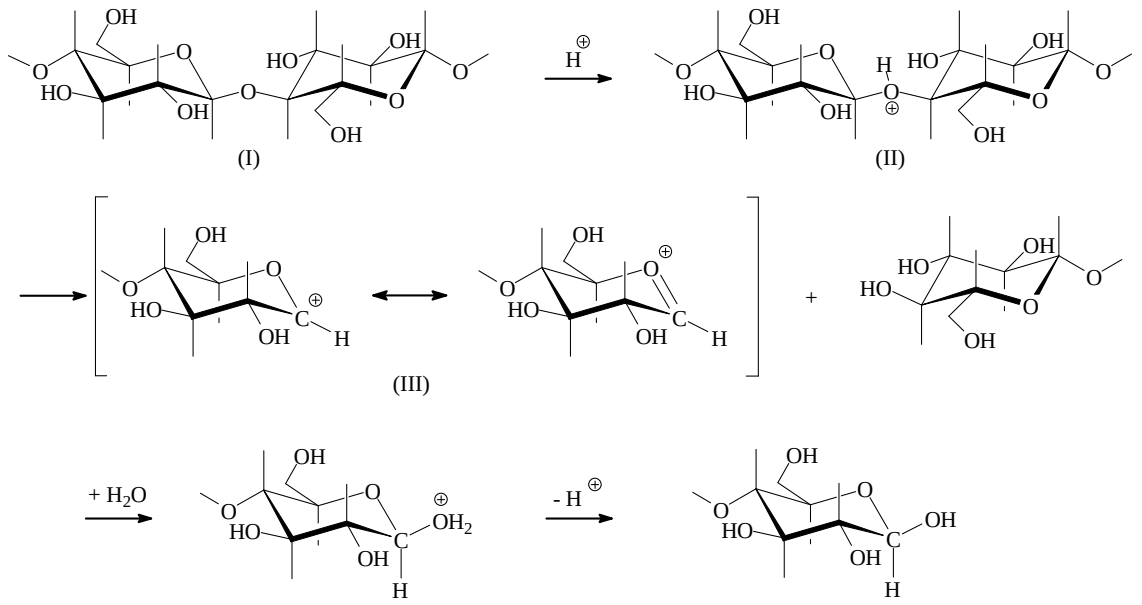


Figura 12. Mecanismo de hidrólise ácida de ligações glicosídicas.

Primeiramente o próton do ácido interage rapidamente com o oxigênio glicosídico que liga duas unidades de açúcar (I), formando o ácido conjugado (II). Essa etapa é seguida por uma clivagem da ligação C-O formando um carbocátion cíclico (III), estabilizado por ressonância. Finalmente uma molécula de água é adicionada ao carbocátion, resultando em um produto final estável.

A escolha do ácido e de sua concentração depende do tipo de amostra e do objetivo da hidrólise. Em análises e em sacarificação de madeira, os ácidos minerais mais empregados, em várias concentrações são: o ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, e mais recentemente ácido trifluoracético.

O comportamento hidrolítico das ligações glicosídicas é substancialmente influenciado por dois fatores. O primeiro é a conformação das unidades de açúcares, e o outro é o efeito indutivo. Os anéis furanosídicos são hidrolisados mais rapidamente que os anéis piranosídicos, devido ao maior ângulo de tensão na conformação das unidades nos anéis de cinco átomos quando comparado aos anéis piranosídicos livres de tensão. O termo efeito indutivo descreve o fato de diferentes substituintes causarem uma alteração na densidade eletrônica no oxigênio do anel. Substituintes eletrofílicos como grupos carboxila ou carbonila reduzem a intensidade da protonação e dificultam a quebra da ligação C-O [FENGEL; WENEGER, 1984].

Durante tratamentos térmicos podem também ocorrer reações de desidratação. Dependendo da concentração do ácido e da temperatura aplicada, numerosos produtos de degradação podem ser formados. A desidratação catalisada por ácidos conduz à formação de anidroaçúcares com ligações glicosídicas intramoleculares, resultantes da eliminação de moléculas

de água. Como essas ligações são facilmente hidrolisadas, produtos de degradação podem ser formados, desde produtos com características aromáticas até compostos condensados. Os mais importantes produtos de degradação, considerando o potencial de utilização, são o furfural (2-furaldeído) formado a partir de pentoses e ácidos urônicos, e hdroximetilfurfural (5-hidroximetil-2-furaldeído) (HMF) derivados de hexoses. Se a temperatura é elevada, a molécula cíclica de HMF pode decompor-se em ácido levulínico e ácida fórmico (Figura 13).

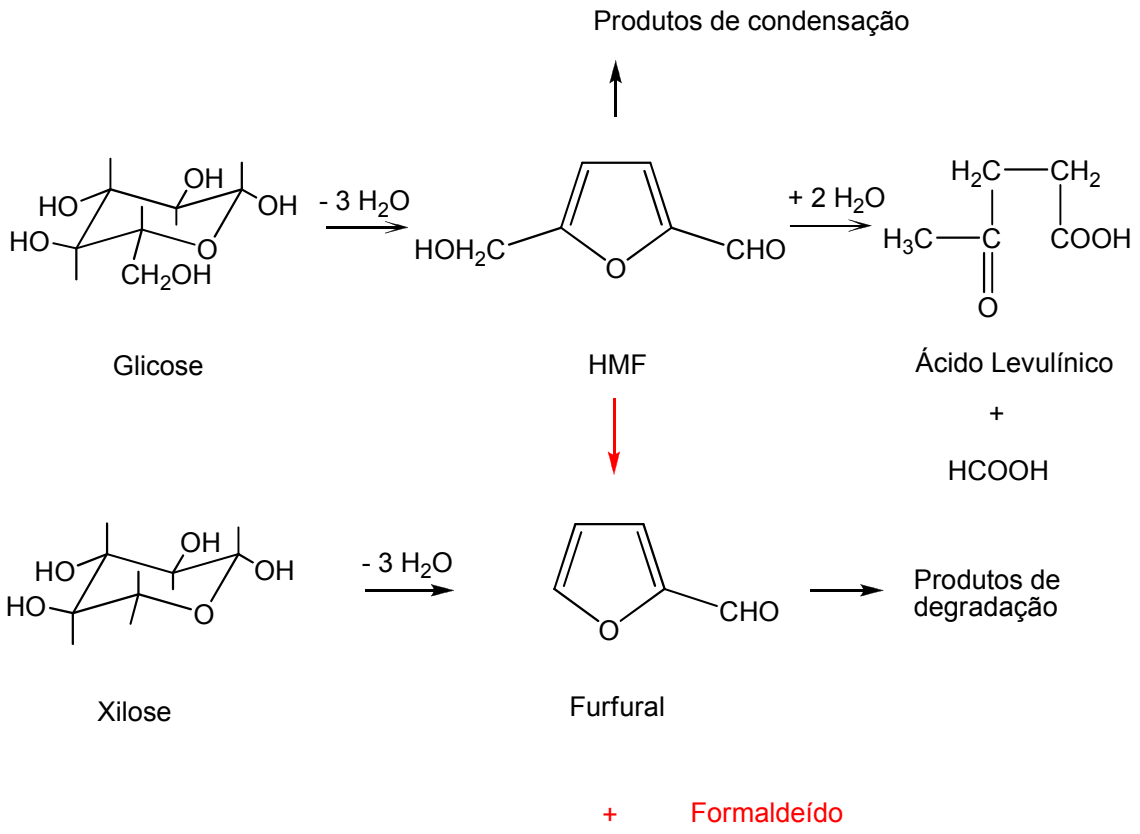


Figura 13 . Formação de furfural e HMF pela degradação de polissacarídeos em meio ácido.

Reações de oxidação envolvendo polissacarídeos em meio ácido são importantes e também ocorrem mais ou menos simultaneamente com a degradação hidrolítica durante processos de polpação e branqueamento, por exemplo.

Em princípio os grupos hidroxilas das unidades de açúcares e os grupos terminais de di, oligo e polissacarídeos podem sofrer ataque oxidativo. Os grupos convertidos são aldeídos, cetonas e grupos carboxílicos. A estrutura do anel pode ser preservada ou pode ser quebrada pela clivagem pelo oxigênio do anel ou das ligações C-C, contudo essas reações não causam a quebra das cadeias de polissacarídeos em grande extensão.

A ação do clorito de sódio em meio ácido na celulose causa ambas as conversões, primeiramente os grupos hidroxilas são convertidos em ácidos urônicos (I) ao longo da cadeia e redução dos grupos terminais para ácido glicônico (II). As reações de oxidação estão mostradas na Figura 14.

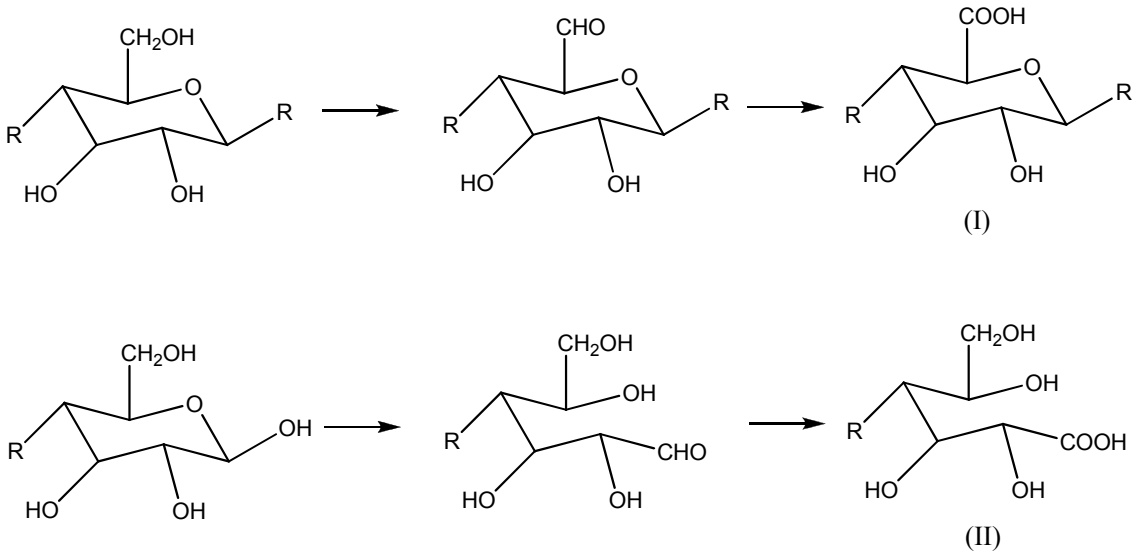


Figura 14. Formação oxidativa de diferentes unidades de açúcares de polissacarídeos.

1.8.2- REAÇÕES DA LIGNINA.

Nas reações solvolíticas catalisadas por ácidos, a degradação da lignina é produzida por reações de substituição e quebra de ligações, geralmente acompanhadas de indesejáveis reações de condensação. As diferentes reações na lignina podem ocorrer ao nível da cadeia propânica lateral, nos átomos de carbono do anel aromático, no grupo metoxila e com menor freqüência nas hidroxilas fenólicas (Figura 15). [FENGEL; WENEGER, 1984].

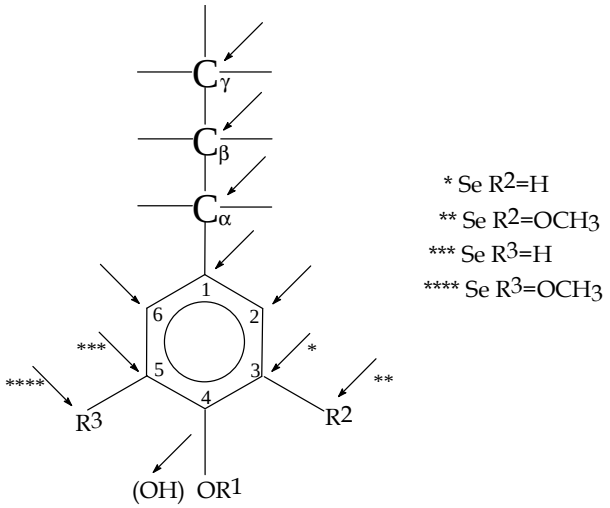


Figura 15. Sítios reativos em unidades fenilpropânicas.

As ligninas, representadas como unidades p-hidróxi ou p-alcóxi arilpropano e arilpropeno, contêm pares de elétrons desemparelhados no átomo de oxigênio fenólico, os quais podem conjugar com elétrons π do anel benzênico, criando sítios de alta densidade eletrônica (δ^-). Nas unidades

arilpropano esses centros estão localizados nas posições *orto* e *para*, em relação ao oxigênio fenólico, enquanto que nas unidades alifáticas com ligações duplas em conjugação com o anel, apresentam um sítio adicional de alta densidade eletrônica no carbono β da cadeia lateral como mostra a Figura 16.

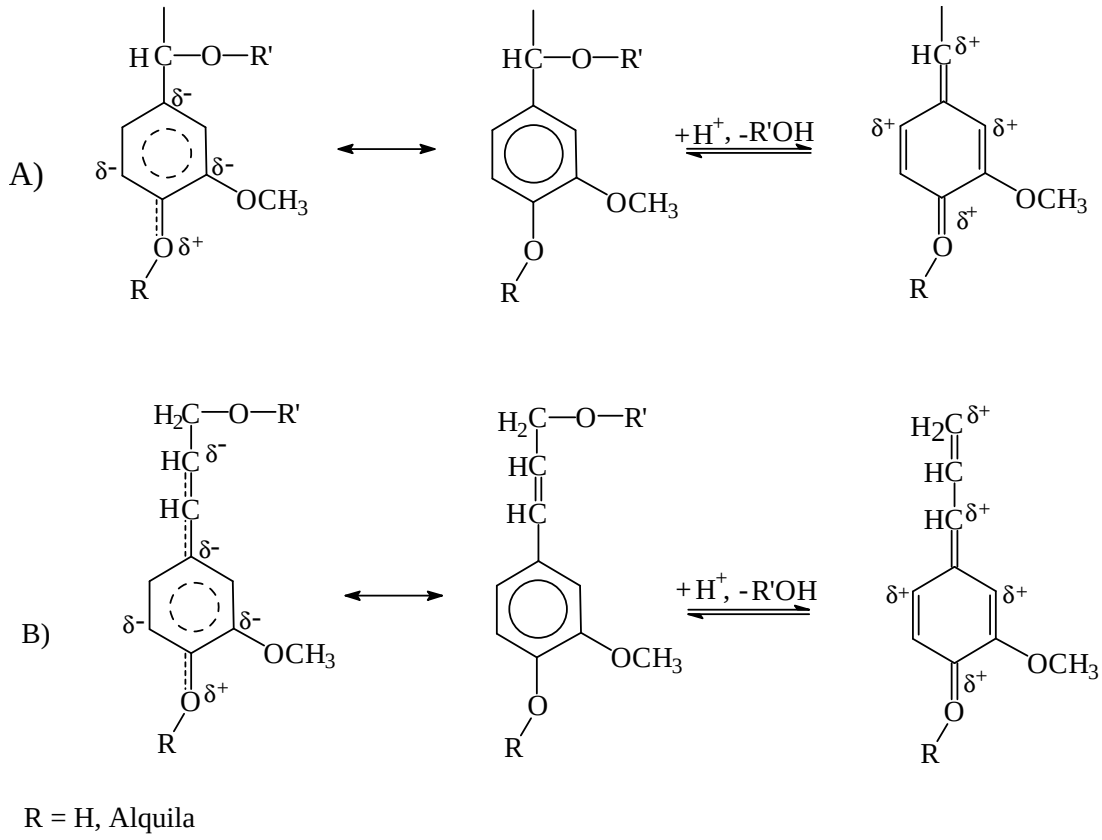


Figura 16. Sítios de alta e baixa densidade eletrônica, em meio ácido ou neutro, em unidades arilpropano (a) e arilpropeno (b).

A protonação freqüentemente ocorre no oxigênio ligado ao carbono α, gerando sistemas carbocátion-oxônio (Figura 17). Estes sistemas estão envolvidos em reações de fragmentação ou condensação da lignina, dependendo do tipo de nucleófilo presente no meio reacional.

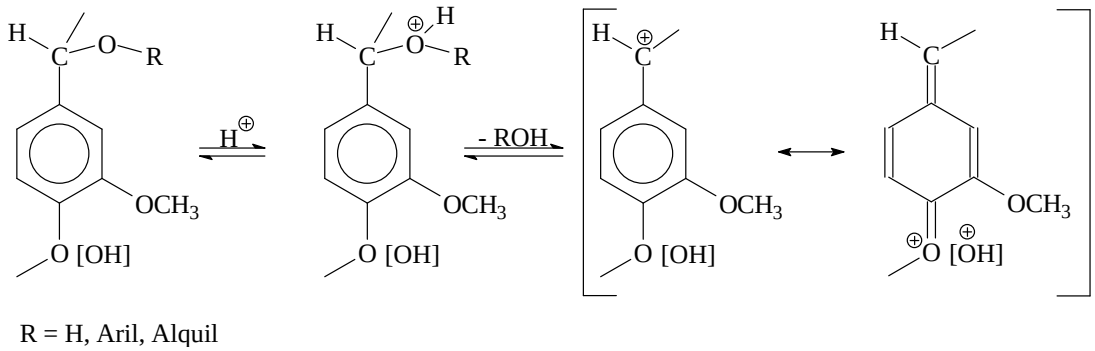


Figura 17. Conversão dos grupos α-éter para carbocátion-oxônio.

O tratamento da madeira com ácidos minerais concentrados podem não causar a dissolução, mas reações de condensação da lignina, como mostra a Figura 18.

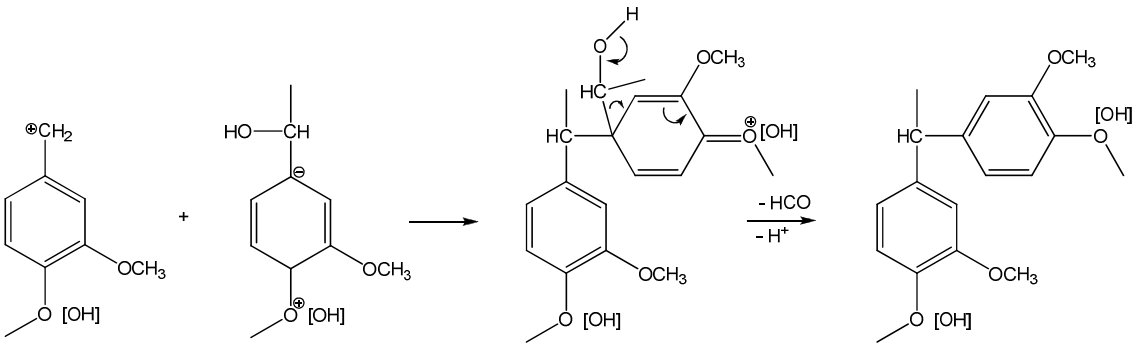


Figura 18. Reações de condensação da lignina com ácidos minerais concentrados.

As reações de oxidação da lignina ocorrem geralmente pelo ataque eletrofílico em sítios de alta densidade eletrônica, seguidas de reações nucleofílicas.

Dióxido de cloro causa a mais eficiente deslignificação, isso é principalmente porque as reações com lignina são exclusivamente reações oxidativas do OH fenólico da lignina com radicais de dióxido de cloro, iniciadas pela abstração de hidrogênio. Os produtos finais da oxidação são derivados de ácidos mucônicos ou estruturas quinóides (Figura 19).

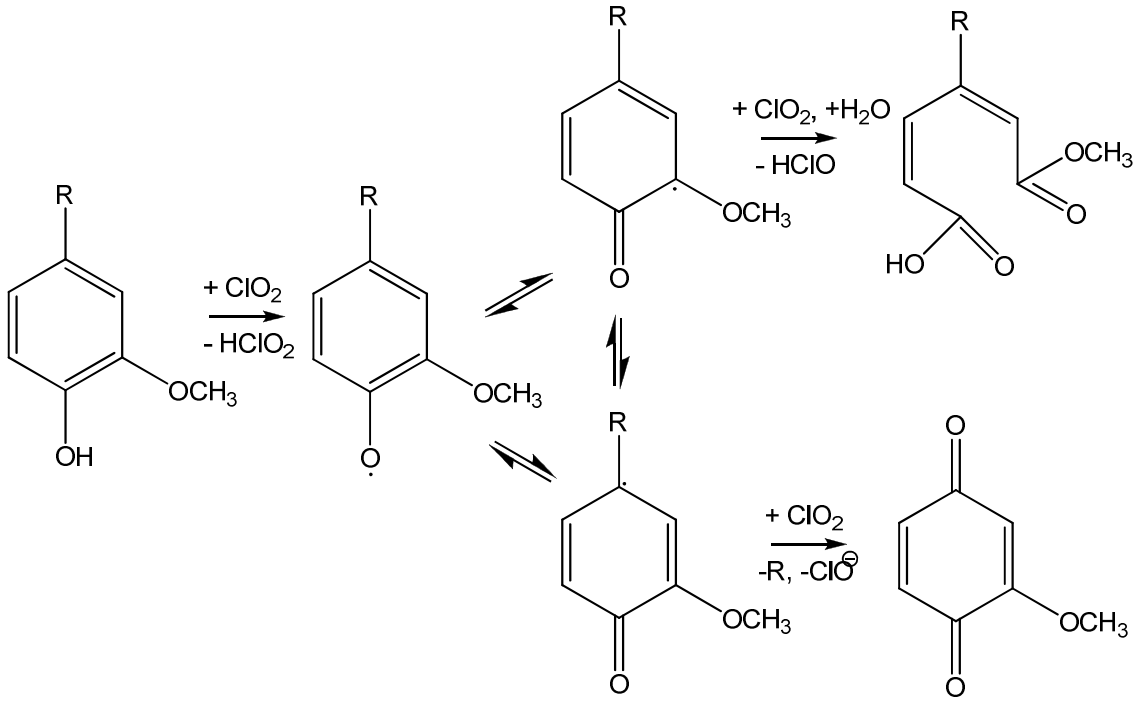


Figura 19. Degradação oxidativa de unidades fenólicas da lignina por dióxido de cloro.

2- OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho é o desenvolvimento de metodologia analítica para determinação quantitativa do conteúdo de lignina em amostras de bagaço e da palha da cana-de-açúcar, com base no estudo sistemático do processo de hidrólise ácida dos polissacarídeos.

Para isso serão avaliadas:

- A influência da concentração de ácido sulfúrico, utilizado na etapa de hidrólise do material lignocelulósico, na condensação de lignina, obtida como resíduo, e na solubilização dos polissacarídeos.
- A influência do agente oxidante na oxidação da lignina, bem como o comportamento da celulose e polioses presentes no material lignocelulósico, na presença do agente oxidante.

3 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 - Matéria-prima

A palha e o bagaço de cana-de-açúcar utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos pela Usina Ipiranga localizada em São Carlos, SP, sendo estes colhidos na safra de 2007. O material fornecido originalmente composto por uma mistura de fibras e medula, geralmente vem acompanhado de certa quantidade de impurezas como terra e fuligem. A fim de remover essas impurezas o bagaço passou por um processo de desmedulamento em água quente, seguido por um peneiramento úmido a frio. O bagaço foi adicionado a um recipiente contendo água a 80ºC e agitado por cerca de 1 hora, depois foi lavado com água fria em uma peneira de 16 mesh. As fibras retidas nesta peneira, e a fração de medula que passou pela peneira foram secas e utilizadas nos experimentos. Este procedimento foi realizado a fim de se separar a fração medula (células de parênquima). Este procedimento também serviu para eliminar extrativos, bem como alguns compostos inorgânicos, solúveis em água.

3.2- AMOSTRAGEM

Durante o processo de desmedulamento, descrito anteriormente no item 3.1, as frações fibra e medula foram separadas pelo uso de peneiras de diferentes aberturas (16, 60 e 100 mesh), sob fluxo de água. Os estudos previstos neste projeto foram realizados separadamente para as frações fibra e medula. A palha foi somente lavada para remoção de impurezas, como terra e fuligem e posteriormente triturada, não foi realizada lavagem com água a 80℃ para evitar a perda de extrativos solúveis em água.

3.3. CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO E DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

3.3.1 – TEOR DE UMIDADE

O teor de umidade das amostras foi determinado em balança OHAUS modelo MB200 a partir de 1 grama de material, pelo aquecimento a 105º por cerca de 180 min. A balança mede diretamente a porcentagem de perda de massa que é relativa ao teor de umidade do bagaço.

3.3.2 – TEOR DE CINZAS

Os teores de cinzas da palha e do bagaço de cana foram determinados pelo teor de resíduos resultantes da queima completa do bagaço conforme norma Tappi T211 om-93 modificada. Cerca de 1g de bagaço (ou palha) é adicionado em um cadinho de porcelana de massa conhecida, este cadinho é levado em mufla a uma temperatura de 525ºC por um período de 4 horas. O cadinho é depois resfriado e pesado com o resíduo. Determinou-se o conteúdo de cinzas com base na massa do resíduo relativo à massa de bagaço (ou palha) seco.

3.3.3 – TEOR DE EXTRATIVOS

A palha e as frações fibra e medula do bagaço de cana-de-açúcar foram submetidas a uma extração em um extrator soxhlet utilizando-se uma mistura cicloexano/etanol (1:1, v/v), conforme norma Tappi T204 cm-97 modificada. O tempo de extração foi determinado pelo monitoramento da concentração da solução por meio de espectroscopia no ultravioleta. Este procedimento foi realizado a fim de se remover os extrativos orgânicos solúveis nesta mistura de solventes. Determinou-se o conteúdo de extrativos com base na diferença em massa do bagaço (ou palha) seco antes e depois do processo de extração.

3.4-DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE LIGNINA

A determinação de lignina foi estudada a partir das condições empregadas no método de hidrólise e solubilização da celulose e polioses em ácido sulfúrico. Nestas condições, a lignina sofre reações de condensação e é determinada gravimetricamente a partir do resíduo insolúvel. Este método, tratado genericamente como método Klason, é dividido em duas etapas: tratamento do material lignocelulósico com ácido sulfúrico 72% por um período de 2 horas seguido de hidrólise com ácido sulfúrico a 3%, sob refluxo, por 4 horas.

O rendimento e composição da lignina isolada no procedimento Klason são afetados pela concentração do ácido utilizado para promover a hidrólise dos polissacarídeos, do tempo e da temperatura do tratamento. Com ácido sulfúrico em concentração abaixo de 65%, os carboidratos não são completamente hidrolisados em tempo razoável; ácido sulfúrico em concentração acima de 80% pode promover a degradação dos carboidratos em produtos insolúveis. A hidrólise incompleta de carboidratos também pode ocorrer se o tempo de reação é muito curto ou a temperatura muito baixa. Por outro lado, o prolongamento da reação ou temperaturas muito altas pode proporcionar um falso aumento na quantidade de lignina como conseqüência da condensação dos carboidratos (ou produtos de degradação destes) produzidos com a lignina (LIN; DENCE ,1992).

A partir da norma TAPPI 222 (método Klason de lignina insolúvel) desenvolvida para madeiras foram realizadas etapas de otimização para o

tratamento da palha e do bagaço de cana de açúcar, variando-se a concentração de ácido sulfúrico de 60% a 80%.

Pesou-se cerca de 1 grama de amostra seca e transferiu-se para um erlenmeyer de 250 mL com 15,0mL de ácido sulfúrico nas concentrações de 60, 65, 70, 72 e 80 %. Esta mistura ficou sob agitação por um período de 2 horas. Após esse tempo, transferiu-se a mistura para um balão de 1,0L, completou-se o volume até concentração de 3% com água destilada e aqueceu-se sob refluxo por 4 horas. Em seguida, filtrou-se a lignina insolúvel em um funil de vidro sinterizado nº 4 previamente tarado. Coletou-se o filtrado para análise posterior de lignina solúvel. Secou-se o funil com a lignina insolúvel em estufa a vácuo a 80 $\pm$ 5℃ por 24 horas. Resfriou-se em dessecador até obtenção de massa constante e pesou-se. A porcentagem de lignina Klason insolúvel foi determinada pela equação 1.

$$\%Lignina = \frac{m1}{m2} x100 \qquad (1)$$

Onde:

% Lignina = teor percentual de lignina Klason insolúvel.

m1 = massa (g) de lignina Klason insolúvel seca.

m2 = massa (g) de bagaço inicial seco.

A lignina obtida como resíduo em cada um dos experimentos realizados nas diferentes temperaturas foi analisada empregando análise elementar, espectroscopia no infravermelho, espectrometria de ressonância C^{13} no estado sólido, análise termogravimétrica (TGA) e cromatografia por exclusão de tamanho.

Para uma melhor compreensão do processo de hidrólise, os açúcares dissolvidos e produtos derivados destes (furfural e hidroximetilfurfural) foram quantificados por meio de análise cromatográfica. A lignina solubilizada em meio ácido foi quantificada por espectroscopia na região do ultravioleta, nos comprimentos de onda de 280nm e 215nm.

Este planejamento permitiu o conhecimento das quantidades de lignina e polissacarídeos residuais, respectivamente nas frações de açúcares e de lignina insolúvel, medidos gravimetricamente, contudo fundamentadas analiticamente com emprego das diferentes técnicas mencionadas anteriormente. A análise destes resultados permitiu compreender em maiores detalhes o processo de hidrólise do bagaço e da palha da cana-de-açúcar, levando assim ao estabelecimento de metodologia.

3.5. DETERMINAÇÃO DE LIGNINA SOLÚVEL

A quantidade de lignina solúvel foi determinada através da medida de absorbância a 215 e 280 nm das soluções resultantes das filtrações do método Klason, nas diferentes condições empregadas (ítem 3.4). As concentrações de lignina foram calculadas pela equação 2:

$$C(g/L) = \frac{(4{,}53\, x\, A_{215}) - A_{280}}{300} \qquad (2)$$

A equação (2) é resultante da resolução simultânea de duas equações

A_{280}= 0,68 C_D + 18 C_L

A_{215}= 0,15 C_D + 70 C_L

Onde A_{280}= valores de absorbância da solução a 280

A_{215}= valores de absorbância da solução a 215

C_D= concentração dos carboidratos (g/L)

C_L= concentração de lignina solúvel (g/L)

Os valores 0,68 e 0,15 são as absortividades molares dos carboidratos em 280 e 215 nm, respectivamente, e os valores 18 e 70 são absortividades molares da lignina solúvel em 280 e 215 nm, respectivamente.

3.6- DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLISSACARÍDEOS

A determinação do teor de polissacarídeos totais (holocelulose) é complementar à determinação de lignina. Neste caso, a fração de polissacarídeos permanece como resíduo sólido e a lignina presente é transformada em produtos solúveis e separada por filtração. O procedimento estudado consiste no tratamento do material pré-extraído com solução de clorito de sódio em meio ácido. Nestas determinações, as variáveis mais importantes são o valor do pH do meio reacional, a temperatura e o tempo de duração do tratamento (BROWNING, 1967). Condições não adequadas podem levar à oxidação incompleta da lignina ou à dissolução parcial da fração de polissacarídeos.

Neste trabalho, adicionou-se cerca de 3 g de material pré-extraído, 160 mL de água destilada, 0,5 mL de ácido acético concentrado e 1,5 g de clorito de sódio nesta ordem, em um balão de três bocas de 250 mL. Foi acoplado um pHmetro e um termômetro para monitorar o pH e a temperatura da reação, que foram mantidos em pH 4 e temperatura entre 70-80 ℃. Segundo Browning em pH entre 3-4 ocorre uma maior produção de cloro, e em temperatura baixas a reação é lenta, sendo que uma maior deslignificação é obtida em temperatura na faixa de 70-80℃.

As quantidades de clorito foram variadas a fim de se obter uma maior deslignificação acompanhada de uma menor perda de polissacarídeos. A extensão da reação de oxidação sobre as frações de lignina e de polissacarídeos foi acompanhada por espectroscopia na região do infravermelho.

3.7- EXTRAÇÃO DE LIGNINA PELO MÉTODO PEPPER

O bagaço pré-extraído com cicloexano/etanol, primeiramente passou por um processo de moagem para obtenção de granulometria de 40 mesh em seguida foi tratado com dioxano-ácido clorídrico aquoso 2N (9:1) à temperatura de ebulição (89-90ºC). Utilizou-se uma razão bagaço-solvente de 1:10 (m/v) por um tempo de 4 horas. O reator foi colocado em um banho de água a 90 ºC e o tempo de extração contado a partir do início do refluxo (cerca de 15 minutos após o sistema ser colocado no banho). Após a extração, o bagaço

residual foi filtrado, transferido para um béquer, lavado com dioxano-água (9:1), sob agitação mecânica, e novamente filtrado. Repetiu-se o procedimento de lavagem por 3 vezes. Os filtrados foram neutralizados com bicarbonato de sódio, reunidos e concentrados até 150 mL. O concentrado foi, então, adicionado em 2000 mL de água sob agitação. A lignina precipitada foi centrifugada e o sólido foi transferido para dessecador a pressão reduzida com pentóxido de fósforo até peso constante e utilizada nas análises.

Esse método foi escolhido para obtenção de uma lignina padrão de referência, pois segundo trabalhos publicados [FUKUSHIMA *et al*., 2001] a lignina obtida apresenta baixa contaminação por carboidratos.

3.8 – MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO.

Devido à complexidade da lignina e à sua susceptibilidade de alteração durante os procedimentos de isolamento, o uso de técnicas espectroscópicas na região do infravermelho e visível tem sido de grande importância na elucidação da estrutura e das reações químicas sofridas pela lignina.

3.8.1- ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A espectroscopia na região do infravermelho (4000-400 cm^{-1}) é uma técnica de grande importância na análise orgânica qualitativa, sendo muito utilizada na área de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas. A espectroscopia na região do infravermelho e demais métodos espectroscópicos modernos constituem hoje os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas. São, também, de alta relevância na determinação da pureza e quantificação de substâncias orgânicas, bem como no controle e acompanhamento de reações e processos de separação.

Desde 1950, espectroscopia no infravermelho (IV) tem sido uma ferramenta analítica bastante utilizada para caracterização química da lignina e seus derivados. Esta técnica pode ser usada como ferramenta para compreender a estrutura de ligninas isoladas, para dar informação sobre grupos químicos alterados, removidos e/ou adicionados durante os processos químicos.

Na Tabela 4 são apresentadas as principais bandas de absorção de três ligninas diferentes, do tipo Guaiacila (G), siringila (S), e guaiacila-siringial-hidroxilfenila (HGS).

Tabela 4. Bandas de absorção características das ligninas.

Faixa de Absorção (cm^{-1})	Atribuição	Softwood	Hardwood	Bamboo
		cm^{-1}	cm^{-1}	cm^{-1}
3460-3412	Estiramento O-H.	3412	3460	3428
3000-2842	Estiramento CH de grupos metila e/ou metileno, simétrico e assimétrico.	3000 2937 2879 2840	3000 2940 2880 2840	3002 2942 2879 2840
1738-1709	Estiramento C=O, em cetona não conjugadas, carbonilas e em ésteres (freqüentemente de carboidratos).	1722	1735	1709
1655-1675	Estiramento C=O, em aril cetonas conjugadas.	1663	1658	
1593-1605	Vibração do anel aromático e estiramento C=O	1596	1593	1601
1505-1515	Vibração do anel aromático.	1510	1505	1511
1460-1470	Deformação C-H assimétrica, em CH_3 e CH_2.	1464	1462	1462
1422-1430	Vibração do anel aromático combinado com deformação C-H no plano.	1423	1422	1423
1365-1370	Estiramento C-H alifático em CH_3; estiramento O-H fenólico.	1367	1367	
1325-1330	Vibração de anel siringila e guaiacila condensados.	1326	1329	1329
1266-1270	Vibração anel guaiacila com estiramento C=O.	1269	1266	1267
1166	Estiramento C - O em grupos ésteres conjugados.			1166
1140	Deformação C-H aromático no plano (típico de unidades guaiacila).	1140		
1128-1125	Deformação C-H aromático no plano (típico de unidades siringila).		1126	1127
1086	Deformação C-O em álcool secundário e éter alifático.	1086		
1030-1035	Deformação C-H aromático; deformação C-O de álcool primário.	1032	1033	1032

* HGS: p-hidroxifenila–guaiacila- siringila. [DENCE e LIN, 1992].

As amostras de lignina foram previamente secas, preparadas como pastilhas de KBr e compactadas a 10 – 12 $Kgf.cm^{-2}$ sob pressão reduzida. Os espectros das ligninas foram obtidos na região de 4000-400 cm^{-1} em um espectrofotômetro marca BOMEN – MB, a partir de pastilhas de KBr (1mg amostra para 100mg Kbr).

3.8.2- ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV-VISÍVEL

A espectroscopia de UV-Vis está entre os mais convenientes e usuais métodos para análise quantitativa e qualitativa de lignina em solução. Devido à natureza aromática da lignina, ela absorve fortemente luz ultravioleta.

O espectro típico da lignina compreende um máximo de absorção em, aproximadamente, 280 nm e um ombro mais ou menos pronunciado na região de 230 nm. Um segundo máximo de absorção com um alto valor de absortividade aparece na região de 200 e 208 nm (FENGEL; WEGENER, 1984).

Os espectros das ligninas foram obtidos na faixa de 190 a 400 nm, em um aparelho Spectrophotometer UV-Vis-NIR, CARY 5G a partir de soluções de H_2SO_4 3% neutralizadas com NaOH 6 mol/L (≈ 1mL).

3.8.3- ESPECTROSCOPIA DE RMN ^{13}C

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) tem mostrado um potencial significante no fornecimento de informações estruturais detalhadas para ligninas. (HIMMELSBACH *et al.*, 1983, JUNG *et al.*, 1989; SALIBA, 1998). As amostras são submetidas a campos magnéticos fortes e irradiadas por radiofreqüências cujos valores dependem do núcleo do átomo estudado. O estudo do espectro RMN dá uma idéia das vizinhanças e dos arranjos relativos dos átomos.

Técnicas padrão de RMN ^{13}C para soluções raramente fornecem espectros úteis quando aplicadas para amostras sólidas, pois os sinais são, geralmente, fracos e largos. No entanto, o problema com os sinais fracos pode ser melhorado usando seqüências de pulsos com polarização cruzada e as linhas podem ser afinadas pelo giro das amostras no “anglo mágico” de 54,7° relativo ao campo magnético aplicado (CP/MAS). [LIN; DENCE, 1992].

Existem diferenças profundas entre um espectro de lignina de próton e de C^{13}, provocados por quatro motivos:

(1) O núcleo C^{13} mostra um campo de absorção cerca de 20 vezes maior em relação ao próton. O espectro de RMN H^1 se estende sobre cerca de 10 ppm e do espectro de RMN C^{13} sobre 200 ppm.

(2) Os núcleos C^{13} apresentam um tempo de relaxação spin-spin maiores que o do hidrogênio. De acordo com uma relação recíproca entre a largura de linha ($\nu_{1/2}$) e o tempo de relaxação T ($\nu_{1/2} \approx 1/T_2$) tem-se as larguras de linhas menores para os sinais de C^{13}.

(3) O desacoplamento C-H leva ao colapso dos multipletes de C^{13}. Assim, o desacoplamento de prótons fornece somente um sinal agudo para cada tipo de átomo de carbono.

(4) Devido a que os átomos de carbono formam o esqueleto da molécula enquanto que prótons aparecem sempre na sua periferia, os sinais de C^{13} dependem muito mais da vizinhança e do padrão de substituição dos respectivos núcleos do que os sinais de prótons. Por este motivo, um espectro de RMN C^{13} contém muito mais sinais com um grau de informação estrutural maior.

No espectro de RMN protônico somente se encontram quatro áreas largas de absorção. Em campo mais baixo aparece um sinal para os hidrogênios aromáticos e olefínicos. A cerca de 4 ppm encontra-se um segundo sinal para os prótons metoxílicos e a 2.2 e 2.0 ppm, dois sinais para os prótons acetilas fenólicos e alcoólicos. O espectro de RMN C^{13} pode ser subdividido em três áreas principais, a primeira delimitada em cerca de 200 ppm a 165 ppm, cobrindo os átomos de carbono dos grupos carbonila, a segunda área delimitada de 165 até cerca de 100 ppm, provocada pelos átomos de carbono aromáticos e olefínicos, e um terceiro domínio, estendendo-se de cerca de 100 a 50 ppm, que é causada pelos átomos de carbono alifáticos.

As medidas foram realizadas em dois equipamentos, um Discovery da marca Tecmag Inc. 85 MHz para o hidrogênio, e 20,1 MHz para carbono, e o outro em um Varian Inova 400MHz pra hidrogênio e 100,5 MHz pra Carbono Os experimentos realizados foram CPMAS (Cross-Polarization Magic-Angle-Spinning) com TOSS (Total Suppression of Spinning Sidebands) de 4 pulsos,

com rotação em torno do ângulo mágico de 2500 Hz (para os experimento feitos no Tecmag) e 5000 Hz (para os feitos no Varian).

3.8.4- ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

As técnicas termoanalíticas são definidas como métodos nos quais se mede a variação de uma determinada propriedade física de uma amostra em função do tempo ou da temperatura. A análise termogravimétrica (TGA) é uma das técnicas termoanalíticas onde é medida a perda de massa da amostra em função do tempo, ou em função da temperatura. A análise termogravimétrica fornece informações sobre o conteúdo dos componentes voláteis como solventes ou água, sobre o comportamento de decomposição e conteúdo de cinzas.

As análises termogravimétricas foram realizadas em um equipamento SHIMADZU TA-50WSI com módulo TGA50, porta-amostra de platina, razão de aquecimento de 20 ^{o}C/min sob fluxo de N_2 de 10 mL/min, num intervalo de temperatura ambiente a 900°C.

3.8.5- ANÁLISE ELEMENTAR (C, H ,N)

Essa técnica está baseada na combustão de uma amostra do material a ser analisado para a determinação das quantidades de carbono, enxofre, hidrogênio e nitrogênio; a quantidade de oxigênio é obtida por diferença.

As análises elementares foram realizadas pelo CAQI – Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química da USP, São Paulo, utilizando aparelho da CE Instruments modelo EA 1110 CRNS-O.

3.8.6. CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)

As distribuições de massas moleculares das ligninas obtidas foram determinadas em um sistema cromatográfico SHIMADZU. São apresentadas a seguir as condições empregadas nas análises por GPC.

Detector – Índice de Refração Diferencial (modelo RID 6A), e detector de UV 254nm.

Coluna – Pré-coluna Pl-Gel + 3 colunas em série Plgel 500 A + 10^3 A + 10^4 A (polymer Laboratories).

Enchimento: Gel de poli(estireno/divinilbezeno) – PS/DVB

Eluente – THF.

3.9- ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS E DERIVADOS

3.9.1- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).

O teor de polissacarídeos foi determinado por análise cromatográfica do filtrado obtido na determinação do teor de lignina Klason, através da detecção dos seguintes compostos hidrolisados: celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural. A solução contendo o hidrolisado foi submetida à filtração em membrana SEP PAK C_{18} (Waters) para separação da lignina solúvel e demais produtos de degradação. As demais condições de análise foram:

<u>AÇÚCARES</u>

Cromatógrafo – SHIMADZU, modelo CR 7A.

Detector – Índice de Refração SHIMADZU R10-6A.

Coluna – Aminex HPX 87 H (300 x 7,8mm BIO-RAD).

Eluente – H_2SO_4 0,005mol.L^{-1}.

<u>HIDROXIMETILFURFURAL E FURFURAL</u>

Cromatógrafo – SHIMADZU, modelo CR 7A.

Detector – UV (254nm) da SHIMADZU SPD-10A.

Coluna – RP 18 (C_{18}) da HEWLETTPACKARD.

Eluente – Solução de acetonitrila/água 1:8 (v:v), contendo ácido acético 1% (v:v)

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Visando o estudo das reações envolvidas nos processos de determinação de lignina do bagaço e da palha de cana-de-açúcar foi realizada uma seqüência de estudos conforme descrito a seguir:

- Preparação e caracterização do material lignocelulósico;
- Estudo do efeito da concentração de ácido sulfúrico na determinação do teor de lignina;
- Caracterização das ligninas isoladas, por diferentes técnicas espectroscópicas;
- Estudo da obtenção de lignina pelo método indireto de determinação dos polissacarídeos totais (holocelulose). A determinação do teor holocelulose é complementar à determinação de lignina. Neste caso, a fração de polissacarídeos permanece como resíduo sólido e a lignina presente é oxidada e transformada em produtos solúveis.

4.1- CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

O bagaço de cana-de-açúcar originalmente composto por uma mistura de fibras e medula, geralmente vem acompanhado de certa quantidade de impurezas como terra e fuligem. A fim de remover essas impurezas o bagaço passou por um processo de extração em água quente, seguido por

desmedulamento úmido a frio. Este procedimento foi realizado a fim de se separar a fração medula (células de parênquima) da fração fibra. Foram obtidos 72% de fibras, 20% de medula e 8% de solúveis e insolúveis (terra). Esse procedimento de separação não é absoluto, ou seja, cada uma das duas frações é, na verdade, rica em um dos dois elementos (fibra e medula), como pode ser observado na figura 20.

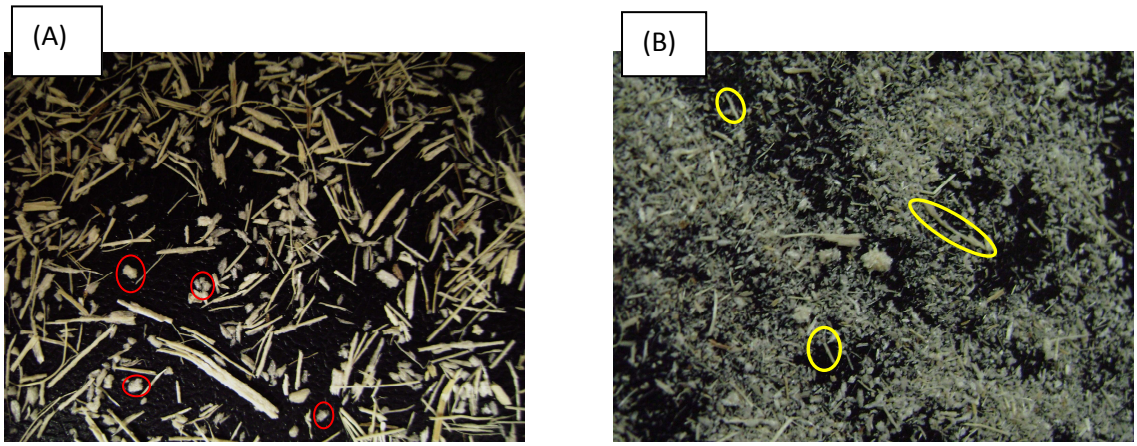


Figura 20. Fotografias das frações (A) fibra e (B) medula do bagaço de cana-de-açúcar. Medula, Fibra

4.2- DETERMINAÇÕES DE CINZAS

Os teores de cinzas (compostos inorgânicos) da palha e do bagaço de cana foram determinados pelo teor de resíduos resultantes da queima completa do bagaço e da palha conforme norma Tappi T211 om-93 modificada. Os valores de cinzas obtidos e os encontrados na literatura para palha, bagaço e suas frações separadamente são mostradas na Tabela 5.

Os valores encontrados apresentam pequenas variações, quando comparados aos da literatura, que pode ocorrer em função da variedade da cana empregada e da localização geográfica dos locais de cultivo.

Quando comparadas as diferentes frações do bagaço (medula e fibra), nota-se que estas apresentam diferentes teores de cinzas. Essa diferença pode ser explicada pela função que cada estrutura celular exerce na planta.

Tabela 5. Teores de cinzas nas amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar.

Referências	Cinzas (%)			
	Fibra	**Medula**	**Bagaço Integral**	**Palha**
Este trabalho	0,34 ± 0,03	2,48 ± 0,02	0,93± 0,03	4,97 ± 0,15
ATLAS (ICIDCA)	1,4	5,4	2,6	–
HOAREAU, W.	1,1	–	–	–
SANJUÁN, R.	1,1	5,4	–	–
NASSAR, M. M.	–	–	3,4	–
XIN, L.	1,9	2,5	1,9	–
JUAREZ, J. A.	–	–	2,7	9,3
BAUDEL, H.M.	–	–	2,6	–

4.3- TEOR DE EXTRATIVOS

A extração com a mistura de solventes orgânicos (cicloexano/etanol) possibilitou a remoção de compostos orgânicos, comumente chamados de extrativos, dentre os quais se incluem lignanas, terpenos, flavonóides e outros aromáticos presentes na amostra, alguns dos quais podem condensar com a

lignina insolúvel interferindo nas análises. A extração com água permitiu a remoção de compostos inorgânicos solúveis em água e, principalmente, uma fração de sacarose residual e polissacarídeos de baixa massa molar não removidos no processo de moagem e extração da cana-de-açúcar.

Os dados obtidos experimentalmente encontram-se dentro da faixa de valores descritos na literatura, exceto para a fração fibra, que apresentou um valor um pouco inferior, como mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Teores de extrativos do bagaço e da palha de cana-de-açúcar.

Referências	Extrativos (cicloexano/etanol) (%)			
	Fibra	Medula	Bagaço Integral	Palha
Este trabalho	1,8	3,2	2,9	4,5
ATLAS (ICIDCA)	2,3	2,9	2,7	–
BAUDEL, H.M.	–	–	3,2*	–
SANJUÁN, R.	2,5	3,6	–	–
Widyorini, R.	4,9	2,2	–	–

* etanol

4.4- DETERMINAÇÕES GRAVIMÉTRICAS DE LIGNINA

As condições escolhidas para a obtenção de lignina insolúvel (tanto para o bagaço e suas frações, fibra e medula, quanto para palha) foram estabelecidas a partir da variação da concentração de ácido sulfúrico em torno do valor de referência (72%). Assim, utilizou-se ácido sulfúrico nas

concentrações de 60, 65, 68, 70, 72 e 80%, com a finalidade de se determinar a concentração de ácido que permita a obtenção de valor mínimo para a fração insolúvel. Ou seja, condições nas quais ocorressem, preferencialmente ou exclusivamente, reações de hidrólise de polissacarídeos, sem (ou minimizando) a ocorrência de condensação destes com a lignina. A concentração de 72% é a concentração utilizada no procedimento descrito pela norma TAPPI T222 para análise de madeiras. Neste trabalho foram escolhidas concentrações de ácido maiores e menores que o da referência para comprovar a ocorrência de um "mínimo".

Na Tabela 7 e 8 são mostrados os valores lignina insolúvel (expressos como resíduo) obtidos nos tratamentos ácidos para o bagaço e suas frações e para palha de cana-de-açúcar nas diferentes concentrações de ácido sulfúrico utilizadas.

Tabela 7. Valores de lignina insolúvel (expresso como massa residual) para o bagaço de cana-de-açúcar e suas frações (fibra e medula)

Concentração H_2SO_4 (%)	Fibra (%)	Desvio Padrão	Medula (%)	Desvio Padrão	Bagaço (%)	Desvio Padrão
60	60,88	±0,41	56,59	±0,67	63,25	±0,27
65	19,80	±0,20	20,19	±0,92	19,37	±0,02
68	19,68	±0,37	18,84	±0,61	19,94	±0,03
70	20,09	±0,43	19,15	±0,44	19,61	±0,27
72	22,26	±0,05	20,53	±0,58	19,76	±0,07
80	24,56	±0,90	24,04	±1,05	23,44	±0,36

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 8. Valores de lignina insolúvel (expresso como massa residual) para a palha de cana-de-açúcar

Concentração H_2SO_4 (%)	Palha (%)	Desvio Padrão
60	61,14	±0,10
65	21,60	±0,25
68	22,36	±0,62
70	22,67	±0,24
72	22,88	±0,50
80	28,32	±0,66

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

Como a concentração ótima de ácido sulfúrico deve permitir a maximização das reações de hidrólise de polissacarídeos com a minimização dos processos de condensação envolvendo a lignina, um gráfico de massa residual (lignina insolúvel) *versus* concentração de ácido deve apresentar um valor de mínimo. Para as amostras ensaiadas neste trabalho (medula, fibra, bagaço integral e palha) foram obtidos valores de mínimo em diferentes concentrações de ácido sulfúrico para cada uma das frações (Figura 21).

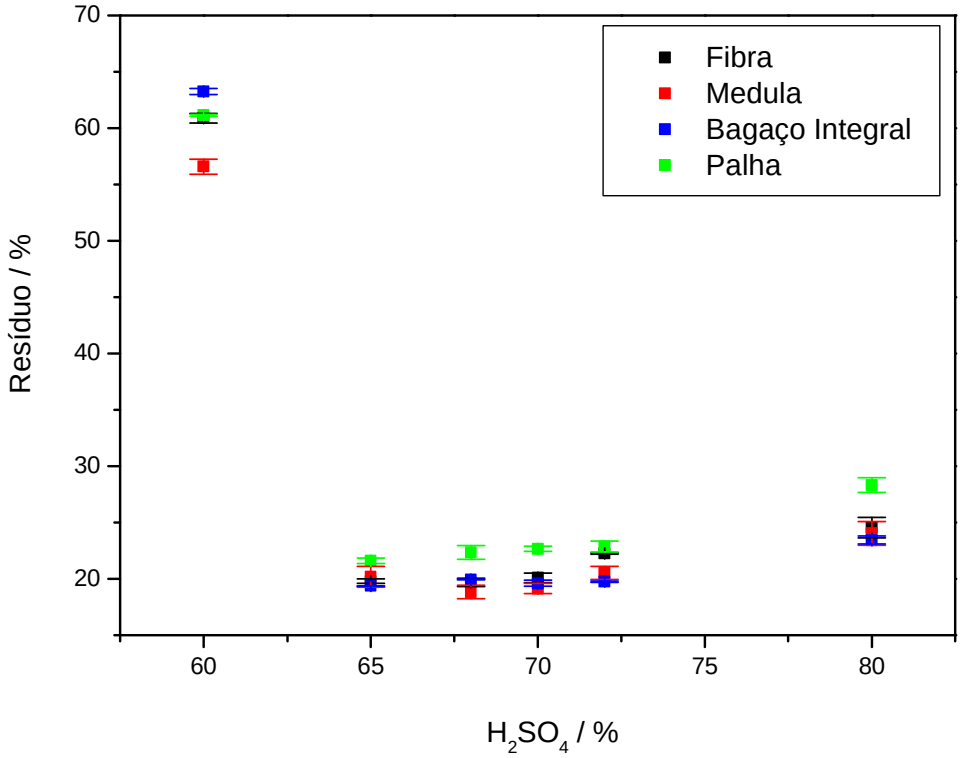


Figura 21. Gráfico do teor de lignina insolúvel (expresso como massa residual) em função da concentração de ácido sulfúrico.

De acordo com os resultados apresentados é possível observar que todas as amostras obtidas com ácido na concentração de 60%, apresentaram valores altos de massa residual, indicando que uma fração de polissacarídeos não foi hidrolisada e permaneceu como resíduo. Para as amostras obtidas com ácido 80% os valores mais altos de lignina são devido à condensação de produtos de degradação dos polissacarídeos, como furfural e p-hidroximetilfurfural, com a lignina.

As análises indicaram que a concentração ótima de ácido, para determinação de lignina insolúvel total, situa-se em um intervalo de concentração, que varia de 65 – 72%, para todas as amostras.

Os teores de lignina encontrados para o bagaço integral estão mais próximos dos teores de lignina da fibra, isso está coerente pelo fato da fibra corresponder a, aproximadamente, 72 % do bagaço. Os teores de lignina insolúvel obtidos para a fibra estão em torno de 20% e da medula em torno de 19%, se fizermos uma média ponderal o teor de lignina no bagaço deveria apresentar um valor próximo a 20%, como obtido experimentalmente.

Como os métodos de determinação de lignina foram desenvolvidos para madeira resolvemos aplicar as mesmas condições utilizadas para o bagaço em duas espécies de madeira (*Pinus taeda e Eucalyptus grandis*), e observar a melhor concentração de ácido para cada espécie. Foram realizados tratamentos com ácidos nas mesmas concentrações utilizadas para o bagaço e para palha de cana-de-açúcar, os resultados são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de lignina insolúvel obtidos para a madeira de *Eucaliptus* e *Pinus*

Concentração H_2SO_4 (%)	**Lignina Insolúvel (%) Eucaliptus**	**Desvio Padrão**	**Lignina Insolúvel (%) Pinus**	**Desvio Padrão**
60	73,21	±0,33	75,08	±0,52
65	26,64	±0,39	30,04	±0,45
68	25,56	±0,06	30,49	±0,26
70	25,90	±0,43	30,10	±0,26
72	27,39	±0,85	29,89	±0,09
80	29,84	±0,43	30,69	±0,13

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

Como podemos observar na tabela 9 as concentrações de ácido que proporcionam os menores teores de lignina (resíduo) estão entre 65 – 72%. Os conteúdos de lignina Klason total para algumas espécies de *Pinus* variam de 26,0 a 30%, e para *Eucayiptus,* de 21,0 a 34,0% [FENGEL; WEGENER, 1984]. Os valores obtidos experimentalmente estão dentro da faixa de valores encontrados na literatura, entretanto observa-se que a concentração de ácido sulfúrico de 72%, referenciada na norma (TAPPI T222), apresenta valores de lignina próximos para madeira de *Pinus*, mas para o *Eucaliptus* a diferença alcança até 2%. Segundo Nimz, as concentrações de ácido variam para madeiras de folhosa e coníferas, no caso de lignina de abeto (conífera) se a concentração de H_2SO_4 for graficada vs. o conteúdo de lignina insolúvel, obtêm-se uma curva com um mínimo em ácido 72 %, já para lignina de faia (folhosa) o mínimo é encontrado em 66%, valores coerentes com observado experimentalmente.

O perfil do gráfico de resíduo vs. concentração do ácido para as amostras de bagaço e para as amostras de madeira mostraram comportamentos semelhantes, como pode ser observado na Figura 22.

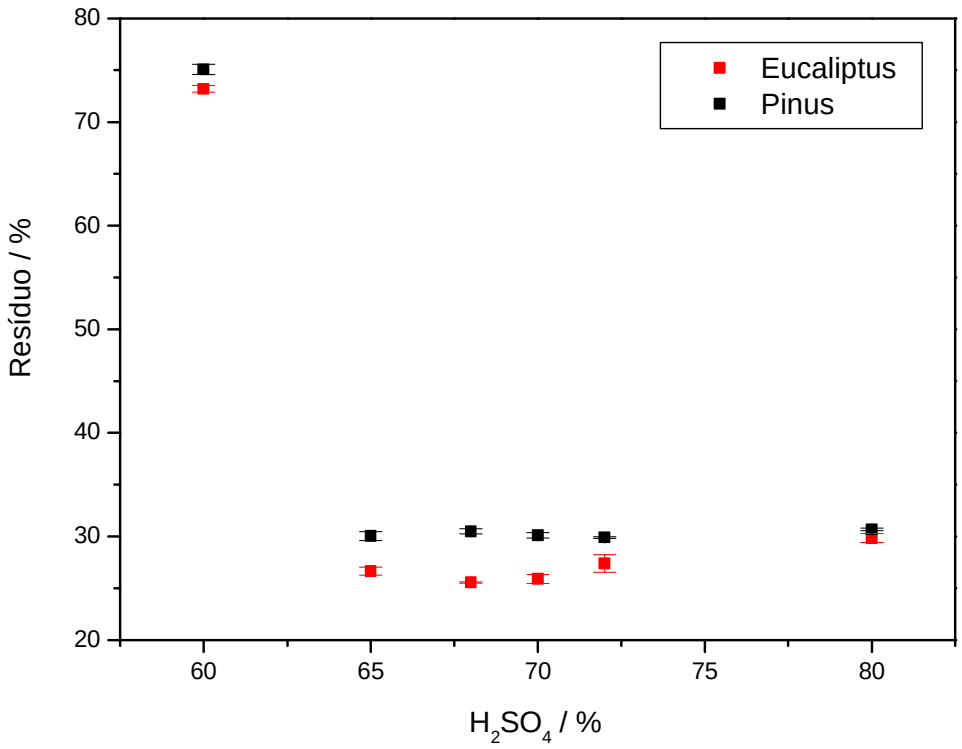


Figura 22. Gráfico do teor de lignina insolúvel (expresso como resíduo) para madeiras em função da concentração de ácido sulfúrico.

Os resultados obtidos para as madeiras de *Pinus* e *Eucayiptus* serviram para confirmar a necessidade do desenvolvimento de métodos específicos para o bagaço de cana-de-açúcar.

4.5- CARACTERIZAÇÃO DAS LIGNINAS OBTIDAS NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO.

Devido a não obtenção de um único valor de mínimo foram realizadas análises dessas ligninas residuais, que pudessem fornecer mais informações, tais como presença de polissacarídeos nos resíduos, que pudessem produzir um artefato na escolha de uma concentração ideal de ácido sulfúrico.

A caracterização de ligninas obtidas no processo de hidrólise é realizada empregando-se análises específicas de grupos funcionais (metoxilas e hidroxilas), análise elementar, massa molecular, ressonância magnética nuclear, espectroscopia na região do ultravioleta e do infravermelho. O emprego destas técnicas é de grande importância, pois permite acompanhar as mudanças estruturais das ligninas ocorridas em função do processo utilizado.

4.5.1- ANÁLISE ELEMENTAR

A análise elementar foi utilizada para avaliar a presença de polissacarídeos nas amostras de ligninas residuais. Considerando a fórmula molecular da anidroglicose como unidade monomérica da celulose $C_6H_{10}O_5$ (Figura 23-a) e de uma anidropentose como monômero das polioses $C_5H_8O_4$ (Figura 23-b) a porcentagem de carbono é igual a 44,4% e 45,5%, respectivamente. No caso da lignina, pelo fato desta apresentar três

precursores (Figura 8) e não se conhecendo a proporção de cada um na macromolécula de lignina do bagaço o teor de carbono pode variar entre 57,9, 60,9 e 63,2%, que correspondem aos teores de carbono do álcool sinapílico (ou unidade siringila), álcool coniferílico (unidade guaiacila) e do álcool cumarílico (unidade p-hidroxifenila), respectivamente, acrescidos de uma molécula de água. A diferença entre esses precursores é o número de metoxilas por anel aromático.

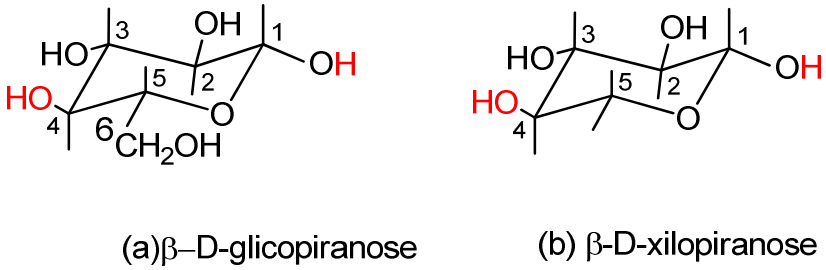


Figura 23. Estruturas moleculares das unidades monoméricas da celulose (β-D-glicopiranose) e de um açúcar típico de polioses (□-D-xilopiranose).

Analisando os dados da literatura, a porcentagem de carbono para lignina do bagaço varia de 59,5 a 63,5 % (Tabela 10), e a porcentagem de carbono para polissacarídeos é cerca de 44%, sendo assim, exceto a amostra obtida pelo uso de ácido sulfúrico na concentração de 60%, todas as demais concentrações produziram amostras compatíveis com a fórmula estrutural de ligninas, pois possui um teor de carbono próximo de 60 %. A lignina padrão, obtida pelo método Pepper, apresentou teor de carbono de 61,66%. Os resultados da análise elementar estão mostrados nas Tabelas 11, 12, 13 e 14

Os teores de carbono foram corrigidos pelas cinzas e o conteúdo de oxigênio foi obtido por diferença.

Tabela 10. Análise elementar de amostras de lignina de bagaço e palha de cana-de-açúcar.

Referência	C (%)	H(%)	O(%)	Amostra
Lignina-Padrão obtida neste trabalho	61,66	5,89	32,21	Bagaço de cana
SINGH, R. *	62,84	5,37	31,79	Bagaço de cana
BOTARO, V.	63,50	5,76	30,70	Bagaço de cana
FENGEL& WEGENER	59,50	5,40	35,10	Bagaço de cana

* Lignina organossolve

Os polissacarídeos podem estar presentes nas amostras de lignina residual, sendo que a porcentagem de contaminação pode variar de 2 a 5% dependendo do método de isolamento e purificação da lignina [FENGEL; WEGENER, 1984].

Todas as amostras obtidas com ácido sulfúrico na concentração de 60% apresentaram um conteúdo de carbono baixo (~47%), indicando a presença de elevada quantidade de carboidratos.

Tabela 11. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas da fração de fibra do bagaço

Amostra	%C	%H	%O	%S	%N
60 %	47,19	6,52	45,21	0,88	0,20
65%	60,03	5,71	32,29	1,54	0,43
68 %	60,08	6,04	31,60	1,88	0,40
70 %	58,05	6,20	33,88	1,35	0,52
72 %	61,09	5,68	31,83	0,98	0,42
80 %	60,32	5,75	32,47	1,04	0,42

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em duplicata.

Tabela 12. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas da fração de medula do bagaço

Amostra	%C	%H	%O	%S	%N
60 %	46,70	6,35	45,80	0,92	0,23
65%	58,75	5,91	33,30	1,52	0,52
68 %	60,68	5,97	31,88	0,98	0,49
70 %	59,32	6,34	32,46	1,35	0,53
72 %	56,90	5,93	34,40	2,28	0,49
80 %	59,25	5,93	33,16	1,19	0,47

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em duplicata.

Tabela 13. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas da fração de palha

Amostra	%C	%H	%O	%S	%N
60%	49,41	6,69	42,17	1,25	0,48
65%	61,06	6,08	30,24	1,51	1,11
68%	61,13	6,15	29,84	1,71	1,17
70%	59,70	6,13	31,23	1,72	1,22
72%	59,52	6,04	31,65	1,65	1,14
80%	61,38	5,84	29,93	1,82	1,03

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em duplicata.

Tabela 14. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas do bagaço integral

Amostra	%C	%H	%O	%S	%N
60%	47,60	6,36	44,89	0,91	0,24
65%	59,09	5,59	33,42	1,49	0,41
68%	58,86	5,82	33,82	1,08	0,42
70%	59,56	5,68	32,67	1,64	0,45
72%	60,24	5,74	32,12	1,47	0,43
80%	60,29	5,59	32,15	1,57	0,40

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em duplicata.

Como a análise elementar da lignina padrão, obtida pelo método Pepper, não apresentou teor de enxofre concluímos que os teores de enxofre encontrados nas demais amostras de lignina são provenientes do processo de hidrólise com ácido sulfúrico que passa por uma etapa de sulfatação da lignina, como mostra a Figura 24. Sendo assim, os teores de carbono, oxigênio e hidrogênio foram corrigidos e são apresentados nas tabelas 15 - 18.

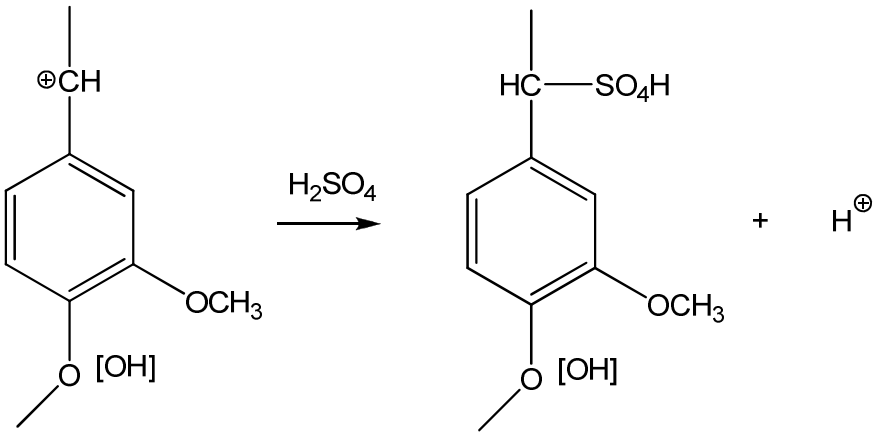


Figura 24. Reação de unidades de lignina em ácido sulfúrico.

Tabela 15. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas da fração de fibra do bagaço.

Amostra	%C	%H	%O	%N
60 %	47,61	6,58	45,61	0,20
65%	60,97	5,87	33,02	0,44
68 %	61,23	6,16	32,20	0,41
70 %	58,84	6,28	34,49	0,39
72 %	61,69	5,74	32,15	0,42
80 %	60,95	5,81	33,83	0,41

Tabela 16. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas da fração de medula do bagaço

Amostra	%C	%H	%O	%N
60 %	47,13	6,41	46,23	0,23
65%	59,66	6,00	33,81	0,53
68 %	61,28	6,01	32,22	0,49
70 %	60,13	6,35	32,98	0,54
72 %	58,23	6,05	35,22	0,50
80 %	59,96	5,92	33,64	0,48

Tabela 17. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas da fração de palha

Amostra	%C	%H	%O	N (%)
60 %	50,03	6,52	42,96	0,49
65%	62,00	6,17	30,70	1,13
68 %	62,19	6,14	30,48	1,19
70 %	60,74	6,24	31,78	1,24
72 %	60,52	6,14	32,18	1,16
80 %	62,52	5,95	30,48	1,05

Tabela 18. Análise elementar (C, H, N e O) das ligninas obtidas do bagaço integral

Amostra	%C	%H	%O	%N
60 %	48,04	6,42	45,3	0,24
65%	59,98	5,67	33,93	0,42
68 %	59,50	5,88	34,19	0,43
70 %	60,55	5,77	33,22	0,46
72 %	61,14	5,83	32,59	0,44
80 %	61,25	5,68	32,66	0,41

Analisando os teores de carbono obtidos experimentalmente, observa-se que esses se situam dentro de uma faixa que vai de 57 a 62%, aproximadamente. Essa faixa de valores está próxima dos teores de carbono das unidades siringila (57,9% de C) e guaiacila (60,9% de C), e p-hidroxifenila (63,2% de C). Contudo, utilizando somente a análise elementar não podemos assegurar a proporção de cada unidade na macromolécula de lignina do bagaço, pois podemos variar as proporções das mesmas de modo a obter teores de carbono na faixa de nenhuma, uma ou duas metoxilas, e a perda de carbono da cadeia lateral também pode alterar os teores de carbono mantendo o número de metoxilas por anel aromático. Na Tabela 19, são apresentadas algumas proporções possíveis.

Tabela 19. Teor de metoxila para algumas proporções de unidades constituintes de ligninas.

Proporções (%)			(OCH_3) por anel
Siringila (2 OCH_3)	**Guaiacila (1 OCH_3)**	**Hidroxifenila (sem OCH_3)**	
100	0	0	2,0
70	20	10	1,6
50	50	0	1,5
60	20	20	1,4
40	40	20	1,2
50	0	50	1,0

Como a variação da concentração do ácido visa à obtenção de um resíduo (lignina insolúvel) onde a lignina obtida tenha a menor quantidade de contaminantes (polissacarídeos), o teor de carbono do produto insolúvel obtido nestas concentrações de ácido, deve estar dentro da faixa esperada (57,9 e 63,2%). Sendo assim, podemos plotar um gráfico de lignina insolúvel e teor de carbono em função da concentração de ácido e observar se o mínimo de lignina corresponde aos maiores valores de conteúdo de carbono.

Os gráficos (Figura 25) mostram um perfil semelhante, onde se observa uma grande variação no teor de carbono da amostra obtida com ácido na concentração de 60% em relação às demais e uma pequena variação nos teores de carbono entre as concentrações de 65 a 80%.

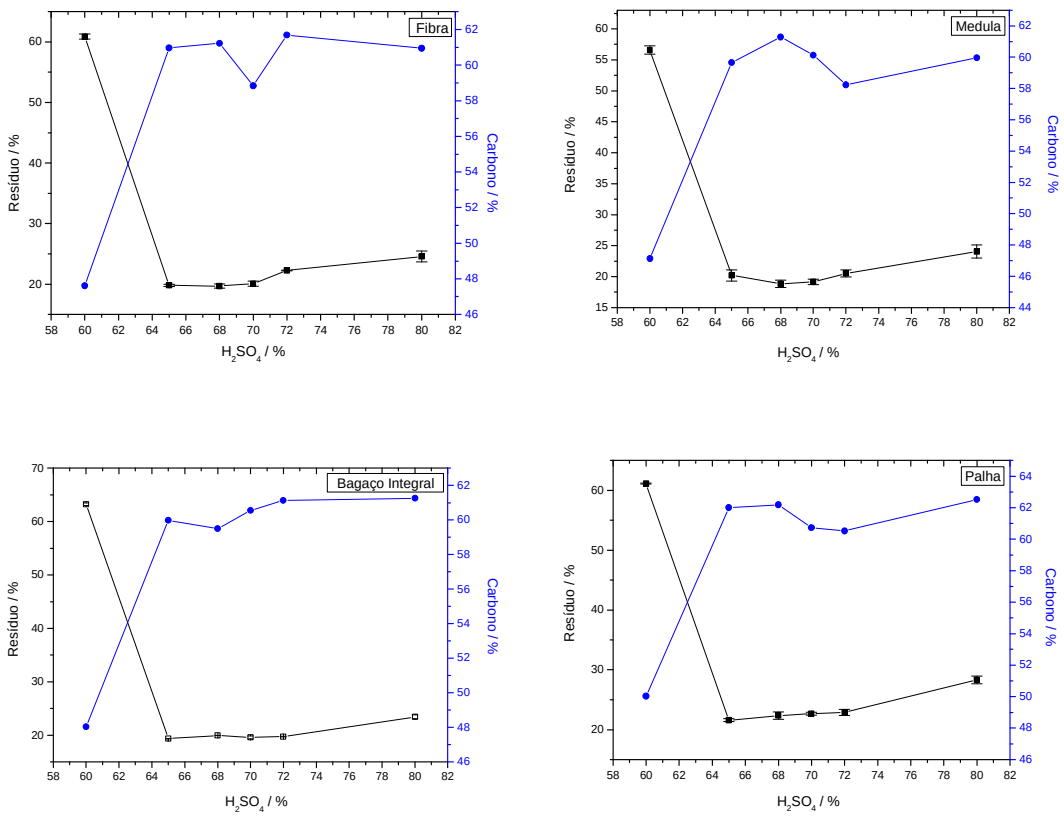


Figura 25. Gráfico de lignina insolúvel (% Resíduo) e do teor de carbono em função da concentração do ácido para o bagaço integral, sua frações (fibra e medula) e para palha de cana-de-açúcar.

4.5.2- ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

As análises térmicas são importantes técnicas para determinação de propriedades químicas e físicas de materiais poliméricos.

A T_g (temperatura de transição vítrea) da lignina é afetada por vários fatores como a presença de contaminantes de baixo peso molecular (incluindo água e solventes), pela massa molecular da lignina, pelas ligações

entrecruzadas e pela pressão. Sendo assim, um valor de T_g típico de alguma lignina particular não pode ser precisamente obtido. Entretanto, segundo dados da literatura os valores de T_g de lignina dioxano e de lignina de madeira moída estão, geralmente, por volta de 400 e 420K, respectivamente [SARKANEN; LAI, 1971].

A decomposição térmica da lignina resulta de complexas reações, sendo assim, são encontradas na literatura várias hipóteses para explicar as etapas de perda de massa das ligninas. Segundo Singh a degradação da lignina apresenta três estágios, um primeiro de perda de umidade residual da amostra em 100 – 150°C, o segundo ocorre em 200-230 ^{o}C que é devido a presença de carboidratos na lignina e o terceiro em 300-400 ^{o}C onde ocorre a degradação máxima da lignina. Para Dominguez a degradação térmica da lignina vai de 200 - 450 ^{o}C, e em temperaturas acima de 400°C que corresponde ao processo de pirólise da lignina, reações de decomposição e de condensação dos anéis aromáticos são possíveis.

Na Figura 26 é apresentada a curva termogravimétrica da lignina obtida pelo método Pepper, utilizada nesse trabalho como padrão. Observa-se uma primeira etapa de degradação que vai até aproximadamente 150°C, essa degradação é atribuída a perda de umidade da amostra. A segunda degradação inicia por volta de 200°C que corresponde a pirólise da lignina e prossegue até cerca de 400 ^{o}C, onde se inicia a terceira degradação atribuída a degradação dos anéis aromáticos.

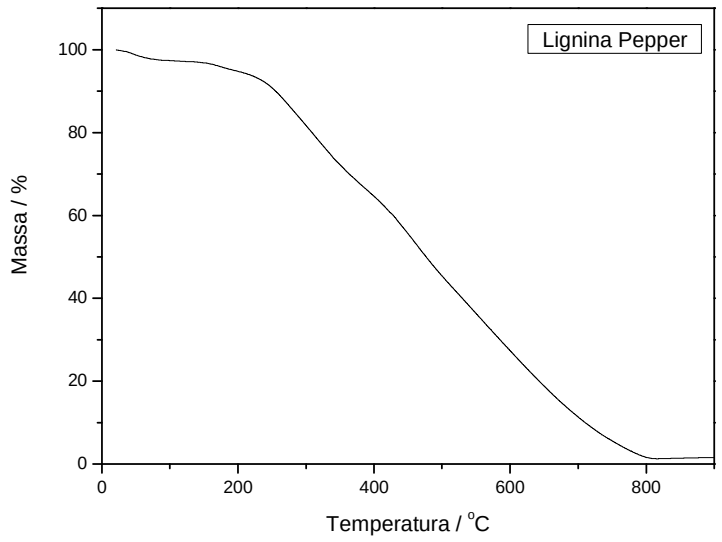


Figura 26. Análise termogravimétrica da lignina obtida pelo método Pepper em atmosfera de N_2.

As curvas de TGA para as ligninas obtidas pelo tratamento com diferentes concentrações de ácido apresentaram um comportamento de degradação semelhante ao observado para lignina padrão. Os resultados das análises termogravimétricas para as ligninas encontram-se nas Figuras 27 – 30. Nas curvas TGA das ligninas obtidas com ácidos nas concentrações de 65, 68, 70, 72 e 80% a perda de massa que aparece em temperatura menor que 100 ℃ é devida, principalmente, à evaporação de água e de outras substâncias de baixa massa molar. A perda de massa que se inicia em 200 ℃ corresponde ao inicio da reação de pirólise da lignina, mas também pode ser um indício da presença de carboidratos na amostra de lignina. A perda de massa prossegue até a temperatura de 500℃, onde é reduzida em quase 40%

da massa inicial. Alguns processos de degradação da lignina que ocorrem normalmente acima de 300 ºC são atribuídos à ruptura de ligações interunidades o que resulta na perda de fenóis monoméricos para a fase vapor. Uma terceira perda de massa é observada acima de 500 ºC, atribuída às degradações de anéis aromáticos. Para as ligninas obtidas pelo tratamento com ácido 60% (Figuras 27 – 30) observa-se um comportamento semelhante, no entanto os máximos valores de perda de massa ocorrem entre as temperaturas de 200 ºC e 400 ºC. Isso pode ser devido à presença de polissacarídeos nestas amostras. As amostras de lignina obtidas com ácido 65% de fibra e medula também apresentaram um perfil diferente. A degradação térmica da lignina procede mais lentamente em relação à celulose e/ou polioses, que são degradadas em uma estreita faixa de temperatura. Isso ocorre, pois a lignina possui estrutura aromática mais complexa com muitas ligações entrecruzadas, que aumentam sua estabilidade.

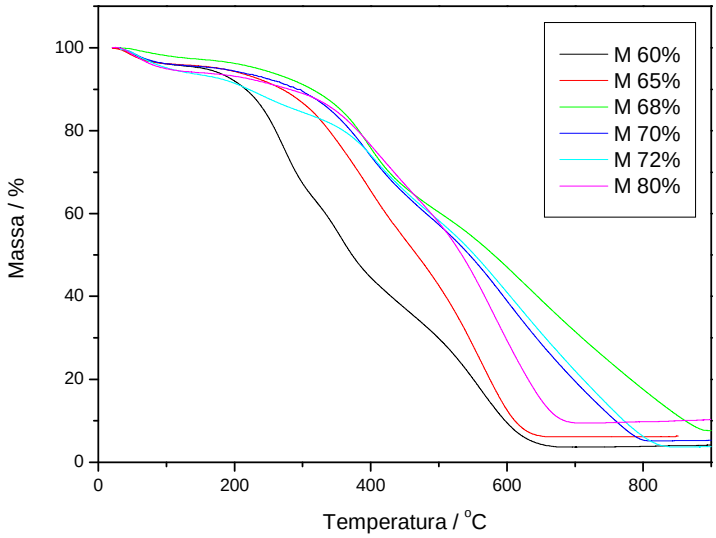


Figura 27. Análise termogravimétrica de ligninas obtidas com ácido sulfúrico nas concentrações de (—) 60%,(—) 65%, (—) 68%, (—) 70%, (—) 72%, (—) 80%, da fração medula do bagaço em atmosfera de N_2.

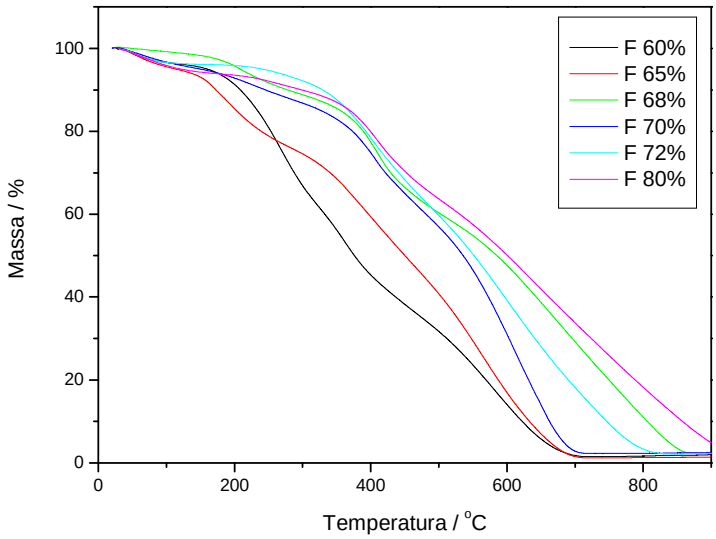


Figura 28. Análise termogravimétrica de ligninas obtidas com ácido sulfúrico nas concentrações de (—) 60%,(—) 65%, (—) 68%, (—) 70%, (—) 72%, (—) 80%, da fração fibra do bagaço em atmosfera de N_2.

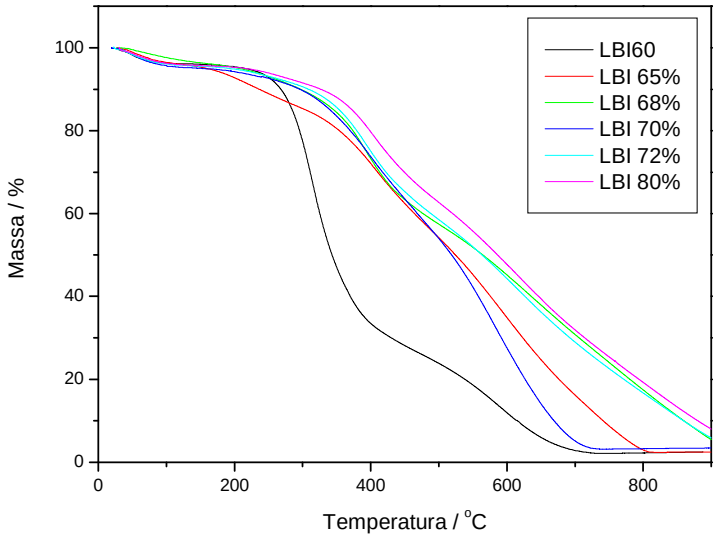


Figura 29. Análise termogravimétrica de ligninas obtidas com ácido sulfúrico nas concentrações de (—) 60%,(—) 65%, (—) 68%, (—) 70%, (—) 72%, (—) 80% do bagaço integral em atmosfera de N_2.

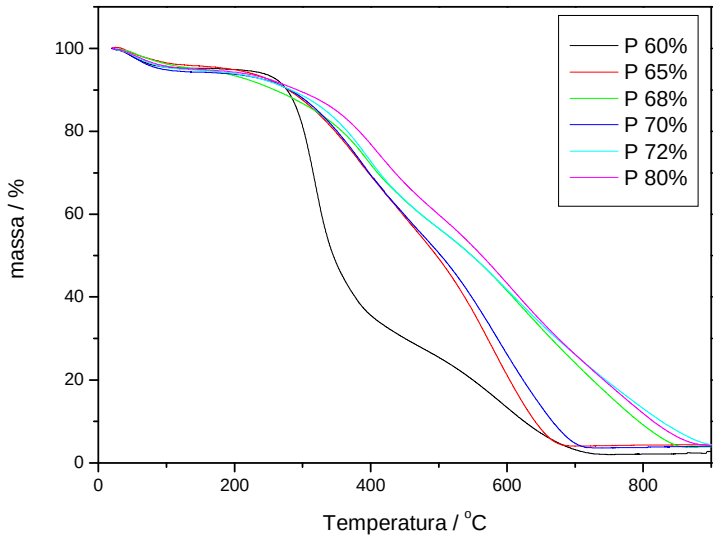


Figura 30. Análise termogravimétrica de ligninas obtidas com ácido sulfúrico nas concentrações de (—) 60%,(—) 65%, (—) 68%, (—) 70%, (—) 72%, (—) 80% da palha de cana-de-açúcar em atmosfera de N_2.

Nas curvas de TGA do bagaço, suas frações e da palha (Figura 31) podem ser observados três estágios de decomposição térmica. A primeira perda de massa aparece em temperatura menor que 100 ℃, devido à evaporação de água e de outras substâncias de baixa massa molar. A segunda perda de massa em 200 ℃ corresponde à decomposição da celulose e hemicelulose em produtos voláteis, e ao inicio da reação de pirólise da lignina. Essa perda de massa prossegue até 350℃, onde a amo stra é reduzida em quase 70% da massa inicial. A terceira perda de massa ocorre acima de 350ºC e corresponde a processos de degradação da lignina atribuídos à ruptura de ligações interunidades o que resulta na perda de fenóis monoméricos para a fase vapor.

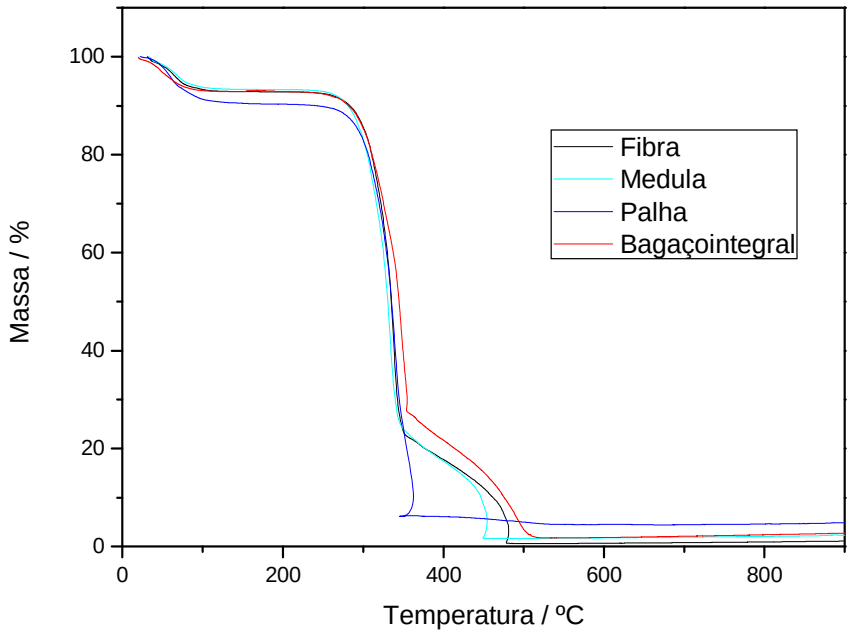


Figura 31. Análise termogravimétrica da fibra, medula, palha e do bagaço integral em atmosfera de N_2.

4.5.3- ANÁLISE DE UV-VISÍVEL

A análise UV foi empregada neste trabalho para a análise da lignina solúvel, com o objetivo de sua determinação quantitativa para a determinação do teor de lignina total.

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis) é uma técnica muito utilizada para caracterização de mudanças na estrutura e propriedades da lignina, que absorve fortemente na região do ultravioleta devido ao seu caráter aromático. É utilizada tanto para análises quantitativas quanto qualitativas de ligninas em solução. A localização e intensidade do máximo de absorção dependem do tipo de lignina, das modificações químicas ocorridas durante os processos de isolamento e do solvente utilizado nas medidas fotométricas.

Embora existam algumas diferenças nos espectros de UV de diferentes ligninas, um espectro típico de lignina apresenta geralmente um máximo de absorção em torno de 280 nm com um ombro na região de 230 nm característico de grupos fenólicos não condensados presentes na estrutura da lignina, e um segundo máximo na faixa entre 200 e 215 nm. Para ligninas de madeira mole (softwood), os espectros consistem de um máximo em 280 nm e para ligninas de madeira dura (hardwood) um máximo entre 275 e 277 nm [FENGEL; WEGENER, 1984]. Esses máximos de absorção podem sofrer pequenos deslocamentos devidos a um aumento no número de conjugações das ligninas durante o processo de isolamento.

A absorção da amostras de lignina em 280 nm pode ser fortemente influenciada pela presença de produtos de degradação dos polissacarídeos, como furfural e hidroximetilfurfural, que também possuem o máximo de absorção nesse comprimento de onda.

Para as ligninas obtidas das amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar os máximos de absorção estão entre 275 e 277 nm, e não foi observada a banda em 200-215 nm, nesse caso, nota-se apenas a presença de um ombro nessa região, como pode ser observado na Figura 32.

As quantidades de lignina solúvel foram calculadas segundo a equação 2, descrita na introdução desta dissertação. Os valores de absorção em 215 e 280 nm e os respectivos teores de lignina solúvel são apresentados na Tabela 20.

$$C(g/L) = \frac{(4{,}53\, x\, A_{215}) - A_{280}}{300} \qquad (2)$$

Os teores de lignina solúvel obtidos para o bagaço e as frações (medula e fibra) diminuem com o aumento da concentração de ácido, exceto para as frações fibra e medula onde na concentração de ácido de 65% se observam valores maiores de lignina solúvel. A tendência observada na diminuição dos teores de lignina solúvel com o aumento da concentração de ácido pode ser justificada, pois em concentrações de ácido sulfúrico maiores as reações de condensação da lignina ocorrer em maior extensão. Para a palha observa-se um comportamento semelhante, contudo o maior valor de lignina solúvel foi obtido em ácido na concentração de 60%.

Para as ligninas obtidas das amostras de *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis* em meio ácido os máximos de absorção estão em 280 e 277 nm, respectivamente, e um segundo máximo em 200 nm para *Eucalyptus Grandis* e entre 193 e 208 nm para *Pinus Taeda*, como pode ser observado na Figura 33. Os valores de absorção em 215 e 280 e os respectivos teores de lignina solúvel são apresentados na Tabela 21.

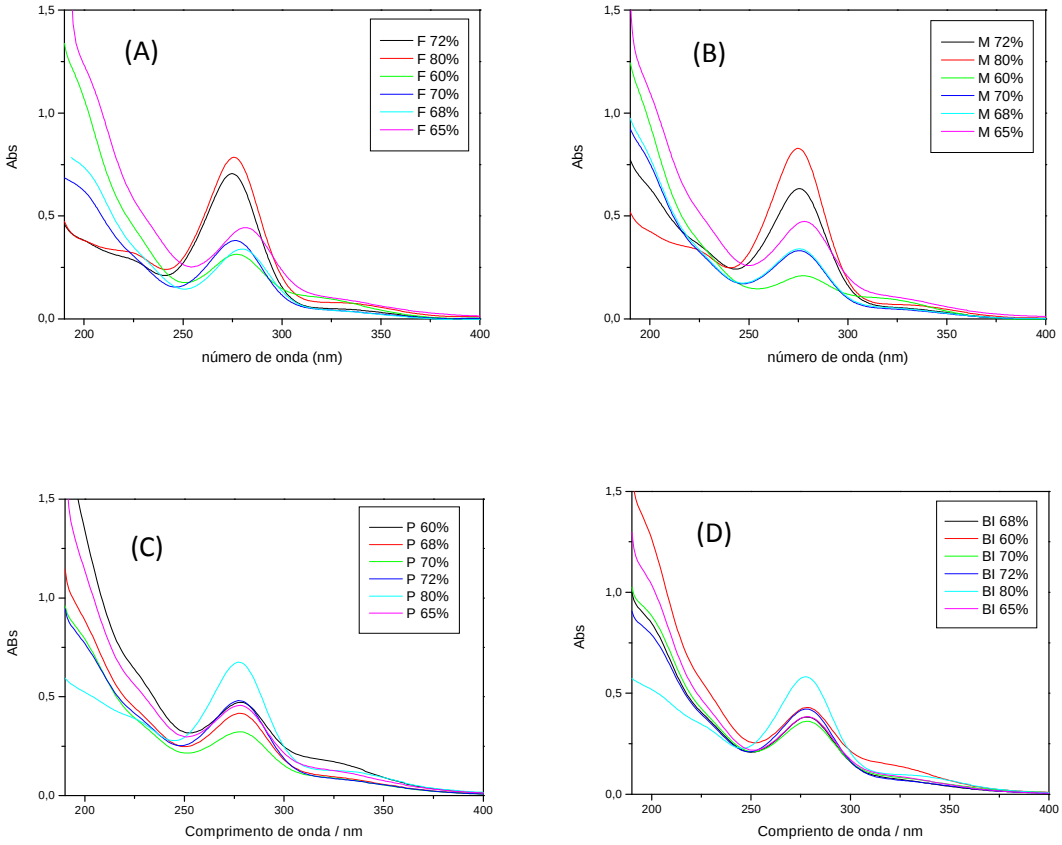


Figura 32. Espectro de UV-vis das ligninas obtidas nas diferentes concentrações de ácido. (A) Fibra, (B) medula, (C) Palha e (D) Bagaço Integral.

Tabela 20. Valores de absorção das ligninas em meio ácido.

H_2SO_4 (%)	FIBRA				MEDULA			
	Abs 280	**Abs 215**	**% lignina Solúvel**	**Desvio Padrão**	**Abs 280**	**Abs 215**	**% lignina Solúvel**	**Desvio Padrão**
60 %	0,25	0,60	**1,84**	±0,10	0,26	0,55	**1,65**	±0,08
65 %	0,42	0,72	**2,46**	±0,02	0,43	0,70	**2,38**	±0,10
68 %	0,35	0,43	**1,43**	±0,05	0,26	0,44	**1,62**	±0,02
70 %	0,34	0,40	**1,39**	±0,01	0,34	0,43	**1,55**	±0,09
72 %	0,58	0,31	**0,78**	±0,06	0,57	0,45	**1,39**	±0,10
80 %	0,77	0,33	**0,85**	±0,07	0,72	0,35	**1,04**	±0,04
H_2SO_4 (%)	PALHA				BAGAÇO INTEGRAL			
	Abs 280	**Abs 215**	**% lignina Solúvel**	**Desvio Padrão**	**Abs 280**	**Abs 215**	**% lignina Solúvel**	**Desvio Padrão**
60 %	0,47	0,79	**2,43**	±0,20	0,40	0,75	**2,23**	±0,05
65 %	0,49	0,70	**2,29**	±0,26	0,38	0,65	**2,19**	±0,05
68 %	0,40	0,60	**1,98**	±0,01	0,40	0,48	**1,89**	±0,03
70 %	0,36	0,54	**1,95**	±0,06	0,39	0,56	**2,10**	±0,02
72 %	0,47	0,53	**1,87**	±0,05	0,42	0,53	**1,88**	±0,02
80 %	0,69	0,42	**1,40**	±0,12	0,70	0,41	**1,37**	±0,12

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

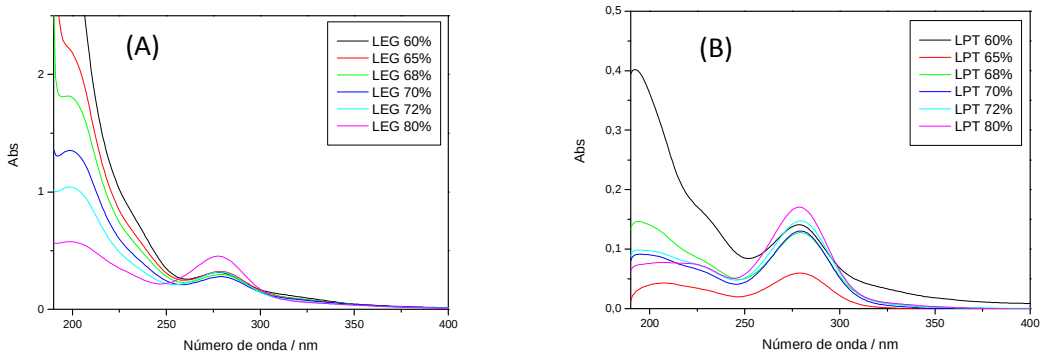


Figura 33. Espectro de UV-vis das ligninas das amostras de madeira obtidas nas diferentes concentrações de ácido. (A) *Eucalyptus Grandis* e (B) *Pinus Taeda.*

Tabela 21 . Valores de absorção das ligninas das madeiras de *Pinus Taeda* e *Eucalyptus Grandis* em meio ácido.

H_2SO_4 (%)	*Pinus Taeda*				*Eucalyptus Grandis*			
	Abs 280	**Abs 215**	**% lignina Solúvel**	**Desvio Padrão**	**Abs 280**	**Abs 215**	**% lignina Solúvel**	**Desvio Padrão**
60 %	0,14	0,22	**0,64**	±0,03	0,32	1,57	**5,07**	±0,04
65%	0,11	0,10	**0,30**	±0,01	0,32	1,28	**4,90**	±0,13
68%	0,14	0,11	**0,33**	±0,06	0,30	1,10	**4,30**	±0,10
70%	0,13	0,07	**0,20**	±0,02	0,29	0,91	**3,60**	±0,02
72%	0,15	0,08	**0,22**	±0,01	0,31	0,74	**2,91**	±0,08
80%	0,17	0,08	**0,23**	±0,04	0,48	0,45	**1,86**	±0,02

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

Observam-se também, que o bagaço, suas frações e a palha apresentam valores de lignina solúvel intermediários entre os valores obtidos para as diferentes madeiras (*Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis)*. Isso é uma evidência de que a estrutura macromolecular da lignina do bagaço e da palha difere da madeira e confirmam a necessidade de estudos específicos para lignina desses materiais. A questão de como as unidades C_9 estão interligadas, na estrutura macromolecular da lignina é de importância fundamental porque explica não somente as propriedades físicas e químicas da lignina, mas também fornece o conhecimento básico, de como a lignina pode ser utilizada ou degradada a compostos de baixa massa molar de interesse tecnológico ou de como sua estrutura pode ser alterada de tal forma a obter um produto com propriedades desejadas.

A partir dos resultados obtidos de lignina solúvel e considerando o teor de cinzas e de lignina insolúvel (resíduo), foi possível calcular a quantidade de

lignina total encontrada nas amostras de bagaço, suas frações (medula e fibra) e de palha de cana-de-açúcar. Os valores obtidos são apresentados nas tabelas 22-25.

Tabela 22. Valores de lignina total (solúvel + insolúvel) obtidos para a fração fibra do bagaço.

Concentração H_2SO_4 (%)	Lignina Insolúvel (%)	Lignina Solúvel (%)	Cinzas (%)	Lignina Total (%)	Desvio Padrão
60	60,88	1,84	0,34	**62,38**	±0,42
65	19,80	2,46	0,34	**21,92**	±0,20
68	19,68	1,43	0,34	**20,77**	±0,37
70	20,09	1,39	0,34	**21,14**	±0,43
72	22,26	0,78	0,34	**22,69**	±0,08
80	24,56	0,85	0,34	**25,07**	±0,90

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

Tabela 23. Valores de lignina total (solúvel + insolúvel) obtidos para a fração medula do bagaço

Concentração H_2SO_4 (%)	Lignina Insolúvel (%)	Lignina Solúvel (%)	Cinzas (%)	Lignina Total (%)	Desvio Padrão
60	56,59	1,65	2,48	**55,76**	±0,67
65	20,19	2,38	2,49	**20,08**	±0,92
68	18,84	1,62	2,48	**17,98**	±0,61
70	19,15	1,55	2,48	**18,22**	±0,45
72	20,53	1,39	2,48	**19,44**	±0,59
80	24,04	1,04	2,48	**22,59**	±1,05

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

Tabela 24. Valores de lignina total (solúvel + insolúvel) obtidos para a palha

Concentração H_2SO_4 (%)	Lignina Insolúvel (%)	Lignina Solúvel (%)	Cinzas (%)	Lignina Total (%)	Desvio Padrão
60	61,14	2,43	4,97	**58,6**	±0,22
65	21,60	2,29	4,97	**18,92**	±0,36
68	22,36	1,98	4,97	**19,37**	±0,62
70	22,67	1,95	4,97	**19,65**	±0,25
72	22,88	1,87	4,97	**19,78**	±0,50
80	28,32	1,40	4,97	**24,75**	±0,67

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

Tabela 25. Valores de lignina total (solúvel + insolúvel) obtidos para o bagaço integral

Concentração H_2SO_4 (%)	Lignina Insolúvel (%)	Lignina Solúvel (%)	Cinzas (%)	Lignina Total (%)	Desvio Padrão
60	63,25	2,23	0,93	**64,55**	±0,27
65	19,37	2,19	0,93	**20,63**	±0,05
68	19,94	1,89	0,93	**20,90**	±0,04
70	19,61	2,10	0,93	**20,78**	±0,27
72	19,76	1,88	0,93	**20,70**	±0,07
80	23,44	1,37	0,93	**23,88**	±0,38

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

Os valores de lignina total para o bagaço apresentaram valores próximos aos obtidos para fibra, da mesma forma que a lignina insolúvel. E a faixa de concentrações de ácido que fornecem um valor de mínimo para lignina continua entre 65 a 72% (Figura 34).

Foram também calculados os valores de lignina total para as amostras de madeira de *Eucaliptus* e *Pinus,* e os resultados são apresentados nas Tabelas 26 e 27.

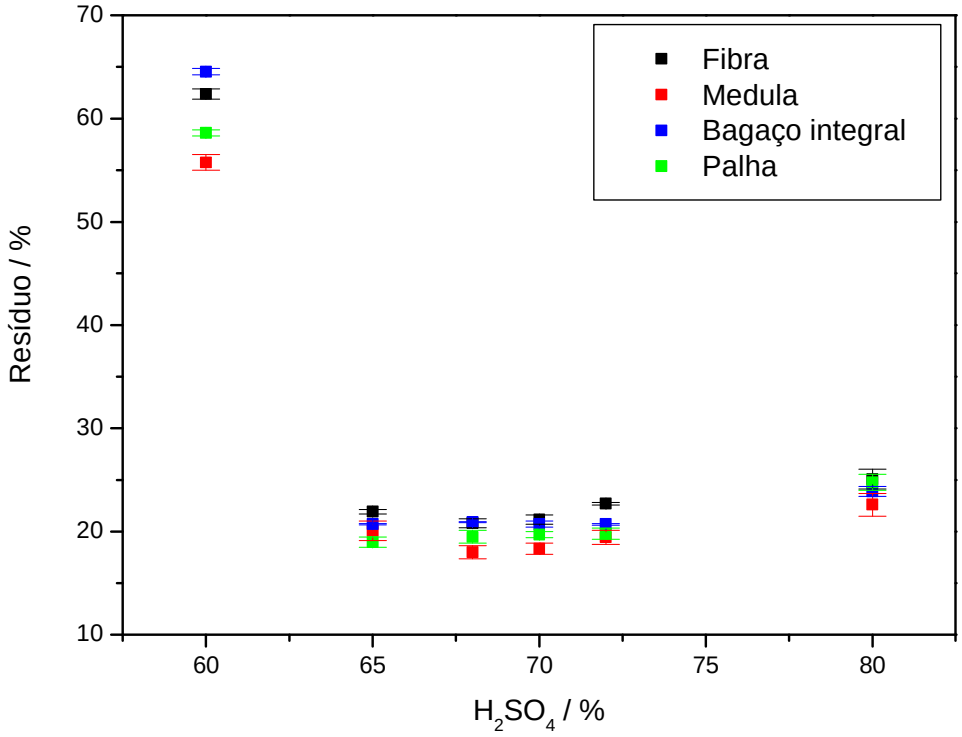


Figura 34. Gráfico do teor de lignina total (solúvel + insolúvel) para as amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar, em função da concentração de ácido sulfúrico.

Tabela 26. Valores de lignina insolúvel obtidos para a madeira de *Eucaliptus*

Concentração H_2SO_4 (%)	Lignina Insolúvel (%)	Lignina Solúvel (%)	Cinzas (%)	Lignina Total (%)	Desvio Padrão
60	73,21	5,07	0,4	77,88	±0,33
65	26,64	4,90	0,4	31,14	±0,41
68	25,56	4,30	0,4	29,46	±0,12
70	25,90	3,60	0,4	29,10	±0,43
72	27,39	2,91	0,4	29,90	±0,85
80	29,84	1,86	0,4	31,30	±0,43

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

Tabela 27. Valores de lignina insolúvel obtidos para a madeira de *Pinus*

Concentração H_2SO_4 (%)	Lignina Insolúvel (%)	Lignina Solúvel (%)	Cinzas (%)	Lignina Total (%)	Desvio Padrão
60	75,08	0,64	0,3	75,42	±0,52
65	30,04	0,24	0,3	29,98	±0,45
68	30,49	0,33	0,3	30,52	±0,27
70	30,10	0,21	0,3	30,01	±0,26
72	29,89	0,22	0,3	29,81	±0,09
80	30,69	0,23	0,3	30,62	±0,06

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

As concentrações de ácido que proporcionaram os menores teores de lignina são 68% para a madeira de *Eucaliptus* e 72% para a madeira de *Pinus* (Figura 35). Os valores mostraram que a concentração de ácido utilizada na norma é adequada apenas para *Pinus*, e a diferença pode alcançar até um ponto percentual para *Eucaliptus*.

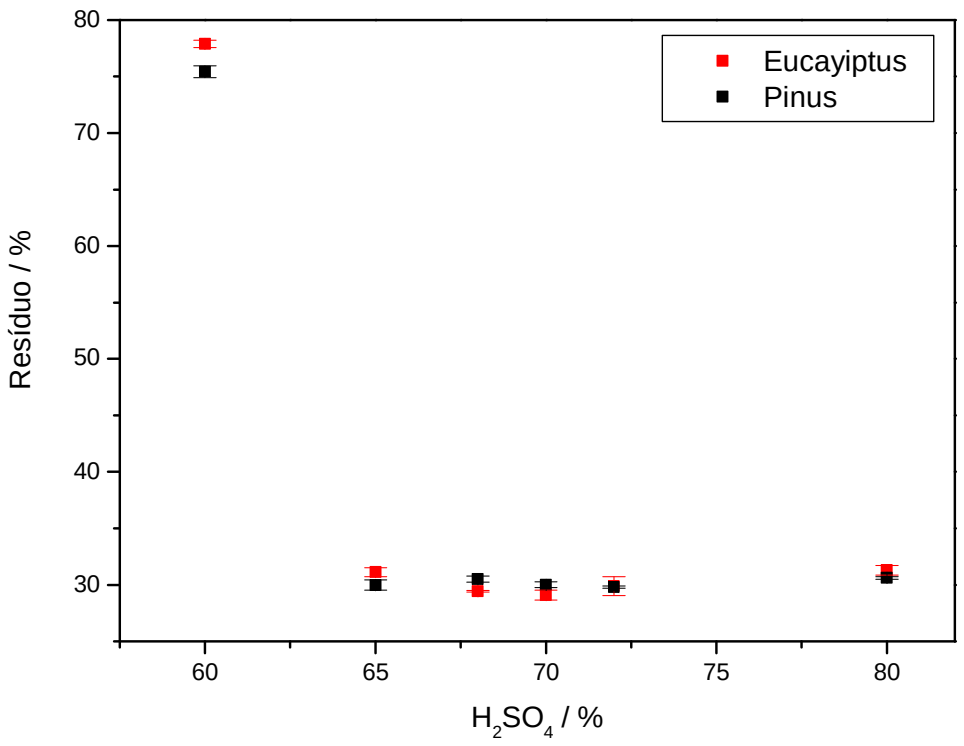


Figura 35. Gráfico do teor de lignina total (solúvel + insolúvel) em função da concentração de ácido sulfúrico para amostras de madeiras.

4.5.4- ANÁLISE DE ^{13}C RMN.

A espectroscopia de RMN ^{13}C é um método muito eficiente para os estudos estruturais das macromoléculas, sendo uma técnica bastante utilizada para análise de ligninas. Neste caso foi empregada com a finalidade de verificar a ocorrência de modificações estruturais, determinação de teores de metoxila e ainda, verificar a presença de sinais devidos a carboidratos.

Um espectro de RMN ^{13}C pode ser subdividido em três regiões principais: uma primeira região delimitada em cerca de 200 a 165 ppm, cobrindo os átomo de carbono dos grupos carbonila; a segunda região que é delimitada de 165 a 100 ppm relativa aos átomos de carbono aromáticos e olefínicos; e uma terceira região, que se estende de 100 a 20 ppm, relativa aos átomos de carbonos alifáticos (α, β, γ e metoxila).

A Figura 36 mostra os espectros de CP/MAS ^{13}C NMR das ligninas obtidas para fração fibra do bagaço e para lignina obtida pelo método Pepper, utilizado como padrão.

O espectro de ^{13}C NMR da amostra de lignina insolúvel de fibra obtida com ácido na concentração de 65% foi obtido em um equipamento Varian Inova 400MHz para hidrogênio e 100,5 MHz para Carbono. Os demais espectros foram realizados em um equipamento Discovery da marca Tecmag Inc. 85 MHz para o hidrogênio, e 20,1 MHz para carbono.

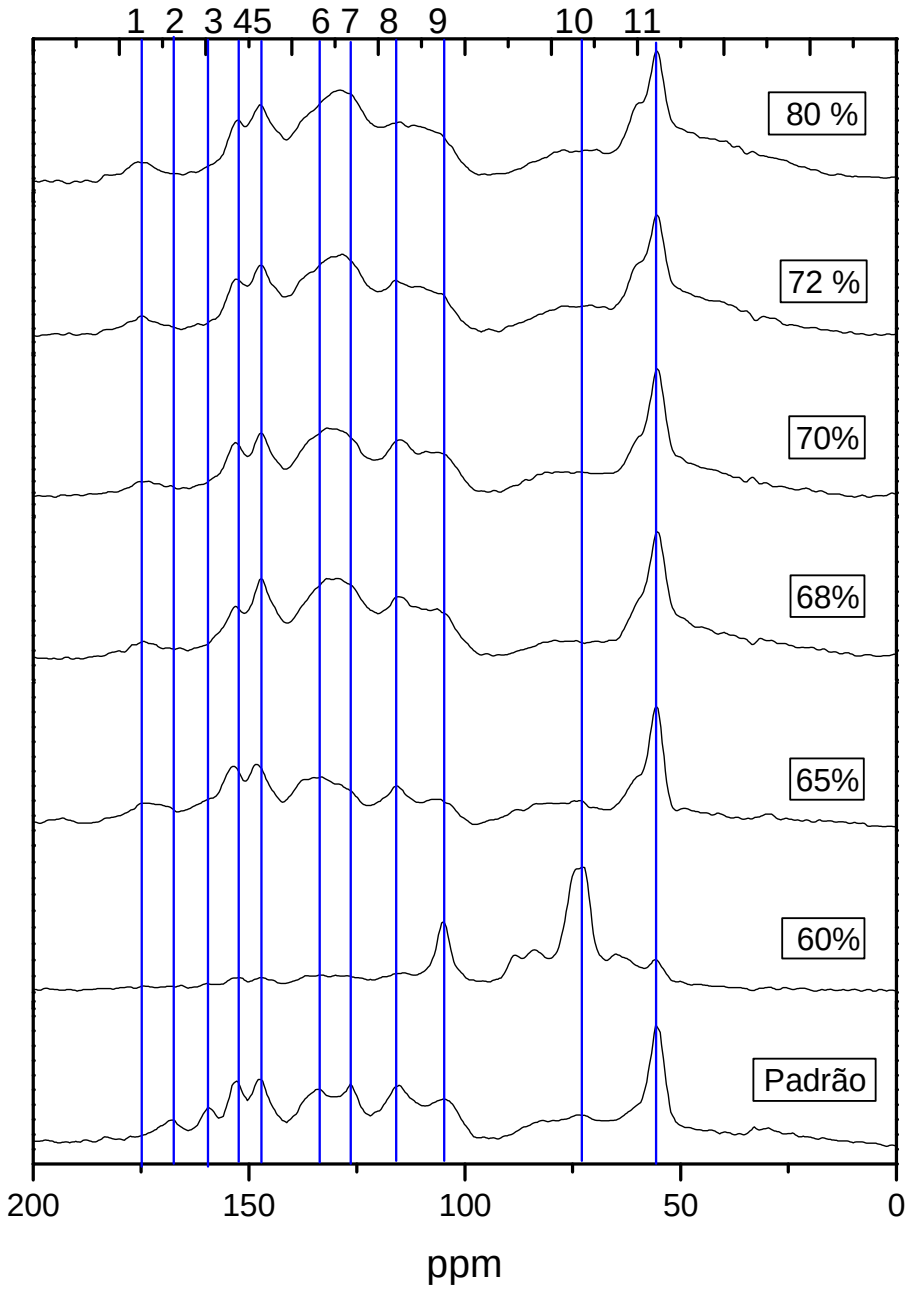


Figura 36. Análise de RMN das ligninas insolúveis obtidas com diferentes concentrações de ácido e Lignina Pepper.

Comparando os espectros apresentados na Figura 36, pode-se perceber que as ligninas residuais obtidas nas concentrações de ácido de 65 – 80% apresentam espectros coincidentes, com pequenas variações nas intensidades dos picos. Podemos observar uma diferença nas intensidades dos picos 4 e 5, que correspondem as unidades siringila (S) e guaiacila (G), respectivamente (Tabela 28). [LIN; DENCE, 1992]. A amostra padrão obtida pelo método Pepper possui quantidades quase iguais de unidades S e G, e as amostras de lignina da fibra obtidas com ácido nas concentrações de 65, 68, 70, 72 e 80% apresentam um aumento de intensidade do pico 5 em relação ao pico 4, com o aumento da concentração de ácido, indicando a presença de maiores quantidades de unidades guaiacila em relação as unidades siringila.

Podemos observar também uma redução no sinal da região de 115 ppm (pico 8) com o aumento da concentração do ácido utilizado. Esse pico é relativo às unidades de ácido p-cumárico que se encontram na lignina, ligados na região de interface com carboidratos, por meio de ligações tipo éster. Sendo assim, podemos verificar que, com o aumento da concentração de ácido, uma maior quantidade de polissacarídeos está sendo hidrolisada. Podemos observar também, a presença do pico 1 nas amostras de lignina com ácido na concentração de 65 - 80%, indicando possíveis oxidações de unidades alcoólicas para aldeídos.

No espectro da lignina obtida com ácido 60% observa-se na região relativa aos carbonos alifáticos (72 – 106 ppm), em particular no sinal número 10 (73,43 ppm), sinais bastante intensos, indicando a presença de polissacarídeos nas amostras.

Tabela 28. Tabela com os valores de picos de ^{13}C RMN atribuídos a lignina da fibra obtidos neste trabalho e picos atribuídos a lignina de bagaço moído (MBL).

Sinal N°	Sinal Lignina Fibra	Sinal MBL	Atribuições	Referências
1	175,3	175,0	-COOH em alifático	Kringstad *et al*. 1983
2	167,9	167,5	αC=O em ArCOOH; ésteres de AC	Lin e Dence 1992; Nimz *et al*. 1981
3	159,5	160,5	C-4 ésteres de AC	Nimz *et al*. 1981
4	153,2	153,6	C-3/C-5 Se	Nimz *et al*. 1981
5	147,2	147,4	C-4 em Ge	LIN e Dence
6	133,8	133,3	C-1 S, G, H	Ludemann *et al*. 1974
7	126,4	126,4	C-1 ésteres AC	Ludemann *et al*. 1974
8	115,0	115,1	C-β ésteres AC	Ludemann *et al*. 1974
9	104,8	105,0	C-2/C-6 Se, S	Ludemann *et al*. 1974
10	73,4	73,3	αC em β-O-4 e $C_{2,3,5}$ de celulose	Ludemann *et al*. 1974
11	55,6	56,4	$-OCH_3$	Ludemann *et al*. 1974

* Abreviações: AC=ácido p-cumarílico; Se=unidades seringila eterificada; S= unidades siringila; G= unidades guaiacila; H=unidades p-hidroxifenila.

Em cerca de 56 ppm aparece um sinal bastante intenso, relativo ao sinal de metoxila presentes nas ligninas. A determinação da quantidade de metoxilas é uma análise muito importante para classificação das ligninas em guaiacila (G), guaiacila-siringila (GS) e guaiacila-siringila-hidroxifenila (GSH). O que diferenciam as unidades guaiacila, siringila e hidroxifenila é a presença de

metoxilas nas posições 3 e 5 do anel aromático (Figura 15). Sendo assim, a determinação de metoxilas fornece a o número de metoxilas por unidade C_9, conseqüentemente, podemos classificar as ligninas em G, GS e GSH.

As áreas da região devida às metoxilas foram determinadas e expressas em valores relativos às áreas referentes às regiões alifáticas e aromáticas, e os resultados são apresentados na Tabela 29. Os valores da última coluna expressam o número de C alifáticos por unidade C_9 incluindo a metoxila.

Tabela 29. Teor de metoxilas determinados por RMN ^{13}C para as ligninas insolúveis, da fração fibra, obtidas no tratamento com ácido sulfúrico em diferentes concentrações.

Amostra	Área (%) (OCH_3)/ carbonos alifáticos	Área (%) (OCH_3)/anel aromático	Nº de metoxilas por anel aromático	Nº de carbonos alifáticos por unidade C_9
Padrão	23,2	17,4	1,0	4,3
60%	9,1	20,1	1,2	13,2
65%	18,4	15,9	0,9	4,9
68%	25,2	16,9	1,0	4,0
70%	25,4	16,3	1,0	3,9
72%	22,8	16,1	1,0	4,4
80%	24,1	16,5	1,0	4,1

Com os valores de metoxilas obtidos pela análise de RMN ^{13}C, e o emprego das análises de composição elementar, são possíveis estimar as unidades fenilpropânicas C_9 das ligninas (Tabela 30). Neste procedimento, os componentes, oxigênio, hidrogênio e teor de metoxilas, são quantificados em

relação a nove átomos de carbono. Sendo assim, para complementar os estudos das ligninas obtidas no presente trabalho, as análises da composição elementar das ligninas foram utilizadas nos cálculos para a determinação da fórmula C_9 da fração fibra do bagaço.

Tabela 30. Determinação das unidades C_9 para as ligninas insolúveis, da fração fibra, obtidas no tratamento com ácido sulfúrico em diferentes concentrações.

Amostra	Fórmula C_9
Padrão	$C_9O_{2,9}H_{8,6}\ (OCH_3)_{1,0}$
60%	Não determinada
65%	$C_9O_{3,1}H_{8,6}\ (OCH_3)_{0,9}$
68%	$C_9O_{3,0}\ H_{9,1}\ (OCH_3)_{1,0}$
70%	$C_9O_{3,6}H_{8,9}\ (OCH_3)_{1,0}$
72%	$C_9O_{3,1}H_{8,7}\ (OCH_3)_{1,0}$
80%	$C_9O_{3,2}H_{8,6}\ (OCH_3)_{1,0}$

De acordo com os dados apresentados na Tabela 28, para as ligninas insolúveis obtidas da fibra, não há grande variação para os teores de metoxilas quando comparadas entre as diferentes amostras e a lignina padrão. Para a amostra de lignina obtida com ácido 60% não foi determinada a fórmula C_9, pois esta apresenta uma maior quantidade de carbonos alifáticos (polissacarídeos condensados) por unidade C_9.

Outra forma de apresentar as fórmulas mínimas das ligninas é considerando-a como um derivado de seus precursores, álcool cumarílico, álcool sinapílico e álcool coniferílico, os quais possuem dois átomos de

oxigênio por molécula, excluindo o oxigênio das metoxilas. Assim o conteúdo de oxigênio das ligninas superior a dois átomos por molécula, excluindo o oxigênio das metoxilas, pode ser expresso como moléculas de água adicionadas. Essa água adicionada é encontrada na lignina na forma de hidroxilas e pode ter três origens diferentes.

i) água adicionada na biossíntese da lignina;

ii) água adicionada na clivagem de ligações éter de lignina;

iii) umidade da amostra.

As ligninas obtidas apresentaram valores de oxigênio superior a dois átomos, os quais podem ser devidos á água adicionada durante a biossíntese ou por clivagem de ligações éter, uma vez que as ligninas foram secas antes das análises.

Com relação ao conteúdo de hidrogênios das ligninas obtidas observa-se que estas apresentam um conteúdo de hidrogênios menor quando comparadas aos precursores que apresentam de 8 a 10 átomos de hidrogênio (não considerando as metoxilas). A menor quantidade de hidrogênios é devido a polimerização dehidrogenativa associada à própria biossintese da lignina e pode também estar indicando que estas ligninas obtidas estão em um estado mais oxidado.

Foi realizada uma medida de RMN ^{13}C em solução da lignina padrão para comparação com a de RMN ^{13}C de sólido. A integração da região aromática com relação à região de metoxilas apresentou resultado bastante coerente com o obtido pelo RMN ^{13}C de sólido, de 0,938 ppm para RMN ^{13}C em solução e 1,0 em RMN ^{13}C de sólido, como pode ser observado na Figura 37.

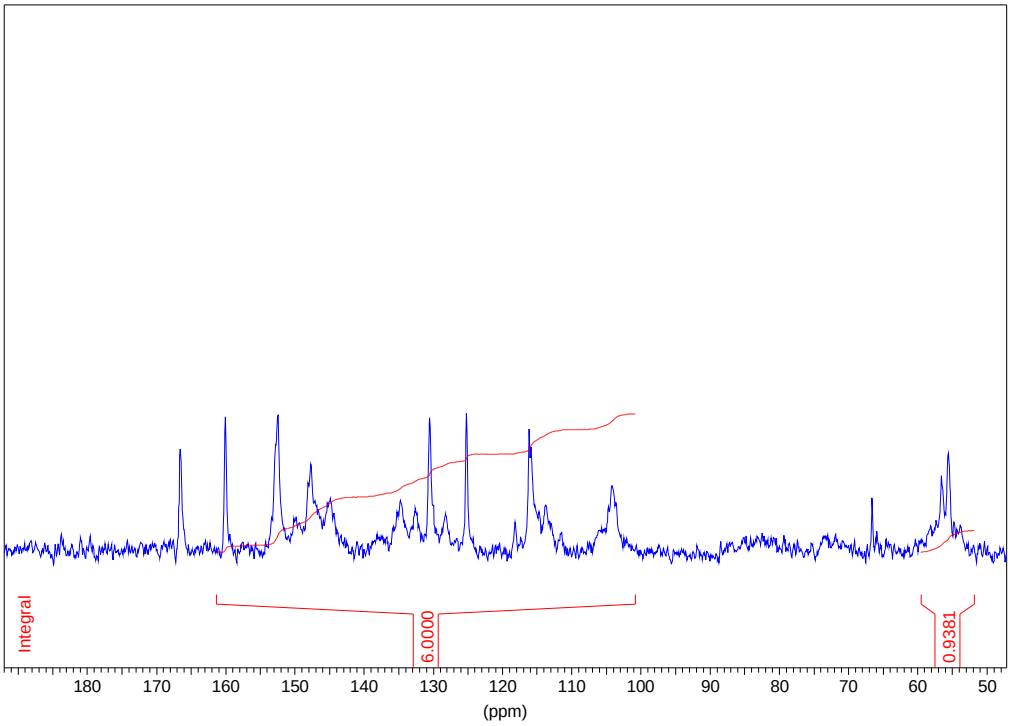


Figura 37. Análise de RMN ^{13}C da lignina da fração fibra do bagaço de cana-de-açúcar obtida pelo método Pepper, em solução de DMSO.

4.5.5- ANÁLISE DE INFRAVERMELHO

A espectroscopia na região do infravermelho (4000 a 400 cm^{-1}) é uma técnica diretamente aplicada em análises de celulose, lignina e outros polissacarídeos. A porção de maior utilidade para o estudo de lignina situa-se entre 4000 e 700 $cm^{-1.}$. Esta técnica pode ser usada como ferramenta para compreender a estrutura de ligninas isoladas, e para dar informação sobre grupos químicos, removidos e/o adicionados durante os processos de

isolamento. A literatura também mostra trabalhos feitos no IV próximo, no intervalo 700 - 4000cm^{-1} (1,42 - 2,5□m). (SARKANEN, LAI, 1971).

O espectro no IV é característico da substância como um todo, mas certos grupos funcionais dão origem a bandas específicas, independentemente da estrutura da molécula. É justamente a presença dessas bandas características de ligações de determinados grupos que permite a obtenção, mediante simples exame do espectro e consulta a tabelas, de informações estruturais úteis (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979). A caracterização de picos de absorção no IV se faz principalmente de modo qualitativo, por comparação com dados tabelados. Entretanto, alguns estudos têm sido desenvolvidos a fim de avaliar quantitativamente alguns picos de absorção observados (TAI ***et al***., 1990; MORAIS ***et al.,*** 1994; SALIBA ***et al***., 1998).

Dentre as absorções mais freqüentes em ligninas, os estiramentos O−H, C−H, e C=O aparecem na região acima de 1600 cm^{-1} e a as bandas vibracionais do anel aromático por volta de 1510 cm^{-1}. A atribuição das bandas abaixo destes valores é mais difícil, sobretudo, nos espectros de moléculas complexas, como as ligninas, com atribuições de vários modos de vibração [LIN; DENCE, 1992]. As diferenças espectrais em ligninas são principalmente o resultado da variação nas razões entre as quantidades de grupos H (hidroxifenila), G (Guaiacila) e S (Siringila).

Uma discussão quanto à classificação do tipo de lignina é apresentada por Lin e Dence, onde os espectros de absorção no infravermelho são comparados e classificados em função do padrão guaiacila (G), guaiacila-siringila (GS) e hidroxifenila-guaiacila-siringila (HGS). As principais bandas

utilizadas para comparação são localizadas em 1600 cm^{-1}, 1510 cm^{-1}e 1460 cm^{-1}.

As diferentes relações entre as intensidades das bandas em 1510 e 1600 cm -1 podem ser utilizadas para diferenciar as ligninas de coníferas (alto teor de grupos guaiacila) das de folhosas (teor de siringila maior que na conífera) [SARKANEN; LAI, 1971]. Se a intensidade da banda em 1510 cm^{-1} for maior do que a de 1600 cm $^{-1}$ a lignina é característica de conífera.

Comparando-se as bandas em 1600 cm^{-1}e 1510 cm^{-1}, podemos verificar que a banda em 1600 cm^{-1} é maior que a banda em 1510 cm^{-1}, indicando que as ligninas possuem maiores quantidades de unidades siringila. As intensidades dessas bandas podem ser influenciadas pela presença de grupos C=O, íons carboxilato e carboidratos. Esses compostos tendem a aumentar a intensidade da banda de 1600 em relação à de 1510 cm^{-1}.

Comparando-se agora as bandas 1510 cm^{-1} e 1460 cm^{-1}, verificamos que as ligninas apresentaram a banda 1510 cm^{-1} mais intensa, e se enquadram dentro dos padrões estabelecidos para lignina do tipo GSH, que correspondem às ligninas de bagaço de cana-de-açúcar.

Fazendo uma comparação entre os espectros das ligninas obtidas das diferentes frações podemos observar também que, as bandas por volta de 1460 e 830 cm^{-1} são mais intensas na lignina Pepper, seguida do bagaço, medula e fibra. Como essas bandas são referentes a vibrações de anel aromático e C-H aromático, quanto mais substituídos os anéis menores são as intensidades das vibrações. Essa observação já era esperada uma vez que o tratamento ácido leva a estruturas mais condensadas.

A Tabela 31 apresenta as bandas de absorção para as amostras de lignina obtidas experimentalmente da palha, do bagaço integral e suas frações (medula e fibra), e lignina padrão. As atribuições das bandas foram feitas de acordo com LIN e DENCE, e os espectros de infravermelho relativos às essas amostras são apresentados na Figura 38.

Tabela 31. Tabela com valores e atribuições dos picos característicos em ligninas.

Banda cm^{-1}				**Atribuições**
Lignina Pepper	**Lignina da Medula**	**Lignina da Fibra**	**Lignina da Palha**	
3410	3438	3432	3438	Estiramento O-H
2933 e 2842	2933 e 2842	2933 e 2842	2927 e 2848	Estiramento C-H em grupos metila e metileno
1706	1718	1718	1718	Estiramento C=O de cetonas e grupos éster (frequentemente originados de carboidratos); aldeídos e ácidos carboxílicos absorvem na região de 1700 cm^{-1}.
1639		1655		Estiramento C=O, em cetonas conjugadas p-substituídas e em aril-cetonas.
1602	1615	1609	1621	Vibração do anel aromático.
1514	1505	1505	1511	Vibração do anel aromático.
1461	1463	1463	1463	Deformação assimétrica C–H, em $–CH_3$ e $–CH_2–$.
1421	1426	1426	1421	Vibração do anel aromático combinado com deformação no plano de C-H.
1326	1336	1330	--------	Deformação C–O anel siringila e/ou anel guaiacila condensado.
----------	1226	1220	---------	Estiramento C–C e C–O.
1124	1116	1116	1105	Deformação C–H do anel aromático no plano (típico de unidades siringila)
833	831	831	813	Estiramento C–H fora do plano nas posições 2 e 6 de siringila, guaiacila, e em todas as posições da unidade hidroxifenila.

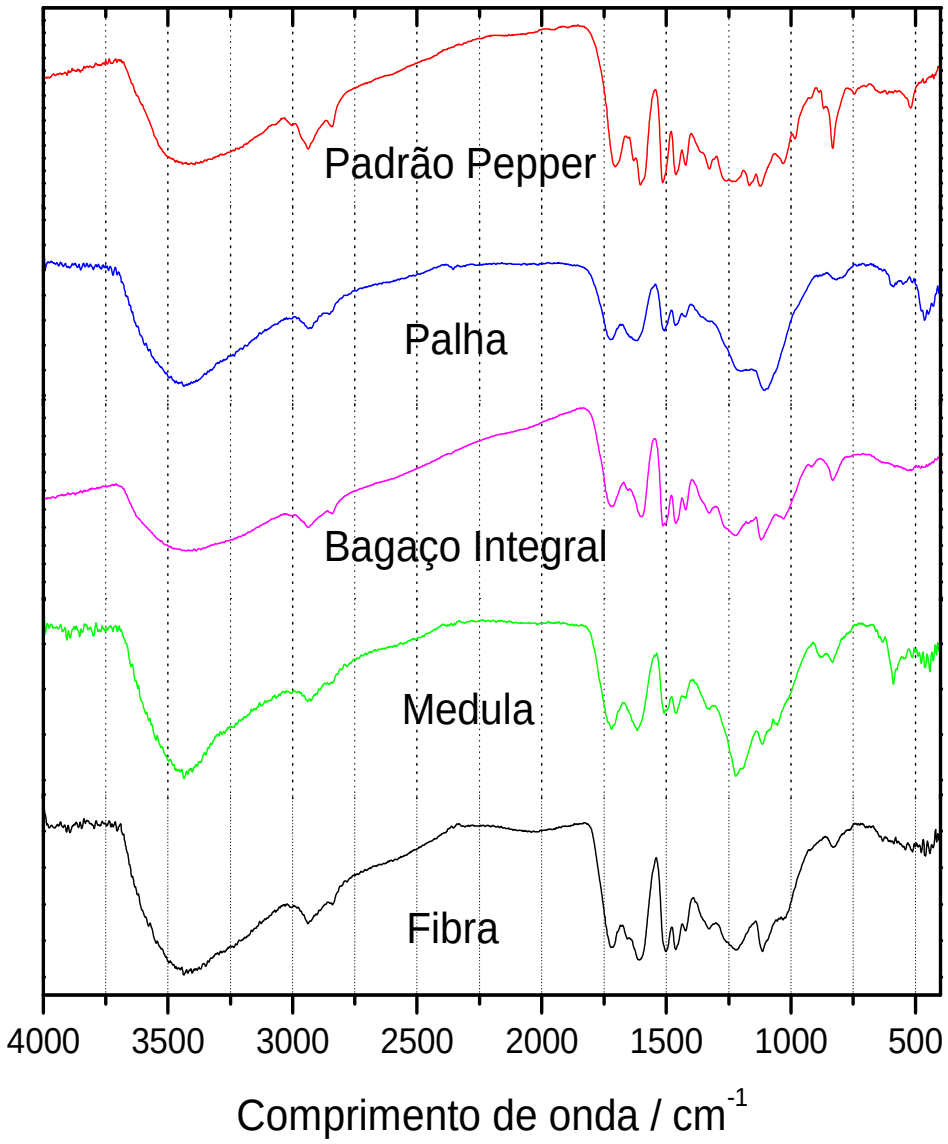


Figura 38. Espectros de infravermelho das ligninas obtidas da (—) Fibra, (—) Medula, (—) Bagaço integral, (—) Palha, (—) Pepper.

4.5.6. ANÁLISE DE MASSAS MOLARES POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC).

A massa molar e a distribuição de massas molares são parâmetros importantes no estudo da estrutura e propriedades da lignina. O principal método para se obter informações sobre a distribuição de massas molares é a cromatografia de permeação em gel. É importante ressaltar que embora a técnica de GPC seja bastante empregada para as análises no fracionamento de lignina, as informações por elas obtidas referem-se apenas ao volume molecular, não permitindo, portanto, nenhuma conclusão a respeito da composição química desta macromolécula.

O método consiste no princípio de exclusão por tamanho, onde as pequenas moléculas podem difundir por um caminho médio maior na coluna empacotada, eluindo mais lentamente. Se uma série de colunas com diferentes tamanhos de poros é utilizada, então o cromatograma obtido em função do tempo ou volume de eluição é característico da distribuição de massas molares do polímero em questão.

A partir da curva de distribuição de massas molares obteve-se a Massa Molecular Média em Número ($\bar{M}n$) e a Massa Molecular Média em Massa ($\bar{M}w$).

Calculou-se também, a partir destes valores, a polidispersividade para estas ligninas pela relação:

$$Polidispersividade = \frac{\bar{M}w}{\bar{M}n}$$

No entanto, para calcularmos os valores de $\bar{M}n$ e $\bar{M}w$ a partir de uma curva de distribuição de massas molares, é necessário a construção de uma curva de calibração com padrões de massa molecular definida e estrutura similar a estrutura da amostra. Em função disto, conhecendo-se a estrutura da lignina, conclui-se que os padrões mais adequados para construção dessa curva seriam os compostos modelos de lignina (dímeros, trímeros, tetrâmeros, etc.). Entretanto, esses modelos são disponíveis apenas para baixas massas molares, até aproximadamente 800 g/mol, correspondendo no máximo a quatro unidades fenilpropânicas. Logo, não seria possível construir uma curva de calibração para massas molares superiores a 800 g/mol. Em função disto, o poliestireno, um polímero de cadeia linear diferente da lignina que tem estrutura ramificada e maior polaridade devido à grande quantidade de grupos hidroxilas, passou a ser utilizado como padrão para a construção destas curvas.

A utilização de poliestireno como padrão apresenta algumas limitações por causa das diferenças estruturais entre a lignina e o poliestireno, como a lignina apresenta uma estrutura ramificada os fragmentos de lignina e poliestireno de mesma massa molecular possuem volumes de eluição diferentes.

A análise cromatográfica foi acompanhada por detectores de índice de refração e de ultravioleta. Os cromatogramas obtidos são apresentados nas figuras 39 e 40.

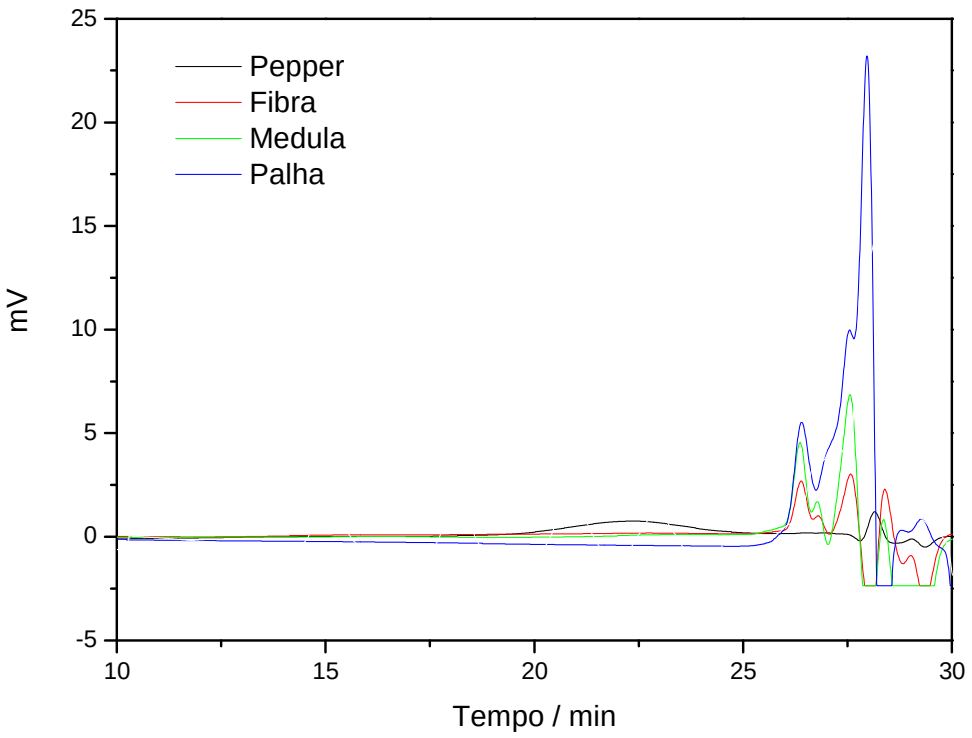


Figura 39. Cromatogramas de análise de GPC das ligninas obtidas com ácido 72%. Detector de Índice de Refração.

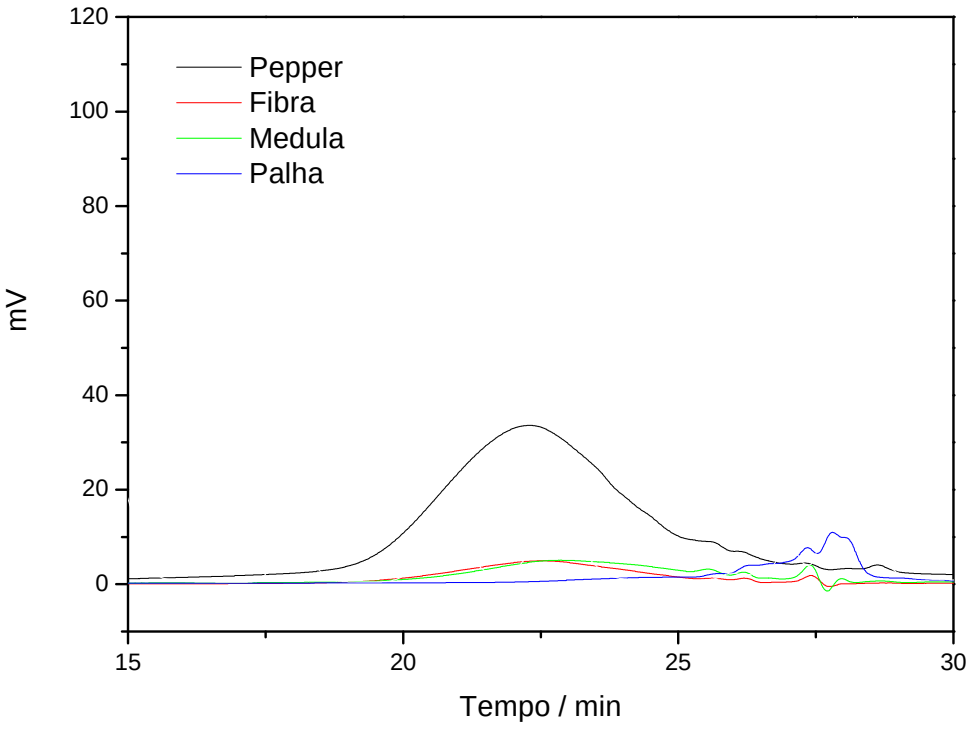


Figura 40. Cromatogramas de análise de GPC das ligninas obtidas com ácido 72%. Detector de UV -254 nm.

As intensidades relativas dos sinais nos cromatogramas é função da concentração das amostras e das características próprias do sistema de detecção. A análise apresentada a seguir deve ser considerada, lembrando que, para algumas amostras, a dissolução parcial das mesmas no solvente empregado para a eluição. Ainda, os valores obtidos representam apenas valores relativos aos padrões de poliestireno empregados na curva de calibração, devendo, portanto, serem analisados de forma comparativa e não absoluta.

As massas molares médias em massa e em número ($\bar{M}n$), assim como as polidisperssividades das ligninas foram obtidas pela cromatografia de permeação em gel e são mostradas nas Tabelas 32, 33 e 34.

Tabela 32. Valores de massas molares médias e polidispersividade das ligninas da fibra.

Amostras (FIBRA)	M_w	M_N	M_w/M_N
Padrão	5.476	1.313	4,17
60%	1384	516	2,68
65%	1696	652	2,60
68%	1686	889	1,90
70%	1948	964	2,02
72%	2591	1174	2,21
80%	1559	790	1,97

Tabela 33. Valores de massas molares médias e polidispersividade das ligninas da medula.

Amostras (MEDULA)	M_w	M_N	M_w/M_N
Padrão	5.476	1.313	4,17
60%	1944	1004	1,94
65%	1559	676	2,30
68%	1840	872	2,11
70%	2000	952	2,10
72%	1759	841	2,09
80%	1609	665	2,42

Tabela 34. Valores de massas molares médias e polidispersividade das ligninas da palha.

Amostras (PALHA)	M_w	M_N	M_w/M_N
60%	173	154	1,12
65%	259	180	1,44
68%	372	193	1,93
70%	368	193	1,90
72%	308	184	1,68
80%	342	188	1,82

A lignina obtida pelo método Pepper apresenta fragmentos com massas moleculares superiores ($\bar{M}w$) aos observados para as ligninas obtidas pelo método com ácido sulfúrico, além de produzir um número maior de fragmentos com massas molares diferentes, que é evidenciado pelo valor encontrado para polidespersão da lignina padrão de 4,17. Esse comportamento é esperado uma vez a lignina obtida pelo método Pepper, estruturalmente, preserva em maior extensão as características da lignina no bagaço, servindo como um parâmetro para avaliar as modificações ocorridas durante os processos de hidrólise.

As ligninas da fibra, da medula e da palha apresentaram baixa solubilidade em THF, sendo assim os resultados apresentados são representativos apenas da fração solúvel, as quais apresentaram valores baixos de polidispersão (~2**).**

Os menores valores de massas molares média em massa e em número foram obtidos para as ligninas da palha. Para as ligninas da fibra e da medula os valores foram semelhantes entre si. Em principio, poderíamos esperar que

mais intensidade de condensação (da própria lignina e de ligninas com carboidratos) deveria levar a um aumento da massa molar. Contudo, as análises são significativas apenas da parte solúvel das ligninas, sendo assim, não foi possível quantificar (pela análise da massa molar) a extensão das reações de condensação. Considerando-se as frações solúveis, podemos observar que as amostras de lignina das frações de fibra e medula resultantes do tratamento com ácido sulfúrico na concentração de 72 e 70%, apresentaram valores de massas molares. Este comportamento pode ser associado com a extensão das reações de condensação, no limite da solubilidade destas frações.

Os valores obtidos para as ligninas de palha foram muito inferiores aos obtidos quando do tratamento das frações fibra e medula. Este resultado é uma evidência da diferença estrutural da lignina nos tecidos que compõem as folhas da cana-de-açúcar, conseqüência das diferentes funções destes tecidos quando comparados com os tecidos que formam as fibras e a medula. A presença de estruturas fenólicas, estruturalmente semelhantes à lignina, e necessárias ao metabolismo que ocorre nas folhas podem resultar, pelo menos em parte, em produtos insolúveis durante o tratamento ácido e, assim, somar-se ao resíduo isolado quando da determinação da lignina Klason. Como as folhas da palha representam uma estrutura fisiologicamente ativa, em plena atividade na planta é esperada uma menor quantidade de lignina, sendo assim, os valores de M_w encontrados nas análises de GPC poderiam ainda indicar que os teores de lignina insolúvel encontrados no trabalho podem ser relativos a monômeros ou dímeros de “lignina”, que seriam utilizados pela planta para uma

posterior lignificação e que condensaram durante o tratamento com ácido sulfúrico.

4.5.7- DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CELULOSE E POLIOSES

O conteúdo de lignina pode ainda ser estimado pela análise quantitativa dos carboidratos presentes nos materiais lignocelulósicos. Uma vez quantificado os carboidratos, a lignina deverá ser o complementar a 100%. Nestes casos, deve ser determinada também a quantidade de compostos derivados de polissacarídeos, como furfural e hidroximetilfurfural, transformando-se estes teores em celulose e polioses equivalentes. A quantificação destes derivados de polissacarídeos pode ainda ser empregada para avaliar a agressividade do meio reacional, empregado na determinação realizada.

As amostras de fibra, medula e palha de cana-de-açúcar tiveram a composição de polissacarídeos determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Depois do tratamento com ácidos nas diferentes concentrações obtém-se uma solução de açúcares que, uma vez, quantificados por análise cromatográfica, permite a determinação dos teores originais de celulose, polioses e produtos de degradação dos materiais lignocelulósicos.

Neste procedimento, as massas de celobiose, glicose e hidroximetilfurfural (HMF), proporcionais às áreas obtidas nos cromatogramas dos padrões, foram convertidas em celulose. Da mesma forma, as massas de

xilose, arabinose e furfural foram convertidas em polioses, e a massa de ácido acético, convertida em acetila. As massas obtidas foram divididas pela massa seca do material original e multiplicadas pelos fatores de conversão. Os fatores de conversão de glicose, celobiose e HMF para a celulose são 0,90, 0,95 e 1,37, respectivamente. De maneira similar, xilose e arabinose foram convertidas a polioses, empregando-se o fator 0,88 e para furfural o fator é 1,29. O fator de conversão de ácido acético para acetila é 0,72. A Figura 41 apresenta os cromatogramas dos padrões utilizados.

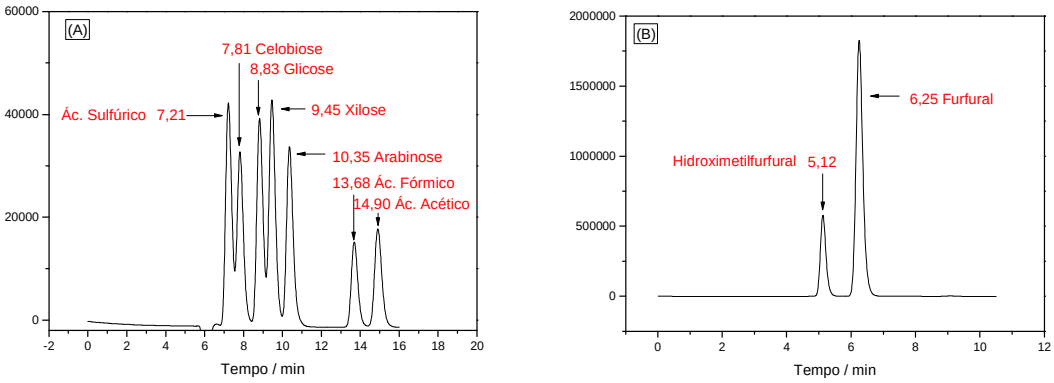


Figura 41. Cromatogramas dos padrões utilizados nas análises dos polissacarídeos dos materiais hidrolisados. (A) Determinação de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido fórmico e ácido acético, (B) Determinação de furfural e HMF.

A partir dos resultados obtidos nas análises cromatográficas e considerando o teor de lignina total (lignina solúvel + lignina insolúvel) e o teor de cinzas, foi possível efetuar o balanço de massas com a finalidade de conhecer a composição química do bagaço e da palha em estudo.

As Tabelas 35 - 38 apresentam as composições químicas das frações de fibras do bagaço e da palha. Os balanços de massa estão próximos de 100% e as pequenas variações podem ser justificadas pelo tempo de refluxo empregado durante a hidrólise dos materiais lignocelulósicos, onde quantidades de polissacarídeos não hidrolisados tenham permanecido junto à lignina insolúvel, ou ainda, alguns trímeros de celulose e polioses, ou produtos de degradação, os quais não foram detectados durante a análise cromatográfica, podem também provocar a diminuição nos valores totais desses açúcares.

Tabela 35. Composição química da fração fibra do bagaço de cana.

Amostra (FIBRA)	lignina total (%)	cinzas (%)	celulose (%)	polioses (%)	Holocelulose (%)	Balanço de massa (%)
60%	62,38	0,34	7,95	30,51	38,46	101,2
65%	21,92	0,34	45,98	29,31	75,29	97,6
68%	20,77	0,34	45,90	31,97	77,87	99,0
70%	21,14	0,34	46,31	32,19	78,50	100,0
72%	22,69	0,34	49,49	24,34	73,84	96,9
80%	25,07	0,34	50,29	24,27	74,56	99,9

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

Tabela 36. Composição química da fração medula do bagaço de cana.

Amostra (MEDULA)	lignina total (%)	cinzas (%)	celulose (%)	polioses (%)	Holocelulose (%)	Balanço de massa (%)
60%	55,76	2,48	10,56	31,90	42,46	100,7
65%	20,08	2,49	45,71	29,11	74,82	97,4
68%	17,98	2,48	46,61	31,63	78,25	98,7
70%	18,22	2,48	45,63	32,80	78,43	99,1
72%	19,44	2,48	46,06	30,82	76,88	98,8
80%	22,59	2,48	46,84	27,24	74,08	99,2

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

Tabela 37. Composição química do bagaço de cana.

Amostra (BAGAÇO INTEGRAL)	lignina total (%)	cinzas (%)	celulose (%)	polioses (%)	Holocelulose (%)	Balanço de massa (%)
60%	64,55	0,93	6,54	28,21	34,75	100,2
65%	20,63	0,93	46,36	29,34	75,70	97,3
68%	20,90	0,93	48,14	26,46	74,60	96,4
70%	20,78	0,93	46,91	28,78	75,69	97,4
72%	20,70	0,93	50,21	27,14	77,35	99,0
80%	23,88	0,93	50,13	23,45	73,57	98,4

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

Tabela 38. Composição química da palha de cana-de-açúcar.

Amostra (PALHA)	lignina total (%)	cinzas (%)	celulose (%)	polioses (%)	Holocelulose (%)	Balanço de massa (%)
60%	58,6	4,97	6,84	29,12	35,96	99,5
65%	18,92	4,97	43,46	28,80	72,26	96,1
68%	19,37	4,97	42,69	31,96	74,66	99,0
70%	19,65	4,97	40,52	31,53	72,05	96,7
72%	19,78	4,97	42,42	29,79	72,21	97,0
80%	24,75	4,97	47,94	23,06	70,99	100,7

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 34 - 37, é possível observar que as amostras obtidas com ácido na concentração de 60%, apresentaram baixos teores de holocelulose indicando que uma fração de polissacarídeos não foi hidrolisada e permaneceram como resíduo, aumentando o teor de lignina residual. Da mesma forma, os hidrolisados obtidos com ácido 80% apresentaram teores menores polissacarídeos devido à condensação destes e de seus derivados (HMF e Furfural) com a lignina.

As amostras de fibra, medula e palha de cana-de-açúcar tiveram também a composição dos produtos de degradação dos polissacarídeos quantificados e são apresentados nas Tabelas 39 - 42.

Com os valores de HMF e furfural encontrados nos hidrolisados podemos verificar as concentrações de ácido que fornecem uma maior quantidade de produtos de degradação disponíveis para reações de condensação com a lignina. De uma maneira geral, observa-se uma maior

formação de furfural nos hidrolisados e um aumento nas quantidades de ambos HMF e Furfural com o aumento da concentração de ácido.

O Furfural é formado pela degradação da xilose e do HMF, como pode ser observado na Figura 13. Contudo, observamos uma maior variação nas quantidades de Furfural em relação às de HMF, sendo assim podemos concluir que o os maiores valores de Furfural são devidos à maior reatividade das polioses quanto comparada à celulose, nas condições empregadas na determinação de lignina Klason.

Tabela 39. Valores de HMF e Furfural dos hidrolisados da fibra quantificados por HPLC.

Amostra (FIBRA)	HMF (g/L)	FURFURAL (g/L)
60%	0,00001	0,00309
65%	0,00157	0,00734
68%	0,00147	0,00833
70%	0,00147	0,00909
72%	0,00175	0,01922
80%	0,00178	0,02555

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

Tabela 40. Valores de HMF e Furfural dos hidrolisados da medula quantificados por HPLC.

Amostra (MEDULA)	HMF (g/L)	FURFURAL (g/L)
60%	0,00043	0,00333
65%	0,00130	0,00475
68%	0,00145	0,00570
70%	0,00150	0,00847
72%	0,00199	0,01613
80%	0,00157	0,02288

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

Tabela 41. Valores de HMF e Furfural dos hidrolisados da palha quantificados por HPLC.

Amostra (PALHA)	HMF (g/L)	FURFURAL (g/L)
60%	0,00002	0,00770
65%	0,00147	0,00586
68%	0,00156	0,00835
70%	0,00101	0,00932
72%	0,00180	0,00971
80%	0,00179	0,01725

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

Tabela 42. Valores de HMF e Furfural dos hidrolisados do bagaço integral quantificados por HPLC.

Amostra (BAGAÇO	HMF (g/L)	FURFURAL (g/L)
60%	0,00005	0,00688
65%	0,00107	0,00520
68%	0,00130	0,00815
70%	0,00145	0,00756
72%	0,00167	0,00878
80%	0,00182	0,01971

Todas as análises apresentadas acima foram realizadas em triplicata.

4.5.8- DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DOS POLISSACARÍDEOS (HOLOCELULOSE).

A determinação de holocelulose foi também realizada para avaliar (por diferença) a adequação dos procedimentos empregados na determinação de lignina Klason. Como os métodos descritos na literatura foram também otimizados para análise de madeiras, realizou-se inicialmente uma análise seguindo-se estes procedimentos. As análises exploratórias visando a determinação de holocelulose foram realizadas segundo a norma TAPPI T9m que consiste no tratamento do material pré-extraído, com cicloexano/etanol, com solução de clorito de sódio (1,5 g) em meio ácido (ácido acético 0,6 mL), mantendo o meio em pH = 4. Neste procedimento a lignina sofre reações de oxidação que resultam em sua solubilização e as frações de polissacarídeos (celulose e polioses) não são oxidadas, permanecendo como resíduo sólido.

Os valores obtidos deveriam ser complementares aos determinados pela determinação gravimétrica de lignina. Entretanto, obtiveram-se valores diferentes dos esperados, como pode ser observado na Tabela 43. Isso pode ter ocorrido devido à utilização de condições não adequadas que podem ter levado à oxidação incompleta da lignina ou à dissolução parcial da fração de polissacarídeos. Sendo assim, foram realizadas modificações no procedimento.

Tabela 43. Valores da primeira determinação de holocelulose e lignina das frações do bagaço e da palha de cana-de-açúcar.

Amostra	Holocelulose (%)	Lignina (%)*	Desvio Padrão
Fibra	84,83	15,17	±0,20
Medula	85,27	14,73	±0,26
Palha	82,8	17,2	±0,85
Bagaço integral	83,11	16,89	±0,30

(*) obtido por diferença.

Como os resultados obtidos por diferença que corresponderiam ao teor de lignina mostraram-se inferiores aos obtidos pelo tratamento com ácido sulfúrico, julgou-se que a oxidação, e conseqüente solubilização, da lignina não tenham sido completas. Assim realizou-se uma primeira modificação do método pelo aumento na quantidade de agente oxidante (clorito de sódio) em 25% (Tabela 44), e uma segunda modificação no tempo de reação, que passou de 3 para 4 horas (Tabela 45). Esse aumento no tempo da reação também proporciona um aumento na quantidade de agente oxidante, uma vez que são adicionadas novas quantidades de clorito e ácido acético a cada hora de reação.

Tabela 44. Valores de holocelulose e lignina das frações do bagaço e da palha de cana-de-açúcar, com aumento na quantidade de clorito em 25

Amostra	Holocelulose (%)	Lignina (%)
Fibra	82,5	17,5
Medula	83,1	16,9
Palha	80,9	19,1
Bagaço integral	82,3	17,7

Tabela 45. Valores de holocelulose e lignina das frações do bagaço e da palha de cana-de-açúcar, com aumento no tempo de reação.

Amostra	Holocelulose (%)	Lignina (%)
Fibra	76,7	23,3
Medula	79,2	20,8
Palha	77,5	22,5
Bagaço integral	79,9	20,1

Para uma melhor avaliação da eficiência das alterações propostas, apresenta-se abaixo (Tabela 46) os valores de lignina Klason total (solúvel + insolúvel).

Tabela 46. Valores de lignina total (solúvel + insolúvel) obtidos para o bagaço e palha de cana-de-açúcar em meio ácido.

Concentração H_2SO_4 (%)	Lignina Total (%) Fibra	Lignina Total (%) Medula	Lignina Total (%) Palha	Lignina Total (%) Bagaço
60	62,38	55,76	58,6	64,55
65	21,92	20,08	18,97	20,71
68	20,81	17,98	19,48	20,78
70	21,14	18,32	19,69	20,71
72	22,69	19,44	19,78	20,70
80	25,07	22,59	24,75	23,88

Comparando os valores obtidos pelos dois métodos (oxidativo e o ácido), os valores de lignina obtidos com aumento de clorito em 25% mostraram uma boa concordância para palha. Para o bagaço e a fração de fibra a variação foi da ordem de 3 pontos percentuais, e para a fração de medula, a variação foi de 1 ponto percentual.

Com o aumento de 1 hora no tempo de reação os valores de lignina foram maiores para todas as amostras, como pode ser observado na tabela 32. Para o bagaço integral o valor de lignina foi bastante próximo do obtido pelo método com ácido sulfúrico. Contudo, para as frações de fibra e medula a variação foi de 2 pontos percentuais e para palha essa variação foi de 3 pontos percentuais.

Os maiores valores de lignina obtidos indiretamente (tabela 44) com aumento do tempo de reação são uma evidência de que ocorreu uma maior dissolução dos polissacarídeos.

Para um melhor conhecimento das reações de oxidação da lignina e dos polissacarídeos foi realizada uma determinação de holocelulose em um uma amostra de polpa branqueada de fibra de bagaço com uma quantidade mínima de lignina. Os resultados mostraram uma perda de 2,7% de polissacarídeos, indicando que, as condições experimentais propostas na norma (para madeiras), não estão otimizadas para determinações a partir de bagaço de cana.

Para verificar se o método oxidativo empregado resulta em dissolução incompleta de lignina, foram realizadas análises no infravermelho para verificar a presença desta nos resíduos de holocelulose. Os espectros das frações de holocelulose obtidas nos três diferentes tratamentos oxidativos são apresentados nas Figuras 42 - 45. As bandas em 1600, 1515 e 830 cm^{-1} que correspondem as linhas 2, 3 e 4, (vide figuras) são características de ligninas, pois se referem a vibrações do anel aromático, como observado na tabela 23. As figuras 42 -45 apresentam ainda os espectros de amostras de celulose e de Lignina Pepper, para facilidade de comparação. Analisando-se os espectros das amostras de holocelulose, não se observa a presença das bandas devidas as ligninas.

O pico em 1700 cm^{-1} marcado com a linha 1 nos espectros de IV corresponde a estiramento C=O de aldeídos e ácidos carboxílicos, formados durante o processo de oxidação dos polissacarídeos.

Sendo assim conclui-se que a espectroscopia no infravermelho não revelou a presença de lignina nas amostras obtidas pelo procedimento da norma e, adicionalmente, revelou a oxidação parcial dos polissacarídeos.

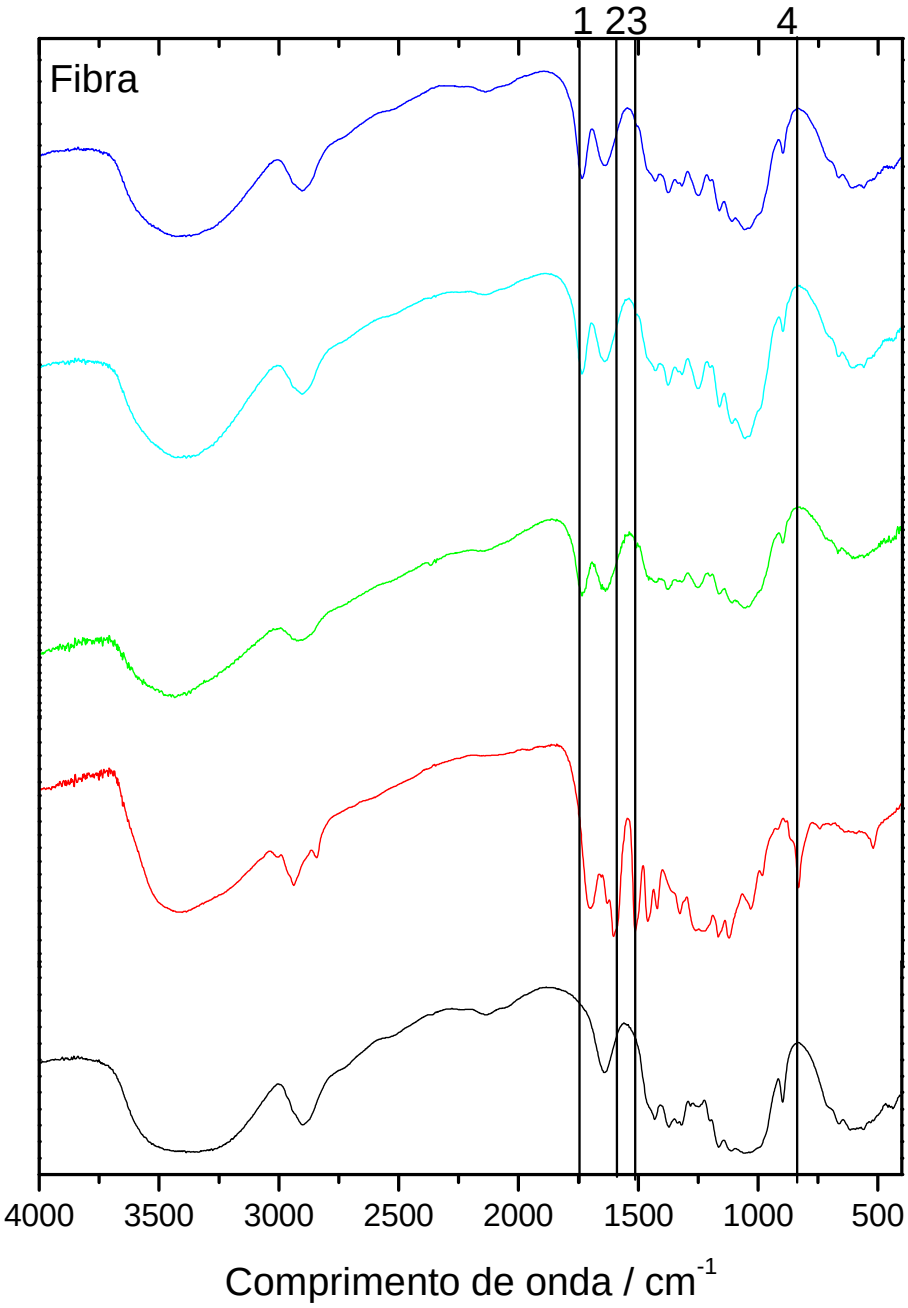


Figura 42. Espectros de infravermelho das amostras de (—) Celulose, (—) Lignina Pepper, e das holoceluloses obtidas da fibra. (—) Norma, (—) 4 horas de reação e (—) aumento de 25% de clorito.

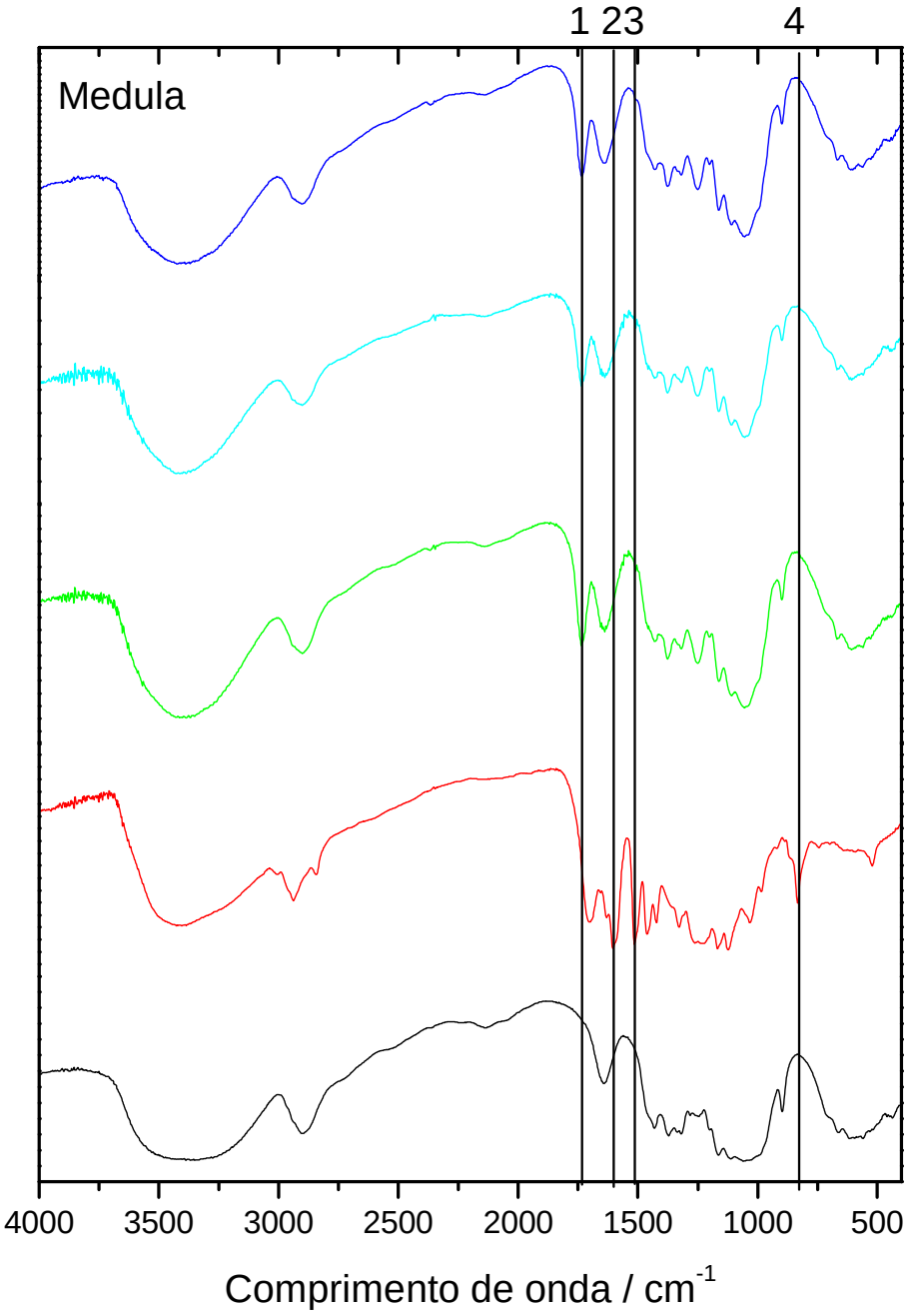


Figura 43. Espectros de infravermelho das amostras de (—) Celulose, (—) Lignina Pepper, e das holoceluloses obtidas da medula. (—) Norma, (—) 4 horas de reação e (—) aumento de 25% de clorito.

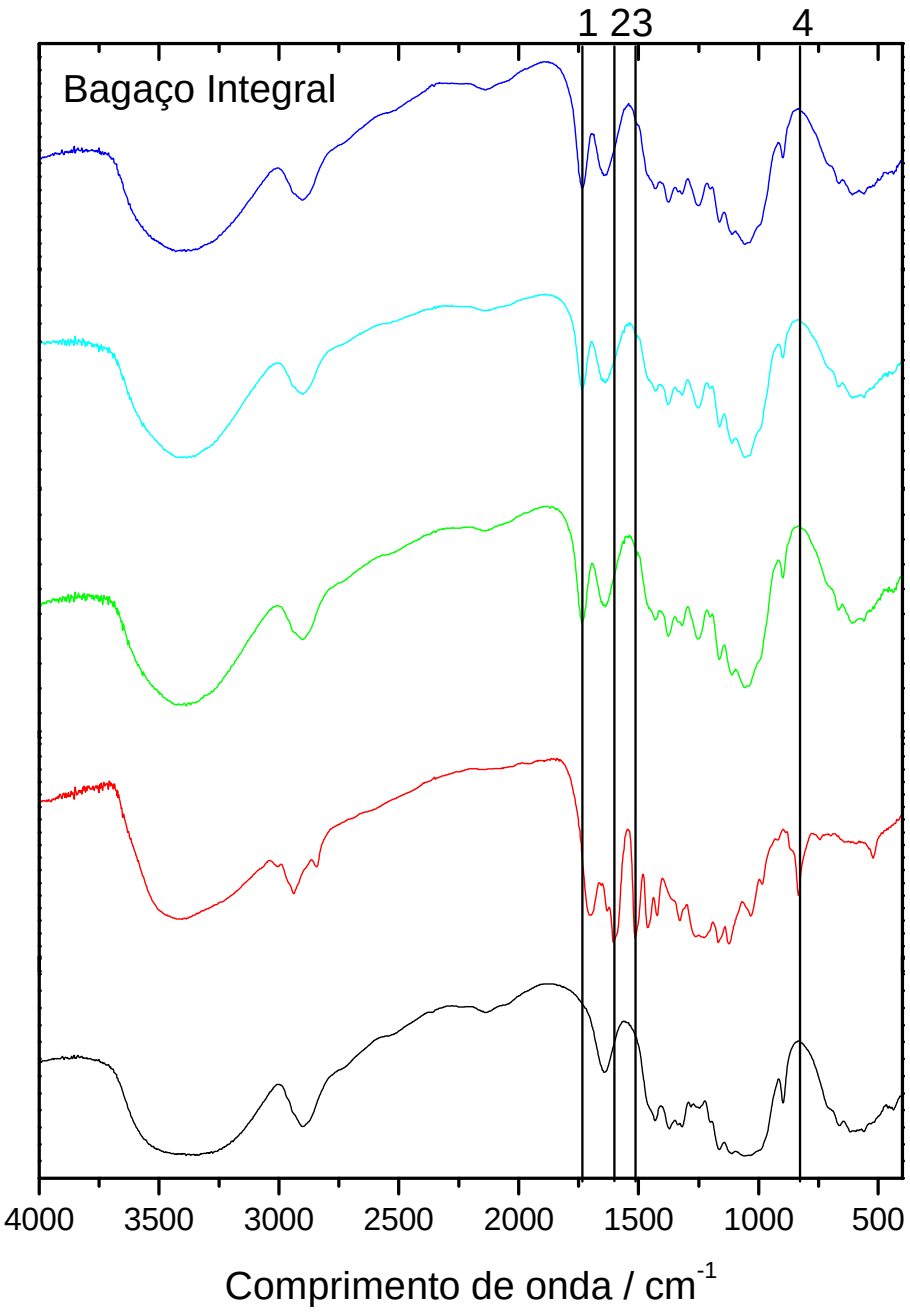


Figura 44. Espectros de infravermelho das amostras de (—) Celulose, (—) Lignina Pepper, e das holoceluloses obtidas do bagaço integral. (—) Norma, (—) 4 horas de reação e (—) aumento de 25% de clorito.

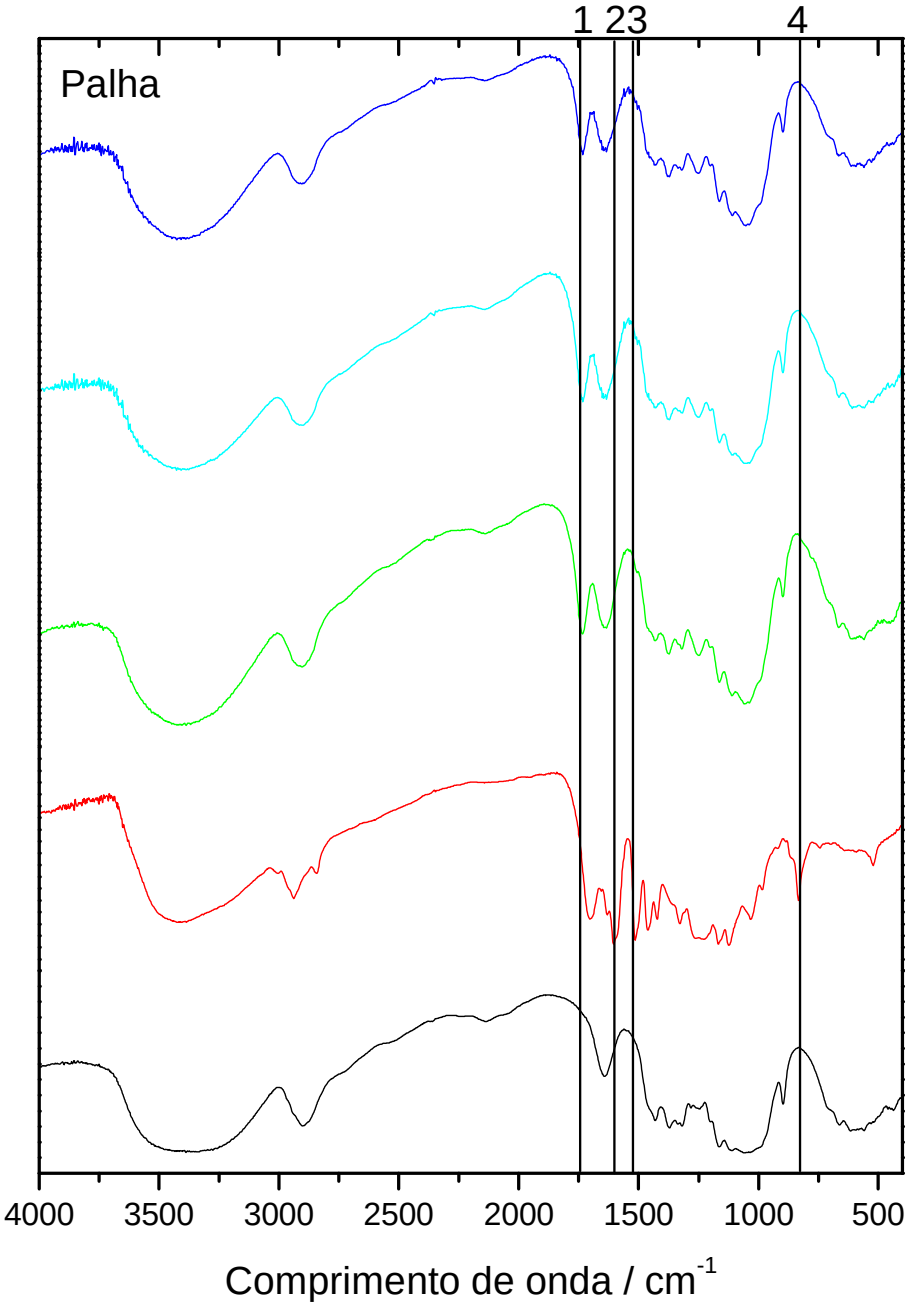


Figura 45. Espectros de infravermelho das amostras de (—) Celulose, (—) Lignina Pepper, e das holoceluloses obtidas da palha. (—) Norma, (—) 4 horas de reação e (—) aumento de 25% de clorito.

5 - CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho destacam algumas características do comportamento dos materiais lignocelulósicos durante os tratamentos com ácido sulfúrico em diferentes concentrações e na presença de agente oxidante, como clorito de sódio, na determinação de lignina.

Os resultados obtidos não mostraram similaridade nas correlações entre os métodos analíticos. A análise pelo tratamento com ácido mostrou valores de lignina e polissacarídeos diferentes dos obtidos pelo método oxidativo utilizando clorito de sódio em meio ácido.

A caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pelas análises de cinzas e extrativos apontou grande dependência com relação ao método de separação empregado para a obtenção das frações de fibra e da medula do bagaço.

A determinação gravimétrica da lignina pelo tratamento ácido mostrou que a concentração ótima de ácido, para determinação de lignina insolúvel total, situa-se em um intervalo de concentração, que varia de 65 – 72%, para todas as amostras. A concentração de ácido sulfúrico de 60% mostrou-se pouco eficiente na hidrólise quantitativa dos polissacarídeos, pois se verificou pelas análises de caracterização das ligninas insolúveis que os polissacarídeos permaneceram junto com a lignina nos resíduos, e na concentração de 80% observou-se um aumento de lignina residual gerado por reações de condensação.

As análises realizadas para as madeiras de *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis* apresentaram valores de ligninas insolúveis bastante próximos dentro

de uma faixa de concentração de 65 a 72%, entretanto observa-se que a concentração de ácido sulfúrico de 72%, referenciada na norma (TAPPI T222), apresenta valores de lignina próximos para madeira de *Pinus*, mas para o *Eucaliptus* a diferença alcança até 2%. Os resultados obtidos tanto para a madeira de *Eucayiptus* quanto para o bagaço e para a palha serviram para confirmar a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos específicos para esses materiais.

A análise elementar apresentou teores de carbono compatíveis com os calculados para os precursores da lignina, variando de 57 a 62%, exceto para as amostras de ligninas obtidas com ácido 60% que apresentaram menores teores de carbono, devido à presença de polissacarídeos residuais.

As análises termogravimétricas das ligninas mostraram que a degradação térmica da lignina procede mais lentamente em relação à celulose e/ou polioses, que são degradadas em uma faixa temperatura mais estreitas. Com isso, pode-se verificar a presença de polissacarídeos nas amostras obtidas com ácido na concentração de 60%.

Utilizando espectroscopia de na região do UV- visível calculamos os teores de lignina solúvel. Para os cálculos foram utilizadas as absorções em 215 e 280 nm, que correspondem a máximos de absorção da lignina, contudo nos espectros obtidos neste trabalho não observou-se a banda em 215nm. Observou-se também que as amostras de bagaço e palha possuem valores de lignina solúvel intermediários aos valores encontrados para as madeiras de *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis.* Essa constatação é uma evidência da diferença entre a estrutura macromolecular da lignina do bagaço e da palha

com relação às madeiras, e certificam a necessidades de métodos de caracterização específicos para estes materiais.

A análise de RMN ^{13}C mostrou-se bastante eficiente para o estudo estrutural das ligninas, bem como a determinação de teores de metoxila e ainda, verificar a presença de sinais devidos a carboidratos. O espectro de lignina da fibra obtida com ácido 60% apresentou picos bastante intensos na região de alifáticos, o que comprova a presença de polissacarídeos. Os demais espectros foram coincidentes, com pequenas variações nas intensidades dos picos. Observou-se também que os espectros das ligninas obtidas pelo tratamento ácido apresentam menores resoluções quando comparados ao obtido com a lignina Pepper. Esse comportamento é esperado uma vez que a lignina obtida pelo método Pepper, estruturalmente, preserva em maior extensão as características da lignina no bagaço, servindo como um parâmetro para avaliar as modificações ocorridas durante os processos de hidrólise.

Os valores de metoxilas encontrados foram de 1 metoxila por anel aromático, o que é coerente com teores de carbono obtidos por análise elementar. Para certificar a viabilidade do método foi realizada uma medida de RMN ^{13}C, em solução, para a lignina padrão, o qual foi comparado com o obtido por RMN ^{13}C de sólido. A integração da região aromática com relação à região de metoxilas apresentou resultado bastante coerente entre os dois métodos.

A análise de infravermelho mostrou espectros bastante coincidentes entre as ligninas das diferentes amostras, com pequenas variações de intensidades entre alguns picos.

As massas moleculares médias em massa e em número ($\bar{M}n$), assim como as polidispersividades das ligninas obtidas pela cromatografia de permeação em gel mostraram que a lignina obtida pelo método Pepper apresenta fragmentos com massas moleculares superiores ($\bar{M}w$) aos observados para as ligninas obtidas pelo método com ácido sulfúrico, além de produzir um número maior de fragmentos com massas moleculares diferentes. As ligninas da palha apresentaram valores baixos de massas moleculares médias em massa e em número, sendo uma indicação da diferença estrutural da lignina da palha com relação à do bagaço.

O balanço de massa obtido por cromatografia líquida apresentou valores bastante satisfatório entre de 97 a 100%. As amostras obtidas com ácido na concentração de 60% apresentaram baixos teores de holocelulose indicando que uma fração de polissacarídeos não foi hidrolisada e permaneceram como resíduo, aumentando o teor de lignina residual. Da mesma forma, os hidrolisados obtidos com ácido 80% apresentaram teores menores polissacarídeos devido à condensação destes e de seus derivados (HMF e Furfural) com a lignina. A formação de produtos de degradação dos polissacarídeos, como HMF e Furfural, foi também quantificada e observou-se que o aumento da concentração do ácido torna o meio mais agressivo com uma maior formação desses produtos.

A utilização de processo oxidativo para a determinação indireta de lignina revelou que este método deve também ser otimizado para ser aplicado a amostras de bagaço de cana-de-açúcar. O procedimento descrito pela norma técnica usual apresentou valores menores para o conteúdo de lignina. O

aumento da quantidade de agente oxidante promoveu uma melhor resposta do método, ainda que quando em excesso pode promover oxidação dos polissacarídeos presentes nas amostras.

As análises de infravermelho das amostras de holocelulose mostraram-se inadequadas para determinação de lignina residual nas amostras de holocelulose.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram comportamentos diferentes entre o bagaço integral e suas frações separadamente, frente ao tratamento ácido. Essa constatação levantou muitas questões que não puderam ser respondidas, indicando a necessidade de estudos mais profundos sobre a estrutura macromolecular da lignina do bagaço e da palha de cana-de-açúcar e dos métodos analíticos empregados para a quantificação desta macromolécula.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACID-insoluble lignin in wood and pulp T222 om-98. In: TAPPI test methods. Atlanta: TAPPI, 1998.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por Aspergillus niger IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **B.CEPPA**, v. 18, n. 1, p. 5770, 2000.

ASH in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525 ^{o}C T211 om-93. In: TAPPI test methods**.** Atlanta: TAPPI, 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7989**: determinação de lignina insolúvel em ácido. Rio de Janeiro, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA TÉCNICA DE CELULOSE E PAPEL. **ABTCP M 10/71**: determinação de lignina. Rio de Janeiro, 1968.

BAUDEL, H. M.; ZAROR, C. Z.; ABREU, C. Catalytic hydrogenation of sugarcane bagasse dissolving pulp efluents over Ru/C catalystic: An ecoefficient environmentally friendly approach. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol. 80, n. 2, p. 230-233, 2005.

BEOM-GOO, L.; ROWELL, R. M. Removal of heavy metal ions from aqueous solutions using lignocellulosic fibers. **Journal of Natural Fibers,** v. 1, p. 97-108, 2004.

BNDES; CGEE; FAO; CEPAL. **Bioetanol de cana-de-açúcar:** energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro : BNDES, 2008, 316 p.

BOEHMAN, A. L. Biodiesel production and processing. **Fuel Processing and Technology**, v. 86, p. 1057, 2005.

BOTARO, V. R. **Deslignificação organossolve de bagaço de cana-de-açúcar: fracionamento de benzilação das ligninas obtidas**. 1996. 167f. Tese (Doutorado)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1996.

BROWNING, B. L. **Methods on wood chemistry**. New York: Iterscience, 1967. v. 2.

CURVELO, Antônio Aprígio da Silva. **Processo de deslignificação organossolve.** 1992. 94f. Tese (Livre Docência) – Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

ERENO, D. Álcool de celulose. **Revista Pesquisa FAPESP**, Edição 133, março 2007.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood:** chemistry, ultrastucture, reactions. New York: Walter de Gruyter, 1984. 613p.

FUKUSHIMA, R. S.; DOHORITY, B. A. Feasibility of using lignin isolated from forages by solubilization in acetyl bromide as a standard for lignin analysis. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 3135- 3143, 2000.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIED, R. D. Extraction and isolation of lignin and its utilization as a standard to determine lignin concentration through a spectrophotometric method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3133-3139, 2001.

GANDINI, A.; BELGACEM, M. N. **Monomers, polymers and composites from renewable resources**. Amsterdam: Elsevier, 2008. 543 p.

GRUPO DE PAÍSES LATINOAMERICANOS y del CARIBE EXPORTADORES DE AÇÚCAR (GEPLACEA). **Atlas Del Bagaço de La Cana de Azucar**. Mexico: GEPLACEA, 1990. 143p.

GONÇALVES, A.R.; REZENE, D.S; MORIYA, R.Y.; OLIVEIRA, L.R.M. Pulping of sugarcane bagasse and straw and biobleaching of the pulps: conditions parameters and recycling of enzymes. In: APPITA ANNUAL CONFERENCE AND EXHIBITION, 59**.,** 2005**,** Auckland. **Proceedings…** Rotorua, Nova Zelândia, Appita, 2005. v. 2. p. 597-602.

HIMMELSBACH, D.S., BARTON II, F.E., WINDHAM, W.R. Comparison of carbohydrate, lignin and protein ratios between grass species by cross polarization-magic angle spinning carbon-13 nuclear magnetic resonance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry***,* v. 31, p. 401-404, 1983.

HOAREAU, W.; TRINDADE, W. G.; SIEGMUND, B.; CESTELLAN, A.; FROLINI, E. Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 86, p. 567-576, 2004.

HYMAN, D. ; SLUITER, A.; CROCKER, D.; JOHNSON, D.; SLUITER, J.; BLACK, S.; SCARLATA, C. Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis Spectroscopy. **Technical Report**. Disponível em: http://www.nrel.gov/biomass/. Acesso em: 10 nov. 2008.

INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CANÃ DE AZUCAR (ICIDCA). **Manual de los derivados de la canã de azucar**. México: CEPLACEA, 1990. 447p.

JOHNSON, D.; B.; MOORE, W.; E.; ZANK, L. C. The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. **Tappi**, v. 44, p. 793-798, 1961.

JUNG, H.J.G.; HIMMELSBACH, D.S. Isolation and characterization of wheat strow lignin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry***,* v. 37, p. 81-87, 1989.

KAPPA number of pulp T236 cm- 85. In: TAPPI test methods. Atlanta: TAPPI, 1993.

KELLY, S. S.; ROWELL, R.M.; DAVIS, M.; JURICH, C.K.; IBACH, R. Rapid analysis of the chemical composition of agricultural fibers using near infrared spectroscopy and pyrolysis molecular beam mass spectrometry. **Biomass and Bioenergy**, v. 27, p. 77-88, 2004.

KRINGSTAD, K.P.; MORCK, R. ^{13}C-NMR Spectra of Kraft Lignins. **Holzforschung**, v. 37, p. 237-244, 1983.

LIN, S.Y.; DENCE, C. W. **Methods in lignin chemistry**. New York: Springer-Verlag, 1992. 578 p.

LIN, X.; KONDO, R.; SAKAI, K. Biodegradation of sugarcane bagasse with marine fungus *Phlebia* sp. MG-60. **The Japan Wood Research Society**, v. 48, p.159-162, 2002.

LUDEMANN, H.D.; NIMZ, H. ^{13}C-Ker-resonanzspektren von ligninen. 2. Buchen und Fichten-Bjorkman-Ligninen. **Makromol Chemistry**., v. 175, p. 2409-2422, 1974.

MARTÍN, C.; LÓPEZ, Y.; PLASENCIA, Y.; HERNÁNDEZ, E. Characterisation of agricultural and agro-industrial residues, as raw materials for ethanol production. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly***,*v. 20, n.· 4, p. 443–447, 2006.

MORAIS, S.A.; NASCIMENTO, E.A.; PILÓ-VELOSO, D. Determinação do grau de condensação e do número de grupos metoxila por unidade monomérica de Ligninas do *Eucalyptus grandis* por espectroscopia FTIR. **Química Nova***,* v. 17, p. 5-8, 1994.

NIMZ, H. H.; ROBERT, D.; FAIX, O.; NEMR, M. Carbon-13 NMR Spectra of Lignins. 8. Structural Differences between Lignins of Hardwood, Softwood, Grasses and Compression Wood. **Holzforschung**, v. 35, p. 16-26, 1981.

NASSAR, M. M.; ASHOUR, E. A.; WAHlD, S. S. Thermal characteristics of bagasse. **Journal of Applied Polymer Science,** v. 61, p. 885-890, 1996.

PASQUINI, D. ; PIMENTA, M. T. B.; FERREIRA, L. H.; CURVELO, A. A.S., Sugar cane bagasse pulping using supercritical CO_2 associated with co-solvent 1-butanol/water . **Journal of Supercritical Fluids,** v. 34, p. 125–131, 2005.

RAMESH K. S.; JAN, B. W.; VICKI, L. B.; XUEHAO, L.; CHAN, W. G.; MOHAMMAD, R. H.*"*Characterization of chars from pyrolysis of lignin*".* **Fuel**, v. 83, p. 1469-1482, 2004.

ROWELL, R. M.; LEE, B. G. Removal of heavy metal ions from aqueous solutions using lignocellulosic Fibers. **Journal of Natural Fibers,** v. 1, p. 97-108, 2004.

SABATIER, J.; FERNANDEZ, N.; ROMERO, N.; SARDIÑAS, O. Structural changes in bagasse lignin by chemimechanical and kraft pulping processes. **Cellulose Chemistry and Technology,** v. 19, p. 543-548, 1985.

SALIBA, E.O.S. **Caracterização química e microscópica das ligninas dos resíduos agrícolas de milho e de soja expostas a degradação ruminal e seu efeito sobre a digestibilidade dos carboidratos estruturais.** 1998. 252 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, 1998.

SANJUÁN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.;TURRADO, J.; PATT, R. Morphological and chemical composition of pith and fibers from Mexican sugarcane bagasse. **Holtz als Roh-und Werkstoff**, v. 59, p. 447-450, 2001.

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

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos***.* Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1979. 299 p.

SINGH, R.; SINGH, S.; TRIMUKHE, K. D.; PANDARE, K. V.; ASTAWADE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Lignin–carbohydrate complexes from sugarcane bagasse: Preparation, purification, and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 57–66, 2005.

SMITH, N. G. J.; VIRGO, J. G.; BUCHANAN, V. E. Potential of Jamaican banana, coconut coir and bagasse fibers as composite materials. **Materials Characterization**, v. 59, p. 1273 -1278, 2008.

SOLVENT extractives of wood and pulp T204 cm-97. In: TAPPI test methods**.** Atlanta: TAPPI, 1997.

SUÁREZ, J. A.; LUENGO C. A.; FELFLI, F. F.; BEZZON, G. Thermochemical properties of cuban biomass. **Energy Sources**, v. 22, p. 851–857, 2000.

TAI, D.S.; CHEN, C.L.; GRATZL, J.S. Lignins: isolation methods and chemical characterization. **Wood Chemistry Technology,** v. 10, p. 917-928, 1990.

VIERA, R. G. P.; RODRIGUES, G. F.; ASSUNÇÃO, R. M. N.; MEIRELES, C. S.; VIEIRA, J. G.; OLIVEIRA, G. S. Synthesis and characterization of methylcellulose from sugar cane bagasse cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 182–189, 2007.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (ÚNICA). Disponível em: < http://www.unica.com.br/>. Acesso em: 20 maio. 2008.

WIDYORINI, R.; XU, J.; SHUICHI, K. U. Manufacture and properties of binderless particleboard from bagasse I: effects of raw material type, storage methods, and manufacturing process. **The Japan Wood Research Society**, v. 51, p. 648–654, 2005.