



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
MESTRADO EM AGROENERGIA

ITANA NEIVA BATISTA

**ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO POTENCIAL DE ETANOL A
PARTIR DE DIFERENTES ESPÉCIES DE BRAQUIÁRIAS**

PALMAS - TO
2016

ITANA NEIVA BATISTA

**ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO POTENCIAL DE ETANOL A
PARTIR DE DIFERENTES ESPÉCIES DE BRAQUIÁRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Agroenergia da Universidade Federal do Tocantins, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Agroenergia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Flávia Lucila Tonani de Siqueira

PALMAS, TO
2016

Batitsta, Itana Neiva..

Estimativa da produção potencial de etanol de diferentes espécies de Braquiárias /
Itana Neiva Batista. Palmas. - 2016.

xx, 58p.; il.

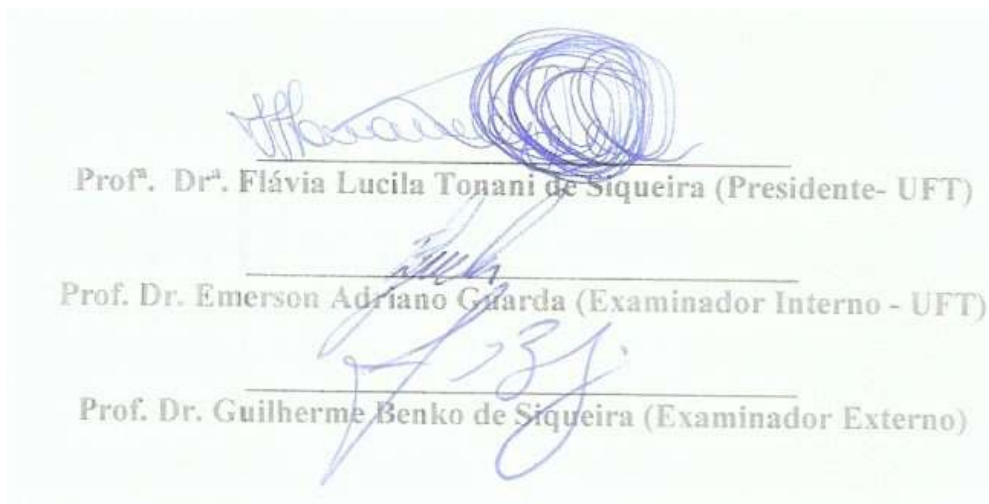
Orientador: Prof^a. Dr^a. Flávia Lucila Tonani de Siqueira

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal do Tocantins.

1. Braquiárias – Brasil. 2. Potencial biomassa – Brasil. 3. Etanol lignocelulósico –
Brasil. I. Itana Neiva Batista. II. Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal
do Tocantins. III. Estimativa da produção potencial de etanol de diferentes espécies de
Braquiárias. / Itana Neiva Batista. Palmas. - 2016.

ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO POTENCIAL DE ETANOL A PARTIR DE DIFERENTES ESPÉCIES DE BRAQUIÁRIAS

COMISSÃO EXAMINADORA



Palmas, 07/07/2016.

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGA para o formato da
Dissertação foram contempladas.

A handwritten signature in blue ink, corresponding to Prof. Dr. Flávia Lucila Tonani de Siqueira, written over a horizontal line.

Prof.^a. Dr.^a. Flávia Lucila Tonani de Siqueira

AGRADECIMENTOS

À Deus por me amparar em todos os momentos, e por mostrar o caminho nas horas incertas.

Aos meus pais João Luiz Neiva Brito e Valdelena Leopoldina Batista por me apoiarem em todos os momentos.

À prof. Dr^a. Flávia Lucila Tonani de Siqueira, pela orientação, amizade, confiança e conhecimentos transmitidos para realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Guilherme Benko de Siqueira, pela inestimável ajuda, apoio, paciência e conhecimentos transmitidos.

Ao Técnico de laboratório Domingos Bonfim dos Santos, pela disposição em ajudar em tudo que foi necessário.

Ao amigo Walysson Bernardo Rodrigues Santos pela parceria durante a realização do trabalho.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PAREDE CELULAR.....	16
FIGURA 2 – ESQUEMA MORFOLÓGICO DA PAREDE DA CÉLULA VEGETAL	17
FIGURA 3 - ESTRUTURA DA CELULOSE	19
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PRODUÇÃO DE ETANOL.....	22
FIGURA 5 – ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DO COMPLEXO CELULOSE-HEMICELULOSE- LIGNINA.....	24
FIGURA 6 – MECANISMO DE AÇÃO DA CELULASE SOBRE A CELULOSE	27

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- DIFERENÇA ENTRE CELULOSE E HEMICELULOSE

TABELA 2- MÉTODO DE PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

TABELA 3- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BRAQUIÁRIA CONVERT HD 364

TABELA 4- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BRAQUIÁRIA MARANDU

TABELA 5- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BRAQUIÁRIA DECUMBES

TABELA 6- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BRAQUIÁRIA RUZIZIENSES

TABELA 7- CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS CETEC E HTEC

TABELA 8-MATERIAL INSOVÚVEL APÓS PRÉ-TRATAMENTO (%MS), FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO (% MS) E PERDA POR SOLUBILIZAÇÃO DA HEMICELULOSE (% MS) PARA DIFERENTES ESPÉCIES DE BRAQUIÁRIAS.

TABELA 9-TEORES DE FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO (FDN) , FIBRA EM DETERGENTE ÁCIDO (FDA) E HEMICELULOSE PARA AS DIFERENTES ESPÉCIES DE BRAQUIÁRIAS.

TABELA 10-COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE DA FIBRA (CD_{FIBRA}) , FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO DIGESTÍVEL ($FDN_{digestível}$) E PRODUÇÃO POTENCIAL DE ETANOL (ETANOL POTENCIAL) A PARTIR DAS BRAQUIÁRIAS: DECUMBENS, BRIZANTHA CV MARANDU, RUZIZIENSIS E CONVERT HD 364.

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	10
Capítulo I: Fundamentação Teórica	12
1.0 Biomassa Lignocelulósica	13
1.1 Estrutura da parede celular vegetal.....	15
1.2 Composição química da biomassa lignocelulósica	16
1.2.1 Celulose	16
1.2.2 Hemicelulose	17
1.2.3 Lignina.....	18
1.2.4 Outros componentes	19
2.0 Etanol de Material lignocelulósico	19
2.1 Etapas para a produção de etanol lignocelulósico	21
2.1.1 Pré-Tratamento da biomassa lignocelulósica	21
2.1.2 Pré-tratamento químico e físico.....	22
2.1.3 Hidrólise enzimática	24
2.1.4 Fermentação do material lignocelulósico	26
3.0 Gramíneas como fonte de etanol de segunda geração	26
3.1 <i>Brachiaria Convert HD 364</i>	27
3.2 Capim <i>Marandu- Brachiaria brizantha cv Marandu</i>	28
3.3 Capim <i>Brachiaria decumbens</i>	28
3.4 <i>Brachiaria Ruzizienses</i>	29
REFERÊNCIAS	30
Resumo	38
Abstract.....	39
Introdução.....	40
2.0 Materiais e métodos.....	41
2.1 Local, tratamentos e delineamento experimental	41
2.2 Parâmetros avaliados	42
2.3- Preparo da biomassa.....	42
2.4 Determinação de componentes pelo método Van Soest.....	42
2.5 Pré-tratamento	43
2.6 Hidrólise enzimática	44
2.7 Determinação da fração fermentecível da fibra (açúcares solúveis)	45
2.8 Estimativa da produção de etanol.....	45
3.0 Resultados e discussão.....	45
3.1 Pré-tratamento	45

3.1	Fibra em detergente neutro (FDN), Fibra em detergente ácido (FDA) e Hemicelulose	47
3.2	Coeficiente de Digestibilidade da Fibra (CD_{Fibra}) e Quantidade de Fibra em Detergente Neutro digestível ($FDN_{\text{digestível}}$)	48
3.2.1-	Rendimento de bioetanol.....	50
3.3-	Regressão Linear	51
	Conclusão	56
	Referências	57

INTRODUÇÃO GERAL

O interesse acerca dos biocombustíveis aumentou consideravelmente nos últimos anos. Não apenas em virtude do discurso da contenção dos danos ambientais; mas também impulsionado pelo aumento da demanda de energia acompanhada do declínio da oferta de combustíveis fósseis (MENDES et al.,2012).

Dentre os biocombustíveis mais utilizados, o etanol é o que possui maior destaque no cenário mundial. O mesmo pode ser obtido a partir de diversas matérias-primas e o processo de produção utiliza diferentes tecnologias de conversão, que podem ser de primeira ou de segunda geração (PITARELO et. al., 2012).

Os processos de obtenção de etanol a partir do caldo de cana-de-açúcar ou do amido do milho já se encontram estabelecidos há muitos anos. O crescente interesse e demanda por etanol tem direcionado as ações de PD&I para a viabilização da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, o denominado etanol de segunda geração. Pesquisas têm sido desenvolvidas visando o aproveitamento de biomassa, residuais ou não, como coníferas, feno, forrageiras, bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha de trigo, de milho e de arroz, resíduos da indústria de papel, entre outros (MENDES et al.,2012).

Além de que a biomassa lignocelulósica é a fonte de carbono não-fóssil mais abundante do planeta (SINGH; MISHRA, 1995).A utilização integral desse resíduo mostra-se como uma alternativa para aumentar a produção de etanol combustível, menos poluente que os combustíveis fósseis, sem a necessidade de aumentar a área plantada de cana (MACHADO, 2009).

A viabilização de novas tecnologias que utilizam a biomassa para produção de etanol de segunda geração representa uma das mais importantes alternativas à consolidação de um modelo sustentável para a produção de combustíveis renováveis. Por esse motivo, é importante estimular o investimento no desenvolvimento de rotas de produção de baixo custo que produzam um combustível competitivo com o mercado (RAMOS, 2000; PITARELO et.al., 2012).

Dentre as vantagens, pesquisadores desde o final da década de 1980, apontam na utilização de forrageiras tropicais como matéria prima para fonte energética: adaptação e boa amplitude nas condições edafoclimáticas nacionais, podendo ser cultivadas em áreas marginais onde outras culturas energéticas não são recomendadas; ciclo perene, diminuindo o custo de produção, uma vez que, após estabelecida, torna-se necessária apenas a manutenção do potencial produtivo e, permitirem diversos cortes, necessitando apenas de pesquisas mais específicas e maiores incentivos para produção (USBERTI, 1988).

Nesse sentido executou-se este estudo, onde foi avaliado o potencial de produção de Etanol de segunda geração a partir de quatro espécies de braquiárias (Descumbens, Brizantha cv. Marandu, Ruziziensis e Convert HD364).

Capítulo I: Fundamentação Teórica

1.0 Biomassa Lignocelulósica

De acordo com Aguiar (2010), refere-se a qualquer tipo de matéria orgânica oriunda de vegetais, animais, ou ainda de processos de transformações, sejam artificiais ou naturais. Caracterizada como fonte de energia renovável, abundante e que pode ser utilizada na produção de biocombustíveis. Configurando-se em matéria prima barata de açúcares fermentescíveis, e conversão em glicose e outros açúcares redutores, sendo considerado como atraente para a produção de etanol ou de outros produtos químicos com valor agregado como exemplo, o ácido láctico (GIRISUTA et al., 2008; HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Surge no cenário mundial o conceito de etanol de segunda geração, correspondendo ao etanol de fonte lignocelulósica, que utiliza como matéria-prima derivados de biomassa vegetal para a sua fabricação, principalmente a celulose. Essas matérias-primas, em suma, são provenientes de resíduos e excedentes da produção agrícola, como a palha de milho/palhas, colmos de diversos vegetais como o bagaço da cana-de-açúcar, lascas de madeiras, cascas de sementes e gramíneas forrageiras. Estes matérias surgem como alternativas fundamentais para produção de etanol de segunda geração (MARTELLI, 2014).

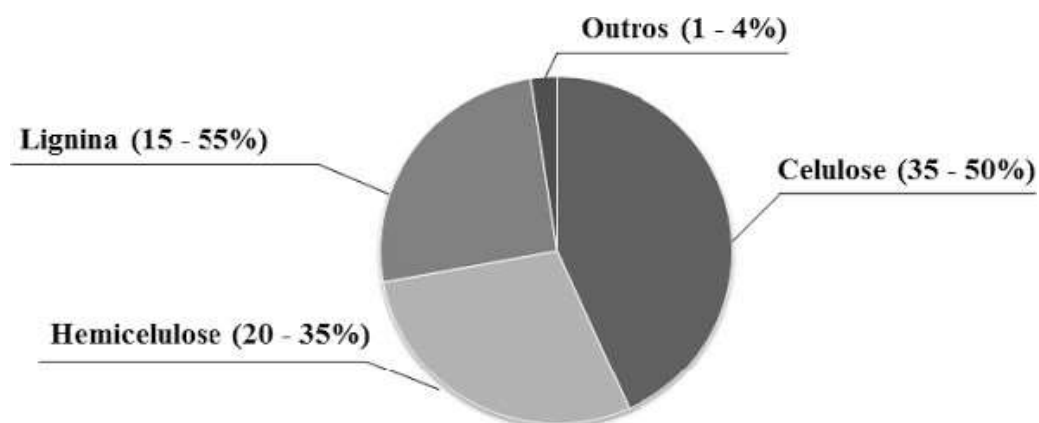
As pesquisas com gramíneas como fonte de biomassa na geração de energia se expandem e revelam que o etanol de 2G é uma alternativa viável e vantajosa como substitutivo aos combustíveis derivados do petróleo. Neste processo, estão incluídas como as biomassas provenientes de capim-elefante, capim-mombaça, capim-marandu, “switchgrass”, triticale, sorgo e outras gramíneas forrageiras conhecidas no Brasil e outros países que comportam tal adaptação vegetal ao clima e solo (SOLOMON et al,2006;SOMMA,et al,2010).

A composição química dos materiais lignocelulósicos é um fator crucial que afeta diretamente na produção de biocombustíveis durante o processo de conversão. A composição química e estrutural desses materiais varia bastante devido a fatores genéticos e influências ambientais (BALAT, 2011).

A parede celular possui como principais componentes químico-estruturais a celulose, a hemicelulose e a lignina. Tipicamente, a celulose

(polímero de glucose) é a maior fração constituinte da parede celular, da ordem de 35-50%. Seguida da hemicelulose (polímeros predominantemente constituídos de xilose, mas pode ter arabinose, galactose, glucose, manose e outros açúcares e derivados), na ordem 20-35% e a terceira fração, da ordem de 15 a 55% é de lignina. Além de outros componentes presentes em menor quantidade, como: pectina, proteínas, extrativos e cinza (WYMAN, 1994).

Figura 1. Composição química da parede celular



Fonte: WYMAN, 1994

Grande parte da celulose e da hemicelulose pode ser convertida em açúcares fermentescíveis, durante a hidrólise enzimática. Os açúcares liberados serão convertidos em etanol durante a fermentação e outros subprodutos do processo poderão ser obtidos. (CASTRO E PEREIRA, 2010; ICIDCA,1990; CARMONA et al 2013).

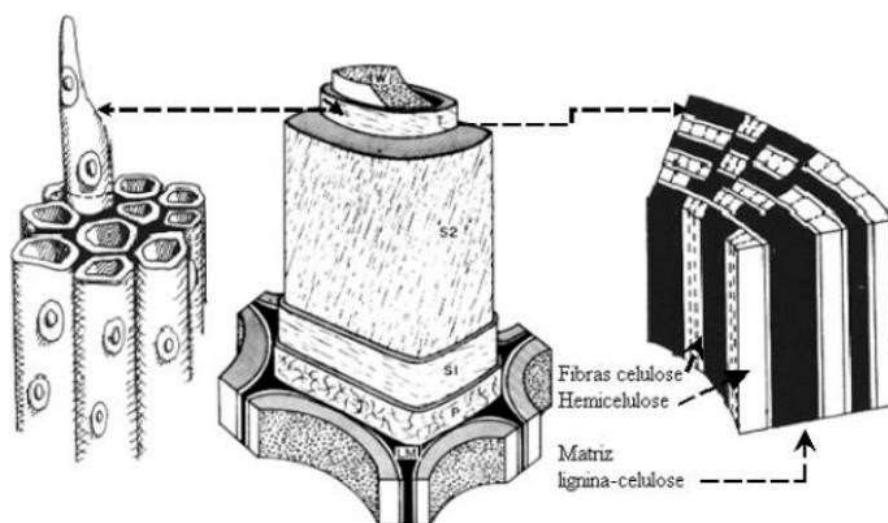
Hoje, basicamente, o processo de obtenção de etanol a partir desses materiais, em geral, consiste em abrir os feixes de lignocelulose, a fim de expor as cadeias de polímeros de celulose e hemicelulose por meio de pré-tratamento. Efetuado o pré-tratamento, o passo seguinte consiste em hidrolisar os polímeros para conseguir soluções de açúcares fermentáveis. Na sequência, promove-se a fermentação desses açúcares a etanol pela ação de microrganismos, seguido da purificação da mistura para reparação do etanol por destilação/desidratação (MARTELLI 2014).

Portanto, o etanol de 2G, como já foi citado é um dos subprodutos de maior interesse para geração de energia limpa, e caracterizar algumas biomassas visando a produção deste combustível é uma necessidade.

1.1 Estrutura da parede celular vegetal

De acordo com Fengel e Wegener (1989), a parede celular vegetal é dividida em parede primária, parede secundária e parede terciária. Sendo composta na maioria por celuloses separadas pela lamela média, camada fina, composta por alta concentração de lignina. A parede primária é a camada mais fina da parede celular e a primeira a ser depositada nas células. Celulose e hemiceluloses são predominantes na região da parede celular e a lignina é distribuída por toda essa estrutura, apresentando concentração máxima na lamela média (Figura 2).

Figura 2: Esquema morfológico da parede da célula vegetal



A celulose é presente na forma de microfibrilas e os microcapilares circundantes da armação da parede celular são preenchidos com hemicelulose e lignina. A hemicelulose liga-se através de ligações de hidrogênio às microfibrilas da celulose, formando uma rede que fornece a espinha dorsal estrutural da parede celular da planta. Enquanto a lignina em algumas paredes

celulares conferem força adicional e resistência a pragas e doenças nas plantas.

1.2 Composição química da biomassa lignocelulósica

A composição química das biomassas vegetais tende a apresentar pequenas variações em função do vegetal ao qual origina, bem como localização dos cultivos, o clima de determinada região. Em geral é composta de três polímeros principais: celulose, hemicelulose e lignina, além de extrativos como óleos e cinzas que variam de proporção com tipo de material estudado (ARIN e DEMIRBAS,2004).

A celulose é responsável pela rigidez e firmeza das plantas, a lignina associada à celulose na parede celular vegetal, possui a função de conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais, já a hemicelulose é parte das paredes celulares dos tecidos vegetais, possui a função de revestimento da superfície das fibras de celulose e pectina, presente na parede primária da célula vegetal permitindo a ligação entre elas e é capaz de se ligar a ramificações de celulose e lignina, constituindo a parede rígida vegetal e fornecendo certa elasticidade (KEPLER, et al 2006).

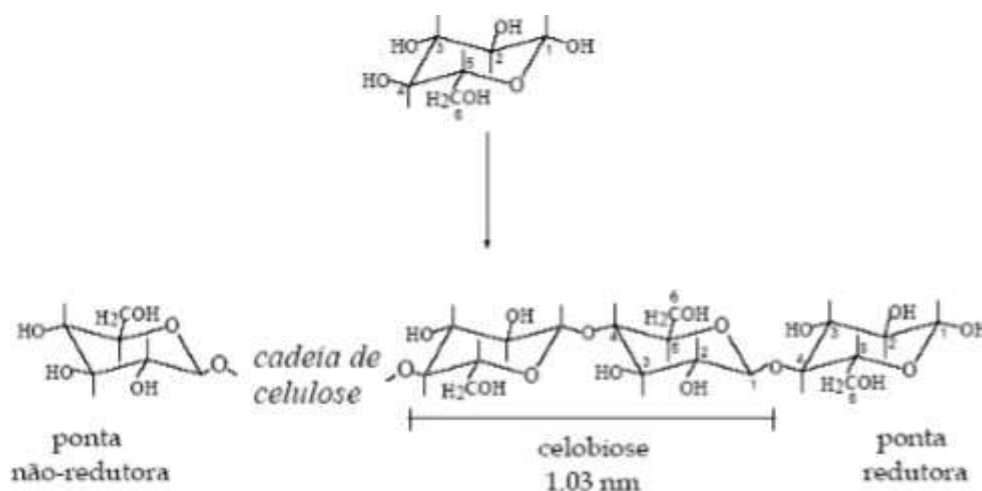
1.2.1 Celulose

A macromolécula mais abundante da crosta terrestre é a celulose. Ela é o constituinte básico da biomassa vegetal (GUO et al., 2008). Em geral, representa cerca de 35 a 50% do peso seco das plantas e é encontrada quase que exclusivamente na parede celular, mas pode ser produzida por animais, algas e algumas bactérias (LYND et al., 2002).

É um polímero linear composto por unidades de β -D-glicopiranosídeos unidos por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1 \rightarrow 4)$ e com fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$ (HOWARD et al., 2003; ZHANG, 2008; SANTOS et al., 2012).

A unidade estrutural do polímero de celulose é chamada de celobiose e consiste em duas moléculas de glicose anidras, como produto da hidrólise da celulose, conforme figura abaixo.

Figura 3: Estrutura da Celulose, parte central da cadeia molecular.



Fonte: Ramos, 2003.

A celulose é composta por 6 carbonos e é um dos maiores constituintes em gramíneas. Em termos estruturais a celulose é o componente que se apresenta em maior quantidade na parede celular, devido ao seu aspecto fibrilar fornece resistência a estrutura. Desta, maneira a celulose pode ser considerada como o “esqueleto” principal da planta, rodeada e incrustada pelas frações de hemicelulose e de lignina (CURVELO,1992, EK,et al 2009).

1.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante (20-50 %) da biomassa lignocelulósica. As hemiceluloses são heteropolissacarídeos cuja natureza química varia de tecido para tecido e de espécie para espécie. Estes polissacarídeos são formados por cadeias de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (RAMOS, 2003; GÍRIO et al., 2010; PITARELO, 2012).

Sua estrutura apresenta ramificações que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (SANTOS et al., 2012). A hemicelulose tem baixa massa molecular e menor grau de polimerização e orientação em relação à celulose e é mais facilmente hidrolisada (REDDY & YANG, 2005; AGBOR et al., 2011).

Tabela 1- Diferenças entre celulose e hemicelulose

Celulose	Hemicelulose
Unidades de glicose ligadas entre si	Unidades variadas de açúcares
Grau de polimerização alto	Grau de polimerização baixo
Forma arranjo fibroso	Forma regiões amorfas
Atacada lentamente por ácido mineral diluído a quente	Atacada rapidamente por ácido mineral diluído a quente
Insolúvel em álcali	Solúvel em álcali

FONTE: Adaptada de RODRÍGUEZ-ZÚNIGA,2010

1.2.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula complexa, tridimensional, amorfa, formada pela polimerização radicalar de unidades fenil-propano: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, unidos por diferentes ligações, como carbono-carbono, ligações éter e ligações éster, todas elas covalentes, sendo que um monômero pode conter um ou vários tipos de ligação (REGULY, 1996; CANILHA et al., 2010; AGBOR et al., 2011; SANTOS et al., 2012).

A composição e a organização dos constituintes da lignina variam de uma espécie para outra, dependendo da matriz de celulose-hemicelulose (SANTOS *et al.*, 2012). A lignina das coníferas (madeira mole) são polímeros de resíduos derivados do álcool coniferílico, a lignina das angiospermas são polímeros de resíduos derivados dos álcoois coniferílico e sinapílico, já a lignina das gramíneas e herbáceas são formadas pelos três álcoois precursores (REGULY, 1996; RAMOS, 2003). As gramíneas apresentam os

menores teores de lignina, já as coníferas são as mais ricas (CANILHA et al., 2010).

Junto à cadeia de hemicelulose e pectina, a lignina preenche os espaços entre as fibrilas de celulose, atuando como material de ligação entre componentes da parede celular, responsável pela rigidez e baixa reatividade dos materiais lignocelulósicos, sua presença representa o principal interferente para o processo de conversão da biomassa, já que é uma substância que atua como uma barreira. Dessa forma, estudos da biodegradação da lignina são de grande importância para possibilitar aplicações biotecnológicas, visto que estas macromoléculas constituem o maior obstáculo para a eficiente utilização de materiais lignocelulósicos em uma ampla faixa de processos industriais (VÁSQUEZ *et al.*, 2007).

1.2.4 Outros componentes

Constituintes não-estruturais como extrativos, não-extrativos e proteínas também são importantes quando se considera a constituição do material lignocelulósico. Estão presentes em menores proporções e consistem de graxas, óleos essenciais, gorduras, gomas, amidos, alcalóides, resinas e demais constituintes citoplasmáticos (FENGEL e WEGENER, 1989).

Os extrativos podem ser extraídos com solventes orgânicos ou aquosos e determinam algumas características da planta como cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, sabor e propriedades abrasivas (FENGEL e WEGENER, 1989). Os não-extrativos consistem em compostos inorgânicos como sílica, carbonatos e oxalatos. Estes componentes geram problemas com a bioconversão devido à presença de inibidores durante o pré-tratamento (MCMILLAN, 1996).

2.0 Etanol de Material lignocelulósico

O desenvolvimento de alternativas energéticas que visem à produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas apresentam inúmeras vantagens, tanto do ponto de vista energético como ambiental. Os biocombustíveis produzidos a partir de recursos renováveis podem ajudar a minimizar a queima

de combustíveis fósseis e a produção de gás carbônico (TURA,2014). A figura 4 traz a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.

Figura 4: Representação esquemática da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.



MARTELLI, 2014

Deter uma tecnologia para obtenção de bioenergia relaciona-se diretamente com a soberania nacional e, principalmente, torna o país mais competitivo no mercado de etanol, além de contribuir com a redução de gases de efeito estufa e ciclagem de carbono no solo (TURA,2014).

Pesquisas mostraram que é possível obter até 11 mil litros de etanol por hectare a partir de gramíneas, como o capim- elefante e capim-marandu, sendo estas, fontes competitivas e eficientes para locais onde não se pode cultivar cana, tanto em áreas de pastagens quanto em áreas marginais, como solos mais pobres em nutrientes e que necessitem de pouco manejo para cultivo (MIRANDA,2010).

O etanol de 2G representa para o Brasil mais produção sem aumento da área plantada, aumento do percentual de etanol por hectare plantado de biomassa, utilização de matéria-prima renovável, sustentabilidade na produção,

racionalidade no uso de recursos naturais e mais etanol no mercado interno e possivelmente externo (MIRANDA,2010).

2.1 Etapas para a produção de etanol lignocelulósico

A produção de etanol de segunda geração com base na biomassa lignocelulósica consiste nas seguintes etapas: pré-tratamento, para desagregar as fibras da biomassa ou resíduo agrícola; hidrólise enzimática/ácida da celulose e hemicelulose para produção de açúcares; fermentação dos mesmos; separação de lignina residual e, finalmente a recuperação e purificação do etanol produzido, através de destilação (MOSIER et al., 2005).

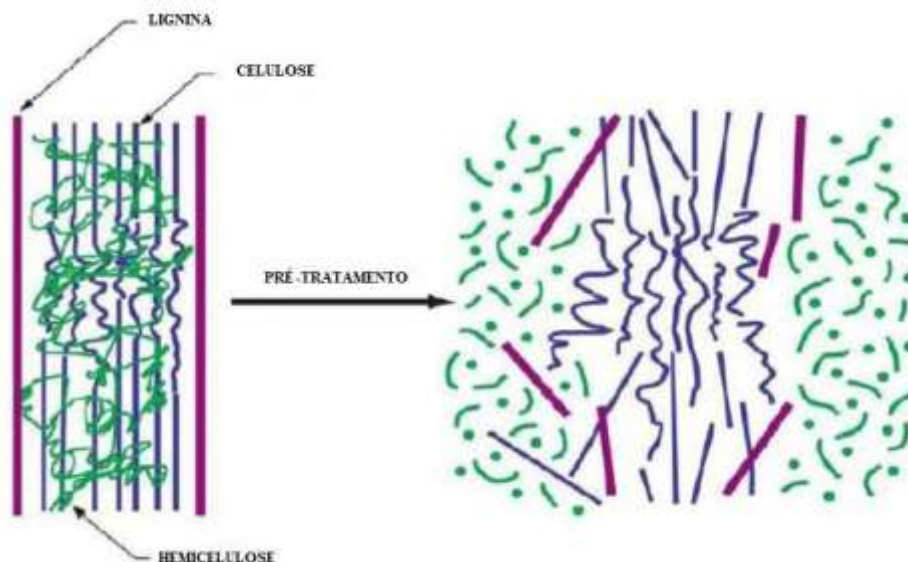
De acordo com Cardona et al., (2013), características intrínsecas aos materiais lignocelulósicos causam dificuldade na produção do etanol. Nesse sentido, destacam-se a ligação química entre a celulose e hemicelulose e a ligação entre a lignina e hemicelulose, constituindo persistente barreira ao ataque hidrolítico. No processo enzimático, a lignina atua como uma barreira física para as enzimas que podem ser irreversivelmente capturadas pela lignina, assim como dificultar a recuperação da enzima após a hidrólise e a natureza cristalina da celulose representa uma limitação adicional ao processo. Por isso, Soccol et al., (2010), salienta a importância da etapa o pré- tratamento do material lignocelulósico, pois o mesmo visará a desagregação da lignina e hemicelulose, redução do caráter cristalino da celulose e um incremento a porosidade do material, configurando maior susceptibilidade à hidrólise enzimática/ácida e conseqüentemente possível maior conversão em açúcares fermentescíveis.

2.1.1 Pré-Tratamento da biomassa lignocelulósica

Segundo Sousa et al., (2009), o pré-tratamento do material lignocelulósico é de extrema importância no processo de obtenção de açúcares fermentescíveis, consistindo no rompimento da barreira protetora da lignina e conversão da estrutura recalcitrante da biomassa a fim de tornar os carboidratos mais acessíveis ao ataque químico/enzimático, aumentando 80%

ou mais a obtenção de açúcares fermentescíveis (HAMELINCK et al.,2009). O efeito do pré-tratamento é apresentado na Figura 5.

Figura 5- Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento.



FONTE: Adaptado de Mosier et al., 2005

Um pré-tratamento para ser eficiente deve apresentar as seguintes características: resultar em uma elevada recuperação de todos carboidratos; elevar a digestibilidade da celulose na hidrólise enzimática; aumentar a concentração de sólidos, bem como a concentração de açúcares livres na fração líquida; requerer baixa demanda de energia; evitar subprodutos; e requerer baixo investimento e custo operacional (SANTOS et al., 2012).

Para isso, existem diversos tipos de pré-tratamentos definidos na literatura, podendo os métodos ser biológicos, físicos, químicos e físico-químicos (Qiu et al., 2012), proporcionando, diferentes rendimentos e efeitos sobre a biomassa (BRANT et al., 2011).

2.1.2 Pré-tratamento químico e físico

Os pré-tratamentos físicos podem ser classificados em: redução mecânica e microondas. O pré-tratamento de redução mecânica é baseada na

redução do tamanho das partículas através de moagem, aumentando o desempenho da enzima pelo aumento da área superficial e, em alguns casos, pela redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose (OGEDA et al., 2010).

O tratamento químico é o mais usual na indústria e é aplicado a diversas materiais lignocelulósicos (AGBOR et al., 2011); pode ser ácido, alcalino ou oxidativo (FENGEL; WEGENER, 1989).

O pré-tratamento ácido, consiste no uso de ácidos, a exemplo do ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico (HCl), ácido fosfórico (H_3PO_4) e ácido nítrico (HNO_3), tem-se a hidrólise da hemicelulose, expondo assim, a celulose ao ataque enzimático pós deslignificação (CHENG et al., 2008). O uso dos ácidos apresenta problemas como o potencial corrosivo e a necessidade da recuperação do reagente para dar viabilidade econômica ao pré-tratamento (AGBOR et al., 2011).

No pré-tratamento ácido com soluções diluídas de ácido sulfúrico, hidrocloreto ou acético, promovem a decomposição da hemicelulose a determinadas temperaturas. A hemicelulose é separada da celulose e é recuperada na forma de xilose, arabinose e outros monômeros, na fração aproximada de 80 a 90%. Desse processo se obtém a celulignina (celulose mais lignina) (CHENG et al., 2008).

O tratamento alcalino faz uso de NaOH, KOH, $Ca(OH)_2$, hidrazina e amoníaco anidro. Esse tratamento aumenta a área de superfície interna da biomassa e diminui tanto o grau de polimerização, como a cristalinidade da celulose, promove o rompimento da estrutura da lignina que é então, removida (deslignificação) e expõe a celulose. A remoção da lignina também pode se dar pela solubilização deste polímero por meio do uso de solventes orgânicos, como o etanol, acetona, etileno e metanol. Livre da lignina, a celulose fica exposta para as etapas de hidrólise e fermentação (AGBOR et al., 2011)

Diversas vantagens e desvantagens são apresentadas conforme o tipo de pré-tratamento estabelecido (GARZON FUENTES, 2009). Por isso, o utilizado deve-se adequar à facilidade e as singularidades das condições

presentes. A tabela 2 apresenta alguns métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Tabela 2. Métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

MÉTODO	PROCESSO	TIPO DE MUDANÇA
Físico	Moagem e Trituração; Irradiação; Alta temperatura.	Diminui o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose; Aumenta a área superficial e o tamanho dos poros da partícula
Químico	Bases; Ácidos; Gases; Agentes oxidantes e redutores; Solventes para extração da lignina	Aumenta a área superficial; Diminui o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose; Parcial ou quase completa degradação da hemicelulose e deslignificação
Físico-químico	Tratamento alcalino associado à explosão a vapor; Moagem com tratamento alcalino ou ácido.	Degradação da hemicelulose e deslignificação; Aumenta a área superficial e os poros da partícula.
Biológico	Fungos e actinomicetos.	Degradação da hemicelulose e deslignificação; Aumenta a área superficial e os poros da partícula; Diminui o grau de polimerização.

Fonte: MENDES, 2014

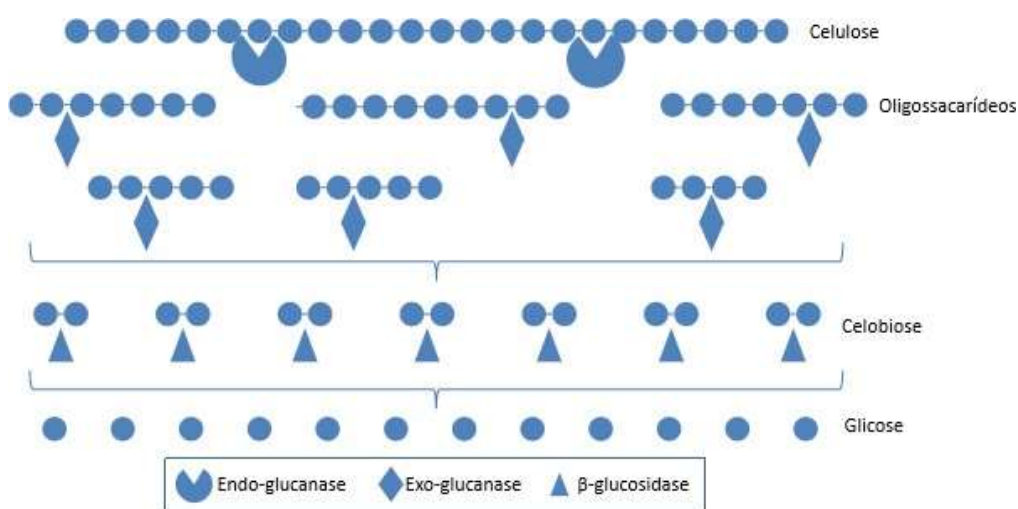
2.1.3 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é a segunda etapa do processo de produção de etanol de materiais lignocelulósicos, envolvendo a decomposição de polímeros da celulose e hemicelulose pelo ataque enzimático. A celulose usualmente contém somente glicanos, enquanto a hemicelulose é formada por vários polímeros como manano, xilano, glicano, galactano e arabinano. Com isso, o produto da hidrólise da celulose será basicamente a glicose, ao passo que a hidrólise da hemicelulose produzirá vários tipos de pentoses e hexoses (BINOD, 2009).

Esta hidrólise consiste de três etapas: adsorção da enzima celulase na superfície da celulose, produção de açúcares fermentescíveis e desorção da celulase. (TALEBNIA, 2010). O principal grupo de enzimas utilizadas nesta hidrólise são as classificadas como celulases. Pela sua capacidade de

hidrolisar a celulose, a celulase age numa ação sinérgica de três tipos distintos de enzimas (Figura 6: endoglucanases (EGs) – que hidrolisam as ligações internas β -D-1,4-glicosídica formando oligossacarídeos; exoglucanases – hidrolisam as ligações de oligossacarídeos pela sua extremidade, formando a celobiose; β -glucosidases (BG) hidrolisam celobiose produzindo glicose, também podem romper ligações de oligossacarídeos (BINOD, 2009).

Figura 6 – Mecanismo de ação da celulase sobre a celulose



Fonte: Binod, 2009.

Conforme mostrado na Figura 6, a endo-glucanase ataca a região de baixa cristalinidade na fibra de celulose e cria uma cadeia aberta, abrindo acesso para a exo-glucanase degradar a molécula e produzir celobiose, um dissacarídeo. Assim, a β -glucosidase pode acessar a celobiose e produzir a glicose (TALEBNIA, 2010).

Muitos fatores podem afetar a hidrólise enzimática da celulose, como por exemplo, a concentração de substrato, a atividade da celulase e as condições da reação (temperatura, pH, bem como outros parâmetros). Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise, é necessário aperfeiçoar o processo e reforçar a atividade das celulases (SUN & CHENG, 2002). Nas últimas 4 a 5 décadas, muitas pesquisas foram realizadas sobre enzimas capazes de

despolimerizar os componentes dos substratos lignocelulósicos, em açúcares fermentáveis. Entretanto, a eficiente, rápida e completa hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos a partir de baixas cargas de enzimas, ainda é um dos principais gargalos técnico e econômico na bioconversão de lignocelulósicos a biocombustíveis. (ARANTES; SADDLER, 2010).

2.1.4 Fermentação do material lignocelulósico

A fermentação do material lignocelulósico para conversão em etanol pode ser realizada em um só estágio ou sequencialmente em duas etapas (DOMÍNGUEZ, 2003). De acordo com Rabelo (2010), o processo que ocorre separadamente apresenta melhores resultados quando comparado ao de um único estágio. Isto porque pode-se fazer o controle das condições operacionais ideais para a hidrólise, assim como para a fermentação, tendo em vista que durante a hidrólise enzimática a temperatura ideal é a da enzima (em torno de 50°C), enquanto que para a fermentação a temperatura ideal se dá pelo microrganismo produtor de etanol (em torno de 30-34°C)

Os melhores micro-organismos para fermentação de hexoses são a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Zymomonas mobilis*, que podem atingir uma eficiência de fermentação de 90 a 97% do teórico (Talebnia, 2010).

3.0 Gramíneas como fonte de etanol de segunda geração

Os principais usos das gramíneas como matéria-prima energética atualmente são para a produção de energia térmica como na queima em fornos de carvão vegetal e na forma de peletização além do uso tradicional na nutrição animal. Entretanto, estudos com diversas gramíneas usadas como culturas energéticas vêm sendo realizados em alguns países (MARTELLI,2014).

No Brasil, o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), o capim-mombaça (*Panicum maximum*), o capim-marandu ou braquiária (*Brachiaria brizantha*), o sorgo-biomassa (*Sorghum bicolor*), a *Brachiaria Convert* e a *Brachiaria decumbens* têm despertado grandes interesses de estudos, a maior parte deles

com foco nas potencialidades das biomassas pra a produção de etanol de 2G e de pallets para queima em fornos de geração de energia. Estas gramíneas apresentam vantagens em relação às demais fontes de biomassa como a madeira, dentre elas: maior produtividade por hectare, menor ciclo produtivo (45~180 dias), podendo aproveitar a rebrota como ciclo produtivo, menor manejo, possibilidade de mecanização total do cultivo e fonte de energia renovável (AYRES, 2010).

Estudos já apontam o potencial de utilização de todas as partes das gramíneas para obtenção de etanol de 2G e, não apenas, as palhadas ou os colmos (MIRANDA, 2010; PARRELLA, 2012).

3.1 *Brachiaria Convert HD 364*

Convert HD 364 é o nome comercial dado à *Brachiaria* híbrida cultivar Mulato II (CIAT 36087) pela empresa Dow AgroSciences atualmente detentora dos direitos de comercialização desse material. Esse capim é resultado de 20 anos de pesquisa genética em braquiárias realizadas pelo programa de forragens tropicais do CIAT em colaboração com outras instituições de pesquisa, como a Embrapa. Constitui em um híbrido resultante de três gerações de cruzamento, iniciados em 1989 entre *Brachiaria ruziziensis* clone 44-6 tetraploide sexual e *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, tetraploide apomítica (ALMEIDA, 2014). A tabela 3 apresenta a composição química da *Brachiaria Convert*.

Tabela 3- Composição química da *Brachiaria Convert*

MS %	PB%	FDA%	FDN%	Lignina%
20	15	32	62	6,32

. Fonte: adaptada de book convert,2012

Dependendo das características de clima e solos, a produção de forrageira do CONVERT* HD364 varia entre 10 e 27 t/ha de MS por ano, sendo que 20% desse rendimento pode ser produzido durante a época seca.

3.2 Capim *Marandu- Brachiaria brizantha cv Marandu*

A palavra “marandu” do Tupi-guarani significa “novidade”. Considerada uma gramínea que inovou as pastagens no Brasil, desde 1967, tendo suas primeiras plantações no estado de São Paulo. Conhecido também como “braquiarão”, teve grande adaptabilidade de clima, solo e região, além de resistência às pragas como a cigarrinha (OLIVEIRA et al,2006). A tabela 4 apresenta a composição química da *Brachiaria Marandu*.

Tabela 4- Composição química da *Brachiaria Marandu*

FDA%	FDN%	Celulose%	Hemicelulose%
34	71	38,2	25,8

FONTE: Adaptado de REIS et al,2013.

Tem sua origem no sul da África e na região tropical, assemelhando seu clima ao do Brasil. Possui ciclos de cultivos razoavelmente curtos, em torno de 90~180 dias. Pode atingir até 2,5m de altura. Pode produzir de 1- a 12 ton.ha.ano de matéria seca –MS (SOARES FILHO et al, 2002; GIMENES et al, 2011).

3.3 Capim *Brachiaria decumbens*

Originaria da África equatorial, a *Brachiaria decumbens* pode se desenvolver em solos férteis, ácidos (pH aproximadamente 4,2), assim como em solos que são calcários e pedregosos com pH próximo a 8,5. Também se estabelece em clima moderadamente úmido, porém não tolera inundações prolongadas (CHAMORRO,1998). A tabela 5 apresenta a composição química da *Brachiaria decumbes*.

Tabela 5-Composição química da *Brachiaria decumbes*

FDA%	FDN%	Celulose%	Hemicelulose%
33	65	38	29

FONTE: Adptado de Johnson e Pezo, 1975.

A *Brachiaria decumbens* é caracterizada como uma gramínea perene, estolonífera, de hábito de crescimento de semi-ereto a prostrado. Pode alcançar de 30 a 100 cm de altura. Suas raízes são fortes e duras, com presença de pequenos rizomas (OLIVERA et al, 2006).

3.4 *Brachiaria Ruzienses*

Originária da África, o Capim *Brachiaria Ruzienses* possui boa palatabilidade e digestibilidade, é bem precoce, com boa velocidade de rebrota, níveis de proteína entre 11 e 13%. É uma espécie perene, subereta, com 1-1,5 m de altura. Possui rizomas fortes, em forma de tubérculos arredondados e com até 15 mm de diâmetro (SOUZA SOBRINHO et al 2005). A tabela 6 apresenta a composição química da *Brachiaria ruzienses*.

Tabela 6-Composição química *Brachiaria ruzienses*

FDA%	FDN%	Celulose%	Hemicelulose%
26,8	58,9	22,8	32,4

FONTE: Adaptado de Valle et al 1998.

No que diz respeito a qualidade da forragem, Souza Sobrinho et al (2005), avaliando a qualidade de forragem de diferentes cultivares de *Brachiaria*, relatam que cv. Comum (*B.ruzienses*), apresentou 57,82% de digestibilidade para toda a planta e um valor de 9,47% para PB.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. M. D. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidos pelo fungo *Aspergillus niger***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2010.

AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 29, n. 6, p.675-685, nov. 2011. Elsevier BV. DOI: 0.1016/j.biotechadv.2011.05.005. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0734975011000607?httpAccept=txt/xml>>. Acesso em: 26 jun. 2016.

ALMEIDA, I. C. L. **Acúmulo e valor nutritivo da forragem do capim Convert HD 364 (*Brachiaria hírida*) sob taxas contrastantes de crescimento em resposta à altura do dossel mantida por lotação contínua**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 70p. 2014.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4. 2010

ARIN.G;DERMIRBAS, A. Mathematical modeling the relations of pyrolytic products from lignocellulose materials.**Energy Sources**.v.26;p.1032,2004.

AYRES,M.Embrapa avalia novas fontes para produzir etanol.Embrapa Cerrados.Notícia completa.2010.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858–875, 2011.

BRANDT, A.; RAY, M. J.; TO, T. Q.; LEAK, D. J.; MURPHY, R. J.; WELTON, T. A Ionic liquid pretreatment of lignocellulosic o with ionic liquid–water mixtures. **Green Chemistry**, v. 13 p. 489–2499, 2011.

BIANCHI,M.L. **Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolve**. Dissertação de Mestrado em Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 76p, 2007.

BINOD, P.;SINDHU,R.;REETTA, R.S. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**.India, 2009.

CANILHA, L.; Milagres, A. M. F.; Silva, S. S.; Silva, J. B. A.; Felipe, M. G. A.; Rocha, G. J. M.; Ferraz, A.; Carvalho, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de préhidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática:

uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Rev. Analytica**. 44:48-54, 2010.

CARDONA, E.; RIOS, J.; PENA, J.; RIOS, L. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. **Fuel**, v. 118, p. 41-47, 2013.

CARMONA, V.B.; OLIVEIRA, R.M.; SILVA, W.T.L.; MATTOSO, L.H.C.; MARCONSINI, J.M. **Nanosilica from Rice husk: extraction and Characterization Industrial Crops and Products** 43, 291-296. 2013.

CASTRO, A.M.; PEREIRA Jr., N. **Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais**. Química nova, São Paulo, v.33, n.1, p. 181-188, 2010.

CURVELO, A.A.S. **Processo de deslignificação organossolve**. 94f. Tese (Livro Docência. Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 94p, 1992.

CHAMORRO, D. Sistema de evaluación de especies forrajeras: Conceptos y procedimientos técnicos. Gramíneas y leguminosas. **Boletín de investigación**. Tolima, Colombia: El Espinal. 1998, p.21

CHENG, T. C., S. H. ORKIN, S. E. ANTONARAKIS, M. J. POTTER, J. P. SEXTON, A. F. MARKHAM, P. J. V. GIARDINA, A. LI, AND H. H. KAZAZIAN, JR. **Thalassemia in Chinese: use of “in vivo” RNA analysis and oligonucleotide hybridization in systematic characterization of molecular defects**. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 81:2821-2825. 2008.

DOMÍNGUEZ, J.M.O. **Efecto de los Productos de Degradación originados en la explosión por vapor de Biomassa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus**. 2003. (Tese de Doutorado). Universidad Complutense. Madrid. 2003.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRICKSSON, G. **Pulp and paper chemistry and technology, wood chemistry and wood biotechnology**. De Gruyter. Berlin, p.1-320, 2009.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, p. 613, 1989.

GARZÓN FUENTES, L. L. **Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio**. 2009. (Dissertação de Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, 2009.

GIMENES, F.M,A.SILVA, S. C; FIALHO, C.A; GOMES, M.B;BERNDT,A;GERDES, L; COLOZZA, M.T. Ganho de peso e produtividade animal em capim-marandu sob pastejo rotativo e adubação nitrogenada. **Pesq.agropec.bras.Brasília**,v.46, n 7, p.751-759.2011.

GIRISUTA, B. et al. Experimental and kinetic modelling studies on the acid-catalysed hydrolysis of the water hyacinth plant to levulinic acid. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 99, n. 17, p. 8367-8375, nov. 2008. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.02.045. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0960852408001892?httpAccept=txt/xml>. Acesso em: 12 mai. 2016.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775–4800, 2010.

GUO, R. et al. Molecular cloning and characterization of two novel cellulase genes from the mollusk *Ampullaria crosseana*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 178, iss. 2, p. 209-215, 2008.

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, D. N.; PEBERDY, J. F. Production of cellulolytic enzymes by mutante of *Aspergillus niger* NEIM 1207. **Enzyme Microb. Technol.** v.10, 442-445. 2009.

HOFVENDAHL, K; HAHN–HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources¹. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 26, n. 2-4, p.87-107, fev. 2000. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0141-0229(99)00155-6. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0141022999001556?httpAccept=txt/xml>. Acesso em: 14 de mai. 2016.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG E. L.; HOWARD S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, p. 602-619, 2003.

ICDCA- Instituto cubano de investigaciones de los derivados de la canã de azucar. **Manual de los derivados de la canã de azucar.México**: CEPLACEA, 447p,1990.

JOHNSON, W.L.; GUERRERO, J; PEZO,D. Cell wall constiturnts ann in vitro digestibility of Napier grass (*Pennisetum purpurem*). **Journal of Animal Science**, v.37, n.5 p. 1255-1261, 1973.

KEPPLRER, F;HAMILTON,JT;BRASS, M,ROCKMANN,T. “Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions”. **Nature** vol.439, 2006.

LYND, L. R. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology**. Reviews, v. 66, p. 506-577, 2002.

MACHADO, R;NÚÑEZ, C.A. **Comportamiento de variedades de Brachiaria spp bajo pastoreo em condiciones de secano y fertilizacion media, Postos y Forrajes, Matanzas**, v.1, n.2, p. 123-132, 2009.

MARTELLI,F.H. **Determinação e caracterização físico-química e espectroscópica de gramíneas para obtenção de etanol de segunda geração**.Dissertação (mestrado) Instituto de química de São Carlos. São Carlos,2014.

MENDES, T. P. P.; **Estudo de obtenção de açúcares redutores totais (ART) a partir de bagaço de frutas**. 2014. 94p.. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

MENDES, T.D; PACHECO,F.B.P; CARVALHO, P.S; RODRIGUES, C.M.M;MACHADO, M.A;. **Avaliação da hidrólise enzimática de Brachiaria brizantha utilizando complexo enzimático comercial**.COBEQ, 2012.

McMILLAN, J. D. **Conversion of hemicellulose hydrolyzates to ethanol. Handbook on fuel ethanol: production and utilization**, 1996.

MIRANDA, C. Biofuel production from water hyacenth in the Pantanal Wetland. USDA. Agricultural Reserch Service. **Ecohidrology & Hydrology**. v.12, n1. pág77-87, 2010.

MOSIER, N., WYMAN, C. E., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y.Y., HOLTZAPPLE, M. T., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v.96, n.6, p. 673–686, 2005.

ODEGA, T. L.; PETRI, T. F. S. **Hidrólise enzimática de biomassa**. Química Nova, v. 33, nº 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA,P.P.A;MARCHESIN,W;CERQUEIRA,P.H;HERLING,V.R.**Guia de identificação de deficiências nutricionais em Brachiaria brizantha cv. Marandu**. Comunicado Técnico n 76. São Carlos-SP, 2006.

PACHECO, F.; MENDES, F. B. P. CARVALHO, D. S. RODRIGUES, C. M. M. MACHADO, M. AYRES. **Avaliação do potencial de biomassas na produção de etanol lignocelulósico**. Búzios,2012.

PARRELLA,R. **Embrapa avalia sorgo biomassa como alternativa de energia renovável em Mato Grosso**.Pesquisa FAPESP. Edição 193, 2012.

PITARELO, A.P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática.** Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

QIU, Z.; AITA, G. M.; WALKER, M. S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 117p. 251–256, 2012.

RABELO, A. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.** 2010. Tese (Doutorado em engenharia química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 447 p, 2010.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.

RODRIGUES-ZÚNIGA, U.F. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulases específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração.** Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos – EESC. Universidade de São Paulo- USP, 2010.

Reddy, N; Yang, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. **Trends Biotechnol.** 23(1):22-27, 2005.

Reguly, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos: fundamentos, matérias primas agrícolas, produtos e processos.** Editora universitária, Universidade Federal de Pelotas. Vol.1, 1996.

SANTOS, A. F.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTI, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**. n.5, pág 1004-1012. 2012.

SINGH, A.; MISHRA, P. Microbial Pentose Utilization: Current Applications in **Biotechnology**. Amsterdam: Elsevier Science B.V. v. 33. p. 396, 1995. ISBN: 978-0-444-82039-6. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/bookseries/00796352/33>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

SOARES FILHO, C.V; RODRIGUES, L.R.A; PERRI, S.H.V. **Produção e valor nutritivo de dez gramíneas forrageiras na região Noroeste do estado de São Paulo.** Maringá, v.24, n.5, p. 1377-1384, 2002.

SOCCOL, C.R; Bioethanol from ligno-celluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SOLOMON, B.D.; BARNES, J.R.; HALVORSEN, K.E. **Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy** *Biomass and Bioenergy*, ed31, p416-425, 2006.

SOMMA, D.; LOBKOWICZ, H. DEASON, J. P. **growing america's fuel: an analysis of corn and celulosic ethanol feasibility in the United States.** *Clean tech environ policy*. v.12, pág 373-380. 2010.

SOUZA, W. R. **Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass.** 123p. 2009.

SOUZA SOBRINHO, F; CARNEIRO, H; PEREIRA, A.V; LEDO, F.J.S. Avaliação agrônômica de híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milho. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.9, p.873880, 2005.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 83, n. 1, p. 1-11, maio 2002. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0960-8524(01)00212-7. Disponível em: <<http://api.elsevier.com>>.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4744–4753, 2010.

TURA, A. **Fermentação de açúcares liberados de biomassas lignocelulósicas pré-tratadas com líquidos iônicos para produção de etanol.** Dissertação (Mestrado) Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Caxias do Sul, 2014.

USBERTI, J. A. F.; TEIXEIRA, J. P. F.; GALLO, P. B.; PEREIRA, C. A. **Produção de etanol de gramíneas forrageiras tropicais.** *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 23(2), p. 175-187, 1988. Disponível em: <<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/13796>>. Acesso em 22 de fev. 2015.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J.N.C.; SOUZA, M.B.; PEREIRA, N. **Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136-140, p. 141-153, 2007.

VALLE, C.B.; SINGH, R.J.; MILLER, D.A. **Pachytene chromosomes of Brachiaria ruzizienses Germain et Evrard.** *Plant Breeding*, Berlim, v.78, n.1, p.75-78, 1998.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocelulosic biomass: technology, economic and oportunities. **Elsevier Science**. v.50. 1994.

ZHANG,P;HIMMEL,M.E;MIELENZ,J.R. **Outlook for cellulose improvement: Screening and selection stragies. Biotechnology Advances.** Vol. 24, p. 452-481, 2008.

Capítulo II: **ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO POTENCIAL DE
ETANOL A PARTIR DE DIFERENTES ESPÉCIES DE
BRAQUIÁRIAS**

Resumo

Alternativas energéticas, por meio de fontes renováveis de energia, tem sido objeto de pesquisas no mundo inteiro, seja por motivos econômicos, geopolíticos ou ambientais. Sendo assim, o material lignocelulósico consiste em uma alternativa interessante de matéria-prima. Diante disso nesse trabalho foi estudada a produção potencial de etanol de quatro espécies de braquiárias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (Braquiárias) e quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e posteriormente à análise de variância pelo teste F. As médias dos tratamentos e dos seus respectivos desdobramentos foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Foram avaliados os teores de fibra em detergente neutro e ácido, digestibilidade e a estimativa de produção de etanol por estequiometria. Foi observada diferenças entre a espécies de braquiárias para o potencial de produção de Etanol de segunda geração, em função da quantidade de fibra em detergente neutro digestível. As *B. decumbens* e *B. Brizantha* cv. Marandu apresentaram menores potenciais de produção de Etanol de segunda geração quando comparadas à *B. ruziziensis* e Convert HD364.

Palavras-chave: digestibilidade, etanol 2G, potencial, hidrólise

PRODUCTION ESTIMATE OF POTENTIAL Brachiarias SPECIES OF DIFFERENT ETHANOL

Abstract

Energy alternatives through renewable energy sources, has been the object of research worldwide, either by economic, geopolitical or environmental reasons. Therefore, lignocellulosic material consists in an interesting alternative feedstock. Thus, in this work was studied the potential of ethanol production by four Brachiaria species using the association of the complex: Cellic® CTec2 and Cellic® HTec2. The experimental design was completely randomized with four treatments (Brachiaria) and four replications. The data were submitted to normality Shapiro-Wilk test and subsequently to an analysis of variance by F test. The averages of the treatments and their outcomes were compared by Scott-Knott test at 5% probability. Were evaluated the fiber content in a neutral and acid detergent, digestibility and the estimation of ethanol production by stoichiometry. It was observed differences between brachiarias species for the potential of second generation ethanol production depending on the amount of neutral detergent fiber digestible. *B. decumbens* and *B. brizantha* cv. Marandu had lower potential of second generation ethanol production when compared to *B. ruziziensis* and Convert HD364.

Index terms: digestibility, ethanol 2G, potential hydrolysis

Introdução

O setor da bioenergia encontra-se diante de um desafio: o de comprovar e garantir sua sustentabilidade. Alternativas energéticas, por meio de fontes renováveis de energia, tem sido objeto de pesquisas no mundo inteiro, seja por motivos econômicos, geopolíticos ou ambientais (RABELO,2010).

As biorrefinarias que visam, a produção de vários produtos e subprodutos, como os combustíveis líquidos, calor e eletricidade estão cada vez mais em foco no mercado da bioenergia (CHEN et al, 2005;ZHANG, 2008). Em uma biorrefinaria lignocelulósica, a biomassa pode ser convertida em biomatérias úteis ou energia de forma integrada, podendo assim maximizar o valor econômico da biomassa utilizada, reduzindo o desperdício e se tornando um importante instrumento de mitigação de emissões de gases de efeito estufa a partir de fontes combustíveis não renováveis (JUNG e DEETZ, 1993).

Sendo assim, o material lignocelulósico consiste em uma alternativa interessante de matéria-prima, pois é abundante, permanente, subutilizado e, por tanto, tende a custos menores que a biomassa cultivada para o propósito de geração de etanol convencional; seu aproveitamento diminui a competição pelo uso da terra e se trata de um resíduo (não alimento) (LYND et al., 2002). Além disso, é formado principalmente pelos biopolímeros renováveis, celulose, hemicelulose e lignina (SUN et al., 2011).

Nesse sentido o melhoramento das forrageiras do gênero *Brachiaria* visando à produção de combustíveis pode ser uma alternativa interessante para a viabilização de um processo competitivo de produção de etanol lignocelulósico. Suas características vantajosas, como a baixa porcentagem de lignina em sua composição e o distanciamento da tradicional disputa alimento-energia (CARVALHO et al., 2009), vêm reforçar a idéia de que o melhoramento voltado ao desenvolvimento de uma matéria-prima energética pode ser decisivo na consolidação da tecnologia da produção de etanol de segunda geração tanto para o mercado interno (em regiões não produtoras de cana-de-açúcar) quanto para o mercado externo.

Apesar dos pontos favoráveis à utilização da biomassa lignocelulósica, o potencial dos biopolímeros ainda não foi plenamente explorado, pois, as

biomassas apresentam variação na composição entre os materiais lignocelulósicos e a estreita associação entre a celulose, hemicelulose e lignina, configuram um desafio às possíveis aplicações. O desenvolvimento de processos para a conversão desse material em combustível e produtos de valor agregado, tornou-se o principal foco e desafio da pesquisa em andamento no mundo todo. (AGBOR et al., 2011, SUN et al., 2011)

Com isso, o grande desafio da produção viável do etanol de segunda geração consiste em determinar a melhor opção de disponibilizar a glicose e outros açúcares a partir da hidrólise da celulose e hemicelulose em termos de custos totais do processo, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado.

Portanto, objetivou-se com esse trabalho avaliar as potencialidades de produção de Etanol de segunda geração a partir de quatro espécies de braquiárias (Descumbens, Brizantha cv. Marandu, Ruziziensis e Convert HD364).

2.0 Material e métodos

2.1 Local, tratamentos e delineamento experimental

O estudo foi conduzido no Laboratório de Solos da Universidade Federal do Tocantins (UFT). Foram avaliadas quatro fontes de biomassa lignocelulósica (parte aérea da planta), o capim *Brachiaria decumbes*, a *Brachiaria* híbrida Convert HD 364, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Brachiara ruzizienses*, mediante a ação do emprego de um pré-tratamento promotor de hidrólise, posteriormente associado à digestão por complexos enzimáticos comerciais (Celulase e Hemicelulase).

No tratamento enzimático (hidrólise enzimática) foi utilizada a associação dos complexos enzimáticos Cellic® HTec2 e Cellic® CTec2, obtidos a partir de cepas de *Trichoderma reesei*, da empresa Novozymes.

Ambos complexos enzimáticos promovem a conversão dos polímeros em açúcares simples antes da fermentação. O produto Cellic® CTec2 é uma mistura de celulases agressivas, com alto percentual de β -glucosidase. O

Cellic® HTec2 contém endoxilanase que tem alta especificidade para a hemicelulose solúvel.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (Braquiárias) e quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e posteriormente à análise de variância pelo teste F. As médias dos tratamentos e dos seus respectivos desdobramentos foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o software estatístico "SISVAR". Para análise de regressão simples foi utilizado o software SAS University Edition.

2.2 Parâmetros avaliados

Os parâmetros avaliados foram: fibra em detergente neutro (FDN); fibra em detergente ácido (FDA) através da metodologia descrita por Van Soest (1979); Hemicelulose obtida pela diferença FDN - FDA; Digestibilidade da FDN (CD_{Fibra} , expressa %FDN); Fibra em detergente neutro digestível ($FDN_{\text{digestível}}$, expressa %MS), e a estimativa do potencial da produção de etanol, conforme Finguerut et al. (1985).

2.3- Preparo da biomassa

Foram coletadas amostras referentes a cada fonte de biomassa pré-seca, que foram mantidas em estufa à temperatura de 60 °C até peso constante. Estas amostras foram moídas em moinho de facas com peneira de 20 "mesh". Estas amostras foram caracterizadas quanto aos teores de fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN) e Hemicelulose.

2.4 Determinação de componentes pelo método Van Soest

O método proposto por Van Soest (1994) foi utilizado para a determinação da composição de forrageiras por permitir um melhor fracionamento dos diversos componentes da fração fibrosa. Este método é baseado na separação das diversas frações constituintes das forrageiras, por meio de reagentes específicos denominados detergentes (Embrapa, 2010). Foram avaliadas as quantidades de fibras em detergente neutro (FDN), que

são constituídas basicamente por celulose, hemicelulose, lignina, as fibras em detergente ácido (FDA), constituídas principalmente por celulose e lignina, assim como a hemicelulose, calculada pela diferença entre FDN e FDA.

Para a determinação do FDN foi realizado o seguinte procedimento: 1,0 g de amostra foi submetida a um processo de lavagem da parede celular onde o conteúdo celular é retirado do material quando submetido à lavagem por 60 minutos em 100 mL de solução de fibra de detergente neutro a quente (aproximadamente 105 °C).

Para a análise das fibras em detergente ácido pesou-se 1,0 g de amostra sendo submetida ao mesmo procedimento de lavagem a quente que o descrito para FDN, porém agora, sendo utilizado o detergente ácido. Terminado este processo, a amostra foi filtrada com auxílio de uma bomba de vácuo e lavada primeiramente com água quente (90 a 100 °C) duas vezes, utilizando aproximadamente 80 mL no total da lavagem, e após com acetona outras duas vezes (utilizando aproximadamente 25 mL por lavagem). A amostra foi levada a uma estufa para secar a 60 °C. Depois foi esfriada em um dessecador para que fosse feita a pesagem.

2.5 Pré-tratamento

O material foi submetido a um pré-tratamento intercalado entre ataque ácido (H_2SO_4 a 1% v/v, 3g material/10ml solução) e básico (NaOH a 4% v/v, 3g material/20 ml solução) da fibra por 60 min à temperatura de 120 °C a 125 °C em autoclave em cada etapa do processo. Terminado o pré-tratamento, a amostra foi filtrada utilizando uma bomba de vácuo e lavou-se por duas vezes com água quente (90 a 100 °C), aproximadamente 80 mL no total, e outras duas vezes com acetona (aproximadamente 25 mL por lavagem), até que as fibras se tornem incolor em toda a amostra. A amostra foi seca em estufa a 60 °C e esfriada em dessecador por 1 h antes de ser pesada.

A metodologia utilizada para o pré-tratamento assemelha-se à determinação de fibra bruta (FB), descrita por Silva e Queiroz (2012), diferindo nas concentrações do ácido e da base que são 1,25% para ambos. Nesse sentido no presente trabalho, a proporção de material insolúvel recuperado

após esse processo equivale a FB. Esses valores serão comparados aos teores de FDN, com finalidade de avaliar o potencial grau de perda de hemicelulose que ocorrerá eventualmente durante o pré-tratamento.

2.6 Hidrólise enzimática

Com finalidade de digerir a biomassa para liberar os açúcares fermentescíveis, as amostras (pré-tratadas) foram submetidas à hidrólise enzimática, sendo determinado o rendimento da hidrólise do material através da fibra em detergente neutro digestível ($FDN_{digestível}$). A tabela a seguir mostra um comparativo entre ambas as enzimas utilizadas.

Tabela 7: Caracterização das enzimas CTEC e HTEC conforme a descrição da empresa fabricante Novozymes.

Produto	Cellic CTec2	Cellic HTec2
Especificação e Descrição	<ul style="list-style-type: none"> - Complexo de Celulase para degradar celulose em açúcar fermentáveis - Uma mistura de celulases agressivas, alto percentual de β-glucosidase e hemicelulase 	<ul style="list-style-type: none"> - Endoxilanase com alta especificidade para hemicelulose solúvel. - Percentual de Celulase
Características	<ul style="list-style-type: none"> - Alta eficiência de conversão - Eficiente para alta concentração de sólidos - Tolerante a inibidores - Compatível com vários tipos de biomassa e pré-tratamentos - Alta concentração e estabilidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Pode ser combinada com CTec2 para aumentar hidrólise da celulose - Favorável para substrato com pré-tratamento ácido ou alcalino - Converte hemicelulose em açúcares fermentáveis
Benefícios	- Até 50% menos de dosagem de enzima	- 20% menos enzima requerida

FONTE: (NOVOZYMES, 2015).

O meio reacional consistiu de 1,0 g do substrato, 16 mL do tampão citrato de sódio/ácido cítrico (0,05 M, pH = 4,8) das enzimas diluídas em frascos erlemeyer de 250 mL. As reações enzimáticas se deram em incubadora “shaker” a 48 °C, agitação de 180 rpm, durante 72 horas. A dosagem dos complexos enzimáticos Cellic CTec2 e HTec2 foi baseada na proporção relativa de FDA e hemicelulose (FDN-FDA) em relação ao FDN contido na amostra; foi usado o nível de dosagem correspondente a 6,0% da

FDA como complexo enzimático, que é o nível indicado pelo fabricante, e a hidrólise foi realizada em quadruplicata, assim como no pré-tratamento.

2.7 Determinação da fração fermentescível da fibra (açúcares solúveis)

Após a hidrólise enzimática com a associação dos complexos enzimáticos Cellic Ctec2 e Cellic HTec2, pode-se estimar os açúcares fermentescíveis. Para tanto, a metodologia utilizada tomou por princípio a quantificação da fração da fibra em detergente neutro que sofreu hidrólise enzimática pela diferença entre o peso inicial da amostra submetida à hidrólise e seu peso ao final da hidrólise. Pelo fato de ser um mix de enzimas, a digestibilidade observada no material se dá exclusivamente sobre o substrato de FDN que gera açúcares solúveis e passíveis de serem fermentados. Assim a fibra em detergente neutro digestível refere-se à fração da FDN que sofreu hidrólise enzimática e liberou açúcares livres para a potencial fermentação etílica. Temos assim, uma quantificação indireta da proporção de açúcares solúveis obtidos a partir da hidrólise enzimática do material.

2.8 Estimativa da produção de etanol

Segundo Finguerut e colaboradores (1985), a estimativa do rendimento de processo fermentativo se deu de forma estequiométrica pela aplicação da equação de Gay – Lussac que, para efeito de cálculo, considera que cada 100 Kg de Açúcar Redutor Total (ART) (expressos em glicose e hemicelulose) fermentado, produz-se 51,1 Kg de etanol.

3.0 Resultados e discussão

3.1 Pré-tratamento

A metodologia utilizada para o pré-tratamento assemelha-se à determinação de fibra bruta (FB), descrita por Silva e Queiroz (2012), diferindo apenas nas concentrações de ácido e base utilizadas, sendo de 1,25% para ambos os tratamentos. Neste sentido, o presente trabalho apresentará a proporção de material insolúvel recuperado após pré-tratamento (o que chamaremos de material pré-tratado e equivaleria à fibra bruta) e faremos o paralelo com a quantidade de FDN presente no material. Desta forma, pode-se

avaliar o potencial grau de perda de hemicelulose que eventualmente pode ter ocorrido durante o pré-tratamento.

Assim, pode-se constatar que o pré-tratamento por hora aplicado resulta na obtenção de uma fração insolúvel da fração fibrosa do material, e que pode, pelo princípio do método, subestimar a quantidade de parede celular por solubilização da hemicelulose.

A partir das considerações apresentadas sobre o pré-tratamento, estão apresentados na tabela a baixo os resultados observados para o pré-tratamento. Nesta tabela fica explícito as proporções de perda da fração hemicelulose solubilizada com o pré-tratamento e a comparação entre a fração insolúvel (pré-tratamento) e a concentração de FDN observada nas amostras.

Tabela 8 – Material Insovúvel após pré-tratamento (%MS), Fibra em detergente neutro (% MS) e perda por solubilização da hemicelulose (% MS) para diferentes espécies de braquiárias.

Espécies de Braquiárias	Pré-Tratamento (%MS)	FDN (%MS)	Hemicelulose solubilizada (%MS)
B. decumbens	33,9 A	76,3 A	42,40 A
B. brizantha cv. Marandu	34,6 A	76,0 A	41,40 A
B. ruziziensis	34,1 A	73,3 A	39,20 A
Convert HD364	34,2 A	76,5 A	42,30 A
CV (%)	4,55	4,05	2,37

Médias seguidas de mesma letra (maiúscula nas colunas) não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

A partir da análise dos dados apresentados na tabela 8, constata-se que a fração insolúvel após o pré-tratamento corresponde a fração fibrosa (que foi posteriormente submetida a hidrólise enzimática) e que deve se aproximar dos resultados esperados para fibra bruta e não fibra em detergente neutro (FDN). Assim subtração direta da fração Pré-tratamento (conforme descrita na tabela 8) com a fração FDN resulta na Perda de hemicelulose por solubilização. Pode-

se observar também que o grau de solubilização da hemicelulose no pré-tratamento foi semelhante para todas as espécies de braquiárias não sendo observada diferença significativa ($p>0,05$) entre elas.

A partir destas observações, conclui-se que o material pré-tratado que seguiu para a digestão enzimática com CTEC/HTEC constou basicamente das frações menos digestíveis e mais lignificadas da parede celular.

3.1 Fibra em detergente neutro (FDN), Fibra em detergente ácido (FDA) e Hemicelulose

Os teores de FDN e FDA das diferentes espécies de Braquiárias são apresentados a seguir, e estão dentro da faixa dos teores descritos por Book Convert 2012, VALLE et al 1998, REIS et al 2013, Johnson e Pezo, 1975 que foram apresentados no capítulo I.

Tabela 9: Teores de fibra em detergente neutro (FDN) , fibra em detergente ácido (FDA) e hemicelulose para as diferentes espécies de braquiárias.

Frações Parede Celular	CV (%)	<i>B. Decumbens</i>	<i>B. brizantha cv. Marandu</i>	<i>B. ruziziensis</i>	Convert HD364
FDN(%MS)	3,99	76,50 a	76,00 a	74,00 a	76,75 a
FDA(%MS)	14,06	47,75 a	46,00 a	48,25 a	43,00 a
Hemicelulose (%MS)	30,45	28,75 a	30,00 a	25,75 a	33,75 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância.

Segundo Bianchi et al., (2007), a fibra vegetal é a uma denominação geral aplicada a diversos materiais compostos de hidrogênio, oxigênio e carbono, representados majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, constituindo a parede celular dos vegetais. Sendo possível estimar as frações digestíveis e não digestíveis através de sua caracterização química.

O teor de hemicelulose foi determinado pela diferença entre fibras em detergente neutro (FDN) e fibras em detergente ácido (FDA). O teor de

hemicelulose das biomassas avaliadas foram correspondentes aos níveis descritos por Valle et al (1998) para *B. ruzizienses*, de Johnson e Pezo, 1975 para *B. decumbes*, de FRANÇA et al,2007 para *B. brizantha* cv. Marandu.

3.2 Coeficiente de Digestibilidade da Fibra (CD_{Fibra}) e Quantidade de Fibra em Detergente Neutro digestível ($FDN_{\text{digestível}}$)

Entende-se por coeficiente de digestibilidade da Fibra o percentual de fibra passível de digestão enzimática, expressa como % Fibra. Já a fibra em detergente neutro digestível representa a quantidade de FDN potencialmente digestível na gramínea, e está expressa como % da matéria seca. A diferença entre elas é que a primeira (CD_{Fibra}) se refere ao coeficiente de digestibilidade da Fibra, e o segunda ($FDN_{\text{digestível}}$), se refere ao coeficiente de digestibilidade da fibra (CD_{Fibra}) multiplicado pelo teor (proporção relativa) de FDN na amostra, ou seja, à quantidade de FDN digestível.

Cabe ressaltar aqui na descrição desta metodologia que, em função do pré-tratamento se assemelhar à metodologia de determinação da fibra bruta, optamos por denominar o coeficiente de digestibilidade da fração fibrosa como coeficiente de digestibilidade da fibra (CD_{Fibra}) apenas, uma vez que foi observada perda de hemicelulose no pré-taramento, o que será explicado com mais detalhe nos resultados e discussão deste trabalho mais a frente.

Na tabela a seguir estão apresentados os dados para o coeficiente de digestibilidade da fibra (CD_{Fibra}) e fibra em detergente neutro digestível ($FDN_{\text{digestível}}$) para as diferentes espécies de braquiárias. Foi observado efeito significativo entre as espécies de braquiárias tanto para o CD_{Fibra} quanto para a quantidade de fibra em detergente neutro digestível ($FDN_{\text{digestível}}$). Entre as espécies de braquiárias estudadas, a *B. decumbens* e a *B. brizantha* cv. Marandu foram as que apresentaram menor ($p < 0,01$) coeficiente de digestibilidade da fibra (CD_{Fibra}) e conseqüentemente, menor FDN digestível ($FDN_{\text{digestível}}$). A *B. ruziziensis* e a Braquiária híbrida Convert HD364 apresentaram CD_{FB} e $FDN_{\text{digestível}}$ mais elevados ($p < 0,05$) que as primeiras, porém não diferindo entre si ($p < 0,01$).

Tabela 10: Coeficiente de digestibilidade da fibra (CD_{Fibra}), Fibra em detergente neutro digestível ($FDN_{\text{digestível}}$) e Produção potencial de Etanol (Etanol Potencial) a partir das Braquiárias: decumbens, brizantha cv Marandu, ruzizensis e Convert HD 364.

Gramíneas	CD_{Fibra} (% Fibra)	$FDN_{\text{digestível}}$ (% MS)	Etanol Potencial (ml/ kg $MS_{\text{pré-tratado}}$)
B. decumbens	17,91 b	13,80 b	89,38 b
B. Brizantha cv Marandu	20,09 b	15,25 b	99,68 b
<i>B. Ruzizensis</i>	28,22 a	20,70 a	134,06 a
Convert HD364	29,34 a	22,46 a	148,56 a
CV (%)	15,26	16,72	16,35

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Kcnott a 5% de significância.

Legenda:

CD_{Fibra} : coeficiente de digestibilidade da fibra, expressa como percentual da Fibra;

$FDN_{\text{digestível}}$: Fibra em detergente neutro digestível, expressa como porcentagem da matéria seca;

Etanol: Expresso em (ml/ kg $MS_{\text{pré-tratado}}$), com base no material após o pré-tratamento;

Segundo JUNG e DEETZ (1993), o limitado acesso das enzimas ao centro de reação do carboidrato parece ser o maior limitante à degradação da parede celular das forrageiras, em decorrência da lignificação. O que explica o menor coeficiente de digestibilidade apresentado pela *B. decumbes*, seguida pela *B. brizantha* cv. Marandu.

Assim como os valores encontrados por Paciullo et al 2001, entre as espécies estudadas, o *B. decumbes* foi a que apresentou mais alto ($P < 0,05$) teor de lignina (4,0%), sendo que as duas outras espécies não diferiram entre si (3,1%). Por isso a mais baixa digestibilidade em colmo de *B. decumbes* pode ser atribuída ao mais alto teor de lignina.

Entretanto, a superioridade da *B. ruzizensis* para características bromatológicas de forragem foi constatada também por Hughes et al (2000),

Valle et al (1998) resumiram estudos de 36 acessos de Braquiária e observaram que a *B. ruzizienses* se destacou na qualidade, pois apresentou os menores teores de FDN, FDA, celulose, hemicelulose e cinzas que as demais espécies, sendo assim um maior grau de digestibilidade.

E a Braquiária Convert HD364 que é constituída por um híbrido resultante de três gerações de cruzamento, entre *Brachiaria ruziziensis* clone 44-6 tetraploide sexual e *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, tetraploide apomítica (ALMEIDA, 2014), apresentou características semelhantes a *B. ruzizienses* em relação a qualidade da fibra.

3.2.1- Rendimento de bioetanol

O rendimento de bioetanol está diretamente associado a quantidade de açúcares solúveis fermentescíveis presentes no substrato após digestão enzimática. A digestibilidade da fibra está ligada a quantidade e qualidade (grau de lignificação) dos carboidratos presentes na fibra, tendo em vista que durante o processo de hidrólise enzimática, essas enzimas atuam diretamente nesses elementos, possibilitando, portanto a sua quantificação e consequentemente avaliação de conversão no biocombustível.

A *B. decumbens* e a *B. brizantha* cv. Marandu foram as que apresentaram os menores coeficiente de digestibilidade da fibra (CD_{Fibra}) e quantidade de fibra digestível ($FDN_{digestível}$) ($p < 0,05$) entre as espécies de Braquiárias estudadas. Foram observados para a decumbens e brizantha um coeficiente de digestibilidade da fibra (CD_{Fibra} : 17,91 e 20,09 %FDN) e quantidade de fibra digestível ($FDN_{digestível}$: 13,80 e 15,25 %MS_{pré-tratado}), respectivamente. Os potenciais de geração de etanol observados tiveram o mesmo agrupamento de médias, sendo para as braquiárias decumbens e a brizantha de 89,38 ml/kg MS_{pré-tratado} e 99,68 ml/kg MS_{pré-tratado} respectivamente.

Entretanto, a Braquiária híbrida Convert HD364 e a *B. ruzizienses* não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$) para CD_{Fibra} e $FDN_{digestível}$, resultando em uma produção potencial de etanol também semelhante entre ambas, tendo sido observado valores de 148,56 e 134,06 ml/Kg MS_{pré-tratado}, para as braquiárias respectivamente. Uma vez que CD_{Fibra} e

a $FDN_{digestível}$ tenham sido semelhantes para as duas braquiárias (ruzizensis e covert HD364), também não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) para a produção potencial de etanol entre elas.

Contudo, SANTOS (2016), chegou a um valor superior de 347,13 rendimento de etanol em (mL/Kg MS) para braquiária CONVERT HD364 devido o material ter recebido adubação nitrogenada. E Pacheco et al (2012) obteve, com o completo consumo da glicose, para a B. brizantha, 49,2 g/L de etanol, correspondente a um rendimento de 96,3% do teórico e uma produtividade de 13,1 getanol/L.h. Já o bagaço de cana-de-açúcar produziu, com o processo fermentativo, 46,1 g/L de etanol, ou seja, 90,2% do rendimento teórico de uma fermentação alcoólica, com produtividade de 12,3 getanol/L.h.

3.3- Regressão Linear

Uma vez que os efeitos entre tratamentos (espécies de braquiárias) foram demonstrados pelo teste de comparação das médias, objetivamos apresentar através de um ajuste de regressão linear, um modelo de predição que levasse em conta a quantidade de FDN digestível ($FDN_{digestível}$) como variável preditora da produção potencial de Etanol de segunda geração.

Os Resultados estatísticos da análise de regressão linear simples podem ser observados agrupados no quadro a seguir, onde a estimativa da produção de etanol (ml/kg $MS_{pré-tratado}$) representou a variável dependente e a quantidade de fibra em detergente neutro digestível (%MS) como variável preditora.

Gráfico 1: Número de observações, Análise de variância da regressão, parâmetros da regressão e significância dos parâmetros de regressão para a estimativa da produção potencial de Etanol a partir da quantidade de FDN digestível observada ($FDN_{digestível}$).

Number of Observations Read	16
Number of Observations Used	16

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	13701	13701	1315.76	<.0001
Error	14	145.77995	10.41285		
Corrected Total	15	13847			

Root MSE	3.22690	R-Square	0.9895
Dependent Mean	117.92250	Adj R-Sq	0.9887
Coeff Var	2.73645		

Parameter Estimates						
Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	Intercept	1	-0.39950	3.36023	-0.12	0.9071
FDNd	FDNd	1	6.55389	0.18068	36.27	<.0001

Gráfico 2: Variáveis observadas e previstas para estimativa de produção potencial de Etanol (ml/ kg MS_{pré-tratado}), segundo o modelo de regressão linear simples.

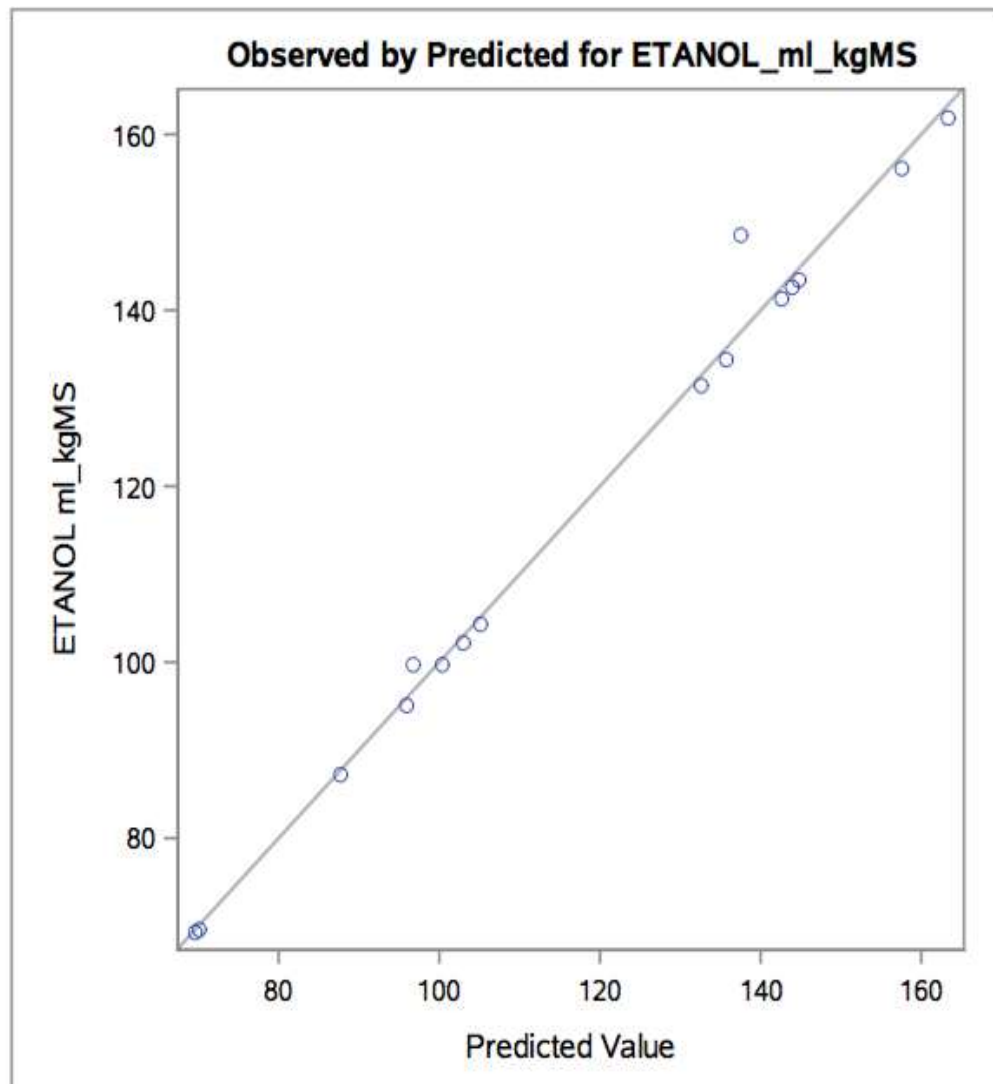
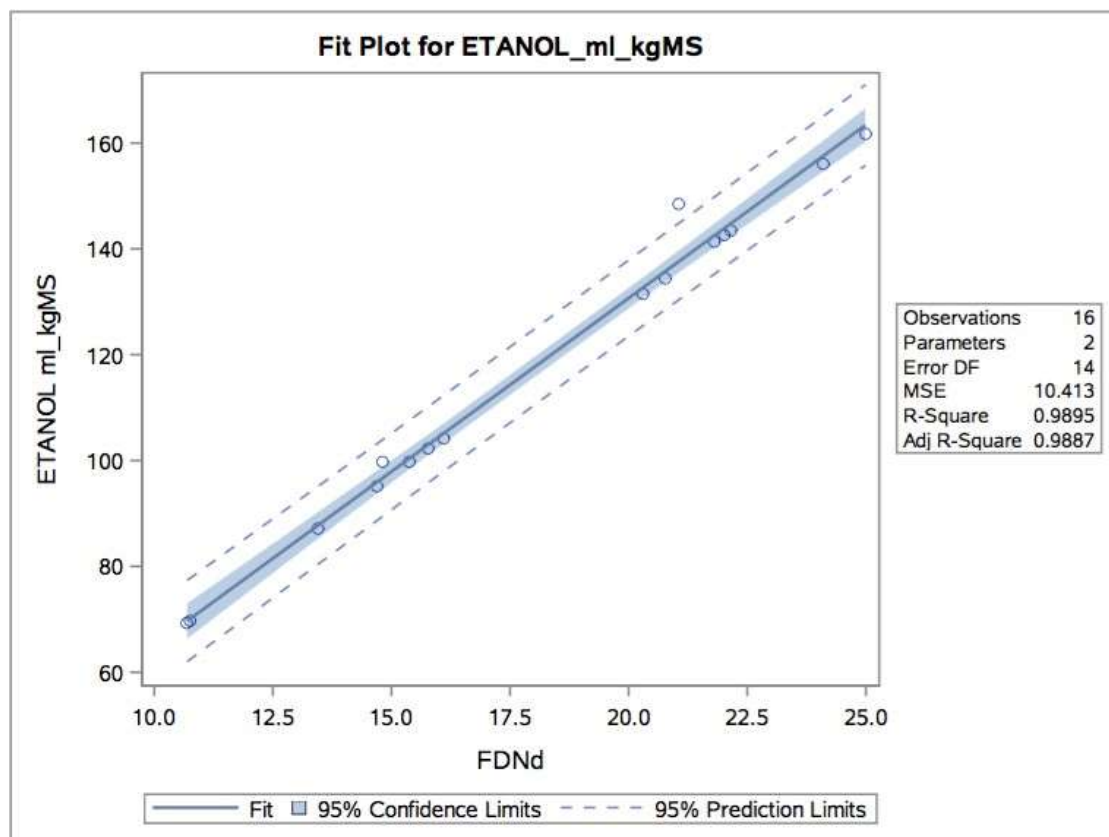


Gráfico 3: Modelo de Regressão linear simples, curva de regressão, intervalos de confiança e plotagem dos dados para a estimativa da produção potencial de Etanol (variável dependente) e FDN_{digestível} (variável independente).



Equação de Regressão:

$$\text{Etanol (ml / Kg MSpré-tratado)} = 6,55389 \times \text{FDN}_{\text{digestível}} (\% \text{MSpré-tratado}) - 0,39950$$

$$R^2 = 0,9895$$

O ajuste do modelo de regressão apresentou elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9895$) o que representa uma elevada capacidade do modelo em prever a produção potencial de etanol a partir da quantidade de fibra em detergente neutro digestível. Além disso, o coeficiente de regressão foi significativo dentro do modelo ($P < 0,01$). Pode-se dizer assim, a partir da equação de regressão ajustada que para cada incremento de 1% de FDN_{digestível} foi observado um incremento médio de 6,55 ml de Etanol/ Kg MS_{pré-tratado}.

O Modelo de regressão foi obtido a partir das diferentes espécies de braquiárias e apresentaram teores semelhantes ($P > 0,05$) de FDN, FDA e Hemicelulose. A amplitude da quantidade de fibra digestível ($FDN_{digestível}$) observada entre as espécies, corrobora com o teste de médias que sugeriu agrupamentos das médias para a mesma variável ($FDN_{digestível}$), o que pode ser explicado pelo efeito que a qualidade da fibra (estrutura química, arranjo espacial das moléculas de celulose, hemicelulose e lignina) exercem sobre a o potencial de hidrólise enzimática dos carboidratos e posterior produção de etanol.

Conclusão

Foi observada diferenças entre as espécies de braquiárias para o potencial de produção de Etanol de segunda geração, em função da quantidade de fibra em detergente neutro digestível.

As *B. decumbens* e *B. Brizantha* cv. Marandu apresentaram menores potenciais de produção de Etanol de segunda geração quando comparadas à *B. ruziziensis* e Convert HD364.

Foi observada perda de hemicelulose no pré-tamento, sendo necessário um aprofundamento nessa etapa do processo.

Referências

AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 29, n. 6, p.675-685, nov. 2011. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011000607>>. Acesso em: 26 ago. 2015.

ALMEIDA, I. C. L. **Acúmulo e valor nutritivo da forragem do capim Convert HD 364 (Brachiaria hírida) sob taxas contrastantes de crescimento em resposta à altura do dossel mantida por lotação contínua**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 70p. 2014.

BIANCHI, M.L. Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolve. Dissertação de Mestrado em Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 76p, 1995.

CARVALHO, E.R.; MARTIN, L.; MILORE, D.M.B.P. Interacting of cheorine with tropical aquatic funcic acids and formation of intermediates absorbed by fluorescence spectroscopy. *Journal of the Brazilian.Clinicd Society*, v. 15 n 53, p.421, 2009.

Convert HD 364 no Brasil: A tecnologia que transforma a forrageira híbrida em arte, 2011. Dissertação (Mestrado em Agroenergia)

FINGUERUT, J. et al. **Estequiometria da fermentação alcoólica a partir do caldo de cana**. Boletim Técnico Opersucar, São Paulo, Brasil, n.33, p. 45-48, 1985.

JOHNSON, W.L.; GUERRERO, J; PEZO, D. Cell wall constiturnts ann in vitro digestibility of Napier grass (Pennisetum purpurem). *Journal of Animal Science*, v.37, n.5 p. 1255-1261, 1975.

Jung, H.G., and D.A. Deetz. 1993. Cell wall lignification and degradability. p. 315-346, In H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield, and J. Ralph, eds. *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, USA.

HUGHES, N.R.G. Shearing strengt as na additional selectin criterion for quality in Brachiaria pasture ecotypes. **Journal of Agricultural Science**, v. 135, n.2, p.123-130, 2000.

LYND, L. R. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology**. Reviews, v. 66, p. 506-577, 2002.

NOVOZYMES, **Novozymes Cellic® CTec2 and HTec2** - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic. Disponível em: <www.bioenergy.novozymes.com>. Acesso em 01 de junho de 2015.

PACHECO, F.; MENDES, F. B. P. CARVALHO, D. S. RODRIGUES, C. M. M. MACHADO, M. AYRES. **Avaliação do potencial de biomassas na produção de etanol lignocelulósico**. Búzios,2012.

PACIULLO, D.S.C., GOMIDE, J.A., QUEIROZ, D.S., SILVA, E.A.M. Composição química e digestibilidade In Vitro de lâminas foliares e colmos de gramíneas forrageiras, em função do nível de inserção no perfilho, da idade e da estação de crescimento. Rev. bras. zootec., 30(3):964-974, 2001.

RABELO, A. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. Tese (Doutorado em engenharia química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 447 p, 2010.

SANTOS, W.B.R. **Estimativa da produção potencial de etanol da Braquiária híbrida Convert HD 364**. Univerdade Federal do Tocantins, Palmas, 2016.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 3. ed. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 2012. 235 p.

SUN, N. et al. Where are ionic liquid strategies most suited in the pursuit of chemicals and energy from lignocellulosic biomass? **Chem. Commun.**, [s.l.], v. 47, n. 5, p.1405-1421, 2011. Royal Society of Chemistry (RSC). DOI: 10.1039/c0cc03990j.

VALLE, C.B.; SINGH, R.J.; MILLER, D.A. Pachytene chromosomes of *Brachiaria ruziziensis* Germain et Evrard. *Plant Breeding*, Berlin, v.78, n.1, p.75-78, 1998.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University, 476p. 1994.

Zhang, Q.Z., Cai, W.M., 2008. Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3. *Biomass Bioenergy* 32, 1130–1135