

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agroenergia  
Ministério Agricultura, Pecuária e Abastecimento

---

# **Biomassa** **para Química Verde**

**Sílvio Vaz Júnior**  
Editor Técnico

Embrapa Agroenergia  
Brasília, DF  
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Agroenergia**

Parque Estação Biológica, PqEB s/n, Brasília, DF

CEP: 70770-901

Caixa Postal: 40.315

Fone: (61) 3448-4246

Fax: (61) 3448-1589

www.cnpae.embrapa.br

sac@cnpae.embrapa.br

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Lorena Costa Garcia

Membros: Eduardo Fernandes Formighieri, João Ricardo Moreira de Almeida, Larissa Andreani, Leonardo Fonseca Valadares, Maria Iara Pereira Machado

Supervisão editorial: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Revisão de texto: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Normalização bibliográfica: Maria Iara Pereira Machado

Fotos da capa: Sergey Yarochkin/Fotolia, MK/Fotolia

Capa, projeto gráfico, editoração eletrônica: Athalaia Gráfica e Editora

Tratamento de ilustrações: Paulo Roberto Pinto

**1ª edição**

1ª impressão (2013): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Agroenergia**

---

B 615 Biomassa para química verde / editor-técnico, Sílvio Vaz Júnior. –  
Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013.

196 p. ; il. color.

ISBN: 978-85-7035-230-9

1. Biomassa – química verde. 2. Agroindústria – Brasil. I.  
Vaz Júnior, Sílvio.

# Análise Química da Biomassa

*Patrícia Verardi Abdelnur  
Clenilson Martins Rodrigues*

Devido à grande diversidade de biomassa disponível, é necessário e essencial realizar estudos analíticos para melhor compreender a composição química da mesma, além das suas propriedades físico-químicas. Esta etapa analítica é primordial para que se possa escolher a biomassa adequada para um determinado processo e, como consequência, obter o produto final desejado com rendimentos economicamente viáveis (SLUITER et al., 2010). Um exemplo é no caso da produção de etanol, onde é necessário que a biomassa tenha altos teores de carboidratos, pois os açúcares serão consumidos no processo de fermentação.

Uma breve revisão de alguns processos de conversão deve ser aqui considerada. Para o processo de produção de biocombustíveis a partir da pirólise, o bio-óleo é o produto formado de maior interesse, pois é um líquido rico em hidrocarbonetos, com potencial de ser convertido a combustível líquido e substituir o diesel e a gasolina (JARVIS et al., 2012). Neste caso, é desejável



que a biomassa tenha grande quantidade de compostos fenólicos (provenientes da lignina), uma vez que estes possuem maior poder calorífico, sendo mais eficientes no processo de combustão.

Para a produção de biodiesel, a composição química da biomassa influencia diretamente no produto gerado. O biodiesel é produzido principalmente pela transesterificação metílica dos triacilglicerídeos (TAG), presentes na matéria-prima (gordura animal ou óleo vegetal). A distribuição de ácidos graxos em TAG varia substancialmente de acordo com a matéria-prima utilizada, em termos do comprimento da cadeia e dos níveis de insaturação. Alterações na composição da mistura resultante dos ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAME), produto final de maior interesse, influencia nas propriedades físico-químicas do biodiesel, podendo comprometer sua eficiência como combustível, como por exemplo, nos parâmetros de corrosividade, viscosidade e estabilidade (ABDELNUR et al., 2008).

Com base nestas informações fica claro que o entendimento da composição original da biomassa é um fator chave em aplicações industriais, uma vez que os rendimentos, a composição, a estrutura e outras propriedades dos produtos são influenciadas pelas propriedades da matéria-prima (GÓMEZ et al., 2007).

Na atualidade, diversos métodos vêm sendo utilizados para a análise composicional e a caracterização de biomassa, desde os considerados tradicionais, baseados em análises mais robustas, até aqueles que utilizam técnicas avançadas. Neste contexto, diversos métodos e técnicas empregados na análise e caracterização da biomassa serão apresentados ao longo deste capítulo.

De modo a facilitar o entendimento do capítulo, devemos considerar a seguinte nomenclatura utilizada na química analítica (VAZ JÚNIOR; SOARES, 2012):

- A *técnica analítica* utiliza-se de um fenômeno físico ou químico para a identificação ou quantificação de um composto químico de interesse (*analito*);
- O *método analítico* aplica a técnica analítica para a determinação do composto em um meio específico (matriz analítica);
- O *procedimento* é um conjunto de detalhamentos técnicos para a aplicação de um método analítico em uma amostra de interesse, considerando-se a amostragem, a eliminação de interferentes e a validação dos dados obtidos;
- O *protocolo* é um conjunto de orientações detalhando os procedimentos que deverão ser seguidos para que os resultados sejam aceitos por uma agência ou órgão regulador, baseando-se em uma legislação ou norma existente.

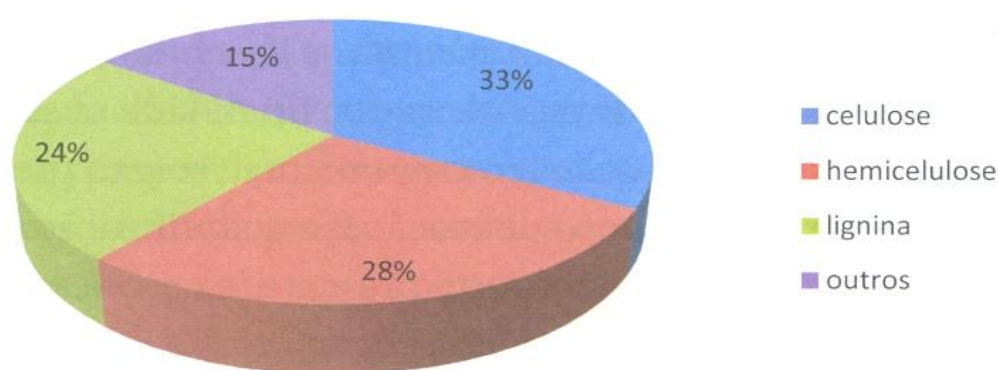
Cabe ressaltar que quanto ao uso, as análises químicas são empregadas para fins de *identificação*, *quantificação* ou *caracterização*. A identificação tem por finalidade observar a presença do composto químico em uma matriz (ex.: presença de furfural no meio aquoso de reação); a quantificação determina a concentração do composto presente (ex.: concentração de sacarose em caldo de cana-de-açúcar), enquanto que a caracterização determina preferencialmente o comportamento do composto frente a um fenômeno físico ou químico (ex.: bandas de absorção na região do infravermelho médio) (VAZ JÚNIOR; SOARES, 2012).



Como já comentado no primeiro capítulo desta obra, a aplicação dos princípios da química verde é de grande relevância para uma química menos agressiva ao meio ambiente; nesse sentido, tais princípios devem ser observados no desenvolvimento e no uso dos métodos de análise química da biomassa.

### Técnicas analíticas tradicionais aplicadas à biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é composta majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina e se destaca em termos de produção em relação às demais classes da biomassa vegetal – *oleaginosa*, *amilácea* e *sacarídea*, já que ela é formada pelos polímeros naturais constituintes da estrutura morfológica dos vegetais. No entanto, existem outros compostos presentes em menor quantidade, os quais podem ser classificados como cinzas, extrativos, entre outros (Figura 1).



**Figura 1.** Composição mássica (% m/m) da biomassa lignocelulósica. Fonte: adaptado de Hon e Shiroshi (2001).

Com base na Figura 1, considera-se, de forma geral, que os compostos químicos presentes em maior quantidade na biomassa são os polímeros derivados de carboidratos (celulose e hemicelulose) e lignina. A celulose é um polímero composto por unidades monoméricas de açúcares de seis carbonos (hexoses); a hemicelulose é um polímero ramificado constituído de açúcares de cinco carbonos (pentose) e de seis carbonos (glicose). A lignina pode ser descrita como um polímero fenólico complexo.

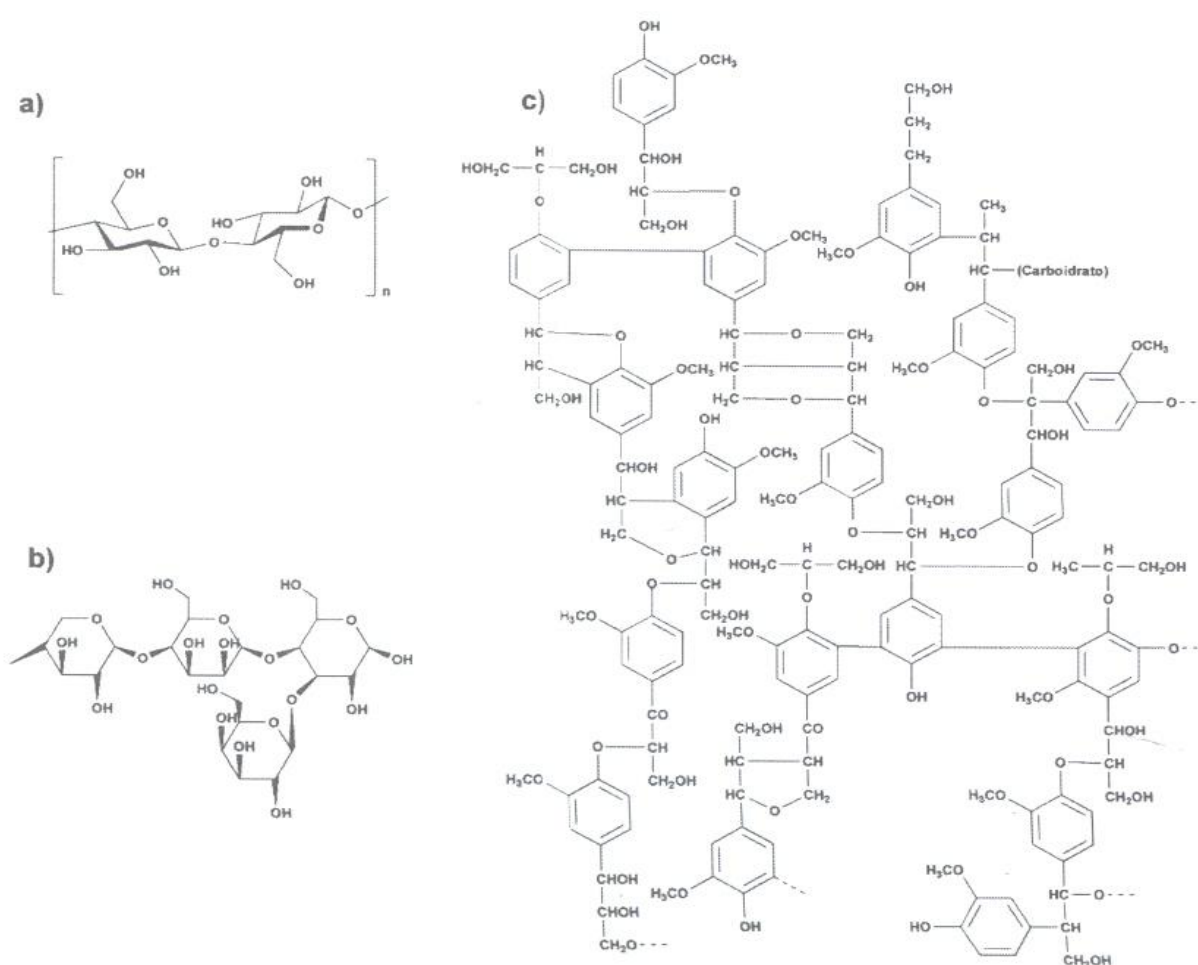
Apesar da presença e quantidade destes açúcares variarem de acordo com a biomassa analisada, o açúcar mais abundante nos diferentes tipos de material é a glicose, seguida pela xilose (ALMEIDA et al., 2011). Por exemplo, no bagaço de cana-de-açúcar glicose e xilose podem representar, respectivamente, até 62% m/m e 33% m/m dos açúcares totais deste material (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010).

Para utilizar esses três componentes da biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a produção de produtos de maior valor agregado, tais como biocombustíveis, materiais e produtos químicos, é essencial avaliar a composição química das frações líquidas dos processos de hidrólise de biomassa e a distribuição molecular dos carboidratos e fenóis presentes na matriz analítica.

A disponibilidade de técnicas e métodos empregados na determinação da composição química dos mais diversos tipos de biomassa é de extrema importância em estudos que preconizam a valorização dos materiais lignocelulósicos (GOUVEIA et al., 2009).

## Determinação do teor de celulose, hemicelulose e lignina

A determinação de celulose, hemicelulose e lignina (Figura 2) vem sendo realizada a partir de métodos propostos por laboratórios de referência mundial. Tais métodos são considerados oficiais por muitas organizações e instituições. A principal vantagem é o fato deles estarem bem estabelecidos e validados.



**Figura 2.** Estrutura química dos principais polímeros constituintes da biomassa vegetal: a) celulose; b) hemicelulose; e c) lignina.

O Laboratório Nacional de Energia Renovável dos Estados Unidos da América (NREL – *National Renewable Energy*



*Laboratory*) possui procedimentos reconhecidos, os quais são aplicados na determinação de diversos compostos presentes na biomassa, como por exemplo, cinzas, carboidratos, ligninas, açúcares, subprodutos, produtos de degradação, inibidores, entre outros. Esses métodos são baseados em processos de hidrólise ácida e necessitam de várias etapas sequenciais para fazer a análise composicional total da biomassa. São laboriosos, muitos deles morosos e que necessitam de muita atenção aos detalhes dos procedimentos laboratoriais.

O NREL desenvolveu um sistema para coordenar os processos e obter a análise completa da biomassa. Os métodos analíticos desenvolvidos estão disponíveis em publicações e são chamados LAPs (*Laboratory Analytical Procedures*) (SLUITER et al., 2010; TEMPLETON et al., 2010).

Os LAPs do NREL são divididos em: “Fechamento da Massa Somativa”; “Preparação de Amostras para Análises Composicionais”; “Determinação dos Sólidos Totais em Biomassa e Sólidos Totais Dissolvidos em Amostras Líquidas do Processo”; “Determinação de Extrativos em Biomassa”; “Determinação de Cinzas em Biomassa”; “Determinação de Composição Proteica em Biomassa”; “Determinação de Carboidratos Estruturais e Ligninas em Biomassa” (SLUITER et al., 2010). Tais publicações podem servir como documentos orientadores durante a realização de análises químicas da biomassa.

### ***Determinação do perfil de açúcares***

Existem alguns métodos oficiais que abordam o monitoramento de açúcares (monômeros) e, dentre eles, o NREL preconiza o emprego de protocolos validados baseados em

análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) acoplada com detector de índice de refração (RID, *Refractive Index Detector*) (SLUITER et al., 2008a).

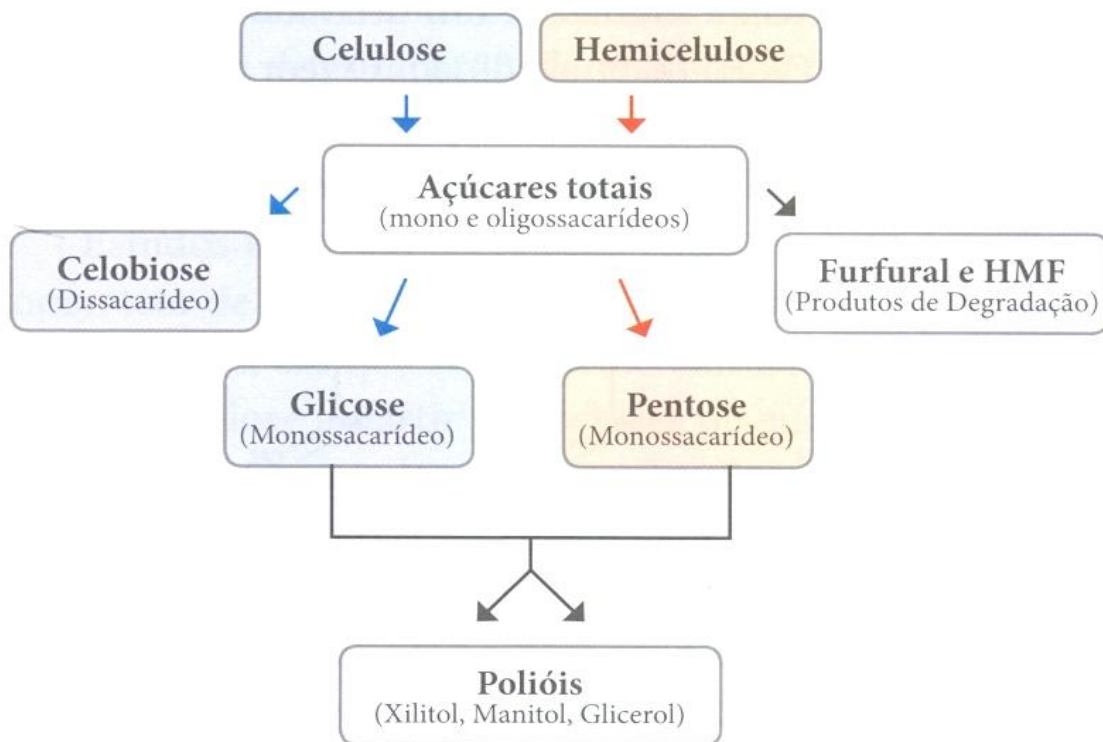
Durante certos pré-tratamentos da biomassa, uma porção desses polissacarídeos é hidrolisada e açúcares são disponibilizados no meio líquido. Esse método é usado para determinar tanto a quantidade total de carboidratos liberada em solução, quanto a quantidade de açúcares monoméricos. Se os açúcares estão presentes na forma oligomérica, é necessário realizar um processo preliminar para transformá-los nas formas monoméricas antes das análises por HPLC.

Tratamentos por diluição ácida e hidrólise enzimática são os procedimentos mais empregados atualmente. A hidrólise por diluição ácida é considerado o procedimento mais rápido, conveniente e barato, mas resulta no acúmulo de compostos que possuem características inibidoras de fermentação, tais como furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e outros derivados fenólicos. Esses compostos, dependendo de suas concentrações no meio de fermentação, podem inibir a microbiota e, como consequência, diminuir a taxa de crescimento específica, afetando o rendimento celular.

Tendo em vista que a porção líquida pode conter também produtos de degradação de carboidratos, tais como HMF e furfural, bem como outros componentes de interesse, como ácidos orgânicos e polióis (polialcoóis: xilitol, manitol, glicerol, etc.), esse método é usado para determinar o teor desses produtos de degradação e subprodutos, sendo que todos esses componentes são analisados por HPLC-RID, metodologia que serve também para determinar os parâmetros

ideais dos processos de produção ou para monitorar as etapas dos mesmos.

A Figura 3 ilustra os compostos que podem ser formados a partir da degradação de celulose e hemicelulose.



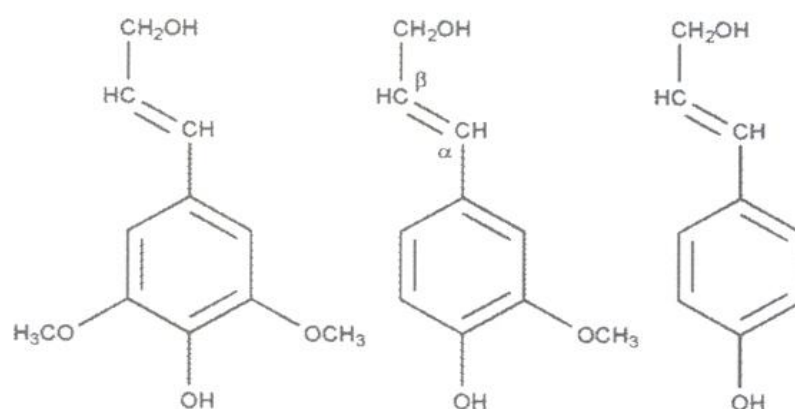
**Figura 3.** Compostos químicos gerados após a degradação da celulose e da hemicelulose.

### ***Determinação do perfil de ligninas***

A lignina é composta por unidades monoméricas de fenilpropanóides, conhecidas como *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), originárias de três principais precursores: álcool *trans-p*-cumarílico; álcool *trans*-sinapílico e álcool *trans*-coniferílico, respectivamente (Figura 4).



Ligninas são produzidas por catálise enzimática, via peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com a polimerização dos três monolignóis (H, G e S) (GRABBER et al., 1997). A polimerização dessas subunidades conduz à formação de três tipos de ligninas. O primeiro monolignol (com dois grupos metoxilas) é chamado de unidade siringil (S). O segundo (com um grupo metoxila) é uma unidade guaiacil (G) e a terceira unidade é um derivado do *p*-hidroxifenilpropano (H) (WHITE et al., 2011). O teor de lignina em material celulósico pode variar de 22,7 a 25,8% m/m e a razão S/G pode chegar a valores entre 1,8 e 2,3 (DAVISON et al., 2006).



**Figura 4.** Álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacil, siringil e *p*-hidroxifenil: álcool coniferílico (G); álcool sinapílico (S); álcool *p*-cumarílico (H), respectivamente – em ordem da esquerda para a direita.

Em aplicações industriais, a lignina diminui o branqueamento (clareamento) no processo de produção de papéis e interage com diversos aditivos empregados na produção dos mesmos. No entanto, a lignina é considerada favorável em alguns processos de polpação, onde a sua retenção aumenta o rendimento da polpa de celulose (BARBOSA et al., 2008). A

polpação química da celulose é empregada quando uma efetiva deslignificação é necessária e o cozimento Kraft (hidróxido de sódio + sulfeto de sódio) é o processo predominante (GOVENDER et al., 2009).

A razão S/G, presente em material lignocelulósico, é conhecida como um parâmetro significante no processo de deslignificação e resultados recentes evidenciaram que essa razão pode ser empregada na determinação da quantidade de etanol que pode ser produzida em processos de fermentação durante a obtenção de etanol de segunda geração (GOVENDER et al., 2009).

Estudos mostram correlação entre a produção de etanol com o teor de lignina presente em biomassa. Por exemplo, em experimentos, em que se usa ácido sulfúrico diluído para hidrolisar celulose a partir de espécies de eucalipto, foi constatado que o aumento da produção de xilose também está relacionado ao aumento da razão S/G (BOSE et al., 2009). Desta forma, a razão S/G é uma informação de extrema importância e serve como referência para processos de produção, tanto para fabricação de papel, quanto para outras aplicações, como a produção de etanol de segunda geração.

Vários métodos analíticos têm sido utilizados para estudar a estrutura da lignina. No entanto, o método padrão mais utilizado para determinar as proporções S e G é a oxidação por nitrobenzeno em meio alcalino. Porém, este procedimento requer análises longas e o consumo de grandes quantidades de reagentes (LIMA et al., 2008).

Métodos espectroscópicos utilizando as espectroscopias de absorção na região do infravermelho (FTIR, *Fourier Transform Infrared*) e de ressonância magnética nuclear (RMN) também são utilizados para determinar a razão S/G. No



entanto, é difícil definir esta razão com precisão devido à baixa sensibilidade, baixa resolução dos espectros e a necessidade da extração da lignina da madeira (BARBOSA et al., 2008).

A pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (py-GC-MS, *pyrolysis-Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) (RALPH; HATFIELD, 1991; LIMA et al., 2008; BARBOSA et al., 2008) e a pirólise acoplada à espectrometria de massas com feixe molecular (py-MBMS) (EVANS; MILNE, 1987; SYKES et al., 2008; HU et al., 2010) vêm mostrando-se como técnicas alternativas e interessantes para estudos de amostras poliméricas, como a lignina, a partir da quantificação da razão S/G.

Essas técnicas apresentam vantagens de não requererem preparo de amostra, usar pequena quantidade e as análises serem rápidas e altamente sensíveis para caracterizar as estruturas químicas da lignina (BARBOSA et al., 2008). Na técnica de py-GC-MS, aproximadamente 100 µg de amostra são colocados em um pequeno recipiente de platina, o qual é inserido em um tubo de quartzo dentro do pirolizador. A pirólise ocorre a alta temperatura (aproximadamente 550°C) e por pouco tempo (cerca de 10 s). Os produtos da pirólise são transferidos para o GC pelo próprio gás de arraste (hélio). Ao entrar na coluna são separados e detectados por EI-MS (*Electron Spray-Mass Spectrometry*), a uma energia de 70 eV, e os compostos são identificados após a comparação com os espectros da biblioteca do equipamento. Estimativas das concentrações podem ser realizadas com base nas áreas dos picos, e a razão S/G pode ser calculada dividindo a soma dos picos referentes às unidades siringil (4-etilsiringol, 4-vinilsiringol, homosiringaldeído, acetosiringona, siringilacetona) pela soma dos picos



referentes aos derivados guaiacil (guaiacol, 4-metilguaiacol, 4-vinilguaiacol, vanilina) (LIMA et al., 2008).

Para a técnica de py-MBMS (*pyrolysis-Molecular Beam-Mass Spectrometry*), aproximadamente 20 mg da amostra são colocados em um tubo de quartzo, o qual é inserido no pirolizador, que está acoplado ao espectrômetro de massas. O procedimento de pirólise é o mesmo descrito para py-GC-MS, com a diferença de que os compostos proveniente do pirolizador entram em contato com um feixe molecular (energia de 22,5 eV) e passam para o quadrupolo, gerando um espectro de massas no modo positivo, e neste caso não há separação cromatográfica prévia. A razão S/G é estimada pela soma das intensidades dos picos de siringil (siringol, etilsiringol, 4-metil-2,6-dimetoxifenol, siringaldeído, 4-propenilsiringol, aldeído sinapílico e álcool sinalílico) dividido pela intensidade dos picos guaiacil (guaiacol, etilguaiacol, metilguaiacol, vinilguaiacol, alil-proenilguaiacol, aldeído coniferílico) (HU et al., 2010).

### ***Análise composicional da biomassa***

A análise composicional da biomassa pode ser dividida em várias etapas, dentre elas destacam-se a determinação de sólidos totais, cinzas, proteínas, extrativos (materiais solúveis de meio aquoso e em meio orgânico), carboidratos estruturais, lignina e amido. Para chegar ao fechamento do balanço de massa de amostras de biomassa é necessário realizar outros procedimentos em conjunto, muitos deles discutidos em outros itens destacados ao longo deste capítulo.

Devido a grande variabilidade no teor de umidade para os diferentes tipos de biomassa, os resultados da análise

composicional são expressos em termos do peso seco. Considerando que o conteúdo da amostra de biomassa pode variar rapidamente quando exposto ao ar, normalmente recomenda-se dividir a amostra e realizar simultaneamente cada uma das etapas da análise composicional.

A determinação de sólidos totais é obtida após a secagem da amostra de biomassa a 105°C até peso constante. Se necessário, o teor de umidade pode ser obtido a partir da diferença encontrada na amostra original (SLUITER et al., 2008b).

A determinação de cinzas pode ser realizada por gravimetria e serve para determinar o teor de materiais inorgânicos presentes em amostras de biomassa. Esta informação é bastante importante, uma vez que altos teores de cinzas podem comprometer as etapas de hidrólise ácida. Basicamente, o cálculo do teor de cinzas leva em conta a razão porcentual da quantidade de cinzas geradas após a exposição da amostra de biomassa a 575°C por seu peso seco (SLUITER et al., 2005a).

Matérias-primas vegetais empregadas na produção de biocombustíveis e produtos químicos renováveis podem conter significativas quantidades de proteína e outros compostos nitrogenados, os quais podem interferir na determinação de lignina em análises subsequentes. A determinação direta do teor de proteína é um processo complexo, por essa razão, proteína em biomassa é determinada de forma indireta e em termos do teor de nitrogênio. Em muitos casos, este teor é obtido após a combustão da amostra ou a partir do método de Kjeldahl, e o teor de proteína é estimado usando um fator de nitrogênio apropriado (HAMES et al., 2008).

Materiais não estruturais da biomassa contribuem no balanço de massa e podem interferir nas etapas de caracterização



de carboidratos e lignina. O processo de remoção destes materiais não estruturais baseia-se em etapas de extração sucessiva com etanol e água, seguida de quantificação das porções extraídas por análises gravimétricas. A extração com etanol é requisito para todo tipo de biomassa, pois este processo garante, principalmente, a remoção de graxas que podem precipitar durante a filtração na etapa de hidrólise ácida. Os constituintes da porção aquosa normalmente incluem compostos inorgânicos, proteínas e diferentes tipos de açúcares, especialmente a sacarose (SLUITER et al., 2005b). Quando necessário, essa porção pode ser analisada seguindo os procedimentos descritos no item **“Determinação do perfil de açúcares”**.

Carboidratos estruturais e ligninas constituem a maior porção da biomassa e a correta determinação desses constituintes depende de etapas preliminares de preparo das amostras de modo que estejam disponibilizados para as análises subsequentes. Nessa etapa é importante não haver extrativos na amostra de biomassa, os quais podem atuar como interferentes. Normalmente, emprega-se a hidrólise ácida para fracionar a amostra e facilitar o processo de quantificação (SLUITER et al., 2008c).

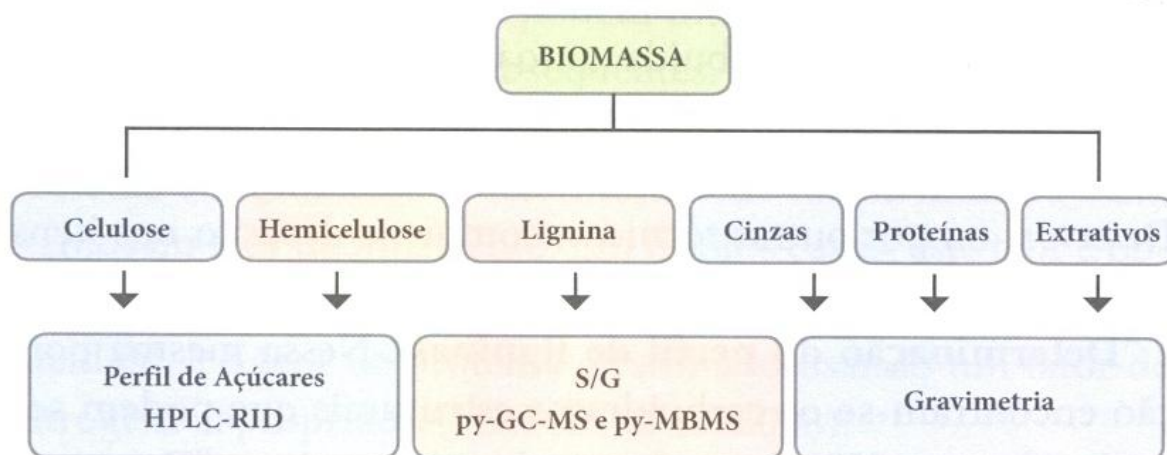
A lignina fica distribuída tanto no material solúvel quanto no material insolúvel resultantes da hidrólise ácida. A lignina solúvel pode ser avaliada por HPLC-PAD (*Photodiode Array Detector*) ou por outras técnicas, conforme descrito nos itens **“Determinação do teor de celulose, hemicelulose e lignina”** e **“Determinação do perfil de ligninas”**. Nessa mesma porção encontram-se os carboidratos estruturais que podem ser analisados por HPLC, conforme descrito no item **“Determinação do perfil de açúcares”**. A lignina insolúvel obtida pelo



processo de hidrólise ácida é determinada gravimetricamente. No entanto, essa porção insolúvel pode conter cinzas e proteínas e tais constituintes devem ser descontados durante a análise gravimétrica (SLUITER et al., 2008c).

O amido é um polímero de alto peso molecular de forma não cristalina que consiste de unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -glicosídicas que podem gerar duas formas poliméricas, a amilose e a amilopectina. A determinação do teor de amido em amostras de biomassa é realizada a partir da solubilização seguida da digestão enzimática do amido. O processo enzimático garante a hidrólise total do amido à glicose monomérica que pode ser quantificada por HPLC. Pelo fato de não ser uma determinação direta, é necessário realizar o processo de extração para garantir a eliminação dos açúcares não estruturais que podem superestimar o teor de amido (SLUITER et al., 2008c).

Resumidamente, a Figura 5 ilustra algumas das técnicas e métodos convencionais empregados na etapa de caracterização de biomassa.



**Figura 5.** Métodos tradicionais utilizados para caracterização da biomassa.

## Técnicas analíticas avançadas aplicadas à biomassa

Conhecer a composição química dos diferentes tipos de biomassa é um fator chave para nortear potenciais usos ou promover a agregação de valor à essa matéria-prima. A composição química e as propriedades físicas e químicas da biomassa podem ser drasticamente alteradas conforme o processo aplicado para desconstruí-la, existindo diversas abordagens para realizar essa etapa de desconstrução.

Tradicionalmente, análises químicas de componentes individuais de materiais lignocelulósicos (por exemplo, açúcar e lignina) têm sido realizadas após hidrólise ácida seguida da determinação gravimétrica de lignina e determinação cromatográfica de açúcares, conforme descrito anteriormente no item “**Técnicas analíticas tradicionais aplicadas à biomassa lignocelulósica**”. Estes métodos podem gerar dados de alta precisão, mas são laboriosos, demorados, com alto consumo de reagentes químicos e dispendiosos. Além do mais, não permitem que as análises sejam realizadas com alta frequência analítica (*high-throughput analysis*). Portanto, é de grande importância o desenvolvimento de métodos e procedimentos analíticos empregados na rápida caracterização da composição química da biomassa (KELLEY et al., 2004).

### *Técnicas espectroscópicas, cromatográficas e espectrométricas*

Algumas técnicas espectroscópicas têm sido utilizadas para a determinação da composição química e das propriedades físico-químicas de diferentes biomassas. Dentre elas,



pode-se citar a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância difusa (DRIFT - *Diffuse Reflectance Infrared Spectroscopy by Fourier Transform*) (SCHULTZ et al., 1985), a qual determina glicose, lignina e xilose. Outra técnica utilizada é a FTIR, anteriormente comentada (RODRIGUES, et al., 2001). Alguns estudos mostram o uso das duas técnicas para a análise quantitativa da composição de madeira (MEDER et al., 1999). Ambas as técnicas fornecem previsões de alta qualidade sobre a composição química de madeiras e dentre as duas técnicas, devido a fácil manipulação da instrumentação durante as análises, a DRIFT é recomendada como técnica mais adequada.

Por outro lado, a limitação destas técnicas consiste no adequado preparo da amostra. Mesmo no caso da DRIFT, considerada a técnica mais amigável, as amostras precisam ser moídas até formação de um pó homogêneo, com as condições de amostragem necessitando de alta representatividade e reprodutibilidade, o que torna tal etapa bastante crítica durante as análises (KELLEY et al., 2004).

A NIR (*Near Infrared Spectroscopy*) pode ser utilizada para coletar rapidamente espectros de uma ampla variedade de amostras. Enquanto a DRIFT processa aproximadamente 8-10 amostras/hora, mais de 100 amostras/hora podem ser processadas por NIR, o que torna essa técnica muito atraente para análises de composição química de biomassa. Por conta da sua versatilidade, essa técnica tem sido utilizada no estudo de caracterização de diferentes tipos de biomassa (MARTIN; ABER, 1994; KELLEY et al., 2004; TEMPLETON et al., 2009).

As técnicas analíticas de pirólise, que foram descritas anteriormente, têm sido utilizadas para determinar compostos



específicos e a composição química de muitos tipos de biomassa. Além da utilização das técnicas de py-MBMS e py-GC-MS na determinação de lignina em amostras, a partir da quantificação da razão S/G, como descrito em item anterior, estas podem ser utilizadas para a análise de vários compostos presentes nas biomassas. A py-MBMS e py-GC-MS podem ser utilizadas, por exemplo, para a determinação de um conjunto complexo de produtos e componentes individuais de reações produzidas a partir de pirólise de madeira (EVANS; MILNE, 1987; AGBLEVOR et al., 1994); e também no estudo da estrutura da lignina, e determinação de lignina e carboidratos, dentre outras aplicações (RODRIGUES et al., 1999; IZUMI; KURODA, 1997).

Devido à especificidade por determinados compostos e as limitações de algumas técnicas, alguns pesquisadores utilizam duas técnicas para testar a eficiência de cada uma e, paralelamente, obter informações mais completas a respeito da composição química da biomassa, por exemplo, DRIFT e FTIR (MEDER et al., 1999).

Uma limitação das análises por py-GC-MS é que os compostos presentes na biomassa podem sofrer degradação devido à alta temperatura da fonte de pirólise. Podem ainda ser formados fragmentos não voláteis a partir da pirólise, os quais não podem ser detectados por GC-MS (KELLEY et al., 2004).

Para a análise de compostos polares, as técnicas mais indicadas, e que não necessitam de pré-tratamentos baseados em *derivatização* da amostra, são a HPLC e a espectrometria de massas. Os sistemas de HPLC podem ser acoplados a diferentes detectores, os quais devem ser escolhidos de acordo com as características dos compostos a ser detectados e da

matriz analítica. Por exemplo, utiliza-se o detector de PDA para detectar compostos com grupos que absorvam na região do ultravioleta (UV), como compostos aromáticos, carbonilados, etc.; por sua vez, o detector RID é capaz de analisar praticamente todos os compostos, independente da estrutura dos mesmos; no entanto, com baixa sensibilidade e seletividade. O espectrômetro de massas, além de ser universal, é sensível, seletivo, possui alta precisão e exatidão nas análises, e pode ser acoplado ao HPLC ou realizar análises introduzindo diretamente a amostra no espectrômetro, no modo DIMS (*Direct Infusion Mass Spectrometry*).

Atualmente, o avanço da instrumentação analítica tem viabilizado cada vez mais a melhoria de parâmetros relacionados ao aumento da sensibilidade, seletividade e capacidade de processamento com que as análises de matrizes complexas são realizadas.

Para os estudos que necessitam de um número de determinações muito elevado, é essencial utilizar protocolos de preparo de amostras, que são aqueles métodos oficiais das agências de controle e utilizados em documentos reguladores, simples, rápidos e que possam minimizar a geração de resíduos laboratoriais. Essas mesmas características também são esperadas para as técnicas que darão a informação analítica para um determinado estudo.

Nesse sentido, a adaptação dos atuais métodos empregados na avaliação da biomassa às novas instrumentações, principalmente àquelas baseadas em técnicas cromatográficas, constitui uma promissora alternativa para a implantação em centros de pesquisa que necessitam realizar estudos compreensivos e com elevado número de amostras.



A introdução da técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC, *Ultra Performance Liquid Chromatography*) trouxe diversas vantagens sobre a cromatografia convencional, como a HPLC. Esse aprimoramento possibilita que os sistemas de UPLC trabalhem com pressões até seis vezes superiores aos sistemas convencionais e essa capacidade de trabalho em altíssimas pressões permitiu a redução do tamanho das partículas das fases estacionárias, bem como do diâmetro interno das colunas.

Além do avanço das fases estacionárias, melhorias no sistema de aquisição, compatibilidade com a maioria dos detectores conhecidos e facilidade no processamento dos dados gerados constituem características que viabilizaram o aumento significativo da resolução, da capacidade de separação e da detecção dos analitos durante as análises cromatográficas, incluindo tempos de aquisição extremamente curtos (SWARTZ, 2005).

Exemplo desse tipo de aplicação pode ser observado no trabalho apresentado por Yizhe et al. (2008), no qual eles desenvolveram uma metodologia empregada no controle de qualidade de ácidos graxos e ésteres metílicos de ácidos graxos presentes em amostras de biodiesel. Nesse trabalho os autores usaram a técnica de UPLC acoplada a detector evaporativo de espalhamento de luz (ELSD, *Evaporative Light Scattering Detector*), sendo possível determinar, simultaneamente, 11 analitos em apenas cinco minutos.

Características similares podem ser levantadas sobre a cromatografia gasosa convencional e a cromatografia gasosa rápida ou ultrarrápida (*fast-GC* e *ultrafast-GC*). Nestas modalidades, a resolução cromatográfica pode ser reduzida para um valor mínimo, próximo do limite que não cause prejuízos na



etapa de separação e identificação dos componentes da amostra. Com isso, há uma redução considerável no tempo das análises (SEQUINEL et al., 2010).

Atualmente, a maioria dos detectores que são utilizados com a cromatografia gasosa clássica pode ser empregada na *fast-GC* ou *ultrafast-GC*. O requerimento básico para que ocorra o processamento de bandas cromatográficas com largura de até 50 ms é existir detectores com alta frequência de amostragem, acima de 200 Hz (CRUZ-HERNANDEZ; DESTAILLATS, 2009).

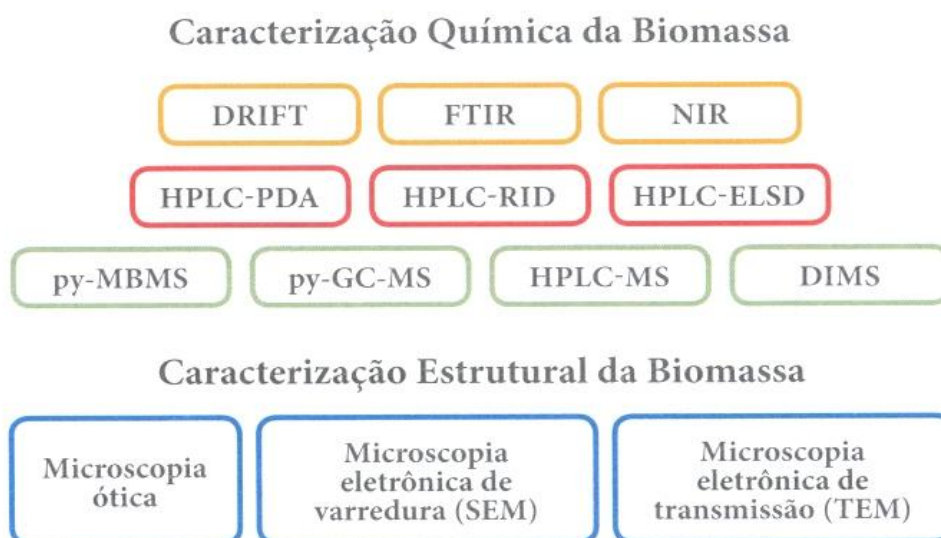
Quanto maior a frequência de aquisição, maior será a capacidade do detector para responder às mudanças de sinal provenientes dos compostos que eluem da coluna. Dentre os detectores usualmente empregados em cromatografia gasosa, os detectores de ionização por chama (FID, *Flame Ionization Detector*) e detector de espectrometria de massas (MS) são os de maior aplicabilidade na modalidade *fast-GC* (CRUZ-HERNANDEZ; DESTAILLATS, 2009).

Exemplo desse tipo de aplicação pode ser observado no trabalho apresentado por Ficarra et al. (2010), em que diversos métodos de transesterificação e esterificação de ácidos graxos foram avaliados e os resultados expressos em termos de análises de *ultrafast-GC-FID* com tempo de aquisição inferior a 2 minutos.

Para aplicações no campo de caracterização de biomassa, as técnicas cromatográficas podem ser aplicadas na avaliação de diversos tipos de analitos, o que pode incluir desde avaliações quali e quantitativa de ligninas, o perfil de açúcares provenientes de biomassa hidrolisada, a formação de inibidores de processos fermentescíveis e outros compostos de interesse.

Além da caracterização química da biomassa, há também a caracterização ultraestrutural da biomassa lignocelulósica – observação dos componentes da parede celular, como as microfibrilas celulósicas e as lamelas, bem como dos subcomponentes de ambas - a qual pode ser feita por análises microscópicas. Há diversos tipos de técnicas microscópicas, como microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura (SEM, *Scanning Electron Microscopy*), microscopia eletrônica de transmissão (TEM, *Transmission Electron Microscopy*), cada uma apresentando suas particularidades (JOY et. al 1986; EGERTON, 1986; WILLIANS; CARTER, 1996). Para a obtenção de informações detalhadas da ultraestrutura da biomassa, o ideal é utilizar as diferentes formas de microscopia para a obtenção de um resultado completo, com todas as informações complementares obtidas pelas diferentes técnicas.

A Figura 6 ilustra as técnicas aplicadas à caracterização química e à caracterização estrutural.



**Figura 6.** Técnicas analíticas avançadas utilizadas na caracterização química e estrutural da biomassa.



## *Estudo de metabólitos por metabolômica*

A análise completa do perfil metabólico em amostras de biomassa é um desafio, principalmente devido à alta complexidade dos compostos presentes e às limitações das técnicas analíticas convencionais utilizadas para a caracterização desse tipo de matéria-prima. Para contornar essa deficiência, o uso de tecnologias mais avançadas vem se tornando vantajoso para se obter análises rápidas, seletivas, sensíveis e com o maior número de compostos detectados por um mesmo equipamento e na mesma análise. Dentro deste contexto, a *metabolômica* e a análise do perfil metabólico da biomassa por espectrometria de massas mostram-se alternativas interessantes para a caracterização desse tipo de matriz analítica ou dos produtos gerados.

A tecnologia voltada para o reconhecimento de uma visão geral, compreensiva, qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes em um organismo é denominada *metabolômica* (HALL, 2006). Os metabólitos constituem um conjunto diverso de arranjos atômicos, proporcionando uma ampla variação nas propriedades físicas e químicas da biomassa. O grau de diversidade é indicado pelas análises de metabólitos orgânicos de baixo peso molecular, polares e/ou voláteis (etanol e isopreno) e pode incluir até análises de metabólitos com maiores pesos moleculares, polares (carboidratos) e não polares (terpenóides e lipídeos).

A *metabolômica* é uma tecnologia capaz de determinar diferentes compostos químicos na mesma análise sendo, portanto, uma análise mais completa dos metabólitos presentes em uma determinada amostra. A identificação e quantificação dos metabólitos necessitam de instrumentação sofisticada, como a MS, RMN e fluorescência induzida por laser (LIF, *Laser Induced Fluorescence*).



Estratégias analíticas que empregam MS estão sendo consideradas como abordagens fundamentais em estudos de metabolômica e têm sido as ferramentas analíticas mais comumente utilizadas (BEDAIR; SUMNER, 2008; LEI et al., 2011). Isto porque as técnicas de metabolômica baseadas em MS oferecem uma excelente combinação de sensibilidade e seletividade, além de gerarem informações muito rápidas sobre a composição química (LEI et al., 2011).

A Figura 7 apresenta um fluxograma geral da aplicação da metabolômica no estudo da biomassa vegetal.



**Figura 7.** Fluxograma geral para estudo metabólico de folhas.

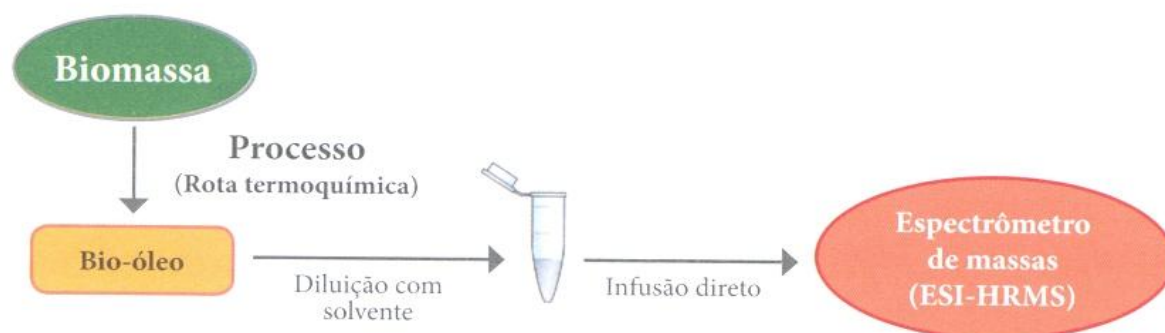
### *Avaliação da biomassa processada*

Os diferentes tipos de biomassa apresentam composições químicas distintas, as quais podem ser determinadas pelos métodos mostrados ao longo do capítulo. As peculiaridades

dos produtos gerados a partir da biomassa estão diretamente relacionadas com as características do material vegetal e com o processo utilizado na sua transformação. Assim, é necessária a utilização de técnicas analíticas para a análise química em todas as fases de processamento da biomassa.

Um exemplo a ser discutido é o uso da técnica de GC-MS para a determinação, por exemplo, da composição química de bio-óleos. No entanto, esta técnica é limitada à análise de compostos voláteis, com cadeias pequenas e apolares. Trabalhos recentes mostram o uso de análises diretas por ESI-MS na caracterização de bio-óleo (SMITH et al., 2012; JARVIS et al., 2012). Esse tipo de abordagem analítica possibilita detectar vários de compostos em uma única análise (Figura 8).

Além da análise de bio-óleos, essa técnica pode ser empregada para a análise de outros produtos gerados a partir do pré-processamento da biomassa, como biodiesel, bem como na identificação de produtos formados nas reações, como inibidores. Por fim, também pode ser utilizada para acompanhamento e otimização de processos químicos e biológicos de diferentes tipos de biomassa.



**Figura 8.** Fluxograma geral para caracterização de produtos de biomassa processada por técnicas avançadas de espectrometria de massas de altíssima resolução (HRMS, *High Resolution Mass Spectrometry*).

## Considerações finais

A complexidade química e estrutural de cada tipo de biomassa pode variar drasticamente, o que pode inferir em diferentes aplicações, desde a produção de biocombustíveis à de produtos químicos renováveis. Portanto, a análise composicional e a caracterização detalhada de cada tipo de biomassa são necessárias.

É possível analisar quimicamente a biomassa por diferentes métodos e técnicas. Devido à ampla diversidade da composição química, nem sempre uma única técnica analítica é suficiente para gerar a informação desejada, seja ela referente à análise composicional ou à caracterização das propriedades físicas e químicas.

Atualmente, métodos mais sustentáveis e automatizados, os quais geram menor carga de resíduos laboratoriais, têm sido desenvolvidos de modo a fornecer análises mais rápidas, seletivas e sensíveis.

A literatura relata a utilização de técnicas espectroscópicas, cromatográficas e espectrométrica que apresentam grande potencial na análise química *quali* e *quantitativa* em amostras de biomassa. No entanto, ainda é necessário avançar na aplicação dessas técnicas, principalmente nas etapas de desenvolvimento e validação de métodos baseados nessas tecnologias.

Tendo em vista as informações apresentadas, torna-se evidente a necessidade do uso de técnicas analíticas modernas para realizar o mapeamento preciso da composição química dos diversos tipos de biomassa. O reconhecimento do potencial de aplicação de determinada matéria-prima ocorrerá, de forma efetiva, no momento em que houver o monitoramento



de todas as etapas envolvidas nos processos de desconstrução e de conversão da biomassa a ser estudada e processada.

Atualmente, existem diversas demandas relacionadas não apenas à etapa de caracterização de biomassa, mas também à de monitoramento dos produtos obtidos nos processos de transformação desse material, seja no acompanhamento da cinética, do rendimento das reações, na identificação dos compostos gerados ou na formação dos inibidores das reações.

Para atender a tais demandas, será cada vez mais comum o emprego das técnicas avançadas, as quais apresentam a capacidade de gerar resultados em curto espaço de tempo, podendo serem aplicadas em linha aos processos de conversão da biomassa.

### Referências bibliográficas

- ABDELNUR, P. V.; EBERLIN, L. S.; DE SA, G. F.; SOUZA, V.; EBERLIN, M. N. Single-shot biodiesel analysis: nearly instantaneous typification and quality control solely by ambient mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 80, p. 7882–7886, 2008.
- AGBLEVOR, F. A.; EVANS, R. J.; JOHNSON, K. D. Molecular-beam mass spectrometric analysis of lignocellulosics materials, I Herbaceous biomass. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Amsterdam, v. 30, p. 125-44, 1994.
- ALMEIDA, J. R.; RUNQUIST, D.; SANCHEZ NOGUE, V.; LIDEN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the

- yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 6, p. 286-299, 2011.
- BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; SILVA, V. L.; COLODETTE, J. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (Pi-CG/EM). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 2035-2041, 2008.
- BEDAIR, M.; SUMMER, L. W. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 27, p. 238-250, 2008.
- BOSE, S. K.; FRANCIS, R. C.; GOVENDER, M.; BUSH, T.; SPARK, A. Lignin content versus syringyl to guaiacyl ratio amongst poplars. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 100, p. 1628-1633, 2009.
- CRUZ-HERNANDEZ, C.; DESTAILLATS, F. Recent Advances in Fast Gas-Chromatography: Application to the Separation of Fatty Acid Methyl Esters. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, London, v. 32, p. 1672-1688, 2009.
- DAVISON, B. H.; DRESCHER, S. R.; TUSKAN, G. A.; DAVIS, M. F.; NGHIEM, N. P. Variation of S/G ratio and lignin content in a populus family influences the release of xylose by dilute acid hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 130, p. 427-435, 2006.



- EGERTON, R. F. Electron energy-loss spectroscopy in the electron microscope. New York: Plenum Press, 1986, 410 p.
- EVANS, R. J.; MILNE, T. A. Molecular characterization of the pyrolysis of biomass; 1. Fundamentals. **Energy & Fuels**, Washington, v. 1, p. 123-37, 1987.
- FERREIRA-LEITAO, V.; PERRONE, C. C.; RODRIGUES, J.; FRANKE, A. P. M.; MACRELLI, S.; ZACCHI, G. An approach to the utilisation of CO<sub>2</sub> as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 3, n. 7, p. 2-8, 2010.
- FICARRA, A; LO FIEGO, D. P.; MINELLI, G.; ANTONELLI, A. Ultra fast analysis of subcutaneous pork fat. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 121, p. 809-814, 2010.
- GÓMEZ, C. J.; MESZAROS, E.; JAKAB, E.; VELO, E.; PUIG-JNAER, L. Thermogravimetry/mass spectrometry study of woody residues and herbaceous biomass crop using PCA techniques. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Amsterdam, v. 80, p. 416-426, 2007.
- GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 1500-1503, 2009.

- GOVENDER, M.; BUSH, T.; SPARK, A.; BOSE, S. K.; FRANCIS, R. C. An accurate and non-labor intensive method for the determination of syringyl to guaiacyl ratio in lignin. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 100, p. 5834–5839, 2009.
- GRABBER, J. H.; RALPH, J.; HATFIELD, R. D.; QUIDEAU, S. p-Hydroxyphenyl, Guaiacyl, and Syringyl Lignins Have Similar Inhibitory Effects on Wall Degradability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, p. 2530-2532, 1997.
- HALL, R. D. Plant Metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, Hoboken, v. 169, p. 453-468, 2006.
- HAMES, B.; SCARLATA, C.; SLUITER, A. Determination of protein content in biomass. In: **Laboratory analytical procedure**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2008, 8 p.
- HON, D.N.-S.; SHIRAISHI, N. (Eds.) **Wood and cellulosic chemistry**. (2nd ed.) New York: Marcel Dekker, 2001. 914 p.
- HU, Z.; SYKES, R.; DAVIS, M. F.; BRUMMER, E. C.; RAGAUSKAS, A. J. Chemical profiles of switchgrass. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, p. 3253-3257, 2010.



- IZUMI, A.; KURODA, K-I. Pyrolysis-mass spectrometry analysis of dehydrogenation lignin polymers with various syringyl/guaiacyl ratios. **Rapid Communication on Mass Spectrometry**, Hoboken, v. 11, p. 1709-15, 1997.
- JARVIS, J. M.; MCKENNA, A. M.; HILTEN, R. N.; DAS, K. C.; RODGERS, R. P.; MARSHALL, A. G. Characterization of pine pellet and peanut hull pyrolysis bio-oils by negative-ion electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy & Fuels*, Washington, v. 26, p. 3810-15, 2012.
- JOY, D. C.; ROMING, J. A. D.; GOLDSTEIN J. I. (Eds.). **Principles of analytical electron microscopy**. New York: Plenum Press, 1986.
- KELLEY, S. S.; ROWELL, R. M.; DAVIS, M.; JURICH, C. K.; OBACH, R. Rapid analysis of the chemical composition of agricultural fibers using near infrared spectroscopy and pyrolysis molecular beam mass spectrometry. **Biomass and Bioenergy**, Amsterdam, v. 27, p. 77-88, 2004.
- LEI, Z.; HUHMANN, D. V.; SUMMER, L. W. Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, *in press*, R111.238691, 2011.
- LIMA, C. F.; BARBOSA, L. C. A.; MARCELO, C. R.; SILVERIO, F. O.; COLODETTE, J. L. Comparison between analytical pyrolysis and nitrobenzene oxidation for determination of

syringyl/guaiacyl ratio in *Eucalyptus spp.* lignin. **BioResources**, Raleigh, v. 3, p. 701-712, 2008.

MARTIN, M.; ABER, J. Analyses of forest foliage III: determining nitrogen, lignin and cellulose in fresh leaves using near infrared reflectance data. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, Chichester, v. 2, p. 25-32, 1994.

MEDER, R.; GALLAGHER, S.; MACKIE, K. L.; BOHLER, H.; MEGLLEN, R. Rapid determination of the chemical composition and density of *Pinus radiata* by PLS modeling of the transmission and diffuse reflectance FTIR spectra. **Holzforschung**, Berlin, v. 53, p. 261-6, 1999.

RALPH, J.; HATFIELD, R. D. Pyrolysis-GC-MS Characterization of forage materials. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39., p. 1426-1437, 1991.

RODRIGUES, J.; MEIER, D.; FAIX, O.; PEREIRA, H. Determination of tree to tree variations in syringyl/guaiacyl ratio of *Eucalyptus globulus* wood lignin by analytical pyrolysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Amsterdam, v. 48, p. 121-8, 1999.

RODRIGUES, J.; PULS, J.; FAIX, o.; PEREIRA, H. Determination of monosaccharides composition of *Eucalyptus globulus* wood by FTIR spectroscopy. **Holzforschung**, Berlin, v. 55, p. 265-9, 2001.



SEQUINEL, R; HATANAKA, RR; GUALTIERI, CE; FLUMIGNAN, DL; OLIVEIRA, JE; PASSARETTI FILHO, J. Cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, p. 2226-2232, 2010.

SCHULTZ, T.; TEMPLETON, M.; MCGINNIS, G. Rapid determination of lignocellulose by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 57, p. 209-12, 1985.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of ash in biomass. In: **Laboratory analytical procedure**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 8p., 2005a.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of extractives in biomass. In: **Laboratory analytical procedure**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 12 p., 2005b.

SLUITER, A; HAMES, B; RUIZ, R; SCARLATA, C; SLUITER, J; TEMPLETON, D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. In: **Laboratory analytical procedure**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 14 p., 2008a.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J. Determination of total solids in biomass and

total dissolved solids in liquid process samples. In: **Laboratory analytical procedure**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 9 p., 2008b.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. In: **Laboratory analytical procedure**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 18 p., 2008c.

**SLUTER, J.B.; RUIZ, R.O.; SCARLATA, C.J.; SLUITER, A.D.; TEMPLETON, D.W.** Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 16, p. 9043-9053, 2010.

SMITH, E. A.; PARK, S.; KLEIN, A. T.; LEE, Y. J. **Bio-oil analysis using negative electrospray ionization: comparative study of high-resolution mass spectrometers and phenolic versus sugarc components**. *Energy & Fuels*, Washington, v. 26, p. 3796-802, 2012.

SWARTZ, ME. UPLC<sup>TM</sup>: an introduction and review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, London, vol.28, p.1253-1263, 2005.

SYKES, R.; KODRZYCKI, B.; TUSKAN, G.; FOUTZ, K.; DAVIS, M. Within tree variability of lignin composition in *Populus*. **Wood Science and Technology**, Gewerbe-strasse, v. 42, p. 649-661, 2008.



- TEMPLETON, D. W.; SLUITER, A. D.; HAYWARD, T. K.; HAMES, B. R.; THOMAS, S. R. Assessing corn stover composition and sources of variability via NIRS. **Cellulose**, Gewerbestrasse, v. 16, p. 621-639, 2009.
- WHITE, W. G.; MOOSE, S. P.; WEIL, C. F.; MCCANN, M. C.; CARPITA, N. C.; BELOW, F. E. Tropical maize: exploiting maize genetic diversity to develop a novel annual crop for lignocellulosic biomass and sugar production. In: BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. **Routes to cellulosic ethanol**. Gewerbestrasse: Springer, 2011, p. 167-179.
- WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. **Transmission electron microscopy: a textbook for materials science**. V. 1. New York: Plenum Press, 1996. 729 p.
- VAZ JÚNIOR, S.; SOARES, I. P. **Química analítica aplicada à agroenergia**. Brasília: Embrapa, 2012. 97 p.
- YIZHE, L.; GUIRONG, B.; HUA, W. Determination of 11 fatty acids and fatty acid methyl esters in biodiesel using ultra performance liquid chromatography. **Chinese Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 26, p. 494 - 498, 2008.