

ALEXANDRE EMMEL

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA EXPLOSÃO A VAPOR
SOBRE AS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS
DA LIGNINA DE *Eucalyptus grandis***

Dissertação apresentada como requisito necessário para a obtenção do grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

1999

TERMO DE APROVAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA EXPLOSÃO A VAPOR SOBRE AS
PROPRIEDADES QUÍMICAS E FÍSICAS DA LIGNINA DE
*EUCALYPTUS GRANDIS***

por

ALEXANDRE EMMEL

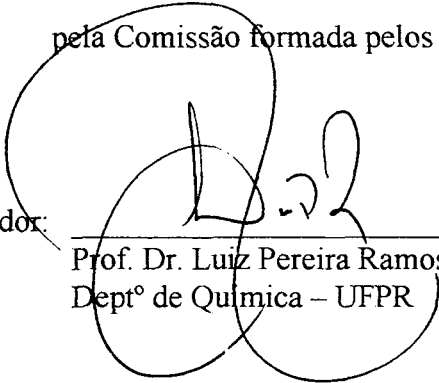
Dissertação aprovada como requisito

parcial para obtenção do grau de

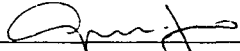
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão formada pelos Professores:

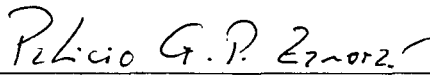
Orientador:



Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos
Deptº de Química – UFPR



Prof. Dr. Antonio Apigio da Silva Curvelo
Deptº de Química – USP São Carlos



Prof. Dr. Patricio Guillermo Peralta Zamora
Deptº de Química - UFPR

Curitiba, dia 08 de abril de 1999.

"Dedico esta Tese a minha família pelo apoio e incentivo e, em especial à minha esposa e filha, Ciça e Fernanda que, sempre com carinho, souberam entender as minhas horas de ausência."

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE EQUAÇÕES	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Estrutura da madeira.....	02
1.1.1. Celulose.....	03
1.1.2. Hemiceluloses.....	08
1.1.3. Lignina.....	15
1.1.3.1. Estrutura química das moléculas de lignina.....	19
1.1.3.2. Análise estrutural de ligninas.....	26
1.2. Pré-tratamento de fitobiomassa.....	29
1.3. Pré-tratamento por explosão a vapor.....	30
1.3.1. Reações de materiais lignocelulósicos durante a explosão a vapor.....	34
2. OBJETIVO	38

3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. Preparação dos cavacos de <i>Eucalyptus grandis</i> para o pré-tratamento.....	41
3.2. Pré-tratamento dos cavacos por explosão a vapor.....	42
3.3. Determinação do peso seco dos cavacos e materiais pré-tratados.....	44
3.4. Extração alcalina.....	44
3.5. Obtenção da lignina a partir da precipitação ácida do extrato alcalino.....	45
3.6. Análise de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico.....	45
3.7. Determinação da lignina de Klason em materiais lignocelulósicos	45
3.8. Análise cromatográfica de hidrolisados de Klason e extratos aquosos.....	46
3.9. Análise dos extratos aquosos por espectrometria no ultravioleta.....	46
3.10. Análise de cinzas dos substratos e das ligninas.....	47
3.11. Análise das frações insolúveis por FTIR.....	47
3.12. Análise multivariada dos dados de FTIR das frações insolúveis.....	47
3.13. Acetilação das ligninas obtidas após a precipitação ácida do licor alcalino.....	48
3.14. Determinação do teor de metoxilas das ligninas.....	48
3.15. Determinação do teor de hidroxilas totais das ligninas.....	49
3.16. Análise espectroscópica das ligninas acetiladas por RMN ¹ H.....	49
3.17. Determinação das fórmulas C ₉ das ligninas.....	50
3.18. Análise térmicas das ligninas.....	50
3.19. Distribuição em massas moleculares das ligninas.....	50
4. RESULTADOS	52
4.1. Pré-tratamento a vapor de <i>E. grandis</i>	53
4.2. Composição química das frações insolúveis em água.....	59

4.3. Extração alcalina de lignina após o pré-tratamento.....	60
4.4. Rendimento total de celulose, hemicelulose e lignina após o pré-tratamento.....	61
4.5. Caracterização físico-química das ligninas solúveis em álcali.....	64
5. DISCUSSÃO.....	80
5.1. Eficiência obtida no pré-tratamento de cavacos de <i>E. grandis</i>	81
5.2. Avaliação do efeito do pré-tratamento sobre as ligninas isoladas.....	83
6. CONCLUSÕES.....	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
8. ANEXOS - Espectros de RMN-¹H das ligninas isoladas por pré-tratamento a vapor seguido de extração alcalina	108

Agradecimentos

Ao professor **Luiz Pereira Ramos** pela acolhida, estímulo e orientação para a conclusão desta Dissertação de Mestrado.

Ao Sr. **Mário Bratek**, funcionário das Usinas Piloto da UFPR pelo auxílio na operação do reator de explosão a vapor e caldeira.

Ao professor **Álvaro Luiz Mathias**, pela atenção e análises térmicas realizadas no Departamento de Química da UFPR.

Ao professor **André Ribeiro Cotrim** do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena - SP (FAENQUIL), pela assistência na execução das análises de teor de metoxilas.

Ao funcionário **Ângelo Roberto de Oliveira**, do Departamento de Química da UFPR, pela amizade e ajuda na execução das análises de FTIR.

Ao funcionário **Eliseu Esmanhoto**, do LAC-COPEL, pela execução das análises de CHN.

À funcionária **Ivânia**, do Laboratório de RMN da Fundação da Universidade Estadual de Maringá, pela execução das análises de RMN.

Ao pessoal da Coordenação de Pós-graduação do Departamento de Química, pela acolhida e colaboração no decorrer do curso.

Aos colegas da Pós-graduação do Departamento de Química pelo apoio e amizade.

Aos colegas de laboratório, Orlando Baron e Melissa Umata Lucato, hoje alunos de mestrado do LAC-COPEL, e Marcelo R. F. Echterhoff (Xoxof), Eliane Lopes da Silva e Giuliano Zagonel, pela amizade, auxílio nas análises e companheirismo.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	= acetil
<i>Araf</i>	= arabinofuranose
<i>Arap</i>	= arabinopiranosose
CG	= cromatografia gasosa
CHN	= carbono, hidrogênio e nitrogênio
CLAE	= cromatografia líquida de alta eficiência
CP1	= componente principal 1
CP2	= componente principal 2
CrI	= índice de cristalinidade
DP	= grau de polimerização
DSC	= calorimetria diferencial de varredura
EPV	= eucalipto pré-tratado a vapor
EPV-IA	= eucalipto pré-tratado a vapor insolúvel em água
EPV-IA _{OH}	= eucalipto pré-tratado a vapor insolúvel em álcali
EPV-SA	= eucalipto pré-tratado a vapor solúvel em água
EPV-SA _{OH}	= eucalipto pré-tratado a vapor solúvel em álcali
FTIR	= infravermelho com transformada de Fourier
<i>Galp</i>	= galactopiranosose
<i>GlcP</i>	= glucopiranosose
<i>GlcP</i> A	= ácido glucopiranosil urônico
GPC	= cromatografia de permeação em gel
IV	= infravermelho
LMM	= lignina de madeira moída
<i>m</i>	= <i>meta</i>
<i>m/m</i>	= massa por massa
<i>Manp</i>	= manopiranosose
MHz	= megahertz
mM	= milimolar
M _n	= massa molecular numérica média

m/v	= massa por volume
Mw	= massa molecular média
N	= normal
nm	= nanometro
OCH ₃	= metóxi
OH _{ali}	= hidroxila alifática
OH _{aro}	= hidroxila aromática
OH _t	= hidroxila total
<i>p</i>	= <i>para</i>
PS	= peso seco
RMN	= ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	= ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TGA	= análise termogravimétrica
THF	= tetraidrofurano
t	= tonelada
u.m.a.	= unidade de massa atômica
UV	= ultravioleta
v/v	= volume por volume
Xylp	= xilopirranose

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Elementos estruturais da celulose.....	04
Figura 2. Mutarrotação.....	05
Figura 3. Substituintes em anéis piranosídicos.....	06
Figura 4. Organização estrutural da celulose, conforme modelo proposto por Ramos, L.P. (contribuição pessoal)	07
Figura 5. Representação das fórmulas estruturais das unidades monoméricas encontradas nas hemiceluloses.....	10
Figura 6. Representação estrutural das galactoglucomananas com suas respectivas unidades monoméricas: β -D-glucopiranoose (Glc ρ); β -D-manopiranoose (Man ρ); β -D-galactopiranoose (Gal ρ). R=CH ₃ CO (acetil) ou H (Sjöström, 1992).....	12
Figura 7. Representação da estrutura das arabinoglucuroxilanas com suas respectivas unidades monoméricas: β -D-xilopiranoose (Xyl ρ); ácido 4-O-metil- α -D-glucopiranosil urônico (Glc ρ A); α -L-arabinofuranose (Araf) (Sjöström, 1992).....	13
Figura 8. Representação da estrutura das arabinogalactanas com suas respectivas unidades monoméricas: β -D-galactopiranoose (Gal ρ), β -L-arabinopiranoose (Ara ρ) e α -L-arabinofuranose (Araf). R pode ser β -D-galactopiranoose (Gal ρ) ou, menos freqüentemente, α -L-arabinofuranose (Araf) e ácido β -D-glucopiranosil urônico (Glc ρ A) (Sjöström, 1992).....	13

Figura 9. Representação da estrutura de galactanas com suas respectivas unidades monoméricas: β -D-galactopiranosose (Galp) e ácido β -D-glucopiranosil urônico (Glc pA) (Sjöström, 1992).....	14
Figura 10. Estrutura dos álcoois precursores da lignina: 1- álcool p-cumarílico; 2- álcool coniferílico; e 3- álcool sinapílico.....	16
Figura 11. Modelo estrutural da lignina de faia (Nimz, 1974, citado por Fengel e Wegener, 1989).....	17
Figura 12. Formas de ressonância do radical fenóxi derivado do álcool coniferílico.....	20
Figura 13. Reações de adição em quinonas levando à formação de várias unidades intermediárias e tipos de ligações em lignina.....	22
Figura 14. Ligação entre interunidades (C_{β} - C_5) na lignina (fenilcumarana).....	23
Figura 15. Ligação entre interunidades (C_{β} - C_1) na lignina.....	23
Figura 16. Formação de ligação pinoresinólica em lignina.....	24
Figura 17. Ligação 5-5' em lignina.....	25
Figura 18. Dibenzodioxocina presente em lignina de madeira mole.....	26
Figura 19. Reação de hidrólise das hemiceluloses.....	36
Figura 20. Reação de desidratação de pentoses e hexoses.....	36
Figura 21. Hidrólise de ligações β -O-4 durante o pré-tratamento a vapor.....	37
Figura 22. Diagrama de blocos representativo do procedimento para a obtenção da lignina.....	41
Figura 23. Rendimentos de recuperação dos materiais pré-tratados. IA, insolúvel em água; SA, solúvel em água; A280, compostos solúveis em água que absorvem no comprimento de onda de 280nm; TOTAL, IA+AS+A280.....	54

Figura 24. Cromatograma típico da fração EPV-SA, correspondente às condições de pré-tratamento codificadas como 13B.....	55
Figura 25. Recuperação de glucose (celulose) e xilose (xilana) na fração solúvel em água (EPV-SA) após o pré-tratamento a vapor de cavacos de <i>E. grandis</i> impregnados com ácido.....	57
Figura 26. Espectros de ultravioleta da fração solúvel em água (EPV-SA). Pré-tratamento com H ₂ SO ₄ a 0,25%.....	58
Figura 27. Espectros de ultravioleta da fração solúvel em água (EPV-SA). Pré-tratamento com H ₂ SO ₄ a 0,5%.....	58
Figura 28. Rendimentos das extrações da lignina solúvel em álcali obtidas pelo método de explosão a vapor em relação ao peso seco de substrato (esquerda) e ao teor de lignina no cavaco original (direita).....	61
Figura 29. Rendimento de recuperação total (EPV-IA + EPV-SA) dos três componentes principais: (A) lignina, (B) glucose (glucanas) e (C) xilose (xilanas), após pré-tratamento de <i>E. grandis</i> impregnado com ácido.....	63
Figura 30. Espectro de FTIR das frações tratadas a vapor derivadas de <i>E. grandis</i> pré-tratado a 210°C por 3,5 min com H ₂ SO ₄ a 0,5%.....	65
Figura 31. FTIR das ligninas acetiladas obtida após precipitação ácida. Pré-tratamento à 200°C.....	67
Figura 32. FTIR das ligninas acetiladas obtida após precipitação ácida. Pré-tratamento à 210°C.....	68
Figura 33A. Extrato dos espectros de ressonância magnética nuclear de ¹ H (RMN ¹ H) das ligninas acetiladas, relativo à região atribuída ao deslocamento químico do hidrogênio de acetatos alifáticos e acetatos aromáticos.....	72

Figura 33B. Extrato dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H) das ligninas acetiladas, relativo à região atribuída ao deslocamento químico do hidrogênio de acetatos alifáticos e acetatos aromáticos.	73
Figura 34. Perfil do teor de hidroxilas das ligninas em função do aumento do tempo de pré-tratamento (marcadores cheios, pré-tratamento a 200°C; marcadores vazios, pré-tratamento a 210°C). Losango, hidroxilas totais, quadrado, hidroxilas alifáticas e círculo, hidroxilas aromáticas.....	75
Figura 35. Perfil de eluição em cromatografia de permeação em gel das ligninas acetiladas, obtidas após precipitação ácida do extrato alcalino derivado de pré-tratamentos realizados a 200°C.....	76
Figura 36. Perfil de eluição em cromatografia de permeação em gel das ligninas acetiladas, obtidas após precipitação ácida do extrato alcalino derivado de pré-tratamentos realizados a 210°C.....	76
Figura 37. Calorimetria de varredura diferencial da fração solúvel em álcali (EPV-SA _{OH}) derivada do pré-tratamento de cavacos de <i>E.grandis</i> impregnados com ácido a 0,25% ...	79
Figura 38. Calorimetria de varredura diferencial da fração solúvel em álcali (EPV-SA _{OH}) derivada do pré-tratamento de cavacos de <i>E.grandis</i> impregnados com ácido a 0,5%	79
Figura 39. Análise multivariada dos dados obtidos por FTIR das frações insolúveis em água (quadrados) e das ligninas solúveis em álcali (asteriscos).....	86
Figura 40. Valores assumidos pelos componentes principais, CP1 e CP2, derivados da análise multivariada dos dados de FTIR das ligninas isoladas.....	87
Figura 41. Fragmentação da lignina pela quebra da ligação β -O-4.....	88

- Figura 42.** Produtos de degradação dos éteres guaiacilglicerol- (R=H) e siringilglicerol- β -guaiacil (R=OCH₃) resultantes da explosão a vapor (Tanahashi, 1990)..... 89
- Figura 43.** Formação de ligação β - β a partir de radicais livres formados durante o pré-tratamento..... 90
- Figura 44.** Distribuição de massa molecular aparente em relação ao grau de severidade (log Ro). Pré-tratamento a vapor de cavavos impregnados com H₂SO₄ a 0,25% (losangos abertos) e 0,5% (losangos fechados)..... 91
- Figura 45.** Temperaturas máximas de decomposição térmica, observadas para cada lignina isolada em relação ao grau de severidade (log Ro). O pré-tratamento foi realizado a partir de cavavos impregnados com H₂SO₄ a 0,25% (marcadores fechados) e 0,5% (marcadores abertos). Condições: 200°C (quadrados) e 210°C (losangos) 94

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Tipos e frequência das ligações existentes na lignina de faia (madeira dura) em número de ligações por 100 unidades C ₉ (Piló-Veloso <i>et al.</i> , 1993).....	17
Tabela 2. Condições utilizadas no pré-tratamento a vapor de <i>E. grandis</i>	42
Tabela 3. Caracterização química das frações EPV-IA	60
Tabela 4. Análise elementar das ligninas obtidas após precipitação ácida.....	71
Tabela 5. Fórmula C ₉ das ligninas obtidas após precipitação ácida.....	74
Tabela 6. Massa molar das ligninas obtidas após a precipitação ácida da fração solúvel em álcali (EPV-SA _{OH}).....	77

LISTA DE EQUAÇÕES**Página**

Equação 1. Cálculo para determinação do grau de severidade, com base na temperatura e no tempo de pré-tratamento.....	43
Equação 2. Cálculo para a determinação do peso seco dos cavacos e materiais pré-tratados.....	44
Equação 3. Cálculo para a determinação do teor de cinzas dos substratos e ligninas.....	47
Equação 4. Cálculo para a determinação do teor de hidroxilas totais das ligninas.....	49

RESUMO

Na parede celular das plantas superiores, as fibras de celulose estão embebidas em uma matriz extremamente rígida, composta majoritariamente por hemiceluloses e lignina. Portanto, para hidrolisar a celulose e as hemiceluloses, é preciso despolimerizar, solubilizar ou remover a lignina presente nos materiais lignocelulósicos. Dos métodos de pré-tratamento propostos na literatura, a explosão a vapor tem se revelado como um dos mais promissores para o fracionamento da madeira em seus três componentes principais, paralelamente a um aumento significativo da susceptibilidade da celulose à sacarificação ácida ou enzimática. Neste estudo, conforme já demonstrado para outros tipos de fitobiomassa, o pré-tratamento a vapor de cavacos de *Eucalyptus grandis* se mostrou bastante eficiente na separação dos três principais componentes estruturais da madeira, celulose, hemicelulose e lignina, assim como na recuperação de cada um deles em bom rendimento.

Os cavacos de *E. grandis* foram inicialmente impregnados com H₂SO₄ diluído (0,25 a 0,5%, m/v) e posteriormente pré-tratados a temperaturas de 200-210°C e tempos de residência de 2 a 5 min no reator. Maiores tempos de residência dentro do reator, particularmente sob condições mais drásticas do pré-tratamento (maiores severidades), resultaram em uma maior quantidade de glucose liberada da fração hidrossolúvel, menor recuperação de hemicelulose hidrolisada e altos rendimentos de recuperação de lignina. O melhor rendimento de recuperação da xilose (aproximadamente 70%) foi obtido após pré-tratamento dos cavacos impregnados com H₂SO₄ a 0,5% por 2 min a 210°C.

A extração alcalina, ainda que realizada à temperatura ambiente pelo tempo de apenas uma hora, resultou em rendimentos de recuperação bastante expressivos, da ordem de 80 a 90% em relação ao peso seco da fração insolúvel em água. Todas as frações lignínicas isoladas apresentaram baixo teor de carboidratos, o que simplificou a análise química devido às possíveis interferências que contaminantes deste tipo poderiam exercer.

O pré-tratamento seguido de lavagem alcalina resultou na obtenção de ligninas com diferentes propriedades químicas dependendo da condição de pré-tratamento utilizado. O aumento da severidade do pré-tratamento a 200°C acarretou uma diminuição no teor de hidroxilas (totais, alifáticas e aromáticas) presente nas ligninas isoladas, enquanto que, para pré-tratamentos efetuados a 210°C, o efeito foi reverso. A análise multivariada dos dados de FTIR indicou que a maior diferenciação química dentre as ligninas isoladas correspondeu à quantidade de ligações condensadas (menor quantidade de CH aromático) por unidade C9. Com efeito, a temperatura máxima de degradação térmica das ligninas isoladas decresceu com o aumento do grau de severidade do pré-tratamento, enquanto que a massa molecular aparente decresceu rapidamente com o aumento da severidade até um valor limite ($\log R_o$ igual a 3,78), a partir do qual foi observado um aumento que esteve provavelmente associado à reações de condensação.

De uma forma geral, estas diferenças foram interpretadas como consequência de reações de hidrólise e de condensação que ocorreram durante o pré-tratamento, cuja caracterização foi possível através de análises químicas, físico-químicas e espectroscópicas.

ABSTRACT

Pretreatment of lignocellulosic materials is essential for their efficient conversion because of the various physical and chemical barriers which greatly inhibit the accessibility of the substrate to chemical and biological catalysts. One pretreatment method that several workers have used to enhance the conversion of lignocellulosics is high pressure steaming, with or without rapid decompression (explosion). Acid-impregnated chips of *E. grandis* were steam-treated over a range of temperatures and residence times into the steam gun to evaluate the effect of pretreatment on the recovery yield of wood components (carbohydrates and lignin) and the chemical properties of the lignin component found within the wood chips.

Steam explosion of *Eucalyptus grandis* has been carried out under various pretreatment conditions (200-210°C, 2-5 min) after impregnation of the wood chips with 0.25 and 0.5% (m/m) dilute H₂SO₄. Acid-catalysed steam treatment allowed good yields of hemicellulose recovery (mostly as xylose) in the water-soluble fraction, as well as a relatively high susceptibility to hydrolysis of the water-insoluble fraction. Formation of dehydration by-products (furfural and hydroxymethylfurfural) and water-soluble chromophores (lignin-carbohydrate complexes) was monitored in the water soluble fraction by UV spectroscopy and their concentration increased with pretreatment severity. Klason lignin of steam-treated substrates also varied according to pretreatment severity.

Longer residence times into the steam gun seemed to impair more drastic pretreatment conditions (greater severities) to the wood chips. This was apparent from the greater amount of glucose released in the water-solubles, lower hemicellulose recovery and lignin yields beyond 100% when pretreatment was carried out for longer residence times of 5 min. The best possible xylose recovery yield (nearly 70%) was obtained after pretreating 0.5% H₂SO₄-impregnated wood chips for 2 min at 210°C.

The effect of alkali washing on the chemical composition of steam-treated substrates and the physical characterization of the alkali-soluble lignin obtained at each pretreatment condition were also assessed in this study. FTIR spectroscopy allowed a direct observation of the pretreatment effect on the chemical composition of the wood chips, particularly after the alkali washing step. Klason lignin of steam-treated and alkali-washed substrates varied

accordingly to pretreatment severity. Higher pretreatment temperatures and residence times resulted in a more extensive depolymerization of lignin. This was apparent from their analysis by differential scanning calorimetry, where a gradual decrease in the temperature required for lignin fragmentation was observed. On the other hand, lignin condensation also occurred at higher residence times in the steam gun and this was shown to be greater than the effect derived from increasing the pretreatment temperature.

A considerable increase in the susceptibility of the water-insoluble fraction to alkali extraction was observed towards higher pretreatment severities, with the best lignin yield obtained after alkali-washing of 0.5% H₂SO₄-impregnated wood chips that had been steam-treated for 2 min at 210°C. Therefore, alkali-washing resulted in steam-treated substrates with higher cellulose content, thus increasing their theoretical yield to fermentable sugars through saccharification and/or fermentation. On the other hand, the lignin component obtained after steam explosion and mild alkali-washing is still suitable for conversion to chemical products. Therefore, aside from maximum hydrolysis yield and xylan recovery, pretreatment optimization should include lignin recovery in an active form to evaluate its probable use as a raw material for industrial applications.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A biomassa vegetal é a mais abundante fonte orgânica na Terra e a quantidade total de madeira hoje disponível na biosfera está estimada em $1,8 \times 10^{12}$ toneladas, o que aproximadamente corresponde à quantidade também estimada de depósitos fósseis (Wilke, 1975). Além disso, a fitobiomassa é um recurso renovável, porque resulta da fixação da energia solar através da fotossíntese. Algumas estimativas sugerem que a produção anual de biomassa, a nível mundial, seja de $7,4 \times 10^{10}$ ton/ano, o que corresponde a quase dez vezes o consumo anual de óleo ou cinco vezes o consumo anual de madeira (Hall, 1979). Desta forma, a biomassa tem importância estratégica como fonte renovável de energia e insumos químicos, particularmente devido a escassez de energia em que nos encontramos atualmente.

Ainda no início da década de 80, vários autores consideravam improvável que a biomassa viesse a substituir totalmente os derivados de petróleo. No entanto, de lá para cá, vários estudos têm demonstrado a possibilidade de se utilizar uma grande variedade de materiais lignocelulósicos, tais como resíduos agrícolas (bagaço de cana de açúcar, cascas de cereais) e resíduos florestais, para a produção de energia e insumos químicos (Goldstein, 1981a,b; Foody e Foody, 1991; Ramos, 1992; Silva, 1995).

Um exemplo destes estudos refere-se ao emprego do etanol como combustível automotivo, o qual é baseado na utilização de recursos renováveis como a cana-de-açúcar. Mais recentemente, a conversão de resíduos celulósicos, derivados da indústria madeireira ou de atividades agro-industriais, tem sido proposta como uma alternativa à produção de etanol (Wright *et al.*, 1987). O interesse nesta área é justificado pela abundância de materiais lignocelulósicos disponíveis no mundo inteiro. Entretanto, a oportunidade de utilizarmos materiais lignocelulósicos como substrato para produção de

biomoléculas de interesse comercial é comprometida pelo fato de que os polissacarídeos de origem vegetal não são passíveis de uma sacarificação eficiente, a menos que sejam submetidos a um pré-tratamento para que estes possam ser hidrolisados a seus açúcares componentes.

A biomassa vegetal é majoritariamente constituída por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e um polímero fenólico (lignina), que por sua vez constituem a parede celular de plantas superiores e podem ser convertidos a alimentos, rações, combustíveis líquidos e matérias-primas para a indústria química. No final da década de 70, as indústrias químicas de sacarificação de madeira (Parisi, 1989), preparação de ração para gado (Guenter e Forsberg, 1972) e de insumos químicos (biorefinarias) (Myerly *et al.*, 1981) já promoviam o desenvolvimento de tecnologia para conversão dos materiais lignocelulósicos. Como a forte associação entre celulose, hemiceluloses e lignina sempre dificultou o aproveitamento destas matérias-primas, a deslignificação passou a representar um dos passos mais importantes para a viabilidade de um processo industrial baseado na conversão de biomassa.

1.1 A Estrutura da Madeira

A dificuldade de se converter os materiais lignocelulósicos em insumos químicos se deve a suas características morfológicas e estruturais. Os materiais lignocelulósicos são compostos de microfibrilas de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de hemicelulose e lignina. Esta matriz amorfa age como uma barreira natural ao ataque de microorganismos e/ou enzimas (Fengel e Wegener, 1989). As características estruturais dos materiais lignocelulósicos e seus três componentes principais, celulose, hemiceluloses e lignina, serão apresentados a seguir.

1.1.1 Celulose

A celulose é a substância natural de maior importância na natureza por constituir a base estrutural da parede celular de plantas. Desta forma, considerando-se que os vegetais correspondem a maior parte dos organismos vivos existentes na crosta terrestre, a celulose representa o polímero de maior ocorrência natural, com uma disponibilidade total da ordem de 20 a 30 x 10¹⁰ toneladas (Fengel e Wegener, 1989).

A celulose encontra-se presente nas mais variadas formas de vida terrestre, desde vegetais superiores a organismos primitivos tais como as bactérias. Entretanto, a quantidade de celulose encontrada nestes organismos varia significativamente, desde os 95 a 99% do algodão e os 80 a 85% da fibra de rami até a faixa dos 20 a 25% de vários tipos de bactérias, protozoários e algas-marinhas (Young, 1986). Dentre os organismos aeróbicos e anaeróbicos capazes de sintetizar celulose extracelular, são dignas de menção os do gênero *Acetobacter* spp. (*A. xylinum* e *A. pasteurianus estunensis*) e as espécies *Valonia ventricosa* e *Sarcina ventriculi*.

Sem sombra de dúvidas, a madeira constitui a maior fonte de celulose na natureza. Nela, a celulose encontra-se em proporções da ordem de 45%, tanto em madeiras moles (gimnospermas ou coníferas) quanto em madeiras duras (angiospermas ou folhosas) (Fengel e Wegener, 1989). No entanto, a separação e extração da celulose existente na madeira é complicada pela sua íntima associação com hemicelulose e lignina, razão pela qual processos como aqueles utilizados na indústria papelreira necessitam de condições operacionais bastante drásticas, necessárias e suficientes para produzir fibras com qualidade apropriada à confecção do papel e outros produtos.

A celulose é um homopolissacarídeo linear composto por unidades de D-

técnicas de hidrólise ácida, metilação e degradação parcial ainda no início do século (décadas de 20 e 30). Tal estrutura primária confere à celulose características e propriedades bastante peculiares, que podem ser facilmente justificadas pela análise conformacional das unidades que compõem o homopolímero e pelo tipo de ligação glicosídica envolvida em sua constituição (Fengel e Wegener, 1989; Solomons, 1996).

Apesar de constituída apenas por unidades de glucose, estudos mais elaborados da estrutura deste homopolímero demonstraram que a celobiose (*O*-4- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranoose) é o seu verdadeiro elemento estrutural (Sarko, 1986). Isto se deve ao fato de que a estereoquímica da ligação β (1-4) exige que cada nova unidade de glucose sofra uma rotação de 180° em torno de seu eixo longitudinal, fazendo com que o elemento básico de simetria da celulose se repita a cada segunda unidade de glucose substituída ao longo da molécula (Figura 1).

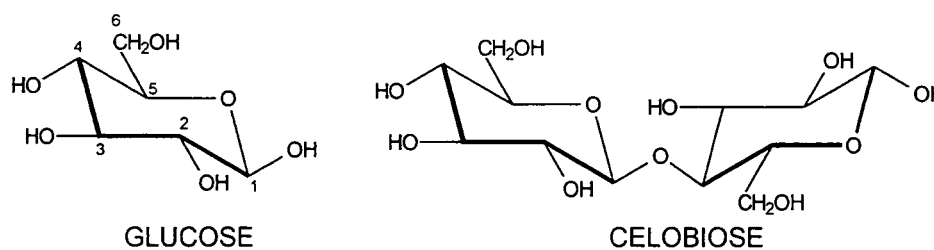


Figura 1. Elementos estruturais da celulose.

Uma importante característica da molécula de celulose é a diferenciação que existe entre os seus grupamentos terminais, a exemplo de quaisquer outros polissacarídeos existentes na natureza. Em uma das extremidades, encontra-se o grupamento hidroxílico do carbono C-4 e as propriedades químicas desta hidroxila alcoólica conferem a este terminal o nome de **terminal não redutor** da molécula. Em contrapartida, na outra extremidade da molécula encontra-se o seu **terminal redutor** e

nele pode-se observar a **mutarrotação** (Figura 2), fenômeno bastante conhecido que caracteriza esta classe de compostos orgânicos (Baker e Engel, 1992; Solomons, 1996). Genericamente, o carbono que possui propriedades redutoras em um carboidrato é denominado de **carbono anomérico** e o princípio de anomericidade ou mutarrotação é caracterizado pela abertura e fechamento do anel hemiacetálico em meio aquoso, gerando dois isômeros de posição em C-1 (epímeros), ou seja, há possibilidade de haver substituições hidroxílicas axiais e equatoriais em C-1, gerando respectivamente, as formas anoméricas alfa e beta. É importante salientar que, devido a sua maior reatividade, reações não enzimáticas de degradação ou depolimerização ocorrem comumente a partir do terminal redutor da molécula (Fengel e Wegener, 1989; Solomons, 1996).

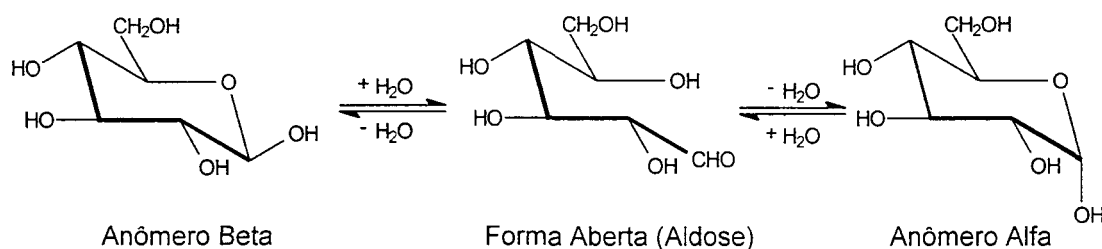


Figura 2. Mutarrotação

Sabe-se que a β -D-glucose (peso molecular de 180 unidades de massa atômica, u.m.a.) é o carboidrato ou poli-hidroxialdeído mais estável que se encontra na natureza. Isto se deve basicamente ao fato de que todas as hidroxilas existentes no anel hemiacetálico assumem uma posição equatorial ao plano do anel (Figura 3), condição esta de muito maior estabilidade conformacional que a posição axial cuja orientação perpendicular ao plano do anel gera tensões comumente interpretadas como fatores de instabilidade conformacional (Solomons, 1996). Com a orientação equatorial das

hidroxilas, distribuídas lateralmente a uma conformação piranosídica do anel em cadeira do tipo 4C_1 , a molécula da β -D-glucopiranosose adquire uma disposição *quasi*-planar que, ligada a outras unidades β -D-glucopiranosídicas por ligações do tipo (1-4), permite a obtenção de oligômeros (ou oligossacarídeos) lineares capazes de alinharem-se uns aos outros formando estruturas organizadas estabilizadas por pontes de hidrogênio inter e intramoleculares (Figura 4). Quanto maior a extensão do oligômero, medida através de seu grau de polimerização (número de unidades anidroglucopiranosídicas existentes na molécula), maior a estabilidade do agregado formado cuja estrutura supramolecular confere ao seu interior uma característica bastante hidrofóbica, enquanto que a superfície do agregado caracteriza-se por um caráter hidrofílico pronunciado. Termodinamicamente, existe um limite para o crescimento e organização deste agregado molecular para-cristalino, a partir do qual a organização é perdida e as moléculas passam a adquirir um direcionamento randômico. A estas regiões de menor organização estrutural dá-se o nome de regiões amorfas e o processo gradual de conversão da celulose cristalina a celulose amorfa é denominado de amorfogênese ou mercerização (Fengel e Wegener, 1989).

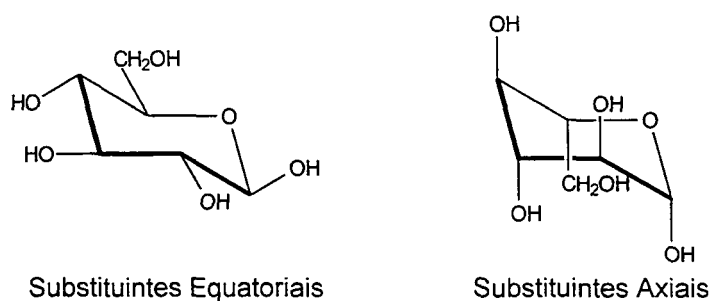
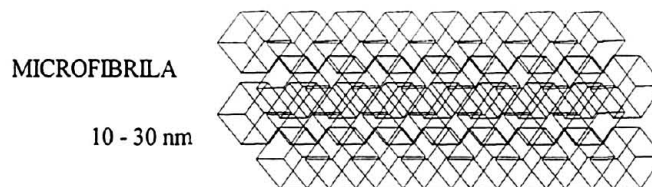
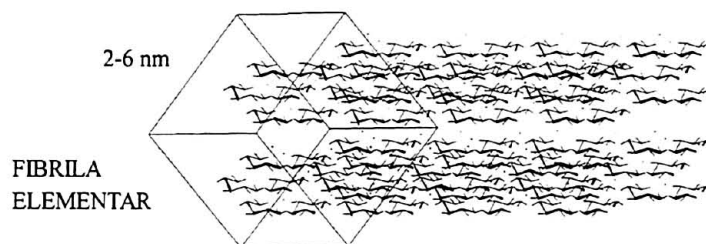
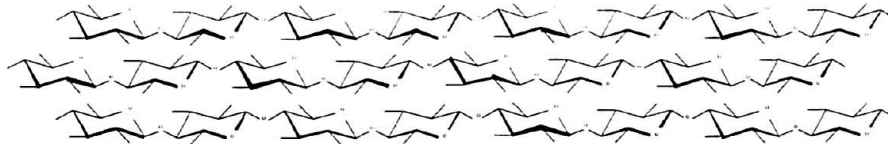
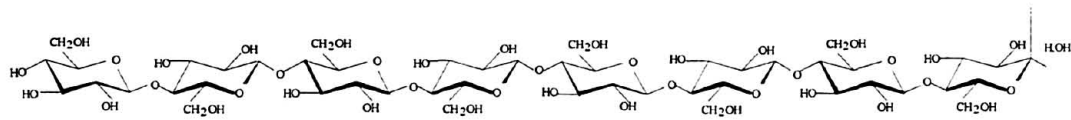


Figura 3. Substituintes em anéis piranosídicos.



FIBRA DE CELULOSE (Camada S-2)

Organização estrutural gerada pela associação de microfibrilas que, por sua vez, encontram-se associadas uma às outras por uma matriz amorfa



Espessura aproximada até o lúmen: 4 - 5 μm
Comprimento da fibra para papel: 1 - 4 mm

Figura 4. Organização estrutural da celulose, conforme modelo proposto por Ramos, L. P. (contribuição pessoal).

1.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses (polioses), juntamente com a celulose, são os principais polissacarídeos encontrados na parede celular vegetal. No entanto, a proposição de uma definição concreta para o termo hemicelulose é uma tarefa relativamente difícil, levando-se em consideração a sua complexidade, diversidade de constituintes monoméricos e polidispersão ao longo de sua grande variedade dentre os vegetais superiores. Dessa maneira, as hemiceluloses podem ser consideradas mais caracteristicamente como uma família de polissacarídeos presentes na parede celular vegetal.

O termo hemicelulose foi primeiramente utilizado por E. Schulze em 1891 para designar polissacarídeos precursores da celulose. No entanto, sabe-se atualmente que isto não é verdadeiro e que as rotas envolvidas na biossíntese desses dois polissacarídeos são distintas (Fengel e Wegener, 1989; Sjöström, 1992). Outra alternativa foi considerar as hemiceluloses como aqueles polissacarídeos isolados da fitobiomassa por extração alcalina. Isto acabou apresentando pouca sustentação já que também a água quente pode solubilizar polissacarídeos tidos como hemiceluloses. Atualmente, as hemiceluloses são genericamente definidas como polissacarídeos não-amiláceos e não-celulósicos que podem ser extraídos da parede celular dos vegetais superiores (Fengel e Wegener, 1989; Sjöström, 1992).

As hemiceluloses são polissacarídeos que apresentam algumas características peculiares. Na sua composição monomérica, podem estar presentes unidades distintas de pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose nas suas formas furanosídicas ou piranosídicas), hexoses (β -D-glucose, β -D-manose e α -D-galactose), ácidos urônicos (ácido β -D-glucurônico, ácido α -D-4-O-metilglucurônico e ácido α -D-galacturônico), além de

deoxi-açúcares (α -L-ramnose e α -L-fucose) (Fengel e Wegener, 1989; Sjöström, 1992).

Na Figura 5, são apresentadas as fórmulas estruturais desses açúcares.

Os diferentes arranjos, possibilitados pela presença de diferentes unidades monoméricas com várias hidroxilas passíveis de serem esterificadas, permite com que a cadeia principal dos polissacarídeos apresente ramificações. Assim sendo, dentre os vários tipos de polissacarídeos isolados como hemiceluloses, encontramos heteropolímeros ramificados tais como as arabinogalactanas (arabinose, galactose) e as glucuronoarabinoxilanas (ácido glucurônico, arabinose, xilose). Outra característica interessante dessas unidades monoméricas é que, em muitos casos, ocorre a presença de grupamentos acetil nas posições C₂, C₃ ou C₂ e C₃ do anel hemiacetálico. Em face dessa diversidade estrutural, as oportunidades de formação de pontes de hidrogênio entre cadeias de hemiceluloses são relativamente restritas, dificultando a formação de regiões com alto grau de ordenamento, a exemplo do que ocorre com homopolímeros lineares como a celulose. Por outro lado, as hemiceluloses apresentam associação covalente com outro importante componente da parede celular vegetal, a lignina, e isto se dá através de algumas de suas unidades estruturais.

Comparadas à celulose, as hemiceluloses apresentam grau de polimerização bastante inferior, que normalmente não ultrapassa as 200 unidades. As variações observadas no grau de polimerização das hemiceluloses depende muito do polissacarídeo em si e também da forma de isolamento utilizada, já que não é possível estudá-lo adequadamente em seu estado natural na parede celular das plantas.

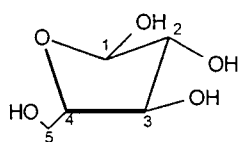
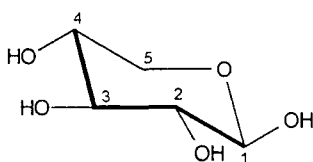
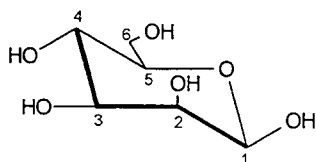
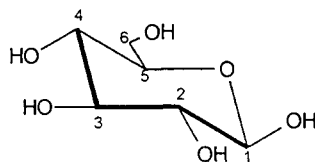
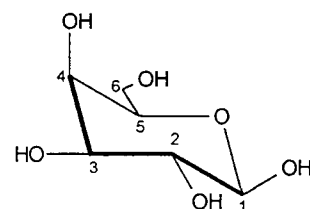
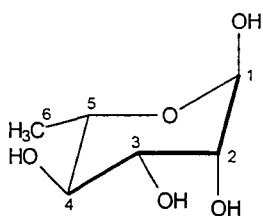
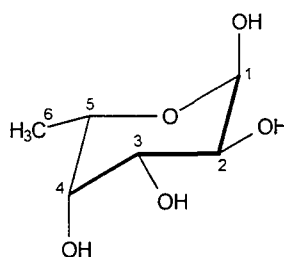
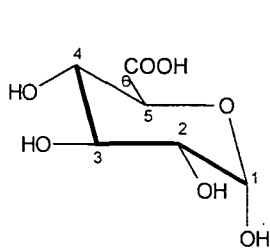
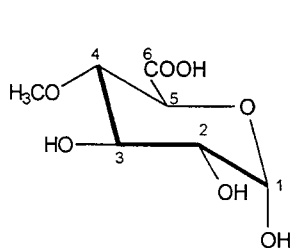
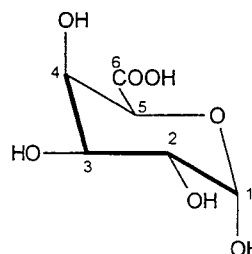
Pentoses α - L - arabinofuranose β - D - xilopiranosose**Hexoses** β - D - manopiranosose β - D - glucopiranosose β - D - galactopiranosose**6-Deoxi-hexoses** α - L - ramnopiranosose α - L - fucopiranosose**Ácidos Urônicos**ácido α - D - gluco
piranosídicoácido 4 - O - metil - α - D -
glucopiranosídicoácido α - D - galacto-
piranosídico

Figura 5. Representação das fórmulas estruturais das unidades monoméricas encontradas nas hemiceluloses.

As hemiceluloses são suscetíveis à hidrólise ácida ou básica, sendo esta característica aproveitada para o desenvolvimento de aplicações onde as hemiceluloses devam ser solubilizadas ou removidas do material original. Os mais tradicionalmente utilizados têm sido os ácidos sulfúrico, clorídrico e fosfórico (Deschamps *et al.*, 1996). Entretanto, outros tipos de pré-tratamento, baseados na hidrólise alcalina parcial das hemiceluloses, têm sido propostos. Vale lembrar que a utilização de álcali (NaOH), no chamado processo kraft, é ainda a forma mais utilizada na obtenção de polpa de celulose junto à indústria de papel.

É grande a diversidade de formas com que os polissacarídeos das hemiceluloses podem se apresentar, considerando-se a espécie vegetal, o tecido e a camada em que se encontram na célula vegetal. Em função disto, os valores relativos à participação das hemiceluloses na composição dos vegetais são bastante variados. Em termos gerais, as hemiceluloses participam nas madeiras em 20 a 30% da composição total, enquanto nas gramíneas estes valores podem variar de 20 a 40% (Sjöström, 1992).

Ainda em termos de diversidade de espécies, também as chamadas madeiras moles (coníferas ou gimnospermas) diferem das madeiras duras (folhosas ou angiospermas dicotiledônias) em relação ao componente hemicelulósico. As hemiceluloses características das madeiras moles são as *O*-acetil-galactoglucomanas, as arabino-4-*O*-metilglucuronoxilanas (heteroxilanas) e, eventualmente, as arabinogalactanas (Fengel e Wegener, 1989; Sjöström, 1992; Terashima *et al.*, 1993). As galactoglucomanas representam cerca de 20% das hemiceluloses nas madeiras moles. Sua cadeia principal está formada por unidades de D-glucopiranosose associadas por ligações $\beta(1-4)$ a unidades de D-manopiranosose. As unidades de galactose se associam à cadeia principal através de ligações $\alpha(1-6)$, enquanto algumas hexoses apresentam a hidroxila de C₂ ou C₃ substituídas por grupamentos acetil, conforme representado na

Figura 6. As xilanas compõem cerca de 5 a 10% das hemiceluloses das madeiras moles, cuja cadeia principal está formada por unidades de β -D-(1-4)-xilopiranosose. Esta cadeia apresenta-se parcialmente substituída por unidades de ácido 4-O-metil- α -D-glucurônico e unidades de α -L-arabinofuranose, conforme pode ser observado na Figura 7. As arabinogalactanas são componentes minoritários, solúveis em água, apresentando como cadeia principal as unidades de D-galactopiranosose unidas por ligações do tipo β (1-3). Esta cadeia apresenta-se parcialmente substituída em C₆ por unidades de β -D-galactopiranosose ou L-arabinose, nas formas α e/ou β em conformação furanosídica ou piranosídica, como apresentados na Figura 8.

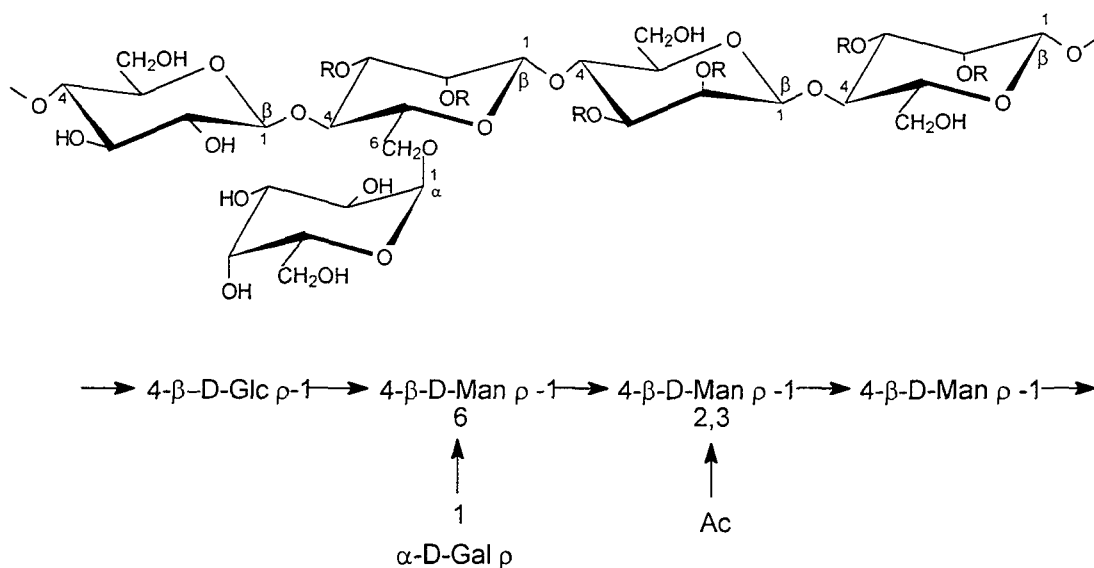


Figura 6. Representação estrutural das galactoglucomananas com suas respectivas unidades monoméricas: β -D-glucopiranosose (Glc ρ); β -D-manopiranosose (Man ρ); β -D-galactopiranosose (Gal ρ). R=CH₃CO (acetil) ou H. Fonte: Sjöström, (1992).

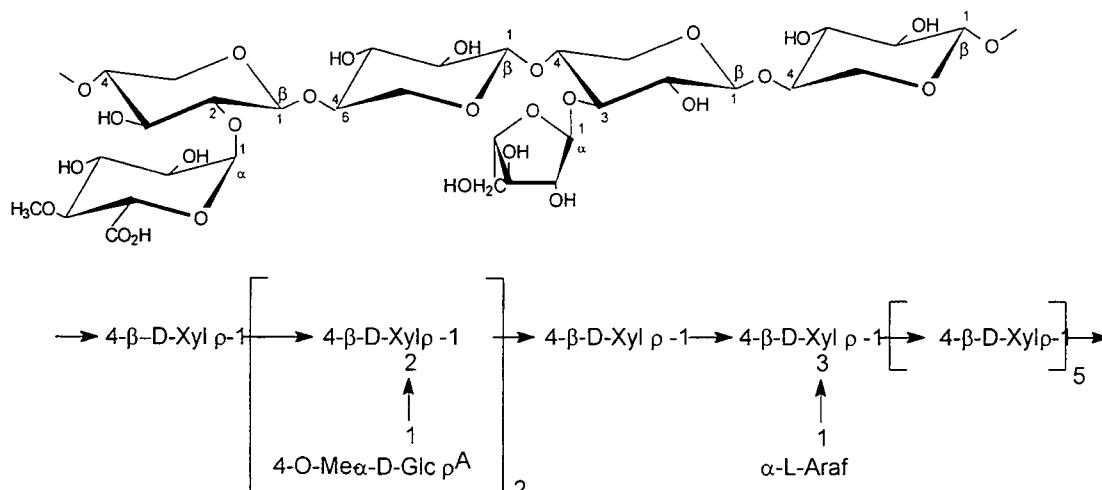


Figura 7. Representação da estrutura das arabinoglucuroxilanas com suas respectivas unidades monoméricas: β -D-xilopiranosose (Xyl_p); ácido 4-O-metil- α -D-glucopiranosil urônico (Glc_pA); α -L-arabinofuranose ($Araf$).
Fonte: Sjöström, (1992).

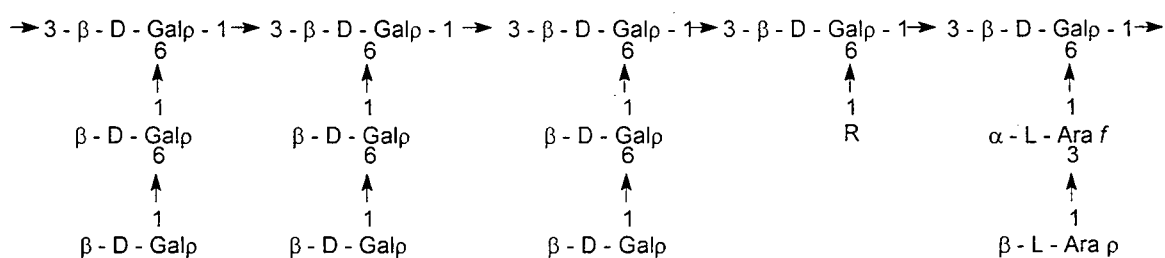


Figura 8. Representação da estrutura das arabinogalactanas com suas respectivas unidades monoméricas: β -D-galactopiranosose (Gal_p), β -L-arabinopiranosose (Ara_p) e α -L-arabinofuranose ($Araf$). R pode ser β -D-galactopiranosose (Gal_p) ou, menos freqüentemente, α -L-arabinofuranose ($Araf$) e ácido β -D-glucopiranosil urônico (Glc_pA). Fonte: Sjöström, (1992).

Nas madeiras duras, as hemiceluloses se caracterizam pela presença das xilanas, cujo principal representante são as *O*-acetil-4-*O*-metil- β -D-glucuronoxilanas (Fengel e

material. A cadeia principal está formada por unidades de D-glucopiranosose e D-manopiranosose unidas por ligação do tipo $\beta(1-4)$.

As hemiceluloses das gramíneas apresentam basicamente os mesmos tipos de polissacarídeos descritos anteriormente, diferindo obviamente em composição percentual e peculiaridades estruturais de acordo com a espécie ou parte da planta que está sendo estudada.

Além da diversidade de arranjos que os diferentes componentes monoméricos podem assumir, as hemiceluloses interagem diretamente com a lignina. A lignificação da parede celular é um processo natural que se acentua com o amadurecimento fisiológico da planta, garantindo maior rigidez e sustentação ao vegetal.

1.1.3 Lignina

A palavra lignina vem do latim *lignum*, que significa madeira. Foi introduzida por Schultz, em 1857, para designar o material que hoje se sabe ser o segundo mais abundante do reino vegetal, logo depois da celulose. A lignina só não está presente em vegetais primitivos como fungos, algas e líquens não lignificados. Além da proteção contra a ação de microorganismos, a lignina é também responsável pela resistência mecânica e pelo transporte de nutrientes, água e metabólitos em plantas vasculares. Estudos associados à caracterização deste polímero vêm despertando interesse desde os trabalhos de Anselme Payen, em 1838, e, principalmente, após o desenvolvimento dos processos de polpação da madeira iniciados em 1860, pois o conhecimento de sua estrutura química é de fundamental importância para a evolução dos processos de polpação e de branqueamento da polpa. Desde então, diferentes estudos foram desenvolvidos para elucidar sua constituição química, biossíntese e distribuição nos vegetais (Pilo-Veloso *et al.*, 1993).

Sendo um constituinte cuja abundância na madeira pode atingir até 30%, dependendo da espécie vegetal, as ligninas são obtidas em larga escala como subproduto da indústria de polpação. No entanto, seu aproveitamento ainda é limitado ao uso como fonte de energia em alto-fornos e vários laboratórios vêm desenvolvendo alternativas para dar-lhe um aproveitamento mais nobre.

A lignina corresponde a uma rede polimérica tridimensional formada por várias unidades fenilpropanóides interligadas aleatoriamente por ligações carbono-carbono e/ou éter. As unidades monoméricas que podem compor a molécula de lignina são mostradas na Figura 10. A molécula base ou bloco construtivo da lignina é a unidade fenil-propano. Assim, a **fórmula mínima** C_9 passou a ser amplamente utilizada na literatura científica para expressar o resultado de sua análise elementar na forma de, por exemplo, $C_9H_xO_y$.

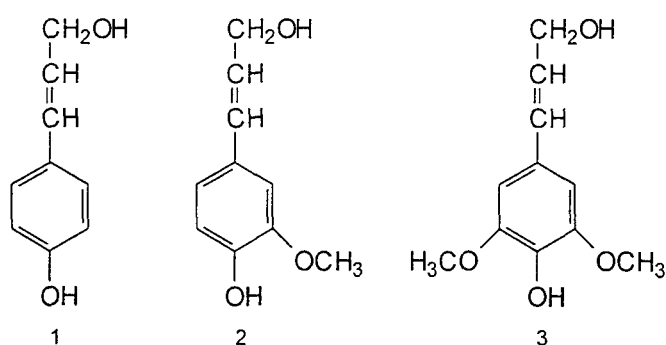


Figura 10. Estrutura dos álcoois precursores da lignina: 1- álcool p-cumarílico; 2- álcool coniferílico; e 3- álcool sinapílico.

A estrutura da lignina é bastante complexa e possui vários tipos de ligações químicas (Figura 11). As principais ligações e a frequência com que ocorrem na estrutura da lignina de faia estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Tipos e frequência das ligações existentes na lignina de faia (madeira dura) em número de ligações por 100 unidades C₉ (Piló-Veloso *et al.*, 1993).

Ligação	Frequência	Nº da unidade na Figura 11
β -O-4	65	4/5, 2/9, 10/11, 23/24
α -O-4	4,7	1/2, 3/4, 8/9, 13/14
β -5	6	14/15, 24/25
β -1	15	2/3, 7/8, 11/12, 18/19
5-5	2,3	9/10
4-O-5	1,5	5'/6'
β - β	5,5	9'/10'

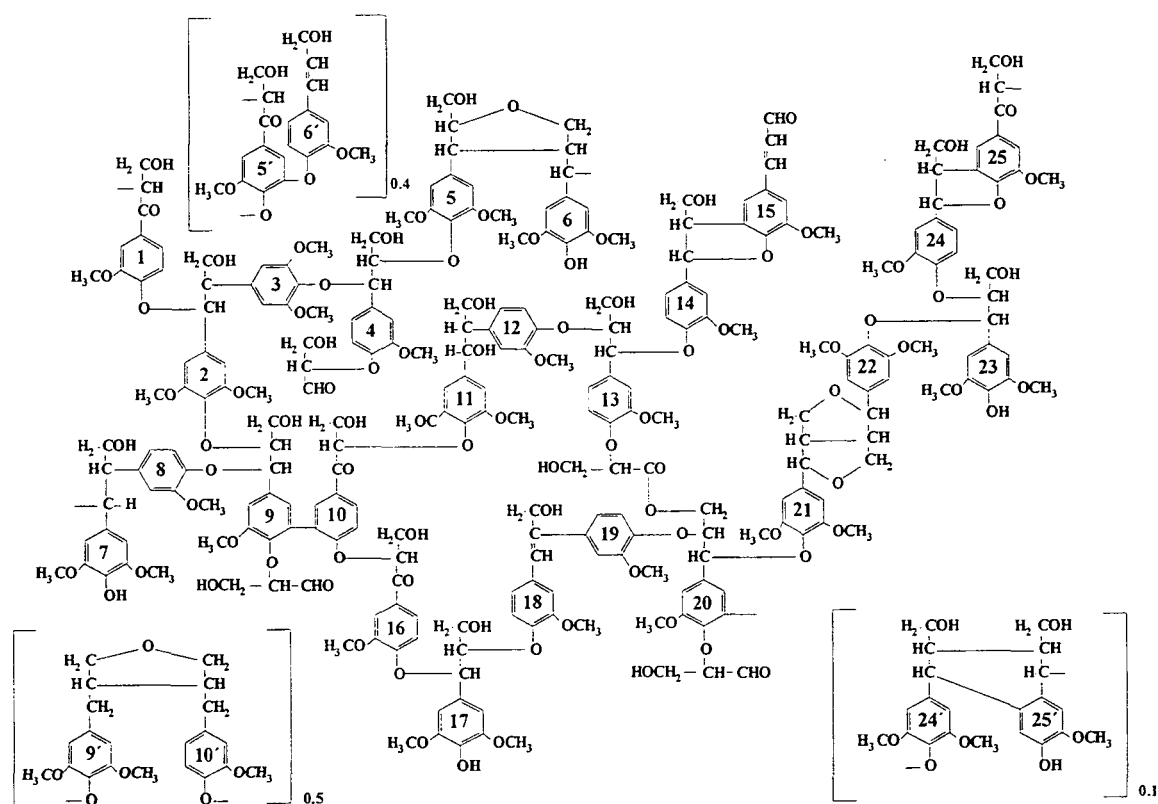


Figura 11. Modelo estrutural da lignina de faia (Nimz, 1974, citado por Fengel and Wegener, 1989).

As ligninas presentes nos vegetais diferem entre si pelo **grau de metoxilação** dos monômeros e pelo grau de ligação carbono-carbono entre os mesmos (Goldstein, 1981a). Nas **coníferas** (madeiras moles, como por exemplo o *Pinus spp*) ocorre a predominância do álcool coniferílico, enquanto que nas **folhosas** (madeiras duras, como por exemplo o *Eucalyptus spp*), encontram-se também unidades de álcool sinapílico em teor equivalente (Higuchi, 1985, 1990). Baseado nesta diferença, a lignina de coníferas é freqüentemente denominada de **lignina guaiacila** (tipo G), enquanto que a de folhosas é denominada de **lignina guaiacil-siringila** (tipo GS). Devido a importância do grupamento metoxílico, o uso da fórmula mínima como $C_9H_xO_y(OCH_3)_z$ passou a ser também bastante comum na literatura.

A lignina também está ligada a carboidratos presentes nos vegetais. Complexos poliméricos de lignina-carboidratos (ou glico-lignina) foram isolados e alguns já caracterizados (Higuchi, 1985, 1990). Por outro lado, o rompimento dessas ligações é especialmente importante nos processos de separação da lignina dos polissacarídeos da madeira. Como as reações envolvidas não são suficientemente seletivas, é fácil entender que a lignina (ou glico-lignina) obtida apresenta alta polidispersidade e nunca corresponderá à molécula originalmente presente no vegetal. À molécula de lignina nativa se dá o nome de **protolignina**.

A interação do componente lignínico com xilanas e glucomanas se dá principalmente através de ligações do tipo éster benzílico, éter benzílico (ambas estáveis em álcali) e fenil glicosídicas (Fengel e Wegener, 1989). Tem sido genericamente aceito que a arabinose e o ácido 4-*O*-metilglucurônico nas xilanas, e a galactose nas galactoglucomanas, são os elementos de ligação das hemiceluloses com a lignina (Fengel e Wegener, 1989).

A interação da lignina com hemiceluloses é tida como barreira para a degradação da parede celular, seja por processos químicos ou enzimáticos (Fengel e Wegener, 1989; Sjöström, 1992; Ralph e Helm, 1993; Hatfield, 1993). O isolamento do ácido diferúlico tem levado à hipótese de que sua possível associação com polissacarídeos poderia se constituir em um importante elemento de limitação para a digestão da parede celular vegetal (Hartley *et al.*, 1990). Portanto, sempre que se pensar em processos que visem o isolamento e aproveitamento das hemiceluloses, deve-se ter em mente que sua associação com a lignina constitui-se em uma importante barreira.

Atualmente, a lignina está sendo usada em uma grande variedade de aplicações industriais, como combustível sólido para caldeiras, resinas fenólicas, poliésteres, espumas de poliuretano e isolantes, dispersantes e surfactantes, além de material precursor para a obtenção de compostos fenólicos de baixa massa molecular (vanilina, catecóis, etc) (Glasser, 1981; Gandini, 1992).

1.1.3.1. Estrutura química das moléculas de lignina

Investigações mais antigas (Higushi, 1958, citado por Argyropoulos *et al.*, 1997), somadas aos mais recentes resultados de Harkin e Obst (Harkin *et al.*, 1973, citados por Argyropoulos *et al.*, 1997), têm mostrado que a polimerização desidrogenativa de monômeros de lignina em plantas é causada por uma classe de enzimas chamadas de peroxidases. Essas enzimas são capazes de extrair um próton da hidroxila fenólica das moléculas do precursor, criando radicais livres que são estabilizados por ressonância. Portanto, a reação de desidrogenação envolve peróxido de hidrogênio como o substrato aceptor de elétrons para a peroxidase. Além disso, sugere-se que radicais superóxidos sejam formados via redução do oxigênio pela NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) (Gross *et al.*, 1977, citados por Argyropoulos *et al.*, 1997). Exemplos

desses radicais, com base no modelo do álcool coniferílico, são apresentadas na Figura 12 (Fengel and Wegener, 1989; Argyropoulos *et al.*, 1997).

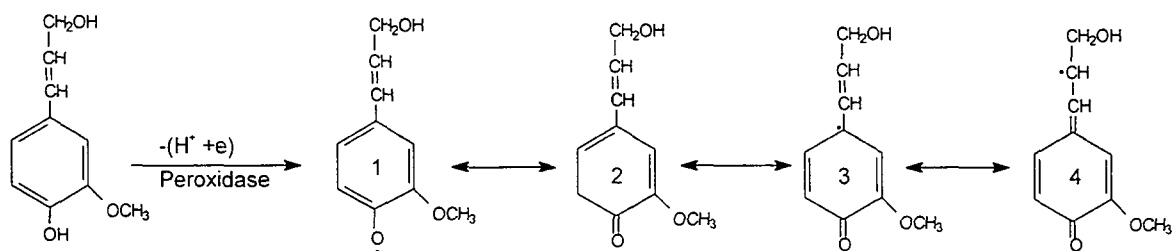


Figura 12. Formas de ressonância do radical fenoxi derivado do álcool coniferílico.

Após a oxidação dos álcoois monoméricos para radicais fenóxi, a rota biossintética da lignina muda drasticamente, pois as reações passam a não ser mais sujeitas ao controle enzimático mas sim, a um processo de polimerização randômica (Argyropoulos *et al.*, 1997).

O maior triunfo na química de lignina foi o sucesso de Freudenberg em providenciar evidências experimentais para a teoria da polimerização desidrogenativa iniciada por enzimas. Isto se tornou possível pela polimerização do álcool coniferílico a um polímero de lignina conhecido como DHP usando lacases e outras enzimas oxidativas produzidas pelo fungo *Psalliota campestris* (Dean *et al.*, 1994, citados por Argyropoulos *et al.*, 1997). Novas tentativas para sintetizar a lignina DHP, usando o sistema peroxidase/H₂O₂, foram realizados com sucesso por Freudenberg e Sarkanen (Freudenberg *et al.*, 1968, 1982 e Sarkanen, 1971, citados por Argyropoulos *et al.*, 1997). Quando a polimerização *in vitro* foi interrompida, estruturas de dímeros e oligômeros intermediários foram isolados e estruturalmente caracterizados como modelos de lignina (Nimz, 1974 e Freudenberg *et al.*, 1964, citados por Argyropoulos *et*

al., 1997). Estes e outros experimentos, envolvendo o álcool sinapílico, sugerem um mecanismo casual para a polimerização dos radicais fenóxi.

O processo de polimerização procede com o acoplamento radicalar das diferentes formas estabilizadas por ressonância. Entre os produtos, quinonas altamente reativas (Figura 13) são formadas as quais reagem pela adição de vários nucleófilos. Reações de troca de radicais livres, como a abstração do hidrogênio de outras moléculas, também são possíveis neste modelo (Freudenberg *et al.*, 1955, 1963, citados por Argyropoulos *et al.*, 1997).

A reatividade de cada radical e a probabilidade de uma forma mesomérica formar uma ligação em particular depende de sua densidade eletrônica e de considerações estéricas. Cálculos de densidade eletrônica em modelos estruturais de lignina guaiacólica (Martensson e Karlson, 1969, citados por Argyropoulos *et al.*, 1997) têm mostrado que a densidade eletrônica é mais alta em sítios específicos dentro da unidade fenilpropano. Estes sítios reativos (Figura 12) correspondem às posições C₁ e C₅ da unidade fenilpropano, o oxigênio fenóxi e o carbono β. Como o oxigênio fenóxi e o carbono β são as espécies mais reativas da unidade C₉, há uma grande abundância de ligações β-O-4 tanto em ligninas de madeiras moles (50%) quanto de madeiras duras (60%).

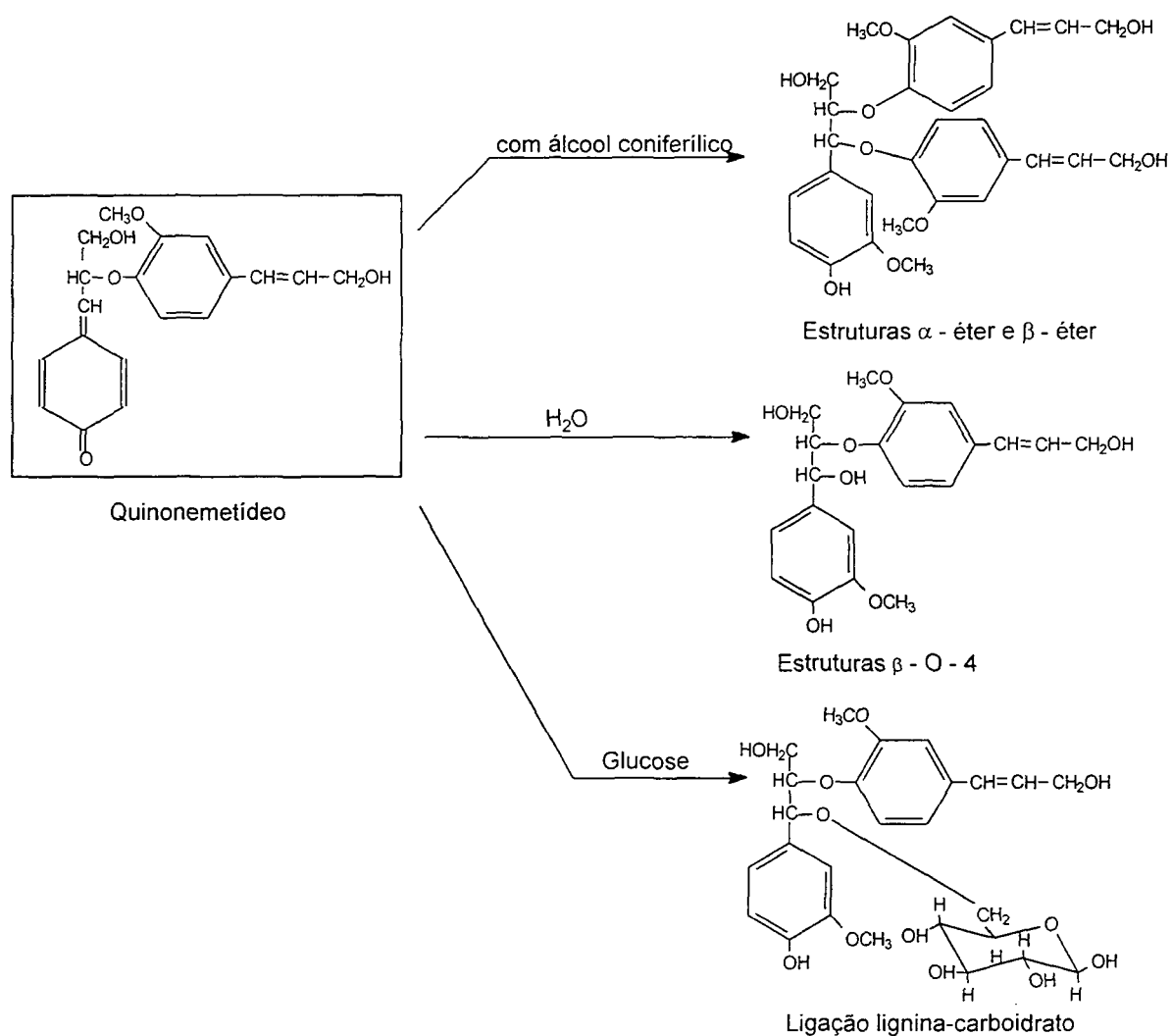


Figura 13. Reações de adição em quinonas levando à formação de várias unidades intermediárias e tipos de ligações em lignina.

O primeiro dímero de lignol a ser isolado e identificado foi uma estrutura fenil cumarânica análoga à do álcool desidrodiconiferílico. Esta estrutura, a qual compreende aproximadamente 10% das unidades de lignina, é formada pelo acoplamento de dois radicais livres do álcool coniferílico localizados nas posições C_5 e C_β da unidade C_9 (Estruturas 2 e 4 na Figura 12), levando a um dímero de quinonemetídeo. Este acoplamento, seguido pela aromatização do anel, permite a formação de uma ligação α -

O-4 (Figura 14). A ligação C_{β} - C_5 assim formada é geralmente muito estável frente a condições de polpação, contanto que seu grupo fenólico esteja eterificado.

Outro modelo de ligação que ocorre em lignina é a chamada unidade diarilpropano ou estrutura β -1 (Figura 15). Estas estruturas correspondem a aproximadamente 5-10% do total de unidades fenilpropano e podem ser consideradas relativamente estáveis frente a condições de polpação alcalina.

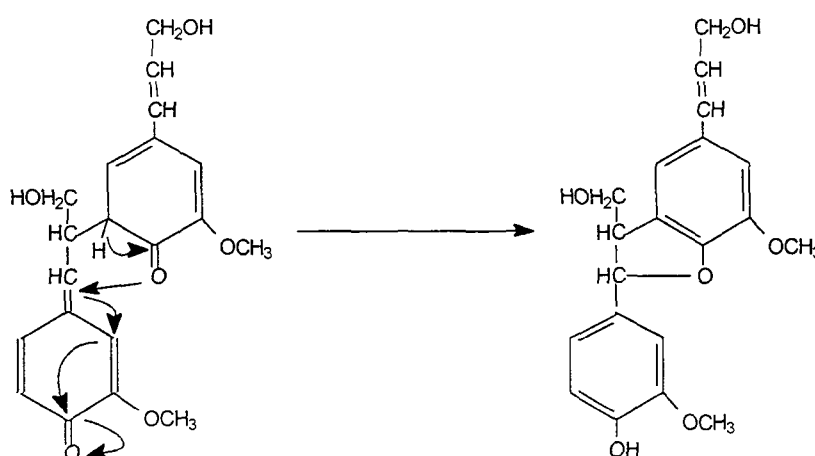


Figura 14. Ligação entre interunidades (C_{β} - C_5) na lignina (fenilcumarana).

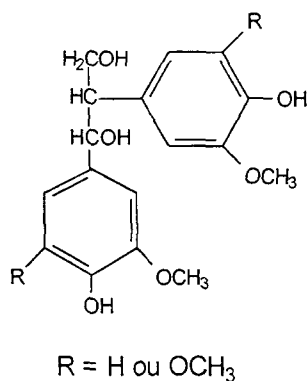


Figura 15. Ligação entre interunidades (C_{β} - C_1) na lignina.

Ligações éter e éster também são comuns na lignina. Com respeito às ligações éter, vários tipos têm sido identificados na estrutura, a saber: diaril éteres, éteres alquil-

benzílicos não cíclicos, éteres β -O-4 arílicos e éteres difenílicos. Éteres diarílicos são gerados pela combinação de um *O*-quinonemetídeo (Estrutura 2 na Figura 12) com um radical fenoxi (Freudenberg *et al.*, 1964 e Adler *et al.*, 1977, citados por Argyropoulos *et al.*, 1997). Eles compreendem somente 6% das unidades fenilpropanóides na lignina de abeto. Ésteres alquil-benzílicos não cíclicos, geralmente presentes em pequenas quantidades na lignina (2-3%), têm sido citados pelo seu efeito benéfico durante a polpação. Entretanto, tentativas recentes para detectá-los na lignina de madeira moída, usando avançadas técnicas de RMN, têm sido improdutivas. A combinação de C_β com um radical fenóxi (Figura 13) resulta na formação de ligações β -O-4, que compreendem 30-50% das ligações existentes na macromolécula de lignina. Estruturas que contêm α , β éteres não são frequentes e geralmente correspondem a menos de 1% das ligações da lignina. Entretanto, tentativas recentes usando técnicas avançadas de NMR têm questionado estes valores (Argyropoulos *et al.*, 1997).

Um outro tipo de estrutura de lignina contendo dois grupos éter é o pinosinol, presente em menos de 5% das unidades fenilpropano. Esta estrutura é formada pelo acoplamento β - β de dois radicais de álcool coniferílico seguido do fechamento do anel, como ilustrado na Figura 16.

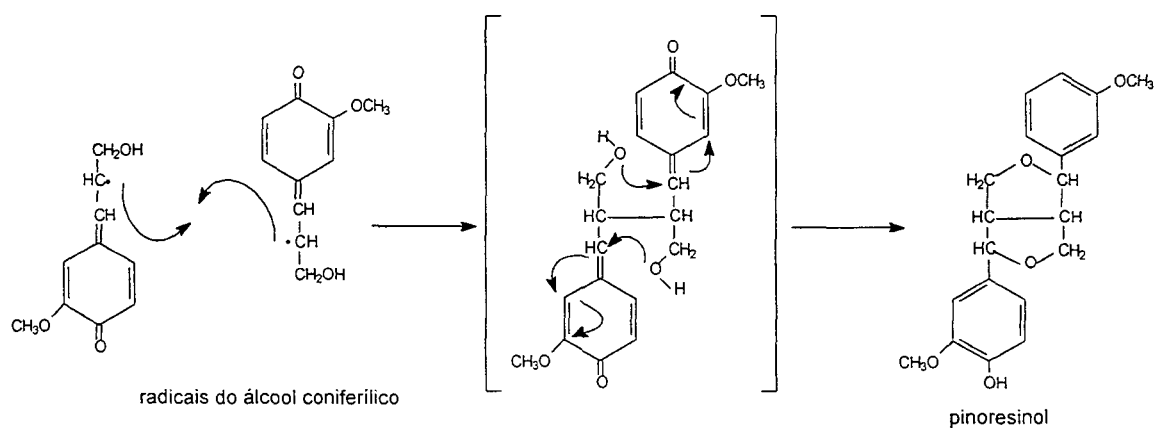


Figura 16. Formação de ligação pinosinol em lignina.

Estruturas benzílicas, análogas ao álcool benzílico também são comuns na molécula de lignina. Estas compreendem mais de 30% das unidades fenilpropano e são formados pela adição de uma molécula de água ao quinonemetídeo. Como os éteres alifáticos, as estruturas benzílicas também são benéficas durante a polpação alcalina, visto que elas facilitam a clivagem dos resíduos de éter arilglicerol- β -arílico sob condições alcalinas com a formação do intermediário epóxido ou estruturas epissulfeto.

Estruturas bifenil e diarilmetano, que unem cada duas unidades aromáticas através das posições C_5-C_5 (5-5') ou $C_\alpha-C_5$ (α -5), contêm ligações carbono-carbono as quais são estáveis frente à condições de polpação. Embora as unidades 5-5' bifenil estejam presentes na madeira original, as unidades diarilmetano são formadas pela condensação de dois anéis aromáticos durante a polpação alcalina e/ou kraft (Figura 17). Como tal, sua importância se torna significativa em técnicas preparativas de lignina. A frequência de ocorrência destas estruturas condensadas é obviamente alta em polpas de madeiras moles, já que a lignina presente é quase que exclusivamente composta por unidades guaiacílicas, isto é, com uma posição livre no carbono C_5 . Além das ligações 5-5' e α -5', as ligações β -5', α -6', β -6', β -1', β - β ', α - β e γ - γ ' também são muito importantes porque elas são estáveis frente a polpação e ao pré-tratamento da madeira.

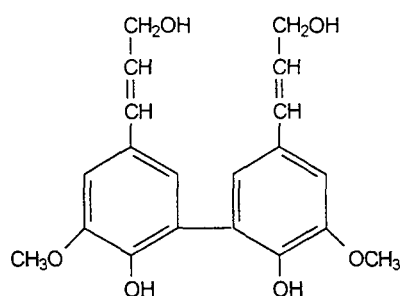


Figura 17. Ligação 5-5' em lignina.

Recentemente, o grupo de Brunow anunciou a descoberta de um outro modelo de ligação presente nas ligninas de madeira mole (Brunow, 1995, citado por Argyropoulos *et al.*, 1997). Esta ligação envolve a formação de α , β éteres nas estruturas bifênicas 5-5'. A nova parte octagonal foi identificada como a da dibenzodioxocina da Figura 18.

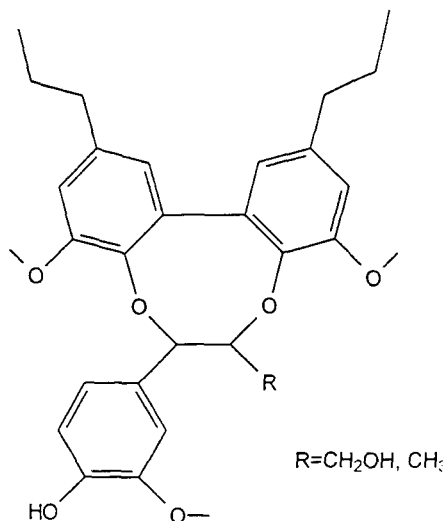


Figura 18. Dibenzodioxocina presente em lignina de madeira mole.

Baseado nestes inúmeros detalhes estruturais, uma variedade de modelos de lignina têm sido propostos por uma variedade de investigadores. Entre os mais citados estão o de Freudenberg, Brauns, Erdtman, Adler, Forss e Fremer (Argyropoulos *et al.*, 1997). Entre os modelos propostos para a lignina de madeira mole, a de Freudenberg ainda é a mais citada.

1.1.3.2. Análise estrutural de ligninas

Segundo Piló-Veloso *et al.* (1993), o estudo químico de ligninas evoluiu a partir da análise dos produtos de suas reações de hidrólise, oxidação com nitrobenzeno e etanolise, que permitiram identificar substâncias do tipo arilpropanóides como suas

unidades estruturais básicas. A partir desta constatação, o grande desafio foi determinar como estas unidades encontram-se quimicamente ligadas na macromolécula das ligninas. Essa questão envolveu uma série de estudos de degradação oxidativa, de reações hidrolíticas e de síntese de substâncias modelo. A análise destes produtos possibilitou elucidar os principais tipos de subestruturas das ligninas, os quais foram apresentados na sua maioria no item 1.1.3.1. Para essa análise, muito contribuiu o desenvolvimento da ressonância magnética nuclear (RMN) e sua aplicação ao estudo de ligninas, principalmente a RMN do carbono-13.

Existem diferentes tipos de preparação de ligninas. Nenhum deles permite obtê-las como se encontram no vegetal, pois há sempre uma interferência do procedimento de isolamento químico sobre a estrutura das ligninas *in situ* (protoligninas). Um bom método de isolamento deve eliminar os extrativos presentes na madeira e ser o mais brando possível, para evitar alterações drásticas na natureza química da lignina. Essas são condições importantes quando se quer desenvolver seu estudo estrutural. Há três procedimentos básicos para preparação de ligninas: por extração, por isolamento como resíduo e como derivados solúveis após funcionalização.

Os parâmetros mais usuais empregados para verificar a representatividade de uma lignina são o teor de grupos metoxílicos e a percentagem de carbono, que devem se situar numa faixa normalmente encontrada para alguns dos tipos já conhecidos de ligninas. Em seguida, tem-se a determinação da fórmula elementar por unidade C₉. Devido à possibilidade de haver carboidratos como contaminantes ou ainda como constituintes do complexo lignina-carboidrato, devem-se corrigir os dados obtidos da análise elementar em relação ao teor de carboidratos analisados na amostra, particularmente se este for superior a 5%.

As razões molares entre os constituintes básicos das ligninas (guaiacil-, siringil- e 4-hidroxifenilpropanóides) dependem da espécie vegetal que lhes deu origem. Por outro lado, como pode ser verificado na Figura 10 (página 16), há uma variação no número de grupos metoxílicos presentes nesses constituintes. Sendo assim, desenvolveu-se a metodologia de tomar o conteúdo desses grupos como um parâmetro de referência na caracterização de uma lignina e de apresentá-lo explicitamente na sua fórmula elementar por unidade C_9 . Isso torna a determinação do teor de metoxila uma etapa de essencial importância na análise estrutural de ligninas, o que é feito quimicamente pelo método de Zeisel modificado. Métodos físicos de análise são também empregados para análise de metoxilas, utilizando-se rotineiramente a espectroscopia no infravermelho (IV) e de RMN (Piló-Veloso *et al.*, 1993).

As diferentes unidades monoméricas das ligninas encontram-se entrelaçadas por diversas ligações químicas carbono-carbono e etéreas. É possível quantificar essas ligações por estudos químicos e físicos, os quais englobam diferentes métodos analíticos: (a) reações de degradação oxidativa com nitrobenzeno ou com permanganato de potássio-periodato de sódio e estudos dos produtos por cromatografia gasosa e detecção de massas; (b) determinação de grupos funcionais, como hidroxilas totais, hidroxilas alifáticas, hidroxilas fenólicas, éteres α -O-4 e β -O-4 e carbonilas; (c) identificação de subestruturas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio, de carbono-13 (^{13}C) e de fósforo-31 (^{31}P); e (d) acetilação e análise da distribuição de massas molares por cromatografia de permeação em gel.

A quantificação de grupos funcionais proporciona um conhecimento mais detalhado da macromolécula da lignina, fornecendo bases lógicas para a proposição de fragmentos de estrutura, como o apresentado na Figura 11 (página 17).

1.2 Pré-tratamento de fitobiomassa

Na parede celular das plantas superiores, as fibras de celulose estão embebidas em uma matriz extremamente rígida. Portanto, para hidrolisar a celulose e as hemiceluloses, é preciso despolimerizar, solubilizar ou remover a lignina presente nos materiais lignocelulósicos sem comprometer a sua estrutura química.

Vários métodos de pré-tratamento têm sido proposto na literatura para este fim, muitos deles classificados como físicos (Chang *et al.*, 1981), químicos (Millet *et al.*, 1976), biológicos (Horton *et al.*, 1980) e/ou uma combinação destes métodos (Millet *et al.*, Schell *et al.*, 1991; Ramos, 1992). Nestes processos, os substratos devem estar sempre na forma de cavacos, pó, cascas ou palhas e a escolha do melhor método depende do grau de separação requerido, do fim a que ele se proponha e principalmente do tipo de material com que se esteja trabalhando. O sucesso de cada método estará então relacionado à quantidade de material recuperado após a etapa do pré-tratamento e, em alguns casos, ao grau de aumento na eficiência com que a celulose é hidrolisada (Saddler *et al.*, 1982 ; Grethlein, 1985).

Vários métodos químicos têm sido propostos na literatura para hidrolisar a madeira, tais como tratamentos químicos em meio básico, que tendem a extrair e solubilizar as hemiceluloses e a lignina, e tratamentos químicos em meio ácido, que hidrolisam e solubilizam os polissacarídeos da parede celular (Wayman, 1988; Wood e Saddler, 1988; Parisi, 1989). Embora a hidrólise ácida tenha sido desenvolvida em escala comercial com alto rendimento em açúcares (Brennan *et al.*, 1986; Wright e Power, 1985; Parisi, 1989), este processo envolve um alto custo de investimento e alto impacto ambiental, devido ao alto consumo de produtos químicos cáusticos e/ou corrosivos e alto custo de recuperação dos produtos de hidrólise.

O uso de pré-tratamentos físicos, tais como moagem e radiação, possuem a desvantagem do alto consumo de energia. No entanto, Furch e Silla (1990) conseguiram um perfil de hidrólise bastante melhorado através de um processo simultâneo de sacarificação e moagem.

Os pré-tratamentos biológicos são mais específicos e causam degradação parcial do material lignocelulósico. Um exemplo é o tratamento da palha de algodão com fungos da podridão branca, onde o teor de lignina é reduzido em até 65% (Silva, 1995). Ferraz e colaboradores (1994), estudando o processo de degradação da lignina via processos biológicos, verificaram que o processo da degradação é muito lento, mas sua aplicação em conjunto com outros métodos químicos e físicos pode vir a ser de grande interesse comercial.

Pré-tratamentos que combinam métodos físicos e químicos têm sido demonstrados na literatura como sendo os mais eficientes. Pré-tratamentos com ácido diluído (Nguyen *et al.*, 1998), pelo processo de percolação (Torget e Hsu, 1994) e com água quente (Walsum *et al.*, 1996), tem sido comumente usados na conversão da biomassa para a produção de etanol e outros insumos químicos. Dentre as várias alternativas até hoje estudadas, o uso do pré-tratamento a vapor tem sido proposto como um dos mais promissores (Excoffier *et al.*, 1991; Ramos, 1992; Silva, 1995).

1.3 Pré-tratamento por explosão a vapor

Dos métodos de pré-tratamento propostos na literatura, a explosão a vapor tem se revelado como um dos mais promissores para o fracionamento da madeira em seus três componentes principais, paralelamente a um aumento significativo da susceptibilidade da celulose à sacarificação ácida ou enzimática. O processo de explosão a vapor foi primeiramente introduzido por Mason em 1928 (Mason, 1928) para desfibrar descartes

e resíduos da indústria madeireira para a produção de papelão. Em 1932, Babcock mostrou que este processo podia ser usado como um pré-tratamento para produzir açúcares fermentescíveis e álcool a partir de madeira (Babcock, 1932). Já em 1953, Asplund produziu polpas pelo processo de explosão a vapor que apresentavam boas propriedades para a fabricação de papel, trabalhando a temperaturas que variaram de 100 a 160°C (Asplund, 1953). Desde então, surgiram outros processos similares a estes, tais como os processos Iotech (DeLong, 1985), Stake (Bender, 1979; Brown, 1980) e Siropulper (Mamers e Rowney, 1979; Puri e Mamers, 1983), todos já utilizados comercialmente para a conversão de biomassa em produtos químicos, energia e ração animal. Assim, o objetivo do pré-tratamento a vapor foi por muitos anos associado à redução da quantidade de enzima necessária para a hidrólise dos polissacarídeos da madeira em seus açúcares monoméricos (Foody e Foody, 1991). Esta afirmação vem de encontro aos inúmeros trabalhos publicados que envolvem o pré-tratamento a vapor seguido de hidrólise enzimática da celulose como procedimento para a obtenção de etanol, através da fermentação dos açúcares (pentoses e hexoses) presentes no hidrolisado (Excoffier *et al.*, 1991; Ramos, 1992; Sawada *et al.*, 1995; Vignon *et al.*, 1995).

O pré-tratamento a vapor baseia-se no aquecimento dos cavacos de madeira a altas temperaturas e pressão, seguido de ruptura mecânica dos materiais pré-tratados por um processo de descarga violenta (explosão) em um tanque de coleta, ou mesmo pela despressurização lenta do reator até a pressão atmosférica (sem explosão). A estrutura da parede celular da planta é radicalmente modificada durante o processo (Ramos, 1992), tornando as hemiceluloses parcialmente hidrolisadas e facilmente removíveis por extração aquosa. A fração insolúvel em água permanece composta de celulose e lignina

parcialmente modificada, sendo que a maior parte desta lignina pode ser então extraída com álcali, etanol ou dioxano.

A viabilidade do pré-tratamento a vapor envolve não somente o aumento da susceptibilidade do substrato à hidrólise mas também a facilidade e a eficiência com que os três constituintes majoritários da madeira, celulose, hemiceluloses e lignina, são fracionados. Vários autores salientam que a acessibilidade de enzimas ao substrato é gradualmente aumentada com o aumento da severidade das condições de pré-tratamento. Entretanto, sob condições de pré-tratamento excessivamente drásticas, há altos níveis de desidratação de açúcares liberados a partir das hemiceluloses e modificação estrutural da lignina (Saddler *et al.*, 1982; Ramos *et al.*, 1992b). Desta forma, condições otimizadas devem resultar em bons substratos para a hidrólise enzimática sem que haja degradação excessiva dos açúcares liberados por hidrólise ácida a partir das hemiceluloses.

O pré-tratamento a vapor tem sido otimizado para vários tipos de madeiras duras, madeiras moles e resíduos agrícolas (gramíneas) (Dekker e Wallis, 1983; Saddler *et al.*, 1982; Ramos *et al.*, 1992a,b; Silva, 1995). Na otimização do processo de pré-tratamento, as variáveis como temperatura (pressão), tempo de residência no reator e concentração do catalisador adicionado são cuidadosamente estudadas a fim de produzir o melhor substrato para conversão, paralelamente à melhor recuperação de açúcares fermentescíveis no extrato aquoso.

Espécies de madeiras duras de rápido crescimento ou incremento florestal têm sido sugeridas como prováveis matérias-primas para os processos de bioconversão futuros (Ramos, 1992). Estas espécies, como o *Populus tremuloides*, híbridos de poplar e *Eucalyptus* spp., têm sido estudadas principalmente devido a alta permeabilidade que apresentam ao vapor saturado e outros aditivos químicos. O mesmo autor ainda sugere

que os resíduos derivados de madeiras duras são mais suscetíveis ao vapor a alta pressão quando comparados aos resíduos de madeiras moles e que, desta forma, estas espécies requerem condições menos drásticas para um pré-tratamento eficiente.

A facilidade em pré-tratar madeiras duras está parcialmente relacionada ao fato das mesmas possuírem um elevado teor de grupamentos *O*-acetílicos, associados à presença de heteroxilanas em sua estrutura. A hidrólise gradual destes substituintes libera ácido acético que, juntamente com outros ácidos formados durante o pré-tratamento (ácido levulínico, ácido fórmico, dentre outros), catalisam a ruptura das ligações do complexo lignina-carboidrato. Por outro lado, as hemiceluloses de madeira mole são compostas basicamente de glucomananas (hexosanas) e estes compostos são mais resistentes à hidrólise ácida do que as xilanas de madeira dura. Por esta razão, as madeiras moles requerem altas temperaturas de pré-tratamento e tempos maiores de reação (Fengel e Wegener, 1989).

Vários autores têm demonstrado que as propriedades desfavoráveis das madeiras moles são minimizadas pela introdução de um catalisador ácido antes do pré-tratamento a vapor (Lomax *et al.*, 1994; Ramos, 1992). Assim, as madeiras moles são as mais beneficiadas com este recurso, embora o uso de catalisadores ácidos seja também empregado com sucesso na otimização do pré-tratamento de madeiras duras e gramíneas (Ramos, 1992; Excoffier *et al.*, 1991; Sawada *et al.*, 1994).

Wyman (1994), estudando o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos por explosão a vapor, apresentou algumas vantagens deste pré-tratamento, entre elas a de que o substrato pode ser totalmente hidrolisado por enzimas celulolíticas a glucose e de que as hemiceluloses podem ser completamente convertidas em combustíveis líquidos.

O uso de catalisadores no pré-tratamento a vapor aumenta a seletividade das reações de hidrólise dos polissacarídeos, propicia a redução da temperatura e do tempo

de pré-tratamento e conseqüentemente melhora o rendimento de sacarificação. A recuperação dos açúcares das hemiceluloses pode portanto ser parcialmente atribuído à maior estabilidade das pentoses em soluções ácidas, com estabilidade máxima na faixa de pH de 2,5 a 3,5 (Parajó *et al.*, 1995a).

Excoffier *et al.* (1991), conseguiu recuperar 70% das hemiceluloses de madeira de álamo na forma de xilose, em pré-tratamentos a vapor catalisados com H_2SO_4 a temperaturas de $217^\circ C$ por 2 min e, quando as condições de pré-tratamento foram aumentadas para $225^\circ C$, foi possível obter um rendimento de 70% em glucose após 24h de hidrólise enzimática.

O uso de catalisador ácido durante o pré-tratamento a vapor causa um substancial decréscimo no grau de polimerização (DP) da celulose (Miller *et al.*, 1989). Vários autores (Vignon *et al.*, 1995; Sawada *et al.*, 1995) têm postulado reduções no grau de polimerização durante a hidrólise ácida de materiais celulósicos como, por exemplo algodão.

Uma grande variedade de catalisadores ácidos encontram-se reportados na literatura, como o ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Excoffier *et al.*, 1991; Brownell e Saddler, 1984; San Martin *et al.*, 1995), o dióxido de enxofre (SO_2) (Lomax *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1992a), o ácido fosfórico (H_3PO_4) (Deschamps *et al.*, 1996) e ácido nítrico (HNO_3) (Saddler *et al.*, 1982). Entretanto, existem também alguns trabalhos que empregam a impregnação alcalina, utilizando NaOH (Fox *et al.*, 1989; Schultz *et al.*, 1984) e NH_3 (Holzapple *et al.*, 1991).

1.3.1. Reações de Materiais Lignocelulósicos durante a Explosão a Vapor.

Os materiais lignocelulósicos, quando submetidos a altas pressões de vapor por um determinado período de tempo, sofrem um processo que é comumente descrito

como auto-hidrólise (Excoffier *et al.*, 1991). Essas reações ocorrem em temperaturas superiores à temperatura de amolecimento da lignina e das polioses. Ao longo do processo, as ligações que asseguram a coesão da biomassa são fragilizadas e em parte quebradas, de forma que, no momento da descompressão, o material é desfibrado e reduzido a partículas menores. Isto explica o aumento da susceptibilidade do material ao ataque de enzimas e reagentes químicos (Barnet *et al.*, 1989).

A hidrólise ocorre sobre todos os componentes da biomassa, porém as pentosanas são as mais susceptíveis a este tipo de reação (Brownell e Saddler, 1984). Sob a ação da temperatura e da pressão de vapor, os grupos acetil presentes nas polioses são hidrolisados a ácido acético (Figura 19). O ácido liberado catalisa a ruptura das ligações do complexo lignina-carboidrato, provocando a solubilização de grande parte das polioses e de uma pequena fração de lignina (Bouchard *et al.*, 1990 e 1991). No estágio inicial do pré-tratamento, as polioses são hidrolisadas a oligômeros e monômeros, principalmente à xilose no caso de madeiras duras e gramíneas. A celulose permanece praticamente intacta, embora sofra redução no seu grau de polimerização, com a formação de oligômeros, celobiose e alguma glucose livre (Barnet *et al.*, 1989; Marchessault e St-Pierre, 1980; Silva 1995).

O aumento da severidade do pré-tratamento (aumento da temperatura e/ou do tempo de residência do material no reator) favorece as reações de hidrólise da celulose e das polioses (Figura 19), provoca o início das reações de desidratação das pentoses e hexoses, com a formação de furfural (Figura 20) e hidroximetilfurfural (Brownell *et al.*, 1986; Brownell e Saddler, 1984; Silva, 1995) e aumenta as reações de condensação dos taninos e outras subestruturas que compõem os extraíveis (Lomax *et al.*, 1994). O pré-tratamento a vapor também favorece a hidrólise das ligações mais termolábeis da

lignina, principalmente as ligações β -O-4 (Figura 21), levando à formação de novas ligações e à fragmentação de partes do polímero lignínico (Tanahashi, 1990).

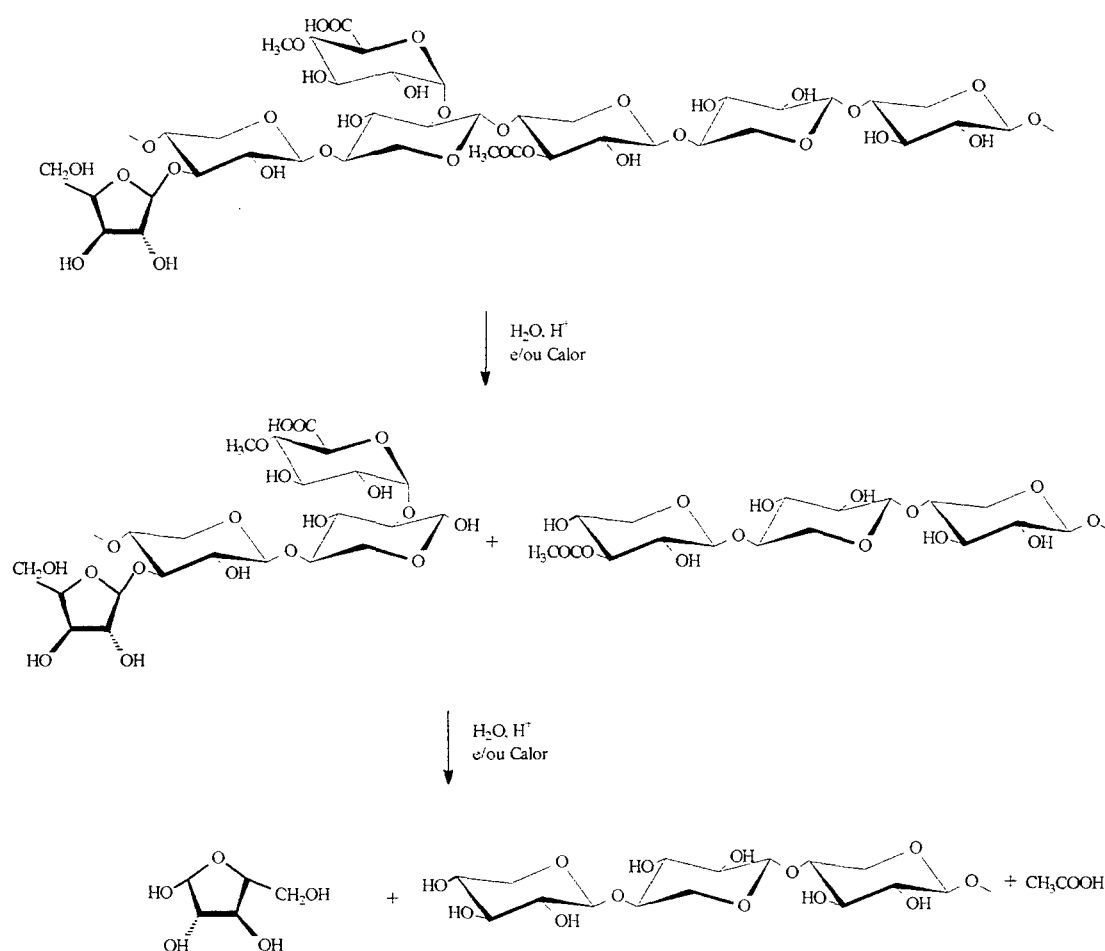


Figura 19. Reação de hidrólise das hemiceluloses.

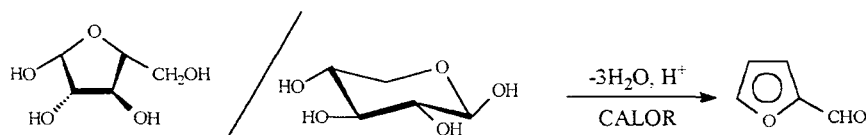


Figura 20. Reação de desidratação de pentoses e hexoses.

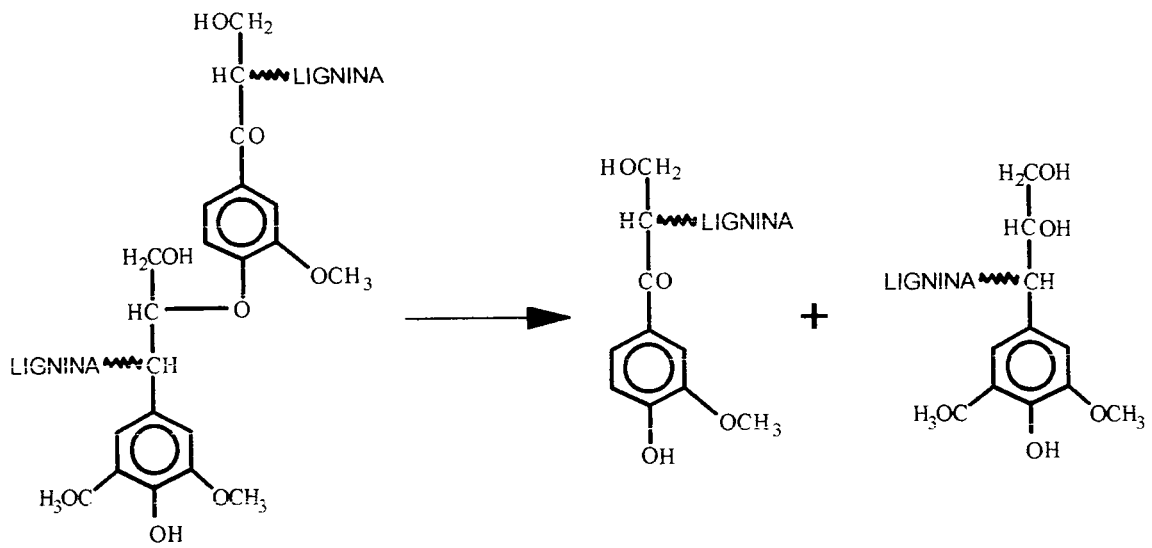


Figura 21. Hidrólise de ligações β -O-4 durante o pré-tratamento a vapor.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

A lignina é um dos mais valiosos e abundantes recursos renováveis existentes na natureza. Entretanto, este polímero geralmente sofre severas modificações químicas durante o isolamento e estas mudanças influem dramaticamente em suas aplicações industriais. Portanto, o procedimento de isolamento deve evitar reações de condensação e fragmentação que podem ocorrer durante o processo. Neste trabalho, a explosão a vapor seguida por extração alcalina foi investigada como método para recuperação da lignina de *Eucalyptus grandis* em alto rendimento. O trabalho termina por apresentar uma metodologia integrada para a caracterização físico-química das frações isoladas, com o intuito de contribuir à elucidação do mecanismo de degradação da lignina a partir do processo de explosão a vapor.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir, na Figura 22, encontra-se o diagrama de blocos representativo das principais etapas realizadas para a obtenção da lignina.

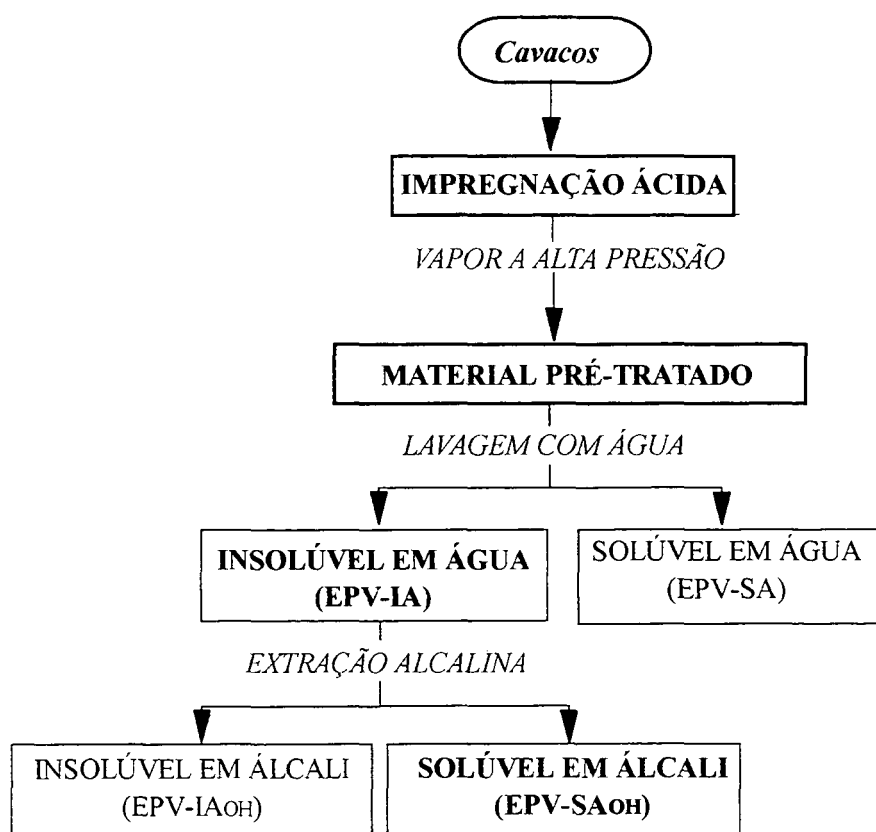


Figura 22. Diagrama de blocos para o procedimento de obtenção da lignina.

3.1 Preparação dos cavacos de *E. grandis* para o pré-tratamento

Aproximadamente 4 kg de cavacos industriais derivados de *E. grandis* de 7 a 10 anos (Klabin Fabricante de Papel e Celulose Ltda., Telêmaco Borba, PR), com uma umidade típica de 10-15% (m/m), foram divididos em duas partes. Uma parte dos cavacos foi tratada com uma solução a 0,25% (m/v) de H_2SO_4 e outra em uma solução

a 0,5% (m/v) em dessecadores sob pressão reduzida por aproximadamente 12 horas à temperatura ambiente. O excesso da solução de H₂SO₄ foi descartada. Os cavacos impregnados adquiriram aproximadamente 50% (m/m) de umidade, o que equivale a 0,087g e 0,175g de H₂SO₄ por 100g de cavaco, respectivamente. Após a impregnação, os cavacos foram divididos em lotes para o pré-tratamento, sendo que cada lote continha aproximadamente 350g em relação ao peso seco dos cavacos.

3.2 Pré-tratamento dos cavacos por explosão a vapor

Os cavacos de *E. grandis* foram tratados a vapor utilizando um reator de 5L, localizado nas Usinas Piloto do Setor de Tecnologia da UFPR (Ramos *et al.*, 1995). As condições utilizadas para a obtenção de cada substrato, assim como o código associado a cada uma delas, estão indicadas na Tabela 2. Nesta mesma tabela, encontra-se tabulado o grau de severidade (Ro ou log Ro) para cada condição de pré-tratamento, cuja determinação foi realizada de acordo com a Equação 1 (Overend e Chornet, 1987).

Tabela 2. Condições utilizadas no pré-tratamento a vapor de *E. grandis*.

Código	log Ro	Temperatura (°C)	Tempo no Reator (min)	Concentração Ácida (%)
02A	3,49	200	3,5	0,25
03A	3,64	200	5	0,25
01B	3,24	200	2	0,5
02B	3,49	200	3,5	0,5
03B	3,64	200	5	0,5
11A	3,54	210	2	0,25
12A	3,78	210	3,5	0,25
13A	3,94	210	5	0,25
11B	3,54	210	2	0,5
12B	3,78	210	3,5	0,5
13B	3,94	210	5	0,5

$$R_0 = \int_0^t \exp^{-(T_{\text{exp}} - 100)/14,75} dt$$

Equação 1. Cálculo para determinação do grau de severidade com base na temperatura e no tempo de pré-tratamento, onde T_{exp} é a temperatura experimental.

O pré-tratamento a vapor foi realizado colocando-se os cavacos no interior do reator e, após tratamento sob uma dada temperatura e tempo de residência, o material foi descarregado do reator por uma rápida despressurização (explosão) para dentro de um ciclone, de onde foi recuperado por lavagem com água. O material tratado a vapor (EPV) foi então extraído duas vezes à temperatura ambiente com água a uma concentração de sólidos de 5% (m/m). A fração insolúvel em água foi chamada de EPV-IA e armazenada a 4°C com um teor de umidade de 65-70%, enquanto que a fração solúvel em água foi chamada de EPV-SA. Os rendimentos de recuperação da fração EPV-IA foram determinados gravimetricamente em relação ao peso seco de cavaco não tratado, enquanto que os rendimentos de recuperação da fração EPV-SA foram derivados de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Vide 4.7).

Para verificação da reprodutibilidade do pré-tratamento a vapor, as condições relativas ao código 12B foram realizadas em triplicatas, revelando um desvio padrão relativo (DPR) não superior a 5% em relação aos rendimentos de cada fração isolada (EPV-IA e EPV-SA). Este resultado justificou a não realização de experimentos em duplicatas para o restante das condições testadas.

3.3 Determinação do peso seco dos cavacos e materiais pré-tratados

Aproximadamente 5g de material úmido (cavaco ou material pré-tratado) foram colocados em um pesa filtro previamente pesado. Este material foi colocado em estufa à 105°C por 2 horas para a eliminação da umidade. Após este período, o material foi esfriado em dessecador, pesado e o peso seco foi calculado pela Equação 2:

$$PS = \frac{MA_s}{MA_u} \times 100$$

Equação 2. Cálculo para a determinação do peso seco (PS) dos cavacos e materiais pré-tratados. MA_s = massa de amostra seca; MA_u = massa de amostra úmida.

3.4 Extração alcalina

Após a lavagem com água, os materiais tratados a vapor foram extraídos duas vezes com álcali diluído a uma concentração de sólidos de 5% (m/v). Aproximadamente 50g de material, em relação ao peso seco, foram tratados com 950mL de uma solução de NaOH 0,4% (m/v) por 1 hora com agitação à temperatura ambiente. Após 1 hora, os resíduos foram filtrados, suspensos novamente em água e neutralizados com ácido acético até pH 6-7. Em seguida, os materiais fibrosos foram lavados exaustivamente com água para eliminação dos sais formados e armazenados a 4°C com um teor de umidade de 60-70%. A fração insolúvel em álcali foi chamada de EPV- IA_{OH} e o rendimento de recuperação foi determinado gravimetricamente em relação ao peso seco do material tratado a vapor.

3.5 Obtenção da lignina por precipitação ácida do extrato alcalino

A lignina solúvel em álcali foi obtida do licor de extração alcalina através de uma precipitação ácida. O licor foi acidificado a pH 2 com H₂SO₄ sob agitação constante à temperatura ambiente. O material insolúvel foi recuperado por centrifugação e lavado com água até a eliminação dos carboidratos em solução, cujo monitoramento foi realizado pelo método do fenol-sulfúrico. Após lavagem com água, as ligninas foram secas em estufa à 50°C, moídas em moinho de facas e reservadas para análise.

3.6 Análise de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico

Em aproximadamente 100 µL de solução (hidrolisados ou águas de lavagem de substratos ou de lignina), adicionaram-se 400 µL de água, 500 µL de fenol a 5% (p/v) e 2,5 mL de H₂SO₄. A solução final foi analisada por espectrofotometria à 490 nm, usando como padrões várias soluções de concentração conhecida de glucose (curva de calibração). As análises foram realizadas em duplicatas revelando um desvio padrão relativo (DPR) em torno de 2%.

3.7 Determinação da lignina de Klason em materiais lignocelulósicos

A análise química dos cavacos e materiais pré-tratados foram realizados por uma modificação do método padrão TAPPI T22 os-74 para a lignina insolúvel em ácido (lignina de Klason). Após o tratamento de aproximadamente 1g de madeira moída (40 mesh) com 15 mL de H₂SO₄ 72% (m/m), água destilada foi adicionada até a concentração de 3% (m/m) em ácido e a suspensão foi tratada por 70 min em autoclave a 121°C. A lignina insolúvel em ácido foi medida gravimetricamente e o teor em carboidratos foi determinado por CLAE nos hidrolisados de Klason (Irick *et al*, 1988). As análises foram realizadas em duplicatas revelando um DPR em torno de 2%.

3.8 Análise cromatográfica de hidrolisados de Klason e extratos aquosos

Os hidrolisados de Klason e extratos aquosos foram analisados por CLAE em um sistema Shimadzu, modelo LC10AD, provido de um amostrador automático SIL10A e detector modelo RID10A para índice de refração. As análises dos solúveis em água e dos hidrolisados de Klason foram realizadas a 65°C em uma coluna HPX-87H (Bio-Rad), com fase móvel H₂SO₄ 8 mM a uma vazão de 0,6 mL/min.

Os componentes presentes nos hidrolisados foram quantificados por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado, celobiose, glucose, xilose, arabinose e ácido acético, e expressos em relação ao peso seco da amostra. Todas as análises cromatográficas foram realizadas em duplicatas revelando um DPR inferior a 1%.

A hidrólise das pentosanas, ocorrida durante o pré-tratamento a vapor, foi determinada pela análise da fração EPV-SA por CLAE como descrita acima (Irick *et al.*, 1988). O rendimento de recuperação da fração EPV-SA foi determinado pela somatória dos componentes identificados por CLAE e expresso em termos de g/100g de madeira seca.

3.9 Análise dos extratos aquosos por espectrometria no ultravioleta

A análise por espectrometria no ultravioleta (UV) das frações EPV-SA foram realizadas com varredura entre os comprimentos de onda de 190 a 400 nm. Os espectros foram gerados em um espectrofotômetro modelo HP 8452A (Hewlett-Packard). Para as absorvâncias verificadas à 205 e 280 nm, cálculos quantitativos foram efetuados considerando-se absorvâncias de 110 e 13,5 L/cm.mol para cromóforos liberados em solução, respectivamente (Fengel e Wegener, 1989).

3.10 Análise de cinzas dos substratos e das ligninas

Pesou-se aproximadamente 1g de cada material pré-tratado e/ou lignina, obtidos sob cada condição de pré-tratamento, em cadinhos de porcelana previamente calcinados e pesados. Os cadinhos foram queimados em bico de Bunsen e posteriormente calcinados em mufla à 700°C por 2 horas. Após este período, os cadinhos foram retirados da mufla e colocados em um dessecador por 2 horas. Então, os cadinhos frios foram pesados e os teores de cinza foram determinados pela Equação 3:

$$\%Cinzas = \frac{MAf}{MAi} \times 100$$

Equação 3. Cálculo para a determinação do teor de cinzas dos substratos e ligninas. MAf = massa de amostra após calcinação; MAi = massa inicial de amostra seca.

3.11 Análise das frações insolúveis por FTIR

Os substratos tratados a vapor foram também analisados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Cada fração, EPV-IA, EPV-IA_{OH}, EPV-SA_{OH} e frações lignínicas acetiladas (vide 4.11), foi compactada em pastilha de KBr (3 mg em 150 mg de KBr) sob 10 ton por 3 min e analisada usando um espectrofotômetro Bomem FTIR MB-100 na região de 500 a 4000 cm⁻¹, com uma resolução de 4 cm⁻¹, 64 varreduras e apodização triangular.

3.12 Análise multivariada dos dados de FTIR das frações insolúveis

As análises de regressão multivariada, aplicadas aos dados obtidos das frações insolúveis em água e ligninas solúveis em álcali por FTIR, foram obtidas utilizando os softwares BIOTEC e FAEN da FAENQUIL (Lorena, SP).

3.13 Acetilação das ligninas obtidas após a precipitação ácida do licor alcalino

Para aumentar a solubilidade em solventes orgânicos, as ligninas foram previamente acetiladas através do método descrito por Chen (Chen, 1992). Aproximadamente 200 mg do material extraído com álcali foram tratados com 2 mL de uma mistura de anidrido acético/piridina 1:1 (V/V) durante uma noite à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 25 mL de etanol para a destruição do excesso de anidrido acético e 25 mL de tolueno para eliminação da piridina por co-evaporação. Após evaporação dos solventes, a lignina acetilada foi isolada e seca em P_2O_5 sob vácuo.

3.14 Determinação do teor de metoxilas das ligninas

O teor de metoxilas das ligninas acetiladas foi determinado através do método de Zeisel modificado (Zakis, 1994). Após o tratamento de aproximadamente 8 mg do material acetilado com ácido iodídrico 47% (0,25 mL) à 125 °C por 30 min, $CHCl_3$ (0,9 mL) e água (1 mL) foram adicionados à mistura inicial. O teor de metoxila foi determinado por cromatografia gasosa (CG) usando 0,1 mL de iodopropano como padrão interno. Os cromatogramas foram obtidos em cromatógrafo CG modelo 35/37 (CG Analítica Ltda.) utilizando uma coluna CG 2193 (1,5 m x 1/8" de diâmetro interno) contendo 30% Carbowax 1500 em Chromosorb W. As análises cromatográficas foram realizadas em duplicata a 78°C com fluxo de N_2 a 30 mL/min e detecção por ionização de chama. Todas as análises foram realizadas em duplicatas revelando um DPR em torno de 1%.

3.15 Determinação do teor de hidroxilas totais das ligninas

O teor de hidroxilas totais das ligninas foi determinado em duplicata através do método descrito por Barnet *et al.* (Zakis, 1994). Aproximadamente 30 mg do material não acetilado foi tratado com 0,25 mL de uma solução de piridina/anidrido acético 10:3 (v/v) à 65 °C por uma noite. Após este período, 15 mL de acetona e 15 mL de água deionizada foram adicionados à mistura inicial. O teor de hidroxila foi determinado por titulação potenciométrica do ácido acético residual contra o branco utilizando como padrão NaOH 0,1N. Todas as análises foram realizadas em duplicatas revelando um DPR em torno de 2%.

Os teores de hidroxila foram calculadas através da Equação 4 utilizando como composto modelo a vanilina:

$$\%OH = \frac{(Vb - Va) \times N \times 1,7 \times Fator}{P}$$

Equação 4. Cálculo para a determinação do teor de hidroxilas totais das ligninas. Vb = volume de NaOH gasto para titular o branco; Va = volume de NaOH gasto para titular a amostra; N = Normalidade do NaOH; Fator = % OH teórico / % OH experimental do composto modelo; P = peso da amostra (g).

3.16 Análise espectroscópica das ligninas acetiladas por RMN ¹H

A análise espectroscópica de cada lignina isolada foi determinada por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) após per-acetilação com anidrido acético em piridina (Gierer *et al.*, 1980; Chen, 1992). Os espectros de RMN foram obtidos no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM) em Espectrômetro Varian de 300 MHz, modelo Gemini 2000, usando como solvente clorofórmio deuterado com pureza superior a 99% (m/m).

3.17 Determinação das fórmulas C₉ das ligninas

A fórmula C₉ de cada lignina isolada foi inicialmente obtida através de análise elementar (CHN), realizada em Analisador Perkin-Elmer modelo 240C do Laboratório Analítico da Copel (Curitiba, PR). O teor de oxigênio foi portanto obtido pela diferença entre o resultado da análise em CHN e a quantidade de lignina utilizada no ensaio. Posteriormente, as fórmulas C₉ foram ajustadas de acordo com os teores de metoxilas e de hidroxilas totais presente em cada fração lignínica isolada. A razão entre hidroxilas alifáticas e hidroxilas aromáticas também foi expressa na fórmula C₉ das ligninas através da integração dos espectros de RMN ¹H dos materiais acetilados. Tal relação foi fundamentada nas atribuições (a) da região de 2,28-1,70 ppm à ressonância do hidrogênio de acetatos alifáticos e (b) da região de 2,60-2,28 ppm à ressonância do hidrogênio de acetatos aromáticos.

3.18 Análise térmica das ligninas

As propriedades térmicas das ligninas foram determinadas por análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC), em um termoanalisador (TGA) Netzsch STA 409EP. Aproximadamente 3 mg de cada lignina foram colocadas em um cadinho de óxido de alumínio (Al₂O₃) e aquecidas de 20 a 950°C a 5°C/min.

3.19 Distribuição em massas moleculares das ligninas

A distribuição em massa molecular aparente das ligninas acetiladas foi determinada por Cromatografia de Permeação em Gel (CPG). Estas análises foram obtidas em cromatógrafo Shimadzu, modelo LC10AD, provido de um detector modelo

SPD10A para espectroscopia no ultravioleta. As análises das ligninas foram realizadas a 45°C em quatro colunas de exclusão molecular dispostas em série (Progel TSK G1000-HXL, G3000-HXL, G4000-HXL e G6000-HXL, da Supelco), tendo THF (tetrahidrofurano) como fase móvel a uma vazão de 1 mL/min. A massa molecular aparente das ligninas, que teve a massa do grupamento acetil descontado, foi calculada a partir dos volumes de retenção das ligninas utilizando o software de cromatografia de permeação em gel para o sistema cromatográfico CLASS-LC10 (Shimadzu). A equação abaixo, gerada a partir da análise de padrões de poliestireno monodispersos de massa molar entre 2500 e 1800000 (20 padrões ao todo), descreve o perfil da curva de calibração obtida, cuja regressão apresentou uma dispersão máxima de 0,05.

$$\log M = -0,00226987 \cdot x^3 + 0,07113776 \cdot x^2 - 0,84671797 \cdot x + 7,17672984$$

RESULTADOS

4. RESULTADOS

De um modo geral, o pré-tratamento a vapor se mostrou bastante eficiente na separação dos três principais componentes da madeira, celulose, hemicelulose e lignina, assim como na recuperação de cada um deles em bom rendimento.

4.1. Pré-tratamento a vapor de *E. grandis*

Os rendimentos obtidos após o pré-tratamento a vapor dos cavacos de *E. grandis* são encontrados na Figura 23, onde a fração solúvel em água foi chamada de EPV-SA e a insolúvel em água de EPV-IA. Os rendimentos de recuperação total decresceram com o aumento do tempo de pré-tratamento para ambas as temperaturas testadas, 200 e 210°C. Os maiores rendimentos de recuperação total da madeira foram de 94,87% para o pré-tratamento realizado a 200°C por 3,5 min usando H₂SO₄ a 0,25% (código 02A, log Ro = 3,49) e de 99,74% para o pré-tratamento a 210°C por 3,5 min % usando ácido a 0,25% (código 12A, log Ro = 3,78).

Os rendimentos de recuperação da fração EPV-IA também decresceram com o aumento do tempo de pré-tratamento em ambas as temperaturas. Este comportamento foi particularmente devido à hidrólise das hemiceluloses e recuperação de monossacarídeos (pentoses e hexoses) na fração aquosa, conforme demonstrado pela análise cromatográfica dos hidrolisados (Figura 24). Por outro lado, observou-se que, com o aumento da drasticidade do pré-tratamento, houve um aumento na absorbância do extrato aquoso a 280 nm, principalmente em tempos mais longos de pré-tratamento. Tal observação foi atribuída ao acúmulo de produtos de hidrólise (fenóis, complexos lignina-carboidrato de baixa massa molecular, etc.) e de desidratação (furfural e hidroximetilfurfural) das ligninas e das hemiceluloses, respectivamente.

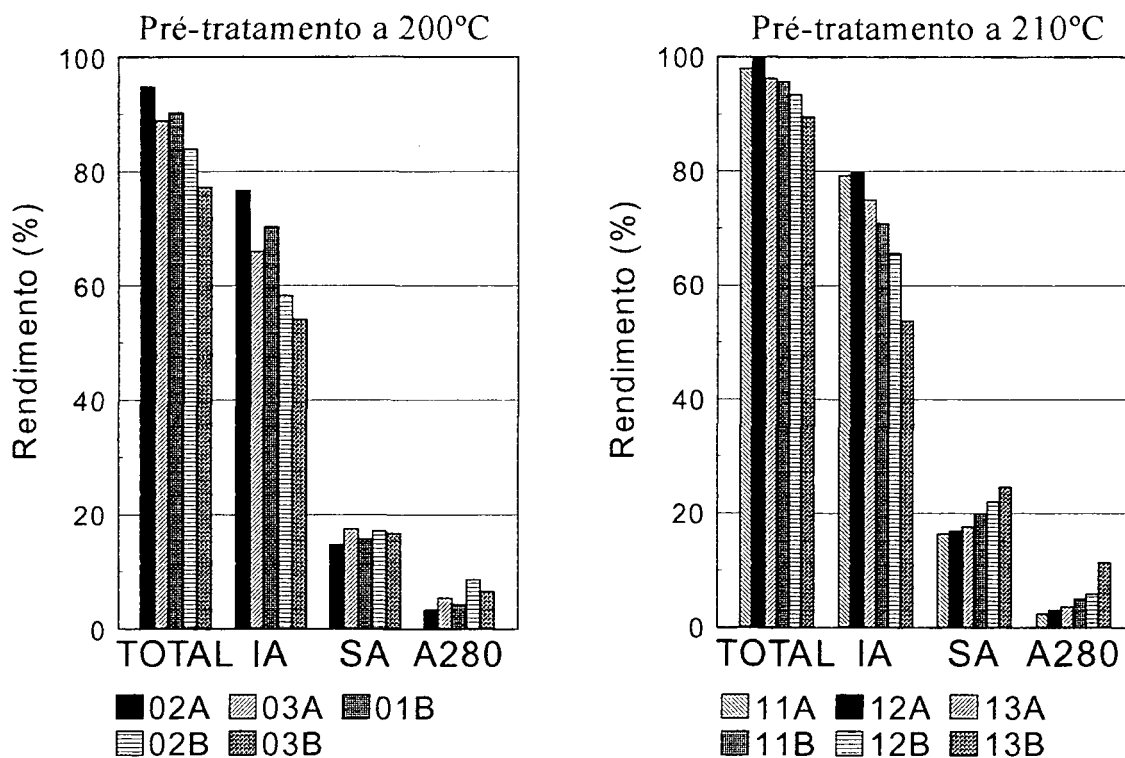


Figura 23. Rendimentos de recuperação dos materiais pré-tratados. IA, insolúvel em água; SA, solúvel em água; A280, compostos solúveis em água que absorvem no comprimento de onda de 280nm; TOTAL, IA+SA+A280 (ver legendas na Tabela 2, página 40).

A 200°C, os rendimentos da fração solúvel em água foram aproximadamente iguais em todas as condições testadas. Porém, a 210°C, observou-se um aumento no rendimento da fração solúvel em água com o aumento da drasticidade do pré-tratamento, indicativo da remoção das hemiceluloses e da hidrólise parcial de regiões mais acessíveis da celulose, além da formação e acúmulo de compostos que absorvem no comprimento de onda de 280nm (A280 da Figura 23). Assim, a recuperação da fração insolúvel em água a 200°C diminuiu de 76,76 para 54,08% e, a 210°C, de 79,3 para 53,68%, quando as condições de pré-tratamento variaram da menor para a maior drasticidade.

Devido ao pH relativamente baixo utilizado para o pré-tratamento, em torno de 2, não houve nenhuma evidência cromatográfica da presença de oligossacarídeos nas frações solúveis em água (Figura 24). A maioria dos açúcares recuperados em solução foram monossacarídeos, principalmente xilose e glucose (veja rendimentos na recuperação mostrados na Figura 23).

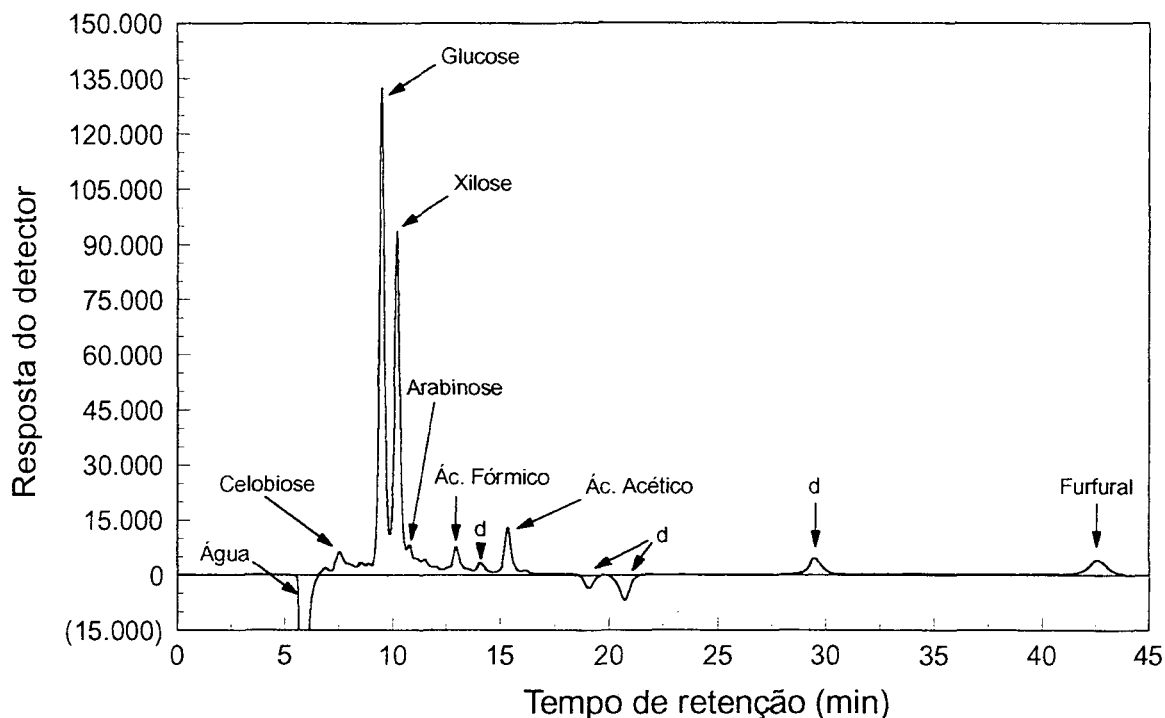


Figura 24. Cromatograma típico da fração EPV-SA, correspondente às condições de pré-tratamento codificadas como 13B (d, desconhecidos).

Na Figura 24, foi observado que a quantidade de arabinose presente na fração EPV-SA foi muito inferior a aquela observada para glucose e xilose e que tal quantidade correspondeu a uma parcela muito pequena da arabinose originalmente presente nos cavacos, na forma de arabinoxilanas. Tal observação foi decorrente do maior grau de desidratação desta pentose, cuja estrutura furanosídica é mais suscetível à degradação por hidrólise ácida.

A presença de ácido acético (Figura 24) na fração EPV-SA foi decorrente da desacetilação das hemiceluloses presentes nos cavacos, enquanto que a formação de

ácido fórmico foi atribuída à reações de degradação da lignina, tais como a hidrólise e/ou remoção de cadeias laterais e a desmetoxilação de anéis aromáticos. Também foram detectados alguns picos (d, Figura 24) que não puderam ser identificados na análise cromatográfica, mas que foram considerados negligíveis por estarem presentes em quantidades muito inferiores aos demais.

À temperaturas de 210°C, pré-tratamentos caracterizados por longos tempos de residência no reator mostraram-se prejudiciais para a recuperação da xilose. Somente 25,82% da xilana presente nos cavacos de madeira foi recuperada como xilose na fração EPV-SA quando o pré-tratamento foi realizado por 5 min a 210°C (Figura 25). Tais perdas foram provavelmente associadas à conversão de xilose a produtos tais como furfural. As maiores recuperações de xilose foram de 57,85 e 68,76% para os pré-tratamentos de cavacos impregnados com 0,5% H₂SO₄ a 200°C por 3,5min % (código 02B, log Ro = 3,49) e a 210°C por 2 min% (código 11A, log Ro = 3,54), respectivamente.

A recuperação de xilose foi equivalente nos pré-tratamentos realizados a 200°C em ambas as concentrações ácidas, mas quando os pré-tratamentos foram realizados a 210°C, a recuperação de xilose decresceu com o aumento do tempo de pré-tratamento. Desta forma, pode-se concluir que, ao aumentarmos a força ácida de 0,25 para 0,5% à 210°C, melhoramos as condições de hidrólise das hemiceluloses obtendo-se um maior rendimento, sendo que este diminuiu com o aumento do tempo de residência no reator devido à reações de desidratação. Por outro lado, à 200 °C, a hidrólise das hemiceluloses aparentemente restringiu-se a regiões mais expostas de sua estrutura, ou seja, mais acessíveis à ação do catalisador.

Aumentando-se a severidade do tratamento, houve a liberação de maiores quantidades de glucose nas frações solúveis em água, sugerindo mais uma vez a

hidrólise parcial de regiões mais acessíveis da celulose (regiões “amorfas”). Uma despolimerização considerável da celulose foi observada em relação a maiores severidades, atingindo 28% em condições mais drásticas de pré-tratamento a 210°C por 5 min, com cavacos impregnados com H₂SO₄ a 0,5% % (código 13B, log Ro = 3,94) (Figura 25, direita).

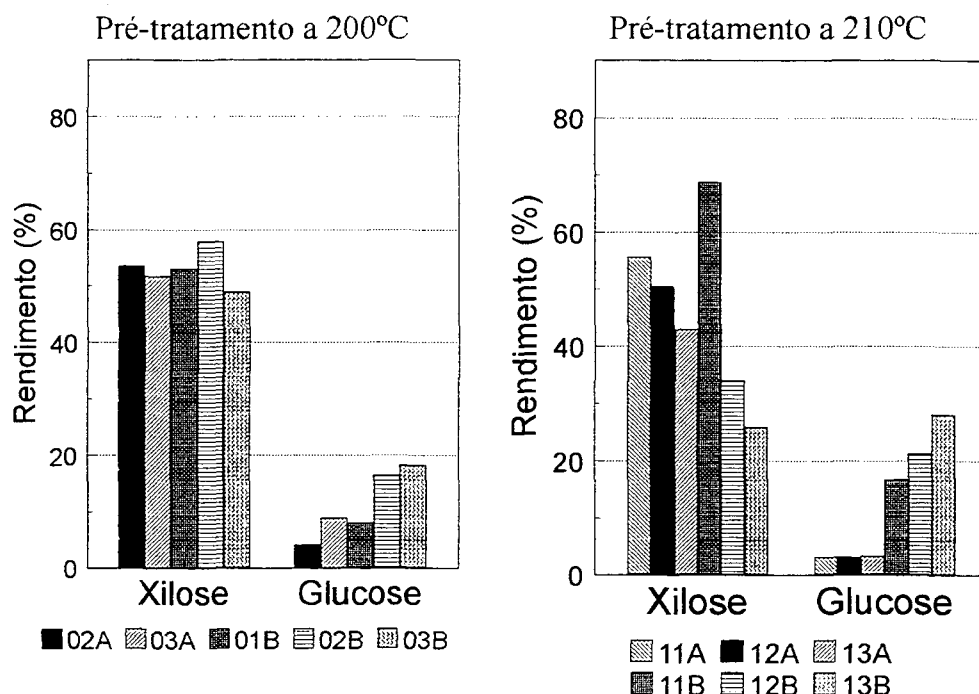


Figura 25. Recuperação de glucose (celulose) e xilose (xilana) na fração solúvel em água (EPV-SA) após o pré-tratamento a vapor de cavacos de *E. grandis* impregnados com ácido.

As Figuras 26 e 27 mostram os espectros de ultravioleta (UV) das frações solúveis em água obtidas a partir dos substratos pré-tratados. As absorções em 205 e 280nm aumentaram com o aumento da drasticidade do pré-tratamento, sugerindo maiores índices de hidrólise e solubilização de compostos aromáticos derivados do componente lignínico presente nos cavacos. Embora tal comportamento espectrométrico pudesse também estar associado à ocorrência de produtos de desidratação na fração solúvel em água, a análise cromatográfica destas frações indicou presença apenas negligível de

furfural e hidroximetilfurfural em solução, confirmando a expectativa de que o aumento da absorção a 205/280 nm era devido à hidrólise de lignina e/ou complexos lignina-carboidrato. A maior solubilização ocorreu a 210°C por 5 min usando como catalisador H_2SO_4 a 0,5% (código 13B, $\log R_o = 3,94$), onde o rendimento foi de 11,37%.

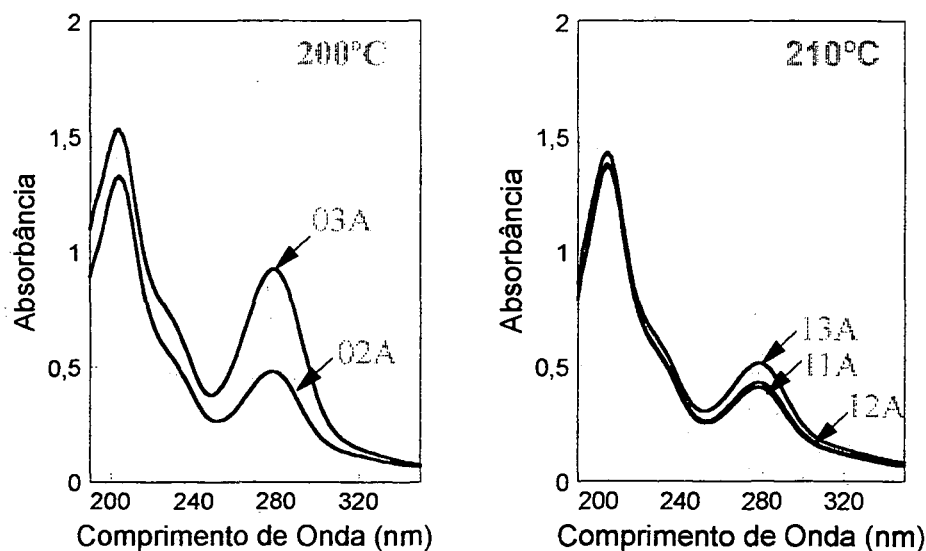


Figura 26. Espectros de ultravioleta da fração solúvel em água (EPV-SA). Pré-tratamento com H_2SO_4 a 0,25%.

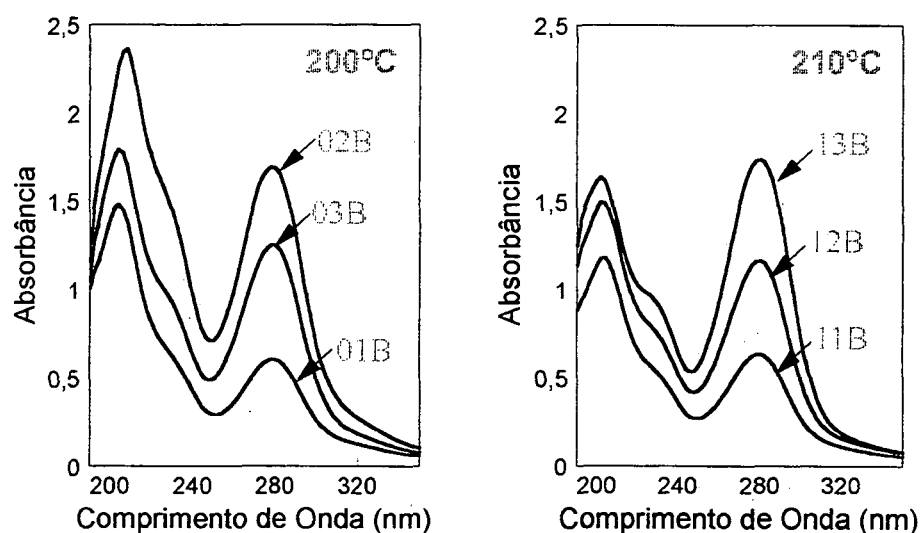


Figura 27. Espectros de ultravioleta da fração solúvel em água (EPV-SA). Pré-tratamento com H_2SO_4 a 0,5%.

4.2. Composição química das frações insolúveis em água

O pré-tratamento a vapor sob alta pressão teve grande influência sobre a composição química da fração insolúvel em água derivada de *E. grandis* (Tabela 3). O conteúdo de xilana do cavaco de madeira decresceu de 15% para menos de 2% quando os cavacos impregnados com 0,5% (m/v) H₂SO₄ foram pré-tratados a 200 e 210°C por um tempo de residência de 5 min (pré-tratamentos codificados como 03B e 13B, respectivamente). Estes resultados indicaram a grande eficiência do pré-tratamento a vapor na hidrólise das hemiceluloses que, com base na composição química do cavaco original, caracterizou a hidrólise de mais de 90% da xilana de *E. grandis* quando o pré-tratamento ocorreu sob as maiores condições de drasticidade. Com a remoção das hemiceluloses pela lavagem com água, o teor de lignina dos substratos aumentou em relação ao teor de lignina do cavaco não tratado e, quanto mais drástica a condição de pré-tratamento utilizada, maior a quantidade de lignina nas frações EPV-IA. A força ácida também contribuiu para o aumento do teor de lignina, onde a 0,5% de ácido, o aumento foi maior do que nas condições usadas com ácido a 0,25%. Por outro lado, o contrário foi observado com respeito ao conteúdo de celulose. Estas modificações na composição química foram basicamente um resultado da remoção das xilanas, embora outros fatores também influenciaram o balanço de massas, incluindo a hidrólise parcial de regiões mais acessíveis da celulose e a hidrólise e degradação da lignina. Esta degradação foi observada no decréscimo do total recuperado de lignina e celulose com o aumento do tempo de pré-tratamento e também foi observada nos espectros de ultravioleta das frações solúveis em água, conforme demonstrado pelo aumento nas absorções a 205 e 280nm (Figuras 26 e 27).

4.3. Extração alcalina de lignina após o pré-tratamento

Um dos principais objetivos deste trabalho foi o de estudar as modificações químicas da lignina de *E.grandis* durante o pré-tratamento a vapor e, para este fim, a extração alcalina foi selecionada como um método eficaz e economicamente viável para o isolamento da lignina em alto rendimento.

Tabela 3. Caracterização química¹ das frações EPV-IA

Condição	Glucana	Xilana	Lignina	Cinzas	Total
-	44,65	15,33	25,77	nd	85,75
02A	51,11 (87,87)	3,44 (17,22)	32,53 (96,90)	0,48	87,56
03A	54,31 (80,28)	2,91 (12,53)	34,63 (88,69)	0,36	92,21
01B	54,83 (86,43)	2,78 (12,76)	33,71 (92,06)	0,60	91,92
02B	53,50 (69,77)	3,08 (11,70)	37,83 (85,48)	0,20	94,61
03B	52,09 (63,09)	2,09 (7,37)	40,52 (85,03)	0,17	94,87
11A	59,53 (105,73)	3,27 (16,92)	32,93 (101,33)	0,29	96,02
12A	58,17 (103,92)	2,91 (15,14)	33,22 (102,83)	0,32	94,62
13A	56,73 (95,33)	2,83 (13,85)	33,62 (97,89)	1,14	94,32
11B	52,14 (82,75)	2,52 (11,65)	36,08 (99,21)	0,31	91,05
12B	47,35 (69,48)	2,03 (8,68)	39,01 (99,18)	0,39	88,78
13B	46,83 (56,30)	1,51 (5,59)	45,17 (97,55)	0,46	93,97

nd = não determinado

() = total recuperado com base na composição química do cavaco original

¹ valores expressos em g/100g de matéria seca

Através do aumento da severidade do pré-tratamento, houve um aumento gradual da quantidade de lignina solúvel em álcali recuperada após a precipitação ácida, indicando uma melhor remoção do componente lignínico com o aumento do tempo de pré-tratamento em ambas as temperaturas (Figura 28). Consequentemente, sob condições mais drásticas de pré-tratamento, a lignina sofreu fragmentação e hidrólise

parcial, levando a uma lignina modificada que pode ser removida por lavagem alcalina à temperatura ambiente.

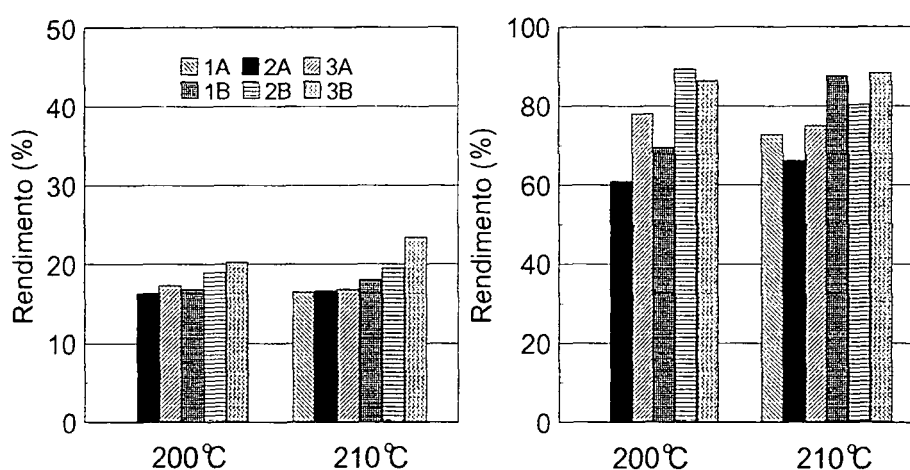


Figura 28. Rendimentos das extrações da lignina solúvel em álcali obtidas pelo método de explosão a vapor em relação ao peso seco (esquerda) e ao teor de lignina (direita) do material pré-tratado.

4.4. Rendimento de celulose, hemicelulose e lignina após o pré-tratamento

Os valores em parênteses da Tabela 3 demonstraram que os índices de recuperação de celulose (glucana), hemiceluloses (xilanas) e lignina diferiram para cada pré-tratamento efetuado. A recuperação de celulose na fração EPV-IA sugeriu que o aumento da severidade acarreta um maior grau de sua solubilização, também observado pelo aumento gradativo da concentração de glucose na fração EPV-SA (vide Figura 25).

A recuperação de xilanas na fração EPV-IA também decresceu com o aumento da severidade, correspondendo a uma variação total de 17,2 a 5,6% para pré-tratamentos efetuados sob as condições codificadas como 02A e 13B, respectivamente. No caso da condição de maior severidade (13B), este valor significa que aproximadamente 95% da hemicelulose foi hidrolisada durante o pré-tratamento, sendo que parte dos açúcares liberados por hidrólise foi recuperada na fração EPV-SA (Figura 25).

Finalmente, a recuperação de lignina na fração EPV-IA indicou que pré-tratamentos realizados a 210°C acarretaram maior perda de lignina por reações hidrolíticas. Por sua vez, todos os pré-tratamentos realizados a 210°C resultaram em rendimentos de 100% com base na lignina presente no cavaco, sugerindo que, face à inevitável perda de massa a estas temperaturas, reações de condensação foram responsáveis pela geração de materiais poliméricos que se comportam como lignina durante o procedimento de Klason.

Alternativamente, o rendimento total de recuperação da lignina foi obtido através da somatória da massa recuperada na fração EPV-SA_{OH} e da lignina de Klason presente na fração EPV-IA_{OH} e expresso em relação à quantidade de lignina presente no cavaco original. Foi observado, através dos rendimentos de recuperação obtidos após pré-tratamento a 200°C sob vários tempos de residência, que a lignina dos cavacos de madeira sofreu uma despolimerização ácida parcial e que estas reações hidrolíticas resultaram na liberação de uma quantidade considerável de fragmentos de lignina nas frações solúveis em água (vide absorção a 205 e 280nm nas Figuras 26 e 27). Nesta temperatura, os níveis de solubilização e/ou perda da lignina estiveram em torno de 4 a 22% em relação à quantidade de lignina originalmente presente no cavaco (Figura 29A). Em contraste, o pré-tratamento a 210°C produziu rendimentos de lignina maiores, algumas vezes superior a 100%. Esta observação pode ser mais uma vez justificada pelo envolvimento de sub-produtos de lignina e hemicelulose em reações de condensação, os quais produziram materiais poliméricos que foram medidos como lignina insolúvel em ácido durante um procedimento normal para a determinação de lignina de Klason.

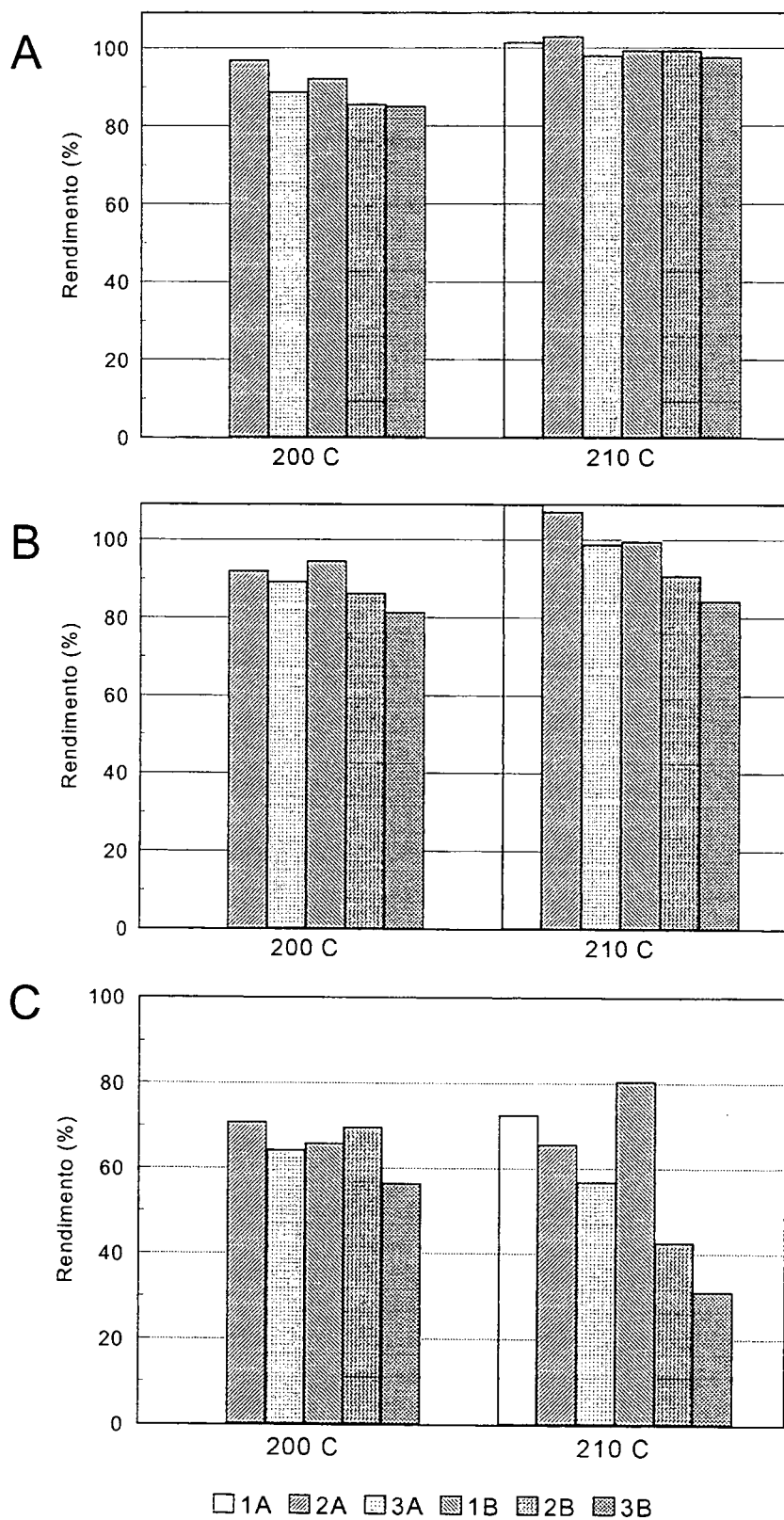


Figura 29. Rendimento de recuperação total (EPV-IA + EPV-SA) dos três componentes principais: (A) lignina, (B) glucose (glucanas) e (C) xilose (xilanas), após pré-tratamento de *E. grandis* impregnado com ácido.

É importante ressaltar que os rendimentos totais de recuperação de glucose (glucanas) e de xilose (xilanas), calculados com base no teor de carboidratos nas frações EPV-IA e EPV-SA, decresceram com o aumento do tempo de pré-tratamento em ambas as temperaturas testadas (Figura 29B e 29C). A recuperação de glucose variou de 91,9 e 108,8% para 81,3 e 84,3% à medida em que se aumentou a drasticidade do pré-tratamento a 200 e 210°C, respectivamente, enquanto que a de xilose variou de 70,7 e 72,5% para 56,3 e 31,1% em relação às mesmas temperaturas de pré-tratamento. Este decréscimo foi mais uma vez decorrente das reações de hidrólise e desidratação das hemiceluloses, assim como da hidrólise parcial das regiões mais acessíveis da celulose.

4.5. Caracterização físico-química das ligninas solúveis em álcali

O efeito da lavagem alcalina sobre os substratos pré-tratados foi facilmente observado nos espectros de FTIR, através de uma considerável diminuição na intensidade de absorção nas regiões de 1510-1517 e 1600-1620 cm^{-1} (estiramento da ligação C-C dos anéis aromáticos) (Figura 30) (Faix e Böttcher, 1993; Morais *et al.*, 1994). Por isso, como resultado desta lignina removida, intensidades de absorção nas regiões usualmente associadas a carboidratos (deformações axiais de C-O e C-O-C em álcoois secundários e ligações glicosídicas a 1050-1250 cm^{-1}) tornaram-se predominantes no espectro de FTIR da fração EPV-IA_{OH}. Por outro lado, o espectro de FTIR da fração solúvel em álcali (EPV-SA_{OH}) demonstrou ser muito característico de ligninas técnicas (Morais *et al.*, 1994). Ainda que os espectros possam facilmente demonstrar o curso do isolamento da lignina, não houve uma diferença considerável entre os espectros obtidos sob diferentes condições de pré-tratamento, razão pela qual os dados apresentados na Figura 30 foram somente relatados para as frações obtidas após

tratamento dos cavacos impregnados a 210°C por 3,5 min usando ácido a 0,5% (código 12B, $\log R_o = 3,78$).

Entretanto, a análise multivariada dos espectros de FTIR permitiu uma melhor observação das diferenças espectrais existentes entre os diferentes materiais obtidos (Figura 30), cujas variações, para cada um dos grandes grupos, estão relacionadas com as modificações químicas que decorrem das diferentes condições de pré-tratamento.

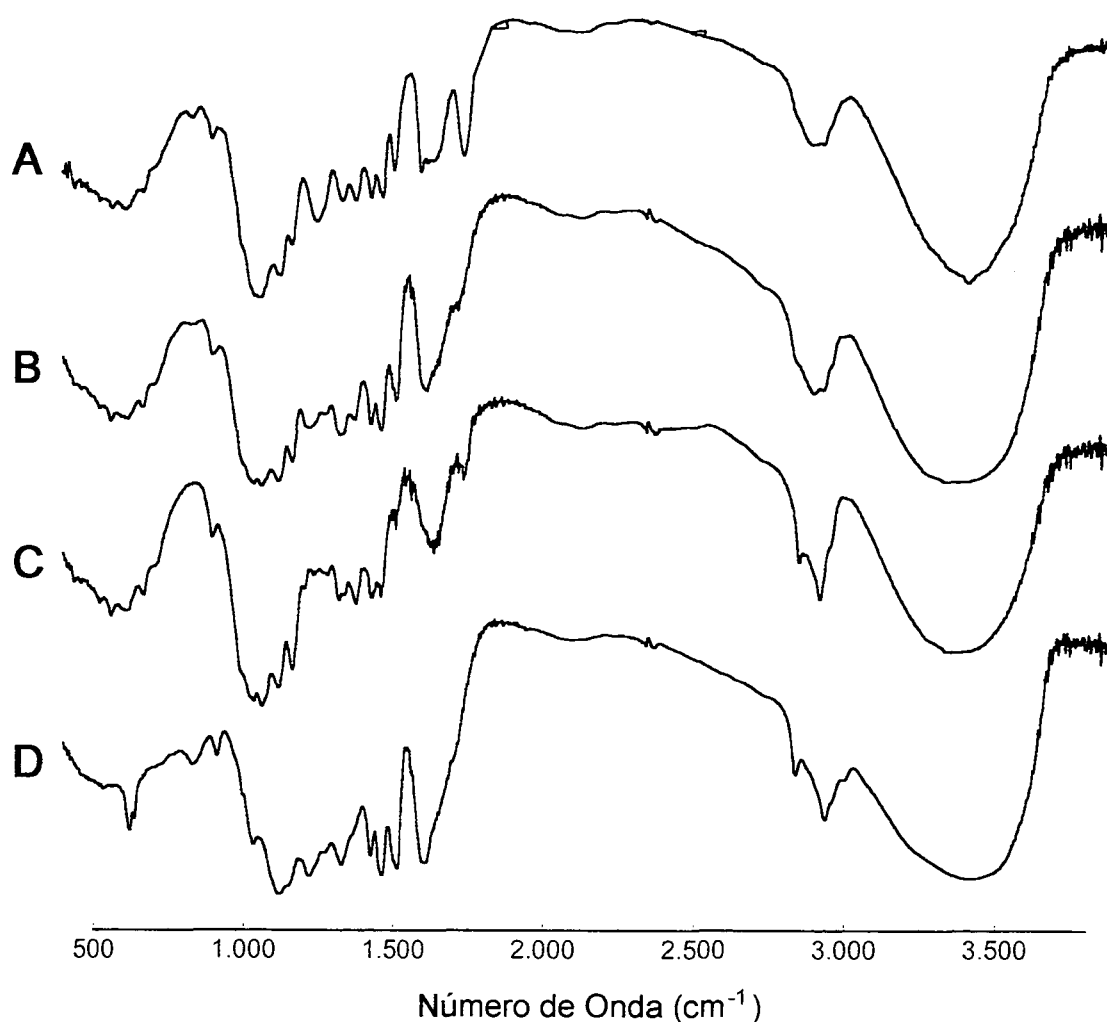


Figura 30. Espectro de FTIR das frações derivadas de *E. grandis* por pré-tratamento a vapor (condições codificadas como 12B). A. Cavavos não-tratados; B. fração insolúvel em água; C. fração insolúvel em álcali; D. fração solúvel em álcali (lignina).

A partir da obtenção da lignina de *E. grandis*, o estudo das modificações químicas da estrutura da lignina, ocorridas durante o seu processo de isolamento, foi realizado através de análises químicas e espectroscópicas, tais como espectroscopia de RMN, cromatografia de exclusão, calorimetria de varredura diferencial (DSC), teor de hidroxilas aromáticas e alifáticas e outros já citados em Materiais e Métodos (item 3).

A análise por RMN e a determinação dos teores de hidroxilas totais e de metoxilas, exigiram solubilidade das ligninas em solventes orgânicos (THF, CHCl_3 , piridina). Para atender a esta exigência, as ligninas então foram per-acetiladas em mistura de piridina/anidrido acético. Os espectros de FTIR das ligninas acetiladas demonstraram uma grande diminuição de absorção na região de 3400 a 3600 cm^{-1} (estiramento O-H em hidroxilas), comparado com o espectro da lignina não acetilada (Figura 30D, página 65), comprovando a grande eficiência obtida na reação de acetilação (Figuras 31 e 32).

A reação de acetilação acarretou poucas mudanças na região correspondente à impressão digital da lignina, de 1000 a 1500 cm^{-1} . No entanto houve o aparecimento de duas bandas bem distintas na região de 1740 e 1760 cm^{-1} , que correspondem ao estiramento da ligação C=O em acetatos aromáticos e alifáticos, respectivamente. A relação entre estas duas bandas se diferenciaram para as diferentes condições de pré-tratamento testadas, indicando que o pré-tratamento a vapor acarretou uma alteração considerável na distribuição de hidroxilas aromáticas e alifáticas na macromolécula de lignina.

Entre os espectros das ligninas acetiladas, a atenuação das bandas associadas a hidroxilas permitiu a observação de variações na região compreendida entre 2800 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} , que correspondem às deformações axiais C-H em grupamentos CH_3 , CH_2 e CH aromático. Estas variações sugeriram alterações na aromaticidade das

macromoléculas de lignina, parcialmente justificadas pelo efeito do pré-tratamento sobre os seus graus de condensação.

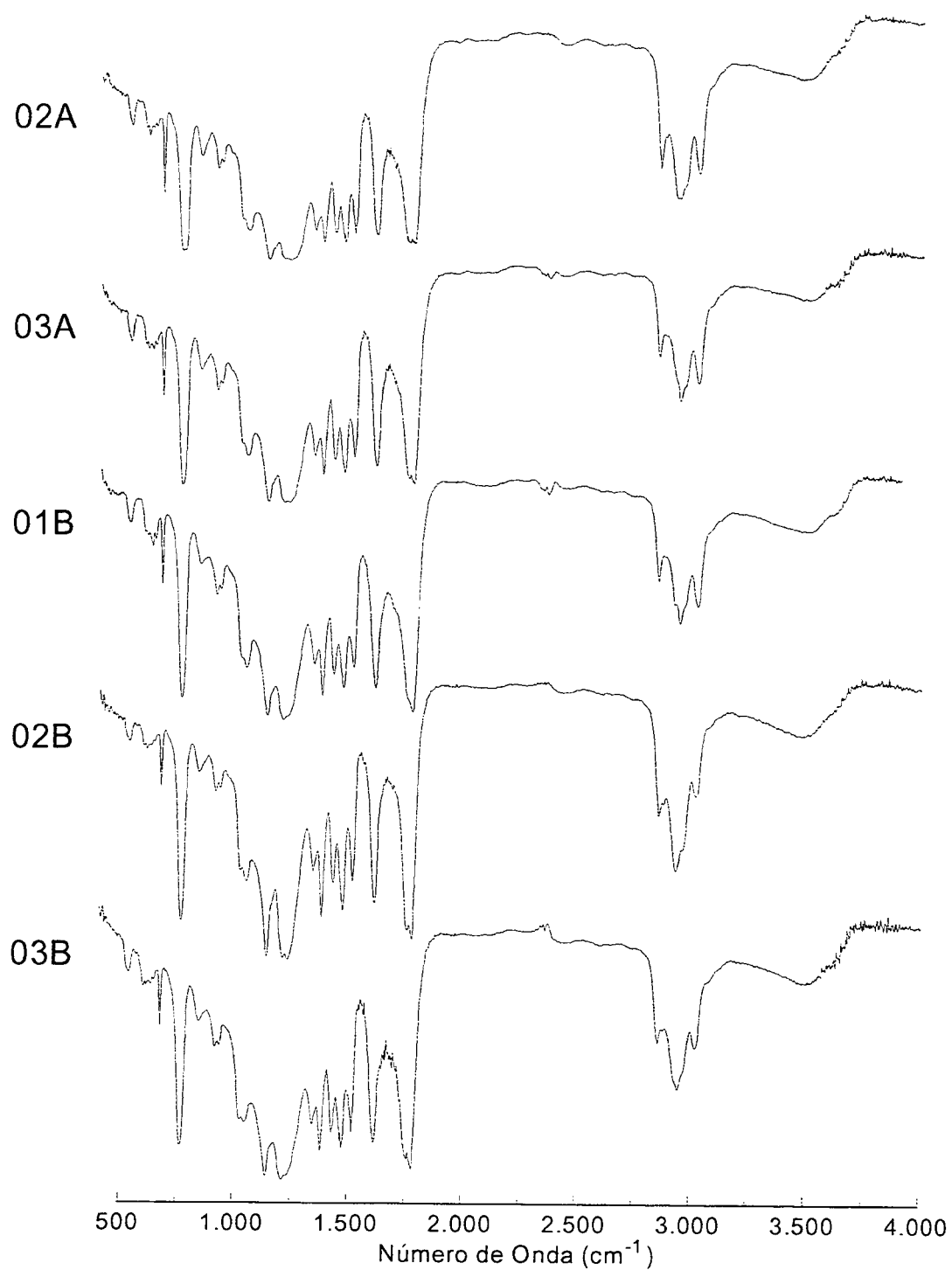


Figura 31. FTIR das ligninas acetiladas obtida após precipitação ácida. Pré-tratamento à 200°C.

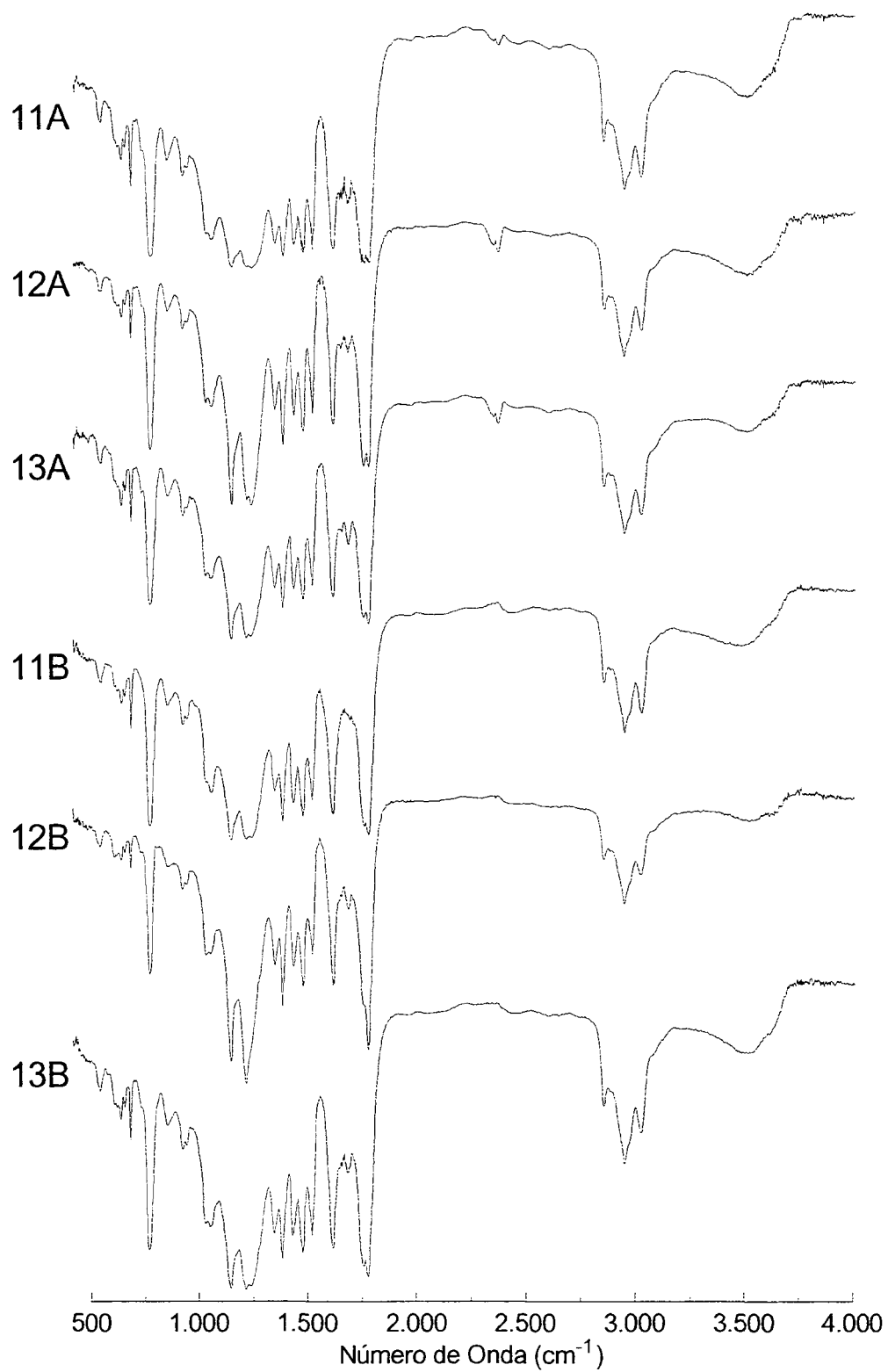


Figura 32. FTIR das ligninas acetiladas obtida após precipitação ácida. Pré-tratamento à 210°C.

A análise elementar das ligninas isoladas por extração alcalina demonstrou que o aumento da severidade do pré-tratamento causou uma considerável alteração na relação CH das frações (Tabela 4). No entanto, não foi possível indicar uma tendência generalizada para cada série de pré-tratamento efetuada, como por exemplo em função do aumento do tempo de reação (2 a 5 min) sob cada temperatura e força ácida utilizada no pré-tratamento. As ligninas solúveis em álcali (frações EPV-SA_{OH}) apresentaram-se de constituição distinta das ligninas usualmente preparadas a partir de madeira moída e, de acordo com este método, poderiam ser coletivamente consideradas como ligninas atípicas, oriundas de um processo termo-degradativo cujo efeito resultou em alterações significativas na estrutura da lignina nativa.

Sabe-se que o teor de metoxilas representa uma importante característica estrutural das ligninas e que tais percentuais permitem classificar estas macromoléculas em relação às suas naturezas guaiacilica e siringilica (lignina GS) (Fengel e Wegener, 1989). Tendo sido este trabalho realizado com *E. grandis*, a lignina isolada deste tipo de angiosperma (madeira dura) deveria ter correspondido a um teor de metoxilas em torno de 20-22%, caracterizando a ocorrência de unidades aromáticas dimetoxiladas. No entanto, a análise pelo método de Zeisel demonstrou, mediante um DPR de 1% em relação ao peso seco das ligninas, que o teor de metoxilas jamais superou 14 pontos percentuais (Tabela 4), o que sugere fortemente a classificação destas ligninas como predominantemente guaiacilicas (lignina G). Como esta hipótese se apresenta contraditória à natureza GS da lignina existente em *E. grandis*, estes resultados sugerem a ocorrência de consideráveis níveis de desmetoxilação das unidades aromáticas, ou mesmo de um provável comprometimento preferencial de unidades siringilicas durante o pré-tratamento. Infelizmente, não foi possível traçar nenhuma correlação direta entre o teor de metoxilas das ligninas e a severidade utilizada no pré-tratamento que as gerou e,

por questões técnicas, a relação G:S das ligninas isoladas não pode ser determinada neste estudo.

O refinamento da análise centesimal de cada lignina isolada foi posteriormente baseado no teor de hidroxilas totais, obtido de acordo com o método descrito por Barnet *et al.* (vide Zakis, 1994). Enquanto pré-tratamentos efetuados a 200°C resultaram em uma diminuição gradativa dos teores de hidroxilas totais nas ligninas isoladas, um efeito oposto foi observado para pré-tratamentos efetuados a 210°C e tais variações estiveram mais intimamente relacionadas com o aumento do tempo de residência dos cavacos no reator. Para pré-tratamentos realizados a 200°C, o teor de hidroxilas totais diminuiu de 6,38 (código 02A) para 5,39 (código 03A) e de 4,73 (código 01B) para 4,17 (código 03B) quando cavacos impregnados com H₂SO₄ a 0,25 e 0,5% foram utilizados, respectivamente. Por outro lado, quando cavacos impregnados com H₂SO₄ a 0,25 e 0,5% foram pré-tratados a 210°C, o teor de hidroxilas totais aumentou respectivamente de 6,70 (código 12A) para 8,69 (código 13A) e de 4,11 (código 11B) para 6,08 (código 13B), conforme os dados da Tabela 4.

Os espectros de RMN de ¹H (Figura 33) das ligninas acetiladas, derivadas da precipitação ácida do extrato alcalino, foram muito úteis para a determinação da relação entre as hidroxilas alifáticas e aromáticas (OH_{ali}/OH_{aro}) nas ligninas pré-tratadas a vapor (Tabela 4). Esta relação foi determinada através da razão entre a percentagem de OH_{ali} e a percentagem de OH_{aro} derivada das integrações dos espectros de RMN de ¹H nas regiões de 2,60-2,28 ppm e 2,28-1,70 ppm, que correspondem aos acetatos aromáticos e alifáticos, respectivamente. Foi observado que, a medida em que se aumentou o tempo de pré-tratamento, a relação OH_{ali}/OH_{aro} diminuiu, exceto para os pré-tratamentos efetuados por 2 a 5 min a 210°C usando H₂SO₄ a 0,5% como catalisador (códigos 11B, 12B e 13B). Esta diminuição pode ter sido decorrente: (a) da hidrólise de ligações α-O-4

e β -O-4 na estrutura das ligninas, (b) da remoção de suas cadeias laterais, e (c) da subsequente redução de suas distribuições em relação à massa molecular das macromoléculas.

Tabela 4. Composição química das ligninas obtidas após precipitação ácida.

	C ¹	H ¹	O ¹	OCH ₃ ²	OH _t ³	OH _{ali} ⁴	OH _{aro} ⁴	OH _{ali} /OH _{aro}
LMM	60,6	6,0	32,0	22,00	11,1	8,80	2,30	3,83
02 ^A	52,8	4,8	42,4	13,84	6,38	3,79	2,59	1,46
03 ^A	53,4	4,9	41,7	12,11	5,39	3,05	2,34	1,30
01B	54,4	4,8	40,8	13,11	4,73	2,75	1,98	1,39
02B	54,2	4,9	40,9	11,44	4,20	2,43	1,77	1,37
03B	53,9	4,7	41,4	12,70	4,17	2,34	1,83	1,28
11A	50,9	4,7	44,4	12,17	6,70	4,07	2,63	1,55
12A	51,9	4,8	46,0	11,58	7,77	4,56	3,21	1,42
13A	52,5	4,7	46,5	13,37	8,69	5,04	3,65	1,38
11B	51,1	4,6	44,3	12,47	4,11	2,37	1,74	1,36
12B	52,9	4,8	42,3	11,94	4,54	2,43	2,11	1,15
13B	53,9	4,9	41,2	10,81	6,08	3,37	2,71	1,24

LMM = Lignina de madeira moída (Piló-Veloso *et al.*, 1993);

¹ Análise elementar (CHN) realizado pelo laboratório analítico da COPEL;

² Teor de metoxila pelo método de Zeisel modificado (Zakis, 1994);

³ Teor de hidroxila total pelo método de Barnet *et al.* (Zakis, 1994);

⁴ Teor de hidroxilas alifáticas, aromáticas e relação OH_{ali}/OH_{aro} determinado por RMN-¹H.

Conforme antecipado durante a discussão sobre a análise centesimal, o cálculo da fórmula C₉ também revelou que as ligninas isoladas da fração EPV-IA por extração alcalina representa uma classe distinta de ligninas e que suas respectivas estruturas sugerem classificação como ligninas do tipo guaiacilica (Tabela 5). Tal evidência foi também discutida quando da determinação do teor de metoxilas das ligninas isoladas. Porém, a não caracterização da relação GS (guaiacil:siringil) nestas ligninas não nos permitiu precisar se o baixo teor de metoxilas foi decorrente de reações de

desmetoxilação randômicas ou se unidades guaiacila (ou siringila) foram preferencialmente degradadas durante o pré-tratamento.

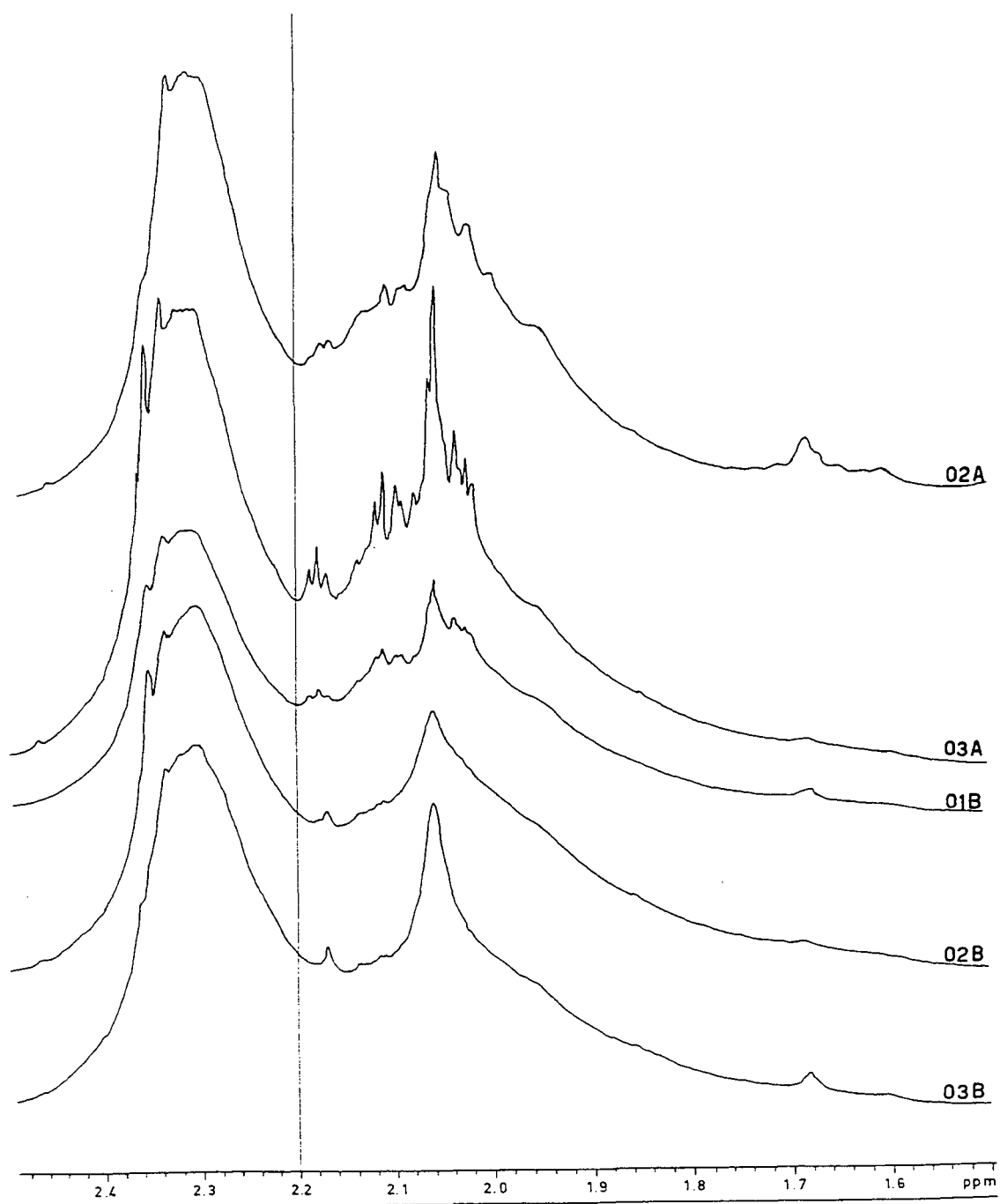


Figura 33A. Extrato dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H) das ligninas acetiladas, relativo à região atribuída ao deslocamento químico do hidrogênio de acetatos alifáticos e acetatos aromáticos.

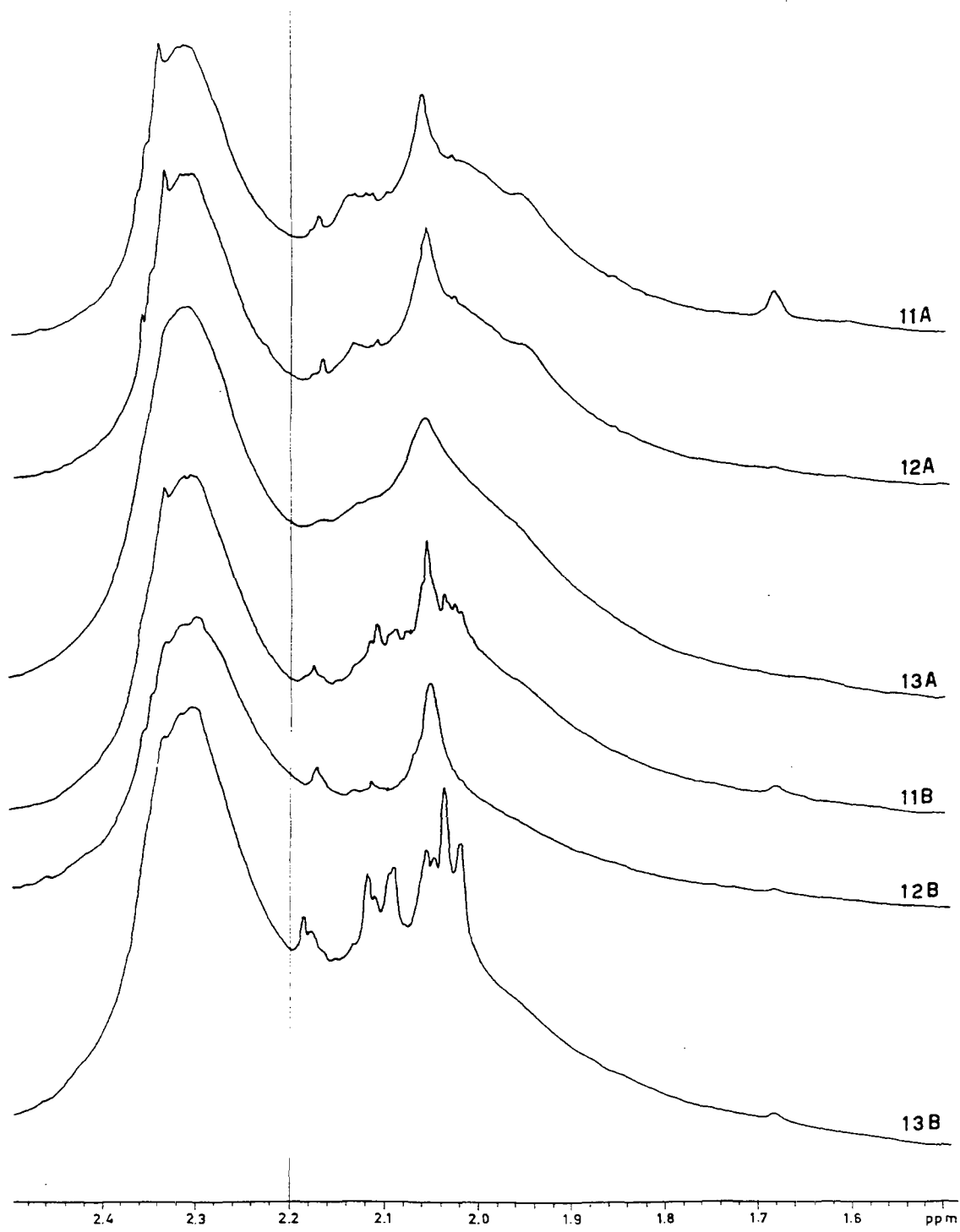


Figura 33B. Extrato dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H) das ligninas acetiladas, relativo à região atribuída ao deslocamento químico do hidrogênio de acetatos alifáticos e acetatos aromáticos.

Tabela 5. Fórmula C9 das ligninas obtidas após precipitação ácida.

Lignina	Fórmula C9
LMM	$C_9H_{7,90}O_{2,73}(OCH_3)_{1,50}(OH_{ali})_{0,73}(OH_{aro})_{0,19}$
02A	$C_9H_{6,80}O_{3,94}(OCH_3)_{1,00}(OH_{ali})_{0,50}(OH_{aro})_{0,34}$
03A	$C_9H_{7,48}O_{4,21}(OCH_3)_{0,87}(OH_{ali})_{0,40}(OH_{aro})_{0,31}$
01B	$C_9H_{7,05}O_{4,05}(OCH_3)_{0,93}(OH_{ali})_{0,35}(OH_{aro})_{0,26}$
02B	$C_9H_{7,62}O_{4,22}(OCH_3)_{0,80}(OH_{ali})_{0,31}(OH_{aro})_{0,23}$
03B	$C_9H_{7,04}O_{4,27}(OCH_3)_{0,90}(OH_{ali})_{0,30}(OH_{aro})_{0,24}$
11A	$C_9H_{7,15}O_{4,64}(OCH_3)_{0,96}(OH_{ali})_{0,56}(OH_{aro})_{0,36}$
12A	$C_9H_{7,15}O_{4,28}(OCH_3)_{0,85}(OH_{ali})_{0,61}(OH_{aro})_{0,43}$
13A	$C_9H_{6,53}O_{3,96}(OCH_3)_{0,98}(OH_{ali})_{0,68}(OH_{aro})_{0,49}$
11B	$C_9H_{7,28}O_{4,97}(OCH_3)_{0,94}(OH_{ali})_{0,33}(OH_{aro})_{0,24}$
12B	$C_9H_{7,48}O_{4,46}(OCH_3)_{0,86}(OH_{ali})_{0,32}(OH_{aro})_{0,28}$
13B	$C_9H_{7,52}O_{4,06}(OCH_3)_{0,76}(OH_{ali})_{0,43}(OH_{aro})_{0,35}$

Com o objetivo de melhor visualizar o comportamento das OH_T , OH_{ali} e OH_{aro} durante o pré-tratamento, foram relacionados graficamente os teores de hidroxilas com os tempos de residência no reator. Em pré-tratamentos a 200°C, os teores de hidroxilas diminuíram com o aumento do tempo de residência no reator (Figura 34). No entanto, com o aumento da temperatura de pré-tratamento de 200 para 210°C, os teores de hidroxilas aumentaram com o aumento do tempo de pré-tratamento (Figura 34), uma tendência oposta à observada anteriormente. Esta tendência esteve provavelmente relacionada com a formação de novos grupamentos hidroxílicos, principalmente aromáticos, através da adição nucleofílica de água no carbono remanescente da hidrólise de ligações aril-éter (α - e β -O-4) e/ou da perda ou hidrólise da cadeia lateral das unidades C9 (fenilpropanóides).

O efeito das várias condições de pré-tratamento sobre a massa molecular da lignina foi determinado por cromatografia de exclusão (permeação em gel). A distribuição em massas moleculares de cada fração acetilada foi então monitorada

(Figuras 35 e 36) e os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 6. A 200°C, observou-se um decréscimo na massa molecular média da lignina com o aumento do tempo de pré-tratamento de cavacos impregnados com ácido a 0,5% (Tabela 6), provavelmente devido à reações de fragmentação com liberação de produtos fenólicos. Conforme a Figura 35, tal comportamento foi também registrado nos perfis de eluição obtidos por cromatografia de exclusão, embora o mesmo não tenha sido observado para pré-tratamentos a 200°C utilizando ácido a 0,25%.

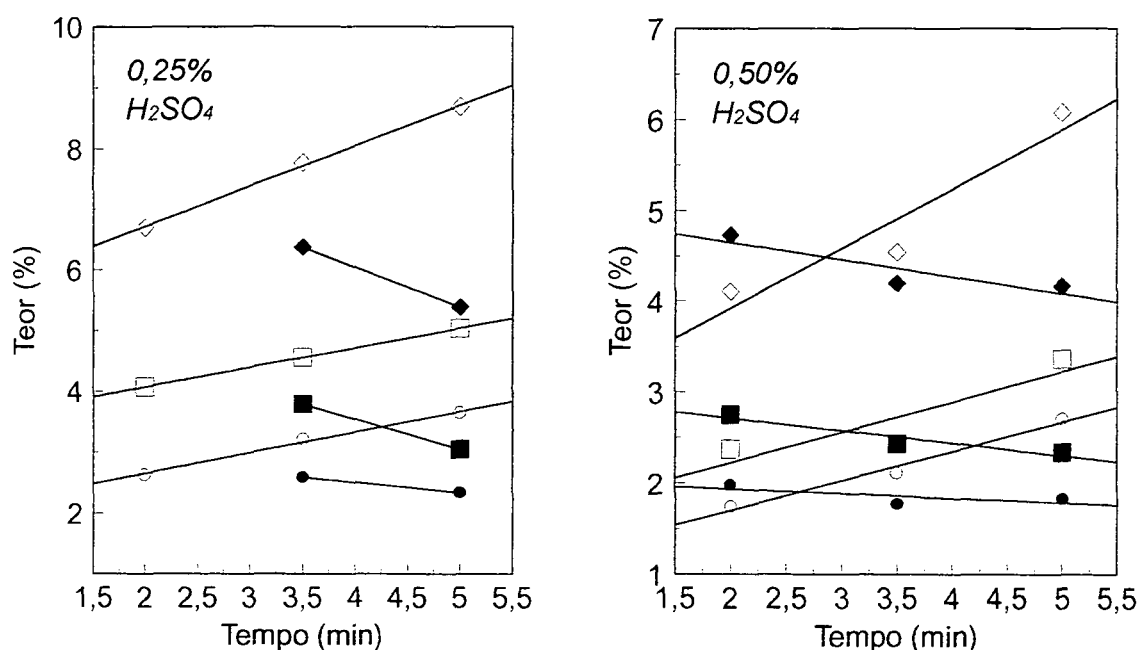


Figura 34. Perfil do teor de hidroxilas das ligninas em função do aumento do tempo de pré-tratamento. Marcadores cheios, pré-tratamento a 200°C; marcadores vazios, pré-tratamento a 210°C. Losangos, hidroxilas totais; quadrados, hidroxilas alifáticas; círculos, hidroxilas aromáticas.

No pré-tratamento a 210°C sob ambas forças ácidas (0,25 e 0,5%), o perfil dos cromatogramas de exclusão foi praticamente o mesmo (Figura 36), exceto para a lignina oriunda do pré-tratamento codificado como 12B. Nesse caso, uma despolimerização gradual da lignina foi observada ao aumentarmos o tempo de tratamento de 2 (código

11B) para 3,5 min (código 12B), mas, quando o material foi tratado por 5 min (código 13B), observou-se um ganho em massas moleculares maiores (Tabela 6) que pode estar atribuído à reações de condensação oriundas da formação de radicais livres e combinação destes durante o processo de pré-tratamento (Tanahashi, 1990).

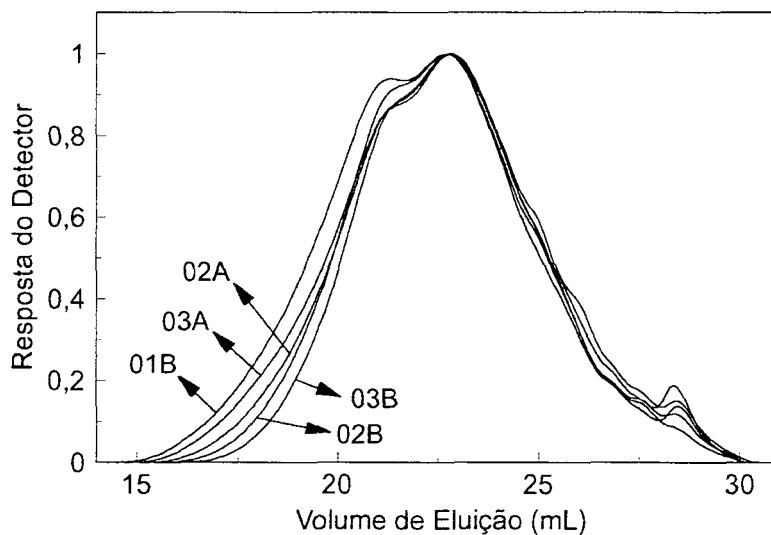


Figura 35. Perfil de eluição em cromatografia de permeação em gel das ligninas acetiladas, obtidas após precipitação ácida do extrato alcalino derivado de pré-tratamentos realizados a 200°C.

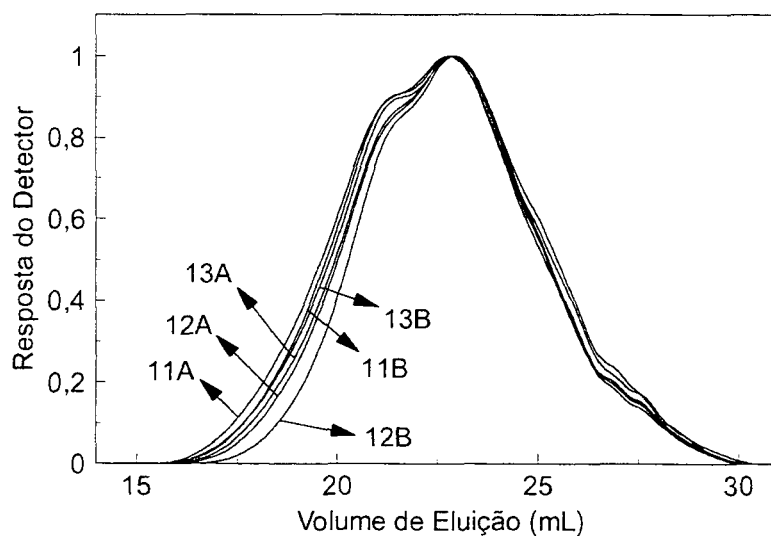


Figura 36. Perfil de eluição em cromatografia de permeação em gel das ligninas acetiladas, obtidas após precipitação ácida do extrato alcalino derivado de pré-tratamentos realizados a 210°C.

Tabela 6. Massa molecular aparente e polidispersidade das ligninas obtidas após a precipitação ácida da fração solúvel em álcali (EPV-SA_{OH}).

Condição	Mw	Mn	Mw/Mn
02A	4386	1990	2,20
03A	5084	2194	2,32
01B	5850	2496	2,34
02B	4171	2140	1,95
03B	3758	1962	1,91
11A	4662	2384	1,96
12A	4027	2300	1,75
13A	4163	2335	1,78
11B	4410	2373	1,86
12B	3583	2136	1,68
13B	4321	2195	1,97

Com o objetivo de enriquecer a investigação das propriedades das ligninas obtidas após pré-tratamento, e de avaliar, mesmo que indiretamente, os seus graus de condensação, as ligninas foram submetidas à análise térmica. Inicialmente, foi observado que todos os eventos de perda de massa, caracterizados por análise termogravimétrica diferencial (DTG), foram acompanhados por reações de transformação cuja detecção foi simultaneamente realizada por calorimetria de varredura diferencial (DSC) (Figuras 37 e 38). Dada a natureza deste método analítico e a heterogeneidade inerente ao material em análise, tais reações de transformação provavelmente envolveram uma grande variedade de fenômenos desde a perda de água (a temperaturas em torno de 100°C), cuja ocorrência não foi registrada no gráfico devido ao baixo teor de umidade das amostras, até reações de cunho degradativo como rearranjos estruturais, pirólise, condensação, hidrólise e fragmentação. Porém, dada a correspondência quase direta entre os dados de DTG e de DSC, a discussão apresentada abaixo foi direcionada à ocorrência de reações de fragmentação, embora outros

fenômenos possam ter sido eventualmente envolvidos durante o processo de perda de massa.

Os perfis de DSC das frações EPV-SA_{OH} derivadas do pré-tratamento a 200°C (Figuras 37 e 38, à esquerda) indicaram que a fragmentação da lignina ocorreu em duas faixas distintas de temperatura. Isto foi mais aparente nas frações EPV-SA_{OH} obtidas após tempos de residência mais longos dentro do reator (ver 03A e 03B nas Figuras 37 e 38, gráficos à esquerda). Entretanto, ao aumentarmos a severidade do pré-tratamento para 210°C (ver sequência 11A, 12A e 13A na Figura 37, gráfico à direita), a lignina registrou uma temperatura média de fragmentação de 400°C, com evidências de menores índices de perda de massa na região de 425-440°C. Portanto, o deslocamento do perfil de fragmentação foi uma clara indicação que a lignina sofreu hidrólise parcial à medida que aumentou a severidade do pré-tratamento. De fato, este é um resultado esperado pois quanto maior a fragmentação da lignina, mais alta a quantidade de oligômeros liberada e estes oligômeros, solúveis em álcali e de baixa massa molecular, têm maior percentagem de ligações químicas mais termolábeis por unidades de fenilpropano. Por outro lado, a redução na ocorrência de fenômenos de transformação à temperaturas superiores a 400°C sugere uma diminuição na contribuição percentual de ligações químicas mais recalcitrantes na estrutura da lignina, ou seja, uma redução do grau de condensação das ligninas com o aumento da severidade.

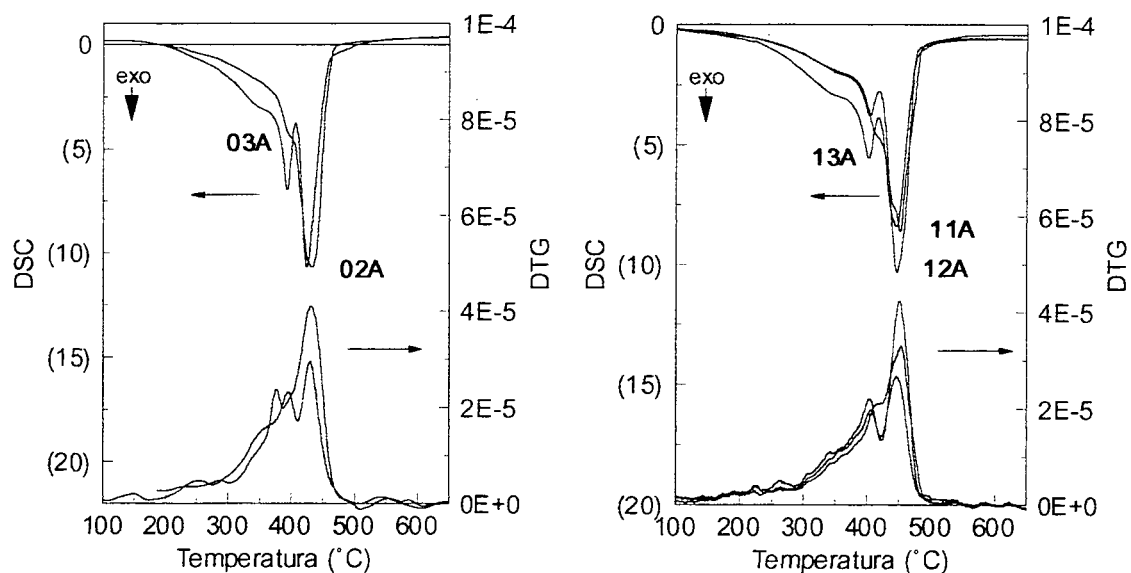


Figura 37. Calorimetria de varredura diferencial da fração solúvel em álcali (EPV-SAOH) derivada do pré-tratamento de cavacos de *E.grandis* impregnados com ácido a 0,25%.

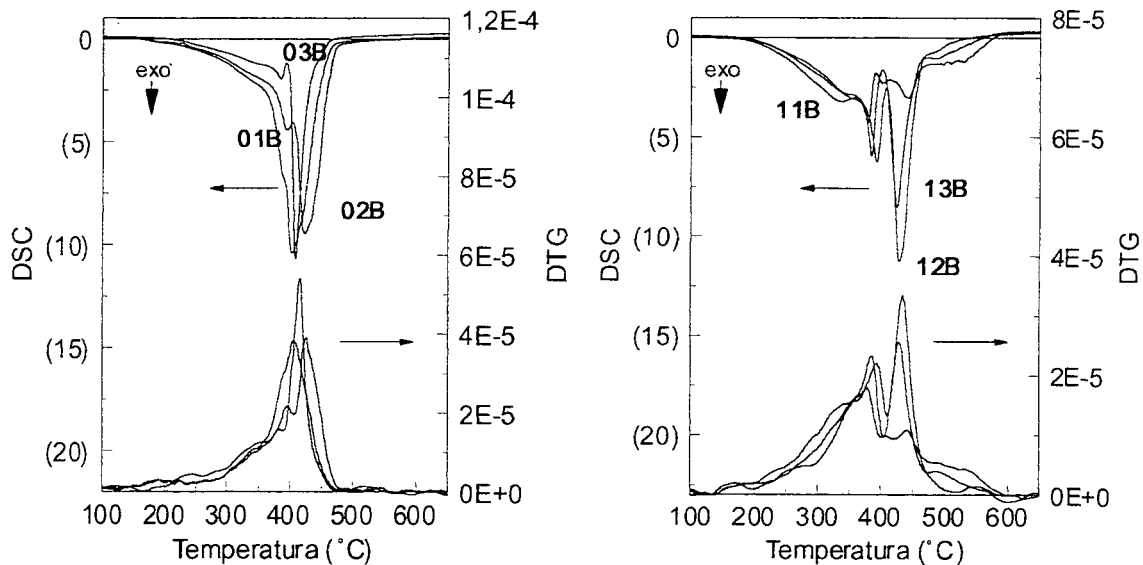


Figura 38. Calorimetria de varredura diferencial da fração solúvel em álcali (EPV-SAOH) derivada do pré-tratamento de cavacos de *E.grandis* impregnados com ácido a 0,5%.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

As temperaturas utilizadas para o pré-tratamento foram escolhidas com base no estudo comparativo desenvolvido por Saddler *et al.* (1993), onde foi demonstrado que, para pré-tratamentos a vapor efetuados sob catálise ácida, a maior parte dos materiais até hoje estudados apresentam boa resposta à faixa de temperatura de 200 a 210°C. Por outro lado, o tempo de pré-tratamento foi limitado a 5 min devido ao aumento da tendência à desidratação dos carboidratos derivados das hemiceluloses, que naturalmente ocorre com o aumento do tempo de residência no reator (Brownell e Saddler, 1984; Saddler *et al.*, 1993), enquanto que a força ácida foi baseada nos estudos desenvolvidos no National Renewable Energy Laboratory (Golden, CO, USA) para a hidrólise de fitobiomassa utilizando ácido sulfúrico diluído (Schell *et al.*, 1991; Torget *et al.*, 1991; Torget e Hsu, 1994). Via de regra, a eficiência do pré-tratamento foi avaliada em relação ao rendimento de açúcares fermentescíveis no extrato aquoso, à produção de inibidores e/ou substâncias tóxicas a processos fermentativos nesta mesma fração (Mês-Hartree e Saddler, 1983), à recuperação de material fibroso na fração insolúvel em água e, finalmente, ao rendimento de extração alcalina da lignina a partir deste mesmo material fibroso. Embora tais condições tenham sido relativamente satisfeitas, a heterogeneidade do processo em questão não permitiu com que os rendimentos finais da fração aquosa fossem obtidos sob a mesma severidade na qual o melhor rendimento de lignina no extrato alcalino foi obtido.

5.1. Eficiência obtida no pré-tratamento de cavacos de *E. grandis*

Os efeitos benéficos do uso de um catalisador ácido durante a explosão a vapor de materiais lignocelulósicos tem sido bem documentada na literatura. Assim, o uso de

HNO₃ (Saddler *et al*, 1982), SO₂ (Ramos *et al*, 1992a), H₂SO₄ diluído (Torget *et al*, 1991) e H₃PO₄ diluído (Dechamps *et al*, 1996) tem sido relatado para aumentar a recuperação total das frações pré-tratadas (incluindo açúcares derivados das hemiceluloses), assim como a susceptibilidade dos resíduos insolúveis à hidrólise enzimática. Deve ser enfatizado que a impregnação ácida também diminui a quantidade de vapor requerido para o melhor pré-tratamento dos cavacos de madeira. Portanto, pelas razões mencionadas acima, o pré-tratamento na ausência de catalisador ácido não foi considerado neste estudo.

Os cavacos impregnados de *E. grandis* foram tratados a vapor sob uma variedade de temperaturas e tempos de residência no reator para avaliar o efeito do pré-tratamento sobre a recuperação de açúcares no extrato aquoso e sobre a estrutura química da lignina obtida após extração alcalina. Houve uma diminuição gradual no rendimento das frações tratadas a vapor à medida que condições mais drásticas de pré-tratamento foram testadas, indicativo da destruição parcial de carboidratos e outros componentes da madeira e a subsequente perda parcial destes como produtos voláteis (Figura 23, página 54).

Aumentando-se a severidade do tratamento, houve a liberação de maiores quantidades de glucose nas frações solúveis em água, mais uma vez indicando hidrólise parcial de regiões mais acessíveis da celulose. Estes resultados foram diferentes daqueles obtidos anteriormente a partir de outras espécies de madeiras duras, incluindo cavacos de *E. viminalis* (Ramos *et al*, 1992a,b) e cavacos de *E. grandis* com 40 anos de idade (Dekker *et al*, 1987), demonstrando que a susceptibilidade ao pré-tratamento depende do tipo e idade da árvore, mesmo que entre árvores pertencentes ao mesmo gênero.

De um modo geral, o aumento da drasticidade do pré-tratamento diminuiu o rendimento de xilose e aumentou a recuperação de glucose na fração solúvel em água, particularmente para pré-tratamentos efetuados a 210°C. No entanto, dos parâmetros de severidade que controlam o pré-tratamento, o aumento do tempo de residência no reator foi o que acarretou maiores perdas, particularmente no rendimento de xilose. Portanto, a exposição prolongada de monossacarídeos à altas temperaturas e pressão ocasiona a degradação, fato que pode ser contornado pelo o aumento da força ácida. Melhorando as condições de hidrólise das hemiceluloses e evitando tempos de residência muito prolongados, as reações hidrolíticas são favorecidas frente às reações de degradação e/ou desidratação dos carboidratos, reduzindo as perdas.

Foi observado, através dos espectros de UV das frações EPV-SA, que a intensidade de absorção a 280nm teve um aumento gradual com o aumento do tempo de pré-tratamento. Esta absorção é oriunda dos compostos que foram gerados durante o pré-tratamento através da desidratação das hemiceluloses e, principalmente, através da despolimerização ácida parcial da lignina. Segundo Tanahashi (1990), o pré-tratamento a vapor gera a hidrólise das ligações β -O-4 levando à formação de produtos secundários e de baixa massa molecular.

5.2. Avaliação do efeito do pré-tratamento sobre as ligninas isoladas

Neste estudo, a lignina residual presente no material pré-tratado a vapor foi obtida por extração alcalina. Para evitar que este isolamento acarretasse qualquer modificação estrutural, o processo de extração foi conduzido à temperatura ambiente, utilizando uma solução alcalina diluída. A extração alcalina, ainda que realizada à temperatura ambiente pelo tempo de apenas uma hora, resultou em rendimentos expressivos de recuperação da lignina em relação à fração insolúvel em água. Neste aspecto, os dados

da Figura 28 (página 61) revelam uma recuperação média de 80 a 90% para pré-tratamentos realizados a 200 e 210°C. No entanto, é provável que os rendimentos de extração pudessem ser aumentados mediante um aumento da temperatura e/ou da concentração da solução alcalina, muito embora tais medidas inevitavelmente conduziram a incertezas quanto ao caráter representativo das frações isoladas. Por outro lado, devido aos objetivos práticos deste trabalho, solventes de extração tais como 1,4-dioxano aquoso não foram testados devido ao custo que tal extração agregaria ao processo, quando comparado à extração alcalina suave.

O efeito da lavagem alcalina sobre os substratos pré-tratados foi facilmente observado nos espectros de FTIR. Por outro lado, os espectros de FTIR da fração solúvel em álcali (EPV-SA_{OH}) demonstraram ser característicos de ligninas técnicas (Morais *et al.*, 1994). Ainda que os espectros possam ter facilmente demonstrado o curso do isolamento da lignina, não houve uma diferença considerável entre os espectros obtidos sob diferentes condições de pré-tratamento, razão pela qual os dados apresentados na Figura 30 (página 65) foram somente relatados para as frações obtidas após tratamento dos cavacos impregnados a 210°C por 3,5 min usando ácido a 0,5% (código 12B, log Ro 3,78). Entretanto, estas diferenças foram melhor observadas através de uma análise multivariada dos espectros de FTIR (Figura 39), cujas variações, para cada um dos grandes grupos, podem estar relacionadas com as modificações químicas que decorrem das diferentes condições de pré-tratamento.

Processos de calibração multivariada têm sido utilizados com grande sucesso em Química Analítica (Kateman, *et al.*, 1993), principalmente naqueles casos em que precisa-se caracterizar uma mistura multicomponente, cuja informação analítica não apresenta seletividade adequada, isto é, quando não é possível identificar os componentes individuais de um sistema a partir da resposta instrumental.

A análise de componentes principais (PCA) é basicamente uma técnica que permite a redução de dados, sem perda de informação. Neste caso particular, um sistema multidimensional (matriz constituída pelos valores de transmitância em vários valores de número de onda) pode ser transformado num sistema de uns poucos eixos ortogonais (componentes principais), capazes de explicar grande parte da variância dos dados. As novas coordenadas das amostras neste novo sistema de eixos são denominadas "scores", enquanto que o peso com que cada variável antiga influencia a definição da nova variável é denominada de "loadings" (Katerman, *et al.*, 1993). Graficando-se os "scores" dos objetos em relação a cada componente principal, é possível estudar a inter-relação entre as medidas. Obviamente, amostras similares terão um comportamento espectroscópico similar, o que faz com que a sua relação com a nova componente principal seja próxima. Nestes casos, as amostras (ou objetos) tendem a se agrupar. Graficando-se os "loadings", é possível determinar a contribuição de cada variável original no estabelecimento da correspondente componente principal. Altos valores de "loadings" (positivos ou negativos) representam variáveis de importância, enquanto que valores próximos de zero representam variáveis que pouco contribuem com a nova componente principal.

Segundo Cotrim *et al.* (1999), os estudos de análise de regressão multivariada dão bons resultados para prever as quantidades de celulose, hemicelulose e lignina em madeira, assim como a quantidade de grupos funcionais na lignina baseado na absorção em comprimentos ou números de onda específicos. Sendo assim, a dispersão observada para a fração EPV-IA na Figura 39 está diretamente relacionada com a quantidade relativa dos três componentes principais do substrato celulósico, enquanto que a dispersão em torno das ligninas isoladas está relacionada com a quantidade de

grupamentos químicos que foram formados e/ou eliminados durante o pré-tratamento a vapor.

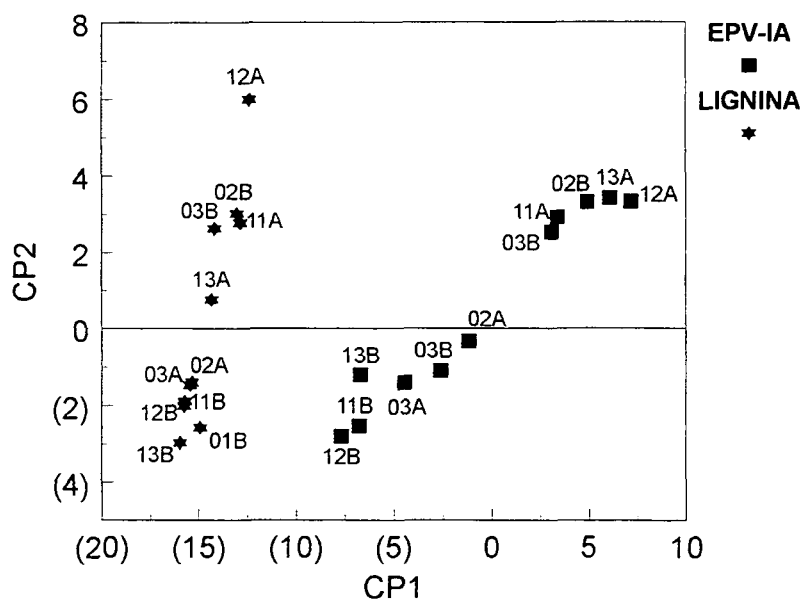


Figura 39. Análise multivariada dos dados obtidos por FTIR das frações insolúveis em água (quadrados) e das ligninas solúveis em álcali (asteriscos).

As diferenças químicas existentes entre as ligninas solúveis em álcali foram também observadas através do “loading” dos CP1 e CP2 derivados dos dados de FTIR (Figura 40), onde observou-se que a diferença química maior entre as ligninas estudadas correspondeu ao comprimento de onda de 1150cm^{-1} . Como esta absorção é atribuída à deformação no plano da ligação C-H em anel aromático, tal resultado sugere que o pré-tratamento ocasionou uma sensível alteração na quantidade de CH aromático por unidade C9, cuja ocorrência está diretamente ligada à quantidade de ligações condensadas na macromolécula de lignina.

As ligninas derivadas de *E. grandis* foram acetiladas para que as análises de RMN e CPG pudessem ser conduzidas. Porém, para verificar se a reação de acetilação tinha sido bem sucedida, a região de deformação axial de hidroxilas livres foi analisada no

espectro de FTIR das ligninas acetiladas. Com efeito, a reação de acetilação acarretou uma redução quase que total da banda de associação de hidroxilas livres, confirmando sua eficiência e alto rendimento.

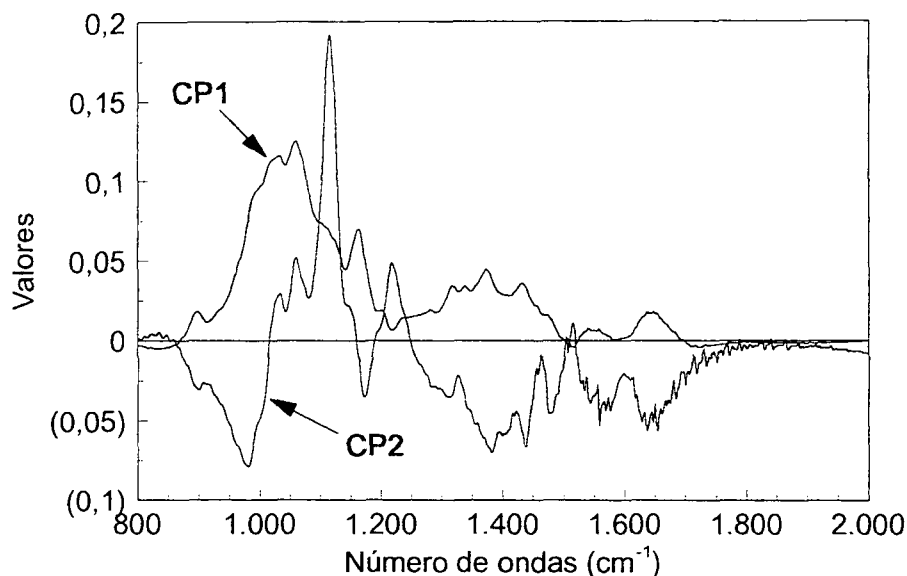


Figura 40. Valores assumidos pelos componentes principais, CP1 e CP2, derivados da análise multivariada dos dados de FTIR das ligninas isoladas.

Segundo Piló-Veloso *et al.* (1993), a estrutura da lignina de madeira moída (LMM) é considerada a mais próxima da proto-lignina existente nos cavacos. Comparando a fórmula C_9 das ligninas obtidas pelo pré-tratamento com a da LMM de *Eucalyptus grandis* (Tabela 5, página 74), observou-se que os teores de metoxila e hidroxila alifática das ligninas explodidas a vapor são menores que a da LMM, mostrando uma grande modificação da estrutura da lignina pelo método de pré-tratamento. Estas modificações podem ser derivadas de reações hidrolíticas que levam ao rompimento das ligações mais lábeis da estrutura fenólica da lignina.

Relacionando os teores de hidroxila com os tempos de pré-tratamento, observou-se que, em pré-tratamentos a 200°C, os teores de hidroxila diminuíram com o aumento do tempo de pré-tratamento (Figura 35). Esta aparente tendência foi tentativamente

atribuída à reações de hidrólise de ligações α - e β -O-4, que levaram à fragmentação e solubilização parcial da macromolécula de lignina e diminuíram assim a quantidade relativa de hidroxilas na molécula (Figura 41). Porém, estas mudanças não puderam ser consideradas significativas frente ao impacto acumulativo dos valores de DPR para cada análise efetuada, desde cálculos dos rendimentos de pré-tratamento até a determinação do teor de hidroxilas pelos métodos empregados neste trabalho.

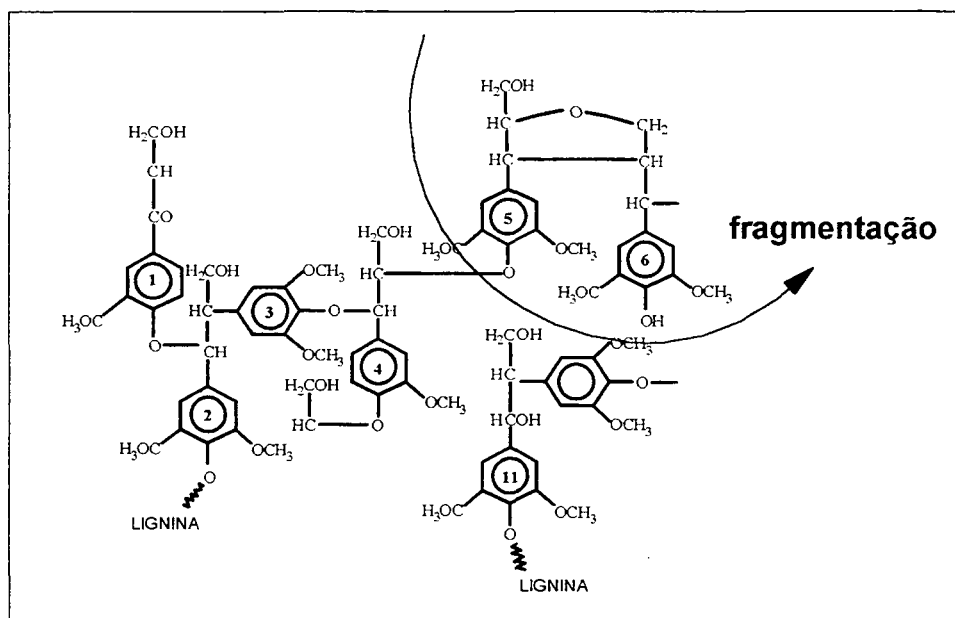


Figura 41. Fragmentação da lignina pela quebra da ligação β -O-4.

Segundo Tanahashi (1990), a maioria dos produtos de degradação da lignina pelo processo de explosão a vapor, são formados a partir da quebra das ligações β -O-4 (Figura 42). Tais estudos foram concluídos com base em vários substratos modelo e ligninas técnicas cuja estrutura foi considerada representativa para esta classe de compostos orgânicos. Assim, frutos da degradação ácida de modelos estruturais de lignina, os compostos representados na Figura 42 podem ter sido igualmente responsáveis pelo aumento da absorção de radiação ultravioleta pela fração solúvel em

água, observada em função do aumento da severidade do pré-tratamento (vide Figuras 26 e 27, página 59). Embora tais valores de absorvância sejam indicativos valiosos da presença de sub-produtos de hidrólise e desidratação na fração (ou extrato) aquosa, cuja determinação quantitativa pode ser efetuada com base em uma absorvidade média de 13,5 L/cm.g (Fengel e Wegener, 1989), a diversidade estrutural observada dentre estes sub-produtos compromete a interpretação direta dos dados quantitativos obtidos, particularmente porque uma variação significativa é esperada para as suas respectivas absorvidades molares.

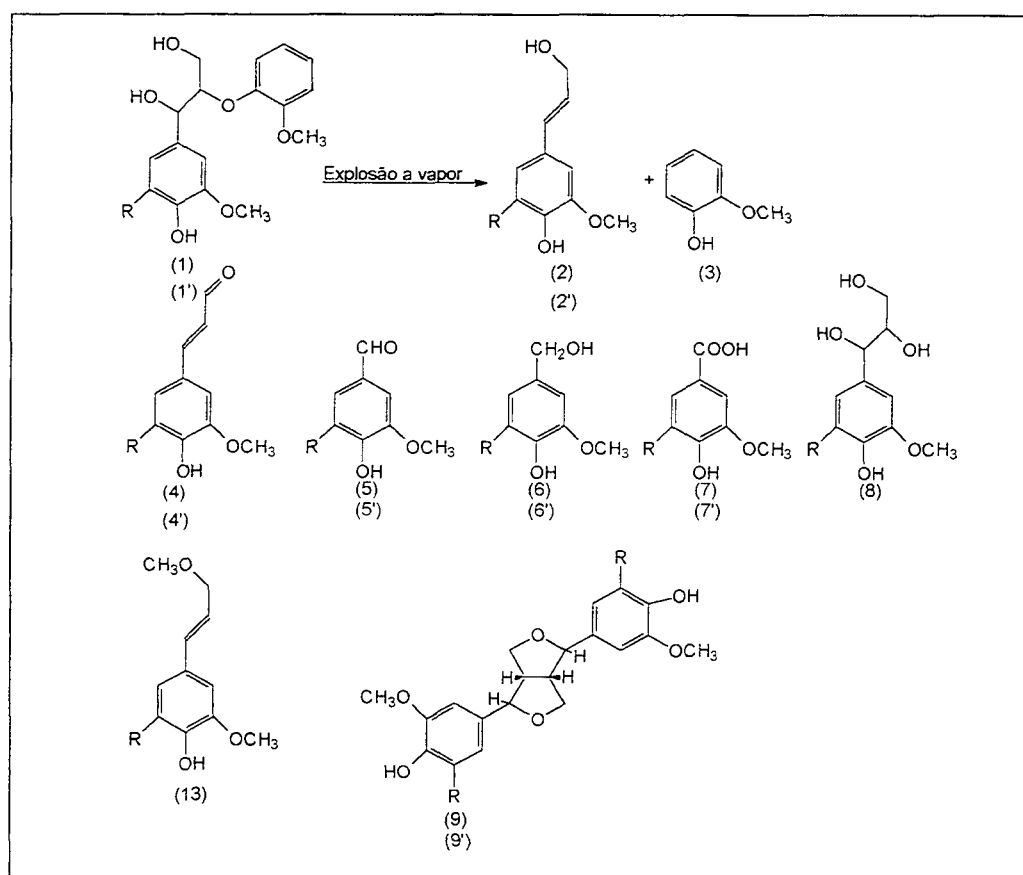


Figura 42. Produtos de degradação dos éteres guaiacilglicerol- (R=H) e siringilglicerol-β-guaiacil (R'=OCH₃) resultantes da explosão a vapor (Tanahashi, 1990).

O processo de explosão a vapor também pode gerar a formação de radicais livres levando à formação de ligações mais condensadas como as do tipo β - β' (Figura 43), 5-5', dentre outras (Tanahashi, 1990). Infelizmente, a formação destes tipos de ligação não pode ser confirmada por RMN ^{13}C devido à má qualidade dos espectros obtidos. No entanto, a presença de tais ligações deve ter tido maior ocorrência na lignina remanescente do processo de extração alcalina (lignina insolúvel em álcali), cuja investigação não fez parte deste estudo. Por outro lado, a formação destas ligações pode ter sido parcialmente responsável pela diminuição do teor de hidroxilas totais nas ligninas isoladas a partir de condições mais drásticas de pré-tratamento.

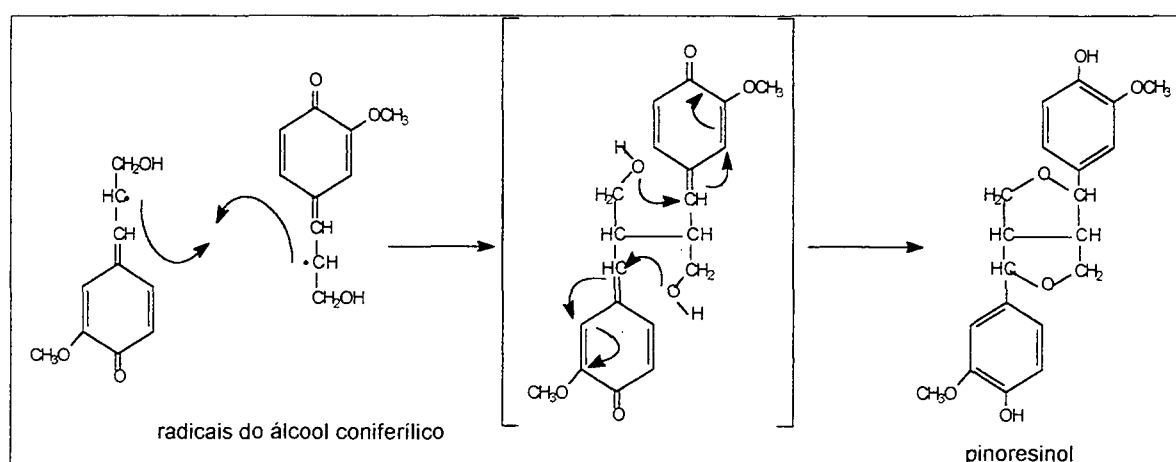


Figura 43. Formação de ligação β - β' a partir de radicais livres formados durante o pré-tratamento.

A despolimerização parcial da lignina pode também ser observada facilmente ao relacionarmos os valores das massas moleculares aparente das ligninas com o grau de severidade do pré-tratamento, representado pelo $\log R_o$ (Figura 44). Observou-se que, a medida em que $\log R_o$ aumentou, a massa molecular aparente decresceu rapidamente até que um valor de $\log R_o$ igual a 3,78 fosse atingido. Após este valor, houve um aumento na massa molecular aparente da lignina, que pode estar associado a reações de

condensação oriundas dos radicais livres formados em pré-tratamentos sob maiores severidades.

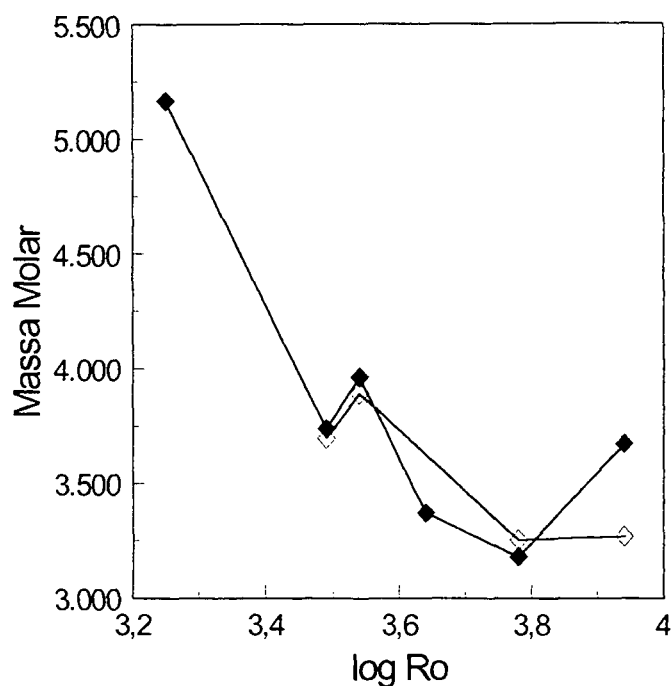


Figura 44. Distribuição de massa molecular aparente em relação ao grau de severidade (log Ro). Pré-tratamento a vapor de cavavos impregnados com H₂SO₄ a 0,25% (losangos abertos) e 0,5% (losangos fechados).

Conforme demonstrado anteriormente, o aumento da severidade do pré-tratamento a 200°C acarretou uma diminuição no teor de hidroxilas totais presente nas ligninas isoladas (Figura 34, página 71). Nesta temperatura, a lignina aparentemente sofreu uma despolimerização parcial pela ruptura de ligações mais lábeis, levando à hidrólise e perda de cadeias laterais em mecanismo similar a uma reação de “peeling” (remoção de regiões ou camadas mais externas) que, de acordo com a natureza de seu mecanismo, levou a uma comprovada diminuição de sua massa molecular aparente. Entretanto, esta despolimerização seletiva ocorreu até uma condição limite, a partir da qual houve uma redução sensível da disponibilidade de ligações lábeis na superfície do agregado amorfo, levando a um cerne macromolecular de maior estabilidade química. Tais

circunstâncias foram portanto atingidas ao serem testadas condições mais drásticas de pré-tratamento, ou temperaturas de pré-tratamento da ordem de 210°C, quando a própria massa molecular aparente da lignina já não apresentou variações significativas, exceto para o experimento 13B ($\log R_o = 3,94$) onde um aumento deste parâmetro foi observado. Tal aumento foi atribuído ao início de uma preponderância relativa de acoplamentos radicalares, a partir do que a lignina apresentaria um aumento gradativo de sua massa molecular aparente em função da maior drasticidade do pré-tratamento. Infelizmente, drasticidades superiores a esta não foram testadas neste estudo.

Mas, como justificar o aumento do teor de hidroxilas totais à medida que houve um aumento na severidade do pré-tratamento a 210°C? Nestas condições, as reações de despolimerização da lignina passaram a ser desfavorecidas em favor da quebra de ligações cuja hidrólise exigia maior energia de ativação. Tais ligações podem ser representadas pela desmetoxilação de núcleos aromáticos seguida por adição nucleofílica de uma molécula de água (ou seja, diminuição do teor de metoxilas por unidade C9 com o subsequente aumento do teor de hidroxilas aromáticas da macromolécula), pela quebra de ligações mais complexas como sub-estruturas do tipo β - β e/ou pinoresinólicas, ou mesmo pela quebra de ligações β -O-4 mais internalizadas na estrutura ou eventualmente envolvidas em sub-estruturas mais condensadas como as fenilcumarânicas. Nestes casos, o aumento da severidade não mais acarretaria um aumento na liberação de oligômeros solúveis em água, seja na forma livre ou associada a carboidratos (complexos lignina-carboidrato), mas sim no aumento do teor de hidroxilas totais (alifáticas e aromáticas) sem maiores reduções na massa molecular aparente da lignina.

A análise das ligninas por calorimetria diferencial de varredura também permitiu visualizar o curso da despolimerização parcial da lignina (Figuras 37 e 38, página 79). A

temperatura máxima de degradação térmica das ligninas isoladas decresceu com o aumento do grau de severidade do pré-tratamento, representado pelo $\log R_o$ (Figura 45). Tal comportamento foi consistente com as tendências observadas para com a massa molecular aparente das ligninas, pois macromoléculas de menor massa molecular e com maior teor em hidroxilas totais deveriam ter um comportamento físico-químico diferenciado, “queimando” à temperaturas menores e evidenciando a ocorrência de sub-estruturas mais termolábeis em função do maior teor de oxigênio por unidade C9.

Outras observações experimentais oferecem suporte às considerações dispostas nos parágrafos acima: (a) de acordo com os parágrafos anteriores, a massa molecular aparente das ligninas deveria decrescer com a severidade do pré-tratamento, e isto foi confirmado através dos dados da Figura 44; (b) sendo as variações no teor de hidroxilas totais uma decorrência de variações no grau de condensação, a análise multivariada dos dados obtidos por FTIR deveria ter demonstrado grande variabilidade na presença de sub-estruturas deste tipo em cada lignina isolada (*e.g.*, número de hidrogênios aromáticos por unidade C9), conforme demonstrado na Figura 39; e (c) se, ao aumentarmos a temperatura de pré-tratamento de 200 para 210°C (aumento da severidade), houvesse um aumento relativo na hidrólise de ligações aril-éter menos acessíveis, a relação OH_{ali}/OH_{aro} deveria ter diminuído ao longo de cada série de pré-tratamento, conforme demonstrado na Tabela 4 (página 71).

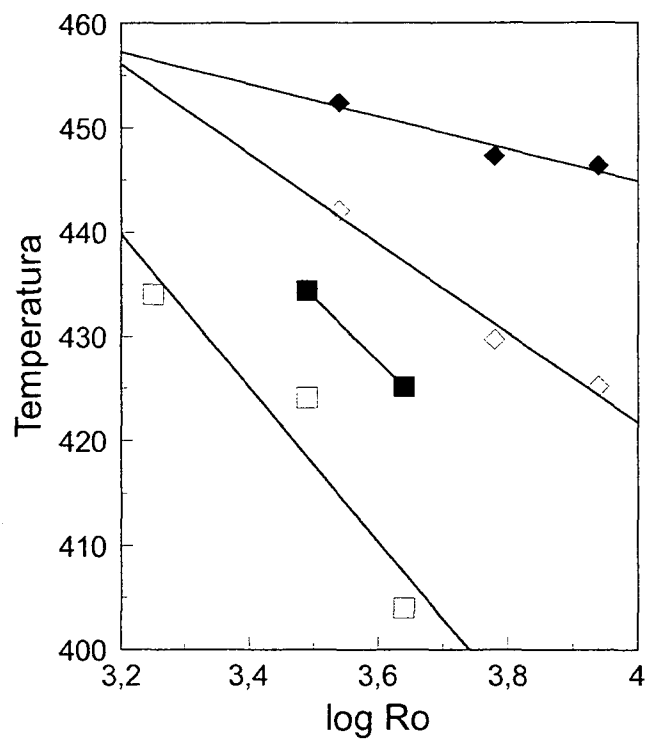


Figura 45. Temperaturas máximas de decomposição térmica, observadas para cada lignina isolada em relação ao grau de severidade (log Ro). O pré-tratamento foi realizado a partir de cavavos impregnados com H₂SO₄ a 0,25% (marcadores fechados) e 0,5% (marcadores abertos). Condições: 200°C (quadrados) e 210°C (losangos).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Conforme já demonstrado para outros tipos de fitobiomassa, o pré-tratamento a vapor se mostrou bastante eficiente na separação dos três principais componentes da madeira, celulose, hemicelulose e lignina, assim como na recuperação de cada um deles em bom rendimento.

Maiores tempos de residência dentro do reator, particularmente sob condições mais drásticas do pré-tratamento (maiores severidades), resultaram em uma maior quantidade de glucose liberada da fração hidrossolúvel, menor recuperação de hemicelulose hidrolisada e rendimentos de lignina superiores a 100%. O melhor rendimento de recuperação da xilose (aproximadamente 70%) foi obtido após pré-tratamento dos cavacos impregnados com H_2SO_4 a 0,5% por 2 min a 210°C.

O pré-tratamento seguido de lavagem alcalina resultou na obtenção de ligninas com propriedades químicas diferenciadas, dependendo das condições de pré-tratamento utilizadas. Estas diferenças foram consequência de reações de condensação e de hidrólise, cuja caracterização foi efetuada a partir de análises físico-químicas que possibilitaram a avaliação dos efeitos decorrentes do aumento da severidade do pré-tratamento.

Das observações práticas mais conclusivas, relacionadas ao efeito do pré-tratamento sobre a estrutura da lignina, destacam-se:

- A extração alcalina, ainda que realizada à temperatura ambiente pelo tempo de apenas uma hora, resultou em rendimentos de recuperação bastante expressivos, da ordem de 80 a 90% em relação ao peso seco da fração insolúvel em água;

- Todas as frações lignínicas isoladas apresentaram baixo teor de carboidratos, o que simplificou a análise química devido às possíveis interferências que contaminantes deste tipo poderiam exercer;
- A análise multivariada dos dados de FTIR indicaram que a maior diferenciação química dentre as ligninas isoladas correspondeu à quantidade de ligações condensadas (menor quantidade de CH aromático) por unidade C9;
- O aumento da severidade do pré-tratamento a 200°C acarretou uma diminuição no teor de hidroxilas (totais, alifáticas e aromáticas) presente nas ligninas isoladas, enquanto que, para pré-tratamentos efetuados a 210°C, o efeito foi reverso;
- A massa molecular aparente decresceu rapidamente com o aumento da severidade, até que um valor de $\log R_o$ igual a 3,78 fosse atingido, a partir do qual foi observado um aumento que esteve provavelmente associado à reações de condensação;
- A temperatura máxima de degradação térmica das ligninas isoladas decresceu com o aumento do grau de severidade do pré-tratamento.

Como perspectivas futuras, as ligninas obtidas por explosão a vapor serão testadas (a) como substratos quimicamente definidos para caracterização do mecanismo de ação de enzimas oxidativas, (b) como matéria-prima para obtenção de novos materiais poliméricos com propriedades surfactantes e/ou emulsificantes e (c) como matrizes para adsorção seletiva de metais pesados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGYROPOULOS, D. S. Lignin. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, v.57, p.128-158, 1997
- BABCOCK, L. W. U.S. Patent, v.1, p.825-864, 1932
- BAKER, A. D.; ENGEL, R. Carbohydrates. In: *ORGANIC CHEMISTRY*, West, St. Paul, USA, 1992. p. 932-972
- BARNETT, C.; LOFERSKI, K.; WARTMAN, C. Experimental procedures routinely applied in the wood chemistry laboratory. Department of Forest Products, University of Madison, Madison, USA, 1982
- BOUCHARD, J.; NGUYEN, T. S.; CHORNET, E.; OVEREND, R. Analytical methodology for biomass pretreatment. Part 1. Solid residues. *Biomass*, v. 23, p. 243-261, 1990
- BOUCHARD, J.; NGUYEN, T. S.; CHORNET, E.; OVEREND, R. Analytical methodology for biomass pretreatment. Part 2. Characterization of the filtrates and accumulative product distribution as a function of treatment severity. *Biores. Technol.*, v. 36, p. 121-131, 1991
- BRENNAN, A. H.; HOAGLAND, W.; SCHELL, D.J. High temperature acid hydrolysis of biomass using an engineering-scale plug flow reactor. Results of low solids testing. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, v. 17, p. 53-70, 1986
- BROWN, D. B. U.S. Patent, v. 4, p. 186-659, 1980
- BROWNELL, H. H.; SADDLER, J. N. Steam-explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, v. 14, p. 55-68, 1984

- BROWNELL, H. H.; YU, E. K. C.; SADDLER, J. N. Steam-explosion pretreatment of wood: effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. *Biotechnol. Bioeng.*, v.28, p. 792-801, 1986
- CHANG, M. M.; CHOU, T. Y. C.; TSAO, G. T. Structure, pretreatment and hydrolysis of cellulose. *Adv. Biochem. Eng.*, v. 20, p. 14-42, 1981
- CHEN, C.-L. Determination of total and aliphatic hydroxyl groups. In: LIN, S. Y.; DENCE, C. W., Eds. *METHODS IN LIGNIN CHEMISTRY*, Springer-Verlag, New York, 1992. p. 409-422
- COTRIM, A. R.; FERRAZ, A.; GONÇALVES, A. R.; SILVA, F. T.; BRUNS, R. E. Identifying the origin of lignins and monitoring their structural changes by means of FTIR-PCA and -SIMCA. *Biores. Technol.*, v. 68, p. 29-34, 1999
- DEKKER, R. F. H.; WALLIS, A. F. A. Enzymic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis-steam explosion. *Biotechnol. Bioeng.*, v.25, p. 3027-3048, 1983
- DEKKER, R. F. H.; KARAGEORGE, H.; WALLIS, A. F. A. Pretreatment of hardwood (*Eucalyptus regnans*) sawdust by autohydrolysis explosion and its saccharification by Trichoderma cellulases. *Biocatalysis*, v.1, p. 45-59, 1987
- DELONG, E. A. Canadian Patent, v. 1, p. 198-703 - Iotech Corporation Ltda, Ontario, Canadá, 1985
- DESCHAMPS, F.C.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Pretreatment of sugar cane bagasse for enhanced ruminal digestion. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 57/58, p. 171-182, 1996
- EXCOFFIER, G.; TOUSSAINT, B.; VIGNON, M. R. Saccharification of Steam-Exploded Poplar Wood. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 38, p. 1308-1317, 1991

- FAIX, O.; BÖTTCHER, J.H. Determination of phenolic hydroxyl group contents in milled wood lignins by FTIR spectroscopy applying partial least-squares (PLS) and principal component regression (PCR) *Holzforschung*, v. 47, p. 45-49, 1993
- FENGEL, D.; WEGENER, G. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter, Berlin, 1989. 613p.
- FERRAZ, A.; MENDONÇA, R.; COTRIM, A. R.; SILVA, T. F. The use of white-rot decaying as a pretreatment for organosolv delignification of *Eucalyptus grandis* wood. In: IEA/BIOFOR WORKSHOP ON APPLICATIONS OF BIOTECHNOLOGY IN BIOENERGY SYSTEMS, Ottawa, Canadá, 1994. Proceedings, 1994
- FOODY, B. E.; FOODY, K. J. Development of an integrated system for producing ethanol from biomass. *Energy Biomass Wastes*, v.14, p. 1225-1243, 1991
- FOX, D. J.; GRAY, P. P.; DUNN, N. W.; MARSDEN, W. L. Comparison of alkali and steam (acid) pretreatments of lignocellulosic materials to increase enzymic susceptibility: Evaluation under optimised pretreatment conditions. *J. Tech. Biotechnol.*, v. 44, p. 135-146, 1989
- FURCH, P. W.; SILLA, H. Comparison of simultaneous wet milling and enzymatic hydrolysis of cellulose in ball mill and attrition mill reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 35, p. 630-645, 1990
- GANDINI, A. Polymers from renewable resources. In: *Comprehensive Polymer Science*, ALLEN, G.; AGGARWAL, S. L.; RUSSO, S., eds. Pergamon, New York, p. 527-573, 1992
- GLASSER, W. G. Potential role of lignin in tomorrow's wood utilizations technologies. *Forest Products Journal*, v. 31, p. 24-29, 1981

- GOLDSTEIN, I. S. Composition of Biomass. In: GOLDSTEIN, I. S. Ed. ORGANIC CHEMICALS FROM BIOMASS, CRC Press, Boca Raton, USA, 1981a. p. 9-18
- GOLDSTEIN, I. S. Economics and Other Considerations. In: GOLDSTEIN, I. S. Ed. ORGANIC CHEMICALS FROM BIOMASS, CRC Press, Boca Raton, USA, 1981b. p. 287-295
- GRETHLEIN, H. E. The effect of pore distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Biotechnology*, v. 3, p. 155-160, 1985
- GUENTER, W.; FORSBERG, N. Nutritional Release, n° 4, Stake Technology, Ottawa, Canada, 1972
- HALL, D. O. Solar energy use through biology – past, present and future. *Solar Energy*, v. 22, p. 307-328, 1979
- HARTLEY, J. D.; MORRISON III, W. H.; HIMMELSBACH, D. S.; BORNEMAN, W. S. Cross-linking of cell wall phenolic arabinoxylans in graminaceous plants. *Phytochemistry*, v.29, p. 3705-3709, 1990
- HATFIELD, R. D. Cell wall polysaccharide interaction and degradability. In: FORAGE CELL WALL STRUCTURE AND DIGESTIBILITY, ASA, CSSA, SSSA, 1993. p. 285-313
- HIGUCHI, T. *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, Orlando, Academic Press, 1985. 679 p.
- HIGUCHI, T. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.*, v. 24, p. 23-63, 1990
- HOLTZAPPLE, M. T.; JUN, J.; ASHOK, G.; PATIBANDLA, S. L.; DALE, B. D. The ammonia freeze explosion (AFEX) process. A practical lignocellulose pretreatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 28/29, p. 59-74, 1991

- HORTON, G. L.; RIVERS, D. B.; EMERT, G. H. Preparation of cellulose for enzymatic conversion. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, v. 19, p. 422-429, 1980
- IRICK, T. J.; WEST, K.; BROWNELL, H. H.; SCHWALD, W.; SADDLER, J. N. Comparison of colorimetric and HPLC techniques for quantitating the carbohydrate components of steam-treated wood. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 17/18, p. 137-149, 1988
- LOMAX, T. D.; MACKIE, K. L.; MEDER, R.; CROUCHER, M.; BURTON, R. J. Steam explosion of *Pinus radiata* bark. *J. Wood Chem. Technol.*, v. 14, n. 4, p. 539-561, 1994
- MAMERS, H.; ROWNEY, J. E. U.S. Patent, v. 4, p. 163-687, 1979
- MARCHESSAULT, R. H.; ST-PIERRE, J. Future sources of organic raw material-CHEMRAWN I. In: CHEMRAWN CONFERENCE, Toronto, Canada, 1978. Proceedings, 1980. p. 613
- MASON, W. H. Apparatus for and process of explosion fibrillation of lignocellulosic material. U. S. Patent, v. 1, p. 618-655, 1928
- MÊS-HARTREE, M.; SADDLER, J. N. The nature of inhibitory materials present in pretreated lignocellulosic substrates which inhibit the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Lett.*, v. 5, n. 8, p. 531-536, 1983
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959
- MILLET, M. A.; BAKER, A. J.; SATTER, L. D. Physical and chemical pretreatments for enhancing cellulose saccharification. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, v. 6, p. 125-153, 1976

- MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; PILÓ-VELOSO, D. Determinação do grau de condensação e de grupos metoxila por unidade monomérica de ligninas do *Eucalyptus grandis* por espectroscopia FTIR. *Química Nova*, v. 17, p. 5-8, 1994
- MYERLY, R. C.; NICHOLSON, M. D.; KATZEN, R.; TAYLOR, J. M. The forest refinery. *Chemtech*, march, p. 186-192, 1981
- NGUYEN, Q. A.; TUCKER, M. P.; BOYNTON, B. L.; KELLER, F. A.; SCHELL, D. J. Diluted acid pretreatments of softwoods: Scientific note. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 70-72, p. 77-98, 1998
- PARAJÓ, J. C.; ALONSO, J. L.; SANTOS, V. Enzymatic hydrolysis of wood: an engineering assessment. *Bioproc. Eng.*, v. 12, p. 253-261, 1995a
- PARAJÓ, J. C.; ALONSO, J. L.; SANTOS, V. Delignification and swelling of *Eucalyptus* wood ahead of enzymatic hydrolysis of the cellulosic fraction. *Proc. Biochem.*, v. 30, n. 6, p. 537-545, 1995b
- PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolysates. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, v. 38, p. 53-87, 1989
- PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. *Química Nova*, v. 16, n. 5, p. 435-448, 1993
- PURI, V. P.; MAMMERS, H. Explosive pretreatment of lignocellulosic residues with high pressure carbon dioxide for the production of fermentation substrates. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 25, p. 3149-3161, 1983
- RALPH, J.; HELM, R. F. Lignin/hydroxycinnamic acid/polysaccharide complexes: Synthetic models for regiochemical characterization. In: FORAGE CELL WALL STRUCTURE AND DIGESTIBILITY, ASA, CSSA, SSSA, 1993. p. 201-246

- RAMOS, L. P., Steam treatment and Enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus viminalis* chips, Tese de Doutorado, School of Graduate Studies and Research University of Ottawa, Ottawa, Ontario, Canada, 224p, 1992
- RAMOS, L. P., BREUIL, C., KUSHNER, D. N.; SADDLER, J. N. Steam Pretreatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of *Eucalyptus viminalis* wood chips. *Holzforschung*, v. 46, p. 149-154, 1992a
- RAMOS, L. P., BREUIL, C.; SADDLER, J. N. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 34/35, p. 37-48, 1992b
- RAMOS, L. P.; MATHIAS, A. L.; SILVA, F. T.; GEORGE, J. M. R.; FERRAZ, A. L. Characterization of residual lignin in steam-exploded cellulosic materials. In: FOURTH BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, Recife, PE, 1995. Proceedings, p. 33-38, 1995
- SADDLER, J. N.; BROWNELL, H. H.; CLERMONT, L. P.; LEVITIN, N. Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fractions. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 24, p. 1389-1402, 1982
- SAN MARTÍN, R.; PEREZ, C.; BRIONES, R. Simultaneous production of ethanol and kraft pulp from pine (*Pinus radiata*) using steam explosion. *Biores. Technol.*, v. 53, p. 217-223, 1995
- SARKO, A. Recent X-ray crystallographic studies of celluloses. In: YOUNG, R. A.; ROWELL, R. M. Eds. CELLULOSE - STRUCTURE, MODIFICATION AND HYDROLYSIS, John Wiley, New York, USA, 1986. p. 29-50
- SAWADA, T.; NAKAMURA, Y.; KOBAYASHI, F.; KUWAHAR, M.; WATANABLE. T. Effects of fungal pretreatment and steam explosion

- pretreatment on enzymatic saccharification of plant biomass. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 48, p. 719-724, 1995
- SCHELL, D. J.; TORGET, R.; POWER, A.; WALTER, P. J.; GROHMANN, K. A technical and economic analysis of acid catalysed steam explosion and dilute sulfuric acid pretreatments using wheat straw or aspen wood chips. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 28-29, p. 87-89, 1991
- SCHULTZ, T. P.; TEMPLETON, M. C.; BIERMANN, C.J.; MCGINNIS, G. D. Steam explosion of mixed hardwood chips, rice hulls, corn stalks, and sugar cane bagasse. *J. Agric. Food Chem.*, v. 32, p. 1166-1172, 1984
- SILVA, F. T. Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 106p, 1995
- SJÖSTRÖM, E. Wood chemistry. Fundamentals and applications, Academic Press, 293p. 1992
- SOLOMONS, T. W. G. Carbohydrates. In: *ORGANIC CHEMISTRY*, 6^a. ed., John Wiley, New York, USA, 1996. pp. 1046-1087
- TANAHASHI, M. Characterization and degradation mechanisms of wood components by steam explosion and utilization of exploded wood. *Wood Res.*, v. 77, p. 49-116, 1990
- TERASHIMA, N.; FUKUSHIMA, K.; HE, L. F.; TAKABE, K. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: *FORAGE CELL WALL STRUCTURE AND DIGESTIBILITY*, ASA, CSSA, SSSA, 1993. p. 248-270
- TORGET, R.; WALTER, P.; HIMMEL, M.; GROHMANN, K. Dilute acid pretreatment of corn residues and short rotation woody crops. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.28/29, p.75-86, 1991

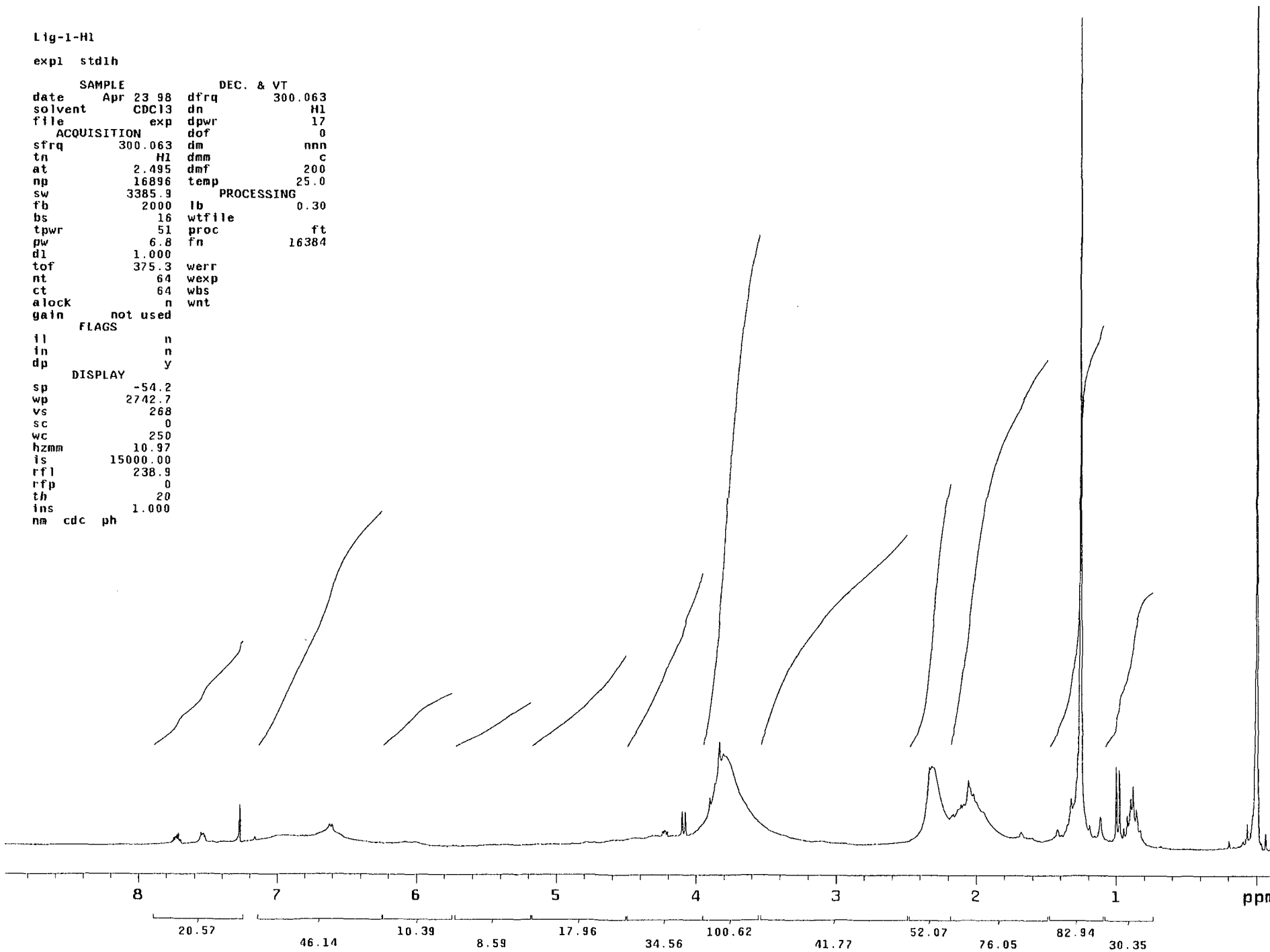
- TORGET, R.; HSU, T. Two-temperature diluted-acid prehydrolysis of hardwood xylan using a percolation process. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.45-46, p.5-22, 1994
- VIGNON, M. R.; JALDON, G.; DUPEYRE, D. Steam explosion of woody hemp chènevotte. *Biotechnology Bioeng.*, v. 12, p. 22-42, 1995
- YOUNG, R. A. Structure, swelling and bonding of cellulose fibers. In: YOUNG R. A.; ROWELL R. M. Eds. *CELLULOSE-STRUCTURE, MODIFICATION AND HYDROLYSIS*, John Wiley, New York, USA, 1986. p. 91-128
- WALSUM, G. P.; ALLEN, S. G.; SPENCER, M. J.; LASER, M. S.; ANTAL JR., M. J.; LYND, L. R. Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 57-58, p. 157-170, 1996
- WAYMAN, M.; PAREKH, S. SO₂ prehydrolysis for high yield ethanol production from biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 17, p. 33-44, 1988
- WILKE, C. R. *Cellulose as a Chemical and Energy Resource*, London, Sydney, Toronto, 1975
- WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. *Meth. Enzymol.*, v. 160, p. 3-11, 1988
- WRIGTH, J. D.; POWER, A. J. Concentrated halogen acid hydrolysis process for alcohol fuel production. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, v. 15, p. 511-532, 1985
- WRIGTH, J. D.; POWER, A. J.; DOUGLAS, L. J. Design and parametric evaluation of an enzymatic hydrolysis process (separate hydrolysis and fermentation). *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, v. 17, p. 285-302, 1987
- ZAKIS, G. F. *Functional Analysis of Lignins and Their Derivates*, Tappi Press, Atlanta, USA, 1994

ANEXOS

Lig-1-H1

expl stdih

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Apr 23 98	dfrq	300.063
solvent	CDC13	dn	H1
file	exp	dpwr	17
ACQUISITION			
sfrq	300.063	dof	0
tn	H1	dm	nnn
at	2.495	dmm	c
np	16896	dmf	200
sw	3385.9	temp	25.0
PROCESSING			
fb	2000	lb	0.30
bs	16	wtfile	
tpwr	51	proc	ft
pw	6.8	fn	16384
dl	1.000		
tof	375.3	werr	
nt	64	wexp	
ct	64	wbs	
alock	n	wnt	
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-54.2		
wp	2742.7		
vs	268		
sc	0		
wc	250		
hzmm	10.97		
is	15000.00		
rfl	238.9		
rfp	0		
th	20		
ins	1.000		
nm	cdc	ph	

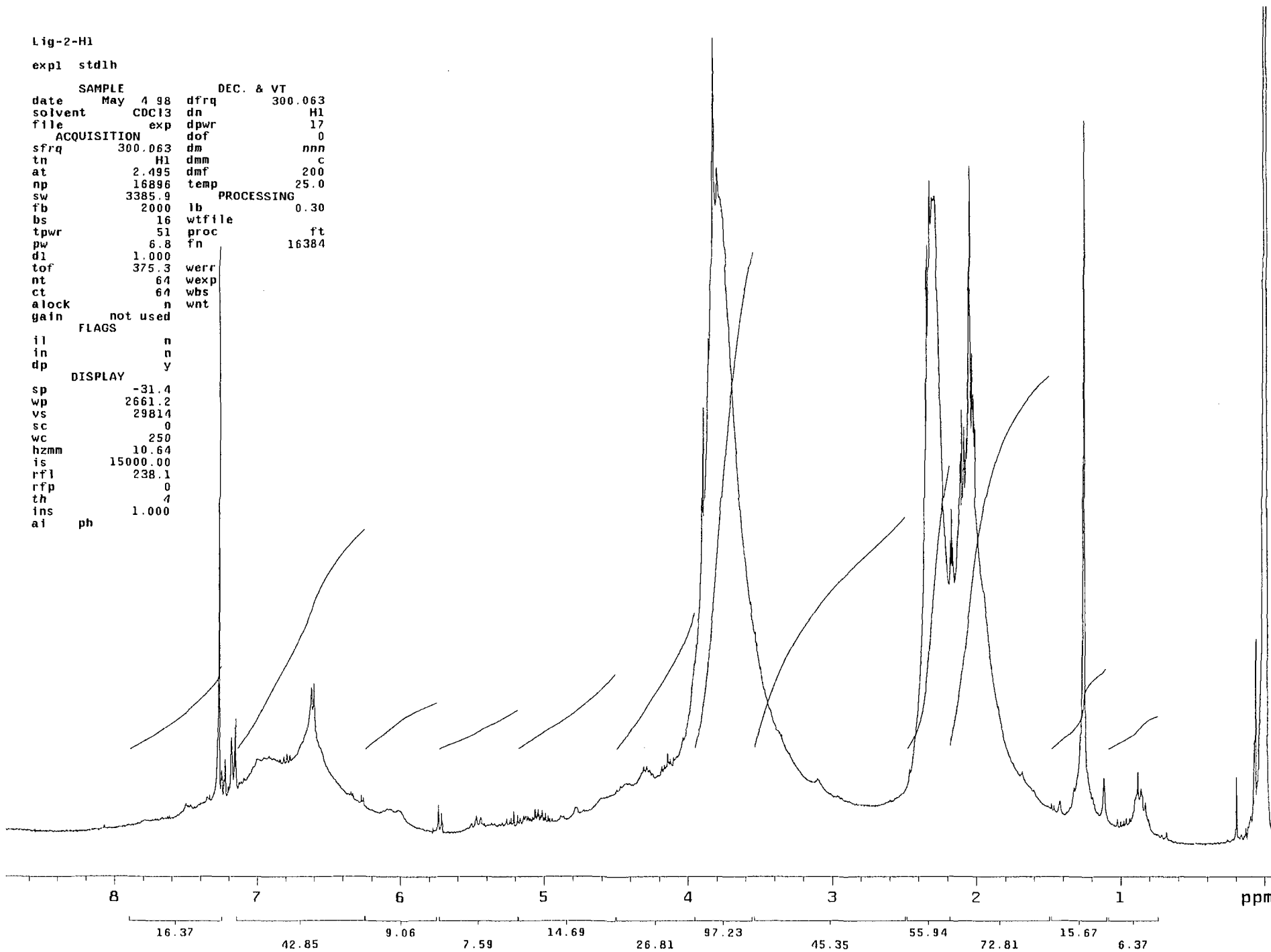


FRAÇÃO EPV-SA_{OH} (lignina solúvel em álcali), derivada do experimento 02A

Lig-2-H1

expl stdlh

SAMPLE		DEC. & VT	
date	May 4 98	dfrq	300.063
solvent	CDCl3	dn	H1
file	exp	dpwr	17
ACQUISITION		PROCESSING	
sfrq	300.063	dm	nnn
tn	H1	dmm	c
at	2.495	dmf	200
np	16896	temp	25.0
sw	3385.9	ib	0.30
fb	2000	wtfile	
bs	16	proc	ft
tpwr	51	fn	16384
pw	6.8	werr	
d1	1.000	nt	64
tof	375.3	ct	64
nt	64	wbs	n
ct	64	wnt	n
alock	not used		
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-31.4		
wp	2661.2		
vs	29814		
sc	0		
wc	250		
hzmm	10.64		
is	15000.00		
rfl	238.1		
rfl	0		
th	4		
ins	1.000		
ai	ph		

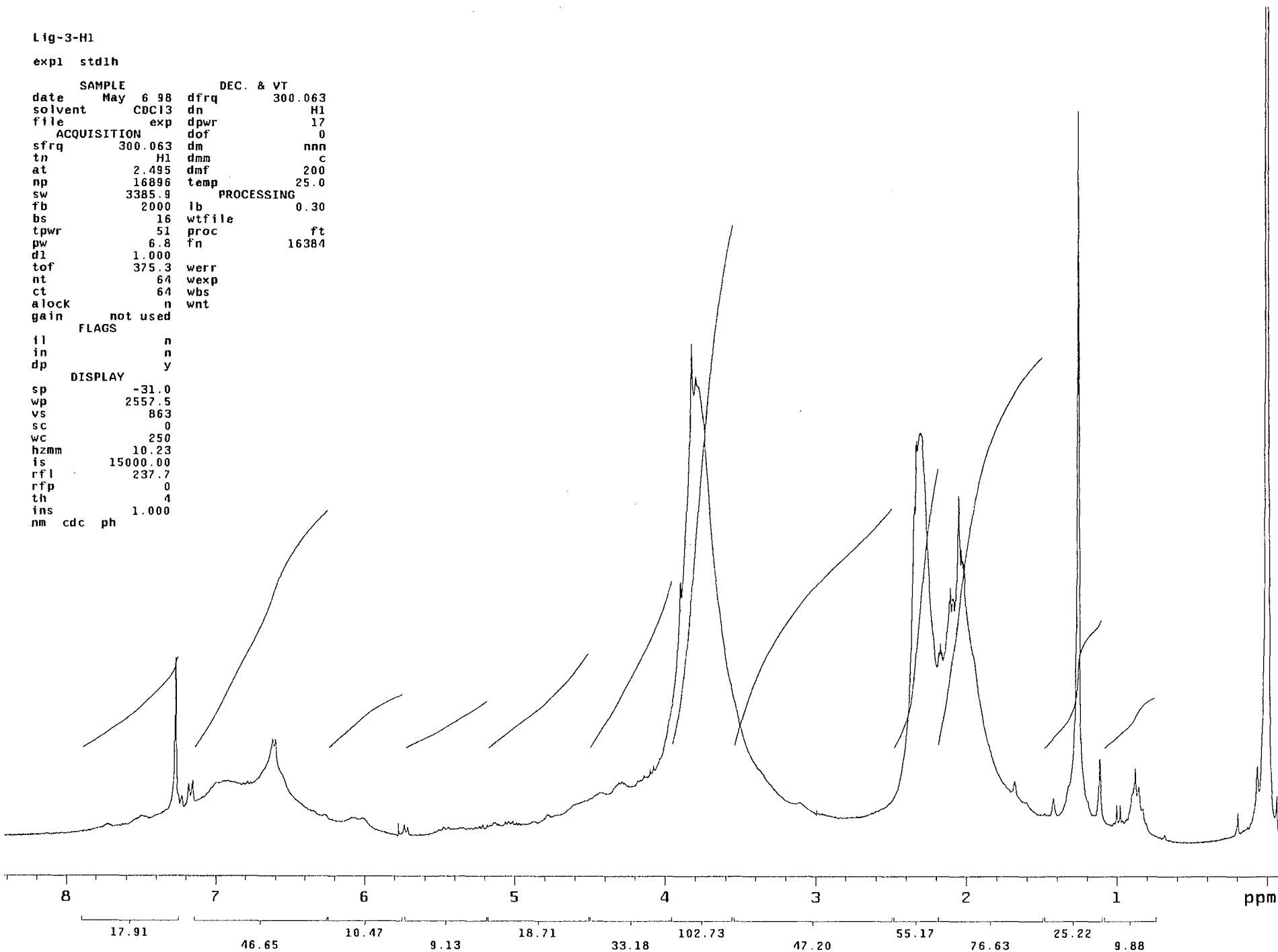


FRAÇÃO EPV-SA_{OH} (lignina solúvel em álcali), derivada do experimento 03A

Lig-3-H1

expl std1h

SAMPLE		DEC. & VT	
date	May 6 98	dfrq	300.063
solvent	CDC13	dn	H1
file	exp	dpwr	17
ACQUISITION			
sfrq	300.063	dm	nnn
tn	H1	dmm	c
at	2.495	dmf	200
np	16896	temp	25.0
sw	3385.9	PROCESSING	
fb	2000	lb	0.30
bs	16	wtfile	
tpwr	51	proc	ft
pw	6.8	fn	16384
d1	1.000		
tof	375.3	werr	
nt	64	wexp	
ct	64	wbs	
alock	n	wnt	
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-31.0		
wp	2557.5		
vs	863		
sc	0		
wc	250		
hzmm	10.23		
is	15000.00		
rfl	237.7		
rfp	0		
th	4		
ins	1.000		
nm	cdc ph		

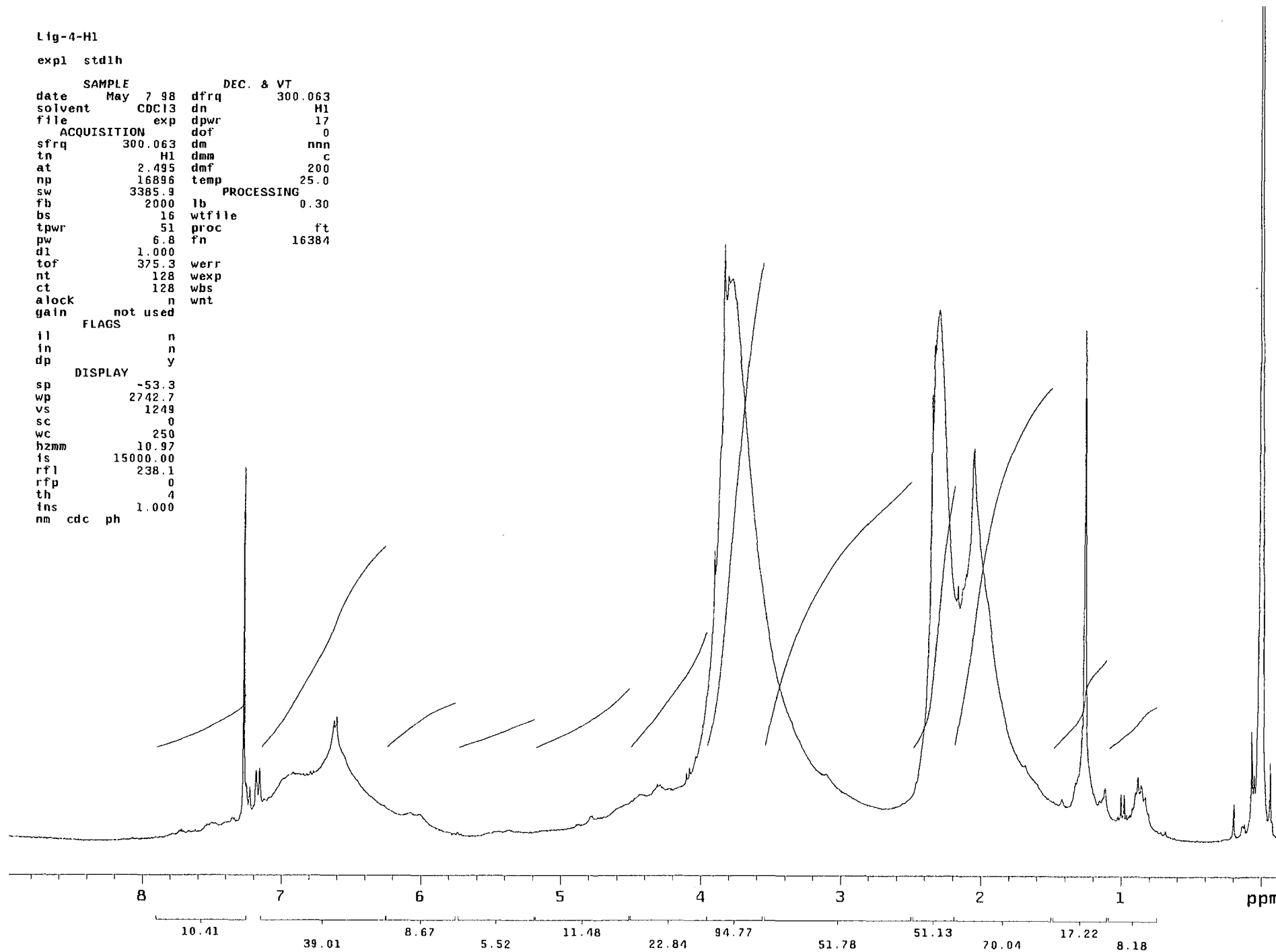


FRAÇÃO EPV-SA_{OH} (Lignina solúvel em álcali), derivada do experimento 01B

Lig-4-H1

expl std1h

SAMPLE		DEC. & VT	
date	May 7 98	dfrq	300.063
solvent	CDCl3	dn	H1
file	exp	dpwr	17
ACQUISITION			
sfrq	300.063	dof	0
tn	H1	dm	nnn
at	2.495	dmm	c
np	16896	dmf	200
sw	3385.9	temp	25.0
PROCESSING			
fb	2000	lb	0.30
bs	16	wtfile	
tpwr	51	proc	ft
pw	6.8	fn	16384
d1	1.000		
tof	375.3	werr	
nt	128	wexp	
ct	128	wbs	
alock	n	wnt	
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-53.3		
wp	2742.7		
vs	1249		
sc	0		
wc	250		
hzmm	10.97		
is	15000.00		
rfl	238.1		
rfp	0		
th	4		
ins	1.000		
nm	cdc ph		

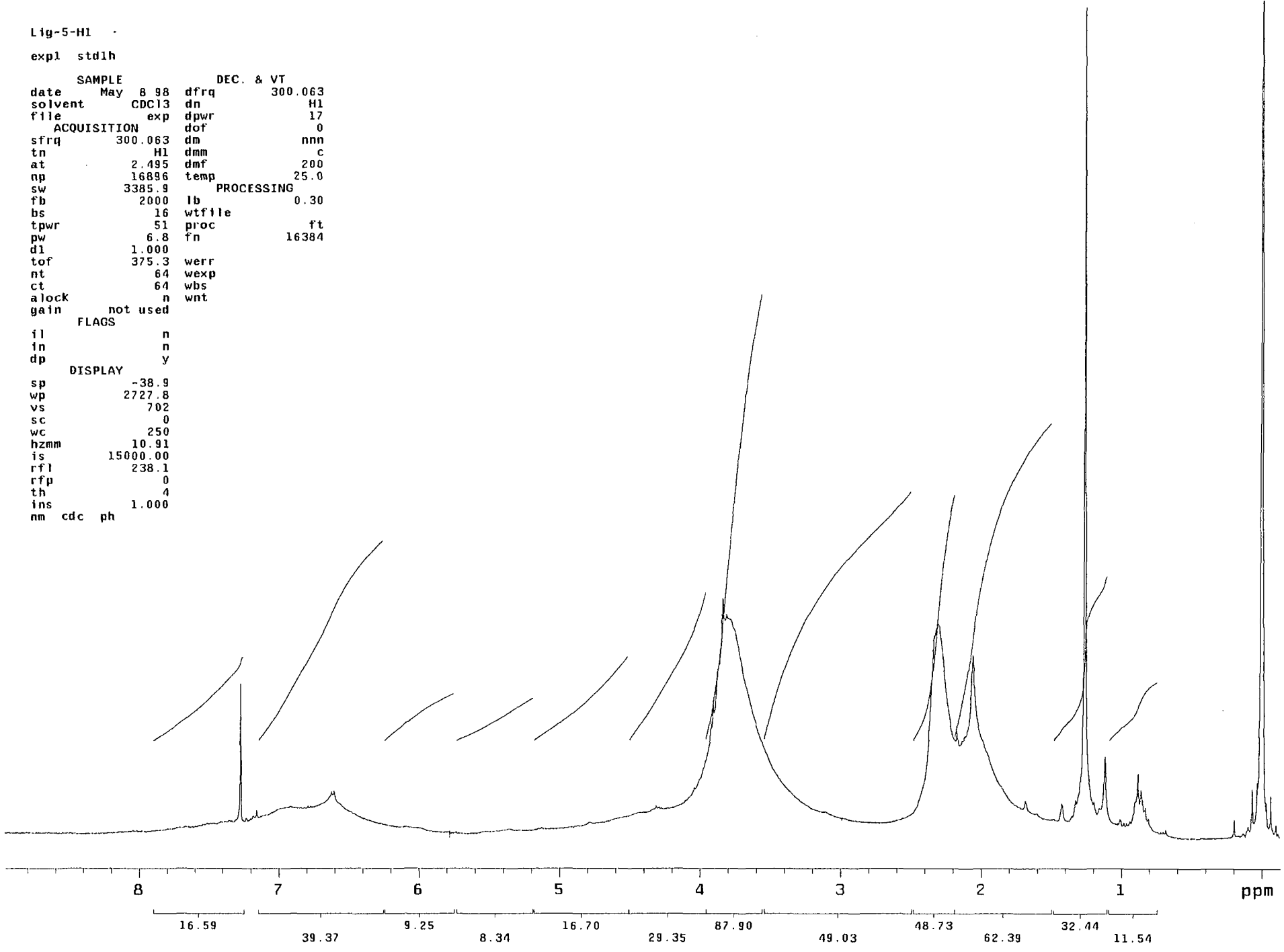


FRAÇÃO EPV-SA_{OH} (lignina solúvel em álcali), derivada do experimento 02B

Lig-5-H1

expl stdlh

date	May 8 98	dfrq	300.063
solvent	CDC13	dn	H1
file	exp	dpwr	17
ACQUISITION			
sfrq	300.063	dof	0
tn	H1	dm	nnn
at	2.495	dmm	c
np	16896	dmf	200
sw	3385.9	temp	25.0
PROCESSING			
fb	2000	lb	0.30
bs	16	wtfile	
tpwr	51	proc	ft
pw	6.8	fn	16384
d1	1.000		
tof	375.3	werr	
nt	64	wexp	
ct	64	wbs	
alock		wnt	
gain	not used		
FLAGS			
il		n	
in		n	
dp		y	
DISPLAY			
sp	-38.9		
wp	2727.8		
vs	702		
sc	0		
wc	250		
hzmm	10.91		
is	15000.00		
rfl	238.1		
rfp	0		
th	4		
ins	1.000		
nm	cdc	ph	

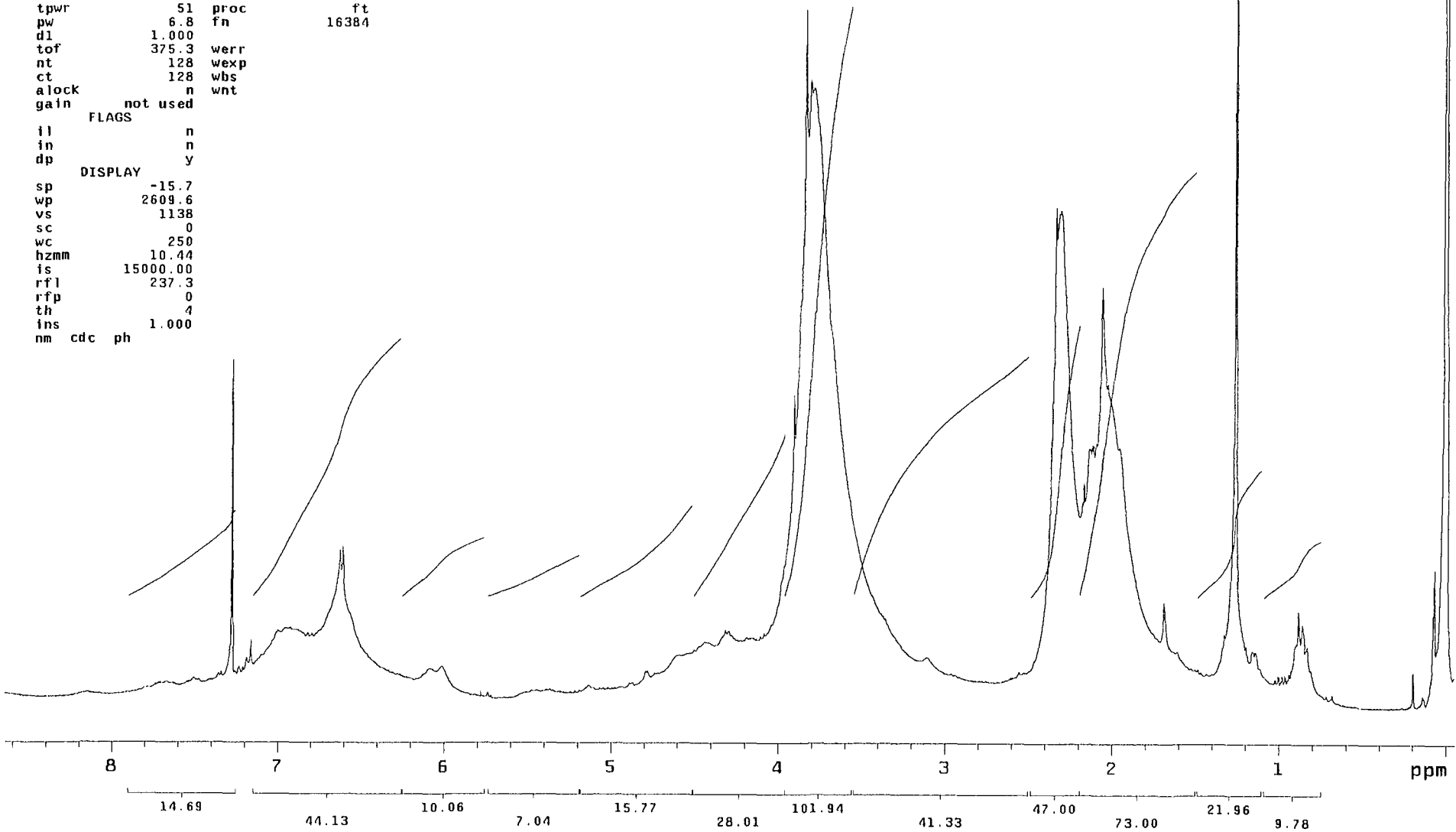


FRAÇÃO EPV-SA_{OH} (lignina solúvel em álcali), derivada do experimento 03B

Lig-6-H1

expl std1h

SAMPLE		DEC. & VT	
date	May 10 98	dfrq	300.063
solvent	CDCl3	dn	H1
file	exp	dpwr	17
ACQUISITION			
sfrq	300.063	dof	0
tn	H1	dm	nnn
at	2.495	dmm	c
np	16896	dmf	200
sw	3385.9	temp	25.0
PROCESSING			
fb	2000	lb	0.30
bs	16	wtfile	
tpwr	51	proc	ft
pw	6.8	fn	16384
d1	1.000		
tof	375.3	werr	
nt	128	wexp	
ct	128	wbs	
alock	n	wnt	
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-15.7		
wp	2609.6		
vs	1138		
sc	0		
wc	250		
hzmm	10.44		
is	15000.00		
rfl	237.3		
rfp	0		
th	4		
ins	1.000		
nm	cdc ph		

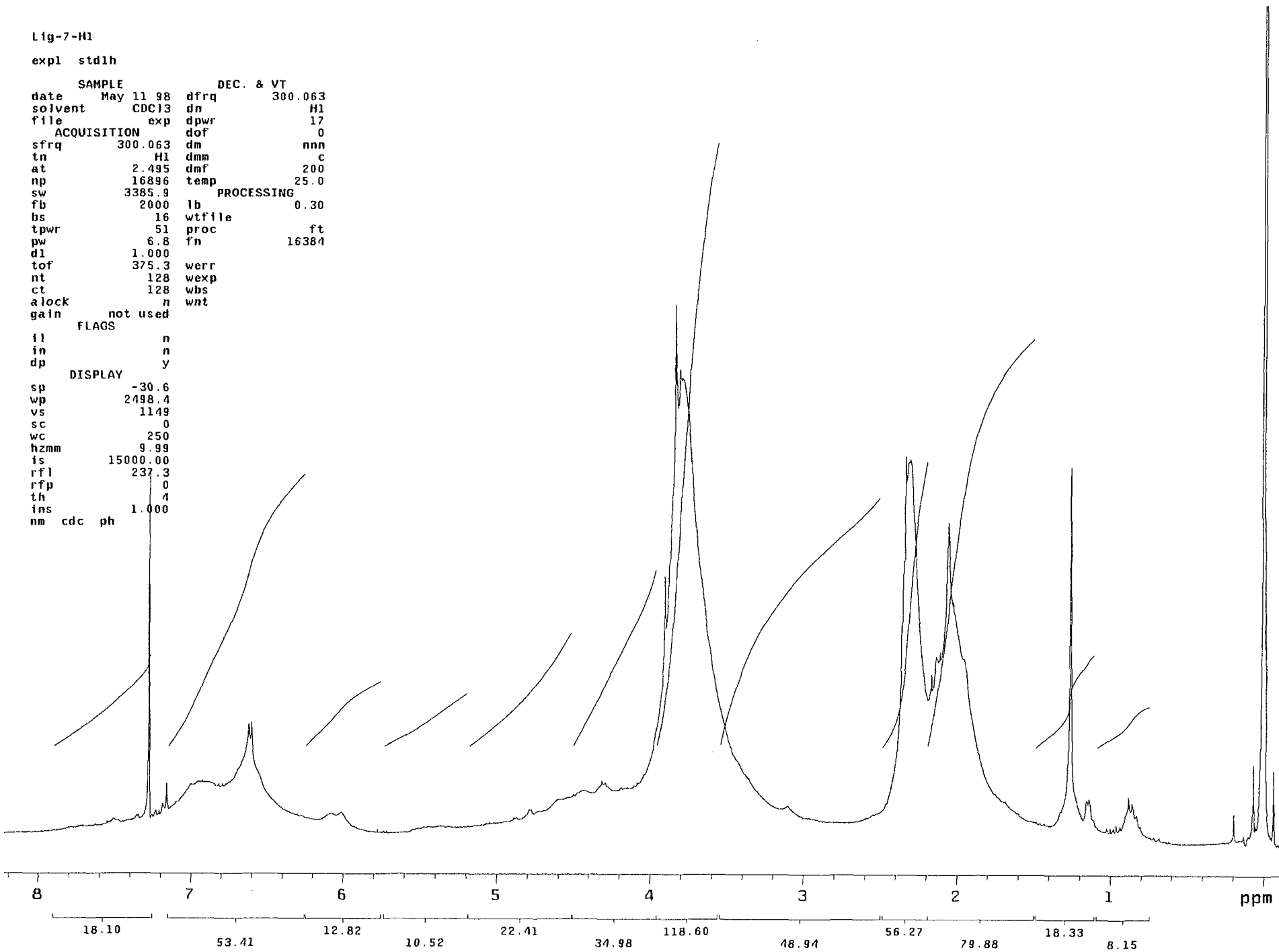


FRAÇÃO EPV-SA_{OH} (lignina solúvel em álcali), derivada do experimento 11A

Lig-7-H1

expl stdlh

SAMPLE		DEC. & VT	
date	May 11 98	dfrq	300.063
solvent	CDC13	dn	H1
file	exp	dpwr	17
ACQUISITION		PROCESSING	
sfrq	300.063	dof	0
tn	H1	dm	nnn
at	2.495	dmm	c
np	16896	dmf	200
sw	3385.9	temp	25.0
fb	2000	lb	0.30
bs	16	wfile	
tpwr	51	proc	ft
pw	6.8	fn	16384
d1	1.000	werr	
tof	375.3	wexp	
nt	128	wbs	
ct	128	wnt	
alock	n		
gain	not used		
FLAGS			
ll	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-30.6		
wp	2498.4		
vs	1149		
sc	0		
wc	250		
hzmm	9.99		
fs	15000.00		
rfl	237.3		
rff	0		
th	4		
ins	1.000		
nm	cdc ph		

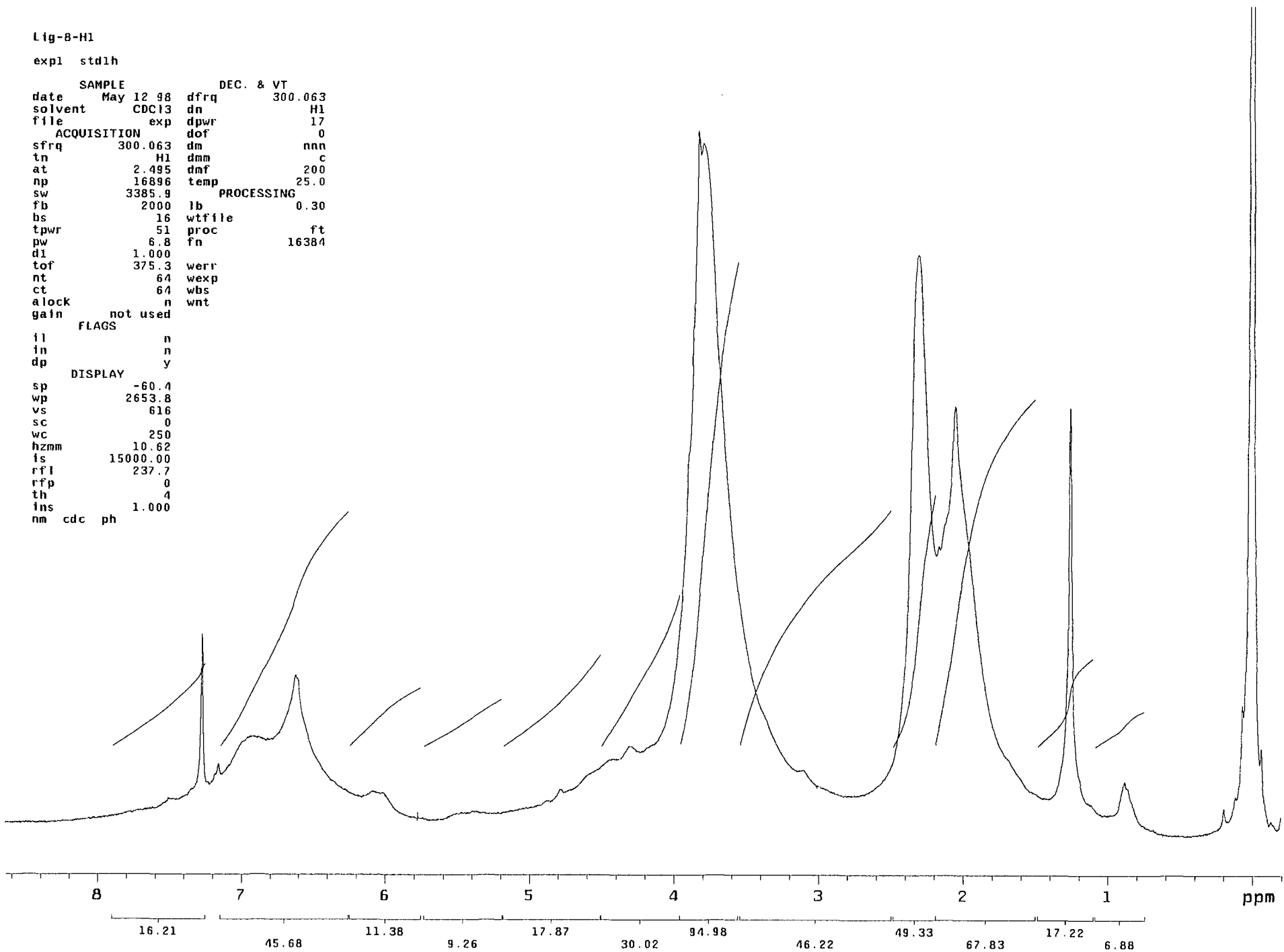


FRAÇÃO EPV-SA0H (lignina solúvel em alcali), derivada do experimento 12A

Lig-8-H1

expl std1h

SAMPLE		DEC. & VT	
date	May 12 98	dfrq	300.063
solvent	CDC13	dn	H1
file	exp	dpwr	17
ACQUISITION			
sfrq	300.063	dof	0
tn	H1	dm	nnn
at	2.495	dmm	c
np	16896	dmf	200
sw	3385.9	temp	25.0
PROCESSING			
fb	2000	lb	0.30
bs	16	wtfile	
tpwr	51	proc	ft
pw	6.8	fn	16384
d1	1.000	werr	
tof	375.3	wexp	
nt	64	wbs	
ct	64	wnt	
alock	n		
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-60.4		
wp	2653.8		
vs	616		
sc	0		
wc	250		
hzmm	10.62		
is	15000.00		
rfl	237.7		
rfp	0		
th	4		
ins	1.000		
nm	cdc	ph	

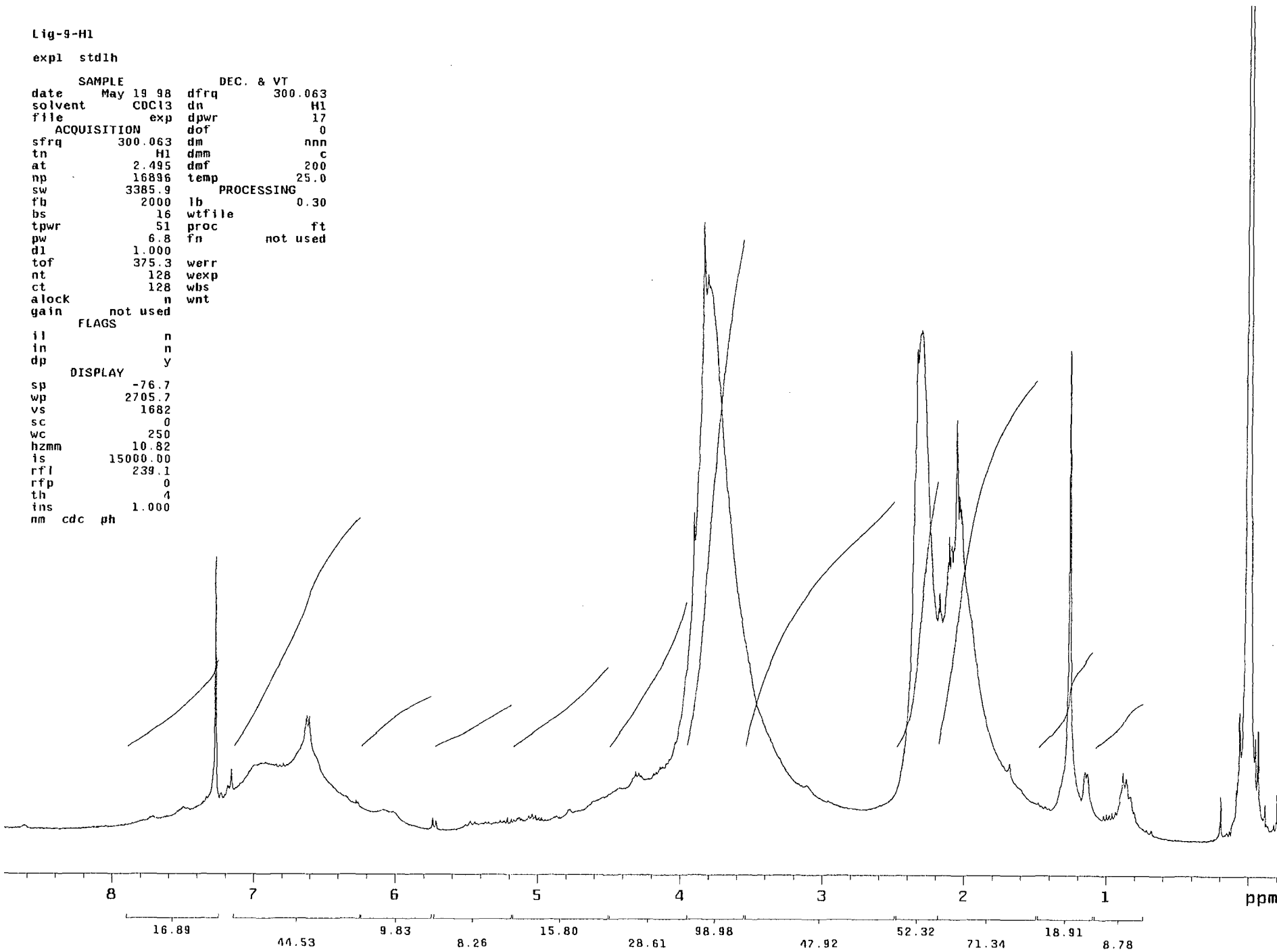


FRACÇÃO EPV-SA_{OH} (lignina solúvel em álcali), derivada do experimento 13A

Lig-9-H1

expl stdlh

SAMPLE		DEC. & VT	
date	May 19 98	dfrq	300.063
solvent	CDC13	dn	H1
file	exp	dpwr	17
ACQUISITION			
sfrq	300.063	dof	0
tn	H1	dm	nnn
at	2.495	dmm	c
np	16896	dmf	200
sw	3385.9	temp	25.0
PROCESSING			
fb	2000	lb	0.30
bs	16	wtfile	
tpwr	51	proc	ft
pw	6.8	fn	not used
d1	1.000		
tof	375.3	werr	
nt	128	wexp	
ct	128	whs	
alock	n	wnt	
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-76.7		
wp	2705.7		
vs	1682		
sc	0		
wc	250		
hzmm	10.82		
is	15000.00		
rfl	239.1		
rfp	0		
th	4		
ins	1.000		
nm	cdc	ph	

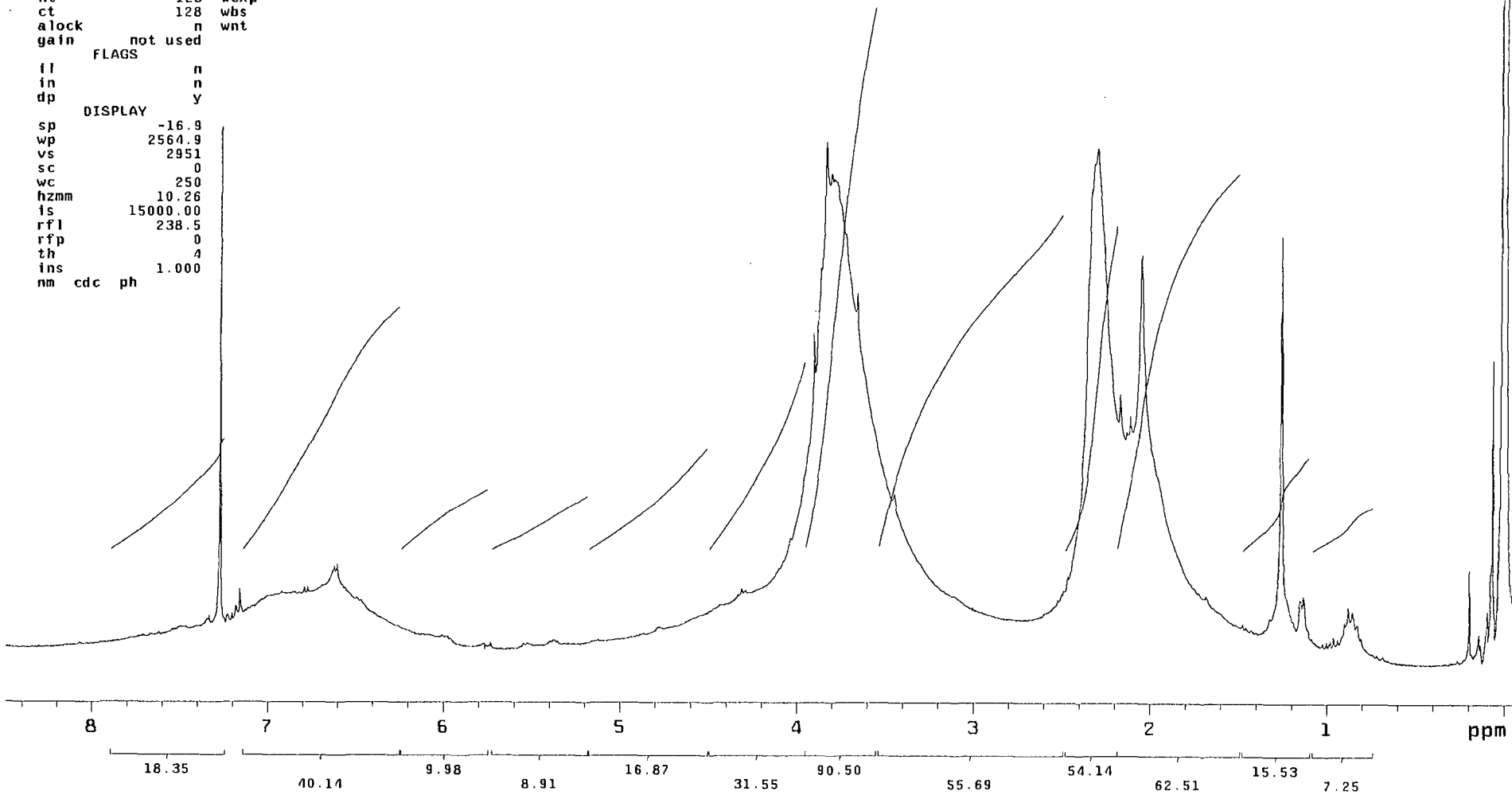


FRAÇÃO EPV-SA0H (lignina solúvel em álcali), derivada do experimento 11B

Lig-10-H1

expl std1h

SAMPLE		DEC. & VT	
date	May 20 98	dfrq	300.063
solvent	CDC13	dn	H1
file	exp	dpwr	17
ACQUISITION			
sfrq	300.063	dof	0
tn	H1	dm	nnn
at	2.495	dmm	c
np	16896	dmf	200
sw	3385.9	temp	25.0
PROCESSING			
fb	2000	lb	0.30
bs	16	wtfile	
tpwr	51	proc	ft
pw	6.8	fn	16384
d1	1.000		
tof	375.3	werr	
nt	128	wexp	
ct	128	whs	
alock	n	wnt	
gain	not used		
FLAGS			
fl	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-16.9		
wp	2564.9		
vs	2951		
sc	0		
wc	250		
hzmm	10.26		
is	15000.00		
rfl	238.5		
rfp	0		
th	4		
ins	1.000		
nm	cdc ph		

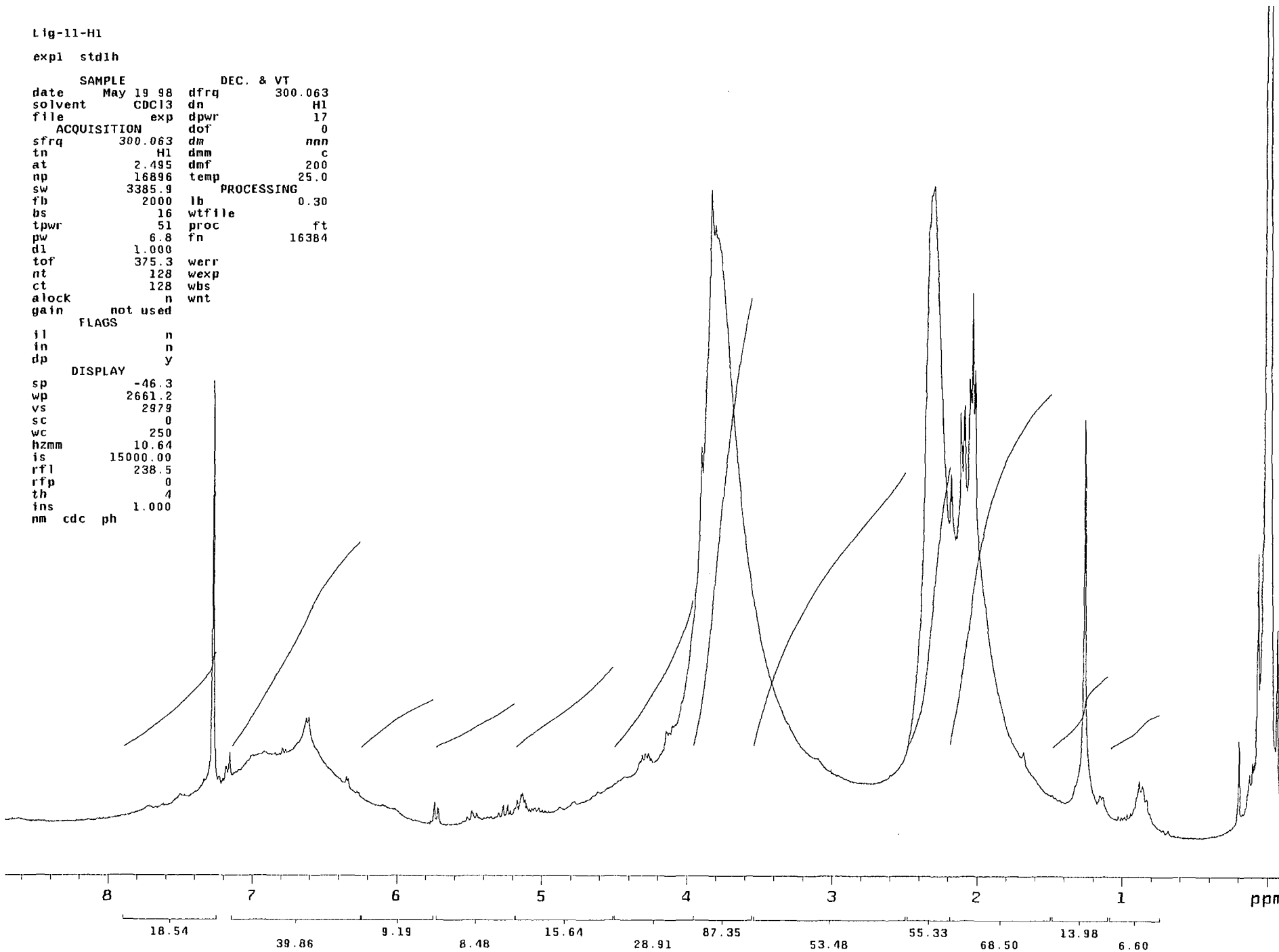


FRAÇÃO EPV-SA0H (lignina solúvel em álcali), derivada do experimento 12B

Lig-11-H1

expl std1h

SAMPLE		DEC. & VT	
date	May 19 98	dfrq	300.063
solvent	CDC13	dn	H1
file	exp	dpwr	17
ACQUISITION			
sfrq	300.063	dof	0
tn	H1	dm	nan
at	2.495	dmm	c
np	16896	dmf	200
sw	3385.9	temp	25.0
PROCESSING			
fb	2000	lb	0.30
bs	16	wtfile	
tpwr	51	proc	ft
pw	6.8	fn	16384
dl	1.000		
tof	375.3	werr	
nt	128	wexp	
ct	128	wbs	
alock	n	wnt	
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-46.3		
wp	2661.2		
vs	2979		
sc	0		
wc	250		
hzmm	10.64		
is	15000.00		
rfl	238.5		
rfp	0		
th	4		
ins	1.000		
nm	cdc	ph	



FRAÇÃO EPV-SA_{OH} (lignina solúvel em álcali), derivada do experimento 13B