

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO-IF GOIANO-CAMPUS RIO VERDE PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

FRACIONAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA
COM O USO DE SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS
PROFUNDOS *NADES*

Autora: Luciene Teixeira Gonçalves Romão
Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro
Coorientadora: Dr.^a Suzana Maria L. de O. Marciolino
Coorientadora: Dr.^a Marilene da Silva Oliveira

RIO VERDE-GO
Novembro-2021

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO –IF-GOIANO-CAMPUS RIO VERDE- PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

FRACIONAMENTO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA
COM O USO DE SOLVENTES EUTÉTICOS NATURAIS
PROFUNDOS *NADES*

Autora: Luciene Teixeira Gonçalves Romão
Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro
Coorientadora: Dr.^a Suzana Maria L. de O. Marciolino
Coorientadora: Dr.^a Marilene da Silva Oliveira

Dissertação apresentada como parte das exigências para
obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto
Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – campus
Rio Verde - Área de concentração Agroquímica.

RIO VERDE-GO
Novembro-2021

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

RL937f Romão, Luciene Teixeira Gonçalves
Fracionamento de biomassa Lignocelulósica com o uso de solventes eutéticos naturais profundos NADES / Luciene Teixeira Gonçalves Romão; orientador Carlos Frederico de Souza Castro; co-orientadora Marilene Silva Oliveira. -- Rio Verde, 2021.
40 p.

Dissertação (Mestrado em Pós- graduação em Agroquímica) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2021.

1. fracionamento. 2. biomassa. 3. NADES. I. de Souza Castro, Carlos Frederico , orient. II. Silva Oliveira, Marilene, co-orient. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 107/2021 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

FRACIONAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA COM O USO DE SOLVENTES EUTÉTICOS
NATURAIS PROFUNDOS NADES

Autora: Luciene Teixeira Gonçalves Romão
Orientador: Carlos Frederico de Souza Castro

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica - Área de Concentração Agroquímica

APROVADA em 22 de novembro de 2021.

Prof. Dr. Alexsandro dos Santos
Felipe
Avaliador externo - IF Goiano /
Campus Rio Verde

Prof. Dr. Osvaldo Vilarini Junior
Avaliador interno - IF Goiano /
Campus Rio Verde

Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro
Presidente da Banca - IF Goiano / Campus Rio Verde

Documento assinado eletronicamente por:

- Alexsandro dos Santos Felipe, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 22/11/2021 15:03:43.
- Osvaldo Valarini Junior, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 22/11/2021 11:21:41.
- Carlos Frederico de Souza Castro, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 22/11/2021 11:10:51.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 18/08/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 301050
Código de Autenticação: c6df7dbbdd



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3620-5600

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder força, esperança, fé e perseverança sempre.

Ao meu esposo e meus filhos e familiares pela paciência, pelas ideias compartilhadas durante o meu estudo

Ao professor Dr. Carlos Frederico de Souza Castro, pela brilhante capacidade intelectual e pelo compromisso em compartilhar seu conhecimento e orientação

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Agroquímica do Instituto Federal Goiano

À professora Dr.^a Suzana Maria Loures, pela orientação dada em muitos momentos

À professora Dr.^a Marilene da S. de Oliveira, pela paciência prestada, pelos ensinamentos compartilhados

À coordenadora da escola Márcia, por ter a compreensão da importância do meu estudo e sempre me apoiar

Aos colegas da Central Analítica e dos demais laboratórios pelo auxílio prestado em vários momentos

Aos professores convidados participantes de todas as bancas, Suzana M. Loures, Celso Martins Belisário, Osvaldo Valarini, Alessandro dos Santos. Meu agradecimento especial às contribuições dadas ao projeto de dissertação que foram muito importantes.

Aos laboratórios onde foram realizadas as análises: laboratório de Química tecnológica (QUITEC), Central Analítica (CAIF) ambos do Instituto Federal Goiano-Campos Rio Verde e Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

BIOGRAFIA

Luciene Teixeira Gonçalves Romão, nascida em 30 de julho de 1983 em Anápolis-GO, Brasil; filha de Maria Antônia T. dos S. Gonçalves e Francisco Martins Gonçalves. Casada, mãe de Maria Teresa Gonçalves C. Romão e Gabriel Gonçalves C. Romão. Em 2004 ingressei na Universidade Estadual de Goiás - UEG onde graduei em Licenciatura em Química em 2008. Durante a faculdade fui aluna monitora das disciplinas de Química Geral Experimental e Química Inorgânica Experimental. Em 2008 atuei como professora bolsista pela rede SENAI-Anápolis-GO. Entre 2009 e 2010 atuei como professora de Química em regime de contrato da Rede Estadual de Goiás. Em 2010 também atuei como professora da Rede Estadual do Distrito Federal. Desde 2010 sou professora de Química da Rede Estadual de Ensino do Estado de Goiás. Em 2011 e 2013 exerci a função de professora supervisora do PIBID subárea Química pelo IF Goiano -Rio Verde. Entre 2014 e 2017 exerci a função de professora supervisora do PIBID subárea de física pela UFT-Universidade Federal do Tocantins, onde realizei publicações de trabalhos e apresentações em congresso e capítulo de livro na área de ensino de Ciências. Em 2019/02 ingressei no curso Pós-graduação em Agroquímica pelo IF Goiano que tem possibilitando agregar conhecimento, ampliar minha visão ao mundo da pesquisa e continuar trabalhando na perspectiva de poder incentivar os jovens a buscarem novas possibilidades para suas vidas na área de pesquisa, formação a qual já tem refletido na qualidade de ensino em que atuo.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	07
ABSTRACT	08
1.INTRODUÇÃO	09
2 <i>Revisão bibliográfica</i>	10
2.1 <i>Principais componentes da biomassa lignocelulósica</i>	10
2.2 <i>Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica</i>	12
2.3 <i>Aplicações da biomassa lignocelulósica</i>	13
2.4 <i>O uso do NADES para o fracionamento da biomassa lignocelulósica</i>	14
2.5 REFERÊNCIAS	15
3.OBJETIVOS	17
3.1 <i>Objetivo geral</i>	17
3.2 <i>Objetivo específico</i>	17
CAPÍTULO I: Fracionamento de Biomassa Lignocelulósica com o uso de solventes eutéticos Naturais Profundos NADES	18
RESUMO	18
ABSTRACT	19
1.Introdução	20
2 Material e Método	21
2.1 <i>Preparo físico da casca da amostra</i>	21
2.2 <i>Caracterização da biomassa da Casca de Eucalipto</i>	21
2.3 <i>Preparo do NADES</i>	22
2.4 <i>Fracionamento da biomassa com o uso de NADES</i>	22
2.5 <i>Métodos de caracterização</i>	22
2.6 <i>Análise estatística</i>	23
3 Resultados e Discussão	23
3.1 <i>Caracterização da biomassa da casca de eucalipto Urograndis</i>	23
3.2 <i>Resultados obtidos das FRC e FR) após o fracionamento da biomassa com NADES</i>	24
3.3 <i>Análise estatística</i>	24
3.4 <i>Aplicação da radiação micro- ondas combinado com NADES</i>	25
3.5 <i>Resultados obtidos pela análise do UV-vis</i>	25
3.6 <i>Análise da Espectroscopia FT -IR</i>	26
3.7 <i>Difratometria de Raios -X</i>	29
3.8 <i>MEV-Microscopia eletrônica de varredura</i>	31
4 Conclusão	32
5 Referências	33

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I	
Tabela 1 - Determinação dos teores dos principais constituintes da casca de eucalipto	23
Tabela 2 - Fração rica em celulose e Fração rica em lignina obtidas após os tratamentos de 1 hora e 8 horas	24
Tabela 3 - Índice de HBI, TCI, LOI da biomassa bruta e fracionada com <i>NADES</i>	28
Tabela 4 -Índice de cristalinidade da biomassa após o fracionamento da biomassa lignocelulósica fracionada com <i>NADES</i> por 1h	31

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1 INTRODUÇÃO	
Figura 1- biomassa lignocelulósica.	11
Figura 2- Efeitos dos pré-tratamentos em biomassa lignocelulósica	14
 CAPÍTULO I	 10
Figura 1: UV-vis .Espectros obtidos para os diferentes tratamentos com <i>NADES</i> . (●) <i>NADES</i> puro; (●) a temperatura ambiente (25°C); (●) aquecimento convencional 100°C; (●) micro-ondas potência 1000W	26
Figura 2: Espectros de FT- IR das amostras de biomassa fracionadas com <i>NADES</i> (●) <i>NADES</i> temperatura ambiente (1 h); (●) <i>NADES</i> puro; (●) <i>NADES</i> aquecimento convencional (100°C) 1h ; (●) <i>NADES</i> a temperatura ambiente (8h); (●) <i>NADES</i> micro-ondas potência 1000W	27
Figura 3 : Espectro de DRX da biomassa bruta	
Figura 4 : Espectros de DRX da biomassa bruta e fracionada com <i>NADES</i> . (●) biomassa fracionada com <i>NADES</i> a temperatura ambiente (25°C); (●) biomassa fracionada com <i>NADES</i> aquecimento convencional (100°C) 1h ; (●) biomassa fracionada com <i>NADES</i> micro-ondas potência 1000W	30
Figura 5- Imagens da Microscopia Eletrônica de varredura da biomassa após fracionamento com <i>NADES</i> : A = Biomassa bruta; B= Biomassa fracionada à temperatura ambiente (1h); C= Biomassa fracionada com aquecimento convencional (1h); D= biomassa fracionada com radiação micro-ondas potência 1000W 1h.	32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

NADES – Solvente eutético natural profundo

FRL– Fração rica em lignina

FRC– Fração rica em celulose

FT- IR – Infravermelho com transformação Fourier

MEV–Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura

Des– Solvente eutético profundo

ChCl – Cloreto de colina

HBD– doador de hidrogênio

HBA– aceitador de ligação de hidrogênio

LA– Ácido Lático

Nm– Nanômetros

DRX– Difractometria de raio-X

UV-vis – Espectroscopia na região do ultravioleta

TCI– Índice de cristalinidade total

HBO– Intensidade da ligação de hidrogênio

LOI– Cristalinidade de ordem lateral

NCC-Nanocelulose cristalina

NCF- Nanocelulose fibrilar

NPs-Nanopartículas

RESUMO

ROMÃO, LUCIENE TEIXEIRA GONÇALVES. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, agosto de 2021. **Fracionamento de Biomassa Lignocelulósica com o uso de solventes eutéticos Naturais Profundos NADES.** Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro, Coorientadoras: Dr.^a Marilene Oliveira Silva. Dr.^a Suzana Maria Loures M. de Oliveira.

A casca do eucalipto é estudada por armazenar inúmeros produtos químicos, como açúcares, ceras, pectinas, álcoois, óleos. E, para aumentar a acessibilidade e reduzir a recalcitrância da biomassa lignocelulósica, existem pré-tratamentos que removem a hemicelulose e /ou modificam a estrutura da lignina e são importantes para expor a celulose. Entre eles estão os solventes eutéticos naturais profundos, em inglês (*NADES*) que apresentam baixa toxicidade, baixo custo, capacidade de solubilização e baixa volatilidade. O objetivo do presente estudo foi realizar o fracionamento da biomassa da casca do eucalipto da espécie *Eucalyptus urograndis* em duas frações: fração rica em celulose (FRC) e fração rica em lignina (FRL) utilizando *NADES* à base de glicose, frutose e sacarose. Os resultados obtidos mostram que para o mesmo tempo de exposição da biomassa ao *NADES* de 1 h foram fracionados via aquecimento convencional 100°C 72,25% da FRC e 27,75% do FRL e 72,54% da FRC e 27,46% da FRL via micro-ondas aplicada potência de 1000W e 6000W por 1h, tais condições se mostraram estatisticamente semelhantes e eficazes para o fracionamento da massa biomassa. O tratamento da biomassa com *NADES* a temperatura ambiente por 8h foi estatisticamente significativo quando comparado aos demais, foram fracionamentos 82,51% da FRC e 17,49% do FRL. A Espectroscopia de absorção UV-vis para fracionamento convencional e micro-ondas 1000W de potência, indicou absorções na faixa de 280nm. Os resultados dos espectros do FT-IR indica modificações nas bandas entre as vibrações de 1640cm⁻¹ do esqueleto aromático C = C. Na faixa de 1160 cm⁻¹ e 1154 cm⁻¹ das soluções com aquecimento convencional e micro-ondas por 1h, vibração do C-O-C atribuída à vibração de grupos típicos de lignina. Deformação angular na faixa de 870 cm⁻¹ atribuída ao grupo CO, metoxila, nas soluções de *NADES* via micro-ondas e convencional. O DRX indica alteração do índice de cristalinidade atribuído ao uso do *NADES* que contribuiu para a remoção e/ou modificação da parte amorfa (rica em hemicelulose e lignina) diminuindo a recalcitrância. O MEV mostra a deformação e o afrouxamento das fibras das tratadas com *NADES* quando comparadas à biomassa bruta. O índice de TCI, HBO, LOI, a diminuição de HBO denota mudanças nas ligações de hidrogênio intra e intermolecular entre grupos hidroxila na celulose e convergem com mudanças na cristalinidade. O *NADES* possui propriedades interessante como (facilidade de síntese, biodegradabilidade) sendo uma alternativa versátil para o fracionamento da biomassa lignocelulósica.

Palavras-chave: Biomassa de eucalipto, Fracionamento, *NADES*

ABSTRACT

ROMÃO, LUCIENE TEIXEIRA GONÇALVES. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, agosto de 2021. **Lignocellulosic Biomass Fractionation using Deep Natural Eutectic Solvents *NADES***. Advisor: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro, Co-advisors: Dr.^a Marilene Oliveira Silva and Dr.^a Suzana Maria Loures M.de Oliveira.

Eucalyptus bark is studied for storing numerous chemicals, such as sugars, waxes, pectins, alcohols, oils. And, to increase accessibility and reduce recalcitrance of lignocellulosic biomass, there are pretreatments that remove hemicellulose and/or modify the structure of lignin and are important to expose cellulose. Among them are the natural deep eutectic solvents (*NADES*) that have low toxicity, low cost, solubilization capacity and low volatility. The objective of the present study was to perform the fractionation of the bark biomass of *Eucalyptus urograndis* species into two fractions: cellulose-rich fraction (CRF) and lignin-rich fraction (LRF) using *NADES* based on glucose, fructose and sucrose. The results obtained show that for the same exposure time of biomass to *NADES* of 1 h were fractionated via conventional heating 100°C 72.25% of CRF and 27.75% of LRF and 72.54% of CRF and 27.46% of LRF via microwave applied power of 1000W and 600W for 1h, such conditions proved to be statistically similar and effective for the fractionation of biomass mass. The treatment of biomass with *NADES* at room temperature for 8h was statistically significant when compared to the others, were fractionations 82.51% of CRF and 17.49% of LRF. UV-vis absorption spectroscopy for conventional fractionation and microwave 1000W power, indicated absorptions in the 280nm range. The results of FT-IR spectra indicate modifications in the bands between the 1640cm⁻¹ vibrations of the C = C aromatic skeleton. In the range of 1160 cm⁻¹ and 1154 cm⁻¹ of the solutions with conventional and microwave heating for 1h, vibration of C-O-C attributed to the vibration of typical lignin groups. Angular deformation in the 870 cm⁻¹ range attributed to the CO, methoxyl group in the *NADES* solutions via microwave and conventional heating. XRD indicates change in crystallinity index attributed to the use of *NADES* that contributed to the removal and/or modification of the amorphous part (rich in hemicellulose and lignin) decreasing recalcitrance. The SEM shows the deformation and loosening of the fibers of those treated with *NADES* when compared to the raw biomass. The index of TCI, HBO, LOI, the decrease of HBO denotes changes in intra and intermolecular hydrogen bonds between hydroxyl groups in the cellulose and converge with changes in crystallinity. *NADES* has interesting properties such as (ease of synthesis, biodegradability) being a versatile alternative for lignocellulosic biomass fractionation.

Keywords: Biomass, Fractionation, *NADES*.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* tem a sua origem na Austrália, Tasmânia e outras ilhas da Oceania. Existem a cerca de 730 espécies reconhecidas botanicamente e pertencente à família *Myrtaceae* e as espécies pertencentes a este gênero são de rápido crescimento e grande, crescem de maneira satisfatória nas mais diversas regiões do mundo em diferentes condições ambientais. As espécies mais utilizadas no momento, em função das características de suas madeiras, são: *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus viminalis*, híbridos de *E. grandis* com *E. urophylla* e *Eucalyptus dunnii* (região sul do Brasil). Para a região Sul, também se destaca o potencial de utilização do *Eucalyptus benthamii*, por sua tolerância a geadas (EMBRAPA,2021). ^[1]

O eucalipto é uma das árvores mais plantadas do mundo, é uma espécie de fácil adaptação as mais diversas condições de clima e solo, além das muitas formas de utilização de sua madeira pela indústria (SILVA,2009). ^[2]

Os estados que lideram a plantação de eucalipto no Brasil tanto por hectares e árvores plantadas são: Minas Gerais 1.920.329, São Paulo 1.215.901, Mato Grosso do Sul com 1.124.637 hectares. Em 2019, o país se manteve como segundo maior produtor de celulose, atingindo 19,7 milhões de toneladas fabricadas. A produção de papel no Brasil subiu 1,0% em 2019, somando 10,5 milhões de toneladas. A alta foi puxada especialmente pelos papéis para fins sanitários e para embalagem, que somaram 1,3 milhão de toneladas (+6,2%) e 5,5 milhões/ton. (+2,4%), respectivamente (IBÁ,2021). ^[3]

As florestas plantadas são capazes de sequestrar elevada quantidade de dióxido de carbono (CO₂) da atmosfera, auxiliando na remoção de (CO₂) que acontece através da fotossíntese, permitindo que o carbono se fixe na biomassa da vegetação e nos solos, por isso desempenha papel importante em relação ao aquecimento global. As cascas de eucaliptos possuem em seus componentes químicos, açúcares, álcoois, óleos, ceras, pectinas, resinas, celulose, hemicelulose, lignina, entre outros. Entretanto, para a produção de celulose e papel a

preocupação é voltada para os principais teores, que são a celulose, hemicelulose e lignina. Além da celulose e papel as cascas também podem ser utilizadas para a produção de combustível, cobertura morta ao solo, adubo, produção de carvão vegetal, fotoquímicos, entre outros (FOELKEL,2021).^[4]

Dentre os procedimentos químicos para separar os componentes lignocelulósicos destacam-se pré-tratamentos ácidos e alcalinos. Dependendo do aditivo de polpação, eles também podem dar origem a uma lignina contendo enxofre que é o principal processo de extração comercial, inclui Kraft e ligninas lignossulfonato (KALLVUS,2015).^[5]

Para aumentar a acessibilidade um estudo realizado por (Brienzo et al., 2015) demonstra que a existem pré-tratamentos que removem a hemicelulose e removem ou modificam a estrutura da lignina e são importantes por expor a celulose .^[6]

Nesse sentido o presente estudo está relacionado ao efeito dos solventes eutéticos naturais profundos *NADES* para o fracionamento da biomassa da casca de eucalipto da espécie *E. urograndis* associado com a radiação de micro-ondas, visando o aproveitamento da biomassa vegetal na forma de resíduos da agricultura e utilizando um solvente ecologicamente sustentável, de baixo custo para promover o fracionamento da biomassa lignocelulósica.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Principais componentes da Biomassa lignocelulósica

Biomassa é qualquer matéria orgânica com conteúdo de energia química que possa ser transformada em energia mecânica, térmica ou elétrica. Pode ser de origem florestal, agrícola, de rejeitos urbanos, industriais ou animais, e seus derivados podem ser obtidos por intermédio de biorrefinarias, a depender tanto da matéria-prima utilizada quanto da tecnologia de processamento para obtenção dos energéticos. Destaca-se o interesse na biomassa florestal como matéria-prima para as biorrefinarias no Brasil em função de: as florestas brasileiras serem certificadas como cultivos sustentáveis, muitas vezes realizados em áreas degradadas, significando que competem muito pouco por terras destinadas aos cultivos agrícolas de alimentos; e os produtos florestais não estarem sujeitos a influências sazonais e poderem ser colhidos durante o ano todo com elevada produtividade (EMBRAPA 2021) .^[1]

A biomassa vegetal inclui materiais lignocelulósica, carboidratos, lignina, proteínas, gorduras, vitaminas, corantes, sabores e essências aromáticas de vários tipos de estrutura química. A composição, por sua vez, determina a facilidade com que a biomassa pode ser convertida em intermediários e afeta a funcionalidade do produto. Desse modo, a variação na composição de uma determinada biomassa requer algumas adaptações no método de conversão. A porcentagem de cada um dos componentes principais varia entre 30% e 50% para a celulose, 20% e 40% para a hemicelulose e 10% e 20% para a lignina (MIKA e NÉMETH ,2018).^[7]

A hemicelulose é um heteropolímero formado por aldopentoses (xilose e arabinose), aldo-hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (SANTOS et al., 2012).^[8]

A lignina é um heteropolímero amorfo, composto por três moléculas de fenilpropano sua finalidade biológica é conferir rigidez à planta, impermeabilidade aos tecidos e prover resistência a ataques microbianos. Sua estrutura é amorfa, é um composto insolúvel em água e opticamente inativo. A característica mais importante da lignina é a sua rigidez que atua não apenas dando força ao tecido vegetal e aumentando a sua resistência, mas também impede o colapso dos elementos condutores de água devido à sua hidrofobicidade . A lignina apresenta o anel aromático dos três álcoois. São chamados de *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), quando ele não é metoxilado, ou possui uma ou duas metoxilas, respectivamente (OLIVEIRA ,2016) .^[9]

A lignocelulose está presente nas células dos vegetais, dando sustentação à parede celular, conforme demonstrado na Figura 1 (ZAMPIERI ,2011).^[10]

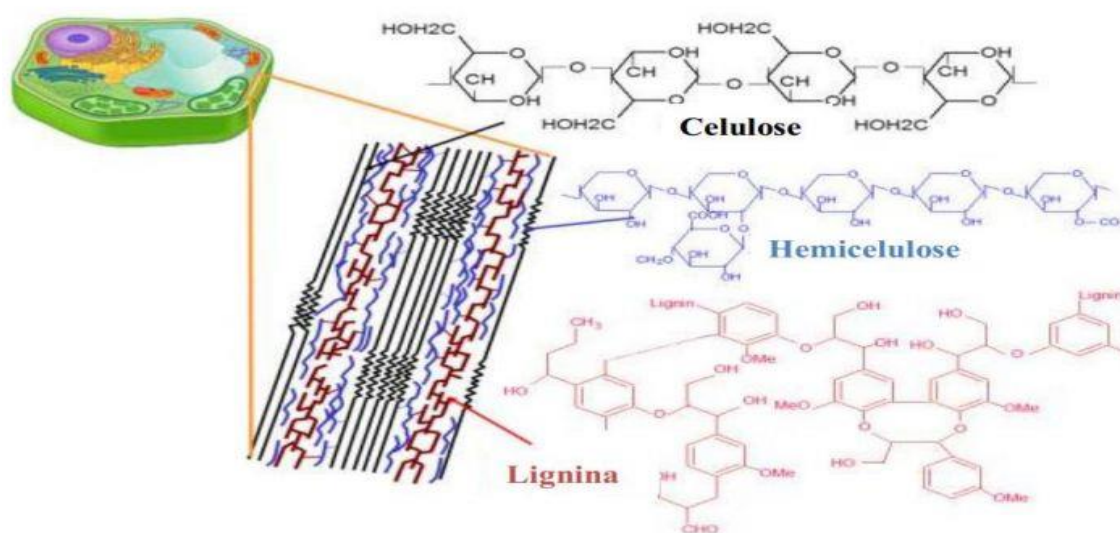


Figura1: biomassa lignocelulósica. Fonte ^[10]

A celulose possui regiões amorfas e cristalinas com diferentes características. As regiões cristalinas são formadas por microfibras, que são arranjos paracristalinos de dezenas de cadeias de (1,4) β -D-glicose unida por ligações de hidrogênio ao longo do seu comprimento, formando uma cadeia de glicose melhor organizada que as regiões amorfas. A celulose é um carboidrato formado por unidades de glicose, e o número de unidades na cadeia de uma molécula de celulose é o que se chama de grau de polimerização (PEREZ et al., 2013). ^[11]

2.2 Pré- tratamentos da biomassa lignocelulósica

O processo de lignossulfonato (sulfito), a abordagem de polpação ácida mais antiga, é inicialmente usado para a extração de celulose em processo de produção de papel. Este método é baseado na aplicação de sulfito e bissulfito em combinação com vários contraíons. O licor de polpação é preparado pela combustão de enxofre controlado com oxigênio, e o dióxido de enxofre resultante reage com a água, dando origem ao ácido sulfúrico. Envolve procedimento de isolamento complexo para o lignossulfonato solúvel em água: ocorre a complexação com alquilamina de cadeia longa, forma um produto insolúvel em água, em seguida, uma extração orgânica do complexo e a regeneração do lignossulfonato adicionando uma base (AZADI, et al.) ^[12]

Os processos alcalinos e ácidos são aplicados na maior parte da produção de celulose e lignina no mundo por sua alta eficiência energética. A polpação com soda é uma das formas mais simples de um processo alcalino. Esse processo geralmente é aplicado para biomassa não lenhosa, como palha, cana-de-açúcar e bagaço. Neste método, a lignocelulose é tratada com solução de NaOH (10-15% em peso) a uma temperatura a cerca de 150-200°C. A deslignificação é uma consequência da saponificação das ligações éster entre a lignina e a hemicelulose, enquanto a desconstrução parcial da lignina ocorre por meio da clivagem das ligações éter α e β . Assim, as ligninas derivadas do processo de soda podem ser mais adequadas e ter vantagens para aplicações de alto valor, como em compósitos e bioplásticos (CHEN,2014). ^[13]

É um método de polpação de madeira que usa solventes orgânicos para dissolver a lignina e hemicelulose da biomassa de lignocelulose; baseiam-se no tratamento hidrotérmico da biomassa com mistura de água, um solvente orgânico (metanol, etanol, acetona, ácidos orgânicos, aminas e cetonas) e aditivos adicionais para produzir uma lignina de alta qualidade sem enxofre. A lignina resultante apresenta pequenas mudanças neste método em comparação com a lignina nativa (MUSSATO,2016). ^[14]

O Procedimento Organosolv é um pré-tratamento de biomassa com mistura de água e solvente orgânico a temperaturas elevadas (a cerca de 200°C) e pressão. O objetivo principal de Organosolv é a deslignificação da biomassa para liberar a celulose para processamento posterior (LORA e GLASSER, 2002).^[15]

A figura a seguir apresenta de forma esquemática os efeitos dos pré-tratamentos em biomassa lignocelulósica.

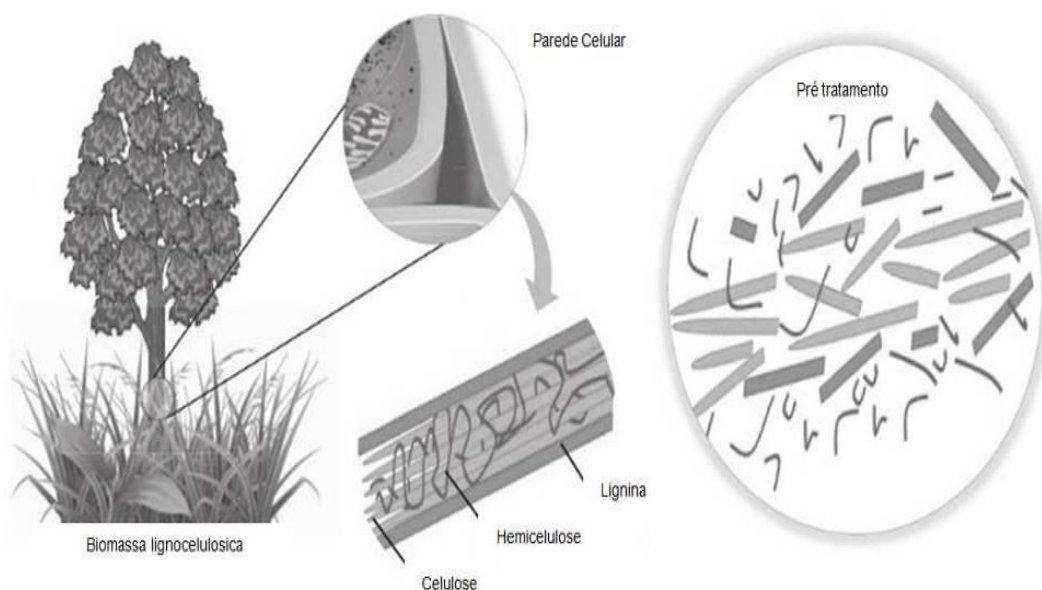


Figura 2 : Efeitos dos pré-tratamentos em biomassa lignocelulósica. Fonte:^[15]

2.3 Aplicações da biomassa lignocelulósica

As frações da biomassa lignocelulósica obtidas após o fracionamento podem ser utilizadas para diversas aplicações: por exemplo, as porções celulósicas e hemicelulósicas da biomassa podem ser hidrolisadas a vários açúcares e então fermentadas. Os principais açúcares e derivados presentes nas hemiceluloses são xilose, arabinose, glicose, galactose, manose, ácido glicurônico, além de grupos acetila as ligninas, por sua vez, podem ser degradadas a frações de massas molares menores, sendo utilizadas em vários processos químicos, como na fabricação de espumas de poliuretanos, resinas fenólicas e epóxi, na produção de fenol e etileno, e podem ser convertidas em fibras de carbono (KADLA et al., 2002).^[16]

A hemicelulose pode ser útil na obtenção de produtos altamente valorizados, tais como hidrogéis para a indústria farmacêutica, bioplásticos, resinas furânicas e reagentes

químicos verdes. As fibras de celulose, extraídas das árvores, são usadas também na indústria têxtil, juntamente com algodão, linho e outras fibras naturais. Seu uso é para a produção de tecidos que serão utilizados nas mais variadas peças de vestuário (Kadam e JACOBSON ,2000).
[17]

A celulose pode ser usada também como material de construção e isolador elétrico. É empregada em materiais domésticos comuns, como filtros de café, esponjas, colas, colírios, laxantes e filmes. Além disso, a celulose também pode servir de biomassa para produção de biocombustível. A obtenção de nanocelulose fibrilar (NCF) e cristalina (NCC) também se mostra potencialmente promissora tanto para a melhoria no revestimento e resistência de papéis (NCF) quanto para a utilização na elevação da força, resistência, refletividade e impermeabilidade de materiais (NCC) .A lignina pode ser aplicada em vários setores industriais e biomédicos, como produtos químicos, biocombustíveis e polímero; e o desenvolvimento de nanomateriais para entrega de fármacos, mas essas aplicações dependem da fonte, modificações químicas e propriedades físico-químicas (FIGUEIREDO et al., 2018).^[18]

A conversão de microlignina em NPs de lignina é promissora rumo à sustentabilidade, porque a lignina preparada a partir de resíduos industriais e agrícolas, e pelos princípios da química verde, estimula suas aplicações. A produção de alto rendimento de NPs de lignina foi relatada em vários meios, incluindo óleo de rícino, etilenoglicol e água, e seus efeitos sobre tamanhos e morfologias foram avaliados (LIU et al., 2019).^[19]

2.4 Uso do NADES para o fracionamento da biomassa lignocelulósica

Os *NADES* têm recebido atenção considerável da indústria bioquímica e alimentar, por sua baixa toxicidade e baixo custo, capacidade de solubilização e baixa volatilidade em temperatura ambiente. São formados por doadores de hidrogênio e receptores de hidrogênio. Sua estrutura apresenta interações intermoleculares fortes entre esses componentes, podendo ou não apresentar água em suas composições.^[20]

Em sua maioria apresentam excelente capacidade de solubilização de compostos polares e não polares, metabólitos pouco solúveis ou insolúveis em água, além de macromoléculas, como as proteínas e polissacarídeos. Sua alta capacidade de solubilização está relacionada com sua estrutura que possui ampla polaridade. Os *NADES* estão sendo usados em diversas áreas, na área de alimentos destacando algumas aplicações como a extração de

compostos e flavonoides, na preservação de antioxidantes na hidrólise da lignina da biomassa de arroz extração de ácido palmítico também na separação de ácidos graxos livres do óleo. [21]

5 REFERÊNCIAS

[1] EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Disponível em <https://www.embrapa.br/florestas/transferecia-de-tecnologia/eucalipto>. Acesso em 10 jan. de 2021

[2] A. L. L, Silva. Tolerância **ao resfriamento e congelamento de folhas de eucalipto**. Biociências, Porto Alegre, 17 (2009) 86-90.

[3] INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – IBÁ. Relatório técnico – Ano base 2016. 100p. Disponível em: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-iba-2020.pdf>. Acesso 10 jan. 2021.

[4] FOELKEL, C. Eucalyptus online book, [2010]. Disponível em: Disponível em: Acesso em: 08 jan. 2021.

[5] KALLVUS, U, KARNER, K EOMAA, M. Determinação semiquantitativa rápida de lignina de aspen em produtos lignocelulósicos, Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, 64 (1S), (2015) 105-112.

[6] BRIENZO, M., FIKIZOLO, S., BENJAMIN, Y., TYHODA, L., & GÖRGENS, J. **Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples**. Renewable Energy, 104 (2017) 271-280.

[7] MIKA, L. T.; CSÉFALVAY, E.; NÉMETH, Á. Catalytic conversion of carbohydrates to initial platform chemicals: Chemistry and sustainability. **Chemical reviews**, v. 118, p. 505–613, 2018.

[8] SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012

[9] OLIVEIRA, C. A. P. **Estudo do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido acético diluído em sistema pressurizado**. p. 28-29, 2016.

[10] ZAMPIERI, D. EXPRESSÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO EM *Penicillium echinulatum*. [s.l.] Universidade de Caxias do Sul, 2011.

[11] L. Perez-Cantu, A. Schreiber, F. Schütt, B. Saake, C. Kirsch and I. Smirnova, **Comparison of pretreatment methods for rye straw in the second generation biorefinery: effect on cellulose, hemicellulose, and lignin recovery** Bioresource. Technol., vol ,142, 428–435.2013.

- [12] Azadi, Pooya & Inderwildi, Oliver R. & Farnood, Ramin & King, David A., "**Liquid fuels, hydrogen and lignin chemicals: A critical review** " *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Elsevier 21 (2013) 506-523.
- [13] CHEN, H. Chemical composition and structure of natural lignocellulose. **Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice**. Dordrecht: Springer Netherlands, (2014) 25–71.
- [14] MUSSATTO, S. I. **Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery**. Amsterdam: Elsevier, 2016. 648 p.
- [15] Lora JS, Glasser WG. Recent Industrial applications of lignin: A sustainable alternative to Nonrenewable materials. **Journal of Polymers Environment**. 2002; 10:39-48.
- [16] Kadla JK, Kubo S, Venditti RA, Gilbert RD, Compere AL, Griffith W. Lignin-based carbon fibers for composite fiber applications. *Carbon*. 2002; 40:2913-20.
- [17] Kadam KL, Forrest LH, Jacobson WA. Rice straw as a lignocellulosic resource: collection, processing, transportation, and environmental aspects. **Biomass and Bioenergy**. 2000; 18:369-89.
- [18] FIGUEIREDO, Patrícia. et al. **Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications**. Editora Elsevier. *Progress in Materials Science*. Vol 93, pag 233-269, 2018.
- [19] Y. Liu, J. Zheng, J. Xiao, X. He, K. Zhang, S. Yuan, Z. Peng, Z. Chen and X. Lin, **Enhanced Enzymatic Hydrolysis and Lignin Extraction of Wheat Straw by Triethylbenzyl Ammonium Chloride/Lactic Acid-Based Deep Eutectic Solvent Pretreatment** *ACS Omega*, vol 4, 2019.
- [20] Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IW, Witkamp GJ, Verpoorte R. **Plant Physiol**. 2011; 156 : 1701–1705
- [21] DAI. Y. et al., **Natural deep eutectic solvents as new potential media for green Technology**, *Analytica Chimica Acta*, Leiden University, The Netherlands, 766 (2013) 61-68.

3.OBJETIVOS

3.1 Geral

Promover o fracionamento da biomassa da casca de eucalipto através do uso de solventes eutéticos naturais profundos (*NADES*) .

3.2 Específicos

- Quantificar os teores de celulose, hemicelulose e lignina;
- Avaliar o efeito do *NADES* sobre e disponibilização da Fração rica em celulose (FRC) e Fração rica em lignina (FRL);
- Avaliar o efeito da radiação micro-ondas sobre e disponibilização da (FRC) e (FRL);
- Comparar o uso de micro-ondas com o aquecimento convencional;
- Caracterizar as amostras (FRL) por UV-vis, Espectroscopia vibracional na região do infravermelho – FTIR;
- Caracterizar a (FRC) por microscopia eletrônica de varredura -MEV, Espectroscopia vibracional na região do infravermelho - FTIR e Difratomia de Raios-X- DRX para cristalinidade.

Capítulo I

(segundo as normas da revista Biomass & Bioenergy)

Fracionamento de Biomassa Lignocelulósica com o uso de solventes eutéticos Naturais Profundos *NADES*

RESUMO

O Brasil apresenta posição privilegiada na liderança do aproveitamento integral da biomassa vegetal pois possui a maior biodiversidade do planeta. A agregação de valor em uma refinaria está associada ao tratamento, desagregação dos componentes da biomassa, e em sua conversão em produtos intermediários como óleos, açúcares, biogás. A composição química da madeira varia de acordo com a espécie, partes da árvore e condições ambientais. Sendo possível separar em dois grupos de componentes químicos: estruturais e não estruturais (extrativos). Nesse contexto engloba-se as substâncias macromoleculares como: a celulose, as hemiceluloses e a lignina. Há processos aplicados ao fracionamento da biomassa em que uma ou mais etapas de pré-tratamento da biomassa são necessárias, com o intuito de remover ou quebrar as camadas de lignina e hemicelulose, o que permite que as enzimas acessem a celulose com mais facilidade. Diante disto a combinação de diferentes pré-tratamentos e enzimas para hidrólise de biomassa gera uma grande diversidade de rotas tecnológicas e podem ser utilizadas técnicas alternativas que vêm sendo desenvolvidas como o uso do solvente eutético natural profundo (*NADES*). Assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar o fracionamento da biomassa da casca do eucalipto da espécie *Urograndis* em duas frações: Fração rica em celulose (FRC) e Fração rica em lignina (FRL) utilizando *NADES*. Neste processo foram aplicadas três condições para o fracionamento da biomassa: aquecimento convencional (100°C), radiação de micro-ondas com potência de 600W e 1000 W e a temperatura ambiente 25°C. Os percentuais obtidos via aquecimento convencional foram 72,25% da FRC, 27,75% da FRL; 72,54% da FRC com radiação de micro-ondas a uma potência de 1000W, 27,46% da FRL. Para o tratamento aplicada a radiação de 600W foram obtidos: 70,61% da FRC e 29,39% da FRL. As técnicas utilizadas para caracterização da (FRC) foram: espectroscopia de infravermelho FT-IR e Difratomia de raio -X para análise da cristalinidade e microscopia eletrônica de varredura MEV. Para caracterização da (FRL) foram utilizadas as técnicas: UV-vis e FT-IR. Foram calculados os índices de cristalinidade total (TCI), o índice de ordem lateral (LOI) e a intensidade da ligação de hidrogênio (HBI). O uso do *NADES* um solvente orgânico de baixo custo, sustentável combinado a radiação micro-ondas mostrou-se eficiente para o fracionamento da biomassa nessas frações.

Palavras-chave: Biomassa, Fracionamento, *NADES*

ABSTRACT

Brazil has a privileged position as a leader in the integral use of vegetable biomass because it has the largest biodiversity on the planet. Adding value to a refinery is associated with the treatment and disintegration of biomass components, and its conversion into intermediary products such as oils, sugars, and biogas. The chemical composition of wood varies according to the species, parts of the tree and environmental conditions. It is possible to separate them into two groups of chemical components: structural and non-structural (extractives). In this context, macromolecular substances such as cellulose, hemicelluloses and lignin are included. There are processes applied to biomass fractionation in which one or more biomass pre-treatment stages are required, with the purpose of removing or breaking down the lignin and hemicellulose layers, which allows enzymes to access cellulose more easily. Given this, the combination of different pre-treatments and enzymes for hydrolysis of biomass generates a wide diversity of technological routes and can be used alternative techniques that have been developed as the use of deep natural eutectic solvent (*NADES*). Thus, the objective of the present work was to perform the fractionation of the biomass of the bark of the eucalyptus species *Urograndis* in two fractions: Cellulose rich fraction (CRF) and Lignin rich fraction (LRF) using *NADES*. In this process three conditions were applied for the fractioning of biomass: conventional heating (100°C), microwave radiation with power of 600W and 1000W and ambient temperature of 25°C. The percentages obtained through conventional heating were 72.25% of CRF, 27.75% of LRF; 72.54% of CRF with microwave radiation at a power of 1000W, 27.46% of LRF. For the treatment applied the radiation at a power of 600W were obtained: 70.61% of CRF and 29, 39% of LRF. The techniques used for characterization of LRF were infrared spectroscopy FT-IR and X-ray diffractometry for crystallinity analysis and scanning electron microscopy SEM. For characterization of LRF the techniques were used: UV-vis and FT-IR. Total crystallinity index (TCI), lateral order index (LOI) and hydrogen bonding intensity (HBI) were calculated. The use of *NADES* a low cost, sustainable organic solvent combined with microwave radiation proved to be efficient for the fractionation of biomass in these fractions.

Keywords: Biomass, Fractionation, *NADES*

1.Introdução

Para aumentar a acessibilidade á lignina existem Pré-tratamentos que removem a hemicelulose e removem ou modificam a estrutura da lignina e são importantes por expor a celulose, como a pesquisa realizada por (Bianchi, 2015) ^[1], que enfatiza a eficiência dos processos de pré-tratamentos para a produção de lignina.

A maioria desses Pré-tratamento apresentam vantagens e desvantagens como alto custo energético e de reagentes, formação de inibidores que pode ocorrer no Pré-tratamento alcalino, ácido e oxidativo (Trajano e Wyman ,2013). ^[2]

Como rota alternativa ao fracionamento da biomassa lignocelulósica, os solventes eutéticos naturais profundos (*NADES*) tem sido considerados uma variação dos líquidos iônicos, pois possuem propriedades físico-químicas semelhantes: são líquidos á temperatura ambiente.Constituem uma boa alternativa, pois apresentam algumas vantagens em relação aos demais líquidos iônicos, destacando-se: menor custo e facilidade de síntese.Assim, garante-se uma redução significativa dos custos do processo, demonstrando a sua relevância econômica para suprir os problemas dos métodos conhecidos e minimizar a geração de resíduos e consequentemente os custos relativos ao seu tratamento (Dai et al.,2015) .^[3]

Nos últimos anos, o Pré-tratamento com *NADES* tem sido estudado uma vez que são fáceis de sintetizar, e segundo um estudo desenvolvido por (Hou et al., 2017) ^[4] são biodegradáveis e ecologicamente corretos, são produtos das interações de ácidos orgânicos e açúcares por meio de ligações de hidrogênio e interações do tipo Van der Waals, oferecem vantagens como baixa toxicidade, biodegradabilidade, sustentabilidade e preparação simples. ^[4]

A aplicação do *NADES* associado a radiação de micro-ondas características evidenciadas no estudo proposto por (Chen e Wan, 2017) ^[5] que revelaram que mais de 90% da produção de açúcar pode ser obtida a partir de resíduos de milho pré-tratado e da espiga de milho usando cloreto de colina (ChCl) à base de *NADES* . ^[5]

A pesquisa realizada por (Hou et al.,2017) ^[4] aponta que a radiação aplicada diretamente sobre a biomassa gera um campo eletromagnético a estruturas moleculares de objetos aquecidos, o micro-ondas levou à quebra da biomassa principalmente através de colisão molecular devido à polarização dielétrica. Além disso, a irradiação de microondas pode maximizar características iônicas e aumentar a polaridade molecular do solvente. ^[4]

Nesse sentido o presente estudo tem por objetivo promover o fracionamento da biomassa da casca de eucalipto da espécie *Urograndis* em duas frações ,utilizando *NADES* composto de uma mistura de açúcares orgânicos: (glicose, frutose e sacarose), um solvente de baixo custo, sustentável ,cuja mistura apresenta ponto de fusão menor que dos seus constituintes, não apresenta toxicidade ou geração de resíduos como líquidos iônicos, organosolventes ou tratamentos ácidos e alcalinos, e seu uso associado à radiação de micro-ondas, otimizam a eficiência do *NADES* para o fracionamento da biomassa lignocelulósica.

2.Material e Método

2.1 Preparo físico da amostra

A casca de eucalipto da espécie *E. urograndis*, foi lavada com água corrente e seca em estufa com circulação forçada de ar, a 40 °C, até massa constante. Em seguida, foi triturada em moinho modelo TE 680-moinho tipo Willey Tecna I[®] e passado em peneira de malha de 60 mesh, as cascas foram trituradas até a obtenção de um pó homogêneo e granulação média e armazenadas em sacos plásticos, sob refrigeração, até o seu uso.

2.2 Caracterização da biomassa da Casca de Eucalipto

As determinações dos teores de celulose, hemicelulose e lignina serão feitas conforme descrito por (Lin et al.,2010; Li et al 2004) ^[6 - 7] , descrito a seguir:

Para determinação dos extraíveis da casca de eucalipto 5 g da casca foi aquecida a 100°C em extrator Soxhlet por 8h, usando cerca de 300 mL de hexano PA. A diferença das massas corresponde ao teor de extraíveis.

Para determinação do teor de hemicelulose e lignina :pesou-se 1 g do material da casca (livre de extraíveis) e acrescentou-se 10 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio (0,5 M; 20 g/L) a mistura foi aquecida por 3,5 horas, filtrada e levada com água destilada; a diferença das massas corresponde ao teor de hemicelulose; e 1g da casca livre de extraíveis foi tratada com 30 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 72%. O resíduo filtrado corresponde ao teor de lignina. Os percentuais dos constituintes da casca: extraíveis, celulose, hemicelulose e lignina estão descritos na Tabela 1.

2.3 Preparo do *NADES*

Para o Preparo do *NADES* foi preparada uma solução de frutose, glicose, sacarose e água em proporções molares de 1:1:1:11, por aquecimento até dissolução completa e reservado em refrigeração 8°C. (Dai et al.,2015) [3]

2.4 Fracionamento da biomassa com o uso de *NADES*

Porções com cerca de 1g de massa da casca de Eucalipto livre de extraíveis foram pesadas, com precisão, em triplicata e transferidas para um béquer, foram submetidas às seguintes condições aplicando o *NADES*: adição de 10 mL e repouso por 1h a temperatura ambiente, adição de 50 mL submetido ao aquecimento convencional de 1h a 100° C, adição de 30 mL, submetido ao tratamento por micro-ondas intercalando 60 segundos com radiação e sem radiação a uma potência de 1000W.

O mesmo protocolo foi realizado com 1g de amostras livres de extraíveis em triplicata alterando-se o tempo de exposição e / ou volume de *NADES*: adição de 10 mL de *NADES* e repouso por 8h a temperatura ambiente, adição de 50 mL submetida ao aquecimento convencional de 8h a 100° C, adição de 30 mL , submetidas á radiação micro-ondas intercalando 60 segundos com radiação aplicada a uma potência de 600W . Após o fracionamento as amostras foram filtradas. A fração rica em celulose (FRC) foi lavado 5 vezes com água destilada e caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), FT-IR e DRX para análise da cristalinidade. A fração líquida rica em lignina (FRL) misturou-se 100mL de água destilada e centrifugou-se por 15 minutos e foram caracterizadas por UV-vis e FT-IR.

2.5 Métodos de caracterização

A espectrometria de absorção na região do ultravioleta e visível da fração rica em lignina FRL, foi realizada no espectrofotômetro UV-Bel phonics IFGCRV, feixe único, grade de 1200 linhas /mm volume 1000 µL. Para a aplicação da técnica UV-vis as amostras das frações rica em lignina FRL foram diluídas em proporções: 300 µL da FRL para 900 µL de água , em cubeta de capacidade 1000 µL : as análises foram realizadas no laboratório de Química tecnológica (QUITEC),BRASIL.

As análises de espectroscopia de infravermelho foram realizadas no equipamento FT –IR Spectrometer Frontier PerkinElmer (Frontier®) com Reflectância total atenuada numa frequência de 600–4000 cm⁻¹ na Central Analítica (CAIF) ambos do Instituto Federal Goiano-Campos Rio Verde, BRASIL.

As análises de Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas em um aparelho Tesam Amber[®] com tensão de aceleração de elétrons de 5kV, operando no modo de detecção de elétrons secundários (SED). A Difratomia de raio-X foram realizadas em um difratômetro Bruker[®] utilizando radiação monocromática de um tubo com anodo de cobre acoplado a um monocromador Johansson para $K\alpha_1$ operando em 40kV e 40mA, configuração Bragg- Brentano θ - 2θ , detector unidimensional *Lynxeye*[®], intervalo de 2θ de 2° a 70°, com passo de 0,01°. As amostras foram mantidas em rotação de 15 rpm durante a medida. O resultado de cada difratograma equivale a média de seis medidas para cada amostra. As análises foram realizadas no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI) da Universidade Federal de Goiás (UFG), BRASIL.

2.6 Análise estatística:

As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste ANOVA. As amostras foram analisadas em triplicata e calculadas a média, o desvio padrão os intervalos de confiança das médias e variâncias com um limite de confiança de 95% ($p < 0,05$). Para se efetuar a comparação entre as médias de um mesmo grupo de tratamento e entre grupos diferentes aplicou-se o teste de Tukey a 5% em nível de significância. Foi calculada a diferença mínima significativa DMS para obtenção do contraste de médias das amostras para averiguação das diferenças estatísticas entre os tratamentos.

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização da biomassa da Casca de Eucalipto

Os resultados das composições determinadas dos constituintes da casca do eucalipto estão relacionados na Tabela 1:

Tabela 1- Determinação dos teores em porcentagem dos principais constituintes da casca de eucalipto

Teor de extraíveis (%)	Teor de Hemicelulose (%)	Teor de Celulose (%)	Teor de Lignina (%)
10,3 ± 0,6	36,5 ± 1,15	38,14 ± 0,1	15,06 ± 0,64

Os dados obtidos apresentam um valor percentual médio de 10,3 % encontrado para o teor de extraíveis com um coeficiente de 0,6% resultado semelhante encontrado também em um estudo realizado por (Chen ,2014).^[08]

Os extrativos presentes nas cascas de espécies comerciais de eucaliptos variam entre 5 a 20%. A maioria está presente na casca interna, rica em seiva elaborada, praticamente já solubilizados em água (Mika, Cséfalvay e Németh ,2018).^[09]

As diferenças encontradas entre os teores dos constituintes da biomassa dependem da forma como a casca foi amostrada, da relação entre casca interna e externa, e da situação fisiológica da árvore (Trugilho et al.,2003).^[10]

O teor de hemicelulose obtido foi da 36,5% com desvio padrão de 1,15%, próximos a valores encontrados por (Chen, 2014)^[08], cujo percentual encontrado é de 20 a 40% para a hemicelulose.

A composição química da biomassa lignocelulósica geralmente contém 35-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. Esta composição química varia em função do tipo de biomassa (Trugilho et al.,2003).^[10]

3.2 Resultados obtidos das FRC e FRL após o fracionamento da biomassa com NADES

A Tabela 2 apresenta os teores da FRC e FRL obtidos após o fracionamento com NADES: para o tempo de exposição da biomassa de 1 e 8 h.

Tabela 2-Dados obtidos para FRC e FRL após tratamentos de 1 e 8 h com NADES:

Tratamento	Temperatura ambiente 25°C		Aquecimento Convencional 100°C		Radiação de Micro-ondas	
					1000W	600W
Tempo em (h)	1 ^c	8 ^b	1 ^a	8 ^a	1 ^a	1 ^a
FRC(%)	99,5 ± 0,10	82,51±0,03	72,25±0,53	73,52 ±0,06	72,54± 1,3	70,61±0,08
FRL(%)	0,5 ± 0,01	17,49±0,17	27,75 ±0,7	26,48 ±0,25	27,46 ±1,3	29,39±0,23

3.3 Análise estatística

Os resultados obtidos na Tabela 2 mostram que :os tratamentos que possuem a mesma letra (a) são estatisticamente iguais entre si, não diferem pelo teste de Tukey com 5% de significância. Para o tratamento de 1h: Fcal>Ftab.e p-valor <0,01.

Os fracionamentos que se apresentaram estatisticamente semelhantes foram: aquecimento convencional (1 e 8h) e micro-ondas quando aplicado potência de 1000W e

600W. Apresentaram-se estatisticamente diferentes os fracionamentos (b) e (c): a temperatura ambiente a 25°C e tempo aplicado de 1 e 8h.

3.4 Aplicação da radiação micro-ondas combinado com *NADES*

O método de extração por micro-ondas é promissor para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (Haghighi et al., 2013) ^[11]. Segundo um estudo realizado por (Hou et al., 2017) ^[4] esse pré-tratamento combinado com uso de solventes eutéticos pode ser feito em um tempo muito curto, mas leva à alta digestibilidade da celulose.

Ao aplicar diretamente um campo eletromagnético a estruturas moleculares de objetos aquecidos, o micro-ondas leva à quebra da biomassa principalmente através de colisão molecular devido à polarização dielétrica segundo um estudo realizado por (Chen, 2014) ^[12]. Além disso, a irradiação de micro-ondas pode maximizar características iônicas e aumentar a polaridade molecular do solvente que influencia na digestibilidade resultado também observados por (Liu et., al 2017). ^[13]

Do ponto vista energético e econômico o tratamento realizado com *NADES*, por 1h via aquecimento convencional a 100°C e micro-ondas com potência de 1000 e 6000W mostraram-se mais efetivos para o fracionamento da biomassa (Tabela 2). E o tratamento com *NADES* a temperatura ambiente com 8h se mostra estatisticamente significativo quando comparado aos demais que sofreram aquecimento, sendo assim este tratamento se apresenta como uma alternativa promissora para o fracionamento da biomassa lignocelulósica, que mesmo sem aquecimento obteve-se o fracionamento nesta condição.

3.5 Resultados obtidos pela análise do UV-vis

Todos os tratamentos realizados empregando *NADES* no período de 1h submetidos as condições: a temperatura ambiente 25°C, aquecimento convencional 100° C e radiação de microondas com potência de 1000W foram analisados por espectroscopia de absorção na região UV-Vis. Os espectros obtidos são apresentados na Figura 1.

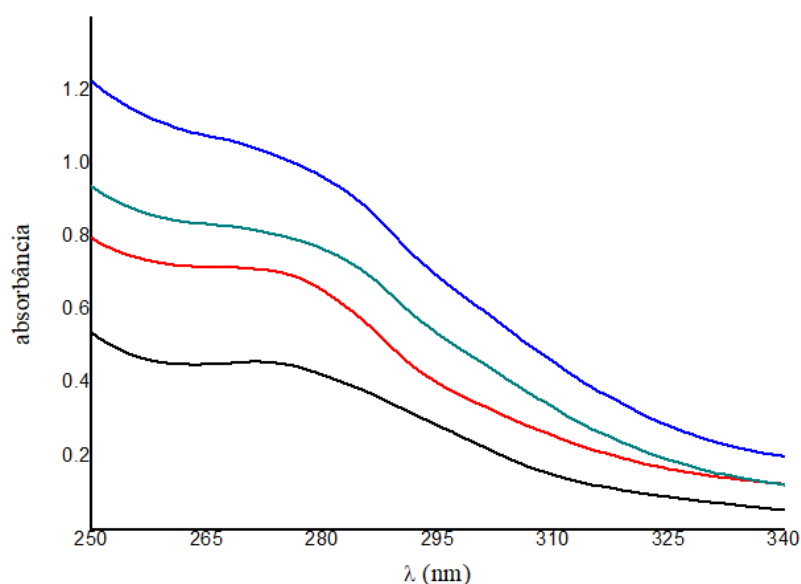


Figura 1: UV-vis .Espectros obtidos para os diferentes tratamentos com *NADES* (●) *NADES* puro; (●) a temperatura ambiente (25°C); (●) aquecimento convencional 100°C ; (●) micro-ondas potência 1000W. Fonte , autoria própria, 2021.

Observa-se na Figura 1 que para o mesmo tempo de aquecimento de 1h o fracionamento convencional a 100°C e micro-ondas aplicada a potência 1000W tiveram bandas de absorvância no comprimento de onda de 280 nm superiores quando comparado ao *NADES* puro. Nas frações com maiores absorvância é sugestivo a presença de outros constituintes diferentes dos carboidratos do *NADES* (Kumar et al., 2016).^[14]

Em uma pesquisa realizada por (Jablosky et al., 2016)^[15] a lignina foi identificada em valores de absorvância a 205 ou 280 nm, faixa semelhante foi observada no espectro da solução de *NADES* Figura 1 no aquecimento convencional 1h.

3.6 Análise da Espectroscopia FT- IR

Pelos espectros FT-IR é possível perceber o surgimento de bandas relacionadas a grupos funcionais característicos das substâncias presentes nas FRL. O espectro do *NADES* puro foi realizado para comparar bandas de possíveis grupos funcionais das FRL.

Foram realizadas as análises espectroscópicas por FT- IR das seguintes amostras: solução de *NADES* puro, solução de *NADES* da FRL via aquecimento convencional 100°C ,1h e 8h, solução de *NADES* da FRL com aplicação de radiação a uma potência de 1000W e solução de *NADES* a temperatura ambiente 25°C por 1h. Os espectros são apresentado na Figura 2 :

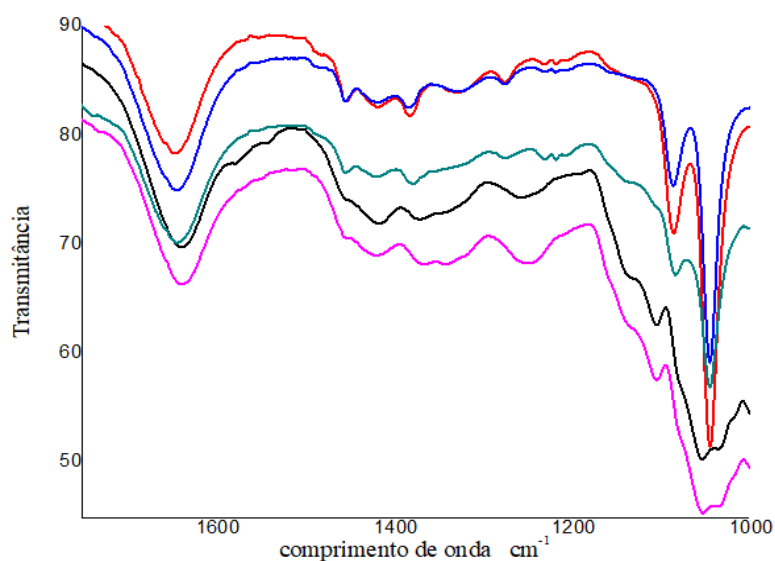


Figura 2: Espectros de FT- IR das amostras de biomassa fracionadas com *NADES* (●) *NADES* temperatura ambiente (1 h); (●) *NADES* puro; (●) *NADES* aquecimento convencional 100°C 1h; (●) *NADES* a temperatura ambiente (8h); (●) *NADES* micro-ondas potência 1000W. Fonte : autoria própria, 2021

Na Figura 2 observa-se um pico em aproximadamente 1720 cm^{-1} que pode ser atribuído ao estiramento do grupo carboxílico (C=O) observado na solução do *NADES* com aquecimento convencional e microondas de 1h. Em um estudo desenvolvido por (Jablosky et al., 2016) ^[15] com biocarvões de *Eucalyptus*, foram observadas bandas entre 1700 e 1740 cm^{-1} atribuídas a grupos carboxílicos.

Outro estudo realizado por (Arafat et al., 2019) ^[16] relacionado com a caracterização de lignina, encontrou-se regiões de 1703 cm^{-1} vibração de C=O e em 1154 cm^{-1} vibração C-O-C típicas de grupos da lignina.

A banda de 1680 cm^{-1} pode ser atribuída aos carboidratos do *NADES* sendo uma banda comum aos demais espectros.

A banda entre 1640-1600 cm^{-1} da Figura 2 está relacionada a vibrações de anel aromático C=C que é observada em quase todos os espectros. No estudo de (Jablosky et al., 2016) ^[15] com biocarvões relata a presença do anel aromático na região de 1600–1500 cm^{-1} , através da banda de absorção da ligação C=C do anel.

A banda de 1160 cm^{-1} está relacionada a vibração do C-O-C, na Figura 2 encontrada com bastante intensidade na amostra submetida ao aquecimento por micro-ondas a potência de 1000W que pode ser atribuída a vibração de grupos típicos de lignina ^[16]

A banda em 1430 cm^{-1} é característica de celulose cristalina, em razão dos anéis aromáticos combinados com estiramento e deformação no plano C-H. A banda em aproximadamente 900 cm^{-1} , está relacionada à celulose, observa-se uma redução da banda no material tratado com *NADES* sob aquecimento, indicando uma mudança estrutural da amostra (Dunn, et al., 2019; Huang et al., 2011).^[17-18]

O estiramento em 870 cm^{-1} está relacionado a uma deformação angular C-O do grupo metoxil, observada nas amostras de *NADES* submetida ao tratamento micro-ondas com potência de 1000W e aquecimento convencional por 1h, tal deformação não é observada no espectro da amostra de *NADES* puro ou a temperatura submetido ambiente por 1h.^[18]

Foram calculados os índices de cristalinidade total (TCI), intensidade da ligação de hidrogênio (HBI) e índice de ordem lateral (LOI) pelo FT-IR para associar a mudanças na cristalinidade da celulose. O cálculo do índice do TCI pode ser encontrado pela razão de absorção entre a flexão dos grupos O-H e o alongamento dos grupos C-H, o TCI é proporcional ao grau de cristalização da celulose pode ser calculado pela (Equação 1):

$$(\text{TCI} = A_{1375\text{cm}^{-1}} / A_{2900\text{cm}^{-1}})^{[19]} \quad \text{Eq. (1)}$$

A cristalinidade de ordem lateral LOI é a razão de absorção entre a flexão dos grupos C-H₂ e as ligações β -glicosídica (Equação 2):

$$(\text{DIREITO} = A_{1420\text{cm}^{-1}} / A_{893\text{cm}^{-1}})^{[19]} \quad \text{Eq. (2)}$$

A Tabela 3 apresentam os resultados obtidos dos índices de TCI, LOI e HBI calculados nas biomassas após o tratamento:

Tabela 3: Índice de HBI, TCI, LOI da biomassa bruta e fracionada com *NADES*

Biomassa	Índice de FTIR		
	HBI	TCI	LOI
	3338/1334	1375/2900	1420/893
	($\text{cm} \cdot \text{cm}^{-1}$)	($\text{cm} \cdot \text{cm}^{-1}$)	($\text{cm} \cdot \text{cm}^{-1}$)
1 Bruta	1,031	0,94	1,032
2 com aquecimento de 1h	1,0097	0,95	1,042
3 com aquecimento de 8h	1,0201	0,94	1,034

A Intensidade da Ligação de Hidrogênio HBI, está relacionada com o grau de regularidade intermolecular, bem como a quantidade de água. O HBI foi utilizado para observar

as mudanças da ligação de hidrogênio entre certos grupos hidroxílicos em celulose. Pode ser determinado pela Equação 3:

$$(\text{HBI} = A_{3338\text{cm}^{-1}} / A_{1334\text{cm}^{-1}})^{[19]} \quad \text{Eq. (3)}$$

As ligações de hidrogênio inter e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática. O resultado do HBI denota a diminuição da razão HBI das amostras tratadas com *NADES* o que infere em modificações e/ou rompimento das ligações de hidrogênio que mantinham a regularidade da região cristalina que após o tratamento foram modificadas (Oh et al., 2005).^[20]

Para a biomassa bruta e tratada por 1h ocorre um aumento do índice de cristalinidade total, TCI e houve o aumento do grau de ordem lateral, LOI nas biomassas tratadas com *NADES* o qual se relaciona com aumento da fração cristalina em decorrência da saída de parte da fração amorfa associado a utilização do *NADES* (Nelson, O'Connor, 1964).^[21]

Os maiores valores encontrados para grau geral de ordem em celulose LOI denota um aumento do índice de cristalinidade da biomassa tratada. A razão entre regiões amorfas e cristalinas da celulose diminuiu após o pré-tratamento devido a remoção parcial de hemicelulose e lignina do material e não pelo aumento de regiões cristalinas. Como resultado ocorre um aumento da cristalinidade do material após o pré-tratamento (Brienzo et al., 2015).^[22]

3.7 Difractometria de raios-X

A cristalinidade da biomassa é uma característica importante que afeta a atividade de hidrólise enzimática. O índice de cristalinidade mostrado na Tabela 3 foi calculado a partir da intensidade máxima obtida no pico de cristalinidade principal do difratograma e da intensidade mínima localizada entre os dois picos cristalinos pela Equação 4:

$$\text{Cr I (\%)} = [(I_{002} - I_{am}) / I_{002}] \times 100. \quad [23] \quad (\text{Eq 4})$$

A Figura 3 descreve o espectro de DRX da biomassa bruta que denota intensidades menores para mesmo ângulo de 2θ quando comparado a figura 4 que apresenta a biomassa fracionada com *NADES*.

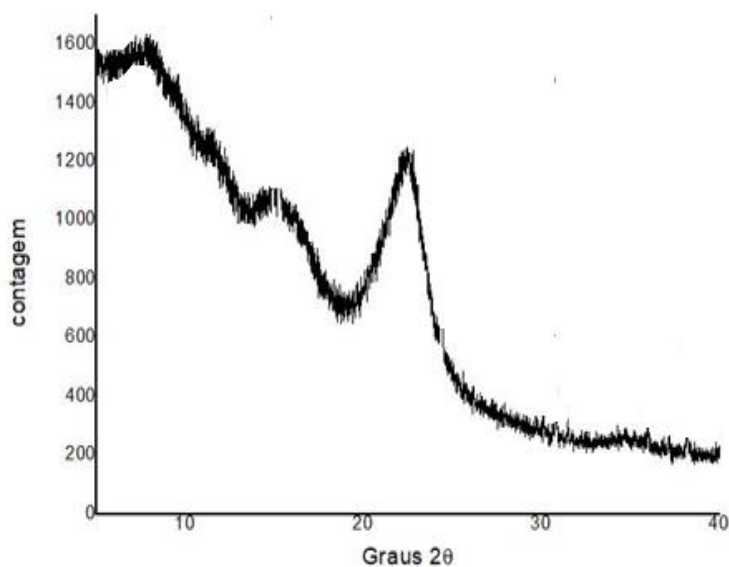


Figura 3 : Espectro de DRX da biomassa bruta. Fonte : autoria própria,2021.

Na figura 4 descreve os espectros de DRX da casca do eucalipto fracionada com *NADES*.

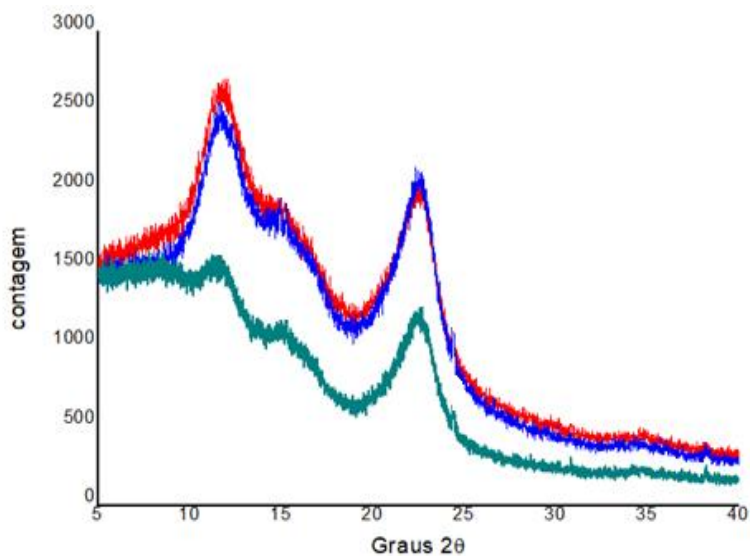


Figura 4 : Espectros de DRX da biomassa bruta e fracionada com *NADES*. (●) biomassa fracionada com *NADES* a temperatura ambiente (25°C); (●) biomassa fracionada com *NADES* aquecimento convencional (100°C) 1h ; (●) biomassa fracionada com *NADES* micro-ondas P (W) 100%.
Fonte : autoria própria,2021.

As intensidades dos picos cristalinos e do halo amorfo foram obtidas através dos gráficos do DRX. O índice de cristalinidade juntamente com a intensidade do plano cristalino principal (2θ) e a fração amorfa foi calculada utilizando-se a intensidade entre 18° e 19° para

celulose I e a intensidade máxima entre 18° e 22° para celulose II, para a fração cristalina e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

A Tabela 4 apresenta o índice de cristalinidade calculado para a amostra bruta, a amostra fracionada com *NADES* a temperatura ambiente 25°C, e aquecimento convencional 100 °C.

Tabela 4- Índice de cristalinidade da biomassa após o fracionamento da biomassa lignocelulósica fracionada com *NADES* por 1 h:

	Biomassa Bruta	temperatura ambiente 25°C	Aquecimento convencional 100°C	Micro-ondas Potência 1000W
18°	749	1221	1184	666
22°	1099	1873	1918	1068
Índice de cristalinidade fração	31,8	34,3	35,6	37,6
Cristalina celulose I IC%				
18°≤20≤22°				

De acordo com a Tabela 4 observa-se um aumento no IC para a biomassa no aquecimento de 1h convencional e micro-ondas aplicada potência de 1000W. De acordo com um estudo realizado por (Karimi, 2016) ^[24] o aumento do IC é sugestivo ao ataque do solvente nas regiões amorfas da celulose e hemiceluloses que são mais suscetíveis, causando também o inchamento da região cristalina o que leva ao aumento da superfície interna e diminui o grau de polimerização. ^[24]

Um estudo semelhante com tratamento álcali realizado por (Oh, et al.,2005) ^[25] descreve que o provável decréscimo inicial do grau de polimerização pela quebra das regiões amorfas da celulose. O aumento do IC das regiões amorfas após o pré-tratamento com *NADES*, se dá pela remoção das regiões amorfas da celulose, aumentando a cristalinidade das amostras. ^[25]

3.8 Microscopia Eletrônica de varredura

As alterações estruturais da biomassa bruta e fracionada com o *NADES* podem ser observadas nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A amostra bruta Figura 5(A), mostrou uma superfície rígida e lisa, uma vez que os fibrilatos estavam todos intactos. No entanto, após o fracionamento da biomassa Figura 5(C) e (D), as amostras mostraram deformação celular e afrouxamento de fibras sugestivo ao efeito do *NADES*. Por meio das

micrografias obtidas é possível observar as alterações estruturais pelo surgimento de fissuras, com provável aparecimento motivado pela dissolução das hemiceluloses e desestruturação do material lignocelulósico, alterações como aumento da área superficial entre a biomassa bruta (A) e a tratada com radiação micro-ondas (D) (Sing et al., 2021). [26]

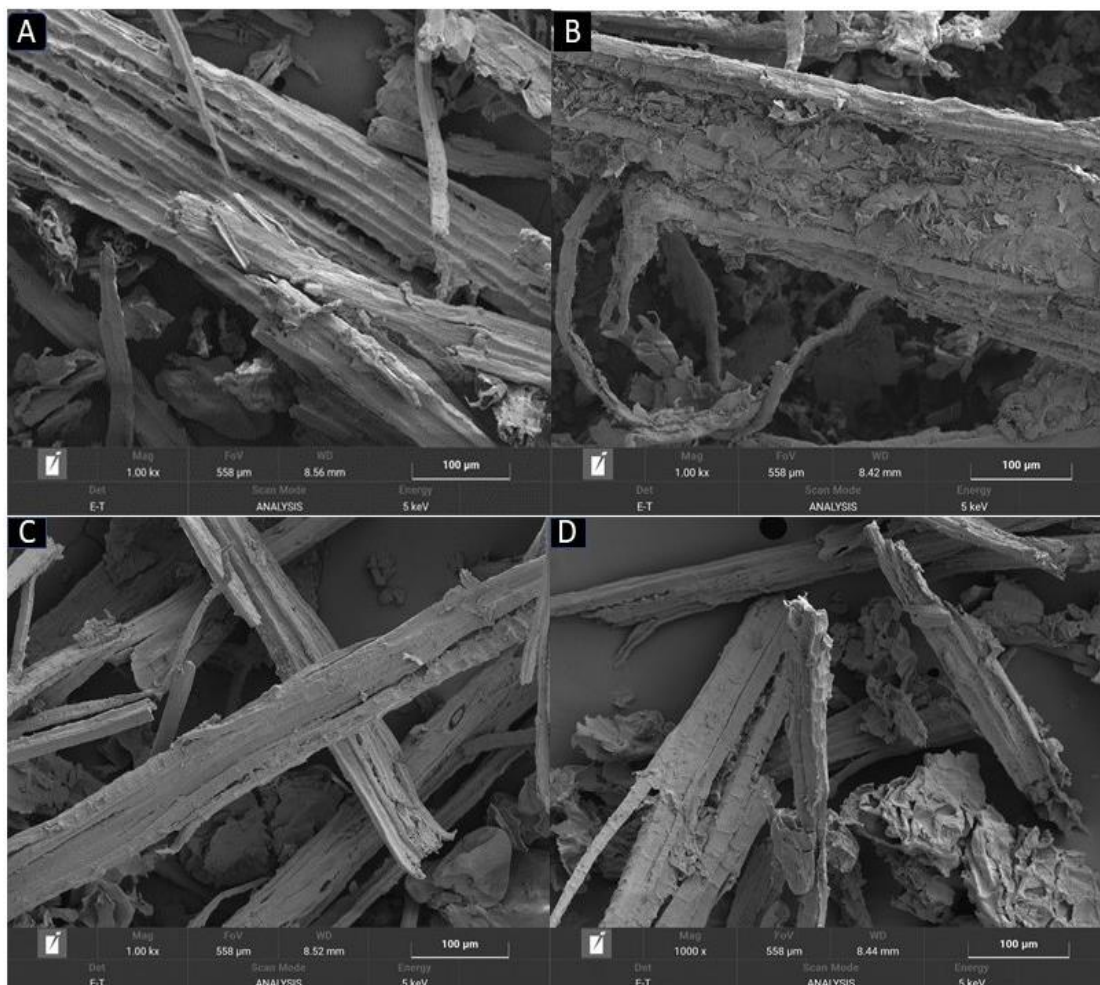


Figura 5: Imagens da Microscopia Eletrônica de varredura da biomassa após fracionamento com *NADES*: A = Biomassa bruta; B= Biomassa fracionada a temperatura ambiente (1h); C= Biomassa fracionada com aquecimento convencional (1h); D= biomassa fracionada com radiação micro-ondas potência 1000W 1h. As imagens do MEV foram ampliadas em 1000 vezes.

4. Conclusão

A exposição da biomassa lignocelulósica ao *NADES* sob aquecimento de 1h e micro-ondas com potência aplicada de 1000W e 600W, resultaram no fracionamento de cerca de 70% da FRC e 30% da FRL, e para a condição submetida a temperatura ambiente resulta no fracionamento em torno de 80% da FRC e cerca de 20% da FRL, o que denota o efeito do *NADES*

sobre a biomassa mesmo sem uso de aquecimento. O que permite inferir que esse processo na cadeia de fracionamento pode contribuir para diminuir a recalcitrância do material lignocelulósica para posterior processo enzimático.

O conjunto de resultados analisados denota o efeito positivo do *NADES* sobre a biomassa lignocelulósica: contribuindo para sua modificação morfológica, a preservação da FRC que pode ser utilizada para um processo posterior como produção de papel entre outros. A não toxicidade do *NADES*, economia energética, não geração de resíduos aplicada ao processo são efeitos que podem ser atribuídos ao uso desse solvente sustentável, além do baixo custo do processo.

5. Referências

- [1] SÁ, Vânia, BIANCHI, Maria. Methods of Pre-treatment of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. II Brazilian Congress of Wood Science and Technology Belo Horizonte. 2015.
- [2] Trajano, H. L., & Wyman, C. E. Fundamentals of biomass pretreatment at low pH. Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals, (2013)103-128.
- [3] Dai Yuntao, Geert Jan, Witkamp, Robert, Verpoorte Young Ha Choi. Adaptation properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications food-chemistry vol 187, 2015.
- [4] Hou, X.-D., Feng, G.-J., Ye, M., Huang, C.-M., Zhang, Y., 2017. Significantly enhanced enzymatic hydrolysis of rice straw by synergistic high-performance eutectic two-stage deep solvent pretreatment. *Bioresource. Technol.* 238, 139-146.
- [5] Chen, Z., Wan, C., Ultrafast Microwave-assisted Deep Eutectic Solvent Pretreatment Fractionation of Lignocellulosic Biomass, *Bioresource Technology* (2017).
- [6] LIN, Z., et al, Pretreatment of Corn Stover for Enhancing the Efficiency of Enzymatic Hydrolysis, *Appl. Biochem. Biotechnology*, 162(7) (2010) 1872-1880.
- [7] Liu, C., & Wyman, C. E. The effect of flow rate of very dilute sulfuric acid on xylan, lignin, and total mass removal from corn stover. **Industrial & engineering chemistry research**, 43(11), (2004) 2781-2788.
- [8] Chen, H. Chemical composition and structure of natural lignocellulose. **Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice**. Dordrecht: Springer Netherlands, (2014) 25–71

- [9] Mika, L. T.; Cséfalvay, Y. E.; Németh, Á. Catalytic conversion of carbohydrates to initial platform chemicals: Chemistry and sustainability. **Chemical reviews**, v. 118, (2018) p. 505–613
- [10] Trugilho, P. F. et al. Determinação do teor de taninos na casca de Eucalyptus spp. **Cerne, Lavras**, v. 9, n. 2, (2003) p.246-254.
- [11] Haghghi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G., Najafi, G.H., Gholami, M., Ardjmand, M. **Biomassa lignocelulósica ao bioetanol, uma revisão abrangente com foco no pré-tratamento**. *Renove. Energia Sustentável*, (2013) Rev.27, 77-93.
- [12] Kadla JK, Kubo S, Venditti RA, Gilbert RD, Compere AL, Griffith W. Lignin-based carbon fibers for composite fiber applications. *Carbon*. (2002) 40:2913-20
- [13] Y. Liu, W. Chen, Q. Xia, B. Guo, Q. Wang, S. Liu, Y. Liu, J. Li, H. Yu. Efficient Cleavage of Lignin- Carbohydrate Complex and Ultrafast Extraction of Lignin Oligomers from Wood Biomass by Microwave Assisted Treatment with Deep Eutect Solvent. *ChemSusChem* (2017), 10, 1692 –1700.
- [14] Kumar, A.K et al “Produção de etanol celulósico a partir da palha de arroz pré-tratada com solvente verde”, **Biocatal. Agric. Biotechnology** vol. 7(2016) 14-23
- [15] Jablosky et al. **Contribuição de solventes eutéticos profundos para o processamento de separação**”, em: Proceedings of the Zem v pasci? Conferência, Hodrusa-Hamre, República Eslovaca, (2016) p. 10.
- [16] Arafat, S et al. Sustainable lignin to enhance asphalt binder oxidative aging properties and mix properties. **Journal of Cleaner Production** vol 217 (2019).456-468.
- [17] Dunn, A. et al. **Selective Continuous Flow Iodination Guided by Direct Spectroscopic Observation of Equilibrating Aryl Lithium Regioisomers, Organometallics**. V 38 (2019) p. 129-137.
- [18] HUANG, H.; et al . Thermochemical liquefaction characteristics of microalgae in sub- and supercritical ethanol. **Fuel Processing Technology**, v.92, (2011), p.147-153
- [19] Nelson, M.L.; O’Connor, R.T. Relação de certas bandas infravermelhas com a cristalina de celulose e tipo de rede cristalina. Parte II. Uma nova razão infravermelha para estimativa de cristalinidade nas celulosas I e II. **J. O Appl. Polímia. Sci.** (1964), 8, 1325-1341.
- [20] Oh, S.Y.; Yoo, D.I.; Shin, Y.; Kim, C.H; Kim, Y.H; Chung, S.Y; Park, H.W; Youk, H.J. Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide

by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy *Carbohydrate Research* .(2005) .340(15), 2376–2391.

[21] Nelson, M.L.; O'Connor, R.T. Relação de certas bandas infravermelhas com a cristalina de celulose e tipo de rede cristalina. Parte II. Uma nova razão infravermelha para estimativa de cristalinidade nas celulosas I e II. **J. O Appl. Polímia. Sci.** (1964), 8, 1325-1341.

[22] Brienzo, et al. Relationship between physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse varieties for bioethanol production. **New Biotechnology**, (2015), 32(2), 253-262.

[23] L. Segal ,J J Creely , AE Martin, CM Conrad .**Um método empírico para estimar o grau de cristalinidade da celulose nativa usando o difratômetro de raios X.**Res. Têxtil. J. , 29 (1959) , pp . 786-794

[24] Karimi, K.; Taherzadeh, M.J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity. **Bioresource. Technol** (2016), 200, 1008–1018.

[25] Oh, S.Y.; Yoo, D.I.; Shin, Y. Seo, G. Análise FTIR de celulose tratada com hidróxido de sódio e dióxido de carbono. *Carbohydr. Res.* (2005) 340, 417-428.

[26] Singh, J.K.et al. Biological Characterization and Instrumental Analytical Comparison of Two Biorefining Pretreatments for Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) Biomass Hydrolysis. **Sustainability** (2021), 13, p. 245.