

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA



ALESSANDRA DIAS BARBOSA PRAXEDES MORAES
DIOGO GUIMARÃES HARDUIM SANT'ANNA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO E DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR
ANTES E APÓS PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO**

Rio de Janeiro
2014

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO E DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR ANTES E APÓS PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

Alessandra Dias Barbosa Praxedes Moraes

Diogo Guimarães Harduim Sant'Anna

Projeto de Graduação do Curso de Engenharia Química da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Engenheiro (a) Químico (a).

Orientadoras: Maria Antonieta P. Gimenes Couto - *D.Sc.* (UFRJ)

Viridiana Santana Ferreira Leitão - *D.Sc.* (INT)

Rio de Janeiro

Março de 2014

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO E DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR
ANTES E APÓS PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO.**

Alessandra Dias Barbosa Praxedes Moraes

Diogo Guimarães Harduim Sant' Anna

PROJETO DE GRADUAÇÃO SUBMETIDO AO CORPO DOCENTE DO CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA DA ESCOLA DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE ENGENHEIRO QUÍMICO

Aprovada por:

Ayla Sant'Ana da Silva, *D.Sc.*

Elcio Ribeiro Borges, *D.Sc.*

Verônica Ferreira Melo, *D.Sc.*

Orientado por:

Maria Antonieta P. Gimenes Couto, *D.Sc.*

Viridiana Santana Ferreira Leitão, *D.Sc.*

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Março de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Moraes, Alessandra. Sant'Anna, Diogo.

Caracterização química do bagaço e da palha da cana-de-açúcar antes e após pré-tratamento hidrotérmico - Rio de Janeiro: UFRJ/ Escola de Química, 2014.

V, 163 f: Il.; 29,7 cm.

Orientadoras: Maria Antonieta P. Gimenes Couto - *D.Sc.*(UFRJ)

Viridiana Santana Ferreira Leitão - *D.Sc.*(INT)

Projeto de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Escola de Química, 2014.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Pelo apoio incondicional e pela presença sempre presente e sutilmente revelada.

Aos nossos pais, irmão e família.

De quem tudo recebemos. Agradecemos pelo exemplo de honestidade, integridade, moral e caráter.

Agradecemos pelo apoio constante e por tudo que até hoje fazem.

Aos nossos amigos.

Que amenizaram muitas dificuldades durante esses anos de faculdade. Àqueles que, de alguma forma, colaboraram para que chegássemos até aqui.

Aos nossos amigos e colegas do INT.

Alexandre, Aline, Ana Luiza, Anete, Angélica, Anna Beatriz, Javier, Juliana, Lorraine, Lívian, Luiza, Maria Cristina, Marina, Patrícia, Raul, Roberta, Rondinele, Stella, Thays, pelo incentivo, suporte e colaboração neste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Tecnologia Enzimática do Instituto de Química-UFRJ coordenado pela Prof^a. Elba

Pelo suporte na realização do pré-tratamento hidrotérmico e pela troca de conhecimentos durante a realização dos ensaios.

Às nossas orientadoras, Maria Antonieta e Viridiana.

Pela orientação e conhecimentos transmitidos.

RESUMO

Moraes, Alessandra; Sant'Anna, Diogo. **Caracterização química do bagaço e da palha da cana-de-açúcar antes e após pré-tratamento hidrotérmico**. Orientadoras: Maria Antonieta Peixoto Gimenes Cortes e Viridiana Santana Ferreira Leitão. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2014. Projeto de Graduação (Engenharia Química).

Nas últimas décadas, observou-se um aumento da demanda energética mundial, bem como uma crescente geração de resíduos agroindustriais. Diante deste fato, a busca por novas fontes de energias sustentáveis mostra-se como uma das grandes problemáticas da humanidade atual. Assim, a produção de etanol de segunda geração (2G) produzido a partir de matéria-prima lignocelulósica torna-se uma alternativa promissora. No entanto, apresentam um maior grau de complexidade tecnológica, visto que, ainda existem muitas barreiras a serem superadas. Um dos principais desafios da tecnologia do etanol 2G é a disponibilização da celulose para a hidrólise enzimática, o que deve ocorrer na etapa de pré-tratamento. Este trabalho objetivou a caracterização da biomassa antes e após o pré-tratamento, bem como a quantificação dos produtos formados. Os ensaios foram realizados utilizando bagaço e palha de cana-de-açúcar *in natura*, e uma mistura de bagaço e palha na proporção 1:1 antes e após pré-tratamento. O bagaço de cana apresentou maior teor de celulose (40,0%) quando comparado com a palha (29,4%). O pré-tratamento foi conduzido à 195°C por 10 minutos em um reator PARR / 4848 com volume de 1 litro do Laboratório de Tecnologia Enzimática, usando 30 g de biomassa seca e 300 mL de água destilada (proporção sólido líquido 1:10). A solubilização de hemicelulose obtida após o pré-tratamento foi de 83,7%, 93,3% e 88,5% para o bagaço, palha e mistura bagaço e palha, respectivamente. O pré-tratamento hidrotérmico também foi capaz de remover quantidades baixas de lignina a partir do bagaço pré-tratado (1,3%), palha pré-tratada (5,6%) e mistura pré-tratada (11,9%). Durante o pré-tratamento, o principal produto de degradação formado foi o ácido acético, nas concentrações: 2,03 g.L⁻¹, 1,93 g.L⁻¹, e 1,88 g.L⁻¹ para o bagaço, palha e mistura bagaço/palha, respectivamente. Os dados obtidos mostraram que o pré-tratamento foi efetivo no tratamento das biomassas investigadas.

ABSTRACT

Moraes, Alessandra; Sant'Anna, Diogo. Chemical characterization of the bagasse and straw from sugarcane before and after hydrothermal pretreatment as step in obtaining bioethanol. Advisers: Maria Antonieta Peixoto Gimenes Cortes and Viridiana Santana Ferreira Leitão. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2014. Graduation Project (Chemical Engineering).

In the last decades, it was observed an increase in global energy demand as well as a growing generation of agro industrial residues. Considering this fact, the search for new sources of sustainable energy is one of the greatest challenges for the next years. Thus, the production of second generation ethanol (2G) from lignocellulosic feedstock appears as a promising alternative. However, this production shows a higher technological complexity, since there are still many barriers to overcome. One of the main challenges of second generation ethanol technology is to improve the access of hydrolytic enzymes to cellulose, which should occur in the pre-treatment step. This study aimed the characterization of sugarcane biomass before and after pre-treatment, as well as the quantification of the products formed. Tests were carried out using sugarcane bagasse and straw *in natura* and bagasse-straw 1:1 mixture, before and after pretreatment. The bagasse showed higher cellulose content (40.0%) when compared with the straw (29.4%). The pre-treatment assays were performed at 195 ° C for 10 minutes in a 1L reactor vessel PARR/4848 containing 30 g of dry biomass and 300 ml of distilled water (solid liquid ratio 1:10). The solubilization of hemicellulose during pre-treatment was 83.7 %, 93.3 % and 88.5 %, for bagasse, straw and the mixture respectively. The hydrothermal pre-treatment was also able to remove amounts of lignin from the pretreated bagasse (1.3%), pretreated straw (5.6%) and pretreated mixture (11.9%). During the pretreatment, the main inhibitor product formed was acetic acid in concentrations: 2.03 g L⁻¹, 1.93 g L⁻¹ and 1.88 g L⁻¹ for bagasse, straw and mixture of bagasse/straw, respectively. The results showed that pre-treatment was effective in the treatment of the biomass investigated.

SUMÁRIO

1. Introdução e Objetivos	1
1.1. Introdução	1
1.2. Objetivo	2
1.2.1. Objetivo geral	2
1.2.2. Objetivos Específicos	3
1.3. Organização do Trabalho	3
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. Etanol	5
2.1.1. Rotas de produção de Etanol	6
2.2. Cana-de-açúcar	10
2.3. Materiais Lignocelulósicos	14
2.3.1. Celulose	15
2.3.2. Hemicelulose	17
2.3.3. Lignina	19
2.3.4. Outros Compostos da Biomassa Vegetal	21
2.3.5. Inibidores	21
2.4. Biorrefinaria e a Rota tecnológica de produção de etanol de 2ª geração	22
2.5. Pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos	24
2.6. Pré-tratamento Hidrotérmico	27
2.7. Considerações Finais	29
3. Materiais e Métodos	30
3.1. Matérias-primas lignocelulósicas utilizadas para análise compositiva.	30
3.2. Caracterização química da biomassa <i>in natura</i> e pré-tratada.....	30
3.2.1. Determinação de sólidos totais ou umidade.....	31
3.2.2. Determinação de cinzas totais.....	31
3.2.3. Determinação dos extrativos na biomassa.....	32
3.2.4. Hidrólise ácida.....	34
3.2.5. Determinação dos carboidratos e inibidores por CLAE	35
3.2.6. Determinação de lignina insolúvel em meio ácido.	37

3.2.7. Determinação de lignina solúvel e total.	37
3.3. Ensaio de pré-tratamento	38
4. Resultados e Discussões.....	40
5. Conclusões.....	44
6. Referências Bibliográficas.....	45
Anexos.....	52

Listas de Abreviaturas e Siglas

°C - Graus Celsius

1G - Primeira geração

2G - Segunda geração

AI- Amostra integral

AFEX - Amônia Fiber, Freezer Explosion

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e B combustíveis

BBC - British Broadcasting Corporation

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

COGEN - Associação da Indústria de Cogeração de Energia

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

GAX - Glucuronoarabinoxilana

h – Hora

HMF - Hidroximetilfurfural

Kg - Quilograma

IAA - Instituto Açúcar e Alcool

INT - Instituto Nacional de Tecnologia

mL – Mililitros

µL - Microlitros

MWH - Mega Watts hora

NREL- National Renewable Energy Laboratory

PROÁLCOOL - Programa Nacional do Alcool

PS- Peso seco

SSF – Fermentação e sacarificação simultâneas (*Simultaneous saccharification and fermentation*)

UNICA - União da Indústria da cana-de-açúcar

Lista de Tabelas

Tabela 1	Projeção e produção de cana-de-açúcar no Brasil	2
Tabela 2.	Principais polissacarídeos encontrados na hemicelulose.	19
Tabela 3.	Efeito dos principais pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos.	27
Tabela 4.	Composição química do bagaço da cana-de-açúcar, palha e da mistura de ambos antes e após o pré-tratamento.	40
Tabela 5.	Concentração de inibidores (g L ⁻¹) formados durante o pré-tratamento hidrotérmico.	42

Listas de Figuras

Figura 1.	Oscilação do preço do petróleo no mercado mundial.	1
Figura 2.	Fórmula química do etanol ou álcool etílico.	5
Figura 3.	Tecnologias para a produção de etanol por fermentação	8
Figura 4.	Produção de etanol no Brasil	10
Figura 5.	Mapa das grandes regiões produtoras de cana-de-açúcar no Brasil	12
Figura 6.	Produtos e resíduos gerados à partir da cana-de-açúcar moída.	12
Figura 7.	Produtos potenciais obtidos a partir de material lignocelulósico.	14
Figura 8.	Representação esquemática da estrutura da biomassa lignocelulósica.	15
Figura 9.	A estrutura e as ligações de hidrogênio inter e intra moleculares da celulose.	16
Figura 10.	Estrutura química - Xilana	18
Figura 11.	Esquema da parede celular vegetal	18
Figura 12.	Precursores básicos na composição da lignina	20
Figura 13.	A rota tecnológica para produção de etanol de segunda geração	24
Figura 14.	Sistema Soxhlet.	33
Figura 15.	Reator PARR/4848 utilizado.	38
Figura 16.	Filtração após pré-tratamento.	39
Figura 17.	Diagrama de blocos das etapas de caracterização química dos materiais investigados.	39
Figura 18.	Bagaço e a palha de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento hidrotérmico.	41

1. Introdução e Objetivos

1.1. Introdução

Dentro de um contexto mundial, onde ocorrem grandes oscilações nos preços do petróleo (Figura 1) em função da instabilidade geopolítica, os biocombustíveis surgem como uma alternativa na redução da dependência dos combustíveis fósseis. No Brasil, a produção de etanol a partir do caldo da cana-de-açúcar (etanol 1G) é um processo consolidado e mundialmente competitivo. Os resíduos lignocelulósicos como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, gerados no processo, podem ser utilizados na produção de etanol de segunda geração (2G), uma vez que estão disponíveis em grandes quantidades como coprodutos da indústria sucroalcooleira.



Figura 1. Oscilação do preço do petróleo no mercado mundial (BBC, 2014).

A produção de cana-de-açúcar no Brasil da safra 2012/2013 foi estimada em 588.478 milhões de toneladas, sendo 23.226 milhões de litros para produção de etanol e 38.246 mil toneladas de açúcar (Unica, 2013). A produção, bem como, a expectativa de produção de cana-de-açúcar é visualizada na Tabela 1.

Aproximadamente 88% do bagaço de cana são queimados nas usinas de açúcar e álcool para a cogeração de energia, enquanto que 30-50% da palha de cana é deixada no solo para a manutenção da fertilidade (Ferreira-Leitão *et. al.*, 2010). Como resultado da regulamentação ambiental (Brasil, 1998) que trata do estabelecimento de normas de precaução relativas ao emprego do fogo em práticas agropastoris e florestais a colheita manual da cana-de-açúcar está gradualmente sendo substituída pela colheita mecânica. Neste novo paradigma, coletar-se-ia a cana integral, resultando em um aumento na quantidade de palha residual, que poderia ser utilizada junto com o bagaço excedente já existente nas usinas sucroalcooleiras.

Tabela 1. Projeção e produção de cana-de-açúcar no Brasil

	2008/2009	2015/2016	2020/2021
Produção de cana de açúcar (milhões de toneladas)	562	829	1.038
Etanol (bilhões de litros)	27,0	46,9	65,3
Consumo interno	22,0	34,6	49,6
Excedente para exportação	4,8	12,3	15,7

Fonte: (COGEN, 2009)

Um dos principais desafios da tecnologia 2G é a disponibilização da celulose para a hidrólise enzimática, o que deve ocorrer na etapa de pré-tratamento. Esta etapa pode influenciar fortemente o custo do processo por determinar entre outros fatores, a toxicidade da fermentação, a taxa de hidrólise enzimática e a carga de enzima utilizada.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

O presente trabalho visa à caracterização química do bagaço e da palha da cana-de-açúcar antes e após pré-tratamento hidrotérmico.

1.2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Busca pelo conhecimento ao assunto abordado
- ✓ Determinação da massa seca, cinzas, lignina e extraíveis das amostras *in natura* e pré-tratadas (bagaço e palha de cana-de-açúcar).
- ✓ Determinação de carboidratos estruturais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), nas amostras *in natura* e pré-tratada.
- ✓ Determinação dos produtos de degradação de açúcares (furfural e hidroximetilfurfural (HMF)) após o pré-tratamento por cromatografia líquida de alta eficiência.

1.3. Organização do Trabalho

O presente trabalho encontra-se relatado da seguinte forma: além deste capítulo introdutório, o capítulo 2 aborda o estado da arte de biocombustíveis, com especial enfoque na caracterização da biomassa residual e pré-tratamento como etapas importantes na produção de etanol de segunda geração.

Os materiais utilizados e as metodologias empregadas são descritas no terceiro capítulo, enquanto os resultados obtidos, assim como sua discussão e análise são apresentados no quarto capítulo. Por fim, no quinto capítulo, encontram-se as conclusões obtidas a partir dos dados experimentais.

Este trabalho é resultado da cooperação científica entre a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e o Instituto Nacional de Tecnologia (INT-MCTI) /DCAP/LABIC e parte do trabalho MOUTTA, R. O.; SILVA, M. C.; CORRALES, R. C. N. R.; CERULLO, M. A. S.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; DA SILVA BON, E. P. 2013. Comparative Response and Structural Characterization of Sugarcane

Bagasse, Straw and Bagasse-Straw 1:1 Mixtures Subjected To Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Conversion. J. Microbial Biochem Technol, S12:1-8.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Etanol

O etanol derivado de biomassa renovável é um biocombustível líquido que tem como principal componente o álcool etílico (Figura 2), podendo ser utilizado, diretamente ou mediante alterações, em motores a combustão interna com ignição por centelha, em outras formas de geração de energia ou em indústria petroquímica, podendo ser obtido por rotas tecnológicas distintas (ANP, 2013).

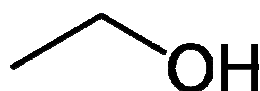


Figura 2. Fórmula química do etanol ou álcool etílico.

Pode-se citar, como uns dos principais motivos para a busca de fontes energéticas sustentáveis e materiais renováveis, o aumento da demanda energética mundial, a preocupação do esgotamento das reservas de combustível fóssil, emissão de gases do efeito estufa liberados no processo de combustão em veículos, principalmente o CO₂ atmosférico e a busca pelo desenvolvimento da economia rural (ZHANG, 2008).

Segundo a ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, o termo biocombustível refere-se à substância derivada de biomassa renovável, tal como biodiesel, etanol e outras substâncias estabelecidas em regulamento da ANP, que pode ser empregada diretamente ou mediante alterações em motores a combustão interna ou para outro tipo de geração de energia, podendo substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (ANP, 2013). Os biocombustíveis são considerados tecnologias importantes para o desenvolvimento e industrialização de vários países. Estes implicam em questões de soberania energética e ambiental, bem como, socioeconômicas relacionadas ao setor rural (DEMIRBAS, 2007).

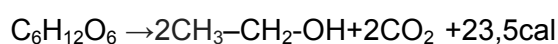
Os combustíveis derivados de biomassa apresentam algumas vantagens em relação aos combustíveis de origem fóssil. Como: facilidade na obtenção de matéria-prima e seu baixo custo e a redução na emissão de carbono na atmosfera. Além disso, para algumas espécies vegetais a produção de biomassa é favorecida face a elevada disponibilidade de CO₂ atmosférico (BIOETANOL, 2013) e são biodegradáveis contribuindo assim para uma produção sustentável (PUPPAN, 2002; HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006).

2.1.1. Rotas de produção de Etanol

Os processos de obtenção do etanol são divididos em três tipos: via destilatória, via sintética e via fermentativa.

A via destilatória, por destilação de líquidos fermentados, não tem significado econômico para o Brasil em comparação a produção total. Essa é restrita a regiões vinícolas onde, em ocasiões especiais, é produzido álcool pela destilação de vinhos de qualidade inferior. Na via sintética, dependendo da disponibilidade de matéria-prima, obtém-se o etanol com os processos tecnológicos de hidratação catalítica direta ou indireta do eteno ou por hidrogenação catalítica do acetileno. (MORRISSON, 1983). Já a via fermentativa é a principal via para a obtenção do álcool etílico no Brasil devido principalmente ao grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o país. É importante observar que qualquer matéria-prima que contenha açúcar ou outro carboidrato em sua estrutura pode ser utilizada nesse processo. Parte-se de matérias-primas açucaradas (cana-de-açúcar, melão, sorgo sacarino, sucos de frutas, cereais, etc) que, após sua transformação em mosto, são submetidas ao processo fermentativo resultando como produtos o álcool e o anidrido carbônico (Enciclopédia Agrícola Brasileira/ESALQ, 1995).

A estequiometria da obtenção do álcool por fermentação pode ser resumida pela equação de GAY-LUSSAC (Equação 1).



Equação 1

No entanto, para que o processo fermentativo seja viável é necessário contabilizar o volume de produzido, o rendimento, bem como, o custo de produção (LIMA, *et al*, 2001).

As matérias-primas podem ser classificadas em matérias açucaradas ou sacaríneas, agrupando, por exemplo, cana-de-açúcar, beterraba açucareira, sorgo sacarino, milho sacarino, melaços, mel de abelhas e frutas; em matérias amiláceas, tais como grãos amiláceos, raízes e tubérculos feculentos; e em matérias lignocelulósicas, incluindo palhas, madeiras, resíduos agrícolas e resíduos sulfíticos de fábricas de papel (LIMA, *et al*, 2001).

A Figura 3 ilustra esquematicamente as principais tecnologias para a produção de etanol por via fermentativa.

Comparando-se o etanol aos combustíveis fósseis tradicionais podem-se destacar diferenças significativas como, por exemplo, o elevado teor de oxigênio, que representa aproximadamente 35% em massa do etanol. Essa característica possibilita uma queima mais limpa e o melhor desempenho dos motores, o que contribui para redução de emissões poluidoras, mesmo quando misturada à gasolina. Neste sentido, o etanol torna-se um aditivo para o combustível tradicional, pois melhora suas propriedades (BIOETANOL, 2008).

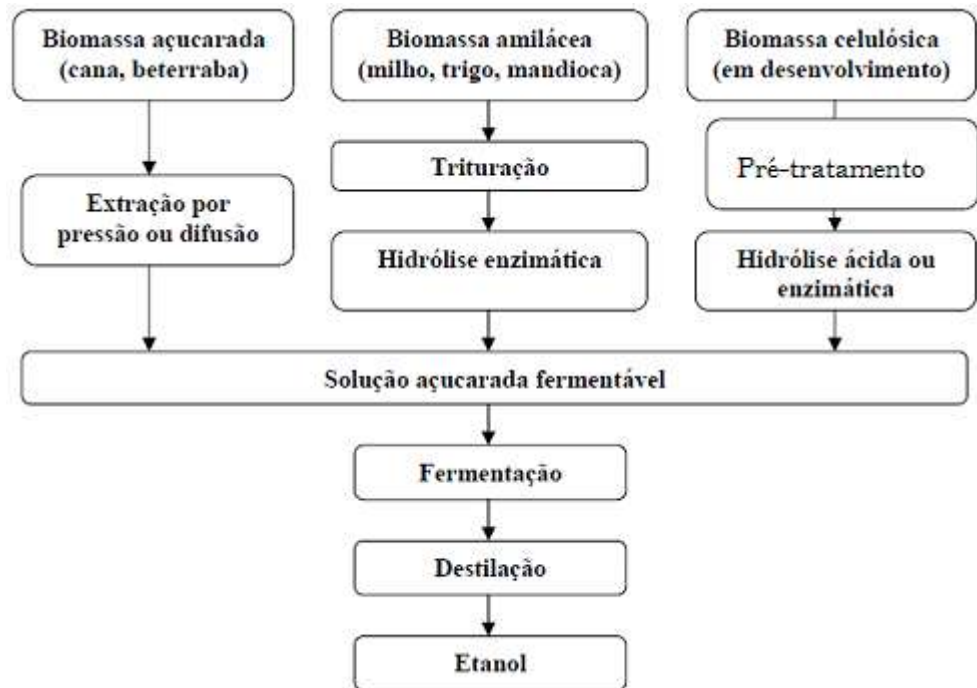


Figura 3. Tecnologias para a produção de etanol por fermentação (Adaptado de BIOETANOL, 2008).

O primeiro grande choque do petróleo de 1973 triplicou o preço do barril de petróleo o que levou os países importadores a buscar novas alternativas. Com isso, o Brasil implantou em 1975 o Programa Nacional do Álcool - PROÁLCOOL, criado pelo Decreto 76.593/75 visando diminuir a dependência da gasolina e utilizar o álcool combustível em sua frota veicular, reduzindo assim, as importações de petróleo. No entanto, a indústria sucroalcooleira estava em crise, pois houve uma redução significativa na demanda internacional pelo açúcar brasileiro. Além disso, devido aos altos investimentos realizados na década de 60 e início dos anos 70, a indústria apresentava sinais de superprodução (BERTELLI, 2005).

A capacidade produtiva do setor sucroalcooleiro foi expandida pelos investimentos feitos nas décadas anteriores. No entanto ao final de 1974 os preços no mercado internacional começaram a cair devido à retração do consumo de açúcar (BERTELLI, 2005).

Na primeira fase do Proálcool, entre 1975-1979, o álcool anidro foi adicionado à gasolina constituindo uma mistura álcool anidro-gasolina sendo basicamente produzido por destilarias anexas. No período compreendido entre 1977 e 1978 houve ociosidade devido à superprodução por parte das indústrias, ultrapassando a demanda pelo produto (SANTOS, 1993).

Na segunda parte do programa, período entre 1979-1985, foram introduzidos no mercado automobilístico os primeiros carros a álcool combustível. Nesse período, ocorreu o segundo grande choque do petróleo, em 1979. Com a alta produção de álcool e a alta do preço do barril de petróleo o governo brasileiro assinou um acordo com a indústria automobilística para produzir carros somente movidos a álcool. Durante toda a década de 80, os carros a álcool eram líderes de venda de veículos leves, porém com a crise de desabastecimento de álcool no final dos anos 80 essa procura por carros diminuiu (MORAES, 1999).

A década de 90 foi marcada pela extinção do Instituto Açúcar e Álcool (IAA) e a instabilidade de produção devido a dificuldades do setor de equilibrar a oferta e a demanda pelos seus produtos. No mais, o governo deixou de fixar os preços do produto do setor. Isso gerou uma busca por melhores práticas de produção, levando à redução dos preços e aumento da competitividade dos produtos na economia de livre mercado (MORAES, 1999).

No novo milênio, a busca por novas alternativas ambientalmente mais seguras levou ao surgimento de veículos bicombustíveis (*flex-fuel*), o que levou novos clientes ao mercado do álcool hidratado. Lançados em 2003, esses novos automóveis utilizam álcool hidratado e gasolina em qualquer proporção e já são líderes das vendas de veículos leves (SOUZA, 2006).

A produção de etanol pode sofrer alterações mediante a produção e variação do preço do açúcar no mercado internacional (figura 4) (UNICA, 2014).

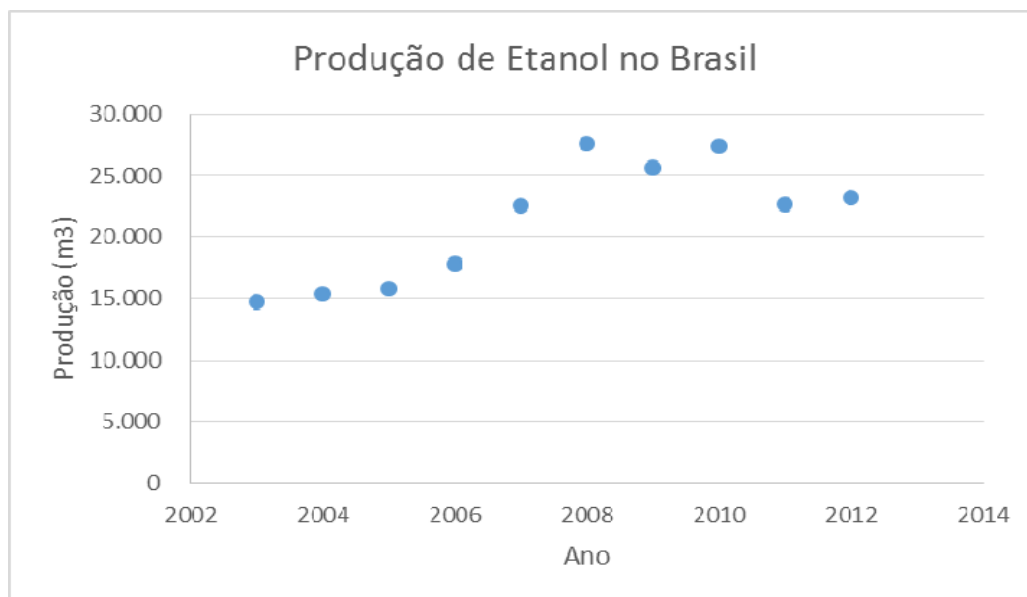


Figura 4. Produção de etanol no Brasil (UNICA, 2014).

2.2. Cana-de-açúcar

Historicamente, acredita-se que a origem da cana-de-açúcar ocorreu na Melanésia, Indonésia e Nova Guiné, sendo expandida para o Pacífico Sul, Índia, China e arredores, entre 1.500 a.C. e 1.000 a.C. Sendo então, bem adaptada a outras regiões do mundo, principalmente regiões de clima tropical e subtropical. Seu cultivo é normalmente feito em latitudes 35 °N até 30 °S e em alturas até 1000 metros, onde a cana-de-açúcar encontrou um ambiente propício para expansão. (OLIVEIRA, 2007). A cultura da cana é vista como uma das atividades agrícolas mais importantes nos países de clima tropical e subtropical, gerando assim, renda e emprego para a população. (NETAFIM, 2009).

A cana-de-açúcar é considerada um dos mais importantes produtos agrícolas no cenário produtivo brasileiro. Desde o período colonial a cana brasileira é vista como uma grande alternativa para geração de renda e energia. Atualmente, o açúcar e o álcool brasileiro, por se tratarem de produtos de origem renovável com um baixo custo de produção, vêm despertando interesse em vários países (OLIVEIRA, 2007).

O Brasil conta com aproximadamente 330 milhões de hectares de áreas aráveis, equivalente a 38,8% de sua área total tais condições são especialmente favoráveis para a agricultura e para a produção de cana-de-açúcar. Cerca de 90% da produção brasileira de cana-de-açúcar é colhida na região Centro-Sul, principalmente no Estado de São Paulo que é responsável por 60% (CONAB, 2013).

A cultura da cana se caracterizando principalmente por ser uma monocultura, utilizando dois modelos tradicionais: o corte com a cana queimada e o corte da cana crua, sem queima e com colheita mecanizada. A utilização do crédito de carbono pelas usinas brasileiras é um exemplo da eficiência ambiental (NETAFIM, 2009).

Para garantir que a cultura da cana-de-açúcar não ameace áreas de grande biodiversidade, que são protegidas pela legislação brasileira, novas áreas de plantio devem respeitar o zoneamento agroecológico da cana-de-açúcar vigente desde 2009. Este é o caso da região da Amazônia que, além de possuir clima impróprio para o plantio da cana-de-açúcar, não está incluída no zoneamento agroecológico da cana-de-açúcar. O mesmo ocorre com outros importantes biomas brasileiros, como o pantanal (UNICA, 2013).

Assim, as usinas não têm licença para operar e não atuam nessas regiões sendo que as grandes regiões produtoras de cana-de-açúcar no Brasil estão a mais de 2.500km de distância da Amazônia (Figura 5).

O desenvolvimento do setor sucroalcooleiro nos últimos anos, principalmente em virtude da demanda pelo etanol nos últimos anos, levou ao surgimento de grandes quantidades de resíduos, tais como a palha e o bagaço da cana-de-açúcar. Estima-se que aproximadamente 14% da massa seca da cana é resíduo (SEABRA, 2008). No mais, calcula-se quem em média para cada tonelada de cana-de-açúcar moída na fabricação de açúcar e etanol gera, em média, 250 kg de bagaço e 200 kg de palha e pontas Figura 6 (UNICA, 2014).

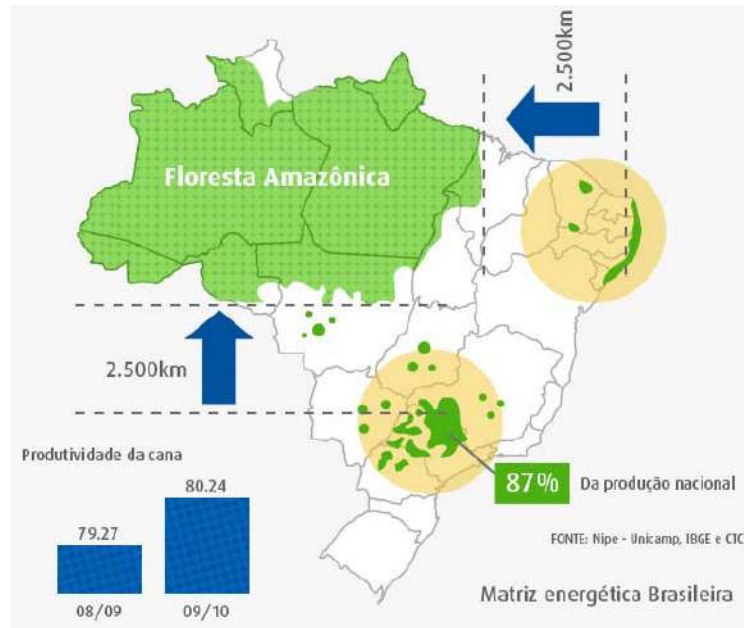


Figura 5. Mapa das grandes regiões produtoras de cana-de-açúcar no Brasil. (UNICA, 2013).

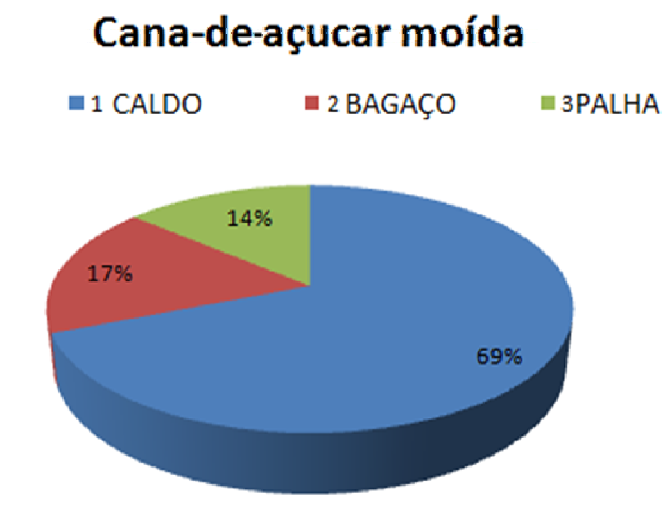


Figura 6. Produtos e resíduos gerados à partir da cana-de-açúcar moída. (UNICA, 2014).

Devido ao seu alto teor de fibras, o bagaço de cana, desde a revolução industrial, tem sido empregado na produção de vapor e energia elétrica para a fabricação de açúcar e etanol, garantindo a autossuficiência energética das usinas

durante o período da safra. Além de atender as necessidades de energia das usinas, desde a década de 1980 o bagaço é responsável por fornecer energia elétrica ao sistema brasileiro. Especificamente no ano de 2012, o setor sucroenergético celebrou 25 anos da atividade de venda de bioeletricidade para a rede elétrica nacional (UNICA, 2014).

O bagaço da cana é utilizado principalmente para gerar energia na própria usina por queima em caldeiras, pois este resíduo está presente em grande quantidade e não apresenta custos adicionais, por exemplo, de transporte. Estima-se que a combustão de 6,5 toneladas de bagaço é capaz de gerar 1MWH de energia (OLIVEIRA, 2007). Uma alternativa para a destinação do bagaço remanescente é a produção de papéis/móveis que utilizam a separação da fibra. Além disso, o bagaço pode ser utilizado na alimentação animal, na produção de furfural e na compostagem para produção de adubo (BERTONCINI, 2008).

Um dos usos para o excedente de palha da cana-de-açúcar é como fertilizante, ao ser deixada sobre o solo, por meio de processo de mineralização com devolução de nutrientes ao solo, controle de erosão e uma maior retenção de água e aumento da fauna microbiana no solo (BERTONCINI, 2008).

Frente a este problema, o governo do estado de São Paulo regulamentou a Lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002, que dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar e dá providências correlatas, sendo que até 2021 toda a área mecanizável terá 100% da queima eliminada e até 2031, toda a área não mecanizável terá 100% da queima eliminada (IMPrensa Oficial, 2003).

2.3. Materiais Lignocelulósicos

A dificuldade de se converter os materiais lignocelulósicos em insumos químicos é atribuída às suas características químicas e morfológicas. Esses materiais são constituídos de fibras de celulose envolvidas em uma matriz amorfa

de poliozes e lignina. Essa matriz amorfa age como uma barreira natural ao ataque de micro-organismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos (FENGEL; WEGENER, 1989).

O diagrama de blocos (Figura 7) apresenta os produtos que podem ser obtidos a partir destes materiais lignocelulósicos.

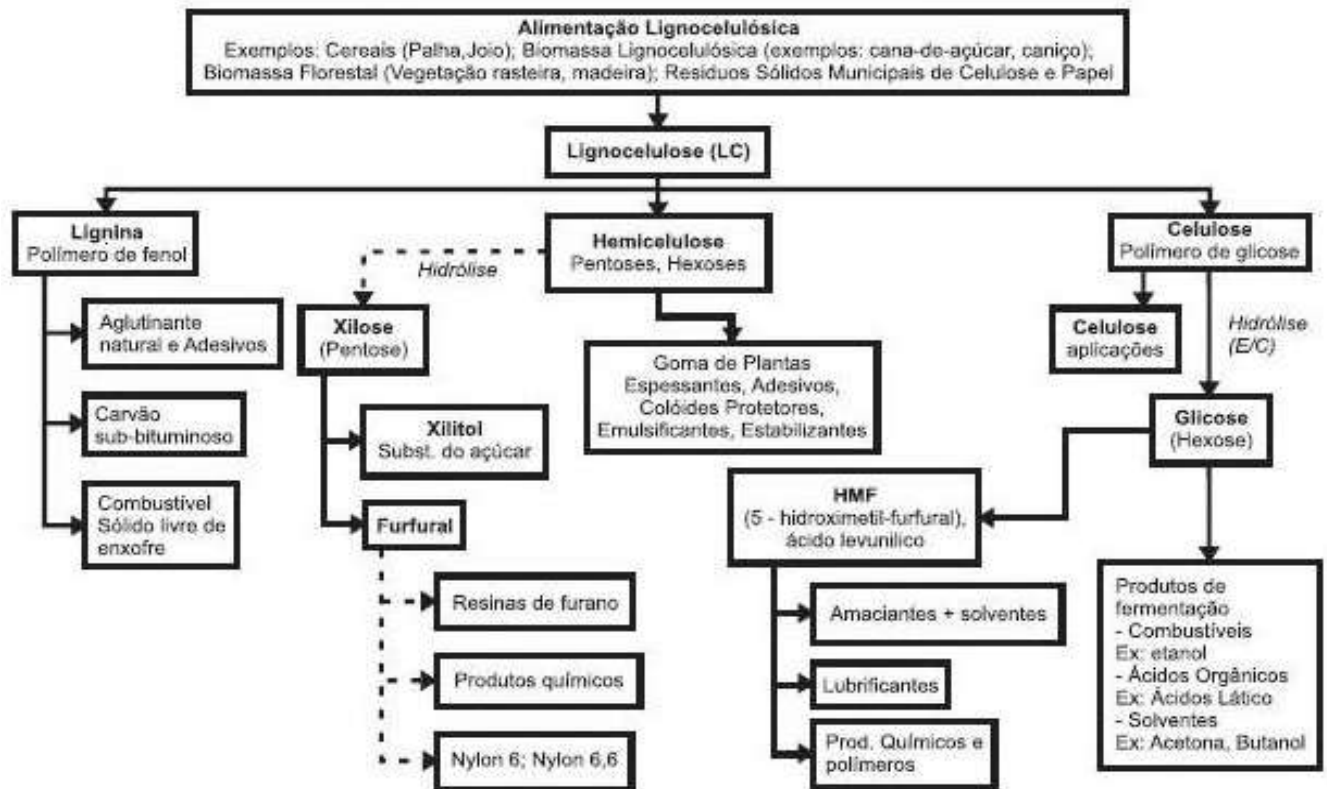


Figura 7 Produtos potenciais obtidos a partir de material lignocelulósico. (KAMM et al., 2006)

Os materiais lignocelulósicos, cuja macro-estrutura é apresentada na Figura 8, estão presentes em vários resíduos agrícolas, por exemplo, palha, cascas, caules, madeiras, folhas, pedúnculos, etc.

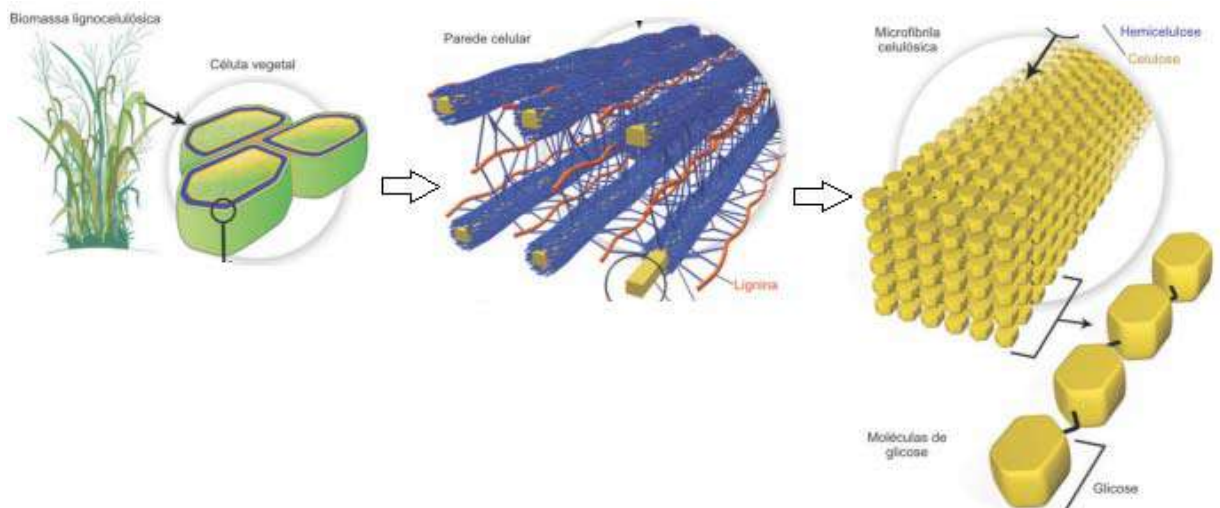


Figura 8. Representação esquemática da estrutura da biomassa lignocelulósica. (Adaptado de KONDO, 1997).

2.3.1. Celulose

A principal macromolécula estrutural dos materiais vegetais, como a madeira é a celulose. Esta se apresenta em aproximadamente 40 – 50% de sua estrutura. A celulose está presente na parede celular e na lamela média sendo responsável por conferir uma característica fibrosa, rigidez e resistência ao estresse nas plantas. Uma variedade de polissacarídeos, presentes nas hemiceluloses, e a lignina estão frequentemente entrelaçadas com a celulose. (GOLDSTEIN, 1981).

A celulose pode ser classificada como um polímero linear de anidroglicopiranosose associada por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas (ZHANG, 2008), no qual a celobiose é monômero do polímero associado. Acredita-se que em uma molécula de celulose possam existir mais de 15.000 unidades de glicose e as cadeias de celulose estão distribuídas paralelamente para formar as fibrilas elementares, que apresentam baixíssima solubilidade em água e são constituídas por regiões cristalinas e amorfas (FENGEL; WEGENER, 1989).

A presença de vários grupos hidroxila (OH) ao longo de sua estrutura possibilita que ocorram ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares gerando assim áreas de bem estáveis e cristalinas. Devido à alta estabilidade, essas cadeias possibilitam a formação de microfibrilas com alto grau de cristalinidade (FENGEL; WEGENER, 1989). Em certas áreas dessas fibras vão

aparecer irregularidades das interações, dando origem a regiões amorfas na rede cristalina (ROEHR, 2001).

A celulose apresenta sua célula unitária e conformação estrutural da cadeia em arranjo de folhas. Sua estrutura é estabilizada por ligações de hidrogênio na direção das ligações intramoleculares $\text{OH}^*3'-\text{OH}^*5$ e $\text{OH}^*6-\text{OH}^*3'$ ao longo da cadeia e na direção das ligações intermoleculares $\text{OH}^*6-\text{OH}^*2$ perpendiculares ao eixo da cadeia ao longo de uma direção, como pode ser visto na figura 9 (FENGEL; WEGENER, 1989).

A resistência à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática e sua estrutura cristalina são asseguradas pelas ligações de hidrogênio inter e intra moleculares (Figura 9) presentes na celulose (BUSELLI, 2007).

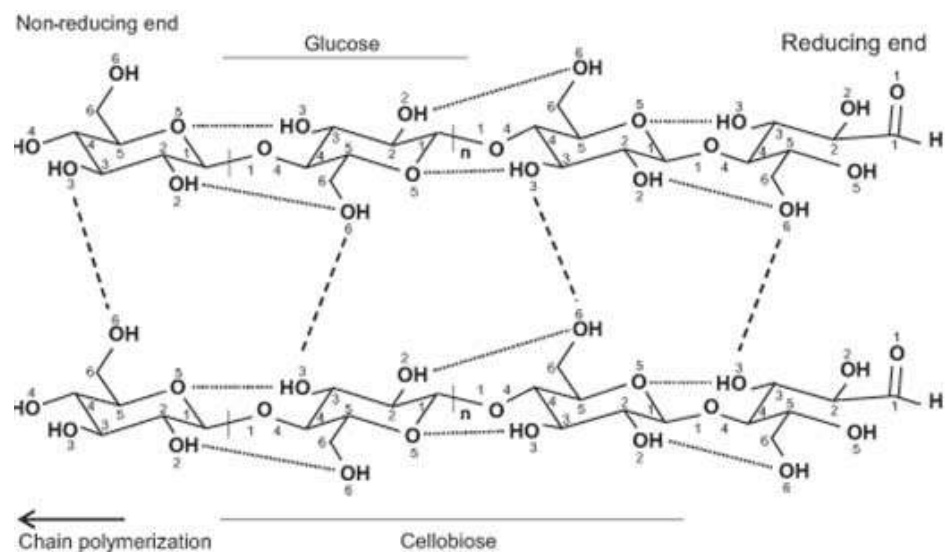


Figura 9. A estrutura e as ligações de hidrogênio inter e intra moleculares da celulose. (BUSELLI *et al*, 2007)

2.3.2. Hemicelulose

Na estrutura dos vegetais a hemicelulose é o segundo componente em maior quantidade, perdendo apenas para a celulose. A hemicelulose está presente na

parede celular dos vegetais e encontra-se entrelaçada com as fibras de celulose (BISARIA; GHOSE, 1981).

A hemicelulose é constituída principalmente por pentoses e hexoses. Além disso, apresenta unidades de repetições de 100 a 200 unidades em sua estrutura polimérica. O percentual de massa molecular da hemicelulose é menor apenas que da celulose. (FENGEL; WEGENER, 1989).

Dentre os principais constituintes dessas polioses podemos citar as hexoses: β -D-glicose, β -D-manose e α -D-galactose; e as pentoses: β -D-xilose e α -L-arabinose. A cadeia principal das hemiceluloses são constituídas de monossacarídeos, sendo classificadas de acordo com a predominância dos monossacarídeos. As que se apresentam em maior quantidade são as xilanas e glucomananas, podendo ser observado outras configurações. Os grupos laterais e ramificações são os ácidos aldônicos, aldurônicos (urônicos), aldáricos e grupos acetila (FENGEL; WEGENER, 1989). A xilana é um polissacarídeo constituído por unidades de xilose que geralmente carrega substituintes como acetil, arabinosil e glucouranosil (KUHAD; SINGH, 1993). A glucuronoarabinoxilana (GAX) consiste de uma cadeia principal de unidades de D-xilopirranose com ligações β -(1,4). (GOLDSTEIN, 1981).

Sua cadeia principal pode se apresentar como um homopolímero, por exemplo, as xilanas, ou um heteropolímero, por exemplo, as glucomananas e podem conter em sua estrutura arabinose, galactose, ácido 4-O-metilglucurônico e grupos acetil ligados à cadeia principal. Um exemplo de como o tipo de hemicelulose interfere nas características físicas do material são as madeiras macias ou coníferas (*softwood*,) pois apresentam maior proporção de galactoglucomananas do que xilanas, enquanto as madeiras duras ou angiospermas (*hardwoods*) são mais ricas em xilanas. A estrutura química da xilana é representada na Figura 10 (FENGEL; WEGENER, 1989).

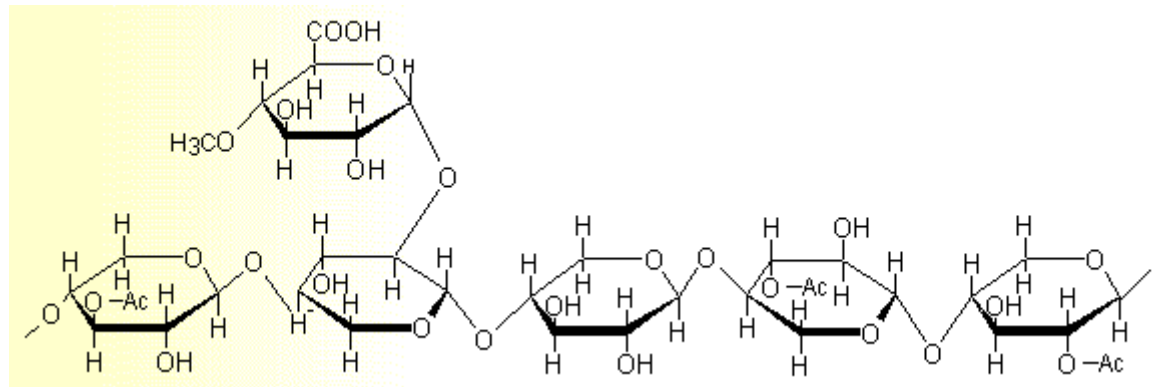


Figura 10. Estrutura química – Xilana. (BUDZIAK, 2004).

Um exemplo de estrutura de uma microfibrila, que contém moléculas de celulose depositadas umas sobre as outras mostrando as unidades de glicose ligadas entre si por ligações do tipo beta-1,4 pode ser visualizada na figura 11 (BUCKERIDGE, 2008).

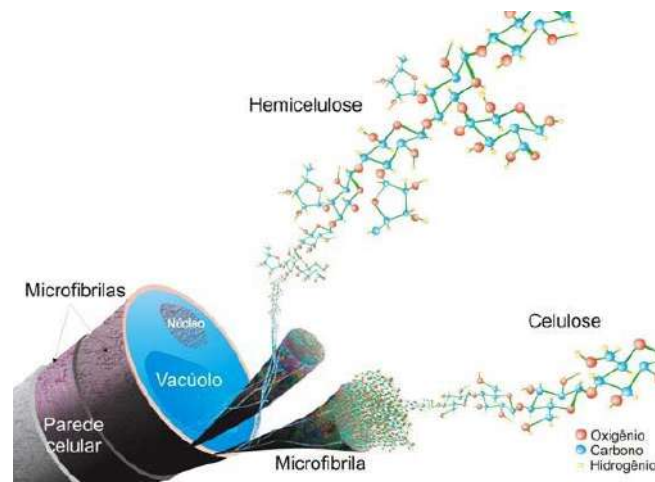


Figura 11. Esquema da parede celular vegetal (BUCKERIDGE, 2008).

A solubilização da hemicelulose, pela etapa de pré-tratamento é importante para a recuperação de açúcares presentes na biomassa, pois, além de remover parte dos açúcares estruturais da biomassa, aumenta a porosidade do material, facilitando a etapa fermentativa. A grande variedade de carboidratos proporciona a hemicelulose uma ampla variedade de arranjos estruturais, que é função da

biologia vegetal (GÍRIO et al, 2010). A tabela 2 organiza as principais estruturas de polissacarídeos presentes na hemicelulose.

Tabela 2. Principais polissacarídeos encontrados na hemicelulose.

POLISSACARÍDEO	ORIGEM BIOLÓGICA	AÇÚCAR DA CADEIA PRINCIAL	COMPONENTES DA CADEIA LATERAL	TIPO DE LIGAÇÃO
Arabinogalactana	Gimnospermas	β -D-Galactose	β -D-Galactose α -L-Arabinofuranose β -L-Arabinopirranose	β -(1 \rightarrow 6) α -(1 \rightarrow 3) β -(1 \rightarrow 3)
Arabinoglucoronoxilana	Gramíneas, Cereais, Gimnospermas	β -D-Xilopirranose	α -L-Arabinofuranose 4-O-Me- α -D-Glicopirranose A	α -(1 \rightarrow 2)
Arabinoxilana	Cereais	β -D-Xilopirranose	α -L-Arabinofuranose Feruloil esterase	α -(1 \rightarrow 2) α -(1 \rightarrow 3)
Galactoglucomanana	Gimnospermas	β -D-Manopirranose β -D-Glicopirranose	β -D-Galactopirranose Acetila	α -(1 \rightarrow 6)
Glucomanana	Angiospermas; Gimnospermas	β -D-Manopirranose β -D-Glicopirranose	-	-
Glucorono-arabinoxilana	Gramíneas e Cereais	β -D-Xilopirranose	α -L-Arabinofuranose 4-O-Me- α -D-GlicopirranoseA Acetila	α -(1 \rightarrow 2) α -(1 \rightarrow 3)
Glucoronoxilana	Angiospermas	β -D-Xilopirranose	4-O-Me- α -D-GlicopirranoseA Acetila	α -(1 \rightarrow 2)
Homoxilana	Algas	β -D-Xilopirranose	-	β -(1 \rightarrow 3)
Xiloglucana	Angiospermas, Gramíneas	β -D-Glicopirranose β -D-Xilopirranose	β -D-Galactopirranose β -D-Xilopirranose α -L-Arabinofuranose α -L-Fucofuranose Acetila	β -(1 \rightarrow 4) α -(1 \rightarrow 3) β -(1 \rightarrow 2) α -(1 \rightarrow 2) α -(1 \rightarrow 2)

Fonte: GÍRIO et al, 2010

2.3.3. Lignina

A lignina é considerada uma macromolécula amorfa, altamente complexa e ramificada tridimensionalmente, produzida a partir da polimerização desidrogenativa dos álcoois hidroxicinâmicos: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 12), Sua constituição é principalmente de unidades de fenilproprano associadas por ligações estáveis do tipo C-C, aril-éter e aril-aril (FENGEL; WEGENER, 1989).

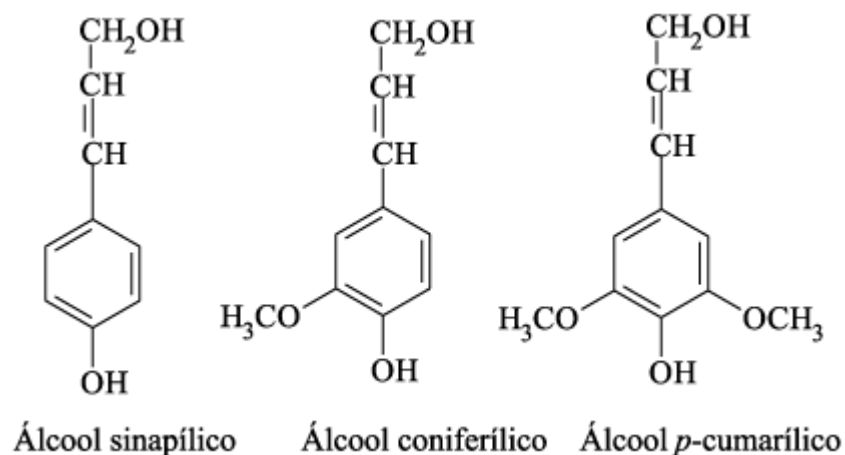


Figura 12. Precursores básicos na composição da lignina (BUDZIAK, 2004).

A lignina está presente na parede celular das plantas e está sempre em conjunto com a hemicelulose. Esta interação pode ser de caráter físico pelo seu entrelaçamento ou química por ligações covalentes. A lignina é garante a rigidez da parede celular nos vegetais, conferindo resistência ao choque, compressão e dobra (LEMOS, 2001).

Pelas suas características físico-químicas a lignina é um composto fenólico altamente resistente aos ataques químicos, enzimáticos e microbianos se tornando um entreposto a ação de agentes externos capazes de destruir as células. Além disso, lignina é um composto bastante estável, insolúvel em solventes orgânicos ou mesmo em ácido sulfúrico concentrado a quente. Como a lignina reveste a hemicelulose que envolve a celulose ataques químicos e enzimáticos que são utilizados em processos fermentativos para produção do etanol se tornam ineficientes.

A lignina é um dos principais componentes da madeira. Sua função biológica é proteger o tecido vegetal contra a oxidação e a ação de micro-organismos. As ligninas estão presentes em muitas espécies vegetais com teores que variam de 15 a 36%, de acordo com a espécie vegetal, e não possuem a mesma estrutura química em todas elas. Portanto, a lignina não deve ser considerada como uma substância química única (de estrutura definida), mas sim, como uma classe de

materiais correlatos constituída de carbono, hidrogênio e oxigênio, o que faz dela uma importante fonte desses elementos (WOLFGANG, 1989).

Da análise morfológica, a lignina é uma substância amorfa situada na lamela média e parcialmente na parede celular secundária. No desenvolvimento celular, a lignina é o último componente da parede interpenetrando as fibrilas e sendo o responsável por seu fortalecimento e enrijecimento (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.3.4. Outros Compostos da Biomassa Vegetal

Além de seus constituintes principais como a celulose, hemicelulose e a lignina, os materiais lignocelulósicos podem conter uma variedade de compostos, dentre os quais podemos citar os extrativos orgânicos que podem ser extraídos por solventes polares ou apolares. Os extrativos mais comuns são os ácidos graxos, ceras, alcaloides, proteínas, fenólicos, açúcares simples, pectinas, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amido, glicosídeos, saponinas e óleos essenciais (FENGEL; WEGENER, 1989).

Esses extrativos são metabólitos vegetais intermediários, os quais garantem a reserva energética e a resistência contra o ataque de micro-organismos e insetos, no entanto, no meio reacional possuem efeito inibitório nos processos fermentativos de conversão de biomassa (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.3.5. Inibidores

Durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica há formação de subprodutos de efeito inibitório aos micro-organismos na etapa de fermentação. Os principais subprodutos inibidores são ácido acético, 2-furaldeído (furfural) e 5-hidroximetil-2-furaldeído (hidroximetilfurfural, HMF). Os dois principais inibidores furanos citados são formados pela decomposição de pentoses (furfural) e hexose (HMF) devido à desidratação por catálise ácida durante a etapa de pré-tratamento, os quais são bastante problemáticos para a etapa da fermentação (MUSSATTO e

ROBERTO, 2004). O ácido acético é formado durante a hidrólise do grupo acetil da hemicelulose.

Pequenas concentrações de espécies inorgânicas, como potássio, sódio, cálcio, etc, podem ser encontradas na biomassa vegetal como resultado dos nutrientes absorvidos durante o crescimento vegetal (YU; LOU; WU, 2008).

2.4. Biorrefinaria e a Rota tecnológica de produção de etanol de 2ª geração

A primeira definição de biorrefinaria apareceu na legislação americana recentemente, na Farm Bill, de 2002, com o significado de instalações, equipamentos e processos que convertem a biomassa em biocombustíveis e produtos químicos e ainda podem gerar eletricidade (BASTOS, 2007).

Segundo Pereira (2006) biorrefinaria é um termo que se refere ao uso de matérias-primas renováveis e de seus resíduos (denominados de forma geral de biomassas), de maneira integral e diversificada, para a produção, por rota química ou biotecnológica, de uma variedade de substâncias e energia, com a mínima geração de resíduos e emissões de gases poluidores.

Acredita-se que em curto espaço de tempo os materiais lignocelulósicos serão utilizados para a produção de biocombustível, calor e eletricidade; entretanto, em longo prazo, a tecnologia do bioetanol será o alicerce para uma produção sustentável de commodities, mediante a obtenção de produtos com maior valor agregado tais como diversos químicos e materiais, em futuras biorrefinarias (WYMAN, 2003; KAMM; KAMM, 2004).

As biorrefinarias de materiais lignocelulósicos baseiam-se na separação de biomassa rica nestes materiais para a produção de correntes intermediárias de celulose, hemicelulose e lignina, sendo posteriormente processadas para obtenção de produtos finais. Esta, então, consiste no aproveitamento das três formas químicas básicas: hemicelulose, celulose e lignina (FERNANDO *et al*, 2006).

O surgimento de novas tecnologias utilizando biomassa é de fundamental importância para os países desenvolvidos, pois as matérias-primas usadas competem com a produção de alimentos, por exemplo, a produção de etanol e produção de açúcar. Além disso, os custos de produção de biocombustível por uma via biotecnológica ainda é maior em comparação com a produção de combustíveis à partir do petróleo (BASTOS, 2007).

A rota tecnológica para produção de etanol de segunda geração (Figura 13) pode ser dividida em três etapas principais. A primeira envolve pré-tratamento e sacarificação enzimática da biomassa vegetal para disponibilizar os açúcares fermentescíveis. Na segunda, ocorre a fermentação dos açúcares liberados realizada por micro-organismos especializados, que pode ser realizada em uma etapa combinada chamada de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF – Sigla em Inglês). Na terceira etapa, comum a qualquer processo de produção de bioetanol, é feita recuperação do etanol por processo de destilação e desidratação, no caso do etanol anidro (BASTOS, 2007).

Atualmente, muitos pesquisadores estão concentrando esforços no desenvolvimento de pré-tratamentos mais eficientes, capazes de liberar uma maior quantidade de açúcar (pentoses e hexoses) na obtenção de micro-organismos geneticamente modificados que possam fermentar tanto pentoses quanto hexoses, no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas para que possam acumular uma maior quantidade carboidratos ou implantar modificações estruturas nos vegetais para facilitar a etapa de pré-tratamento em condições amenas e na utilização de processos integrados para diminuir o número de etapas do processo e consequentemente reduzir o gasto energético. (DIEN; COTTA; JEFFRIES, 2003; JEFFRIES, 2006; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).



Figura 13. A rota tecnológica para produção de etanol de segunda geração.
(Adaptado de BASTOS, 2007)

2.5. Pré-tratamento dos Materiais Lignocelulósicos

As técnicas de pré-tratamento são classificadas em pré-tratamentos físicos, químicos ou biológicos, ou ainda uma junção deles. Os tratamentos físicos são geralmente utilizados como uma primeira etapa para a abertura da cadeia lignocelulósica e posteriormente temos um tratamento químico (ácidos ou bases) ou biológico (enzimas ou células). Dentre os tratamentos físicos podemos citar a moagem, trituração ou esfarelamento mecânicos e termofísicos (GALBE; ZACCHI, 2007).

Durante o tratamento químico a estrutura da parede celular é rompida se submetida a condições drásticas de pH. Além do uso de ácidos e bases, podemos fazer uso de solventes para rompimento de ligações. Um processo descrito na literatura é o organosolv que utiliza uma mistura de ácido e solvente orgânico,

normalmente etanol, para o quebrar as ligações internas da lignina e da hemicelulose (PAN *et al*, 2005).

Embora os tratamentos químicos possam se mostrar eficientes, eles geralmente conduzem à formação de compostos intermediários indesejáveis, que podem ser tóxicos ao biocatalisador. Uma forma de diminuir a severidade do processo químico é utilizando é a hidrólise enzimática. Uma vez que xilanases e esterases apresentam diferentes especificidades de substratos, estas enzimas se tornam importantes ferramentas analíticas na compreensão das formações estruturais (ex.: frequência, posição) das substituições na hemicelulose, bem como para a remoção específica de monossacarídeos e dados sobre as ligações na parede celular. No entanto, as tecnologias conhecidas apresentam altos custos consideráveis se aplicados em escala comercial (FAULDS *et al*, 1999).

A busca pela diminuição da estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos e a liberação dos polissacarídeos fermentáveis são as maiores preocupações para desenvolver uma rota tecnologicamente viável para obtenção de etanol lignocelulósico e para a produção de químicos em processos desenvolvidos em biorrefinaria (EERE, 2006; ZHANG, 2008).

A etapa de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos é controlada por inúmeros fatores, tais como o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose, a umidade do lignocelulósico, a área superficial acessível ou porosidade do material (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000; LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

No entanto, as principais causas da resistência dos materiais lignocelulósicos à hidrólise enzimática são a baixa acessibilidade às fibras celulósicas (micro)-cristalinas, as quais restringem ao acesso das celulasas, e a presença de hemicelulose e principalmente de lignina na superfície da celulose, impedindo a ação das celulasas ao substrato (KIM; HOLTZAPPLE, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; ZHANG, 2008).

Deve-se considerar que não há somente um tipo de pré-tratamento específico para um determinado material lignocelulósico, visto que, a quantidade de hemicelulose e lignina pode variar de acordo com o tipo da planta a partir da qual a biomassa é retirada, idade da colheita, etc (CLAASSEN et al., 1999).

Diante do exposto, conclui-se, que um tratamento prévio destes materiais é necessário para que as barreiras físicas (diminuição da cristalinidade da celulose e a associação com a lignina) impostas à celulasas possam ser rompidas possibilitando assim uma alta eficiência do rendimento de conversão da celulose em glicose (MOSIER et al., 2005; WYMAN et al., 2005; HIMMEL et al., 2007).

Além da eficiência enzimática, a etapa de pré-tratamento pode influenciar fortemente o custo do processo por determinar a toxicidade que serão expostas as enzimas fermentativas, a taxa de hidrólise enzimática, a quantidade de enzima utilizada, o poder dos reagentes, a concentração e a purificação dos produtos obtidos, a demanda no tratamento de resíduos, etc. Logo, para esta etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica se tornar economicamente viável necessita-se de um baixo custo de produção, ou seja, evitando-se um elevado consumo de reagentes químicos, alta demanda energética e intensa degradação dos materiais lignocelulósicos (WYMAN et al., 2005).

Dentre as técnicas de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos mais estudados e promissores, podemos citar a o hidrotérmico, AFEX e a utilização de ácido diluído (MOSIER et al., 2005; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). A tabela 2 mostra o efeito dos principais pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos.

Tabela 3. Efeito dos principais pré-tratamentos nos materiais lignocelulósicos.

Pré-tratamento	Características composicionais			Vantagens	Desvantagens	
	Celulose	Hemicelulose	Lignina			
Físico	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Redução de cristalinidade	Alto consumo de energia
	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Condições médias, altas produção de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso
	Hidróxido de sódio	Inchação significativa	Considerável solubilidade	Considerável solubilização, >50%	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro, recuperação alcalina
Químico	ARP	Menor que 5% de despolimerização	~50% de solubilidade	~70% de solubilização	Efetiva deslignificação	Recuperação alcalina, relativamente caro
	Hidróxido de cálcio	Pouca despolimerização	Significativa solubilização	Solubilização parcial (~40%)	Efetiva remoção de lignina e acetil, baixo custo	Menor efetividade devido a pouca solubilidade da cal
	Ozonólise	Não foi observada despolimerização	Pequena solubilização	Solubilização acima de 70%	Efetiva deslignificação em condições suaves	Caro, necessidade de mais ozônio
	Organosolv	Considerável inchação	Significativo, quase completa	Significativo, pode ser quase completa	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação de solvente cara
	Biológico	Biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	~40% de deslignificação	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação

Fonte: SANTOS, 2012.

2.6. Pré-tratamento Hidrotérmico

Vários estudos visando à conversão da biomassa lignocelulósica foram desenvolvidos nos últimos anos utilizando água quente sob alta pressão como solvente em processos de pré-tratamento (YU; LOU; WU, 2008).

O processo de pré-tratamento hidrotérmico é visto como um dos métodos mais promissores no tratamento da biomassa lignocelulósica. Este processo consiste em utilizar água sob alta pressão e temperatura, normalmente a temperatura varia de 180 °C a 240 °C, levando ao aumento da força iônica (ROGALINSKI; INGRAM; BRUNNER; 2008). Uma vez submetida à alta pressão, a água acaba penetrando e hidratando a estrutura celular da matéria lignocelulósica que acaba por remover a hemicelulose presente. A temperatura age como um modificador do pH reacional visto que, o pH da água pura à 25 °C é considerado neutro (7,0) e à 200°C é ligeiramente ácido(5,0) (ALLEN et al., 2001).

Além disso, o processo hidrotérmico é considerado um processo autocatalítico uma vez que a água sob alta pressão e temperatura cliva as ligações glicosídicas dos polissacarídeos, normalmente as hemiceluloses e o ácido acético formado a partir da desacetilação parcial da fração hemicelulósica irá atuar como catalisador da reação da hidrólise da matéria lignocelulósica promovendo a despolimerização da hemicelulose (ALLEN et al., 2001).

O emprego de altas temperaturas (180 a 220 °C) em curtos intervalos de tempo, além de dissolver a camada hemicelulósica pode, dependendo do nível de condensação do vapor, extrair diferentes parcelas de lignina com água. Logo, observamos uma diminuição do grau de polimerização da celulose ao longo do tempo e com o aumento da temperatura do processo hidrocatalítico (BOBLETER, 1994).

O processo hidrotérmico apresenta várias vantagens em relações aos processos que utilizam ácido diluído. Uma vez que não utilizam ácidos em seu processo, não há necessidade de se trabalhar com reatores resistentes à corrosão ácida, reduzindo drasticamente o custo desta tecnologia (LIU; WYMAN, 2003).

Estudos demonstram a completa dissolução da xilana e uma recuperação maior que 90% de pentosanas pelo pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de fluxo contínuo (ALLEN et al, 1996). Em trabalhos realizados por Petersen *et al.* (2009) foram verificadas as condições ótimas do pré-tratamento hidrotérmico palha de trigo para a conversão em etanol lignocelulósico. Esse trabalho demonstrou que as melhores condições foram manter a temperatura de 195 °C em um curto intervalo de tempo entre 6 a 12 min, sendo assim obtida uma eficiência do pré-tratamento de aproximadamente 70% de hemicelulose e 94% de celulose, dos quais 89% desta celulose puderam ser convertidas em etanol.

O pré-tratamento hidrotérmico tem se mostrado altamente eficiente para produzir fibras mais susceptíveis à hidrólise, recuperar a maior fração de pentosanas e gerar hidrolisados que resultem em baixa ou nenhuma inibição da

fermentação de glicose (LASER et al., 2002; NEGRO, et al., 2003; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

2.7 Considerações Finais

A tecnologia para produção de etanol 2G, embora promissora, apresenta grandes barreiras tecnológicas. A disponibilidade da celulose é considerada uma etapa crítica do processo, pois influencia na eficiência de toda a cadeia produtiva. Assim, se faz necessário, sua compreensão para o desenvolvimento de uma rota tecnologicamente viável para produção de etanol em larga escala. Em face de toda complexidade existente, o pré-tratamento hidrotérmico se mostra como uma alternativa auspiciosa no desenvolvimento desta solução.

3. Materiais e Métodos

3.1. Matérias-primas lignocelulósicas utilizadas para análise compositiva

No presente trabalho, foram submetidos ao pré-tratamento e analisados os seguintes materiais lignocelulósicos: palha da cana-de-açúcar, bagaço da cana-de-açúcar e uma mistura de ambos na proporção de 1:1.

As amostras de matérias-primas (palha e bagaço da cana-de-açúcar) foram gentilmente cedidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira, São Paulo e pela empresa Dedini S. A. Indústrias de Base, São Paulo, Brasil. Inicialmente, as amostras de palha e bagaço de cana-de-açúcar foram moídas em moinho de facas WILEY MILL, passadas em peneira com abertura de 1,41 mm e armazenadas para posterior utilização.

3.2. Caracterização química da biomassa *in natura* e pré-tratada

A caracterização química do material *in natura* e das frações líquida e sólida insolúvel, obtidas após o pré-tratamento, foi determinada de acordo com a metodologia descrita pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) que encontra-se em anexo.

De acordo com o protocolo, foram realizadas as seguintes análises para a determinação da composição da biomassa: (1) determinação de cinzas; (2) extrativos; (3) determinação de carboidratos estruturais (celobiose, glicose, xilose, galactose, arabinose e manose); (4) determinação de lignina total, lignina solúvel e insolúvel em ácido.

A seguir são detalhadas as metodologias.

3.2.1. Determinação de sólidos totais ou umidade

Uma quantidade conhecida de material lignocelulósico ($M_2=2,0g$) foi colocada em pesa filtro previamente tarado. Este material foi levado para a estufa a $105^\circ C$ *overnight* para eliminação do teor de umidade. O material foi resfriado em dessecador e posteriormente pesado em balança analítica. Em seguida, a massa de matéria seca foi calculada em relação à massa original, de acordo com o desenvolvimento abaixo:

- Cálculo do peso de matéria seca:

$$AI = M_1 + M_2 \quad \text{Equação 2}$$

$$Umidade(U) = AI - M_3 \quad \text{Equação 3}$$

$$\%Umidade = \frac{U}{M_2} \times \quad \text{Equação 4}$$

Onde, M_1 = massa do pesa-filtro (pós-estufa) (g)

M_2 = massa da biomassa (g)

AI = amostra integral

M_3 = massa do pesa-filtro + amostra seca (g)

U= umidade

3.2.2. Determinação de cinzas totais

Uma massa de 0,5g (C_2) da amostra seca foi acondicionada em cadinhos de porcelana, previamente tarados (C_1), sendo então calcinada em mufla a $575^\circ C$ *overnight*. O teor de cinzas foi obtido pela diferença de massa entre o cadinho com cinzas (C_3) e o cadinho vazio tarado, que foi expressa em relação à quantidade de amostra inicial.

- Cálculos para cinzas:

#

$$\% \text{Cinzas} = \frac{C3 - C1}{C2} \times 100$$

Equação 5

Onde, C1: massa do cadinho (g)

C2: massa da biomassa seca (g)

C3: massa do cadinho + cinza (g)

3.2.3. Determinação dos extrativos na biomassa

Nesta etapa, os cartuchos de celulose para extração, foram mantidos em estufa a 105°C *overnight* e pesados (E1). Logo após, adicionou-se aproximadamente 4,0 g da amostra, descontando o teor de umidade (E2), ao cartucho de extração.

O cálculo da massa da amostra somando-se a umidade é feito através do cálculo proporcional esquematizado abaixo. No qual a massa de 4,0g representa 100% de umidade. Dado a umidade calculada anteriormente, conseguimos encontrar a massa de água presente na amostra. Assim a massa da amostra representa a massa seca somada da umidade.

- Cálculo da massa da amostra somando a umidade (E2):

$$\frac{4,0g}{x} = \frac{100\%}{(\text{umidade})}$$

#

$$E2 = 4,0g + x$$

Equação 6

Onde, E2: massa da amostra

Uma vez concluída a montagem do extrator, o cartucho preenchido com biomassa foi introduzido no tubo de extração em um extrator de sistema Soxhlet. (Figura 14).



Figura 14. Sistema Soxhlet.

Adicionou-se 190,0 mL de solvente (água) em cada balão do extrator juntamente com pérolas de vidro. Os balões foram colocados no extrator e o aquecimento ajustado para fornecer no mínimo 4 a 5 sifonações por hora. A extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho de extração se tornasse incolor. Posteriormente, o mesmo procedimento de extração foi realizado utilizando etanol como solvente. Cabe ressaltar que o tempo de extração foi de aproximadamente 8 horas para cada solvente. Ao término da extração, os cartuchos foram levados à estufa à 105° C *overnight*, resfriados em dessecador e pesados (E4).

O cálculo da massa da amostra descontando-se a umidade é feito pelo cálculo proporcional esquematizado abaixo. No qual a massa da amostra (E2) representa 100% de umidade. Dado a umidade calculada anteriormente, conseguimos encontrar a massa de água presente na amostra. Assim a massa da amostra descontando-se a umidade (E3) representa a massa da amostra (E2)

descontando-se a umidade. O cálculo da massa do bagaço livre de extrativos (E5) é calculado pela Massa da amostra seca (E3) - Massa do cartucho pós-estufa (E4).

- Cálculo de E3 - Descontando-se a umidade de E2 (para calculo da % de extrativos)

$$\frac{E2}{X} - \frac{100\%}{(Umidade)}$$

$$E5 = E3 - E4$$

Equação 6

$$\% \text{ Extrativos} = \frac{E5 - E3}{E3} \times 100$$

Equação 7

Onde, E1: Massa do cartucho pós-estufa (g)

E2: Massa da amostra seca (g)

E3: E1 + E2 (g)

E4: Massa do cartucho + massa da biomassa livre de extrativos (g)

E5: Massa do bagaço livre de extrativos (g)

3.2.4. Hidrólise ácida

Inicialmente, os cadinhos tipo *Gooch* foram levados à mufla por aproximadamente 4h e colocados no dessecador para esfriar por 1h (M1). Posteriormente, 300mg (M2) das amostras de material lignocelulósico foram pesadas e inseridas em tubos de tampa rosqueada preenchidos parcialmente, doravante mencionados como tubos de hidrólise. Procedeu-se ao tratamento com 3 mL de H₂SO₄ 72%(m/m), homogeneizando a cada cinco minutos com bastão de teflon, em banho termostaticado à 30 °C por 1 hora. Em seguida adicionou-se 84 mL de água grau reagente, nesta etapa a concentração do H₂SO₄ em solução passa a ser de 4%. Para uma hidrólise completa dos oligômeros restantes, o tubo de hidrólise foi fechado e autoclavado a 121°C, por uma hora.

Após a descompressão da autoclave, o tubo de hidrólise foi retirado da mesma e resfriado à temperatura ambiente, sendo a mistura reacional filtrada sob vácuo em kitassato de 250mL nos cadinhos previamente tarados. Visando análises futuras, o filtrado obtido foi separado e reservado. O material sólido obtido (lignina) foi lavado com água destilada até se obter um valor de pH neutro e levado à estufa à 105°C *overnight*.

O mesmo procedimento supracitado foi utilizado para determinar a recuperação de açúcar durante o procedimento de hidrólise com ácido diluído. Colocando-se 10 mL da solução padrão no tubo de hidrólise e adicionando 348 µL de H₂SO₄ 72% (m/m) de forma a se obter uma concentração final do H₂SO₄ igual à 4%.

3.2.5. Determinação dos carboidratos e inibidores por CLAE

Os carboidratos foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo LaChrom Elite equipado com um detector de índice de refração Hitachi L-2490 utilizando uma coluna Biorad HPX-87P condicionada em um forno à 80°C. A pré-coluna utilizada foi Carbo-P, 4,6mm ID x 4 cm (resina plúmbea).

As concentrações e padrões utilizados na análise eram previamente preparados pelo técnico do laboratório e utilizados no experimento. Neste procedimento, a fase móvel utilizada foi a água com uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹. O furfural, o ácido acético e o hidroximetilfurfural presentes na fração líquida após o pré-tratamento foram analisados pelo mesmo sistema de CLAE usando agora uma coluna Biorad Aminex HPX-87H e detector de índice de refração. Sendo a fase móvel constituída de ácido sulfúrico 0,005M a uma vazão de 0,6 mL. min⁻¹ e uma temperatura de 80°C.

O material foi neutralizado adicionando-se lentamente CaCO₃ até atingir pH 5 – 6 (testado com papel de pH). O pH não deve ultrapassar 9,0. Posteriormente foram centrifugados a 1000 x g por 10 minutos uma alíquota (aproximadamente 5mL) e o sobrenadante filtrado com filtro de 0,22µm.

- Percentual de recuperação de açúcar

$$\% Raçucar = \frac{conc.quantificadaporCLAE(mg / mL)}{conc.teóricadopadrãoporCLAE(mg / mL)} \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

- Concentração de açúcar corrigida

$$C_{corrigida} \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{conc.quantificada\ por\ CLAE\ x\ fator\ de\ diluição}{Raçucar} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

$$Canidro = C_{corrigido} \times fator\ de\ correção\ anidro \quad \text{Equação 10}$$

Fator de correção anidro: para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares. Esse fator refere-se à inserção de água na estrutura após a hidrólise ácida.

Para glicose, galactose e manose = 0,90

Para xilose e arabinose = 0,88

Para celobiose = 0,95

$$\%açúcar = \frac{Canidro \times V_{filtrado}}{Massa\ Seca} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

Onde, V filtrado = 86,73mL

3.2.6. Determinação de lignina insolúvel em meio ácido

O material insolúvel proveniente da etapa de hidrólise ácida para caracterização química foi lavado com água destilada, para remoção da acidez residual e sua estabilização em pH em torno de 7. Em seguida, seco em estufa à temperatura de 105 °C até massa constante (M3). A porcentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada em relação à massa de material lignocelulósico seco descontando-se a massa de cinzas presente na lignina, segundo a equação (17)

$$\%LigninaInsolúvel = \frac{|(M3 - M1) - (M4 - M1)|}{MassaSeca} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

Onde, M1: Peso do cadinho pós mufla (g)

M2: Massa inicial (g)

M3: Peso do cadinho + amostra pós estufa (g)

M4: Peso cadinho + amostra pós mufla (g)

$$MassaSeca = M2 - x \quad \text{Equação 13}$$

3.2.7. Determinação de lignina solúvel e total

A quantidade de lignina solúvel presente foi determinada pela equação (21) descrita abaixo. A medida de absorvância foi realizada em um espectrofotômetro UV-visível na faixa 240 nm e a diluição da amostra foi de (1:5) para uma leitura entre 0,7-1,0.

$$\%LigninaSolúvel = \frac{UV_{ABS} \times V_{filtrado}}{25 \times MassaSeca} \times 100 \quad \text{Equação 14}$$

$$\% LigninaTotal = \% LigninaInsoluvel + \% LigninaSoluvel$$

Equação 15

3.3. Ensaios de pré-tratamento

Os resíduos lignocelulósicos (bagaço e a palha de cana-de-açúcar) foram submetidos ao tratamento hidrotérmico em um reator PARR / 4848 (Figura 15) de 1L com temperatura e pressão controladas. Três ensaios distintos foram realizados: utilizando bagaço *in natura*, palha *in natura* e uma mistura de bagaço e palha na proporção 1:1. Os ensaios de pré-tratamento foram conduzidos a 195°C por 10 minutos, usando 30g de biomassa seca e 300 mL de água destilada (proporção sólido líquido 1:10) (SILVA et al, 2010).



Figura 15. Reator PARR/4848 utilizado.

O material pré-tratado foi filtrado (Figura 16) e lavado com água para e remover os açúcares solubilizados e a acidez residual. As frações obtidas foram estocadas para análises posteriores.



Figura 16. Filtração após pré-tratamento.

O diagrama de blocos utilizado para a caracterização química dos materiais avaliados está representado na Figura 17.

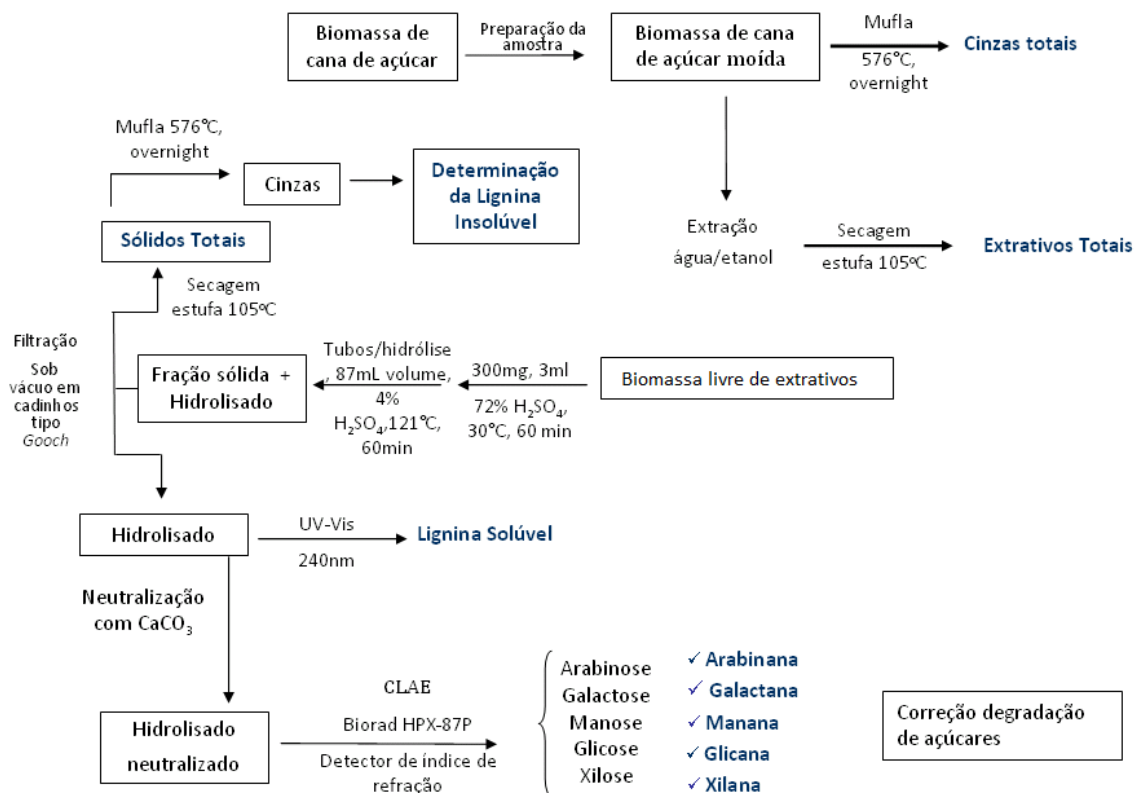


Figura 17. Diagrama de blocos das etapas de caracterização química dos materiais investigados.

4. Resultados e Discussões

A composição química do bagaço, da palha e da mistura antes e após pré-tratamento hidrotérmico é mostrada na Tabela 1. O bagaço de cana-de-açúcar apresentou maior teor de celulose (40,0%) quando comparado com a palha (29,4%). Resultados semelhantes foram observados por Ferreira-Leitão (2010), que obteve 41,1% de celulose para o bagaço e 33,3% de celulose para a palha. No entanto, é importante ressaltar que a palha apresentou maior teor de hemicelulose quando comparado com bagaço de cana-de-açúcar (Tabela 3).

Tabela 4. Composição química do bagaço da cana-de-açúcar, palha e da mistura de ambos antes e após o pré-tratamento.

Componentes (%)	Material <i>in natura</i>		Material Pré-tratado		
	Bagaço	Palha	Bagaço	Palha	Mistura Bagaço/Palha
Celulose	40.0 ± 3.50	29.4 ± 8.20	49.0 ± 3.28	36.3 ± 3.44	49.4 ± 3.16
Hemicelulose	21.8 ± 4.43	31.4 ± 2.88	4.4 ± 0.42	2.6 ± 0.50	4.4 ± 0.42
Lignina	26.5 ± 1.45	26.0 ± 0.60	32.0 ± 0.53	30.8 ± 2.89	33.3 ± 2.95
Cinzas	1.4 ± 0.04	4.8 ± 0.10	2.6 ± 0.50	6.3 ± 0.01	4.6 ± 0.60
Extrativos*	7.4 ± 0.71	**12.6 ± 0.09	9.9 ± 5.8	19.0 ± 4.81	8.2 ± 0.3
Total	97.1 ± 8.30	104.2 ± 6.97	97.9 ± 3.41	94.9 ± 6.81	100.2 ± 6.03

*O conteúdo de extrativos para o material pré-tratado foi calculado com base no rendimento de massa obtido após o pré-tratamento.

** O conteúdo de extrativos para a palha *in natura* foi determinado antes e após lavagem do material, sendo que o conteúdo de extrativos obtido para a palha não-lavada foi de 17,45%. Este valor foi considerado para o cálculo do teor de extrativos da palha pré-tratada, uma vez que foi utilizado o material não-lavado na etapa de pré-tratamento.

As análises das frações líquidas e sólido-insolúveis após o pré-tratamento hidrotérmico demonstraram que a quantidade de hemicelulose solubilizada foi de 83,7% e 93,3% para o bagaço e palha, respectivamente. No que diz respeito a mistura bagaço/palha, a solubilização de hemicelulose foi de 88,5%. Silva *et al* (2010) obtiveram 88,7% de solubilização da hemicelulose após o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço.

O pré-tratamento hidrotérmico promoveu a solubilização de hemicelulose, conforme esperado. Açúcares oligoméricos foram predominantes (52,1%, 78,4% e 70,0% para o bagaço, palha e mistura bagaço/palha, respectivamente após o pré-tratamento). A figura 18 mostra o bagaço e a palha antes e após o pré-tratamento hidrotérmico.

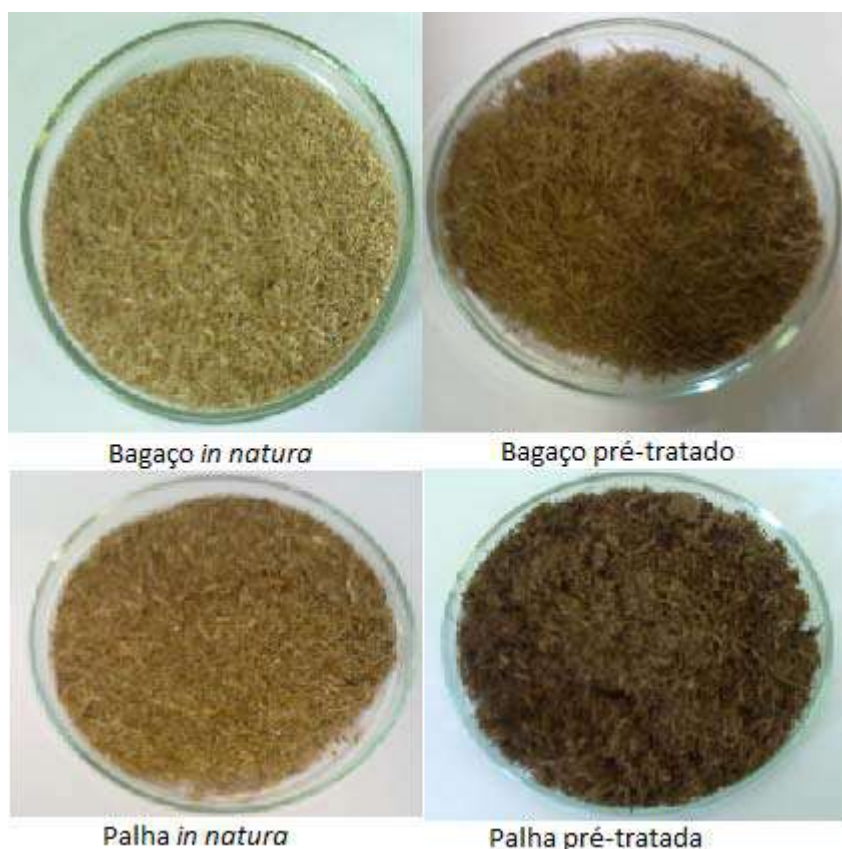


Figura 18. Bagaço e a palha de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento hidrotérmico (Silva et al,2010 e Moutta et al, 2012).

O pré-tratamento hidrotérmico também foi capaz de remover quantidades baixas de lignina a partir do bagaço pré-tratado (1,3%), palha pré-tratada (5,6%) e mistura pré-tratada (11,9%). De acordo com Agbor *et al* (2011), a baixa remoção de lignina pode dificultar o acesso das enzimas celulolíticas à celulose, pelas razões que se seguem: i) adsorção não específica de enzimas hidrolíticas pela lignina; ii) ligação não produtiva de enzimas celulolíticas com complexos lignina-carboidratos, e iii) liberação de compostos derivados da lignina, que têm toxicidade sobre os micro-organismos em processos de fermentação alcoólica. Por outro lado, a preservação de lignina apresenta também efeito positivo, uma vez que após a hidrólise enzimática o resíduo sólido pode ser usado para cogeração de energia.

Pode-se concluir que não houve remoção significativa de celulose após o pré-tratamento, o que é positivo para a recuperação de glicose após a hidrólise enzimática.

O pré-tratamento hidrotérmico também promoveu a degradação de açúcares em hidroximetilfurfural, furfural e ácido acético provenientes da hemicelulose. A fração líquida obtida após o pré-tratamento foi caracterizada quanto a presença destes compostos inibidores (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração de inibidores (g L^{-1}) formados durante o pré-tratamento hidrotérmico.

Inibidores	Concentração de inibidores g L^{-1}		
	Bagaço	Palha	Mistura Bagaço/Palha
Furfural	0,59 \pm 0,10	0,81 \pm 0,15	0,67 \pm 0,17
Hidroximetilfurfural	0,03 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01	0,17 \pm 0,02
Ácido Acético	2,03 \pm 0,40	1,93 \pm 0,10	1,88 \pm 0,13

Durante o pré-tratamento, o principal produto de degradação formado foi o ácido acético, que apresentou as seguintes concentrações: 2,03 g.L^{-1} , 1,93 g.L^{-1} , e

1,88 g.L⁻¹ para o bagaço, palha e mistura bagaço/palha, respectivamente. A liberação do ácido acético pode ter contribuído para a redução do pH, uma vez que o pH observado na fração líquida após o pré-tratamento foi aproximadamente 4,6. Moutta *et al.* (2012) obtiveram 3,19 g.L⁻¹ de ácido acético na fração líquida, obtida após pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído da palha da cana-de-açúcar.

A concentração dos produtos de degradação de carboidratos, como furfural e hidroximetilfurfural (HMF) obtidos neste trabalho, foi comparável aos dados apresentados no estudo desenvolvido por Moutta *et al.* (2012). Bagaço e mistura bagaço/palha apresentaram concentrações mais baixas de inibidores quando comparados com a palha, provavelmente, devido à maior susceptibilidade da palha ao tratamento.

Verificou-se também a produção de ácido acético, possivelmente, devido a decomposição da xilana que apresenta grupos acetil. De acordo com Felipe *et al.* (1995), concentrações de ácido acético em torno de 1 g L⁻¹ melhoraram a bioconversão de xilose em xilitol. No entanto, concentrações acima de 3 g.L⁻¹ causaram inibição ao processo fermentativo. Segundo dados da literatura, concentrações de furfural abaixo de 0,5 g.L⁻¹ não interferem no crescimento de células de *Pichia stipitis*, que fermentam açúcares C5 em etanol, enquanto que a concentração de HMF de 0,5 g. L⁻¹ foi capaz de inibir 43% do crescimento das células de *P. stipitis* (MANCILHA *et.al.*,1991). Assim, a faixa de concentração de inibidores obtida neste trabalho (Tabela 2) sugere que a fração líquida obtida, rica em pentoses, pode ser aplicada em processos de fermentação.

5. Conclusões

- Os resultados obtidos da caracterização química da biomassa antes e após o pré-tratamento hidrotérmico permitiu avaliar a solubilização de hemicelulose presente no bagaço de cana, na palha e na mistura bagaço/palha, respectivamente.

- A quantidade de hemicelulose solubilizada após o pré-tratamento foi de 83,7%, 93,3% e 88,5% para o bagaço de cana, palha e mistura bagaço/palha, respectivamente. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a palha foi mais susceptível ao pré-tratamento hidrotérmico.

- A porcentagem de lignina para o bagaço pré-tratado (1,3%), palha pré-tratada (5,6%) e mistura pré-tratada (11,9%) presente na fração líquida após o pré-tratamento pouco foi alterada.

- A quantidade de celulose, a matéria-prima principal do processo fermentativo, não apresentou alterações significativas no pré-tratamento hidrotérmico.

- Embora os dados obtidos da concentração dos subprodutos do pré-tratamento como furfural e ácido acético não sejam altos, sua produção deve ser controlada para evitar que atinjam níveis de inativação biológica dos microorganismos fermentadores. Os valores encontrados para a concentração dos inibidores (furfural, HMF e ácido acético) após o pré-tratamento foram compatíveis com os dados obtidos na literatura.

6. Referências Bibliográficas

- AGBOR, V.B.; NAZIM, C.; SPARLING, R.; BERLIM, A.; LEVIN, D.B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application, *Biotechnology Advances*, vol. 29, pp. 675–685.
- ALLEN, S.G.; KAM, L.C.; ZEMANN, A.J.; ANTAL, M.J. (1996). Fractionation of sugar cane with hot compressed liquid water. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.35, p.2709-2715.
- ALLEN, S.G.; SCHULMAN, D.; LICHWA, J.; ANTAL, JR.; LASER, M.; LYND, R. (2001). A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.40, p.2934-2941.
- ANP (2013). <http://www.anp.gov.br/?id=582#b>. Acessado em 24/11/2013.
- BASTOS, V.D. (2007). Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n.25, p. 5-38.
- BBC (2014) - British Broadcasting Corporation. Acessado em 18/04/2014. Disponível em: http://www.bbc.co.uk/portuguese/especial/1930_oilg/page5.shtml
- BERTELLI, L. G. (2012). A verdadeira historia do PROÁLCOOL. *JORNAL CANA*. NOV. 2005. Disponível em: <http://www.jornalcana.com.br/pdf/143/%5Cmerccot.pdf>. Acesso: 14 de setembro de 2012.
- BERTONCINI, E. I. (2008). In: Workshop: Aspectos Ambientais Da Cadeia Do Etanol De Cana-De-Açúcar. Painel IV: Geração de Resíduos da Indústria da Cana-de-açúcar, 2008. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana>. Acesso em 01 de agosto de 2013.
- BIOETANOL de cana. (2013). Disponível em: <http://www.bioetanoldecana.org>. Acesso em 24 de Novembro de 2013.
- BIOETANOL de cana-de-açúcar (2008). Disponível em: http://www.cgee.org.br/arquivos/bioetanol_port.pdf?idProduto=4809
- BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. (1981). Biodegradation of cellulosic materials: substrats, microrganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 3, p. 90 – 103.
- BOBLETER, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog. Polymer Science*, v. 19, p.797-841.
- Brasil (1998). Decreto nº 2.661, de 8 de julho de 1998. Regulamenta o parágrafo único do art. 27 da Lei nº 4.771, de 15 de setembro de 1965 (código florestal),

mediante o estabelecimento de normas de precaução relativas ao emprego do fogo em práticas agropastoris e florestais, e dá outras providências.

BUCKERIDGE, M.S., SILVA, G.B. & CAVALARI, A. A. (2008). Parede Celular. In: Kerbauy, G.B. (ed). 2ed. Fisiologia Vegetal, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. Pg. 165-181.

BUDZIAK C, R.; MAIA C. (2004) - Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. Quím. Nova vol.27 no.3 São Paulo.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P.(2007). Structure, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. Brazilian Journal Plant Physiology, v.19, p. 1–13.

CHANG, V.S.; HOLTZAPPLE, M.T. (2000). Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. Applied Biochemistry Biotechnology, p.5–37.

CLAASSEN, P. A. M.; VAN LIER, J. B.; LÓPEZ CONTRERAS, A. M.; VAN NIEL, E. W. J.; SIJTSMA, L.; STAMS, A. J. M.; DE VRIES, S. S.; WEUSTHUIS, R. A. (1999). Utilization of biomass for the supply of energy carriers. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 52, p. 741–755.

COGEN (2009). Portal COGEN - Associação da Indústria de Cogeração de Energia acessado em 17/12/2009 - <http://www.cogen.com.br>

CONAB (2013). <http://sna.agr.br/tag/conab/>. Acessado em 24/11/2013

DEMIRBAS, A. (2007). Progress and recent trends in biofuels. Progress in Energy and Combustion Science, v.33, p.1–18.

DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; JEFFRIES, T. W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. Applied Microbiology and Biotechnology, v.63, p.258–266.

DONINI Í.A.N.; SALV, D.T.B.; FUKUMOTO F. K. (2010). Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. Eclet. Quím. vol.35 no.4

Enciclopédia Agrícola Brasileira/ESALQ (1995), São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.

FAULDS, C. B.; KROON, PAUL A. BARTOLOMÉ B.; WILLIAMSON G. (1999). Hydrolysis of Hemicelluloses Using Combinations of Xylanases and Feruloyl Esterases. Methods in Biotechnology: Carbohydrate Biotechnology Protocols. HUMANA PRESS v. 10, p. 183-189.

- FELIPE M.G.A, VIEIRA M. V., VITOLO M., MANCILHA I. M., ROBERTO I. C., SILVA S. S. (1995). Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*, *Journal of Basic Microbiology*, v. 35, pp. 171–177.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. (1989). *Wood Chemistry, Ultra structure, Reactions*. Berlin: Walter de Gruyter, p.613.
- FERNANDO, S. (2006). Biorefineries: Current Status, Challenges and a Future Direction. *Energy & Fuels*, v. 20, 2006, p. 1727-1737.
- FERREIRA, LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F; FERRARA, M.A.; NEPOMUCENO, A.L.; MOLINARI, H.B.C.; BON, E.P.S. (2010). Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. *Waste Biomass Valor*, v. 1, p. 65-76.
- FERREIRA-LEITÃO, C. C. PERRONE, J. RODRIGUES, A. P. M. FRANKE, S. MACRELLI e G. ZACCHI (2010a). An approach to the utilisation of CO₂ as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and straw for ethanol production, *Biotechnology for Biofuels*, vol. 3, pp. 1-8, 2010.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. (2007). Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production; *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Series* Editor: T. Scheper; p. 41-67.
- GOLDSTEIN, I. S. (1981). *Organic chemicals from biomass*. Boca Raton: CRC press, p309.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. (2006). Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, v.24.
- HENDRIKS, A.T.W. M.; ZEEMAN, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v.100, p.10–18.
- HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D . (2007). Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science*, v.315, p.804-807.
- IMPrensa OFICIAL (2003). Decreto N° 47.700, de 11 de Março de 2003-Regulamenta a Lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002, que dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar e dá providências correlatas
- JEFFRIES, T. W. (2006). Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, v.17, p.1–7.
- KAMM.B & KAMM, M. (2004). Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol Biotechnology*.64, pages 137-145.

KAMM, B.; GRUBER, P.R.; KAMM, M. (2006). *Biorefineries – Industrial Processes and Products*. Wiley-VCH, ISBN: 3-527-31027-4, Weinheim, Germany.

KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. *Bioresource Technology*, v.97, p.583-591, 2006.

KONDO, T. (1997). *J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Physics*, 35, 717.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.*, v.13, n.2, p.151-172, 1993.

WOLFGANG G. GLASSER. (1989). *Lignin – Properties and Materials*", Ed., American Chemical Society, Washington,DC.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. v. 96, p.1959 – 1966, 2005.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL JR., M. J.; LYND, L. R. A. (2002). Comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*, v.81, p.33-44.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p.1081–1099.

LEMOS, J.L.S (2001). Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana, Tese de Doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (2001). *Biotechnologia Industrial*. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, vol.3.

LIU, C.; WYMAN, C. E. (2003). The effect of flow rate of compressed hot water on xylan, lignin and total mass removal from corn stover. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.42, p.5409–5416.

MANCILHA, I.M.; ROBERTO, I.C.; LACIS, L.S.; BARBOSA, M.F. (1991). Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. *Process Biochemistry*. Pages 15–21.

MORAES, M. A. F. D. (1999). *A Desregulamentação do Setor Sucroalcooleiro Brasileiro*. 1999. 291 f. Tese de Doutorado em Ciências, Economia Aplicada – Esalq, Piracicaba, São Paulo.

MORRISON, R. T.; BOYD R. N. (1983). *Química Orgânica* 8. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.

- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; LADISCH, M. (2005). Features of promising technologies for treatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96. p. 673-686.
- MOUTTA, R. O. ; CHANDEL, A. K.; RODRIGUES, R. C. L. B.; SILVA, M. B.; ROCHA, G. J. M.; SILVA, S. S. (2012). Statistical Optimization of Sugarcane Leaves Hydrolysis into Simple Sugars by Dilute Sulfuric Acid Catalyzed Process, *Sugar Tech*, vol. 14, pp. 53-60.
- MOUTTA, R. O.; SILVA, M. C.; CORRALES, R. C. N. R.; CERULLO, M. A. S.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; DA SILVA BON, E. P. 2013. Comparative Response and Structural Characterization of Sugarcane Bagasse, Straw and Bagasse-Straw 1:1 Mixtures Subjected To Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Conversion. *J. Microbial Biochem Technol*, S12:1-8.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technol.* 93, 1-10.
- NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I.; OLIVA, J. M.; CABAÑAS, A.; BALLESTEROS, M. (2003). Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.105, p.87-100.
- NETAFIM (2013). Cana-de-açúcar. Disponível em <http://ethanolcrop.com/> Acesso: 28/11/2013
- OLIVEIRA, F. M. V. (2007). Estudo de diferentes condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar no processo de obtenção de bioetanol. 2007. 49p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade de Pernambuco, Recife.
- PAN, X.J., ARATO, C., GILKES, N., GREGG, D., MABEE, W., PYE, K., XIAO, Z.Z., ZHANG, X., SADDLER, J. (2005). Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnol. Bioeng.* v. 90. p. 473–481.
- PEREIRA, R.E. (2006). Avaliação do potencial nacional de geração de resíduos agrícolas para produção de etanol. 116 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- PETERSEN, M.O.; LARSEN, J.; THOMSEN, M. H. (2009). Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. *Biomass and Bioenergy*, v.33, p.834-840.

PUPPAN, D. (2002). Environmental evaluation of biofuels. *Periodica Polytechnica Ser Soc Man Sci* v.10, p.95-116.

ROBERTO I. C.; L. S. LACIS; BARBOSA M. F. S.; MANCILHA, I. M. (1991) "Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol", *Process Biochem* v. 26, p. 15-21.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.; AZEVEDO, J. L. (1988). *Tratado de microbiologia*. São Paulo: editora Manoli Ltda. 186 p.

ROGALINSKI, T.; INGRAM, T.; BRUNNER, G. (2008). Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.47, p.54-63.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v.99, p.5270–5295.

SANTOS, M. H. C. (1993). *Política e Políticas de uma energia alternativa: o caso do Proálcool*, RJ ed. Notrya.

SANTOS, Fernando A.(2012). Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quím. Nova* . 2012, vol.35, n.5, pp. 1004-1010. ISSN 0100-4042.

SEABRA, J. E. A. (2008). *Análise de opções tecnológicas para uso integral da biomassa no setor de cana-de-açúcar e suas implicações*. 2008. 298p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SILVA, VINÍCIUS F. N.; ARRUDA, PRISCILA V.; FELIPE, MARIA G. A.; GONÇALVES, ADILSON R.; ROCHA, GEORGE J. M. (2010). Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 37, p. 1476-5535.

SILVA, G.B. (2005). *A importância da parede celular para a filogenia das Pteridofitas*. Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Instituto de Botânica de São Paulo.

SOUZA, R. R. (2006) *Panorama, oportunidades e desafios para o mercado mundial de álcool automotivo*. 2006. Dissertação (Mestrado Em Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos) – Escola de Química, UFRJ, RJ.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R, SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. *Determination of Ash in Biomass*. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1-5, 2008a.

SLUITER, A., RUIZ, R, SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. *Determination of Extractives in Biomass*. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1-9, 2008b.

SLUITER, A., HAMES, RUIZ, R, SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., CROCKER, D. Determination of Structural carbohydrates and lignin in Biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1-14, 2008c.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R, SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1-11, 2008d.

UNICA (2014). Portal Unica acessado em 17/03/2014 - <http://www.unica.com.br/>

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. (2008). Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot-Compressed Water and Its Comparisons with Other Hydrolysis Methods. *Energy & Fuels*, v.22, p. 46–60.

ZHANG, Y.H.P. (2008). Reviving the carbohydrate economy via multi-product biorefineries. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 367–375.

Anexos

Preparation of Samples for Compositional Analysis

Laboratory Analytical Procedure (LAP)

Issue Date: 8/06/2008

B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, A. Sluiter, J. Sluiter, and
D. Templeton

Technical Report

NREL/TP-510-42620

Revised August 2008

DISCLAIMER

These Standard Biomass Analytical Methods (“Methods”) are provided by the National Renewable Energy Laboratory (“NREL”), which is operated by the Midwest Research Institute (“MRI”) for the

Department Of Energy.

Access to and use of these Methods shall impose the following obligations on the user. The user is granted the right, without any fee or cost, to use, copy, modify, alter, enhance and distribute these Methods for any purpose whatsoever, except commercial sales, provided that this entire notice appears in all copies of the Methods. Further, the user agrees to credit NREL/MRI in any publications that result from the use of these Methods. The names NREL/MRI, however, may not be used in any advertising or publicity to endorse or promote any products or commercial entity unless specific written permission is obtained from NREL/MRI. The user also understands that NREL/MRI is not obligated to provide the user with any support, consulting, training or assistance of any kind with regard to the use of these Methods or to provide the user with any updates, revisions or new versions.

THESE METHODS ARE PROVIDED BY NREL/MRI "AS IS" AND ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, THE IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY AND FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE ARE DISCLAIMED. IN NO EVENT SHALL NREL/MRI BE LIABLE FOR ANY SPECIAL, INDIRECT OR CONSEQUENTIAL DAMAGES OR ANY DAMAGES WHATSOEVER, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO CLAIMS ASSOCIATED WITH THE LOSS OF DATA OR PROFITS, WHICH MAY RESULT FROM AN ACTION IN CONTRACT, NEGLIGENCE OR OTHER TORTIOUS CLAIM THAT ARISES OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE ACCESS, USE OR PERFORMANCE OF THESE METHODS.

Procedure Title: Preparation of Samples for Compositional Analysis

Laboratory Analytical Procedure

1. Introduction

- 1.1 This procedure describes a reproducible way to convert a variety of biomass samples into a uniform material suitable for compositional analysis. The National Renewable Energy Laboratory (NREL) LAPs for compositional analysis have been optimized using samples with a specific particle size range and moisture content. All NREL biomass compositional analysis procedures assume that the samples have been prepared to meet these specifications. Deviations from these parameters may invalidate assumptions made in those methods and thereby introduce errors in the analysis. Procedures are listed that are suitable for the preparation of biomass feedstocks and a variety of biomass-derived materials. Representative sampling of biomass samples is also addressed.
- 1.2 This procedure is substantially similar to ASTM Standard Practice E 1757 – 01. Parts of this procedure are similar to TAPPI method number T264 and NFTA method A 1.1.
- 1.3 This procedure describes methods for drying, size reduction, obtaining samples with a uniform particle size and representative sampling of biomass samples.

2. Scope

- 2.1 This method is appropriate for the preparation of most types of biomass and biomass-derived solids for compositional analysis.
- 2.2 This procedure is not intended for materials that will already pass through a 20-mesh sieve.
- 2.3 This procedure is not intended for materials that cannot be dried by the described methods to a total solids content of greater than 90% of the sample's oven dried weight.
- 2.4 All analyses shall be performed according to the guidelines established in an appropriate Quality Assurance Plan (QAP).

3. Terminology

- 3.1 *Ambient conditions*- a temperature of 20°C to 30°C (68°F to 85°F), less than 50% relative humidity.
- 3.2 *Prepared biomass*- biomass that has been prepared according to this practice.
- 3.3 *Oven dry weight (ODW)*- the weight of biomass mathematically corrected for the amount of moisture present in the sample at the time of weighing

4. Significance and Use

- 4.1 This procedure is used, in conjunction with other procedures, to determine the chemical composition of biomass samples.
- 4.2 This procedure describes drying, size reduction, and representative sampling

methods that must be performed prior to analysis for many other constituents.

5. Interferences

- 5.1 This procedure produces biomass samples with a particle size range. The NREL procedures for biomass compositional analysis have been optimized for samples with this particle size range. Deviation to a smaller particle size may result in a low bias in carbohydrate content (and consequent high lignin bias) due to excessive carbohydrate degradation. Deviation to a larger particle size may also result in a low bias in carbohydrate content (and consequent high lignin bias) due to incomplete hydrolysis of polymeric sugars to monomeric sugars.
- 5.2 This procedure produces samples with moisture contents below 10%. The NREL procedures for biomass compositional analysis have been optimized for samples with low moisture contents. Higher moisture content in biomass samples will alter the effective acid concentration in the concentrated acid hydrolysis steps. Lowering the acid concentration may result in a low bias in carbohydrate content due to incomplete hydrolysis of polymeric sugars to monomeric sugars. Incomplete hydrolysis leaves oligomeric sugars, which are not soluble in 4% acid and are incorrectly counted as acid insoluble residue in these procedures, introducing a consequent high lignin bias.
- 5.3 This procedure assumes that chemical fractionation does not occur during the optional sieving steps and that the chemical composition of any fines removed from the sample is substantially similar to the composition of the bulk sample. Sieving can be performed if the ash content according to LAP “Determination of Ash in Biomass” is high. Sieving may also be performed if homogeneous particle size is critical. **However, if the entire biomass sample needs to be analyzed, sieving can frequently cause fractionation and should not be performed.**

6. Apparatus

- 6.1 Large table or drying rack for air drying biomass (method A only).
- 6.2 Convection oven capable of maintaining $45 \pm 5^\circ\text{C}$ (method B only).
- 6.3 Freeze-Drier - System with vacuum chamber and pump capable of maintaining a pressure of <1 torr and a cold finger in the chamber capable of maintaining a temperature of -50°C (method C only).
- 6.4 Balance, sensitive to 0.1 g.
- 6.5 Standard laboratory knife mill with 2 mm screen. A Wiley Mill, size No. 4 with a 2-mm screen, is suitable for samples >20 g, and the intermediate model Wiley Mill, with 1-mm screen, is suitable for samples <20 g that will not be sieved. Equivalent knife mills are acceptable.
- 6.6 Sieve Shaker that provides motion in both horizontal and vertical axes- for optional sieving step
 - 6.6.1 Sieve Set, No. 20 (850 μm), No. 80 (180 μm) stackable sieves with lid and bottom pan. Sieves and bottom pan should be 8.9 cm (3 1/2 in.) in height. Sieves should conform to ASTM Specification E 11.
 - 6.6.2 Riffle Sampler with Pans — A manual sample divider that splits the milled biomass into two or more equivalent sub-samples. Riffle divisions should be between 6.4 mm and 12.7 mm (1/4 to 1/2 in.) with at least twenty-four riffle openings. The feed

chute and riffles should have a slope of at least 60°. Collection pans, one to pour the sample into the riffler, and two or more to collect the sub-samples.

7. Reagents and materials

7.1 Reagents

7.1.1 For lyophilization method only

7.1.1.1 Acetone, electronic grade.

7.1.1.2 Dry ice, ground.

7.2 Materials

7.2.1 Assorted trays and containers as appropriate for the selected drying method.

8. ES&H Considerations and Hazards

8.1 Milling and sieving actions both produce large amounts of dust. This dust can be a nuisance, hazard, or irritant. Use appropriate respiratory protection and eye protection as needed.

8.2 If excessive amounts of dust are allowed to become airborne, a potential explosion hazard is possible. Provide appropriate dust control measures as needed.

8.3 Follow all applicable NREL chemical handling procedures.

8.4 This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.

9. Sampling, Test Specimens and Test Units

9.1 This procedure describes sampling, and sample preparation required prior to analysis for ash, extractives, carbohydrates, lignin, and protein.

10. Procedure

Prepare the biomass sample using one of the three methods described below. Use either 10.1, 10.2, or 10.3.

10.1 **Method A - Air-drying.** This method is suitable for the preparation of large quantities (>20 g) of field-collected samples into a form appropriate for compositional analysis. This method is suitable for drying materials where ambient humidity allows the sample to air-dry to a moisture content below 10% as measured using LAP "Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples".

10.1.1 Biomass samples must first be available as pieces with overall dimensions less than 5 by 5 by 0.6 cm (2 by 2 by 1/4 in.). Stems or twigs should not exceed 0.6 cm (1/4 in.) diameter. It is recommended that wastepaper should be shredded into pieces less than 1 cm (3/8 in.) wide. Twigs, straw and wastepaper should not exceed 20 cm (8 in.) in length to facilitate milling.

10.1.2 The biomass material should be spread out on a suitable surface and allowed to air-dry prior to any milling. Do not pile the material deeper than 15 cm. Turn the material at least once per day to ensure even drying and inhibit microbial growth in samples.

10.1.3 Following NREL LAP “Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples” measure the solids content of the

biomass sample once every 24 hours.

- 10.1.4 The material is considered dried when the moisture content is less than 10% by weight and the change in weight is less than 1% in 24 h.

10.2 **Method B - Convection oven drying.** An alternative to air-drying is to dry the biomass sample in a convection oven at temperatures no greater than 45°C. This method may be used for very wet biomass samples that are at risk for microbial growth during drying, wet pretreated biomass, samples that would not be stable during prolonged exposure to ambient conditions, or for drying materials when ambient humidity does not allow the sample to air-dry to a moisture content below 10% as measured using LAP “Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples”. This drying method is suitable for small samples of biomass (<20 g).

Note: This method may cause some biomass samples to change, particularly pretreated biomass. This procedure should only be used when air-drying is impossible.

- 10.2.1 Select a container suitable for oven drying the biomass sample and dry this container at $45 \pm 3^\circ\text{C}$ for a minimum of 3 h.
- 10.2.2 Place the container in a desiccator and allow the container to cool to room temperature.
- 10.2.3 Weigh the container to the nearest 0.1 g and record this weight as W_t .
- 10.2.4 Place the biomass material into the dried container to a maximum depth of 1 cm.
- 10.2.5 Weigh the container and biomass to the nearest 0.1 g and record this weight as W_i .
- 10.2.6 Place the container and biomass in a drying oven maintaining the temperature at $45 \pm 3^\circ\text{C}$. Allow the material to dry for 24 to 48 h.
- 10.2.7 Remove the container and biomass from the drying oven, place in a desiccator and allow the sample to cool to room temperature.
- 10.2.8 Weigh the container and biomass to the nearest 0.1 g and record this weight as W_f .
- 10.2.9 Return the sample to the drying oven, maintaining the temperature at $45 \pm 3^\circ$. Keep the sample in the drying oven at $45 \pm 3^\circ\text{C}$ for minimum of 4 h .
- 10.2.10 Remove the container and biomass from the drying oven, place in a desiccator and allow the sample to cool to room temperature
- 10.2.11 Weigh each sample to the nearest 0.1 mg and record this weight.
- 10.2.12 Return the samples to the drying oven at 45°C for 1 h.
- 10.2.13 Remove the container and biomass from the drying oven, place in a desiccator and allow the sample to cool to room temperature.
- 10.2.14 Weigh each sample to the nearest 0.1 mg and record this weight.
- 10.2.15 Repeat steps 10.2.12 through 10.2.14 until the change in the mass of the biomass is less than 1% in one hour.
- 10.2.16 Use calculations in section 11 to determine the total solids obtained with this method.

10.3 **Method C - Lyophilization.** An acceptable alternative to air-drying (10.1) or drying in

a convection oven (10.2) is lyophilization (freeze-drying) of the sample. This method is suitable for very wet biomass that is at risk for microbial growth during drying, wet

pretreated biomass, samples that would not be stable during prolonged exposure to ambient conditions, or for drying materials when ambient humidity does not allow the sample to air-dry to a moisture content below 10% as measured using LAP “Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples”. This test method is also suitable for materials that are heat sensitive and would degrade if subjected to the drying oven in Test Method B. This drying method is suitable for small samples of biomass (<20 g).

- 10.3.1 Weigh a suitable freeze-drier container to the nearest 0.1 g and record this weight as W_t .
- 10.3.2 Place the biomass material in the container. For solid samples, do not fill the container more than half full. For liquid or slurry materials, limit the sample to the amount of material that gives a uniform coating of around 0.5 cm on the walls of the container when the sample is frozen.
- 10.3.3 Weigh the container and biomass to the nearest 0.1 g and record this weight as W_i .
- 10.3.4 Combine the dry ice and acetone in a shallow container suitable for shell freezing.
- 10.3.5 Place the freeze dry flask containing the biomass sample in the dry ice acetone mixture. Slowly turn the container (10 r/min) to freeze the material into a uniform layer on the walls of the container.
- 10.3.6 Immediately place the container on the freeze-drier and allow the material to dry until all visible traces of ice and frost are gone from the sample. This process typically takes 12 h for small (<20 g) samples, and can extend to more than 96 h for large samples (>250 g).
- 10.3.7 Remove the container and biomass from the freeze drier.
- 10.3.8 Allow the sample to warm to room temperature.
- 10.3.9 Weigh the container and biomass to the nearest 0.1 g and record this weight as W_f .
- 10.3.10 Use calculations in section 11 to determine the total solids obtained with this method.

Mill the dry sample, and sieve if desired.

10.4 Milling

- 10.4.1 Feed the air-dried biomass into the knife-mill, and mill until the entire sample passes through the 2 mm screen in the bottom of the mill, or a 1mm screen on small mills. Laboratory mills can generate enough heat to damage biomass samples. Monitor the mill closely and allow the mill to cool to room temperature between batches if necessary.
- 10.4.2 If the prepared sample is not analyzed immediately after sieving milling, the sample should be stored in an airtight container or sealable polyethylene bag and kept at -20°C until needed.

10.5 Optional sieving

Note: Sieving can be performed if the ash content according to LAP “Determination of Ash in Biomass” is high. Sieving may also be performed if

homogeneous particle size is critical. **However, if the entire biomass sample needs to be analyzed, sieving can frequently cause fractionation and should not be performed.**

- 10.5.1 Stack the sieves in the following order, starting at the bottom: solid catch pan, 80-mesh sieve, 20-mesh sieve.
- 10.5.2 Place the milled biomass in the 20-mesh sieve. The sample should be no more than 7 cm deep in the 20-mesh sieve. The milled sample may be processed in batches if necessary.
- 10.5.3 Place the cover on the sieve stack and secure the stack in the sieve shaker.
- 10.5.4 Shake the sieves for 15 ± 1 min.
- 10.5.5 The fraction retained on the 20-mesh sieve (+20 mesh fraction) should be reprocessed (steps 10.4.1) until no biomass remains on the 20-mesh sieve.
- 10.5.6 The fraction retained on the 80-mesh sieve (-20/+80 mesh fraction) should be retained for compositional analysis.
- 10.5.7 The material in the solid catch pan is the fines (-80mesh) fraction. Retain this material for ash analysis.
- 10.5.8 Combine all of the -20/+80 mesh batches. Weigh the combined -20/+80 mesh fraction to the nearest 0.1 g. Record the weight of the -20/+80 mesh fraction as $W_{t20/80}$.
- 10.5.9 Combine all of -80 mesh batches. Weigh the combined fines to the nearest 0.1 g. Record the weight of fines fraction as W_{t80} .
- 10.5.10 If multiple sieved samples were combined they must homogenized. Pour the -20/+80 mesh fraction into the riffle sampler.
 - 10.5.10.1 The sample must be distributed evenly onto all the riffle openings. A pan, as wide as the riffle opening, should be used. Pour the sample evenly off the entire side of the pan and not from the end or the corner. Do not transfer the biomass sample from a narrow-mouth container such as a jar.
- 10.5.11 Recombine the riffled sub-samples.
- 10.5.12 Repeat steps 10.5.10 through 10.5.11 a total of four times.
- 10.5.13 Determine the total solids content (TS) of both the -20/+80 mesh fraction and the fines fraction using LAP "Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples". Record the total solids of the -20/+80 mesh fraction as $TS_{20/80}$. Record the total solids content of the fines as TS_{-80} .
- 10.5.14 Determine the ash content of each fraction using LAP "Determination of Ash in Biomass". Record the ash content of the -20/+80 mesh fraction as $Ash_{20/80}$. Record the ash content of the fines as Ash_{-80} .
- 10.5.15 Using the equations in Section 11, calculate the percent of each fraction in the original, biomass sample. The fraction weight percent is used to reconstruct the composition of the original biomass sample.
- 10.5.16 If the total sample needs to be subdivided into smaller samples, use the riffler to make this separation.
- 10.5.17 If the prepared sample is not analyzed immediately after sieving and riffling, the sample should be stored in an airtight container or sealable polyethylene bag and kept at -20°C until needed.

11. Calculations

- 11.1 To calculate the fraction percent of -20/+80 mesh fraction, use the following equation:

$$Fraction_{20/80} \% = \frac{(Wt_{20/80})}{(Wt_{20/80} + Wt_{80})} \times 100$$

Where:

$Wt_{20/80}$ = weight of -20/+80 mesh fraction (g)

Wt_{80} = weight of fines fraction (g)

11.2 To calculate the fraction percent of -80 mesh fraction, use the following equation:

$$Fraction_{80} \% = \frac{(Wt_{80})}{(Wt_{20/80} + Wt_{80})} \times 100$$

Where:

$Wt_{20/80}$ = weight of -20/+80 mesh fraction (g)

Wt_{80} = weight of fines fraction (g)

11.3 To calculate the percent of total solids obtained by drying at 45°C (Method B), use the following equation:

$$\% T_{45} = \frac{(W_f - W_t)}{(W_i - W_t)} \times 100$$

Where:

$\% T_{45}$ = percent total solids of a sample oven dried at 45°C, W_t = tare weight of freeze-drier container,

W_i = initial weight of container and sample

W_f = final weight of container and sample.

11.4 To calculate the percent of total solids obtained by freeze drying (Method C), use the following equation:

$$\% T_{fd} = \frac{(W_f - W_t)}{(W_i - W_t)} \times 100$$

Where:

$\% T_{fd}$ = percent total solids of a freeze-dried sample, W_t = tare weight of freeze-drier container,

W_i = initial weight of container and sample

W_f = final weight of container and sample.

11.5 For larger biomass samples that must be prepared in batches, record the total percent solids of each fraction as well as the combined weight of the biomass in each fraction, $(W_f - W_t)$.

11.6 To calculate the composition of constituent X in the original biomass sample, use the following equation:

$$\%X_{\text{Original}} = \left(\%X_{-20/+80} \times \text{Fraction}_{-20/+80} \% \right) + \%X_{-20/+80} \times \frac{100 - \%Ash_{-80} + \%Ash_{-20/+80}}{100} \times \text{Fraction}_{-80} \%$$

12. Report Format

12.1 Report weight percent prepared biomass and weight percent fines. Report results on an oven dry weight basis.

13. Precision and Bias

13.1 *Repeatability* – Duplicate determinations on splits of the gross sample, by the same operator, using the same sieves, should duplicate the percent mass fractions within 2% absolute.

13.2 *Reproducibility* – Duplicate determinations on splits of the gross sample, by different operators, using the same sieves, should duplicate the percent mass fractions within 2% absolute.

13.3 *Bias* – Since there is not an appropriate standard reference material, no statement about bias can be made.

13.4 *Round robin testing* – For a report documenting an international round robin test of biomass analysis methods, including this procedure, see Milne et al., 1992.

14. Quality Control (all items bellow, missing)

14.1 Reported Significant Figures or decimal places: Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan, see LAP “Rounding and Significant Figures”.

14.2 Replicates: not applicable

14.3 Blank: not applicable

14.4 Relative percent difference criteria: not applicable

14.5 Calibration verification standard: not applicable

14.6 Sample size: not applicable

14.7 Sample storage: If the prepared biomass sample is not analyzed immediately after sieving and riffing, the sample should be stored in an air-tight container or sealable polyethylene bag and kept at –20°C until needed.

14.8 Standard storage: not applicable

14.9 Standard preparation: not applicable

14.10 Definition of a batch: not applicable

14.11 Control charts: not applicable

15. Appendices

15.1 None

16. References

- 16.1 Moore, W., and D. Johnson. 1967. *Procedures for the Chemical Analysis of Wood and Wood Products*. Madison, WI: U.S. Forest Products Laboratory, U.S. Department of Agriculture
- 16.2 ASTM E 1757 - 01 "Standard Practice for Preparation of Biomass for Compositional Analysis" In *2003 Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.05*. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, International.
- 16.3 NREL Laboratory Analytical Procedure "Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples"
- 16.4 NREL Laboratory Analytical Procedure "Determination of Ash in Biomass"
- 16.5 TAPPI Test Method T264 cm-97, "Preparation of wood for chemical analysis" In *Tappi Test Method 2002-2003*. Atlanta, GA: Technical Association of the Pulp and Paper Industry
- 16.6 National Forage Testing Association Methods, available on-line at http://www.foragetesting.org/lab_procedures.php, Omaha, Nebraska, National Forage Testing Association, Accessed April 2004
- 16.7 Milne, T. A.; Chum, H. L.; Agblevor, F. A.; Johnson, D. K. (1992). "Standardized Analytical Methods" Biomass & Bioenergy. Proceedings of International Energy Agency Bioenergy Agreement Seminar", 2-3 April 1992, Edinburgh, U.K.. Vol. 2(1-6), 1992; pp. 341-366

Determination of Ash in Biomass

Laboratory Analytical Procedure (LAP)

Issue Date: 7/17/2005

A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, and D.
Templeton

Technical Report

NREL/TP-510-42622

January 2008

Procedure Title: Determination of Ash in Biomass

Laboratory Analytical Procedure

3. Introduction

- 1.1 The amount of inorganic material in biomass, either structural or extractable, should be measured as part of the total composition. Structural ash is inorganic material that is bound in the physical structure of the biomass, while extractable ash is inorganic material that can be removed by washing or extracting the material. Extractable ash can be the result of soil remaining in the biomass. Refer to LAP “Total Mass Closure” for information on where to utilize this procedure.
- 1.2 This procedure is substantially similar to ASTM Standard Method Number E1755-01 “Standard Method for the Determination of Ash in Biomass”
- 1.3 This test method covers the determination of ash, expressed as the percentage of residue remaining after dry oxidation at 550 to 600^oC. All results are reported relative to the 105^oC oven dry weight of the sample.

4. Scope

- 2.5 This procedure is applicable to hard and soft woods, herbaceous materials, agricultural residues, wastepaper, and solid fraction process samples.
- 2.6 All analyses should be performed in accordance with an appropriate laboratory specific Quality Assurance Plan (QAP).

5. Terminology

- 3.1 *Oven dry weight (ODW)*- the weight of biomass mathematically corrected for the amount of moisture present in the sample at the time of weighing
- 3.2 *Prepared biomass*- biomass prepared according to LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis”.
- 3.3 *Ash*- The inorganic residue left after dry oxidation at 575^oC.

6. Significance and Use

- 4.3 The ash content is a measure of the mineral content and other inorganic matter in biomass and is used in conjunction with other procedures to determine to total composition of biomass samples.
- 4.4 This procedure is used, in conjunction with other procedures to determine the chemical composition of biomass samples, see LAP “Summative Mass Closure for Biomass Samples”.

7. Interferences

- 5.1 None

8. Apparatus

- 6.1 Muffle furnace, equipped with a thermostat, set to 575 ± 25 °C or equipped with optional ramping program

- 6.2 Analytical balance, accurate to 0.1 mg.
- 6.3 Desiccator containing desiccant
- 6.4 Ashing crucibles, 50 mL, porcelain, silica, or platinum
- 6.5 Porcelain markers, high temperature, or equivalent crucible marking method
- 6.6 Ashing burner, ignition source, tongs, and clay triangle with stand
- 6.7 Convection drying oven, with temperature control of $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$, optional

7. Reagents and materials

- 7.1 Reagents
 - 7.1.1 None
- 7.2 Materials
 - None

8. ES&H Considerations and Hazards

- 8.1 Use appropriate safety measures when handling open flame.
- 8.2 When placing crucibles in a furnace or removing them, use appropriate personal protective equipment, including heat resistant gloves.
- 8.3 Follow all applicable NREL chemical handling procedures

9. Sampling, Test Specimens and Test Units

- 9.1 Care must be taken to ensure a representative sample is taken for analysis.
- 9.2 LAP "Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis" should be performed prior to this analysis
- 9.3 LAP "Determination of Solids in Biomass" should be performed at the same time that samples for ash analysis are weighed out. Alternately, 105°C oven dry biomass may be used, eliminating the need for total solids corrections.

10. Procedure

- 10.1 Using a porcelain marker, mark an appropriate number of crucibles with identifiers, and place them in the muffle furnace at $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$ for a minimum of four hours. (Marking crucibles with a porcelain marker will permanently mark them, so a generic identifier is recommended.) Remove the crucibles from the furnace directly into a desiccator. If using a furnace set to $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$, cool for a specific period of time, one hour is recommended. Record the cool time. Weigh the crucibles to the nearest 0.1 mg and record this weight.
- 10.2 Place the sample back into the muffle furnace at $575 \pm 25^{\circ}\text{C}$ and dry to constant weight. Constant weight is defined as less than ± 0.3 mg change in the weight upon one hour of re-heating the crucible.
- 10.3 Weigh 0.5 to 2.0 g, to the nearest 0.1 mg, of a test specimen into the tared crucible. Record the sample weight. If the sample being analyzed is a 105°C dried test specimen, the sample should be stored in a desiccator until use. If air dry samples are used, LAP "Determination of Total Solids in Biomass" should be performed at the same time, to accurately measure the percent solids for correction. Each sample should be analyzed in duplicate, at minimum.

- 10.4 Ash the samples. Use step 10.4.1 if using a muffle furnace set to 575 ± 25 °C. Use step 10.4.2 if using a muffle furnace with a ramping program.
- 10.4.1 Ash the samples using a muffle furnace set to 575 ± 25 °C.
- 10.4.1.1 Using an ashing burner and clay triangle with stand, place the crucible over the flame until smoke appears. Immediately ignite the smoke and allow the sample to burn until no more smoke or flame appears. Allow the crucible to cool before placing it in the muffle furnace. Alternately, a furnace with a temperature ramping function may be used to avoid pre-ignition.
- 10.4.1.2 Place the crucibles in the muffle furnace at 575 ± 25 °C for 24 ± 6 hours. When handling the crucible, protect the sample from drafts to avoid mechanical loss of sample.
- 10.4.1.3 Carefully remove the crucible from the furnace directly into a desiccator and cool for a specific amount of time, equal to the initial cool time of the crucibles. Weigh the crucibles and ash to the nearest 0.1 mg and record the weight.
- 10.4.1.4 Place the sample back into the muffle furnace at 575 ± 25 °C and ash to constant weight. Constant weight is defined as less than ± 0.3 mg change in the weight upon one hour of re-heating the crucible. When allowing samples to cool in a desiccator, it is necessary to maintain the initial cool time.
- 10.4.2 Ash the samples using a muffle furnace equipped with a ramping program.
- Furnace Temperature Ramp Program: Ramp from room temperature to 105 °C
 Hold at 105°C for 12 minutes Ramp
 to 250 °C at 10°C / minute Hold at
 250 °C for 30 minutes Ramp to 575
 °C at 20 °C / minute Hold at 575 °C
 for 180 minutes Allow temperature
 to drop to 105 °C
 Hold at 105 °C until samples are removed
- 10.4.2.1 Place the crucibles in the muffle furnace and begin the ramping program. When handling the crucible, protect the sample from drafts to avoid mechanical loss of sample.
- 10.4.2.2 Carefully remove the crucible from the furnace directly into a desiccator and cool. Weigh the crucibles and ash to the nearest 0.1 mg and record the weight.
- 10.4.2.3 Place the sample back into the muffle furnace at 575 ± 25 °C and ash to constant weight. Constant weight is defined as less than ± 0.3 mg change in the weight upon one hour of re-heating the crucible

10.3 Calculations

- 1 If an air dry sample was used, calculate the oven dry weight (ODW) of the sample, using the average total solids content as determined by the LAP “Standard Method for the Determination of Total Solids in Biomass”.

$$ODW = \frac{\text{Weight}_{\text{air dry sample}} \times \% \text{ Total Solids}}{100}$$

11.2 Calculate and record the percentage ash on an ODW basis.

$$\% \text{ Ash} = \frac{\text{Weight}_{\text{crucible plus ash}} - \text{Weight}_{\text{crucible}}}{\text{ODW}_{\text{sample}}} \times 100$$

11.3 To report or calculate the relative percent difference (RPD) between two samples, use the following calculation

$$RPD = \frac{(X_1 - X_2)}{X_{\text{mean}}} \times 100$$

Where:

X_1 and X_2 = measured values

X_{mean} = the mean of X_1 and X_2

11.4 To report or calculate the root mean square deviation (RMS deviation) or the standard deviation (st dev) of the samples, use the following calculations.

First find the root mean square (RMS), of the sample using

$$RMS = x_m = \text{mean} = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}}$$

Then find the root mean square deviation, or standard deviation, using

$$RMS\text{deviation} = \sigma = \text{stdev} = \sqrt{\frac{\sum^n (x_i - x_m)^2}{n}}$$

Where:

x_m = the root mean square of all x values in the set
 n = number of samples in set

x_i = a measured value from the set

10.3.11 Report Format

Report ash as a percentage of the ODW of the sample. Report the percent solids, if applicable. Standard deviation and relative percent difference may also be reported.

10.3.12 Precision and Bias

13.1 *Round robin testing* – For a report documenting an international round robin test of biomass analysis methods, including this procedure, see Milne et al., 1992.

14. Quality Control

Reported Significant Figures or decimal places: Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan.

- 14.1 Replicates: Run all samples and method verification standards, if applicable, in duplicate, at minimum.
- 14.2 Blank: An empty aluminum dish or crucible should be run through the analysis. The dish should be weighed empty, ashed, and reweighed. The difference in weight must be less than the equivalent of a 0.5% error.
- 14.3 Relative percent difference criteria: Each sample must reproduce ash content ± 0.5 wt %.
- 14.4 Method verification standard (MVS): A MVS, such as a QA/QC sample, should be run in duplicate with every batch.
- 14.5 Sample size: 1-4 grams. If there is insufficient sample, the result should be flagged and the lack of precision noted.
- 14.6 Sample storage: If applicable, oven dried samples should be stored in a desiccator until ready to use.
- 14.7 Standard storage: Not applicable
- 14.8 Standard preparation: Not applicable
- 14.9 Definition of a batch: Any number of samples that are analyzed and recorded together. The maximum size of a batch will be limited by equipment constraints
- 14.10 Control charts: MVS or a QA/QC material should be control charted to verify reproducibility
- 14.11 Others: Biomass can rapidly gain or lose moisture when in contact with air. During the weighing steps, minimize the amount of time the sample and crucibles are exposed to the air.

15. Appendices

- 15.1 None

16. References

- 16.1 Moore, W., and D. Johnson. 1967. *Procedures for the Chemical Analysis of Wood and Wood Products*. Madison, WI: U.S. Forest Products Laboratory, U.S. Department of Agriculture.
- 16.2 NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure #005 "Standard Method for Ash in Biomass".
- 16.3 TAPPI Test Method T211, "Ash in Wood and Pulp." *In Tappi Test Methods*. Atlanta, GA: Technical Association of the Pulp and Paper Industry.
- 16.4 Milne, T. A.; Chum, H. L.; Agblevor, F. A.; Johnson, D. K. (1992). "Standardized Analytical Methods" Biomass & Bioenergy. Proceedings of International Energy Agency Bioenergy Agreement Seminar", 2-3 April 1992, Edinburgh, U.K. Vol. 2(1-6), 1992; pp. 341-366
- 16.5 ASTM E1755-01 "Standard Method for the Determination of Ash in Biomass" In 2003 *Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.05*. Philadelphia, PA: American Society for

Testing and Materials, International.

Determination of Extractives in Biomass

Laboratory Analytical Procedure (LAP)

Issue Date: 7/17/2005

A. Sluiter, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, and D. Templeton

Technical Report

NREL/TP-510-42619

January 2008

Procedure Title: Determination of Extractives in Biomass

Laboratory Analytical Procedure

5. Introduction

- 1.1 It is necessary to remove non-structural material from biomass prior to analysis to prevent interference with later analytical steps. This procedure uses a two-step extraction process to remove water soluble and ethanol soluble material. Water soluble materials may include inorganic material, non-structural sugars, and nitrogenous material, among others. Inorganic material in the water soluble material may come from both the biomass and any soluble material that it is associated with the biomass, such as soil or fertilizer. No attempt is made to distinguish the source of the inorganic material. Ethanol soluble material includes chlorophyll, waxes, or other minor components. Some biomass may require both extraction steps, while other biomass may only require exhaustive ethanol extraction.
- 1.2 Refer to LAP-010 or ASTM Standard Test Method E 1690 “Determination of Ethanol Extractives in Biomass” for extraction procedures for isolation and characterization of extractives.
- 1.3 This procedure covers the determination of soluble non-structural materials in a biomass sample. The results are reported, on a dry weight basis, as a weight percentage of the biomass. Extractives percentages are measured and used to convert compositions from an extractives-free basis to and as-received basis. Determining the amount of water extractable sucrose is also covered. This LAP should be used in conjunction with other assays to determine the total composition of biomass samples as described in LAP “Summative Mass Closure for Biomass Samples”. This procedure should be performed prior to LAP “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass”

6. Scope

This procedure has been optimized for the removal of extractives in biomass.

The decision to utilize a two-step or one step extraction should be made based on biomass type.

The two-step extraction should be used to quantify extractives in biomass samples that contain a significant amount of water soluble material, or biomass that has water soluble components of interest. Corn stover is an example of biomass that should be subjected to a two-step extraction process, as the water soluble portion of the biomass is significant and the water soluble material includes quantifiable carbohydrates.

Ethanol only extractions should be used for samples that have little or no water extractable material or when no water soluble components need to be quantified. Examples include hardwoods and softwoods. These samples should be subjected to exhaustive ethanol extraction only.

This procedure should not be applied to other types of biomass without appropriate investigations as to the applicability of the method, including samples with partially

ethanol-soluble fats.

7. Terminology

3.1 *Extractives*- The material in a biomass sample that is soluble in either water or ethanol during exhaustive extraction. Extractives include non-structural components of biomass samples that could potentially interfere with the down stream analysis of the biomass sample.

- 4.5 *Non-structural components*- Non-chemically bound components of biomass that include but are not limited to sucrose, nitrate/nitrites, protein, ash, chlorophyll, and waxes.
- 4.6 *Extractives-free biomass*- Biomass after exhaustive water and ethanol extraction.
- 4.7 *Soxhlet cycle*- One soxhlet cycle is an amount of time measured from the start of one siphoning until the start of the next siphoning from the extractor.
- 4.8 *Exhaustive extraction*- An exhaustive water extraction is complete when most or all of the water extractable material has been extracted from the biomass. For the Soxhlet method, this is usually 6-24 hours. An exhaustive ethanol extraction is usually complete in 24 hours using the Soxhlet method.
- 4.9 *Oven dry weight (ODW)*- The weight of biomass mathematically corrected for the amount of moisture present in the sample at the time of weighing, or the weight of glass or porcelain apparatus dried in a 105 ± 5 °C drying oven to a constant weight.

4. Significance and Use

- 4.1 This procedure is used, in conjunction with other procedures to determine the chemical composition of biomass samples, see LAP “Summative Mass Closure for Biomass Samples”.
- 4.2 Removal of extractives prior to analysis for carbohydrates and lignin improves precision of those methods. Irreproducible partitioning of extractives introduces errors in those methods, see Milne et al. (1992)

5. Interferences

- 6.8 Samples that are moldy or aged may contain structural materials that have been modified and are now soluble in water or ethanol.
- 6.9 Failure to remove extractable materials may result in an error in structural sugar values. Hydrophobic extractives inhibit penetration of the sulfuric acid into the sample resulting in incomplete hydrolysis.
- 6.10 Failure to remove extractable material may result in falsely high lignin values when unhydrolyzed carbohydrates condense with the acid insoluble lignin.

6. Apparatus

- 6.1 Analytical balance, accurate to 1 mg or 0.1 mg
- 6.2 Medium to large capacity oven set to 105 ± 5 °C for glassware drying
- 6.3 Vacuum oven set to 40 ± 2 °C or drying oven set to 45 ± 2 °C
- 6.4 Apparatus for extraction, either Soxhlet or automatic
 - 6.4.1 Apparatus for Soxhlet extraction
 - 6.4.1.1 Glass Soxhlet extraction tubes of suitable size (capacity 85 mL)
 - 6.4.1.2 Heating mantles, suitable for 500 mL boiling flasks
 - 6.4.1.3 Condensers with appropriate fitting for Soxhlet tubes and a source of chilled water or other cooling system
 - 6.4.1.4 Single thickness cotton cellulose thimbles, 94 mm external length by 33 mm internal diameter (Alundum thimbles, medium porosity, of appropriate size for Soxhlet tube may also be used)
 - 6.4.1.5 250 mL glass rotary evaporator trap, optional
 - 6.4.2 Apparatus for automatic extraction

- 6.4.2.1 Dionex Accelerated Solvent Extractor, model 200
- 6.4.2.2 Extraction cells, 11ml
- 6.4.2.3 Appropriately sized glass or polypropylene filters and tamping rod. Polypropylene filter cloth may be used to cut filters, and is available from Sigma-Aldrich, catalog #Z557722, W 102 cm permeability factor activity 60 cfm. Polypropylene filters should not be used for incompatible solvents, such as hexane.
- 6.5 Evaporator, either apparatus listed or equivalent device suitable for evaporating water and ethanol
 - 6.5.1 Rotary evaporator with trap and water bath set to 40 ± 5 °C
 - 6.5.2 Automatic solvent removal system, such as TurboVap II, with appropriate tubes
- 6.6 YSI analyzer with appropriate membranes or equivalent sucrose quantification method

10.2 Reagents and materials

10.1.1 Reagents

Water, HPLC grade

Ethyl alcohol, 190 proof, USP grade

10.1.2 Materials

Materials necessary for Soxhlet extraction

Boiling flasks, round bottom, 500 mL capacity, 24/40 joint, equal to the number of extractions desired

Teflon boiling chips or stir bars (stir bars may only be used with heating mantles equipped with stirring capacity)

Cellulose filter paper, medium porosity, of appropriate size

Buchner funnels, for paper diameter 70 mm or larger

200 mL volumetric flasks, necessary for sucrose determination only

Desiccator(s) containing desiccant, of a volume large enough to accommodate appropriate glassware

Materials necessary for automatic extraction

7.2.2.1 Collection vials with lids and septa, sized to fit extraction cell volume

7.2.2.2 Extraction cell filters, either glass fiber or polypropylene, cut to fit if necessary

10.3.13 ES&H Considerations and Hazards

Ethyl alcohol is flammable.

Follow all applicable NREL chemical handling procedures.

10.3.14 Sampling, Test Specimens and Test Units

Follow LAP "Preparation of Biomass for compositional Analysis" prior to analysis

Care must be taken to ensure a representative sample is taken for analysis.

The test specimen should consist of 5-20 grams of milled sample obtained in such a manner as to ensure that the sample is representative of the entire lot of material. A minimum of 8 g of extracted sample is required for complete compositional analysis.

10.3.15 Procedure

Prepare the sample for extraction.

The moisture content of a biomass sample can change rapidly when exposed to air.

Weigh samples for total solids determination (LAP “Determination of Total Solids and Moisture in Biomass”) at the same time as the samples for the extractives determination to avoid errors due to changes in humidity.

Extract the sample- Soxhlet method only

2 Prepare the apparatus for extraction.

- 10.5.9 Dry boiling flasks and other relevant glassware (bump traps and automatic evaporator glassware if desired) in a 105 ± 5 °C drying oven for a minimum of 12 hours. Remove the glassware and allow it to come to room temperature in a desiccator. Add boiling stones (or stir bars if using heating mantles with stirring capacity) to the flasks, label clearly, and record the oven dry weight (ODW) to the nearest 0.1 mg.. If significant foaming is expected during water extractions, the ODW of the bump traps may also be recorded.
- 10.5.10 Add 2-10 g of sample to a tared extraction thimble. Record the weight to the nearest 0.1 mg. The amount of sample necessary will depend on the bulk density of the biomass. The height of the biomass in the thimble must not exceed the height of the Soxhlet siphon tube. If the biomass height does exceed the siphon height, incomplete extraction will occur. Label the top edge of the thimble with a pencil.
- 10.5.11 Assemble the Soxhlet apparatus. Add a 250 mL bump trap between the receiving flask and the Soxhlet tube to control foaming if necessary. Insert the thimble into the Soxhlet tube.

2 Analyze the sample for water extractives (if necessary)

- 10.3.1 Add 190 ± 5 mL of HPLC grade water to the tared receiving flask. Place the receiving flask on the Soxhlet apparatus. Adjust the heating mantles to provide a minimum of 4-5 siphon cycles per hour.
- 10.3.2 Reflux for 6-24 hours. The reflux time necessary will depend on the removal rate of components of interest, the temperature of the condensers, and the siphon rate. In some biomass, such as corn stover, the reflux time is usually around eight hours, and any remaining water soluble material will be extracted during the ethanol extraction.
- 10.3.3 When reflux time is complete, turn off the heating mantles and allow the glassware to cool to room temperature.
- 10.3.4 If a successive ethanol extraction is to be performed, leave the thimble in the Soxhlet extractor, removing as much residual water from the Soxhlet tube as possible. If an ethanol extraction is not necessary, remove the thimble and transfer the extracted solids, as quantitatively as possible, onto cellulose filter paper in a Buchner funnel. Wash the solids with approximately 100 mL of fresh HPLC grade water. Allow the solids to dry using vacuum filtration or air dry.
- 10.3.5 Analyze the water extract for sucrose content if desired.
 - 10.3.5.1 Once the water receiving flask has reached room temperature, transfer the water to a 200 mL volumetric flask. Bring to volume with HPLC grade water and mix well. Remove a 10.00 mL aliquot of the solution. Analyze the aliquot using a YSI analyzer equipped with appropriate membranes or equivalent sucrose quantification method. Replace the remaining 190.00 mL of water extract back into the water receiving flask. This removed volume must be compensated for during calculations.

10.4 Analyze the sample for ethanol extractives

- 10.4.1 Add 190 ± 5 mL 190 proof ethyl alcohol to the tared ethanol receiving flask. Place the receiving flask on the Soxhlet apparatus. Adjust the heating mantles to provide a minimum of 6-10 siphon cycles per hour.
- 10.4.2 Reflux for 16-24 hours. The reflux time necessary will depend on the removal rate of components of interest, the temperature of the condensers, and the siphon rate.
- 10.4.3 When reflux time is complete, turn off the heating mantles and allow the glassware to cool to room temperature.
- 10.4.4 Remove the thimble and transfer the extracted solids, as quantitatively as possible, onto cellulose filter paper in a Buchner funnel. Wash the solids with approximately 100 mL of fresh 190 proof ethanol. Allow the solids to dry using vacuum filtration or air dry.

Extract the sample- Automatic extraction method only

10.5 Prepare the apparatus for extraction.

- 10.5.1 Dry the collection tubes, but not plastic lids or septa, in a 105 ± 5 °C drying oven for a minimum of 12 hours. Remove the glassware and allow it to come to room temperature in a desiccator. Label each tube clearly and record the oven dry weight (ODW) to the nearest 0.1 mg.
- 10.5.2 Place two appropriately sized glass filters in the bottom of a labeled extraction cell, tamping down one at a time. A tamping rod is available to fit each extraction cell. Alternatively, a single polypropylene filter of appropriate size may be tamped into the bottom of the extraction cell. Polypropylene filter cloth may be used to cut filters, and is available from Sigma-Aldrich, catalog #Z557722, W 102 cm permeability factor activity 60 cfm. Polypropylene filters should not be used for incompatible solvents, such as hexane.
- 10.5.3 Add 1-10 g of sample to a tared extraction cell. Record the weight to the nearest 0.1 mg. The amount of sample necessary will depend on the bulk density of the biomass. Do not pack the biomass tightly in the thimble, as this can interfere with complete extraction. Do not use inert fillers to fill dead volume if further analysis of the biomass is required. Screw the ends of the cell on tightly. Place the cell in the automatic extractor, ensuring that the end with the filters is on the bottom.

10.6 Analyze the sample for water extractives (if necessary) and ethanol extractives

- 10.6.1 Create a method in the automatic extractor software. Using the Dionex ASE system, program the following parameters:
 - Pressure: 1500 PSI
 - Temperature: 100 °C
 - Preheat time: 0
 - Heat time: 5 minutes (automatic software default)
 - Static time: 7 minutes
 - Flush volume: 150%
 - Purge time: 120 seconds (optional)
 - Static cycles: 3

Note: If using 33 ml extraction cells, a flush volume of 150% and three static

cycles may overflow the collection vial. Programming one static cycle per collection vial may be necessary.

Save one program for 100% water, if desired, and another for 100% 190 proof ethanol.

- 10.6.2 Run each desired method on the sample. To avoid filling up the purge collection vials when running sequential water and ethanol extractions on a large number of samples, extract every sample with water, and then extract every sample with ethanol.
- 10.6.3 Allow the extraction cell to cool to room temperature. Remove the sample from the cell and allow the solids to air dry.
- 10.6.4 Analyze the water extract for sucrose content if desired.
 - 10.6.4.1 Once the water collection tube has reached room temperature, transfer the water to a 50 mL volumetric flask. Bring to volume with HPLC grade water and mix well. Remove a 5.00 mL aliquot of the solution. Analyze the aliquot using a YSI analyzer equipped with appropriate membranes or equivalent sucrose quantification method. Replace the remaining 45.00 mL of water extract back into the water collection tube. This removed volume must be compensated for during calculations.

10.7 Remove solvent from the extractives

- 10.7.1 Combine any solvent from the Soxhlet tube with the solvent in the receiver flask if using Soxhlet method. For automatic extraction method, remove collection vials from instrument.
- 10.7.2 The solvent may be removed from the extract using either apparatus listed or an equivalent device suitable for evaporating water and ethanol.
 - 10.7.2.1 To remove the solvent using a rotary evaporator, use a rotary evaporator equipped with a water bath set to 40 ± 5 °C and a vacuum source. Transfer the extract into a tared round bottom boiling flask. The vacuum source should be sufficient to remove solvent without extreme bumping. Continue to remove solvent until all visible solvent is gone.
 - 10.7.2.2 To remove solvent using a TurboVapII, transfer the extract into a tared TurboVap tube if necessary, set the inlet pressure to 15 – 18 psi, and adjust the water bath to 40 °C. Continue to remove solvent until all visible solvent is gone.
- 10.7.3 Place the flask or tube in a vacuum oven at 40 ± 2 °C for 24 hours. Cool to room temperature in a desiccator. Weigh the flask or tube and record the weight to the nearest 0.1 mg. If necessary, this step may also be performed on the bump trap to quantify any extract remaining in the bump trap.

11. Calculations

- 11.1 Calculate the oven dry weight (ODW) of the sample, using the average total solids content as determined by the LAP “Standard Method for the Determination of Total Solids in Biomass”.

$$ODW = \frac{(\text{Weight}_{\text{thimble plus sample}} - \text{Weight}_{\text{thimble}}) \times \% \text{ Total solids}}{100}$$

- 11.2 Calculate the amount of extractives in the sample, on a percent dry weight basis. If sucrose measurements were performed, use the second equation to calculate extractives with a correction for the removed sample volume.

$$\% \text{ Extractives} = \frac{\text{Weight}_{\text{flask plus extractives}} - \text{Weight}_{\text{flask}}}{\text{ODW}_{\text{sample}}} \times 100$$

$$\% \text{ Extractives} = \frac{\text{Weight}_{\text{flask plus extractives}} - \text{Weight}_{\text{flask}}}{\text{ODW}_{\text{sample}}} \times \frac{\text{Volume}_{\text{total}} - \text{Volume}_{\text{removed aliquot}}}{\text{Volume}_{\text{total}}} \times 100$$

- 11.3 To report or calculate the relative percent difference (RPD) between two samples, use the following calculation

$$RPD = \left(\frac{X_1 - X_2}{X_{\text{mean}}} \right) \cdot 100$$

Where:

X_1 and X_2 = measured values

X_{mean} = the mean of X_1 and X_2

- 11.4 To report or calculate the root mean square deviation (RMS deviation) or the standard deviation (st dev) of the samples, use the following calculations.

First find the root mean square (RMS), of the sample using

$$RMS = x_m = \text{mean} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n}}$$

Then find the root mean square deviation, or standard deviation, using

$$RMS\text{deviation} = \sigma = \text{stdev} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2}{n}}$$

Where:

x_m =the root mean square of all x values in the set

n =number of samples in set

x_i =a measured value from the set

12. Report Format

12.1 Report the average percent extractives in the sample on a dry weight basis. Standard deviation and relative percent difference may also be reported.

13. Precision and Bias

13.1 Data obtained by replicate testing of a hybrid poplar sample in one laboratory, via Soxhlet, gave a standard deviation in extractive content of 0.15% and a CV% of 7.6%. Replicate testing of a National Institute of Standards and Technology (NIST) #8494 wheat straw gave a standard deviation of 0.20% and a CV% of 1.6% and NIST #8493 Pinus radiata gave a standard deviation of 0.20% and a CV% of 8.0%

13.2 Prolonged heating of the extractive residue may bias the reported results low because of evaporation of semivolatile constituents. Insufficient heating or using inadequate vacuum can bias the results high due to incomplete removal of solvent.

14. Quality Control

14.1 Reported Significant Figures: Report results as a weight percentage, with two decimal places. Standard deviation and relative percent difference may also be reported.

14.2 Replicates: Run all samples in duplicate.

14.3 Blank: Not applicable.

14.4 Relative percent difference criteria:

14.5 Calibration verification standard:

14.6 Sample size: The sample should be a minimum of three grams of sample per thimble, or the results should be flagged and the lack of precision noted.

14.7 Sample storage: If the extracted sample is greater than 90% solids, it may be stored at room temperature. If it is less than 90% solids, it should be stored in a refrigerator.

14.8 Standard storage: Not applicable.

14.9 Standard preparation: Not applicable.

14.10 Definition of a batch: Any number of samples that are analyzed and recorded together. The maximum size of a batch will be limited by equipment constraints.

14.11 Control charts: NIST standards or a QA/QC material should be control charted to verify reproducibility.

15. Appendices

15.1 None

16. References

- 16.1 ASTM Standard Test Method E 1690 "Determination of Ethanol Extractives in Biomass" in *2003 Annual book of ASTM Standards volume 11.05* Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- 16.2 ASTM D1105-84, "Method for Preparation of Extractive-Free Wood." In *1993 Annual Book of ASTM Standards, Volume 04.09*. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- 16.3 Moore, W., and D. Johnson. 1967. *Procedures for the Chemical Analysis of Wood and Wood Products*. Madison, WI: U.S. Forest Products Laboratory, U.S. Department of Agriculture
- 16.4 NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure "Standard Method for the Determination of Total Solids in Biomass."
- 16.5 TAPPI Test Method T204, "Solvent Extractives of Wood and Pulp." In *Tappi Test Methods*. Atlanta, GA: Technical Association of the Pulp and Paper Industry
- 16.6 Milne, T. A.; Chum, H. L.; Agblevor, F. A.; Johnson, D. K. (1992). "Standardized Analytical Methods" Biomass & Bioenergy. Proceedings of International Energy Agency Bioenergy Agreement Seminar", 2-3 April 1992, Edinburgh, U.K.. Vol. 2(1-6), 1992; pp. 341-366

Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP)

Issue Date: April 2008

**Revision Date: August 2012 (Version 08-03-
2012)**

A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D.
Templeton, and D. Crocker

Procedure Title: Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass

Laboratory Analytical Procedure

8. Introduction

- 1.1 Carbohydrates and lignin make up a major portion of biomass samples. These constituents must be measured as part of a comprehensive biomass analysis. Carbohydrates can be structural or non-structural. Structural carbohydrates are bound in the matrix of the biomass, while non-structural carbohydrates can be removed using extraction or washing steps. Lignin is a complex phenolic polymer.
- 1.2 Portions of this procedure are substantially similar to ASTM E1758-01 “Standard Method for the Determination of Carbohydrates by HPLC.”
- 1.3 This procedure is suitable for samples that do not contain extractives. This procedure uses a two-step acid hydrolysis to fractionate the biomass into forms that are more easily quantified. The lignin fractionates into acid insoluble material and acid soluble material. The acid insoluble material may also include ash and protein, which must be accounted for during gravimetric analysis. The acid soluble lignin is measured by UV-Vis spectroscopy. During hydrolysis the polymeric carbohydrates are hydrolyzed into the monomeric forms, which are soluble in the hydrolysis liquid. They are then measured by HPLC. Protein may also partition into the liquid fraction. A measure of acetyl content is necessary for biomass containing hemicellulose with a xylan backbone, but not biomass containing a mannan backbone. Acetate is measured by HPLC.

9. Scope

- 2.7 This procedure is appropriate for extractives free biomass, which includes biomass that has been extracted using LAP “Determination of Extractives in Biomass,” as well as process solids containing no extractives. Results are reported on an oven dry weight basis. Results may be reported on an as received biomass basis or an extractives free basis, depending on type of biomass used. LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis” should be used prior to this procedure.
- 2.8 This procedure is appropriate for biomass containing the components listed throughout the procedure. Any biomass containing other interfering components not listed must be further investigated.
- 2.9 A measure of acetyl content is necessary for biomass containing hemicellulose with a xylan backbone, but not biomass containing a mannan backbone.
- 2.10 All analyses should be performed in accordance with an appropriate laboratory specific Quality

Assurance Plan (QAP).

7. Terminology

3.1 *Oven dry weight (ODW)*—the weight of biomass mathematically corrected for the amount of

moisture present in the sample at the time of weighing.

4.10 *Prepared biomass*—biomass prepared according to LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis.”

4.11 *Extractives free biomass*—biomass after exhaustive water and ethanol extraction (refer to LAP “Determination of Extractives in Biomass”).

4.12 *Acid insoluble lignin*—the residue remaining on a medium porosity filtering crucible after a two step hydrolysis, with correction for acid insoluble ash and acid insoluble protein, if necessary.

4.13 *Structural carbohydrates*—polymeric carbohydrates, namely cellulose and hemicellulose.

4.14 *Non-structural components*—non-chemically bound components of biomass that include but are not limited to sucrose, nitrate/nitrites, protein, ash, chlorophyll, and waxes.

9. Significance and Use

5.1 This procedure is used, possibly in conjunction with other procedures, to determine the amount of structural carbohydrates and lignin in a solid biomass sample.

10. Interferences

6.2 This procedure has been optimized for the particle size range specified in LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis.” Deviation to a smaller particle size may result in a low bias in carbohydrate content (and consequent high lignin bias) due to excessive carbohydrate degradation. Deviation to a larger particle size may also result in a low bias in carbohydrate content (and consequent high lignin bias) due to incomplete hydrolysis of polymeric sugars to monomeric sugars.

6.3 Samples containing extractives are not suitable for this procedure. Extractives will partition irreproducibly, resulting in a high lignin bias.

6.4 Samples with an ash content above 10 wt % may not be suitable for this procedure, as the sample may contain soil or other minerals that will interfere with appropriate acid concentrations and may catalyze side reactions.

6.5 Samples with a moisture content above 10 wt % may not be suitable for this procedure, as the excess moisture will interfere with appropriate acid concentrations. Samples should be dried (air-dried or oven dried at less than 40°C) prior to this procedure.

6.6 Samples containing protein will bias the acid insoluble lignin high unless the protein is accounted for in the gravimetric determination of acid insoluble material. An independent nitrogen analysis is required to estimate the protein content of the residue. The protein estimate is then subtracted from the acid insoluble residue measurement. Physical separation of the acid insoluble protein from the acid insoluble lignin is beyond the scope of this procedure.

6.7 This procedure is not suitable for samples containing added acid, base, or catalyst.

6.8 Certain guard columns for carbohydrate quantification may cause artifact peaks. Individual carbohydrates should be run on new columns and guard columns to verify to absence of artifact peaks.

2 Apparatus

6.2 Analytical balance, accurate to 0.1 mg.

6.3 Convection drying oven, with temperature control of $105 \pm 3^\circ\text{C}$.

6.4 Muffle furnace, equipped with a thermostat, set to $575 \pm 25^\circ\text{C}$ or equipped with optional ramping program.

6.5 Water bath, set at $30 \pm 3^\circ\text{C}$.

6.6 Autoclave, suitable for autoclaving liquids, set to $121 \pm 3^\circ\text{C}$.

6.7 Filtration setup, equipped with a vacuum source and vacuum adaptors for crucibles.

- 6.7 Desiccator containing desiccant.
- 6.8 HPLC system equipped with refractive index detector and the following columns:
 - 6.8.1 Shodex sugar SP0810 or Biorad Aminex HPX-87P column (or equivalent) with ionic form H^+/CO_3^- deashing guard column.
 - 6.8.2 Biorad Aminex HPX-87H column (or equivalent) equipped with an appropriate guard column.
- 6.9 UV-Visible spectrophotometer, diode array or single wavelength, with high purity quartz cuvettes of pathlength 1 cm.
- 6.10 Automatic burette, capable of dispensing 84.00 mL water, optional.

2 Reagents and Materials

1 Reagents

- 7.2.1 Sulfuric acid, 72% w/w (specific gravity 1.6338 at 20°C) – (also commercially available as a reagent for the determination of fluorine, from Fluka #00647).
- 7.2.2 Calcium carbonate, ACS reagent grade.
- 7.2.3 Water, purified, 0.2 μm filtered.
- 7.2.4 High purity standards: D-cellobiose, D(+)-glucose, D(+)-xylose, D(+)-galactose, L(+)-arabinose, and D(+)-mannose.
- 7.2.5 Second set of high purity standards, as listed above, from a different source (manufacturer or lot), to be used to prepare calibration verification standards (CVS).

2 Materials

- 7.2.1 QA standard, well characterized, such as a National Institute of Standards and Technology (NIST) biomass standard or another well characterized sample of similar composition to the samples being analyzed.
- 7.2.2 Pressure tubes, minimum 90 mL capacity, glass, with screw on Teflon caps and o-ring seals (Ace glass # 8648-30 tube with #5845-47 plug, or equivalent).
- 7.2.3 Teflon stir rods sized to fit in pressure tubes and approximately 5 cm longer than pressure tubes.
- 7.2.4 Filtering crucibles, 25 mL, porcelain, medium porosity, Coors #60531 or equivalent.
- 7.2.5 Bottles, wide mouth, 50 mL.
- 7.2.6 Filtration flasks, 250 mL.
- 7.2.7 Erlenmeyer flasks, 50 mL.
- 7.2.8 Adjustable pipettors, covering ranges of 0.02 to 5.00 mL and 84.00 mL.
- 7.2.9 pH paper, range 4–9.
- 7.2.10 Disposable syringes, 3 mL, fitted with 0.2 μm syringe filters.
- 7.2.11 Autosampler vials with crimp top seals to fit.

8. ES&H Considerations and Hazards

- 8.1 Sulfuric acid is corrosive and should be handled with care.
- 8.2 Use caution when handling hot pressure tubes after removal from the autoclave, as the pressurized tubes can cause an explosion hazard.
- 8.3 When placing crucibles in a furnace or removing them, use appropriate personal protective equipment, including heat resistant gloves.
- 8.4 Operate all equipment in accordance with the manual and NREL Safe Operating Procedures.
- 8.5 Follow all applicable NREL chemical handling procedures.

9. Sampling, Test Specimens, and Test Units

- 9.1 Care must be taken to ensure a representative sample is taken for analysis.

9.2 LAP “Preparation of Samples for Biomass Compositional Analysis” should be performed

prior to this analysis. Samples must have a minimum total solids content of 85%.

- 10.5 LAP “Determination of Extractives in Biomass” should be performed prior to this analysis if extractives are present in the sample.
- 10.6 LAP “Determination of Solids in Biomass” should be performed at the same time that samples for this analysis are weighed out.
- 10.7 This procedure is suitable for samples that have been air dried or lyophilized. Samples dried at a temperature of 45°C or higher are not suitable for this procedure.
- 10.8 Steps 9.2 to 9.4 should be applied to the QA standard.

10. Procedure

- 10.1 Prepare the sample for analysis and hydrolyze.
 - 10.1.1 Place an appropriate number of filtering crucibles in the muffle furnace at 575 ± 25 °C for a minimum of four hours. Remove the crucibles from the furnace directly into a desiccator and cool for a specific period of time, one hour is recommended. Weigh the crucibles to the nearest 0.1 mg and record this weight. It is important to keep the crucibles in a specified order, if they are not marked with identifiers. Permanent marking decals are available from Wale Apparatus. Do not mark the bottom of the filtering crucible with a porcelain marker, as this will impede filtration.
 - 10.1.2 Place the crucible back into the muffle furnace at 575 ± 25 °C and ash to constant weight. Constant weight is defined as less than ± 0.3 mg change in the weight upon one hour of re-heating the crucible.
 - 10.1.3 Weigh 300.0 ± 10.0 mg of the sample or QA standard into a tared pressure tube. Record the weight to the nearest 0.1 mg. Label the pressure tube with a permanent marker. LAP “Determination of Total Solids in Biomass” should be performed at the same time, to accurately measure the percent solids for correction. Each sample should be analyzed in duplicate, at minimum. The recommended batch size is three to six samples and a QA standard, all run in duplicate.
 - 10.1.4 Add 3.00 ± 0.01 mL (or 4.92 ± 0.01 g) of 72% sulfuric acid to each pressure tube. Use a Teflon stir rod to mix for one minute, or until the sample is thoroughly mixed.
 - 10.1.5 Place the pressure tube in a water bath set at 30 ± 3 °C and incubate the sample for 60 ± 5 minutes. Using the stir rod, stir the sample every 5 to 10 minutes without removing the sample from the bath. Stirring is essential to ensure even acid to particle contact and uniform hydrolysis.
 - 10.1.6 Upon completion of the 60-minute hydrolysis, remove the tubes from the water bath. Dilute the acid to a 4% concentration by adding 84.00 ± 0.04 mL deionized water using an automatic burette. Dilution can also be done by adding 84.00 ± 0.04 g of purified water using a balance accurate to 0.01 g. Screw the Teflon caps on securely. Mix the sample by inverting the tube several times to eliminate phase separation between high and low concentration acid layers.

Note: The volume of the 4% solution will be 86.73 mL, as demonstrated in the following calculations.

$$\text{Density } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4 = d_{72\% \text{ H}_2\text{SO}_4} = 1.6338 \text{ g/mL}$$

$$\text{Density H}_2\text{O} = d_{\text{H}_2\text{O}} = 1.00 \text{ g/mL}$$

$$\text{Density } 4\% \text{ H}_2\text{SO}_4 = d_{4\% \text{ H}_2\text{SO}_4} = 1.025 \text{ g/mL}$$

- 1. The weight of 3.00 mL 72% H₂SO₄ is:
 $3.0 \text{ mL } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4 \times d_{72\% \text{ H}_2\text{SO}_4} = 4.90 \text{ g } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4$
- 2. The composition of 3 mL of 72% H₂SO₄ is:

$$2 \text{ g 72\% H}_2\text{SO}_4 \times 72\% \text{ (acid wt)} = 3.53 \text{ g acid}$$

$$\text{g 72\% H}_2\text{SO}_4 \times 28\% \text{ (water wt)} = 1.37 \text{ g water}$$

3. The concentration of H₂SO₄ after dilution is:

$$3.53 \text{ g acid} / (84.00 \text{ g H}_2\text{O} + 4.90 \text{ g 72\% H}_2\text{SO}_4) = 3.97 \% \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ (w/w)}$$

4. The total volume of solution present after dilution is:

$$(4.90 \text{ g H}_2\text{SO}_4 + 84.00 \text{ g H}_2\text{O}) \times (d_{4\% \text{ H}_2\text{SO}_4})^{-1} = 86.73 \text{ mL}$$

- 10.1.7 Prepare a set of sugar recovery standards (SRS) that will be taken through the remaining hydrolysis and used to correct for losses due to destruction of sugars during dilute acid hydrolysis. SRS should include D-(+)glucose, D-(+)xylose, D-(+)galactose, -L-(+)arabinose, and D-(+)mannose. SRS sugar concentrations should be chosen to most closely resemble the concentrations of sugars in the test sample. Weigh out the required amounts of each sugar, to the nearest 0.1 mg, and add 10.0 mL deionized water. Add 348 μ L of 72% sulfuric acid. Transfer the SRS to a pressure tube and cap tightly.
- 10.1.7.1 A fresh SRS is not required for every analysis. A large batch of sugar recovery standards may be produced, filtered through 0.2 μ m filters, dispensed in 10.0 mL aliquots into sealed containers, and labeled. They may be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex the frozen SRS prior to use. If frozen SRS are used, the appropriate amount of acid must be added to the thawed sample and vortexed prior to transferring to a pressure tube.
- 10.1.8 Place the tubes in an autoclave safe rack, and place the rack in the autoclave. Autoclave the sealed samples and sugar recovery standards for one hour at 121°C, usually the liquids setting. After completion of the autoclave cycle, allow the hydrolyzates to slowly cool to near room temperature before removing the caps. (If step 10.2 is not performed, draw a 10 mL aliquot of the liquor for use in step 10.5.)
- 10.5.9 Analyze the sample for acid insoluble lignin as follows.
- Vacuum filter the autoclaved hydrolysis solution through one of the previously weighed filtering crucibles. Capture the filtrate in a filtering flask.
- Transfer an aliquot, approximately 50 mL, into a sample storage bottle. This sample will be used to determine acid soluble lignin as well as carbohydrates, and acetyl if necessary. Acid soluble lignin determination must be done within 6 hours of hydrolysis. If the hydrolysis liquor must be stored, it should be stored in a refrigerator for a maximum of two weeks. It is important to collect the liquor aliquot before proceeding to step 10.2.3.
- Use deionized water to quantitatively transfer all remaining solids out of the pressure tube into the filtering crucible. Rinse the solids with a minimum of 50 mL fresh deionized water. Hot deionized water may be used in place of room temperature water to decrease the filtration time.
- Dry the crucible and acid insoluble residue at 105 \pm 3 °C until a constant weight is achieved, usually a minimum of four hours.
- Remove the samples from the oven and cool in a desiccator. Record the weight of the crucible and dry residue to the nearest 0.1 mg.
- Place the crucibles and residue in the muffle furnace at 575 \pm 25 °C for 24 \pm 6 hours.
- A furnace with temperature ramping may also be used.
- Furnace Temperature Ramp Program:
Ramp from room temperature to 105 °C
Hold at 105 °C for 12 minutes

Ramp to 250 °C at 10 °C / minute
 Hold at 250 °C for 30 minutes
 Ramp to 575 °C at 20 °C / minute
 Hold at 575 °C for 180 minutes
 Allow temperature to drop to 105 °C
 Hold at 105 °C until samples are removed

10.2.7 Carefully remove the crucible from the furnace directly into a desiccator and cool for a specific amount of time, equal to the initial cool time of the crucibles. Weigh the crucibles and ash to the nearest 0.1 mg and record the weight. Place the crucibles back in the furnace and ash to a constant weight. (The amount of acid insoluble ash is not equal to the total amount of ash in the biomass sample. Refer to LAP “Determination of Ash in Biomass” if total ash is to be determined.)

2 Analyze the sample for acid soluble lignin as follows.
 On a UV-Visible spectrophotometer, run a background of deionized water or 4% sulfuric acid.

Using the hydrolysis liquor aliquot obtained in step 10.2.2, measure the absorbance of the sample at an appropriate wavelength on a UV-Visible spectrophotometer. Refer to section 11.3 for suggested wavelength values. Dilute the sample as necessary to bring the absorbance into the range of 0.7–1.0, recording the dilution. Deionized water or 4% sulfuric acid may be used to dilute the sample, but the same solvent should be used as a blank. Record the absorbance to three decimal places. Reproducibility should be ± 0.05 absorbance units. Analyze each sample in duplicate, at minimum. (This step must be done within six hours of hydrolysis.)

Calculate the amount of acid soluble lignin present using calculation 11.3.

16.2 Analyze the sample for structural carbohydrates.

10.4.1 Prepare a series of calibration standards containing the compounds that are to be quantified, referring to Table 1 for suggested concentration range. Use a four point calibration. If standards are prepared outside of the suggested ranges, the new range for these calibration curves must be validated.

10.4.1.1 Table 1. Suggested concentration ranges for 10.4.1 calibration standards

Component	Suggested concentration range (mg/ml)
D-cellobiose	0.1–4.0
D(+)glucose	0.1–4.0
D(+)xylose	0.1–4.0
D(+)galactose	0.1–4.0
L(+)arabinose	0.1–4.0
D(+)mannose	0.1–4.0
CVS	Middle of linear range, concentration not equal to a calibration point (2.5 suggested)

10.4.1.2 A fresh set of standards is not required for every analysis. A large batch of standards may be produced, filtered through 0.2 μm filters into autosampler



vials, sealed and labeled. The standards and CVS samples may be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex frozen standards prior to use. During every use, standards and CVS samples should be observed for unusual concentration behavior. Unusual concentrations may mean that the samples are compromised or volatile components have been lost. Assuming sufficient volume, standards and CVS samples should not have more than 12 injections drawn from a single vial. In a chilled autosampler chamber, the lifetime of standards and CVS samples is approximately three to four days.

- 10.4.2 Prepare an independent calibration verification standard (CVS) for each set of calibration standards. Use reagents from a source or lot other than that used in preparing the calibration standards. Prepare the CVS at a concentration that falls in the middle of the validated range of the calibration curve. The CVS should be analyzed on the HPLC after each calibration set and at regular intervals throughout the sequence, bracketing groups of samples. The CVS is used to verify the quality and stability of the calibration curve(s) throughout the run.
- 10.4.3 Using the hydrolysis liquor obtained in step 10.2.2, transfer an approximately 20 mL aliquot of each liquor to a 50 mL Erlenmeyer flask.
- 10.4.4 Use calcium carbonate to neutralize each sample to pH 5–6. Avoid neutralizing to a pH greater than 6 by monitoring with pH paper. Add the calcium carbonate slowly after reaching a pH of 4. Swirl the sample frequently. After reaching pH 5–6, stop calcium carbonate addition, allow the sample to settle, and decant off the supernatant. The pH of the liquid after settling will be approximately 7. (Samples should never be allowed to exceed a pH of 9, as this will result in a loss of sugars.)
- 10.4.5 Prepare the sample for HPLC analysis by passing the decanted liquid through a 0.2 μm filter into an autosampler vial. Seal and label the vial. Prepare each sample in duplicate, reserving one of the duplicates for analysis later if necessary. If necessary, neutralized samples may be stored in the refrigerator for three or four days. After this time, the samples should be considered compromised due to potential microbial growth. After cold storage, check the samples for the presence of a precipitate. Samples containing a precipitate should be refiltered, while still cold, through a 0.2 μm filter.
- 10.4.6 Analyze the calibration standards, CVS, and samples by HPLC using a Shodex sugar SP0810 or Biorad Aminex HPX-87P column equipped with the appropriate guard column.
 - HPLC conditions:
 - Injection volume: 10–50 μL , dependent on concentration and detector limits
 - Mobile phase: HPLC grade water, 0.2 μm filtered and degassed
 - Flow rate: 0.6 mL/minute
 - Column temperature: 80–85 $^{\circ}\text{C}$
 - Detector temperature: as close to column temperature as possible
 - Detector: refractive index
 - Run time: 35 minutes
 - Note: The deashing guard column should be placed outside of the heating unit and kept at ambient temperature. This will prevent artifact peaks in the chromatogram.
- 10.4.7 Check test sample chromatograms for presence of cellobiose and oligomeric sugars. Levels of cellobiose greater than 3 mg/mL indicate incomplete hydrolysis. Fresh samples should be hydrolyzed and analyzed.

- 14.1 Check test sample chromatograms for the presence of peaks eluting before cellobiose (retention time of 4–5 minutes using recommended conditions). These peaks may indicate high levels of sugar degradation products in the previous sample, which is indicative of over hydrolysis. All samples from batches showing evidence of over-hydrolysis should have fresh samples hydrolyzed and analyzed.
- 2 Analyze the sample for acetyl content if necessary.
 - 15.1 Prepare 0.005 M (0.01 N) sulfuric acid for use as a HPLC mobile phase. In a 2 L volumetric flask, add 2.00 mL of standardized 10 N sulfuric acid and bring to volume with HPLC grade water. Filter through a 0.2 μm filter and degas before use. If 10N sulfuric acid is not available, concentrated sulfuric acid may also be used. 278 μL concentrated sulfuric acid brought to volume in a 1 L volumetric flask with HPLC grade water will also produce 0.005 M sulfuric acid.
 - 15.2 Prepare a series of calibration standards containing the compounds that are to be quantified. Acetic acid is recommended, formic acid and levulinic acid are optional. A range of 0.02 to 0.5 mg/mL is suggested. An evenly spaced four point calibration is suggested. If standards are prepared outside of the suggested ranges, the new range for these calibration curves must be validated.
 - 15.3 Prepare an independent calibration verification standard (CVS) for each set of calibration standards, using components obtained from a source other than that used in preparing the calibration standards. The CVS must contain precisely known amounts of each compound contained in the calibration standards, at a concentration that falls in the middle of the validated range of the calibration curve. The CVS should be analyzed on the HPLC after each calibration set and at regular intervals throughout the sequence, bracketing groups of samples. The CVS is used to verify the quality and stability of the calibration curve(s) throughout the run.
 - 15.4 Prepare the sample for HPLC analysis by passing a small aliquot of the liquor collected in step 10.2.2 through a 0.2 μm filter into an autosampler vial. Seal and label the vial. If it is suspected that the sample concentrations may exceed the calibration range, dilute the samples as needed, recording the dilution. The concentrations should be corrected for dilution after running.
 - 15.5 Analyze the calibration standards, CVS, and samples by HPLC using a Biorad Aminex HPX-87H column equipped with the appropriate guard column.
 - HPLC conditions:
 - Sample volume: 50 μL
 - Mobile phase: 0.005 M sulfuric acid, 0.2 μm filtered and degassed
 - Flow rate: 0.6 mL/minute
 - Column temperature: 55–65 $^{\circ}\text{C}$
 - Detector temperature: as close to column temperature as possible
 - Detector: refractive index
 - Run time: 50 minutes

17. Calculations

- 16.1 Calculate the oven dry weight (ODW) of the extractives free sample, using the average total solids content as determined by the LAP “Standard Method for the Determination of Total Solids in Biomass.”

$$ODW = \frac{\text{Weight}_{\text{air dry sample}} \times \% \text{ Total solids}}{100}$$

12. Calculate and record the weight percent acid insoluble residue (AIR) and acid insoluble lignin (AIL) on an extractives free basis.

$$\% \text{ AIR} = \frac{\text{Weight}_{\text{crucible plus AIR}} - \text{Weight}_{\text{crucible}}}{\text{ODW}_{\text{sample}} \times 100}$$

$$\% \text{ AIL} = \frac{(\text{Weight}_{\text{crucible plus AIR}} - \text{Weight}_{\text{crucible}}) - (\text{Weight}_{\text{crucible plus ash}} - \text{Weight}_{\text{crucible}}) - \text{Weight}_{\text{protein}}}{\text{ODW}_{\text{sample}}} \times 100$$

Where:

Weight_{protein} = Amount of protein present in the acid insoluble residue, as determined in LAP “Determination of Protein Content in Biomass.” This measurement is only necessary for biomass containing high amounts of protein. Our studies have shown that, for a corn stover feedstock, only a minor fraction of the protein condenses into the residue. For a pretreated corn stover, a significant amount of the nitrogenous material condenses into the AIR. The amount of nitrogen in the residue can be determined. If a nitrogen value is determined, the user should be aware that the nitrogen-to-protein factor will no longer be valid, as the nitrogenous material will likely have degraded.

- 11.3 Calculate the amount of acid soluble lignin (ASL) on an extractives free basis.

$$\% \text{ ASL} = \frac{UV_{\text{abs}} \times \text{Volume}_{\text{filtrate}} \times \text{Dilution}}{\epsilon \times ODW_{\text{sample}} \times \text{Pathlength}} \times 100$$

Where:

UV_{abs} = average UV-Vis absorbance for the sample at appropriate wavelength (see table below)
 Volume_{hydrolysis liquor} = volume of filtrate, 86.73 mL

$$\text{Dilution} = \frac{\text{Volume}_{\text{sample}} + \text{Volume}_{\text{diluting solvent}}}{\text{Volume}_{\text{sample}}}$$

ϵ = Absorptivity of biomass at specific wavelength (see table below)

ODW_{sample} = weight of sample in milligrams

Pathlength = pathlength of UV-Vis cell in cm

Absorptivity constants for acid soluble lignin measurement for select biomass types

Biomass type	Lambda max (nm)	Absorptivity at lambda max (L/g cm)	Recommended wavelength (nm)	Absorptivity at recommended wavelength (L/g cm)
Pinus Radiata- NIST SRM 8493	198	25	240	12
Bagasse- NIST SRM 8491	198	40	240	25
Corn Stover- NREL supplied feedstock	198	55	320	30
Populus deltoides- NIST SRM 8492	197	60	240	25

Note: Lambda max values often contain interfering peaks from carbohydrate degradation products. Recommended wavelength values have been chosen to minimize these interferences.

11.4 Calculate the total amount of lignin on an extractives free basis.

$$\% \text{Lignin}_{\text{ext free}} = \% \text{AIL} + \% \text{ASL}$$

11.5 Calculate the total lignin value to an as received basis, if necessary

$$\% \text{Lignin}_{\text{as received}} = \left(\% \text{Lignin}_{\text{ext free}} \right) \times \frac{(100 - \% \text{Extractives})}{100}$$

Where:

% Extractives = percent extractives in the prepared biomass sample, as determined in LAP “Determination of Extractives in Biomass”

11.6 Create a calibration curve for each analyte to be quantified using linear regression. From these curves, determine the concentration in mg/mL of each component present in the samples analyzed by HPLC, correcting for dilution if required.

11.7 Calculate and record the amount of each calibration verification standard (CVS) recovered following HPLC analysis.

$$\% \text{ CVS recovery} = \frac{\text{conc. detected by HPLC, mg/mL} \times 100}{\text{known conc. of standard, mg/mL}}$$

11.8 For the sugar recovery standards (SRS), calculate the amount of each component sugar recovered after dilute acid hydrolysis, accounting for any dilution made prior to HPLC analysis. Average any replicate (%R_{sugar}) values obtained for each individual sugar and report %R_{avg, sugar}.

$$\% R_{\text{sugar}} = \frac{\text{conc. detected by HPLC, mg/mL}}{\text{known conc. of sugar before hydrolysis, mg/mL}} \times 100$$

11.9 Use the percent hydrolyzed sugar recovery values calculated in step 11.8 to correct the corresponding sugar concentration values obtained by HPLC for each of the hydrolyzed samples (C_{cor. sample}), accounting for any dilution made prior to HPLC analysis.

$$C_x = \frac{C_{\text{HPLC}} \times \text{dilution factor}}{\% R_{\text{ave. sugar}} / 100}$$

Where: C_{HPLC} = conc. of a sugar as determined by HPLC, mg/mL
 % R_{ave. sugar} = average recovery of a specific SRS component
 C_x = C_{cor. sample}, concentration in mg/mL of a sugar in the hydrolyzed sample after correction for loss on 4% hydrolysis

11.10 Calculate the concentration of the polymeric sugars from the concentration of the corresponding monomeric sugars, using an anhydro correction of 0.88 (or 132/150) for C-5 sugars (xylose and arabinose) and a correction of 0.90 (or 162/180) for C-6 sugars (glucose, galactose, and mannose).

$$C_{\text{anhydro}} = C_{\text{corr}} \times \text{Anhydro correction}$$

Note: To be completely correct, the hydrolysis of the hemicellulose branches should be accounted for in the xylan values, since the loss of functional groups adds either a proton or a hydroxide to the xylan. Two examples of branch compounds that are quantified in this LAP are acetate and minor sugars such as galactan, arabinan, and mannan. However, for the typical concentrations of acetate and minor sugars seen in biomass samples, the resulting changes in xylan values are negligible, and so this correction is not performed. If desired, the correction can be applied per the equations below. However, this correction actually increases the uncertainty of the xylan value, since the uncertainties of the measured concentration values of the minor sugars are much larger than for xylose. It also makes the assumption that each of the minor sugars and acetate groups branch directly from the xylan backbone, which is likely an erroneous assumption.

$$C_{\text{anhydro_xylan}} = (C_{\text{Xylose}} \times (1 - C_{\text{AAcorrection}} - C_{\text{Minorsugarcorrection}})) \times 132/150$$

$$\text{Where: } Xylose_{AA\text{correction}} = \frac{\text{Acetic acid concentration}}{Xylose \text{ _ concentration}} \times \frac{17(OH^- MW)}{132(xylose MW)}$$

$$Xylose_{Minorsugar\text{correction}} = \frac{\text{Minor sugar concentration}}{Xylose \text{ _ concentration}} \times \frac{1(H^+ MW)}{132(xylose MW)}$$

11.11 Calculate the percentage of each sugar on an extractives free basis.

$$\% \text{ Sugar}_{\text{ext free}} = \frac{C_{\text{anhydro}} \times V_{\text{filtrate}} \times \frac{1g}{1000mg}}{ODW_{\text{sample}}} \times 100$$

Where: V_{filtrate} = volume of filtrate, 86.73 mL

11.12 Calculate the percentage of each sugar on an as received basis, if necessary.

$$\% \text{ Sugar}_{\text{as received}} = \left(\% \text{ Sugar}_{\text{ext free}} \right) \times \frac{(100 - \% \text{ Extractives})}{100}$$

Where:

% Extractives = percent extractives in the prepared biomass sample, as determined in LAP "Determination of Extractives in Biomass"

11.13 Calculate the acetate percentage on an extractives free basis.

$$\% \text{ Acetate}_{\text{ext free}} = \frac{C_{AA, HPLC} \times \text{Volume}_{\text{filtrate}} \times \text{Conversion factor}}{ODW_{\text{sample}}} \times 100$$

Where:

$C_{AA, HPLC}$ = concentration in mg/mL of acetic acid as determined by HPLC

$\text{Volume}_{\text{hydrolysis liquor}}$ = volume of filtrate, generally 86.73 mL

Conversion factor = $(59/60) = 0.983$, the conversion from acetic acid to acetate in biomass

Note (July 8, 2011): The conversion factor has been updated from previous versions of the LAP. The previous value was $(43/60) = 0.717$.

11.14 Calculate the acetyl percentage on an as received basis, if necessary.

$$\% \text{ Acetyl}_{\text{as received}} = \left(\% \text{ Acetyl}_{\text{ext free}} \right) \times \frac{(100 - \% \text{ Extractives})}{100}$$

11.15 To report or calculate the relative percent difference (RPD) between two samples, use the following calculation.

$$RPD = \frac{(X_1 - X_2)}{X_{mean}} \times 100$$

Where:

X_1 and X_2 = measured values
 X_{mean} = the mean of X_1 and X_2

11.16 To report or calculate the root mean square deviation (RMS deviation) or the standard deviation (st dev) of the samples, use the following calculations.
 First find the root mean square (RMS) of the sample using:

$$RMS = x_m = mean = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n}}$$

Then find the root mean square deviation, or standard deviation, using:

$$RMS\ deviation = \sigma = stdev = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2}{n}}$$

Where:

x_m = the root mean square of all x values in the set
 n = number of samples in set
 x_i = a measured value from the set

12. Report Format

- 12.1 Report the weight percent of lignin, each sugar, and acetate. Report on an as received basis, correcting for extractives if necessary.
- 12.2 For replicate analyses, report the average and relative percent difference.

13. Precision and Bias

- 13.1 *Round robin testing* – For a report documenting an international round robin test of biomass analysis methods, including this procedure, see Milne et al., 1992.

2 Quality Control

- 13.1 Reported significant figures or decimal places: Determined by data quality objectives

and laboratory specific Quality Assurance Plan.

15. Replicates: Run all samples in duplicate.
16. Blank: None.
17. Relative percent difference criteria: Determined by data quality objectives and laboratory specific Quality Assurance Plan.
18. Calibration verification standard: Calibration verification standards should be independently prepared and analyzed as appropriate, per the procedure.
19. Sample size: 4g, minimum, of sample, extracted if necessary (including amount necessary for percent solids determination).
20. Sample storage: Hydrolysis liquors may be stored in a refrigerator for up to two weeks. Neutralized hydrolysis liquors may be stored in a refrigerator for up to four days.
21. Standard storage: HPLC standards should be stored in a freezer and removed when needed. Thaw and vortex samples prior to use.
22. Standard preparation: Standards should be prepared as described in the procedure, including a QA standard.
- 14.10 Definition of a batch: Any number of samples that are analyzed and recorded together. The recommended size is three to six samples with a QA standard, all run in duplicate.
- 14.11 Control charts: All CVS, SRS recoveries, and NIST or QA standards should be control charted.

15. Appendices

- 15.1 None

16. References

- 16.1 NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure “Determination of Total Solids in Biomass.”
- 16.2 NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure “Determination of Ash in Biomass.”
- 16.3 NREL BAT Team Laboratory Analytical Procedure “Determination of Extractives in Biomass.”
- 16.4 NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#002 “Determination of Structural Carbohydrate Content in Biomass by High Performance Liquid Chromatography.”
- 16.5 NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#003 “Determination of Acid Insoluble Lignin in Biomass.”
- 16.6 NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#017 “Determination of o-Acetyl Groups in Biomass by High Performance Liquid Chromatography.”
- 16.7 NREL CAT Task Laboratory Analytical Procedure#019 “Hydrolysis of Corn Stover for Compositional Analysis.”
- 16.8 Moore, W., and D. Johnson. 1967. *Procedures for the Chemical Analysis of Wood and Wood Products*. Madison, WI: U.S. Forest Products Laboratory, U.S. Department of Agriculture.
- 16.9 ASTM E1758-01 “Standard method for the Determination of Carbohydrates by HPLC.” In *2003 Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.05*. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, International
- 16.10 Milne, T. A.; Chum, H. L.; Agblevor, F. A.; Johnson, D. K. (1992). “Standardized Analytical Methods.” *Biomass & Bioenergy. Proceedings of International Energy Agency Bioenergy Agreement Seminar, 2-3 April 1992, Edinburgh, U.K.. Vol. 2(1-6), 1992; pp. 341-366*

17. List of Revisions

Version 08-03-2012:

- Page 11: Section 11.10 includes notes on the correction of the xylan number for minor sugars and acetate, as well as has a corrected $C_{anhydro_xylan}$ equation.

Version 07-08-2011:

- Page 9: Section 11.2 includes notes on nitrogenous material in AIR.
- Page 9-10: Section 11.3 includes pathlength in the ASL equation, which has always been assumed to be 1 cm, but may differ.
- Page 11-12: Section 11.10 includes explanations and equations to correct xylan for branched hemicelluloses components.
- Page 12: Section 11.13 corrects the acetic acid to acetate conversion factor.

Previous version (July 2010).