

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

USO DA RADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS NO PRÉ-
TRATAMENTO ÁCIDO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL
LIGNOCELULÓSICO DE CAPIM COLONIÃO (*Panicum
maximum*)

Autora: Taís Lima da Silva
Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico de
Souza Castro

Rio Verde - GO
Agosto - 2015

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

USO DA RADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS NO PRÉ-
TRATAMENTO ÁCIDO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL
LIGNOCELULÓSICO DE CAPIM COLONIÃO (*Panicum
maximum*)

Autora: Taís Lima da Silva
Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico de
Souza Castro

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

Rio Verde - GO
Agosto - 2015

Lima da Silva, Taís

Cutter Uso da radiação de micro-ondas no pré-tratamento ácido para produção de etanol lignocelulósico de capim colonião (*Panicum maximum*) / Taís Lima da Silva. --Rio Verde. - 2015.
44 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano –
Câmpus Rio Verde, 2015.

Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro.

Bibliografia

1. biomassa 2. açúcares 3. hidrólise. 4. biocombustíveis I. Título
II. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde.

CDD

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

USO DA RADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS NO PRÉ-
TRATAMENTO ÁCIDO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL
LIGNOCELULÓSICO DE CAPIM COLONIÃO (*Panicum
maximum*)

Autora: Taís Lima da Silva
Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico de
Souza Castro

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica

APROVADA: 12 de agosto de 2015.

Blyeny Hatalita Pereira Alves
(Membro externo)
IF Goiás – *Câmpus* Itumbiara

Cibele Silva Minafra
(Membro interno)
IF Goiano – *Câmpus* Rio Verde

Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro
(Orientador)
IF Goiano – *Câmpus* Rio Verde

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da sabedoria, persistência e dedicação que tive ao longo desse processo.

Agradeço aos meus pais Aldivanir e Solange, que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, me apoiando e me dando suporte a cada passo dado, inclusive nesse período da Pós-Graduação. A eles, serei sempre grata!

Em geral, à minha família e amigos, que compartilharam comigo cada vivência, principalmente àqueles que participaram de forma direta para que essa nova etapa pudesse ser alcançada.

A todos os colegas do Laboratório de Química Tecnológica, em especial, à minha amiga Andreza, que sempre esteve presente, me ajudando nas etapas a serem vencidas, responsável pela obtenção de muitos reagentes e novos métodos de análises. Obrigada, amiga!

Agradeço também à amiga Gabriella Cabral, que me deu suporte emocional durante todo esse tempo e até hoje.

A todos os professores da pós-graduação, em especial, ao professor Dr. Carlos Frederico de Souza Castro, pelas orientações durante todo o processo, que sempre esteve à disposição para sanar as dúvidas que iam surgindo, e que foram muitas.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Taís Lima da Silva, filha de Aldivanir Macedo de Lima e Solange Barbosa da Silva, nasceu em Caçu, estado de Goiás, em 08 de fevereiro de 1990. Iniciou sua formação profissional no Instituto Federal Goiano – *Câmpus* Rio Verde, no ano de 2009, com o curso de Licenciatura e Bacharelado em Química. E quatro anos e meio depois, recebeu grau conferido pelo Instituto. No segundo semestre de 2013, ingressou no mestrado em Agroquímica, também pelo Instituto Federal Goiano - *Câmpus* Rio Verde.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE EQUAÇÕES	ix
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO	1
Etanol Lignocelulósico	3
Celulose	4
Hemicelulose	5
Lignina.....	6
Capim.....	8
Pré-tratamento.....	9
Pré-tratamentos químicos	11
Uso de micro-ondas	12
Hidrólise.....	13
Fermentação.....	16
Inibidores de fermentação.....	17
Separação / destilação	188
Referências Bibliográficas	188
OBJETIVOS	233
Geral.....	23
Específicos	23
ARTIGO CIENTÍFICO	24

Introdução	26
Material e Métodos	Erro! Indicador não definido.
Resultados e Discussão	31
Conclusão.....	422
Referências Bibliográficas	422

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Matéria-prima e composição (% peso seco) de biomassa lignocelulósica.	4
 ARTIGO	
Nenhuma entrada de índice de ilustrações foi encontrada.	
Tabela 2. Resultados apresentados dos valores médios em porcentagem e desvios padrão dos teores de extraíveis, hemicelulose, lignina e celulose.....	31
Tabela 3. Resultados de ANOVA para as variáveis do planejamento fatorial realizado sobre cada constituinte de <i>Panicum maximum</i>	Erro! Indicador não definido. 2
Tabela 4. Valores médios e desvios padrão para cada constituinte da biomassa de <i>Panicum maximum</i> em função dos níveis das variáveis do planejamento fatorial.....	363
Tabela 5. Teores de hemicelulose, lignina, celulose e cristalinidade do capim colônia para o material bruto, branco e ácido.....	366

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura da parede celular dos vegetais	3
Figura 2. Ilustração de uma cadeia de celulose	4
Figura 3. Representação das ligações de hidrogênio da celulose	5
Figura 4. Representação esquemática de um xilano de gramínea. (1) 1,4-D-xilopirranose; (2) L-arabinose; (3) ácido 4-O-D-metil- α -D-glucurônico; (4) grupo acetil	6
Figura 5. Precursores primários da lignina	7
Figura 6. Representação esquemática da lignina	8
Figura 7. Representação esquemática da ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico	9
Figura 8. Produção de bioetanol e biogás a partir do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos	10
Figura 9. Diagrama esquemático do efeito do processo de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica	11
Figura 10. Reações que ocorrem na hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos	14
Figura 11. Atuação das enzimas celulasas sobre a celulose	15

ARTIGO

Figura 1. Micrografias obtidas por MEV do material bruto (à esquerda) e pós-tratamento ácido (Exp.1) (à direita), com ampliação x1000.....	377
Figura 2. Espectros de absorção do capim colônia (<i>Panicum maximum</i>), obtidos por análises de espectroscopia no Infravermelho.....	388
Figura 3. Teores de açúcares redutores totais obtidos após hidrólise enzimática, dos materiais em estudo: material bruto, branco e pré-tratado com ácido. A.T.F = após tempo de fermentação.....	40

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

	Página
ARTIGO	
Equação 1. Cálculo do teor de extraíveis, expresso em porcentagem	27
Equação 2. Cálculo do teor de hemicelulose, expresso em porcentagem	27
Equação 3. Cálculo do teor de lignina, expresso em porcentagem	28
Equação 4. Cálculo do teor de celulose, expresso em porcentagem	28
Equação 5. Determinação da cristalinidade do material lignocelulósico	30
Equação 6. Cálculo da massa de glicose liberada na hidrólise enzimática	31

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

α	Alfa
%	Porcentagem
β	Beta
θ	Ângulo Teta
2-G.....	Segunda geração
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Hidróxido de Cálcio
CrI	Índice de Cristalinidade
cv.....	Cultivar
CO_2	Dióxido de carbono
Cu.....	Cobre
DNS	Ácido 3,5 – di-nitrosalicílico
DP.....	Grau de Polimerização
FPU.....	Filter Paper Unit
FPU g^{-1}	Filter Paper Unit por grama
FTRI.....	Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier
g	Gramas
g L^{-1}	Gramas por litro
GO	Goiás
h.....	Horas
HCl.....	Ácido Clorídrico
HMF.....	Hidroximetilfurfural
H_2SO_4	Ácido Sulfúrico
I_{002}	Intensidade de difração da parte cristalina da biomassa
I_{am}	Intensidade de difração da parte amorfa da biomassa
$\text{K}\alpha$	Kalfa
kg	Quilogramas
kV.....	Kilovolt

L.....	Litro
M.....	Molar
mA.....	Miliamper
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
min.....	Minutos
mL.....	Mililitro
mg dm ⁻³	Miligrama por decímetro cúbico
m/v.....	Massa/Volume
mg mL ⁻¹	Miligrama por mililitro
NaOH.....	Hidróxido de Sódio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sódio
nm.....	Nanômetros
PA.....	Pureza Analítica
PE.....	Ponto de Ebulição
pH.....	Potencial Hidrogeniônico
R.L.S.....	Razão Líquido-Sólido
Rpm.....	Rotações por minuto
UV-VIS.....	Ultravioleta visível
v/v.....	Volume/Volume
W.....	Watt

RESUMO

SILVA, TAÍS LIMA DA. Instituto Federal Goiano – *Câmpus* Rio Verde – GO, agosto de 2015. **Uso da radiação de micro-ondas no pré-tratamento ácido para produção de etanol lignocelulósico de capim colonião (*Panicum maximum*)**. Orientador: Carlos Frederico de Souza Castro. Coorientador: Edson Luiz Souchie.

A produção de etanol de segunda geração baseia-se na conversão da biomassa lignocelulósica, contudo, observa-se um impedimento devido à sua estrutura, a presença da lignina, que dificulta o acesso das enzimas durante a hidrólise e fermentação. Diante deste problema, algumas técnicas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de mitigar tais obstáculos. O pré-tratamento com radiação de micro-ondas, quando combinado com compostos alcalinos ou ácidos, tem sua eficácia maximizada. O uso de biomassa lignocelulósica vem sendo considerado a principal alternativa para suprir a demanda mundial de etanol, além de apresentar alta disponibilidade e baixo custo. Este estudo tem como objetivo investigar a associação da radiação de micro-ondas com ataques químicos ácidos, usando como matéria-prima *Panicum maximum* (capim colonião), para a produção de etanol lignocelulósico. O pré-tratamento ácido associado à radiação de micro-ondas foi utilizado para aumentar a digestibilidade da hemicelulose, com o propósito de obter maior liberação de açúcares. O pré-tratamento químico foi feito com ácido sulfúrico em concentrações de 0,5 e 5% m/v, com uma razão líquido-sólido de 10:1 e 50:1, radiação no micro-ondas com potência de 10 e 20% e tempo de irradiação de 10 e 60 minutos. As condições ótimas encontradas no estudo foram: concentração do reagente de 0,5%; razão líquido-sólido de 10:1; radiação no micro-ondas com potência de 10 %; e tempo de irradiação de 10 minutos. O melhor tratamento foi caracterizado

morfologicamente pela Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para perceber as alterações sofridas, foi feita hidrólise enzimática com enzimas comerciais e, após 72 horas, fermentado com *Saccharomyces cerevisiae*. Ao término da hidrólise, foram obtidos 2,39 g L⁻¹ de açúcares redutores totais. Os resultados mostram que o pré-tratamento químico ácido é eficiente para o aumento do teor de celulose, porém, não houve deslignificação do material, resultando em um baixo rendimento na hidrólise enzimática (28% de conversão), contudo, apresentou 70% a mais de conversão quando comparado com a hidrólise do material bruto (16,5% de conversão). O pré-tratamento é eficaz, sendo necessários mais estudos para alcançar um processo ótimo de hidrólise no capim colonião para considerá-lo uma fonte alternativa de biomassa lignocelulósica para produção de etanol, para atender à demanda atual.

PALAVRAS-CHAVE: biomassa, açúcares, hidrólise, biocombustíveis.

ABSTRACT

The second generation of ethanol is based on the conversion of lignocellulosic biomass, however, there is an impediment due to its structure, the presence of lignin, that complicates the access of enzymes during hydrolysis and fermentation. Faced with this problem, some techniques have been developed in order to mitigate these obstacles. The pre-treatment with microwave radiation, when combined with alkali compounds or acids, has a maximized effectiveness. The use of lignocellulosic biomass has been considered the main alternative to meet the global demand for ethanol, in addition to presenting high availability and low cost. This study aims to investigate the association of microwave radiation with chemical attacks acids, using as raw material *Panicum maximum* (*Panicum maximum*), for the production of lignocellulosic ethanol. The acid pretreatment associated with microwave radiation was used to increase the digestibility of hemicellulose to obtain a greater release of sugars. The chemical pre-treatment was performed with sulfuric acid to 0.5 to 5% concentration w/v, with a liquid-solid ratio of 10:1 and 50:1, the radiation power at microwave 10% and 20%, and irradiation time 10 and 60 minutes. The optimum conditions found in the study were: 0.5% reactant concentration; liquid-solid ratio of 10:1; microwave radiation with a power of 10%; and 10 minutes irradiation time. The best treatment was morphologically characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM). And to perceive changes occurred, it was made an enzyme hydrolysis with commercial enzymes and after 72 hours fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. At the end of hydrolysis, there were obtained 2.39 g L⁻¹ of total reducing sugars. The results show that chemical pretreatment acid is effective for increasing the cellulose content, however, there was no delignification of the material, resulting in a low yield in the enzymatic hydrolysis (28% of conversion), however, exhibited 70% more conversion when compared to the hydrolysis of the crude material

(16.5% conversion). Thus, the pretreatment appears as effective, but further studies are needed to achieve optimal hydrolysis process in guinea grass (*Panicum maximum*), in order to consider it an alternative source of lignocellulosic biomass for ethanol production to meet current demand.

KEYWORDS: biomass, sugars, hydrolysis, biofuels.

INTRODUÇÃO

Com o aumento do preço do petróleo e a busca de novas tecnologias para diminuir a emissão de gases causadores do efeito estufa, a preocupação econômica envolvendo a produção de energia está cada vez maior, diante disso, o uso de energias renováveis está sendo o centro das atenções. E essa meta de pesquisa vem tomando um espaço cada vez maior no ramo tecnológico (WEI et al., 2012; ORTIZ & OLIVEIRA JÚNIOR, 2014; FASAHATI et al., 2015).

Assim, os biocombustíveis se tornaram o foco de muitos países no âmbito energético e a produção de culturas usadas para obtenção do bioetanol começa a sofrer uma enorme pressão, pois a maior parte dessas culturas, entre elas, a beterraba, o milho e a cana-de-açúcar, é de uso alimentar, podendo seu uso gerar conflitos com a produção de alimentos (SOCCOL et al., 2010).

O Brasil se encontra em uma situação oportuna para produção de biocombustíveis, podendo futuramente liderar na produção de etanol internacionalmente (KOHLHEPP, 2010).

Nos EUA, o bioetanol é produzido principalmente de matérias-primas de amido de milho, enquanto no Brasil a maior produção é proveniente do caldo de cana e do melaço. Juntos, Brasil e EUA respondem por 89% da atual produção de bioetanol mundial (LIMAYEM & RICKE, 2012).

Com a preocupação do uso de fontes alimentares para produção de biocombustíveis, pesquisadores começaram a utilizar a biomassa lignocelulósica, resíduos urbanos, agroindustriais, agrícolas, gramíneas e madeiras, como matéria-prima, visto não competirem com a produção de alimentos, além de contribuírem com a sustentabilidade ambiental, sendo agora chamado de etanol de segunda geração, etanol 2-G ou etanol lignocelulósico (VAN DYK & PLETSCHE, 2012).

A biomassa lignocelulósica apresenta uma composição que pode variar de acordo com a espécie vegetal, mas é composta principalmente por três componentes: lignina, hemicelulose e celulose (LEE, 1997). É constituída por cerca de 75% de açúcares polissacarídeos. Por causa da complexidade da sua estrutura, o material se torna recalcitrante, sendo necessário um tratamento prévio, que consiste em desestruturar o material lignocelulósico (VAN DYK & PLETSCHE, 2012).

Nesse sentido, o pré-tratamento, que consiste na primeira etapa do processo para produção do etanol, é feito com o intuito de reduzir os teores de hemicelulose e lignina, visto que a hidrólise dessas partes estruturais pode gerar subprodutos e açúcares que, muitas vezes, causam inibição da fermentação microbiana. Nessa etapa, a celulose do material se torna mais acessível, e a liberação de açúcares fermentescíveis é facilitada (KUMAR et al., 2009; LIMAYEM & RICKE, 2012).

Após o pré-tratamento, é feita a hidrólise, que pode ser ácida ou enzimática, sendo a enzimática mais vantajosa. Nesse caso, é adicionado um coquetel de enzimas para disponibilizar os açúcares presentes no material, procedendo-se, dessa forma, à fermentação e à obtenção do etanol lignocelulósico (OGEDA & PETRI, 2010).

Catalisada pelas celulasas, a hidrólise enzimática consiste em um substrato insolúvel (celulose) e um catalisador solúvel (enzimas), sendo, assim, uma reação heterogênea. Para que a hidrólise seja completa, há uma ação selecionada feita por várias enzimas, que apresentam diferentes particularidades em relação ao material (SILVA, 2010).

A hidrólise enzimática de celulose que gera glicose e celobiose tem como passos considerados essenciais: a adsorção das enzimas celulasas e a concepção do complexo enzima/substrato (OGEDA & PETRI, 2010).

Como fonte de matéria-prima, o capim colônia é uma boa alternativa para produção de etanol de segunda geração, pois não compete com a produção de alimentos, é de fácil manuseio e pode ser obtida uma alta quantidade de material lignocelulósico. No que concerne ao mercado de sementes forrageiras no Brasil, 11% é movimentado pelo *Panicum maximum* (ANDRADE, 2001).

Assim, objetivou-se, com o presente trabalho, fazer no material lignocelulósico do capim colônia o pré-tratamento ácido, combinado com a radiação de micro-ondas, otimizando as melhores condições para tal processo, considerando as variáveis de concentração do reagente, potência do micro-ondas, tempo de radiação e razão líquido-sólido. Após o tratamento nas condições ótimas, o material foi então submetido à

radiação infravermelha e à Microscopia Eletrônica de Varredura, tendo sido verificadas morfológicamente a desestruturação da matéria-prima e sua suscetibilidade à hidrólise enzimática.

Etanol Lignocelulósico

Atualmente, há um grande crescimento nas pesquisas em busca de novos métodos que diminuam os causadores da poluição ambiental (GURAGAIN et al., 2011). Assim, há uma crescente demanda por biomassas de origem vegetal para sua utilização como matéria-prima na produção de biocombustíveis, devendo ser levados em consideração o custo, os parâmetros do processo, a disponibilidade da matéria-prima, o impacto ambiental e a viabilidade financeira, para produção do etanol combustível (MELO et al., 2008; SÁNCHEZ, 2009; GURAGAIN et al., 2011).

A parede celular da biomassa tem como principal constituinte a lignocelulose, sendo seus principais constituintes a celulose (polímeros de hexoses, 40–60%), a hemicelulose (polímeros de pentoses e hexoses e ácidos urônicos 20–40%) e a lignina (polímeros de compostos aromáticos, 10–25%), juntamente com outros materiais como pequenas quantidades de pectina, proteínas, extrativo, gorduras e cinzas, encontrados nos resíduos lignocelulósicos, em diferentes proporções. A Figura 1 mostra a estrutura da parede celular dos vegetais (GALBE & ZACCHI, 2007; LIN et al., 2010; EISENHUBER et al., 2013; BEHERA et al., 2014).

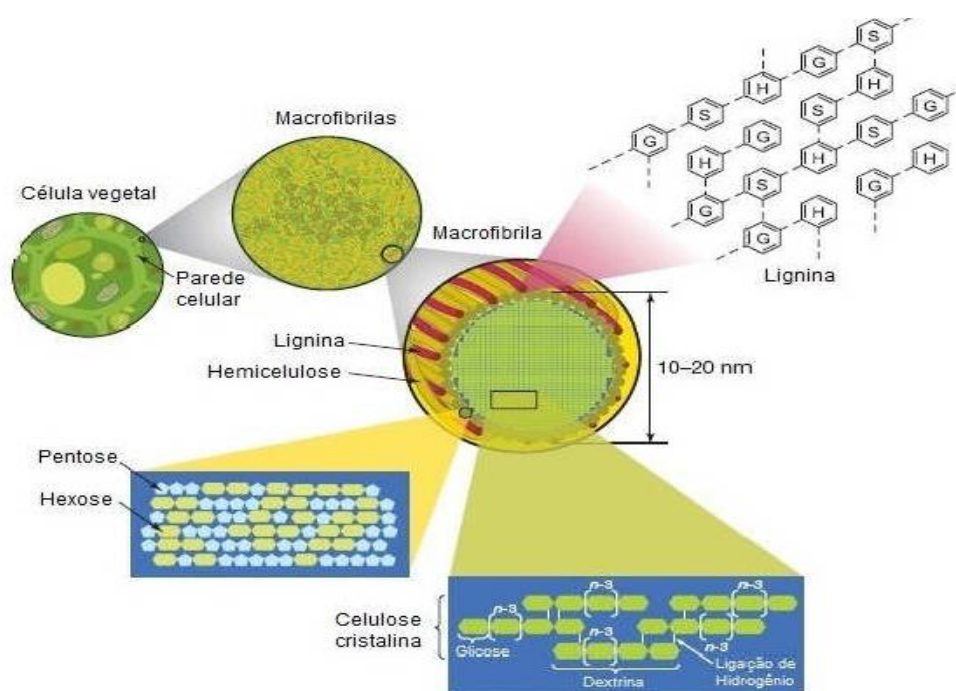


Figura 1. Estrutura da parede celular dos vegetais. Fonte: (GARCIA, 2012).

A Tabela 1 mostra a composição, em porcentagem, das partes estruturais da planta em diferentes materiais lignocelulósicos.

Tabela 1. Matéria-prima e composição (% peso seco) de biomassa lignocelulósica. Fonte: Adaptado (LIMAYEM E RICKE, 2012).

Matéria-prima	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Outros (ou seja, cinzas)
Resíduos agrícolas	37-50	25-50	5-15	12-16
Madeira dura	45-47	25-40	20-25	0,80
Madeira conífera	40-45	25-29	30-60	0,50
Gramíneas	25-40	35-50	-	-
Papéis de resíduos de polpas Químicas	50-70	12-20	6-10	-
Jornal	40-55	25-40	18-30	-
<i>Panicum vigatum</i>	40-45	30-35	12	-

Celulose

A celulose, parte predominante da estrutura da parede celular da planta, compõe aproximadamente 30% da planta (polímero orgânico mais abundante). É um homopolissacarídeo linear, de peso molecular elevado, formado por várias unidades consecutivas de celobiose (β -1, 4- glicosídicas) (Figura 2). A celulose consiste de partes com uma estrutura cristalina (organizada) e de partes desorganizadas, de estrutura amorfa (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009; LIMAYEM E RICKE, 2012).

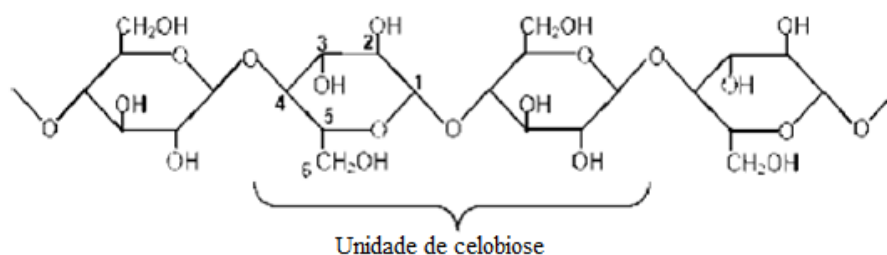


Figura 2. Ilustração de uma cadeia de celulose. Fonte: Adaptado (KUMAR et al., 2009).

A Figura 3 mostra que a celulose é formada por ligações de hidrogênio intramoleculares (responsáveis pela dureza) e intermoleculares (responsáveis pela constituição de fibrilas, estruturas que formam as fibras de celulose) (KUMAR et al., 2009; LIMAYEM E RICKE, 2012; SANTOS et al., 2012).

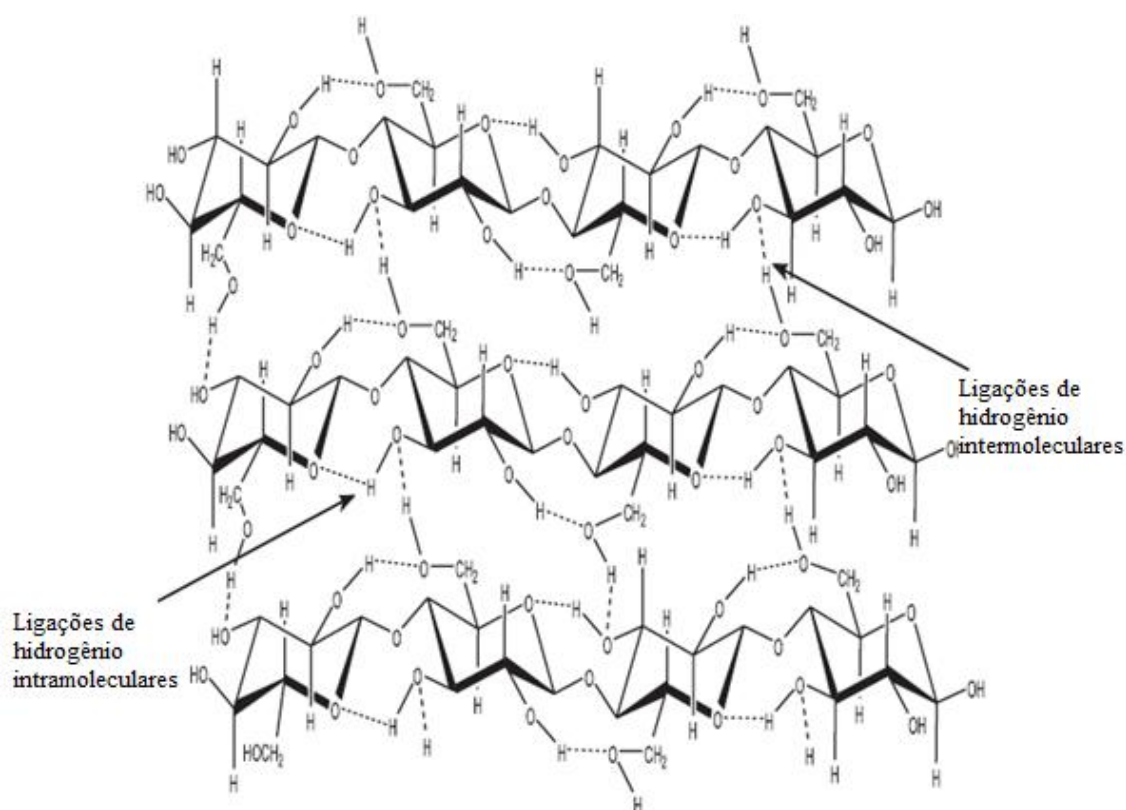


Figura 3. Representação das ligações de hidrogênio da celulose. Fonte: Adaptado (SANTOS et al., 2012).

Hemicelulose

Associados à celulose estão os polissacarídeos, de estrutura amorfa e variável, constituídos por cadeias ramificadas de açúcares, vários monossacarídeos e polimerizados, incluindo pentoses (como xilose e arabinose), hexoses (como manose, glicose e galactose) e ácidos urônicos. Esses polissacarídeos podem variar, dependendo da natureza e da fonte de matéria-prima. Devido à heterogeneidade dos seus açúcares, eles requerem uma grande diversidade de enzimas para hidrolisá-los em açúcares monoméricos. O componente dominante da hemicelulose de madeira e de plantas agrícolas é o xilano (Figura 4) (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

As hemiceluloses têm peso molecular menor do que a celulose, e também diferentes açúcares, que são polímeros simples que podem ser hidrolisados, formando cadeias laterais curtas, que funcionam como ligações entre a lignina e as fibras de celulose. Essas ligações dão flexibilidade e estabilidade ao complexo fibroso, fortificam

a rijeza da microfibrila celulósica, atuando como plastificante estrutural, aumentando a rigidez da parede celular (LIMAYEM & RICKE, 2012). Ao contrário da celulose, não formam microfibrilas (PASANGULAPATI et al., 2012).

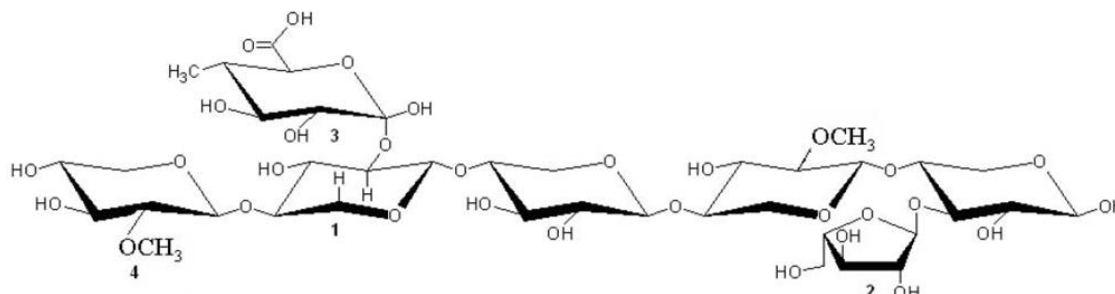


Figura 4. Representação esquemática de um xilano de gramínea. (1) 1,4-D-xilopiranosose; (2) L-arabinose; (3) ácido 4-O-D-metil- α -D-glucurônico; (4) grupo acetil. Fonte: (SILVA, 2010).

Da parte estrutural da planta, a hemicelulose é o constituinte mais sensível quando se trata de tratamento químico térmico. A ordem crescente de solubilidade dos seus compostos é: manose, xilose, glicose, arabinose e galactose. O aumento da temperatura tem influência positiva e direta na solubilidade dos compostos. Na temperatura de 180°C, a hemicelulose se solubiliza em água, mas, a partir de 150°C, partes da hemicelulose já são solubilizadas. O xilano é a parte que pode ser mais facilmente extraída, tanto em meio ácido como alcalino, enquanto a glicomanana dificilmente pode ser extraída em um ambiente ácido, necessitando de um meio alcalino (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

Lignina

A lignina, depois da celulose e da hemicelulose, é um dos polímeros mais abundantes na natureza. É um heteropolímero aromático, rígido e amorfo, ligado por ligações covalentes aos xilanos (porção da hemicelulose), o que lhe confere suporte estrutural, enrijecimento, impermeabilidade, resistência a ataques enzimáticos, microbianos e a estresse oxidativo. Sua estrutura apresenta macromoléculas de forma tridimensional, formada por unidades de *p*-propilfenol, formadas pela polimerização de três monômeros fenólicos: os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 5) (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009; KUMAR et al., 2009).

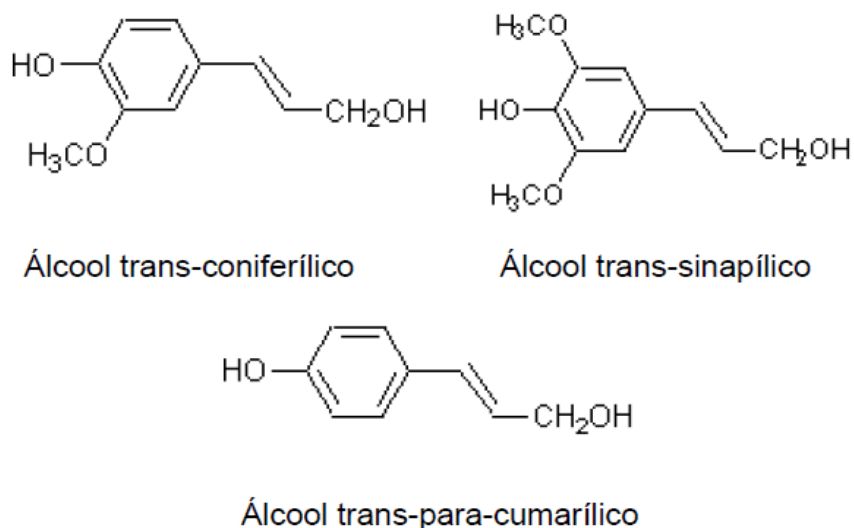


Figura 5. Precursores primários da lignina. Fonte: (SILVA, 2010).

Esses componentes, por serem derivados de grupos fenilpropanoides (altamente condensados e muito resistentes à degradação por apresentarem compostos aromáticos, estrutura e constituição muito irregular), estão firmemente agregados uns aos outros, formando a parte estrutural da lignocelulose, composta de açúcares complexos, que representam um obstáculo à ação de microrganismos ou enzimas. Sua representação esquemática pode ser observada na Figura 6 (VÁSQUEZ et al., 2007; SCHLITTLER & PEREIRA JR., 2008; JARDINE et al., 2009; EISENHUBER et al., 2013).

A lignina não é solúvel em água e é opticamente inativa, fazendo com que sua degradação seja muito difícil. Da mesma forma que a hemicelulose, a lignina, sob condições neutras, geralmente começa a se dissolver em água a, aproximadamente, 180°C (LIMAYEM & RICKE, 2012).

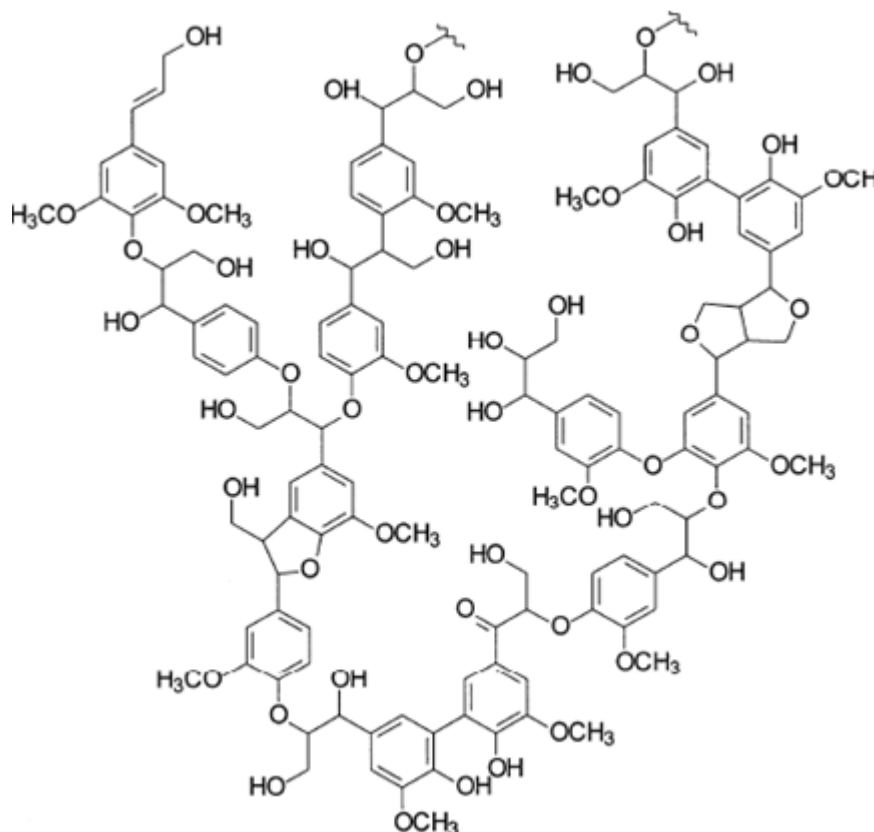


Figura 6. Representação esquemática da lignina. Fonte: (SANTOS, 2011)

As ligninas são divididas em duas classes, ligninas guaiacil e ligninas guaiacil-siringil (lignina das gramíneas), que diferem nos constituintes do esqueleto fenilpropanoide. As ligninas guaiacil apresentam grupo metoxi na posição do carbono-3, enquanto as ligninas guaiacil-siringil apresentam grupo metoxi nas posições do carbono 3 e 5 (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Para a obtenção do etanol de segunda geração, proveniente do material lignocelulósico, é necessário desenvolver quatro procedimentos: primeiro, o pré-tratamento do material para solubilizar a lignina; segundo, a hidrólise dos polissacarídeos, celulose e hemicelulose em açúcares monoméricos; na sequência, a fermentação dos mono e dissacarídeos; e, por fim, a destilação do etanol obtido no processo de fermentação (HU et al., 2008; RABELO, 2010).

Capim

Segundo Schlittler e Pereira Jr. (2008), o capim apresenta em sua estrutura uma composição de celulose, hemicelulose e lignina de 32%, 20% e 9%, respectivamente, e um teor de proteína de 6 a 11% na matéria seca.

O *Panicum maximum*, família Poaceae, é originário da África Ocidental, e foi introduzido no Brasil de forma acidental. Ele veio nos navios negreiros e servia de cama para os escravos. Acabou se espalhando rapidamente, dando origem à primeira cultivar, o Colômbio. Atualmente, está localizado em quase todo o território nacional, exceto nas regiões frias. É uma gramínea que cresce formando touceiras densas com um metro de largura, podendo atingir até 2,5 m de altura, sendo exigente em fertilidade de solo (um índice de saturação por bases mínima de 60%, fósforo acima de 8 mg dm^{-3} e solos ricos em matéria orgânica). Apresenta coloração verde azulada nas folhas. Sua forma mais usual de plantio é por sementes. Floresce a maior parte do ano, sendo considerada uma forrageira de alto potencial de produção de biomassa (NAGANO et al., 2011).

Pré-tratamento

O pré-tratamento, Figura 7, é o primeiro passo para a produção do bioetanol, sendo a etapa mais cara do processo, aproximadamente 33% do custo total. Consiste na ruptura do material recalcitrante da biomassa, causando redução da cristalinidade da celulose, por meio da remoção da hemicelulose e da lignina. O consequente aumento da porosidade da biomassa e a diminuição da formação de subprodutos que inibem a hidrólise possibilitam a bioconversão, levando a um alto teor de bioetanol, via fermentação (VÁSQUEZ et al., 2007; KUMAR et al., 2009; LIMAYEM & RICKE, 2012).

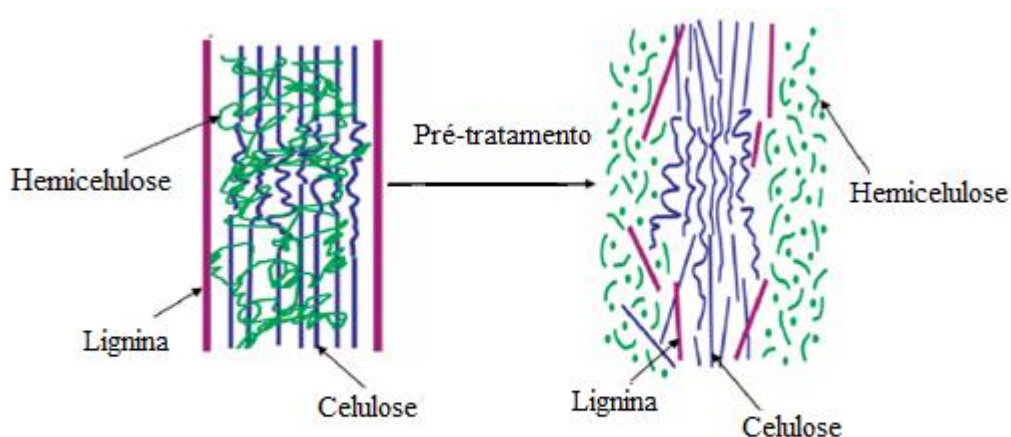


Figura 7. Representação esquemática da ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico. Fonte: Adaptado (KUMAR et al., 2009).

Como a maioria dessas tecnologias de pré-tratamento resulta em rendimentos relativamente baixos de açúcares e altos custos de processamento, faz-se necessário a escolha de condições ótimas do pré-tratamento que afetem diretamente as características do material. Essa etapa é de suma importância para obtenção do rendimento final, pois tem interferência direta na hidrólise e fermentação dos açúcares (Figura 8). Assim, a escolha do pré-tratamento deve ser avaliada com atenção, para que seja a melhor possível. Para isso, há necessidade de se conhecer bem a estrutura do material lignocelulósico em questão (KUMAR et al., 2009; ^aCHEN et al., 2012).

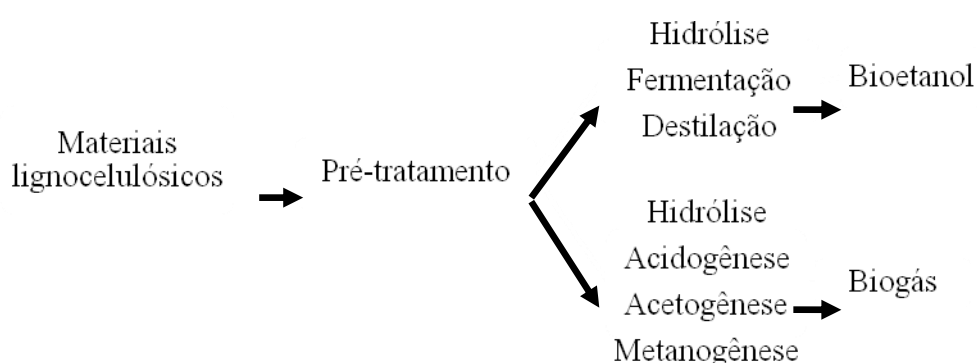


Figura 8. Produção de bioetanol e biogás a partir do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Fonte: Adaptado (BEHERA et al., 2014).

A Figura 9 mostra o efeito do pré-tratamento sobre a biomassa, cujos bioprodutos obtidos por processos sem pré-tratamento prévio resultam em baixa produtividade e rendimento e numa grande quantidade de resíduo final.

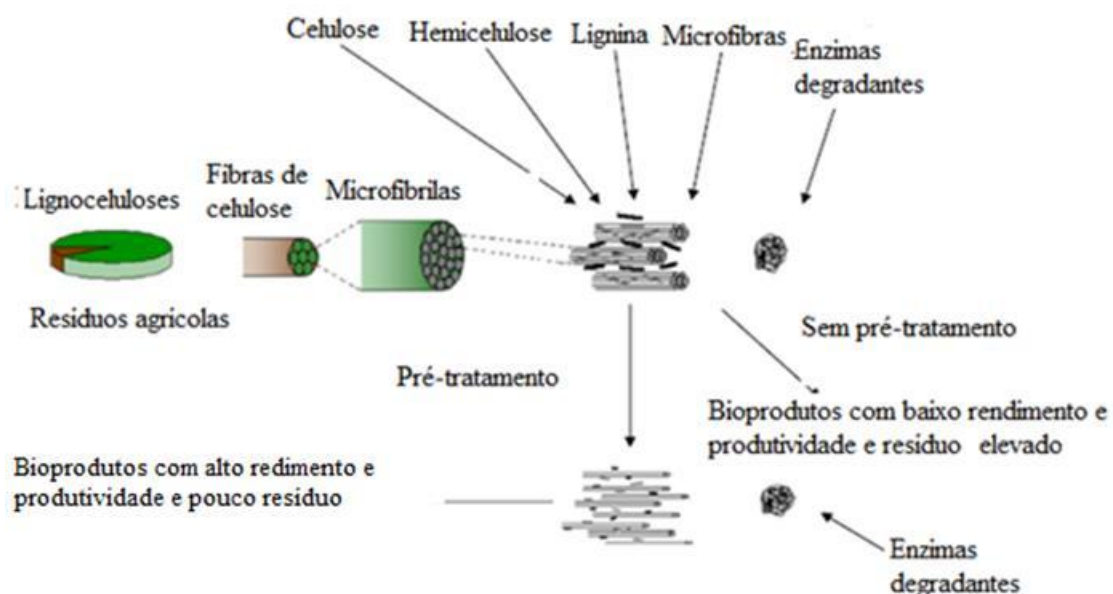


Figura 9. Diagrama esquemático do efeito do processo de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. Fonte: Adaptado (BEHERA et al., 2014).

O pré-tratamento eficaz é fundamental para o sucesso da hidrólise enzimática. Durante o processo de pré-tratamento, há aumento da porosidade do substrato e da acessibilidade da celulose, resultando, por fim, em uma maior digestibilidade das enzimas no processo de hidrólise (BIAN et al., 2014).

Pré-tratamentos químicos

Entre os pré-tratamentos químicos, temos o pré-tratamento por ozonólise, que diminui o teor de lignina, afeta a hemicelulose, não produz resíduos tóxicos, aumentando dessa forma a digestibilidade do material lignocelulósico, além de as reações poderem ser feitas em temperatura ambiente e pressão normal. Porém, em contrapartida, necessita de grandes quantidades de ozônio, resultando, assim, num alto custo (KUMAR et al., 2009).

No pré-tratamento ácido, no qual os ácidos mais utilizados são H_2SO_4 (com concentrações inferiores a 4%) e HCl, a hemicelulose é hidrolisada em xilose, e a estrutura da lignina é alterada, obtendo como resultado uma melhoria na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica. Porém, apresenta como limitações um alto custo, formação de substâncias tóxicas como o furfural a partir de xilose e hidroximetilfurfural (HMF) a partir de glicose, além de compostos fenólicos e ácido acético, e corrosão de equipamentos (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

O pré-tratamento ácido diluído usando H_2SO_4 é o método mais amplamente utilizado, por ser capaz de hidrolisar a hemicelulose em açúcares monoméricos. O pré-tratamento pode ter efeitos diferentes sobre os componentes estruturais de lignocelulose, dependendo do tipo de produto químico utilizado (TALEBNIA et al., 2010, WEI et al., 2012).

As bases frequentemente utilizadas para hidrólise alcalina são hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônio. Quando utilizados como tratamento prévio, causam solubilização, redistribuição e condensação da lignina e remoção da hemicelulose, aumentando a superfície interna da área, reduzindo o impedimento estéreo de enzimas hidrolíticas, causando redução do grau de polimerização, diminuição da cristalinidade e melhorando a digestibilidade dos carboidratos, além de utilizar temperaturas e pressões

mais baixas. Ao comparar esse pré-tratamento com os processos ácidos, são citadas como vantagens a possível recuperação dos sais e uma menor degradação dos açúcares. Porém, exige maior tempo de residência (KUMAR et al., 2009).

Os processos com solventes orgânicos (organossolv) são caracterizados hoje como um tratamento promissor, tendo uma grande utilização em processos de pré-tratamento. É utilizada uma mistura de solvente orgânico ou inorgânico (metanol, etanol, acetona, etileno glicol, trietileno glicol e álcool tetra-hidrofurfurílico) com catalisadores ácidos (ácido sulfúrico, clorídrico, oxálico, acetilsalicílico e ácido salicílico), sendo que essa mistura hidrolisa a hemicelulose e a lignina. Mas é um processo ambiental e economicamente inviável, pela necessidade de o solvente passar por etapas de dreno no reator, evaporação, condensação e reciclagem (KUMAR et al., 2009).

Após os pré-tratamentos, o material lignocelulósico é lavado para remoção da hemicelulose solubilizada. Contudo, até 15% dos açúcares na biomassa podem ser perdidos deste modo (^bPALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Uso de micro-ondas

Por causa da sua alta eficiência e por apresentar uma forma fácil de operação, a radiação micro-ondas tem sido muito utilizada. Está sendo aplicada como pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, com o objetivo de melhorar a hidrólise enzimática, pois nesse aquecimento ocorre a quebra da estrutura do material (ZHU et al., 2006; KASHANINEJAD & TABIL, 2011).

Kumar (2009), relata que o pré-tratamento alcalino associado à radiação micro-ondas resultou em uma forma eficiente de melhorar a digestibilidade de gramíneas.

Para substituir o aquecimento convencional, que se baseia em uma transferência de calor superficial, é utilizada a radiação micro-ondas como alternativa. Ele apresenta várias vantagens quando comparado a outros métodos, ressaltando, entre outras vantagens, ser uma tecnologia de aquecimento capaz de acelerar a reação, provocando alterações mecânicas e térmicas, rompendo a estrutura e podendo ocasionar uma desestruturação do material, tendo se tornado, desta forma, uma tecnologia atraente. Mas o tipo de amostra também está direcionado diretamente ao comportamento do aquecimento (RODRIGUES, 2010; ^aCHEN et al., 2012; CHOUDHARY et al., 2012; JANKER-OBERMEIER et al., 2012).

O pré-tratamento com radiação micro-ondas tem seu efeito maximizado quando combinado com compostos alcalinos (NaOH, Ca(OH)₂ e Na₂CO₃) ou ácidos (H₂SO₄ e HCl), aumentando, assim, sua eficácia e acelerando a velocidade da reação química (ZHU et al., 2006).

Quanto à associação da radiação micro-ondas no pré-tratamento, foi verificado, por Janker-Obermeier et al. (2012), que a solubilização da lignina depende diretamente da entrada de energia micro-ondas, enquanto a carga de NaOH exibe apenas efeitos menores na solubilização da lignina dentro do intervalo de teste.

Kashaninejad e Tabil (2011), citam que a combinação da irradiação de micro-ondas com a diluição da solução alcalina melhora a hidrólise enzimática pela aceleração das reações durante o processo de pré-tratamento, em comparação com o produto químico de aquecimento convencional.

Além dessas vantagens já citadas, o uso da radiação micro-ondas tem como vantagens redução do tempo de aquecimento ou pré-tratamento, com um aquecimento rápido e uniforme, capacidade instantânea de início e parada do aquecimento e tamanho cada vez menor do reator (CHEN et al., 2012).

Hidrólise

Após o pré-tratamento, em que a celulose se torna disponível, a biomassa passa por um processo de hidrólise para converter a celulose em glicose, posteriormente, via fermentação, o açúcar monomérico disponibilizado é metabolizado, pelas leveduras, em etanol, sendo que a levedura mais utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura é muito eficaz para hexoses, mas não apresenta um bom resultado para metabolização de xiloses (EISENHUBER et al., 2013).

O pré-tratamento antes da etapa de hidrólise tem como finalidade minimizar a perda dos açúcares e, conseqüentemente, obter a maior quantidade possível de açúcares liberados, e quando estes açúcares estão disponíveis, eles sofrem hidrólise e fermentação para produção de bioetanol (WEI et al., 2012).

A hidrólise pode ser ácida ou enzimática. A ácida pode ocorrer com a utilização de ácido concentrado, que é o método mais utilizado, pois tem sido considerado o método mais prático. Ele não é seguido por concentrações elevadas de inibidores e produz um elevado rendimento de açúcares, porém necessita de grandes quantidades de ácido, bem como da reciclagem do ácido, sendo um processo dispendioso, menos viável economicamente. A hidrólise com ácido diluído utiliza

normalmente ácido sulfúrico 0,5%, que flui continuamente para a biomassa a uma temperatura elevada de 150-180°C, num curto período de tempo, permitindo uma maior recuperação de açúcar, mas, ao contrário do ácido concentrado, ele segue com a degradação de hexoses e pentoses e consequente formação de elevadas concentrações de compostos tóxicos, incluindo HMF e compostos fenólicos, que são prejudiciais a uma sacarificação eficaz, e se não forem removidos rapidamente, se recondensam em precipitado na biomassa (LIMAYEM & RICKE, 2012).

Os ácidos mais utilizados no processo são H_2SO_4 ou HCl , sendo a hidrólise feita com maior rapidez e facilidade, porém não é seletiva, além de formar produtos secundários e apresentar um rendimento de etanol de apenas 50–60% de valores teóricos (^aPALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000). Na Figura 10, podem ser observadas as reações que ocorrem durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos tratados a uma temperatura elevada sob condições ácidas, percebendo-se a formação e liberação de uma série de compostos inibidores.

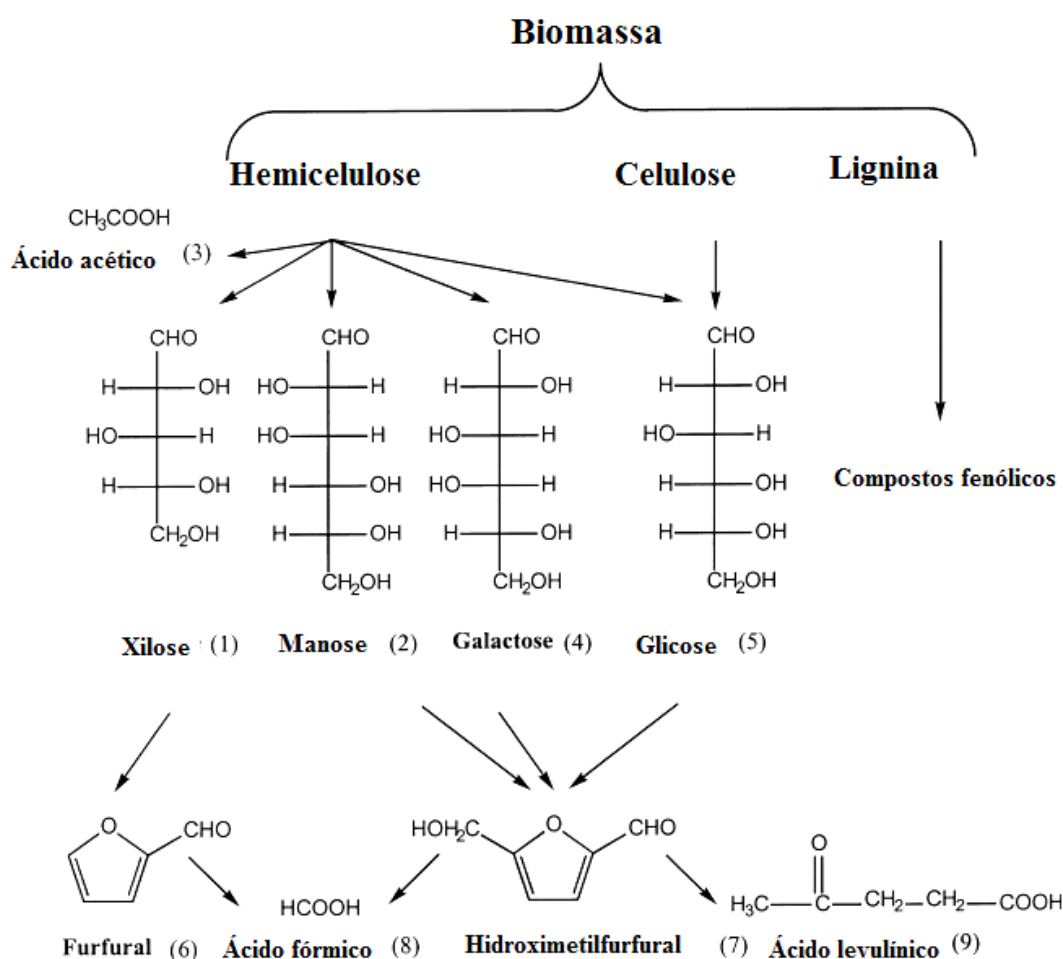


Figura 10. Reações que ocorrem na hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos. Fonte: Adaptado (^bPALMQVIST E HAHN-HÄGERDAL, 2000).

A hidrólise enzimática é feita usando enzimas celulolíticas apropriadas. É o método mais eficaz, pois a partir de materiais celulósicos tem a capacidade de liberar açúcares simples. As celulases são as enzimas que processam a hidrólise da celulose e hemicelulose, convertendo-as em açúcares redutores, que podem posteriormente ser fermentados para obter o etanol, que se objetiva por meio de microrganismos adequados, obtendo altos rendimentos (ZHU et al., 2006; TALEBNIA et al., 2010). As celulases são uma combinação de endo-1,4- β -glucanase, exo-1,4- β -glucanase (celulases) e β -glicosidase, que atuam em sinergia para converter os açúcares complexos presentes na biomassa lignocelulósica em glicose (BORTOLAZZO, 2011).

Nesse processo, as celulases decompõem a celulose a celobiose, que é clivada em glicose por β -glicosidase (Figura 11). Contudo, as celulases e β -glucosidases são inibidas por celobiose e glicose, respectivamente, ou seja, a atividade da enzima pode ser afetada pelos produtos das suas próprias ações e ainda por produtos formados por outras enzimas (VAN DYK & PLETSCHKE, 2012).

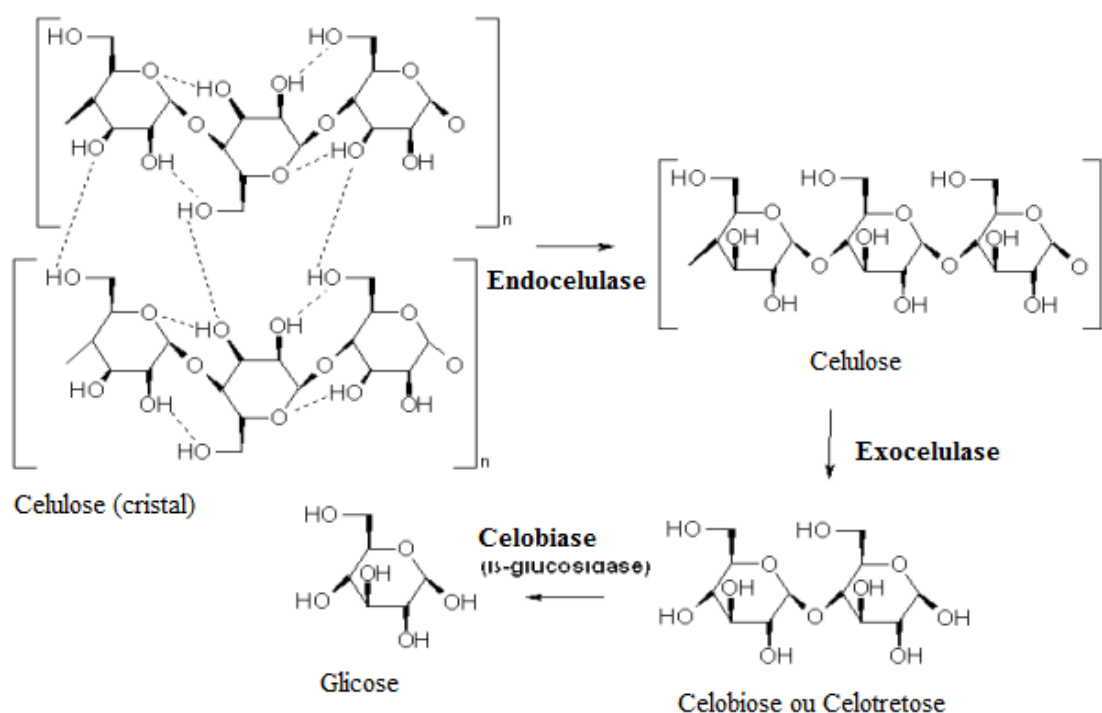


Figura 11. Atuação das enzimas celulases sobre a celulose. Adaptado de (BORTOLAZZO, 2011)

Por serem biodegradáveis o uso das enzimas prioriza a responsabilidade ambiental. Na hidrólise enzimática obtêm-se maiores rendimentos devido ao fato das enzimas celulases catalisarem apenas as reações de hidrólise, e não as reações de degradação do açúcar (^bPALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000).

A hidrólise enzimática do material lignocelulósico é limitada por vários fatores: cristalinidade de celulose, grau de polimerização (DP), teor de umidade, área de superfície disponível, teor de lignina e tamanho dos poros do substrato em relação ao tamanho das enzimas. A remoção de hemicelulose aumenta o tamanho de poro médio do substrato e, por conseguinte, a probabilidade de a celulose ser hidrolisada. A remoção da lignina é um fator essencial, pois essa parte estrutural da planta limita a taxa e a extensão da hidrólise, agindo como um obstáculo de proteção, evitando que os açúcares monoméricos sejam hidrolisados (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

Fermentação

Para otimizar a fermentação, são feitos os processos de pré-tratamento e hidrólise. Dependendo das condições e da matéria-prima utilizada, é necessária, para a fermentação, a presença de microrganismos para fermentar açúcar em álcool, ácido láctico e outros produtos finais formados.

O melhor e mais adequado processo fermentativo a se utilizar deve ser bem escolhido, analisando-se o rendimento de etanol, as propriedades dos microrganismos, o material a ser fermentado, a produtividade, além dos processos econômicos (PALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000; PAVLAK & ABREU-LIMA, 2011).

As leveduras industriais, como a *Saccharomyces cerevisiae*, são utilizadas para produção de álcool, principalmente nas indústrias de cervejaria e vinho, e atualmente, também para produção de biocombustíveis. Uma vez tornado acessível por hidrólise enzimática ou ácida, o material celulósico pré-tratado é convertido em açúcares fermentescíveis. Durante a fermentação, a levedura fermenta açúcares de hexoses em etanol sob condições anaeróbicas e a temperatura controlada, e essa fermentação é sempre acompanhada pela formação de dióxido de carbono (EISENHUBER et al., 2013).

Apesar de suas grandes vantagens de tolerância a inibidores e às condições de estresse, a *S. cerevisiae* não é capaz de fermentar outros açúcares, senão as hexoses. E essa incapacidade de fermentar a xilose, segundo açúcar mais abundante na natureza, limita seu uso na produção de biocombustíveis. As leveduras *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* e *Pichia stipitis* são capazes de fermentar a xilose (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009; KALYANI et al., 2013).

Um problema que ocorre durante a fermentação é que o etanol formado é um inibidor para as leveduras ou bactérias que processam a fermentação, e isto limita a concentração de açúcares fermentescíveis (MOSIER et al., 2005).

Os inibidores formados são outro problema encontrado, entre os quais, podem ser citados o furfural, compostos fenólicos (os de baixo peso molecular são mais inibidores do que aqueles com peso molecular elevado) e outros compostos, que podem inibir ou mesmo parar a fermentação (HENDRIKS & ZEEMAN, 2009).

Esses compostos promovem a perda de integridade das membranas biológicas, e, assim, afetam sua capacidade como barreiras. Para superar o efeito inibidor, o hidrolisado tem que ser desintoxicado ou os microrganismos devem ser adaptados para estes compostos inibitórios, porém a desintoxicação é um processo muito dispendioso (BEHERA et al., 2014).

Um microrganismo de fermentação ótima deve ser tolerante aos inibidores químicos formados durante o pré-tratamento, além de resistir a uma elevada concentração de etanol e ao processo de hidrólise. E para um melhor rendimento de etanol, deveria ser capaz de fermentar tanto hexoses, quanto pentoses, simultaneamente, com formação mínima de produtos tóxicos (LIMAYEM & RICKE, 2012).

Como a glicose e a xilose são os dois açúcares dominantes em hidrolisados lignocelulósicos, há necessidade de fermentar os dois de forma eficaz para que a produção de etanol seja viável. Atualmente, nenhum microrganismo nativo é capaz de converter todos os açúcares em etanol com um alto rendimento (KALYANI et al., 2013).

Inibidores de fermentação

A concentração de ácido, a temperatura e o tempo de hidrólise influenciam a geração de inibidores da fermentação e em consequência da existência desses compostos inibitórios que se formam na hidrólise, como furanos, compostos fenólicos e ácidos fracos, o teor final de etanol sofre uma diminuição. Pelo surgimento de inibidores e de compostos tóxicos já formados antes no processo de pré-tratamento, a fermentação se torna reduzida (^bPALMQVIST & HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Essa formação de inibidores pode ser reduzida otimizando as condições de pré-tratamento do material lignocelulósico e de hidrólise.

A escolha de um microrganismo adaptado é um dos caminhos para melhorar o resultado que se espera da fermentação do hidrolisado. Para fermentação de açúcares

derivados da biomassa lignocelulósica, em geral, tem-se escolhido como levedura a *Saccharomyces cerevisiae*, mantendo-se um pH ótimo entre 5,0 e 5,5. A escolha da levedura em questão se deve à sua capacidade de produzir etanol e a uma elevada tolerância aos inibidores formados nos processos anteriores (BORTOLAZZO, 2011).

Separação / destilação

Após a fermentação, o bioetanol obtido requer separação e purificação, e esse processo pode ser feito por meio de um processo de destilação fracionada, que consiste na separação de dois líquidos que apresentam pontos de ebulição distintos, ou seja, diferentes volatilidades. No caso em questão, o etanol (PE 78,3°C) é separado da água (PE 100 °C) e convertido em vapor (LIMAYEM & RICKE, 2012).

Referências Bibliográficas

ANDRADE, R.P.de. Pasture seed production in Brazil. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001, São Pedro. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2001. p.129-132.

BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.36, p.91–106, 2014.

BIAN, J.; PENG, P.; PENG, F.; XIAO, X.; XU, F.; SUN, R-C. Microwave-assisted acid hydrolysis to produce xylooligosaccharides from sugarcane bagasse hemicelluloses. **Food Chemistry**, v.156, p.7–13, 2014.

BORTOLAZZO, N.G. **Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 76p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

^aCHEN, C.; BOLDOR, D.; AITA, G.; WALKER, M. Ethanol production from sorghum by a microwave-assisted dilute ammonia pretreatment. **Bioresource Technology**, v.110, p.190–197, 2012.

^bCHEN, W-H.; YE, S-C.; SHEEN, H-K. Hydrothermal carbonization of sugarcane bagasse via wet torrefaction in association with microwave heating. **Bioresource Technology**, v.118, p.195–203, 2012.

CHOUDHARY, R.; UMAGILIYAGE, A.L.; LIANG, Y.; SIDDARAMU, T.; HADDOCK, J.; MARKEVICIUS, G. Microwave pretreatment for enzymatic

saccharification of sweet sorghum bagasse. **Biomass and Bioenergy**, v.39, p.218-226, 2012.

EISENHUBER, K.; KRENNHUBER, K.; STEINMÜLLER V.; JÄGER, A. Comparison of Different Pre-treatment Methods for Separating Hemicellulose from Straw During Lignocellulose Bioethanol Production. **Energy Procedia**, v.40, p.172-181, 2013.

FASAHATI, P.; WOO, H.C.; LIU, J.J. Industrial-scale bioethanol production from brown algae: Effects of pretreatment processes on plant economics. **Applied Energy**, v.139, p.175–187, 2015.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.108, p.41–65, 2007.

GARCIA, D. **Estudo da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis*, a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte**. 2012. 153p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Lorena.

GURAGAIN, Y.N.; CONINCK, J.D.; HUSSON, F.; DURAND, A.; RAKSHIT, S.K. Comparison of some new pretreatment methods for second generation bioethanol production from wheat straw and water hyacinth. **Bioresource Technology**, v.102, p.4416-4424, 2011.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.100, p.10-18, 2009.

HU, Z.; WEN, Z. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, p.369-378, 2008.

JANKER-OBERMEIER, I.; SIEBER, V.; FAULSTICH, M.; SCHIEDER, D. Solubilization of hemicellulose and lignin from wheat straw through microwave-assisted alkali treatment. **Industrial Crops and Products**, v.39, p.198-203, 2012.

JARDINE, J.G.; DISPATO, I.; PERES, M.R. Indicações de aspecto tecnológico sobre o bioetanol de matéria-prima amilácea. 2009. 29p. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária (Documentos, 94).

KALYANI, D.; LEE, K.-M.; KIM, T.-S.; LI, J.; DHIMAN, S. S.; KANG, Y. C.; LEE, J.-K. Microbial consortia for saccharification of woody biomass and ethanol fermentation. **Fuel**, v.107, p.815-822, 2013.

- KASHANINEJAD, M.; TABIL, L.G. Effect of microwave–chemical pre-treatment on compression characteristics of biomass grinds. **Biosystems Engineering**, v.108, p.36-45, 2011.
- KOHLHEPP, G. Análise da situação de produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v.24, p.223-253, 2010.
- KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.48, p.3713–3729, 2009.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v.56, p.1-24, 1997.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.38, p.449-467, 2012.
- LIN, L.; YAN, R.; LIU, Y.; JIANG, W. In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. **Bioresource Technology**, v.101, p.8217-8223, 2010.
- MELO, W. C.; SILVA, D. B. DA; PEREIRA JR; N. Produção de etanol a partir de torta de mamona (*Ricinus communis L.*) e avaliação da letalidade da torta hidrolisada para camundongos. **Química Nova**, v.31, p.1104-1106, 2008.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.96, p.673–686, 2005.
- NAGANO, N.R.; ZANET, C.; TIRITAN, C.S.; SANTOS, D.H. Efeito da adubação nitrogenada e altura de corte sobre o capim Tanzânia. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, p.100-112, 2011.
- OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v.33, p.1549-1558, 2010.
- ORTIZ, P.S.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. de. Exergy analysis of pretreatment processes of bioethanol production based on sugarcane bagasse. **Energy**, v.76, p.130-138, 2014.
- ^aPALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v.74, p.17-24, 2000.

^bPALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v.74, p.25-33, 2000.

PASANGULAPATI, V.; RAMACHANDRIYA, K.D.; KUMAR, A.; WILKINS, M.R.; JONES, C.L.; HUHNKE, R.L. Effects of cellulose, hemicellulose and lignin on thermochemical conversion characteristics of the selected biomass. **Bioresource Technology**, v.114, p.663–669, 2012.

PAVLAK, M.C.M.; ABREU-LIMA, T.L.; CARREIRO, S.C. Estudo da fermentação do hidrolisado de batata-doce utilizando diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v.34, p.82-86, 2011.

RABELO, S.C. **Avaliação de otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. 2010. 414p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RODRIGUES, T.H.S. **Estudo do pré-tratamento alcalino em micro-ondas da fibra de caju (*Anacardium occidentale* L.) seguido de hidrólise enzimática para produção de etanol**. 2010. 71p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v.27, p.185–94, 2009.

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

SANTOS, M.F.R.F. **Elaboração da Technology Roadmap para Biorrefinaria de Produtos da Lignina no Brasil**. 2011. 309p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SCHLITTLER, L.A.F.S.; PEREIRA JR., N. Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósicos: pré-tratamento e estratégias de processamento. **Diálogos & Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC**, v.6, p.11-23, 2008.

^aSILVA, N.L.C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 109p. Dissertação (Pós-Graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

^bSILVA, O.G. **Produção de etanol com utilização do bagaço da cana-de-açúcar**. 2010. Trabalho (Conclusão de Curso) - Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, São Paulo.

- SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; BON, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAÚJO, J.A.; TORRES, F.G.A. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, p.4820–4825, 2010.
- 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.
- VAN DYK, J.S.; PLETSCHKE, B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v.30, p.1458-1480, 2012.
- VÁSQUEZ, M.P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA JR. M.B. de; PEREIRA JR., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.12, p.137-140, 2007.
- WEI, W; WU, S.; LIU, L. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated eucalyptus chips for fermentable sugar production. **Bioresource Technology**, v.110, p.302–307, 2012.
- ZHU, S.; WUL, Y.; YU Z.; CHEN, Q.; YU, G.; YU, F.; WANG, C.; JIN, S. Microwave-assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. **Biosystems Engineering**, v.94, p.437–442, 2006.

OBJETIVOS

Geral

- Avaliar a produção de etanol lignocelulósico a partir de capim colonião (*Panicum maximum*), submetido a tratamento químico em condições ácidas, associado com à radiação micro-ondas.

Específicos

- Determinar o teor de celulose, hemicelulose e lignina no capim colonião (*Panicum maximum*) dos materiais pré-tratados;
- Avaliar os efeitos da concentração de ácido sulfúrico, da razão líquido-sólido, do tempo e potência do micro-ondas sobre o material lignocelulósico;
- Avaliar o teor de açúcares fermentescíveis obtidos da hidrólise enzimática do material bruto e do material otimizado;
- Processar a fermentação dos materiais hidrolisados; e
- Avaliar o teor de açúcares após a fermentação.

ARTIGO CIENTÍFICO

(Normas de acordo com a revista Pesquisa Agropecuária Brasileira)

Uso da radiação de micro-ondas no pré-tratamento ácido para incremento da hidrólise enzimática de capim colônia (*Panicum maximum*)

Resumo – Os biocombustíveis de segunda geração estão tomando maior espaço no ramo tecnológico, pois não competem com a produção de alimentos e são relativamente baratos. Porém, a biomassa apresenta uma estrutura complexa, sendo necessário um tratamento. Um pré-tratamento vantajoso é a associação da radiação micro-ondas com ácido, que aumenta a digestibilidade da hemicelulose, favorecendo a liberação de açúcares. Portanto, o objetivo do trabalho foi otimizar o pré-tratamento químico associado à radiação micro-ondas para produção de etanol de segunda geração a partir da *Panicum maximum* cv. Colônia. O pré-tratamento químico foi feito seguindo um planejamento fatorial e um rendimento de aproximadamente 30% a mais de celulose que o material bruto, tendo sido obtido no experimento de concentração de reagente 0,5%, razão líquido-sólido 10:1, tempo de 10 minutos e potência do micro-ondas de 10%. As análises de infravermelho mostraram que o material sofreu algumas alterações. Na hidrólise enzimática, esse material apresentou liberação de 2,39 g L⁻¹ de açúcares redutores totais com 72 horas de hidrólise, representando uma conversão de 28%, um rendimento 70% maior que o do material bruto, comprovando a eficiência do processo. Contudo, são necessários estudos para alcançar resultados ótimos e colocar o capim colônia como fonte para produção de bioetanol.

Termos para indexação: biomassa, *Panicum maximum*, açúcares, biocombustíveis.

Use of microwave radiation in acid pretreatment for enhancing the enzymatic hydrolysis of guinea grass (*Panicum maximum*)

Summary - Second-generation biofuels are occupying more space in the technology sector because it does not compete with food production and are relatively inexpensive. However, biomass has a complicated structure, requiring treatment. A pretreatment is advantageous to the association of the acid with microwave radiation, which increases the digestibility of hemicellulose, favoring the release of sugars. Therefore, the objective was to optimize the chemical pretreatment associated with microwave radiation for production of second generation ethanol derived from *Panicum maximum* cv. Colonião. The chemical pre-treatment was carried out in accordance with a factorial design, with a yield of approximately 30% more cellulose raw material having been obtained in experiment 0.5% reactant concentration, solid-liquid ratio 10:1, while 10 minutes and the microwave power of 10%. The infrared analysis showed that the material has undergone some changes. In enzymatic hydrolysis, this material released 2.39 g L⁻¹ of total reducing sugars with 72 hours of hydrolysis, representing a 28% conversion yield greater than 70% of the crude material, proving the process efficiency. However, studies are needed to achieve optimal results and put the guinea grass as a source for bioethanol production.

Index terms: biomass, *Panicum maximum*, sugars, biofuels.

Introdução

A premissa do esgotamento de combustíveis fósseis como petróleo, carvão, gás natural e emissões de gases causadores do efeito estufa (CO₂) têm aumentado cada vez mais os esforços tecnológicos em busca de um caminho ecológico e sustentável, que satisfaça as exigências energéticas. E a utilização dos combustíveis renováveis é uma opção para um menor impacto ambiental, pois produz energia com menor emissão de poluentes (LIMAYEM & RICKE, 2012; EISENHUBER et al., 2013; FASAHATI et al., 2015).

A produção de etanol de primeira geração baseia-se no uso de plantas como a cana-de-açúcar e o milho, mas surgem argumentos sobre o uso de culturas alimentares para essa produção. Em decorrência deste fato, inicia-se a produção de etanol de 2ª geração, que é obtido de fontes não alimentares, utilizando resíduos agrícolas e florestais, juntamente com materiais herbáceos e resíduos urbanos, contribuindo para sustentabilidade ambiental (LIMAYEM & RICKE, 2012).

Contudo, esse material é recalcitrante em razão de sua composição, cuja estrutura é composta por hemicelulose, celulose e lignina, e este último componente causa um impedimento na realização da hidrólise do material para obtenção do etanol. Nessas circunstâncias, algumas técnicas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de minimizar a quantidade de lignina da biomassa e aumentar a disponibilidade de açúcares fermentescíveis, maximizando, assim, a etapa de hidrólise, que pode ser ácida ou enzimática (KUMAR et al., 2009; RABELO, 2010).

O *Panicum maximum*, cv. Colonião é uma boa alternativa como fonte de material lignocelulósico para produção de etanol de segunda geração, pois é de fácil manuseio, apresenta alta disponibilidade e baixo custo. Segundo Schlittler e Pereira Jr. (2008), o capim apresenta valores médios de 32% de celulose. No mercado de sementes forrageiras, 11 % é movimentado pelo *Panicum maximum*, estando entre as principais forrageiras cultivadas no Brasil. Exigências de fertilidade e manuseio prejudicaram a espécie, porém estima-se que a área já foi ocupada por um valor superior a 6 milhões de hectares, sendo o colonião a principal cultivar (ALMEIDA et al., 2000; ANDRADE, 2001).

O pré-tratamento ácido combinado à radiação micro-ondas é largamente utilizado, pois é capaz de alterar a estrutura da lignina, rompendo as estruturas do material lignocelulósico, propiciando diretamente melhores condições para a hidrólise

enzimática do material, além de que a radiação micro-ondas conciliada ao processo potencializa a digestibilidade da biomassa (BIAN et al., 2014). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de etanol lignocelulósico a partir de capim colônia (*Panicum maximum*), submetido ao tratamento químico em condições ácidas associado à radiação micro-ondas, e o rendimento da hidrólise enzimática.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Química Tecnológica, do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde.

Material lignocelulósico

Porções do material lignocelulósico, capim colônia (*Panicum maximum*), foram obtidas em 2012, junto a produtores da região, lavadas em água corrente para remover quaisquer sujidades e secas em estufa com circulação forçada de ar, a 40 °C, até massa constante. Então, foram trituradas até a obtenção de um pó homogêneo e armazenadas em sacos plásticos, sob refrigeração, até o seu uso. As determinações dos teores de celulose, hemicelulose e lignina foram feitas em triplicata, conforme a metodologia relatada por Li et al. (2004) e Lin et al. (2010), descritas a seguir:

Teor de Extraíveis

Foram pesados 5,0 g do material lignocelulósico (m0) e deixados em extração por 8 h, num extrator Soxhlet, usando cerca de 300 mL de Hexano PA. Após a extração, o material foi seco a 35-40°C e pesado (m1). O teor de extraíveis foi calculado pela Equação 1.

$$\%E = \frac{m1 - m0}{m0} \times 100 \quad (1)$$

Teor de Hemicelulose

Pesou-se 1,0 g do material lignocelulósico (livre de extraíveis) e foram acrescentados 30 mL de solução aquosa de Hidróxido de Sódio (0,5 M). Ferveu-se a mistura por 3,5 h, filtrou-se e lavou-se com água destilada. O resíduo sólido foi seco a 35-40°C e pesado (m2). O teor de hemicelulose foi calculado pela Equação 2.

$$\%HC = \frac{m2 - m1}{m0} \times 100 \quad (2)$$

Teor de Lignina

Do material lignocelulósico (livre de extraíveis), foi pesado 1,0 g (m3) e acrescentados 30 mL de solução aquosa de Ácido Sulfúrico 72%. Após 24 h de repouso, a solução foi diluída com água destilada até o volume de 300 mL e posterior ebulição por 1 h. Filtrou-se e lavou-se o resíduo sólido com água destilada. O resíduo sólido obtido foi seco a 35-40°C e pesado (m4) e calculando o teor de lignina pela Equação 3.

$$\%L = \frac{m4 - m3}{m0} \times 100 \quad (3)$$

Teor de Celulose

A celulose foi determinada pela diferença entre a massa original e os teores de hemicelulose, lignina e extraíveis (Equação 4).

$$\%C = 100 - \%E - \%HC - \%L \quad (4)$$

Pré-tratamento ácido

A influência da associação entre a radiação de micro-ondas e a etapa de pré-tratamento ácido foi investigada através de um planejamento fatorial em dois níveis com um controle, considerando como variáveis a concentração do ácido, a razão líquido/sólido (R.L.S. v/v), o tempo de radiação e a potência da radiação de micro-ondas (Philco, 30 L PMS35N, potência de consumo e nominal de 1400 e 900 W, respectivamente) aplicada conforme o planejamento fatorial apresentado na Tabela 1. Após o tratamento, a mistura foi filtrada e o líquido resultante usado para determinação do teor de açúcares pelo método de DNS, proposto por Miller (1959).

Tabela 1: Planejamento Fatorial indicando a distribuição das quatro variáveis em dois níveis.

Experimento	Concentração (%)	Razão Líquido Sólido (v/v)	Tempo (min)	Potência (%)
1	0,5	10:1	10	10
2	5	10:1	10	10
3	0,5	50:1	10	10
4	5	50:1	10	10
5	0,5	10:1	60	10
6	5	10:1	60	10
7	0,5	50:1	60	10
8	5	50:1	60	10
9	0,5	10:1	10	20
10	5	10:1	10	20
11	0,5	50:1	10	20
12	5	50:1	10	20
13	0,5	10:1	60	20
14	5	10:1	60	20
15	0,5	50:1	60	20
16	5	50:1	60	20

Porções do pó lignocelulósico foram tratadas com Ácido Sulfúrico em concentração de 0,5 e 5% (m/v), razões de 10:1 (v/v) e 50:1 (v/v) entre a solução ácida e o pó lignocelulósico, submetidas a diferentes potências de radiação de micro-ondas (10% e 20%), sob diferentes tempos (10 e 60 minutos, sendo um minuto irradiando e um minuto em descanso). Para a análise dos dados através do planejamento fatorial 2^4 , foi aplicada a análise de variância (ANOVA).

Os resíduos sólidos foram analisados para determinação da sua composição e caracterização morfológica.

Caracterização do material lignocelulósico

Amostra bruta e amostras do material lignocelulósico após cada um dos pré-tratamentos foram retiradas e colocadas em frasco plásticos herméticos e inertes e estocadas em freezer (-5°C), enviadas ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, onde foram caracterizadas por espectro no infravermelho com transformada de Fourier e Microscopia Eletrônica de Varredura, sendo avaliadas assim alterações estruturais.

Cristalinidade da biomassa

A cristalinidade do material lignocelulósico foi determinada por difração de raios-X em um difratômetro da marca SHIMADZU, modelo DRX-6000, em condições normais de

temperatura e pressão atmosférica, com ângulos entre 10 a 50⁰, com uma fonte de cobre com linha em Cu K α 1,54 Å em 40 KV e 30 mA.

Para determinação da cristalinidade do material lignocelulósico, um dos métodos utilizados foi o método de raio-X na biomassa, expresso pelo índice de cristalinidade (CrI), o qual foi determinado pela Equação 5:

$$\%CrI = \left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100 \quad (5)$$

Em que I_{002} é a intensidade de difração da parte cristalina da biomassa (celulose) a uma posição 002, a cerca de $2\theta = 22,5^\circ$; e I_{am} é a intensidade de difração para a porção amorfa (isto é, celulose, hemicelulose e lignina) a cerca de $2\theta = 18,7^\circ$, conforme relatado por Rabelo (2010).

Hidrólise Enzimática:

A hidrólise foi feita em erlernmeyers de 250 mL, tendo sido utilizados 2 g do sólido, obtido após o pré-tratamento químico. Foram adicionadas enzimas celulolíticas em 100 mL de tampão citrato 0,05 M, mantendo-se pH 4 - 5 (4,8 especificamente), a 50 °C, durante 72 h, sob agitação constante de 120 rpm. Em intervalos de 0, 1, 6, 12, 24, 48 e 72 h da hidrólise, foram retiradas alíquotas da parte líquida para quantificação dos açúcares liberados no processo. As análises foram feitas pelo método de DNS, proposto por Miller (1959), que utiliza ácido 3,5-diinitrosalicílico (DNS) para leitura no espectrofotômetro UV-VIS (Bioespectro –SP-220) com absorbância em 540 nm.

Fermentação

Após a etapa da hidrólise enzimática, foi adicionada à solução de hidrólise, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* YPO4, em proporção de 2% (m/v). A fermentação foi mantida a 37 °C durante 48 h. E os açúcares finais foram quantificados de acordo com a metodologia descrita por Miller (1959) e leitura no espectrofotômetro UV-VIS.

Determinação dos Teores de Açúcares Redutores Totais

Com os dados obtidos pela leitura da absorbância da curva padrão de glicose, foi possível traçar um gráfico linear da concentração de glicose (açúcar redutor) em função da absorbância, obtendo assim uma equação que relaciona as duas grandezas.

A equação 6 foi usada para encontrar a massa de glicose liberada na hidrólise enzimática, com $R^2 = 0,9949$.

$$y = 0,1488 x \quad (6)$$

Para a hidrólise enzimática, foi utilizada uma carga enzimática de 20 FPU g^{-1} de celulase e 4% v/v β -glicosidase. A enzima celulase comercial utilizada apresentou uma atividade enzimática igual a 27 FPU g^{-1} .

Resultados e Discussão

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos experimentalmente dos teores de extraíveis de hemicelulose, lignina e celulose do material lignocelulósico pré-tratado com ácido sulfúrico, com água (branco) e também do material não tratado (bruto).

Tabela 2. Resultados apresentados dos valores médios em porcentagem e desvios padrão dos teores de extraíveis, hemicelulose, lignina e celulose.

Experimento	Extraíveis	Hemicelulose	Lignina	Celulose
1	0,3 ± 0,08	26,4 ± 1,35	30,7 ± 0,74	42,5 ± 2,00
2	2,1 ± 0,09	41,8 ± 1,00	32,3 ± 2,91	23,9 ± 2,00
3	1,5 ± 0,37	32,2 ± 1,12	35,5 ± 1,06	30,8 ± 2,55
4	1,8 ± 0,49	30,3 ± 1,34	34,9 ± 1,62	33,0 ± 0,21
5	3,6 ± 0,37	53,3 ± 3,00	39,3 ± 0,29	3,7 ± 2,91
6	4,1 ± 0,04	19,6 ± 0,07	40,6 ± 0,48	35,6 ± 0,60
7	0,7 ± 0,05	49,6 ± 2,20	32,3 ± 0,58	17,4 ± 2,83
8	2,3 ± 0,06	49,4 ± 1,38	33,7 ± 0,20	14,6 ± 1,52
9	0,9 ± 0,33	42,3 ± 0,52	38,7 ± 0,14	18,0 ± 0,32
10	10,5 ± 0,78	21,5 ± 0,16	38,2 ± 1,86	29,8 ± 1,24
11	0,3 ± 0,26	50,1 ± 0,76	33,4 ± 0,09	16,2 ± 1,12
12	2,8 ± 0,03	24,8 ± 1,13	37,3 ± 1,74	35,1 ± 2,90
13	1,8 ± 0,13	49,1 ± 2,57	41,1 ± 2,12	8,1 ± 4,56
14	1,3 ± 0,01	38,7 ± 1,24	38,6 ± 0,03	21,7 ± 1,22
15	2,3 ± 0,18	47,2 ± 2,47	41,8 ± 0,64	8,7 ± 2,93
16	2,3 ± 0,02	44,6 ± 2,23	38,7 ± 0,82	14,3 ± 1,39
Branco	0,8 ± 1,70	32,1 ± 1,70	39,9 ± 1,70	27,2 ± 1,70
Bruto	15,9 ± 3,26	27,7 ± 1,55	23,6 ± 4,35	32,7 ± 2,64

Na análise dos resultados referentes à quantidade de extraíveis no material lignocelulósico, foi possível notar que no material bruto a quantidade de extraíveis foi de 15,9%, Tabela 2, diferente dos valores relatados por Morais et al. (2005) para gramíneas, de, aproximadamente, $26 \pm 5\%$. Os mesmos autores definem extraíveis

como constituintes secundários, pois não são partes estruturais da parede celular da planta, sendo a soma de pequenas quantidades de pigmentos, graxas, óleos essenciais, resinas e taninos e solúveis em solvente orgânicos neutros.

Ao analisar os teores de hemicelulose no material bruto, observa-se um valor de 27,7%, Tabela 2, condizendo com os valores da literatura estudada por Morais et al. (2005), que encontraram $27 \pm 3\%$ de hemicelulose para gramínea.

Em relação aos teores de lignina, percebe-se que o material bruto apresentou 23,6%, Tabela 2, valor bem maior que os valores da literatura consultada. Morais et al. (2005) relatam $11 \pm 3\%$ para gramíneas e Schlittler e Pereira Jr. (2008), 9% para capim. O cultivo da planta, região, temperatura, nutrientes, solo, luz, idade, período de colheita, sazonalidade entre outros, influenciam na estrutura morfogênica e estrutural da espécie, podendo explicar variações nos teores de lignina, hemicelulose e celulose (CÂNDIDO, 2003; CGEE, 2010).

Na Tabela 2, ao analisar os resultados de teor de celulose do material sem tratamento (bruto), percebe-se que o teor também condiz com a literatura consultada, 32,7% de celulose. Segundo Schlittler e Pereira Jr. (2008), o capim apresenta valores médios de 32%. Morais et al. (2005) e Limayem e Ricke (2012) apresentam valores de celulose em gramíneas de $36 \pm 5\%$ e 25 – 40%, respectivamente.

Pela aplicação da análise de variância (ANOVA), foram verificadas significâncias dos efeitos das variáveis em função dos teores de extraíveis, hemicelulose, lignina e celulose determinados (Tabela 3), e valores médios e desvios padrão para cada constituinte da biomassa de *Panicum maximum* em função dos níveis das variáveis (Tabela 4).

Tabela 3. Resultados de ANOVA para as variáveis do planejamento fatorial realizado sobre cada constituinte de *Panicum maximum*.

	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	Sig
Extraíveis				
Concentração	30,811	30,811	339,986	,000*
R. L. S.	13,781	13,781	152,069	,000*
Tempo	,281	,281	3,103	,097
Potência	4,351	4,351	48,014	,000*
Hemicelulose				
Concentração	795,008	795,008	291,178	,000*

R. L. S.	157,975	157,975	57,860	,000*
Tempo	835,383	835,383	305,966	,000*
Potência	29,453	29,453	10,787	,005*
Lignina				
Concentração	,211	,211	,132	,721
R. L. S.	16,820	16,820	10,508	,005*
Tempo	79,380	79,380	49,593	,000*
Potência	100,820	100,820	62,988	,000*
Celulose				
Concentração	604,650	604,650	72,639	,000*
R. L. S.	5,040	5,040	,606	,448
Tempo	1214,013	1214,013	145,844	,000*
Potência	228,445	228,445	27,444	,000*

* significativo ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste F.

Tabela 4. Valores médios e desvios padrão para cada constituinte da biomassa de *Panicum maximum* em função dos níveis das variáveis do planejamento fatorial.

	Extraíveis	Hemicelulose	Lignina	Celulose
Concentração				
0,5%	1,437 ± 0,075	43,775 ± 0,413	36,625±0,316	17,306±0,721
5%	3,400 ± 0,075	33,806 ± 0,413	36,788±0,316	26,000±0,721
R. L. S.				
1:10	3,075 ± 0,075	36,569±0,413	37,431±0,316	22,050±0,721
1:50	1,762 ± 0,075	41,013±0,413	35,981±0,316	21,256±0,721
Tempo				
10	2,512 ± 0,075	33,681±0,413	35,131±0,316	27,813±0,721
60	2,325 ± 0,075	43,900±0,413	38,281±0,316	15,494±0,721
Potência				
10%	2,050 ± 0,075	37,831±0,413	34,931±0,316	24,325±0,721
20%	2,787 ± 0,075	39,750±0,413	38,481±0,316	18,981±0,721

Assim, para os extraíveis, as variáveis concentração, razão líquido-sólido e potência foram significativas ao nível de 5% de confiança, pelo teste F de Fischer, Tabela 3, sendo um efeito positivo a concentração e a potência, apresentando menor teor de extraíveis, com menor concentração e menor potência; e um efeito negativo para a razão L. S. (Tabela 4).

Para a hemicelulose, todas as variáveis foram significativas sobre os teores encontrados, Tabela 3, e apenas a concentração do ácido apresentou efeito negativo (Tabela 4).

Sobre a lignina, apenas a variável concentração não apresentou efeito significativo. As variáveis significativas tempo e potência resultaram em efeito positivo, apresentando menores teores de lignina com menor tempo de radiação aplicada e menor potência do micro-ondas. A razão L. S. apresentou efeito negativo, tendo apresentado menor teor de lignina num maior volume da solução ácida utilizada (Tabelas 3 e 4).

Para a celulose, apenas a razão líquido-sólido não apresentou efeito significativo, Tabela 3, sendo que o tempo e a potência apresentaram efeito negativo com teores menores de celulose, e a concentração apresentou efeito positivo, levando a teores maiores de celulose no material lignocelulósico com menor concentração do ácido (Tabela 4).

Deve-se lembrar então que a análise estatística faz comparação entre os 16 experimentos, mas, ao analisar individualmente os pré-tratamentos realizados, percebe-se que, para haver aumento em um dos componentes, outros sofrem redução, por isso em alguns experimentos houve drástica redução no teor de um dos constituintes.

Portanto, o foco principal do pré-tratamento é o aumento da celulose e a redução da lignina, que foram os componentes mais analisados em função dos resultados obtidos. Quando analisados os materiais pré-tratados, observa-se que o Experimento 1, Tabela 2, apresentou 42,5% de celulose, aumento de aproximadamente 10% quando comparado com o teor de celulose do material bruto, apresentando também maior redução no teor de extraíveis, com apenas 0,3% de gorduras no material, uma pequena remoção de hemicelulose e um aumento no teor de lignina, mas menor aumento, quando comparado com os demais. Esperava-se maior quantidade de açúcar a ser liberada e, conseqüentemente, melhor hidrólise e um bom rendimento de etanol.

Silva (2009) obteve maior quantidade de celulose e lignina da palha de cana pré-tratada com ácido diluído (H_2SO_4 , 1%) a 120°C por 10 minutos quando comparada com o material sem tratamento, justificando esse aumento pela solubilização da hemicelulose do material.

Portanto, o melhor pré-tratamento ácido, ou seja, o que corresponde ao maior teor de celulose e ao menor aumento de lignina, foi o Experimento 1, condições otimizadas de reagente H_2SO_4 0,5%, confirmando resultados encontrados por Kumar (2009), que relatou o pré-tratamento ácido como sendo vantajoso para pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Além do mais, o autor especifica que o ácido sulfúrico com

concentrações inferiores a 4% tem sido interessante, tendo mostrado melhores resultados do que o pré-tratamento com ácido concentrado, alcançando altas taxas de reação e melhorando de forma significativa a hidrólise.

Wei et al. (2012) destacam a vantagem do pré-tratamento com ácido diluído, que é capaz de remover a maior parte da hemicelulose e interromper parcialmente a lignina, aumentando a porosidade do material, deixando a celulose mais acessível às enzimas, melhorando o rendimento dos açúcares disponíveis. Ainda otimiza o melhor pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (0,75%), tempo de residência de 10 minutos numa autoclave, utilizando cavacos de eucalipto para a produção de açúcares fermentescíveis. Entre os pré-tratamentos feitos por estes pesquisadores, estão aqueles com concentração maior de ácido (H_2SO_4 a 1%), tendo verificado que apresentaram quantidades inferiores de celulose, resultando, assim, em menores quantidades de glicose no processo de hidrólise.

Saha et al. (2005), quando se referem ao pré-tratamento com ácido diluído, citam, além da vantagem de solubilizar a hemicelulose, que ele é capaz de converter essa porção em açúcares fermentescíveis, reduzindo ou até mesmo eliminando a necessidade de adicionar hemicelulases no coquetel de enzimas na hidrólise.

Binod et al. (2010), também obtiveram aumento nos teores de lignina e celulose, no material (palha da cana) tratado, quando comparado com os teores dos componentes no material bruto. Os autores justificam o aumento como resultado da solubilização de hemicelulose, tendo percebido também aumentos no teor de lignina proporcionalmente ao aumento da temperatura de pré-tratamento.

Nos trabalhos conduzidos por Zhu et al. (2006), com palha de trigo e palha de arroz, foi verificado que a irradiação de micro-ondas, mesmo que doméstico, é um método de pré-tratamento eficaz para a subsequente hidrólise enzimática e a fermentação do material pré-tratado.

Hu e Wen (2008), fizeram tratamento convencional e com radiação micro-ondas em gramíneas, tendo percebido que a radiação micro-ondas aumenta a superfície de contato, desestruturando a lignocelulose, e também uma melhor hidrólise enzimática no uso do material tratado em micro-ondas.

Portanto, percebe-se que os resultados obtidos confirmam os da literatura estudada.

O Experimento 1, selecionado para realização da hidrólise enzimática, corresponde às seguintes condições de pré-tratamento: concentração de ácido sulfúrico 0,5%, razão líquido/sólido 10:1, radiação micro-ondas de 10 minutos e potência aplicada de 10%.

Cristalinidade dos materiais lignocelulósicos

A Tabela 5 mostra os valores obtidos dos teores de celulose, hemicelulose e lignina do melhor pré-tratamento ácido (Experimento 1), do material bruto e do branco. Desses materiais, foi feita a análise de raio-X para obtenção da cristalinidade, que também consta nesta tabela.

Tabela 5. Teores de hemicelulose, lignina, celulose e cristalinidade do capim colômbio para material bruto, branco e ácido.

	Hemicelulose	Lignina	Celulose	CrI (%)
Bruto	27,7	23,6	32,7	34,0
Branco	32,1	39,9	27,2	51,6
Ácido	26,4	30,7	42,5	50,2

Para o *Panicum maximum*, foi encontrado índice de cristalinidade (CrI) de 34% para o material bruto, 51,6% para o material branco (tratado apenas com água destilada), que apresentou o maior teor de hemicelulose (32,1%) dos três, e 50,2 % de CrI para o material tratado com ácido sulfúrico, Experimento 1, que apresentou maior teor de celulose (42,5%) e menor teor de lignina (30,7%) entre os 16 experimentos.

Os valores de cristalinidade obtidos estão de acordo com a literatura consultada, o que já era esperado. Thompson et al. (1991) relataram que, apesar de a cristalinidade não ter dependência com a temperatura, ela pode ter um aumento em razão do pré-tratamento. Os autores ainda citam que tiveram o índice de cristalinidade aumentado decorrente de pré-tratamento com H₂SO₄ diluído sobre a madeira, material lignocelulósico utilizado no estudo.

Kumar et al. (2009) relatam que o aumento do índice de cristalinidade não está única e necessariamente relacionado à alteração estrutural da celulose, mas aos seus componentes amorfos (lignina e hemicelulose), que, quando removidos, fazem com que as cadeias de celulose fiquem mais compactadas, aumentando, dessa forma, a cristalinidade.

Segundo Mosier et al. (2005), os pré-tratamentos termoquímicos causam perturbações nas ligações de hidrogênio presentes nas cadeias de celulose, podendo alterar sua estrutura cristalina. Porém, mesmo que haja aumento da cristalinidade, devem ser

levadas em consideração as mudanças estruturais que o material sofre, entre as quais, o aumento da porosidade do material, que aumenta o acesso à celulose.

Análise Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises feitas por MEV tiveram por objetivo averiguar possíveis alterações morfológicas superficiais causadas pelo pré-tratamento ácido quando comparado com o material bruto.

As micrografias do material bruto e do pré-tratamento ácido, Experimento 1, estão dispostas na Figura 1.

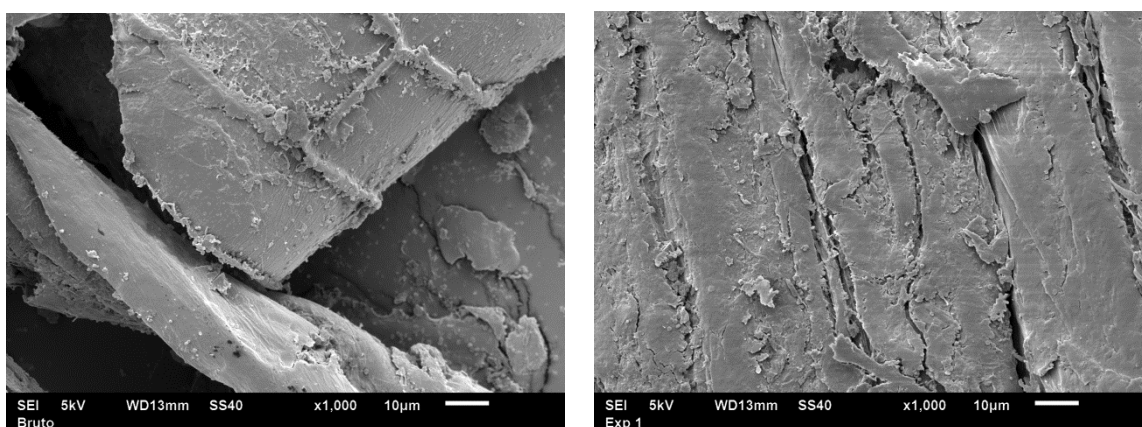


Figura 1. Micrografias obtidas por MEV do material bruto (à esquerda) e pós-tratamento ácido (Exp.1) (à direita), com ampliação x1000.

Na micrografia do material tratado com ácido, é possível observar as alterações estruturais pelo surgimento de fissuras, com provável aparecimento motivado pela dissolução das hemiceluloses e desestruturação do material lignocelulósico. Os pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos extraem lignina e hemicelulose, removendo dessa maneira a região interfibrilar (ABREU, 2011), promovendo aumento da porosidade do material, facilitando sua hidrólise enzimática.

As microfibrilas, unidades constituídas pela hemicelulose e lignina, formam filamentos contínuos no comprimento da fibra, dando rigidez ao material (MARTINS et al., 2004). Portanto, se houver alterações nas fibras, a rigidez do material diminui.

Os resultados observados estão de acordo com a literatura estudada. Silva (2009), por exemplo, destaca as alterações causadas no material pela remoção das células vegetais da palha de cana após ser submetida a um pré-tratamento com ácido diluído.

As micrografias confirmam as análises químicas, percebendo-se uma solubilização dos componentes, o que deixa as fibras mais expostas, aumentando, dessa forma, a área superficial, facilitando o acesso das enzimas para a etapa de hidrólise.

Pela comparação das micrografias dos materiais em estudo, podem ser percebidas mudanças significativas após o pré-tratamento, reforçando, assim, os resultados obtidos.

Infravermelho

As amostras foram analisadas por FT-IR (Infravermelho com Transformada de Fourier), na faixa espectral de 400-4000 cm^{-1} e resolução 4 cm^{-1} . A técnica foi usada objetivando analisar mudanças na estrutura química da biomassa, provocadas pelo tratamento químico. Foram feitas análises no Infravermelho e obtidos espectros de absorção do capim: do material bruto (sem tratamento), buscando facilitar a identificação das bandas, e dos materiais pré-tratados com água (branco) e ácido sulfúrico (Tratamento Ácido, Experimento 1), que podem ser observados na Figura 2.

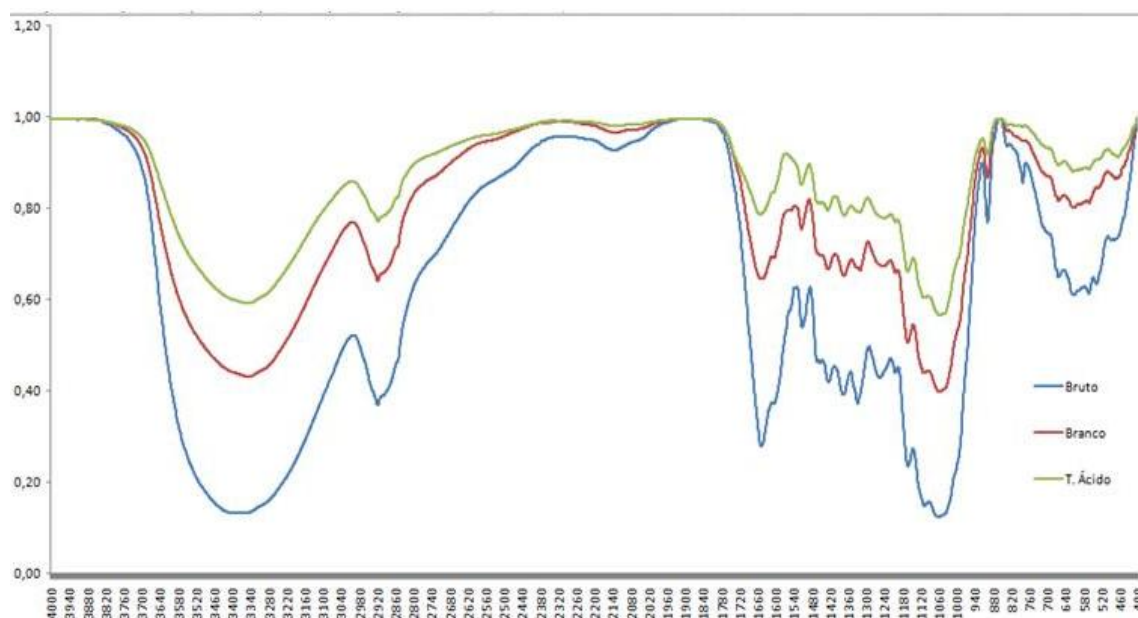


Figura 2. Espectros de absorção do capim colômbio (*Panicum maximum*), obtidos por análises de espectroscopia no Infravermelho.

Com os espectros obtidos, na região do infravermelho foi possível perceber aumento e/ou redução e intensidade de picos relacionados a grupos funcionais característicos, percebendo-se alterações que o pré-tratamento causa na estrutura do material.

O que pode ser observado na análise dos espectros é que, na região de 903 cm^{-1} , banda relacionada à celulose, há uma redução da banda no material tratado com ácido, indicando uma mudança estrutural desta banda (CASTRO, 2003).

Em aproximadamente 1580 cm^{-1} , há um alargamento da banda no espectro do material com pré-tratamento ácido, sendo essa região característica da vibração do esqueleto

aromático com estiramento da carbonila (C=O) da lignina, que pode ser atribuído ao aumento da lignina no material, resultado que condiz com as análises feitas para determinar o teor deste componente na biomassa (aumento de aproximadamente 30 % em relação ao bruto) (OH et al., 2005).

Mas em contrapartida, em 1.330, 834 e 780, os picos desaparecem no tratamento ácido, região também referente à lignina, indicando, desta forma, que o componente pode ter sofrido alterações estruturais. Segundo Abreu e Oertel (1999), os sinais entre 1.320 e 1.330 cm^{-1} referem-se à vibração do anel guaiacil-siringílico com contribuição do estiramento de C=O e de estruturas condensadas.

Em aproximadamente 1.520, há uma diminuição na intensidade da banda. Silva (2009) observou também esse decréscimo nessa região, sendo característica de anéis aromáticos. O autor relaciona essa alteração com a remoção da lignina no material de estudo (palha de cana pré-tratada com ácido diluído). Seguindo o mesmo raciocínio, nesse trabalho, essa alteração pode então estar relacionada com a alteração estrutural do componente, já que ele não foi reduzido no pré-tratamento.

Segundo Oh et al. (2005), todas as bandas sofrem influência das transformações que envolvem as ligações intra e intermoleculares.

Observa-se, com as alterações sofridas pelos grupos funcionais, que foi alcançado o objetivo do pré-tratamento, que foi o de causar modificações morfológicas no material.

A banda em 1430 cm^{-1} é característica de celulose cristalina, em razão dos anéis aromáticos combinados com estiramento e deformação no plano C-H. Com os valores dessa banda no espectro, é possível fazer uma comparação das intensidades de absorção da banda e, assim, poder observar a cristalinidade dos materiais (HUANG et al., 2011). Os resultados observados condizem com os obtidos na análise de Raios-X, sendo observada maior cristalinidade no material tratado com ácido.

Hidrólise e Fermentação

Essa etapa é feita em condições ótimas, com pH 4,8 e temperatura entre 45 e 50 °C. Essas condições, segundo Silva (2009), permitem os maiores rendimentos de álcool, pois são condições ótimas para as enzimas e resultam em baixo custo de utilização e manutenção e ainda possibilitam a fermentação concomitantemente à sacarificação. A absorção da enzima no material depende da acessibilidade dos sítios de ligação à celulose, que, por sua vez, dependem diretamente da sensibilidade da celulose ao ataque enzimático.

Pode-se perceber na análise do gráfico da Figura 3 que, após 24 h de hidrólise, o material pré-tratado com ácido aumenta enormemente a liberação de açúcares até 72 h, passando de 0,84 para 2,39 g L⁻¹, o que representa uma conversão de 28% da celulose total presente no material (42,5%); enquanto o maior rendimento do material bruto apresentou teor de açúcares redutores totais (ART) de 1,07 g L⁻¹, sendo convertido nesse caso 16,5% da celulose do material (32,7%), no mesmo tempo de hidrólise. Pode-se supor que se tivesse havido continuidade da hidrólise, haveria maior liberação de açúcares em se tratando do material que sofreu tratamento prévio com radiação micro-ondas e ácido diluído, e isso provavelmente não aconteceria com o material bruto e branco que, a partir de 24 horas de hidrólise, começa a se estabilizar, passando de 0,96 e 0,68 g L⁻¹, na devida ordem, terminando a hidrólise com 1,07 e 0,74 g L⁻¹, respectivamente.

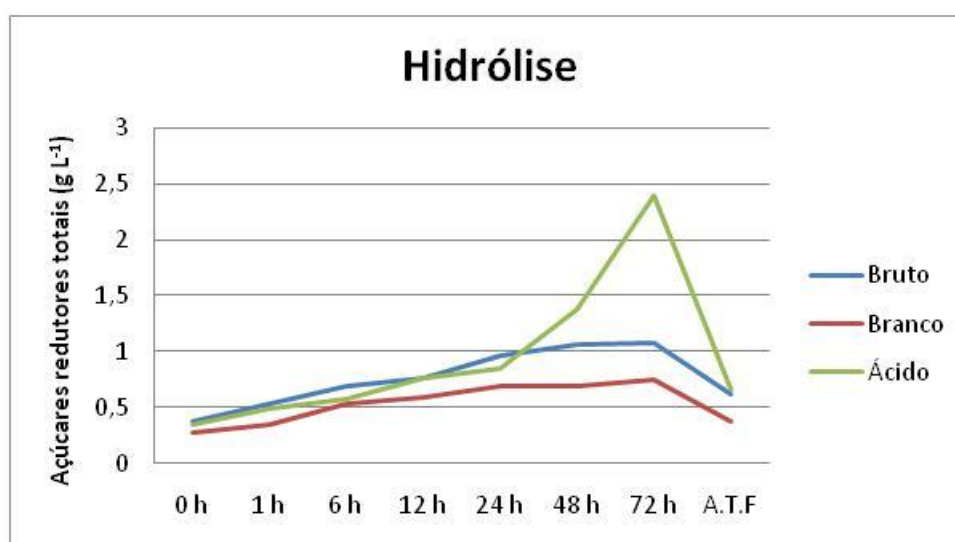


Figura 3. Teores de açúcares redutores totais obtidos após hidrólise enzimática dos materiais em estudo: material bruto, branco e pré-tratado com ácido. A.T.F = após tempo de fermentação.

Portanto, foi percebido no trabalho em questão um melhor rendimento da hidrólise do material que sofreu pré-tratamento ácido associado à radiação micro-ondas, um rendimento da hidrólise de 51% a mais que o material tratado apenas com água (branco) e 70% a mais que o bruto.

Mesmo apresentando um maior rendimento, quando comparado com o bruto, o teor de ART do material pré-tratado pode ser melhorado, pois o teor máximo esperado era de 8,5 g L⁻¹. Talvez esse valor pudesse ser alcançado se todas as enzimas trabalhassem em sinergismo, dessa forma, poderia ser liberado o máximo de açúcares da celulose.

Para realização da hidrólise do estudo em questão, foram usadas apenas as enzimas celulase e β -glicosidade, que atuam somente na celulose e celobiose. Segundo Kalyani et al. (2013), as principais enzimas que precisam estar presentes na hidrólise são celobiohidrolases, endoglucanase, β -glicosidase, endo- β -1,4-xilanase e β -xilosidade. E dependendo da análise do material, ainda são adicionadas enzimas assessoras, como mananase e amiloglucosidade, que podem justificar também o baixo teor de açúcares redutores totais encontrados neste trabalho durante a hidrólise, mais baixo do que o esperado.

Wei et al. (2012), também encontraram na hidrólise enzimática de eucalipto após um pré-tratamento com ácido sulfúrico de 0,75%, a 140°C, durante 10 minutos, rendimentos extremamente baixos de glicose (26% de glicose da matéria-prima), explicando esse resultado pelo elevado teor de lignina do resíduo sólido pré-tratado. A biomassa pode conter uma porcentagem significativa de lignina, sendo um fator importante que limita a hidrólise da biomassa por enzimas celulolíticas e hemicelulases, chegando até inibir diretamente suas atividades (QI et al., 2011).

Uma boa alternativa seria adicionar enzimas como peroxidase de lignina, lacase e peroxidase de manganês para auxiliar na deslignificação e, desta forma, aumentar o rendimento do processo de hidrólise (SCHILLING et al., 2009).

Além da presença da lignina no substrato, Van Dik e Pletschke (2012), citam que os oligossacarídeos, dissacarídeos e monômeros formados durante a hidrólise enzimática podem causar efeito inibidor nas enzimas envolvidas, e quando atingem elevadas concentrações, podem apresentar impacto na eficiência do processo. E de acordo com Kalyani et al. (2013), a inibição de açúcares tem um impacto maior na hidrólise do que os inibidores de pré-tratamento.

Outro fator, segundo Van Dyk e Pletschke (2012), que inibe o processo de hidrólise são os produtos de formação das enzimas, as celulasas e β -glicosidasas, por exemplo, que são inibidas por celobiose e glicose, respectivamente, ou seja, a atividade da enzima pode ser afetada pelos produtos das suas próprias ações e ainda por produtos formados por outras enzimas. Por isso, há necessidade de se entender o comportamento de inibição das enzimas para tomar as medidas necessárias para remover ou evitar os compostos inibidores e, assim, alcançar ótimos rendimentos.

Ao analisar a quantidade de açúcares ao final da fermentação no material tratado com ácido (0,65 g L⁻¹), Figura 3, percebe-se uma fermentação de aproximadamente 72% em álcool, apresentando o maior rendimento dos três materiais. O material tratado apenas

com água apresentou 50% de fermentação, com um teor de ART no final da fermentação de 0,37 g L⁻¹, e a menor conversão foi no material bruto, de apenas 42%, sobrando ainda 0,62 g L⁻¹ de açúcares redutores no fermentado.

Conclusão

O pré-tratamento ácido sulfúrico diluído pode ser aplicado com sucesso para o aumento do teor de celulose do capim colonião e para a hidrólise enzimática, podendo apresentar valores ótimos de hidrólise e fermentação se os inibidores da atividade enzimática, que são formados tanto no pré-tratamento, quanto no próprio processo de hidrólise, forem evitados ou removidos.

Referências

- ABREU, A. L. de. **Modificação química de resíduo lignocelulósico para a preparação de compósito**. 2011. 110p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ABREU, H.S.; OERTEL, A.C. Estudo químico da lignina de *Paullinia rubiginosa*. **Cerne**, v.5, p.52-60, 1999.
- ALMEIDA, A.A.S.; MONTEIRO, F.A.; JANK, L. Avaliação de *Panicum maximum* jacq. para tolerância ao alumínio em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.339-344, 2000.
- ANDRADE, R.P.de. Pasture seed production in Brazil. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 19., 2001, São Pedro. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2001. p.129-132.
- BIAN, J.; PENG, P.; PENG, F.; XIAO, X.; XU, F.; SUN, R-C. Microwave-assisted acid hydrolysis to produce xylooligosaccharides from sugarcane bagasse hemicelluloses. **Food Chemistry**, v.156, p.7-13, 2014.
- BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: an overview. **Bioresource Technology**, v.101, p.4767-4774, 2010.
- CÂNDIDO, M.J.D. **Morfofisiologia e crescimento do dossel e desempenho animal em *Panicum maximum* cv. Mombaça sob lotação rotativa com três períodos de descanso**. 2003. 134p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

- CASTRO, G. R.; **Síntese, caracterização e aplicação de celulose funcionalizada com o ligante p-aminobenzóico em pré-concentração de íons metálicos**. 2003. 57p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (CGEE) - **Química verde no Brasil: 2010-2030 - Edição revista e atualizada**, v.8, p.350, 2010.
- EISENHUBER, K.; KRENNHUBER, K.; STEINMÜLLER V.; JÄGER, A. Comparison of Different Pre-treatment Methods for Separating Hemicellulose from Straw During Lignocellulose Bioethanol Production. **Energy Procedia**, v.40, p.172-181, 2013.
- FASAHATI, P.; WOO, H.C.; LIU, J.J. Industrial-scale bioethanol production from brown algae: Effects of pretreatment processes on plant economics. **Applied Energy**, v.139, p.175–187, 2015.
- HU, Z.; WEN, Z. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, p.369-378, 2008.
- HUANG, H.; YUAN, X.; ZENG, G.; WANG, J.; LI, H.; ZHOU, C.; PEI, X.; YOU, Q.; CHEN, L. Thermochemical liquefaction characteristics of microalgae in sub- and supercritical ethanol. **Fuel Processing Technology**, v.92, p.147-153, 2011.
- KALYANI, D.; LEE, K.-M.; KIM, T.-S.; LI, J.; DHIMAN, S. S.; KANG, Y. C.; LEE, J.-K. Microbial consortia for saccharification of woody biomass and ethanol fermentation. **Fuel**, v.107, p.815-822, 2013.
- KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.48, p.3713–3729, 2009.
- LI, S.; XU, S.; LIU, S.; YANG, C.; LU, Q. Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas. **Fuel Processing Technology**, v.85, p.1201-1211, 2004.
- LIMAYEM, A.; RICKE, S.C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.38, p.449-467, 2012.
- LIN, L.; YAN, R.; LIU, Y.; JIANG, W. In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. **Bioresource Technology**, v.101, p.8217-8223, 2010.

- MARTINS, M.A.; KIYOHARA, P.K.; JOEKES, I. Scanning electron microscopy study of raw and chemically modified sisal fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v.94, p.2333, 2004.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A.; MELO, D.C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa*. **Revista Árvore**, v.29, p.461-470, 2005.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.96, p.673–686, 2005.
- OH, S.Y.; YOO, D.I.; SHIN, Y.; KIM, H.C.; KIM, H.Y.; CHUNG, Y.S.; PARK, W.H. ; YOUK, J.H. Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v.340, p.2376–2391, 2005.
- PENG, H.; LI, H.; LUO, H.; XU, J. A novel combined pretreatment of ball milling and microwave irradiation for enhancing enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. **Bioresource Technology**, v.130, p.81–87, 2013.
- QI, B.; CHEN, X.; SU, Y.; WAN, Y. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Bioresource Technology**, v.102, p.2881–2889, 2011.
- RABELO, S.C. **Avaliação de otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. 2010. 414p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- SAHA, B.C.; ITEN, L.B.; COTTA, M.A.; WU, Y.V. **Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol**. **Process Biochemistry**, v.40, p.3693-3700, 2005.
- SCHILLING, J.S.; TEWALT J.P.; DUNCAN, S.M. Synergy between pretreatment lignocellulose modifications and saccharification efficiency in two brown rot fungal systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.84, p.465–475, 2009.
- SCHLITTLER, L.A.F.S.; PEREIRA JR., N. Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósicos: pré-tratamento e estratégias de processamento. **Diálogos & Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC**, v.6, p.11-23, 2008.

SILVA, V.F.N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico.** 2009. 116p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Lorena.

THOMPSON, D.N.; CHEN, H.-C.; GRETHLEIN, H.E. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. **Bioresource Technology**, v.39, p.155–163, 1992.

VAN DYK, J.S.; PLETSCHKE, B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v.30, p.1458-1480, 2012.

WEI, W; WU, S.; LIU, L. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated eucalyptus chips for fermentable sugar production. **Bioresource Technology**, v.110, p.302–307, 2012.

ZHU, S.; WUL, Y.; YU Z.; CHEN, Q.; YU, G.; YU, F.; WANG, C.; JIN, S. Microwave-assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. **Biosystems Engineering**, v.94, p.437–442, 2006.