

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – *CAMPUS* RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -  
AGRONOMIA

AVALIAÇÃO DE *Brachiaria brizantha* CV. MARANDU  
COMO MATÉRIA-PRIMA PARA A PRODUÇÃO DE  
ETANOL COMBUSTÍVEL AUXILIADO POR TRATAMENTO  
QUÍMICO E MICRO-ONDAS

Autor: Geraldo Pereira de Souza Neto  
Orientador: Prof. Dsc. Carlos Frederico de Souza Castro

Rio Verde - GO  
Fevereiro - 2014

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – *CAMPUS* RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -  
AGRONOMIA

AVALIAÇÃO DE *Brachiaria brizantha* CV. MARANDU  
COMO MATÉRIA-PRIMA PARA A PRODUÇÃO DE  
ETANOL COMBUSTÍVEL AUXILIADO POR TRATAMENTO  
QUÍMICO E MICRO-ONDAS

Autor: Geraldo Pereira de Souza Neto  
Orientador: Prof. Dsc. Carlos Frederico de Souza Castro

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em Ciências Agrárias no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - *Campus* Rio Verde.

Rio Verde - GO  
Fevereiro – 2014

Souza Neto, Geraldo Pereira de  
622.6692

S719a Avaliação de *Brachiaria brizantha* cv. marandu como matéria-prima para a produção de etanol combustível auxiliado por tratamento químico e micro-ondas / Geraldo Pereira de Souza Neto. – 2014  
46 f.: fig., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, 2014.

Bibliografia: 21 – 24; 43 – 46.

Inclui índice de tabelas, figuras e lista de símbolos, siglas, abreviações e unidades.

1. *Brachiaria brizantha* cv. marandu. 2. Biocombustíveis. 3. Biomassa lignocelulósica. 4. Pré-tratamento álcali e micro-ondas. I. Castro, Carlos Frederico de Souza. II. Título.

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
AGRÁRIAS-GRONOMIA**

**AVALIAÇÃO DE BRACHIARIA BRIZANTHA CV.  
MARANDU COMO MATÉRIA-PRIMA PARA A PRODUÇÃO  
DE ETANOL COMBUSTÍVEL AUXILIADO POR  
TRATAMENTO QUÍMICO E MICRO-ONDAS**

Autor: Geraldo Pereira De Souza Neto  
Orientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de  
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em 27 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Takeshi Kamada  
Avaliador externo  
UniRV/Rio Verde

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cibele Silva Minafra  
Avaliadora interna  
IFGoiano/RV

Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro  
Presidente da banca  
IFGoiano/RV

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus que na sua infinita bondade possibilitou que eu pudesse chegar até este momento e o mais importante conhecendo pessoas maravilhosas que me ajudaram muito.

A minha família, meus pais, Geraldo Pereira Filho e Célia Borges Pereira, que foram os responsáveis por me tornar o homem que sou, sempre me ensinando o certo e o errado, e o que é mais importante me mostrando através de exemplos que podemos ser pessoas melhores. É especialmente deles que tiro todo o apoio necessário para travar qualquer batalha. A minha irmã Gerlliana Borges Pereira, que tenho muito amor e apreço. A minha namorada Mallú Emrich Leão, que me auxiliou e incentivou por várias vezes em minhas decisões e que decidiu trilhar seu caminho ao meu lado.

Ao professor Carlos Frederico de Souza Castro, que me acompanhou neste período de trabalho e o mais importante, confiou em todo o trabalho que realizamos juntos, ajudando sempre com a sua orientação tanto na vida profissional quanto na pessoal, uma pessoa que tenho grande admiração e respeito. Meu muitíssimo obrigado!

Ao professor Edson Luiz Souchie pela co-orientação e pelo espaço cedido no Laboratório de Microbiologia Agrícola do Instituto Federal Goiano – *Campus* Rio Verde

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias-Agronomia do Instituto Federal Goiano - *Campus* Rio Verde pela oportunidade de realização de todo o trabalho

A todos que participaram de forma direta ou indireta na execução deste trabalho, muito obrigado!

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Geraldo Pereira de Souza Neto, filho de Geraldo Pereira Filho e Célia Borges Pereira, nasceu em Rio Verde, Estado de Goiás, em 20 de setembro de 1988. Em 2009, recebeu grau de Licenciatura em Química, conferido pela extinta Universidade Católica de Goiás (hoje PUC-GO) na cidade de Goiânia – GO. Em março de 2012, iniciou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias-Agronomia pelo Instituto Federal Goiano-*Campus* Rio Verde – GO.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2. BIOCOMBUSTÍVEIS.....	12
3. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	14
3.1. Composição.....	14
3.1.1. Celulose.....	14
3.1.2 Hemicelulose.....	15
3.1.3. Lignina.....	16
3.1.4. Outras substâncias.....	16
3.2. <i>Braquiaria brizantha</i> cv. Marandu.....	17
4. ETAPAS DE PRODUÇÃO DO ETANOL DE 2ª GERAÇÃO.....	19
5. PRÉ-TRATAMENTO.....	19
5.1 Hidrólise enzimática.....	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
7. OBJETIVOS.....	25
7.1 Objetivo geral.....	25
7.2 Objetivo específico.....	25

USO DE PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO ASSOCIADO COM RADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS SOBRE BRACHIARIA BRIZANTHA CV. MARANDU. ....	26
1. INTRODUÇÃO.....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1. Caracterização do material lignocelulósico.....	30
2.2. Cristalinidade da biomassa.....	31
2.3. Determinação dos Teores de Açúcares Redutores Totais e Atividade Enzimática da Celulase.....	32
2.4. Hidrólise enzimática.....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1. Composição físico-química de <i>Braquiaria Brizantha</i> cv. marandu após o pré-tratamento alcalino.....	33
3.2. Cristalinidade dos materiais lignocelulósicos.....	39
3.3. Determinação dos Teores de Açúcares Redutores Totais e Atividade Enzimática da Celulase.....	40
3.4. Hidrólise enzimática.....	40
4. CONCLUSÃO.....	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> Estrutura da celulose (FENGEL E WEGENER, 1989). .....	14
<b>Figura 2:</b> Derivados do álcool cinâmico (a): álcool trans-p-cumárico (b), álcool trans-coniferílico (c) e álcool-sinapílico (d), são os precursores primários na formação da lignina no processo de polimerização desidrogenativa (FENGEL e WEGENER, 1989). .....	16
<b>Figura 3:</b> Semente e planta <i>Braquiaria brizantha</i> cv. marandu. ....	17
<b>Figura 4:</b> Participações em áreas dos capins coletados em 80 fazendas distribuídas por 250 mil hectares. Fonte: Scot Consultoria, 2013. ....	18
<b>Figura 5:</b> Quebra do material lignocelulósico após auxílio do pré-tratamento (Mosier <i>et al</i> , 2005). ....	20
<b>Figura 1:</b> Espectrometria do material sem tratamento e o material com melhor resultado (E16). ....	38
<b>Figura 2:</b> Difratoograma para a <i>Braquiaria brizantha</i> cv. marandu bruto e com o melhor pré-tratamento.....	39
<b>Figura 3:</b> Teores de Açúcares Redutores Totais ( $\text{g L}^{-1}$ ) produzidos pela hidrólise enzimática de <i>Brachiaria Brizantha</i> . ....	41

## ÍNDICE DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1:</b> Diferença entre celulose e hemicelulose (BIANCHI, 1995) .....	15
<b>Tabela 1:</b> Planejamento fatorial do pré-tratamento químico alcalino associado à radiação de micro-ondas.....	30
<b>Tabela 2:</b> Valores médios e desvio padrão dos resultados obtidos após caracterização do material.....	33
<b>Tabela 3:</b> Valores médios e efeitos principais calculados para os resultados da Tabela 2. ....	37

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

g.....	Gramma
CO <sub>2</sub> .....	Dióxido de Carbono
cv .....	Cultivar
mm .....	Milímetros
cm <sup>-1</sup> .....	Centímetros a menos um
g L <sup>-1</sup> .....	Gramma por litro
m .....	Metro
cm .....	Centímetro
% .....	Porcentagem
CBH .....	Celobiosehidrolases
EG .....	Endo-1,4-β-D-glicanases
BG .....	β-glicosidades
°C .....	Graus Celsius
pH .....	Potencial de hidrogênio
nm .....	Nanômetros
min .....	Minutos
E .....	Experimento
m/v .....	Massa por volume
A .....	Amperes
KV .....	Quilo volt
mA .....	Miliampère
CRI .....	Índice de Cristalinidade
I <sub>002</sub> .....	Cristalinidade da Biomassa
I <sub>amorphous</sub> .....	Parte amorfa da celulose
M .....	Molar
mg mL <sup>-1</sup> .....	Miligramma por mililitros
DNS .....	Ácido dinitrosalicílico
FPU .....	Filter Paper Unit
Rpm .....	Rotações por minuto
W .....	Watts

## RESUMO

A pesquisa por fontes energéticas renováveis ganhou força, pois atualmente crescem os problemas ligados à emissão de CO<sub>2</sub> e também surge a demanda por combustíveis que não agridam o meio ambiente. Neste contexto, surgem os combustíveis renováveis que tornam a grande esperança para a diminuição da dependência do petróleo, dentre os quais se encontra o etanol de segunda geração. A produção atual de etanol utiliza como matérias-primas o amido e açúcares, obtidos do milho, da beterraba e da cana-de-açúcar. Entretanto, o uso da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol - o chamado etanol de 2<sup>a</sup> geração ou bioetanol - se apresenta como alternativa interessante, podendo ser obtido de vários materiais que seriam descartados, tais como o bagaço da cana-de-açúcar, jornais velhos, palha de soja, entre outros. O processamento da lignocelulose consiste em quatro etapas: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e purificação/separação. O pré-tratamento é a etapa inicial e permite alterar a estrutura da biomassa celulósica para permitir que as enzimas possam transformar os carboidratos poliméricos em açúcares fermentáveis, sendo uma das etapas mais onerosas do processo. As etapas de pré-tratamento têm a finalidade de remover a lignina e hemicelulose, aumentar o teor de açúcares fermentáveis, além de serem economicamente viáveis, prevenir ou impedir a formação de compostos inibidores dos processos de hidrólise e fermentação, e minimizar a degradação dos carboidratos. O aquecimento por micro-ondas permite um controle maior sobre a temperatura, além de requerer menor custo energético, por ser um método de aquecimento por acoplamento direto da energia das micro-ondas com as moléculas envolvidas. Assim, o objetivo do trabalho foi verificar a eficiência do pré-tratamento alcalino auxiliado com radiação de micro-ondas, caracterizar o material lignocelulósico, a fim de determinar qual pré-tratamento foi melhor em liberação de celulose e posteriormente fazer a hidrólise enzimática determinando a quantidade de celulose transformada em glicose e qual a quantidade teórica de glicose que poderá ser transformada em etanol.

**PALAVRAS-CHAVES:** Biocombustíveis, Lignocelulósicos, Açúcares

## ABSTRACT

The search for renewable energy sources turned strong because currently there were growing problems related to CO<sub>2</sub> emissions and also arises a demand for fuels that do not harm the environment. In this context raises the renewable fuels that become the great hope for reducing dependence from oil , among it there is the second generation of ethanol . Current production of ethanol uses as raw the starch and sugars from corn, sugar beet and cane sugar. However, the use of lignocellulosic biomass for ethanol production - called ethanol of 2nd generation or bioethanol - presents itself as an interesting alternative, that can be obtained from various materials that would be discarded , such as bagasse from cane sugar , old newspapers , soybean straw , among others . The processing of lignocellulose consists of four steps: pretreatment, hydrolysis, fermentation and purification / separation. The pre- treatment is the initial step and allows to change the structure of the cellulosic biomass to allow the enzymes to transform polymeric carbohydrates into fermentable sugars, being one of the most costly steps in the process. The pretreatment steps intend to remove the lignin and hemicellulose, increase the content of fermentable sugars, as well as being economically feasible prevent or inhibit the formation of inhibitory compounds of hydrolysis and fermentation processes and to minimize the degradation of carbohydrates. Heating by microwave allows greater control over the temperature, in addition to requiring a lower energy cost , as a method of heating by direct coupling of microwave energy with the molecules involved . Thus, the objective was to verify the efficiency of the alkaline pretreatment with microwave radiation , characterize the lignocellulosic material in order to determine which pretreatment was better in release the cellulose and subsequently to enzymatic hydrolysis by determining the amount of cellulose converted to glucose and what is the theoretical amount of glucose to be converted into ethanol.

**KEY WORDS:** Biofuels, Lignocellulosic, Sugars

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Um dos maiores problemas encontrados no mundo moderno é a possível escassez de petróleo em um futuro breve, em que o crescimento populacional alavancou várias crises no mundo em relação ao preço exorbitante dos barris de petróleo. Com a crise do petróleo em meados dos anos 1970 criou-se o Programa Pró-Álcool, quando se pretendia transformar o excesso da produção de açúcar, que, estava em crise e com preços muito baixos, em álcool anidro para a gasolina (24%) e posteriormente o incentivo à produção de motores que usassem o etanol como fonte de combustível (KOHLHEPP, 2010).

Com esta problemática os biocombustíveis surgem como alternativa viável e que pode substituir a dependência do petróleo como fonte de combustível para veículos.

No Brasil a cana-de-açúcar é a cultura que possui maior destaque na produção de etanol combustível, porém competindo com a produção de cana-de-açúcar no país, ficando assim o etanol como segundo plano e os donos de usinas sucroalcooleiras ditam os preços no mercado interno tanto na produção de açúcar quanto na do etanol (KOHLHEPP, 2010).

Com a instabilidade dos preços do petróleo, muitos países decidiram direcionar sua política energética para o uso de biocombustíveis. E com isso há enorme pressão sobre a produção de culturas que podem fornecer bioetanol. No entanto, como a maioria das culturas são de uso alimentar como o açúcar, milho, beterraba, etc., a produção de bioetanol pode gerar conflitos com a produção de alimentos (SOCCOL et al., 2010).

Os materiais lignocelulósicos se apresentam então como fonte viável para a produção de bioetanol, porque não há competição com os alimentos e servem como complemento a quantidade de bioetanol produzida no país, sendo assim chamado de etanol de 2ª geração. Dentre as culturas que podem ser utilizadas como fonte de material lignocelulósico a braquiária surge como alternativa para esta produção de bioetanol, pois se trata de uma cultura de fácil manuseio, possui uma quantidade de material

lignocelulósico relativamente elevado e principalmente não compete com a produção de alimentos, podendo ser plantado na entre safra da cana-de-açúcar.

Em geral, o processo biológico de conversão de biomassa lignocelulósica em etanol envolve: (1) pré-tratamento, que se faz necessário para remover a lignina e hemicelulose e com isso disponibilizar celulose, (2) a despolimerização de polímeros de carbono hidratado auxiliado por um complexo de enzimas de celulase para liberação de açúcares livres, (3) o processo fermentativo de açúcares hexoses e/ou pentoses para produzir etanol, (4) destilação do etanol (CANILHA et al., 2012; JING, ZHANG & BAO, 2009).

Neste trabalho foi utilizado o pré-tratamento alcalino, o pré-tratamento ácido, que é conhecido por separar pentoses e hexoses; enquanto o pré-tratamento alcalino é conhecido por separar a lignina da biomassa lignocelulósica (BINOD et al., 2012), em associação com a radiação do micro-ondas para que possa maximizar a celulose disponibilizada no meio e assim obter o etanol de 2ª geração com o melhor aproveitamento do material lignocelulósico.

## **2. BIOCOMBUSTÍVEIS**

Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) o conceito de biocombustíveis são todos aqueles que derivam de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia. Os dois principais biocombustíveis líquidos que são utilizados no Brasil são o etanol extraído de cana-de-açúcar e, em escala crescente, o biodiesel, que é produzido a partir de gorduras animais ou de óleos vegetais e que é adicionado ao diesel de petróleo em proporções que podem variar (ANP, 2012).

E ainda segundo a ANP, cerca de 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos no Brasil já são renováveis. No resto do mundo, 86% da energia vêm de fontes energéticas não renováveis (ANP, 2012).

O Brasil tem mostrado experiência de décadas na produção do biocombustível etanol extraído da cana-de-açúcar. Logo após a primeira crise do preço do petróleo em meados 1973/1974, foi introduzido no Brasil, em 1975, o Programa Pró-Álcool que visava a diminuição da dependência das importações do petróleo (anos 1970: demanda de importação de petróleo era maior que 80%; até 47% do valor da importação total do Brasil). Desde o ano de 2006, o Brasil se tornou autossuficiente no abastecimento de

petróleo, significando que a nova perspectiva para a ampliação da produção de biocombustíveis é atribuída as várias discussões internacionais em cerca da mudança do clima e com isso às tentativas do aumento da produção de energias renováveis com relação direta com a diminuição de emissão de CO<sub>2</sub>, visando a enorme subida do preço da energia fóssil – o petróleo. O Brasil se enquadra por ter condições naturais extremamente favoráveis para a produção de biocombustíveis, potencial que certamente será de grande proveito para firmar seu lugar como futuro líder do etanol no mercado internacional (KOHLHEPP, 2010).

O potencial do Brasil em relação ao biocombustível acaba por fortificar a sua posição como potência regional com influência global e garante a sua pretensão de líder político na América Latina. Com os recentes desenvolvimentos no setor de biocombustíveis mostraram que o Brasil passa por um processo abrangente de transformação, conduzindo não somente a enormes consequências econômicas, mas também na política interna levando a mudanças sociais, socioculturais e ecológicas (KOHLHEPP, 2010).

Os crescentes problemas oriundos da emissão de CO<sub>2</sub>, aliados a preocupação com o futuro da disponibilidade de energia no planeta, conduziram a maior interesse na pesquisa por fontes energéticas renováveis. A biomassa é a única fonte de energia renovável, a qual pode oferecer alternativa viável para combustíveis como diesel e etanol, a curto prazo (ALVIRA et al., 2010).

A produção atual de etanol utiliza como matérias-primas o amido e açúcares, obtidos do milho, da beterraba e da cana-de-açúcar. Entretanto, o uso da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol - o chamado etanol de 2<sup>a</sup> geração ou bioetanol se apresenta como alternativa interessante, já que não compete com a produção de alimentos e é relativamente mais barato. Estima-se que a produção mundial anual de lignocelulose atinja cerca de  $1 \times 10^{10}$  milhões de toneladas (ALVIRA et al., 2010).

Segundo o relatório Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar, da Companhia Nacional de Abastecimento, de agosto de 2011, o estado do Goiás aparece em terceiro lugar em área plantada, com cerca de 672 mil hectares, além de apresentar também a terceira maior expansão no período (cerca de 123 mil hectares). Isto indica a produção estimada de 32 milhões de toneladas de etanol para safra 2011/2012, no estado do Goiás (CONAB, 2011).

### **3. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO**

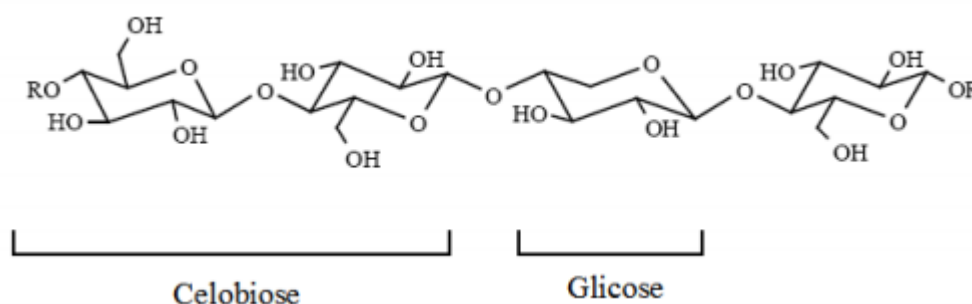
#### **3.1 Composição**



No geral, toda biomassa lignocelulósica é composta por cadeias de celulose (ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas) unidas por ligações de hidrogênio. Essas longas cadeias de polissacarídeos (fibras celulósicas) são, por sua vez, recobertas por hemiceluloses (polissacarídeos ramificados no qual são formados principalmente por D-xilose e pequenas parcelas de D-glicose, L-arabinose, D-manose, D-galactose, ácido glucurônico e ácido manurônico) e ligninas (redes compostas por polímeros tridimensionais formadas por unidades de fenilpropano interligadas). Especialmente, a lignina forma uma barreira impermeável que impede a ação das enzimas, bem como ataques microbianos e oxidativos (WYMAN et al., 2005).

### 3.1.1 Celulose

A celulose é o principal constituinte nos materiais lignocelulósicos, na qual é formada por anéis de  $\beta$ -D-glicopirranose que são ligadas entre si por ligações do tipo  $\beta$ -D-(1,4) glicosídicas, de fórmula ( $C_6H_{10}O_5$ ), é um polímero natural sendo um homopolissacarídeo linear em que a celobiose é a unidade repetitiva conforme mostra a Figura 1.



**Figura 1:** Estrutura da celulose (FENGEL E WEGENER, 1989)

Dentro das microfibrilas existem duas regiões cristalina e amorfa. A região cristalina apresenta elevada ordem, enquanto as regiões amorfas são menos organizadas. As duas regiões se apresentam em proporções características em celulose de diferentes materiais, em que o ataque enzimático pode ser preferencial para uma das estruturas (GAMA, 1996). Na região cristalina, encontra-se uma fibra com maior resistência a tração, ao alongamento e a solvatação; já na região amorfa, a fibra apresenta maior flexibilidade (FENGEL & WEGENER, 1989).

Conforme O'Sullivan (1997), todo material amorfo é definido como o material que é disforme ou aquele material que não possui forma definitiva, entretanto, a celulose amorfa provavelmente ainda pode ter algum grau de ordem.

Apesar de toda a simplicidade química, existe uma gama de formas muito complexas da celulose, devido, principalmente sua origem e os processamentos tecnológicos subsequentes aos quais a biomassa celulósica foi submetida. A descrição destes substratos inclui propriedades como o tamanho, a porosidade, a forma, a área superficial, a associação com os compostos não celulósicos, a conformação molecular e cristalinidade, sendo eles todos muito importantes para o processo de hidrólise (BEGUIN & AUBERT, 1994).

### 3.1.2. Hemicelulose

As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas mas principalmente nas camadas primárias e secundárias que estão intimamente associadas a celulose e lignina (RABELO, 2010).

A xilana é o principal polissacarídeo das hemiceluloses, que são heteropolissacarídeos ligados por  $\beta$ -1,4 de resíduos de D-xilanopiranosil com ramificações arabinosil e/ou acetil, dependendo do material em que é encontrado. No caso de algumas madeiras, como o *Eucalipto* e bétula, as xilanas chegam a corresponder de 20 a 35% do peso seco da biomassa e o grupo substituinte é o O-acetil-4-O-metilglucuranoxilana, em madeiras moles como o *Pinos*, vários cereais e gramíneas é o arabino-4-O-metilglucuranoxilana, que irá corresponder a cerca de 8% de biomassa seca (HALTRICH et al., 1996; WONG et al., 1988).

As hemiceluloses se diferem da celulose principalmente por sua constituição em diferentes unidades de açúcares, formando cadeias bastante ramificadas e curtas (RABELO, 2010). A Tabela 1 apresenta algumas diferenças entre hemicelulose e celulose.

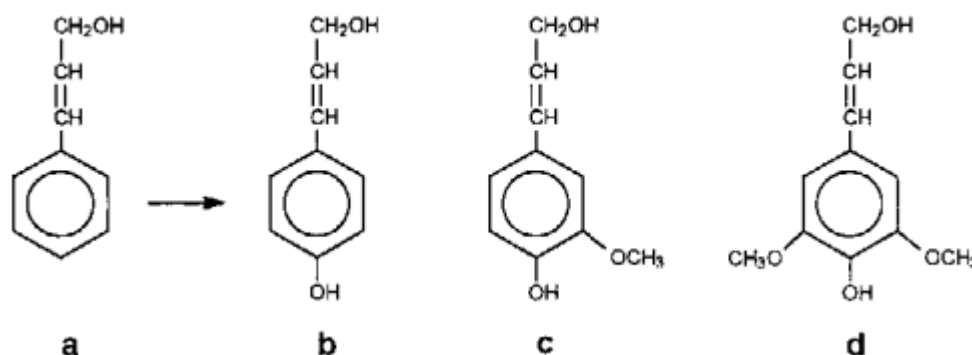
<b>Celulose</b>	<b>Hemicelulose</b>
Possui unidades de glicose ligadas entre si.	Unidades variadas de açúcares.
Grau de polimerização elevado	Grau de polimerização baixo
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Forma regiões amorfas e cristalinas	Formam apenas regiões amorfas
É insolúvel em álcali	É solúvel em álcali

**Tabela 1:** Diferença entre celulose e hemicelulose (Bianchi, 1995).

### 3.1.3. Lignina

A lignina é a substância polimérica mais abundante nas plantas depois da celulose e cabe a ela conferir rigidez à parede das células. Na madeira, por exemplo, age como agente de ligação permanente as células, gerando assim uma estrutura com alta resistência a impacto, compressão e dobra. Além de tudo isso, ela também está diretamente ligada ao transporte interno de água, nutrientes e metabólitos (BRITOW & KOLSETH, 1986).

Durante o crescimento do vegetal, a lignina é incorporada, sendo composta basicamente de unidades de fenilpropano que formam uma molécula tridimensional e amorfa. Os monômeros que formam a lignina são chamados de álcoois cumarílicos, que são diferenciados entre si pelas substituições que apresentam no anel aromático (RABELO, 2010). A Figura 2 mostra os precursores primários para a formação da lignina.



**Figura 2:** Derivados do álcool cinâmico (a): álcool trans-p-cumárico (b), álcool trans-coniferílico (c) e álcool-sinapílico (d), são os precursores primários na formação da lignina no processo de polimerização desidrogenativa (FENGEL e WEGENER, 1989).

### 3.1.4 Outras Substâncias

Existem várias outras substâncias que não são parte da parede celular e estão presentes na biomassa lignocelulósica, sendo solúveis em solventes neutros. Cerca de 4-10% do peso seco da madeira compreendem compostos solúveis em solventes neutros ou frações de extraíveis, incluindo grande variedade de terpenos, que são polímeros de isopreno; as resinas, na qual se encaixam vários compostos não voláteis como óleos, ácidos graxos, álcoois, resinas ácidas, fitosterol, dentre outros; e os fenóis, que por sua maioria são representados pelos taninos (RABELO, 2010). Dentro desta fração

podemos encontrar também alguns carboidratos de baixo peso molecular, alcaloides e lignina solúvel (KLINKE et al., 2004)

### 3.2. *Brachiaria brizantha* cv marandu

Pertencente à família *Poaceae* e gênero *Brachiaria*, e tida como espécie denominada de *brizantha* e cultivar chamada de marandu, e com nomes populares como braquiarão e brizantão, a *Brachiaria brizantha* (Host ex A.Rich.) STAPF. cv. Marandu (CIAT 6294 – IRI 822 – BRA 000591) foi originalmente encontrada em uma região vulcânica da África, em que os solos apresentam bons níveis de fertilidade, com 700mm anuais de precipitação pluviométrica e aproximadamente 8 meses de seca (RAYMAN, 1983). Na figura 3, encontra-se o capim e a semente de *Brachiaria brizantha* cv. marandu.

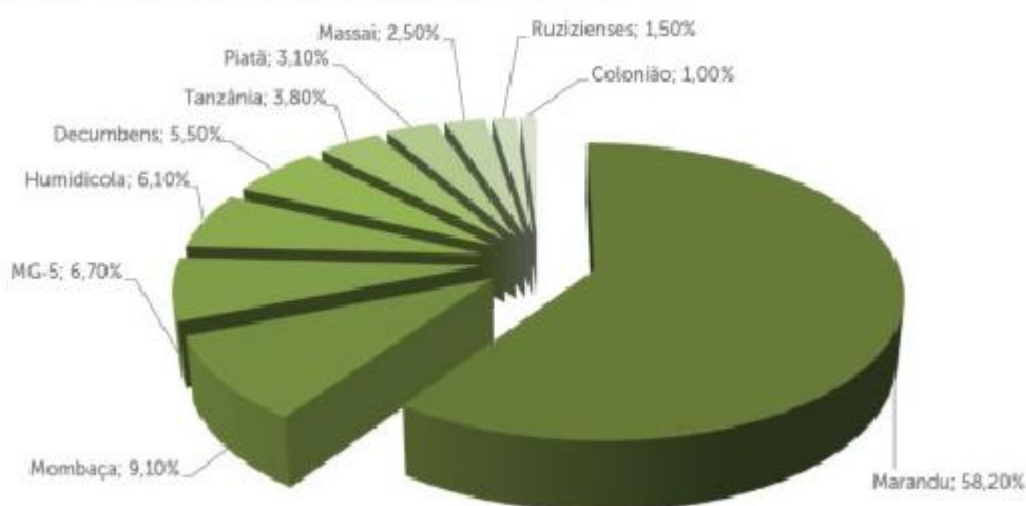


**Figura 3:** Semente e planta *Braquiaria brizantha* cv. marandu.

Planta cespitosa, muito robusta, com alturas entre 1,5 a 2,5 m, possuindo colmos iniciais prostrados, mas produzindo afilhos predominantemente eretos. Seus rizomas são muito curtos e encurvados. Colmos floríferos eretos, frequentemente com afilhamento nos nós superiores, que subsequentemente leva à proliferação de inflorescência, especialmente quando submetidos a corte ou pastejo, bainhas pilosas e com cílios nas margens, geralmente mais longas que os entre-nós, escondendo assim os nós, que confere assim a impressão de haver densa pilosidade nos colmos vegetativos. Inflorescências de até 40 cm de comprimento, encontrando normalmente com 4 a 6 racemos, bastante equidistantes ao longo do eixo, que medem de 7 a 10 cm de comprimento, mas que podem chegar a 20 cm nas plantas que possuem maior vigor. Espiguetas unisseriadas ao longo da raque, oblongas a elíptico-oblongas, possuindo de 5

a 5,5 mm de comprimento por 2 a 2,5 mm de largura, esparsamente pilosas no ápice (VALLS & SENDULSKY, 1984).

Em pesquisa realizada pela Scot Consultoria que visitou 80 fazendas de pecuária com alta e média tecnologia que se encontravam na região Sudeste e Centro-Oeste, totalizando aproximadamente 250,0 mil hectares, foi constatado que 58,2% dos pastos estão ocupados com *Brachiaria brizantha* cv. Marandu conforme disposta na Figura 4.



**Figura 4:** Participação em áreas dos capins coletados em 80 fazendas distribuídas por 250 mil hectares. Fonte: Scot Consultoria, 2013.

São gramíneas consideradas perenes, com grande produtividade, resistentes ao estresse hídrico, podem se desenvolver em condições de sombreamento, com boa tolerância a temperaturas baixas, porém apresentam intolerância a solos com déficit de drenagem e necessidade de fertilidade para o seu desenvolvimento (BOGDAN, 1977).

Após avaliar alguns capins do gênero *Panicum*, Coan et al. (2001) encontrou teores de hemicelulose de 29,7% presentes no capim mombaça e 29,5% no capim tanzânia, já para os teores de lignina encontrados foram de 7,4% e 7,8%, respectivamente, para o capim mombaça e tanzânia. Para os teores de celulose foram encontrados 35,3% para o capim mombaça e 35,9% para o capim tanzânia, mostrando pequena diferença existente entre os teores de hemicelulose, lignina e celulose nas gramíneas estudadas.

#### **4. ETAPAS DE PRODUÇÃO DO ETANOL DE 2ª GERAÇÃO**

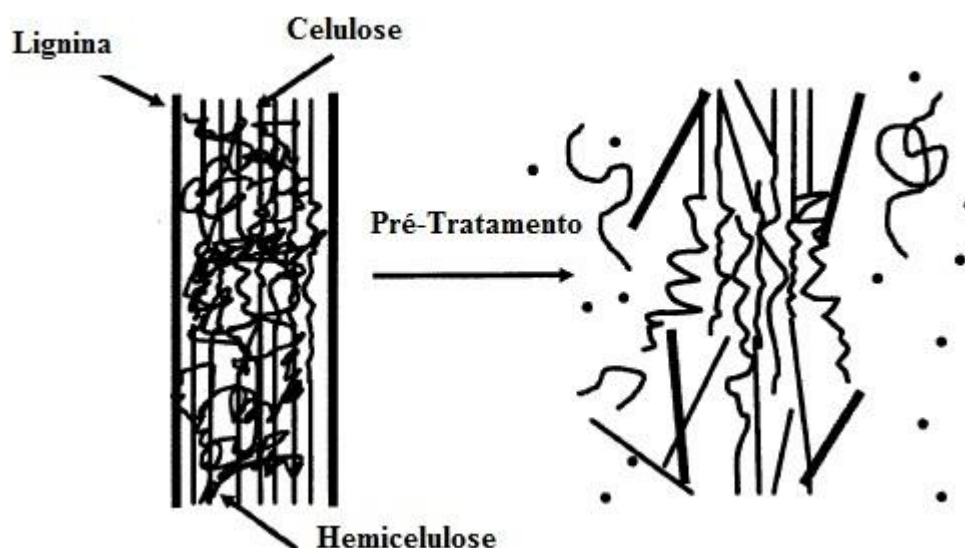
Devido à complexa associação de lignina com as hemiceluloses e a celulose presentes no material lignocelulósico, o isolamento da lignina a partir desta biomassa lignocelulósica é um trabalho bastante desafiador. Muitas abordagens foram feitas, incluindo a extração alcalina, o fracionamento com solventes orgânicos, hidrólise a partir da explosão de vapor e até o uso de enzimas têm sido aplicados para isolar as ligninas dos materiais lignocelulósicos tanto em escala laboratorial quanto para escalas industriais (KUMAR et al., 2009).

O processamento da lignocelulose consiste em quatro etapas: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e purificação/separação. O pré-tratamento é a etapa inicial e permite alterar a estrutura da biomassa celulósica para permitir que as enzimas possam transformar os carboidratos poliméricos em açúcares fermentáveis, sendo uma das etapas mais onerosas do processo (MOSIER et al., 2005).

#### **5. PRÉ-TRATAMENTO**

As etapas de pré-tratamento têm a finalidade de remover a lignina e hemicelulose, aumentar o teor de açúcares fermentáveis, além de serem economicamente viáveis, prevenir ou impedir a formação de compostos inibidores dos processos de hidrólise e fermentação, e minimizar a degradação dos carboidratos. Em geral, os pré-tratamentos utilizam aquecimento direto como maneira para aumentar o rendimento do processo e diminuir o seu tempo de duração. Contudo, o aquecimento direto é relativamente lento e ineficiente, pois depende da condutividade térmica dos materiais envolvidos. O aquecimento por micro-ondas permite maior controle sobre a temperatura e economia de energia, por ser um método de aquecimento por acoplamento direto da energia das micro-ondas com as moléculas envolvidas (XUE et al., 2012).

O pré-tratamento é uma das ferramentas importante para a prática de processos de conversão de celulose dos materiais lignocelulósicos. Sendo necessário para modificar a estrutura da biomassa celulósica tornando a celulose mais acessível para que as enzimas convertam os polímeros de carbono em açúcares fermentáveis tal como representado no diagrama esquemático da fig. 5 (MOSIER et al., 2005).



**Figura 5:** Quebra do material lignocelulósico após auxílio do pré-tratamento (MOSIER *et al.*, 2005)

### 5.1 Hidrólise enzimática e Fermentação

No Geral, as enzimas celulolíticas pertencem as O-Glicosil hidrolases, um grupo difundido de enzimas que são responsáveis pela hidrólise das ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos, ou entre um carboidrato e um não carboidrato. Geralmente as celulases são classificadas em duas classes: celobiohidrolases (CBH), que são chamadas também de *exo*-1,4- $\beta$ -D-glicanases, e *endo*-1,4- $\beta$ -D-glicanases (EG), baseado em suas especificidades em relação ao substrato, ou seja, pela afinidade para as extremidades ou interior das cadeias de glicose, respectivamente. Porém há uma terceira classe de enzimas que trabalham juntamente com CBH e EG, que são as  $\beta$ -glicosidases (BG). Estas enzimas não são referidas como celulases “reais” já que seu papel é hidrolisar as ligações glicosídicas de oligossacarídeos solúveis ou celobiose, não atuando na celulose propriamente dita (RABELO, 2010).

Normalmente, as hidrólises enzimáticas permitem um rendimento de produção de açúcares em torno de 20%. Entretanto, usadas em conjunto com etapas de pré-tratamentos, tais rendimentos podem atingir até cerca de 90% dos açúcares disponíveis (OGEDA & PETRI, 2010).

Em relação à hidrólise, os meios utilizados são ácidos ou enzimas. Os processos ácidos se mostram eficientes e relativamente baratos, porém acabam por gerar grandes quantidades de inibidores de fermentação, devido a parte que acaba por ser degradada da glicose, hemicelulose e lignina, diminuindo a quantidade de álcool produzido no final do processo fermentativo. Por este motivo, a sacarificação enzimática tem sido um dos grandes objetivos de vários estudos no mundo todo, uma vez que proporciona elevado rendimento, é realizado a pressão ambiente e temperaturas moderadas (45-60°C), e não forma subprodutos que poderão inibir o processo fermentativo (LEATHERS, 2003; RILEY, 2002; SZCZODRAK & FIEDUREK, 1996; WYNAM, 1999).

Segundo Eklund et al. (1990), para o processo de hidrólise enzimática ser eficiente, primeiramente a biomassa lignocelulósica deve ser pré-tratada para facilitar a acessibilidade das enzimas. Durante o pré-tratamento, a hemicelulose pode ser hidrolisada separadamente da celulose, pois possuem estruturas diferentes. Para a hidrólise da celulose se deve utilizar as enzimas celulasas, que por ser um mecanismo mais suave produz uma quantidade menor de subprodutos, resultando em um alto rendimento de açúcares fermentáveis.

A celulose pode ser hidroliticamente quebrada em glicose, enzimaticamente ou quimicamente, por meio de celulasas ou por ácido sulfúrico e outros ácidos. Glicose, galactose e manose são açúcares de seis carbonos (hexoses), facilmente fermentados em etanol por muitos organismos que ocorrem naturalmente, mas as pentoses, xilose e arabinose (contendo apenas cinco átomos de carbono) são fermentados em etanol por algumas estirpes nativas, e, geralmente, com baixo rendimento (GONG, 1983).

Para a conversão de hexoses em etanol, a *Saccharomyces cerevisiae* é um dos microrganismos que possuem melhor relação custo/benefício na produção de etanol de diferentes fontes, pela alta eficiência na fermentação de hexoses a etanol, por possuir tolerância a variação de pH e aos compostos inibitórios presentes na biomassa lignocelulósica após o pré-tratamento (KLINKE et al., 2004).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: an overview. *Bioresource Technology*, v.101, p.4851-4861, 2010.



ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=60467&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1390926288208>> Acesso em: 28/01/2014

BIANCHI, MARIA LUCIA. Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolv. Dissertação (Mestrado). Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1995.

BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.13, p 25-58, 1994.

BINOD, P.; SATYANAGALAKSHMI, K.; SINDHU, R.; JANU, K. U.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY A.; Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, v.37, p.109-116, 2012

BRISTOW, J.A.; KOLSETH, P. Paper, structure and properties. **M.Dekker**, New York, 1986

BOGDAN, A.V. Tropical pasture and fodder plants. London: Longman, 475p. 1977.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T.S.S; ANTUNES, F.A.F; FREITAS, W.L.C; FELIPE, M.G.A; SILVA, S.S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2012, p.1-15, 2012.

COAN, R.M.; VIEIRA, P.F.; SILVEIRA, R.N. ET AL. Efeitos do inoculante enzimático-bacteriano sobre a composição química, digestibilidade e qualidade das silagens dos capins Tanzânia e Mombaça. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 38. Piracicaba, 2001. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 2001. P.124-126.

CONAB, Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2011. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília. Conab, 2011.

EKLUND, R.; GALBE, M; ZACCHI, G. Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzymatic saccharification of steam-pretreated willow. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v.12, p. 225-228, 1990.

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

GAMA, FRANCISCO MIGUEL PORTELA. Mecanismo bioquímico da acção de celulasas de *Trichoderma reesei*. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, 1996.

GONG, C.S., In: Tsao, G.T. (Ed.), Recent Advances in D-xylose Conversion by Yeasts, **Annual Reports of Fermentation Processes**, vol. 6, p. 253–291, 1983.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v.58, p. 137-161, 1996.

JING, X; ZHANG, X; BAO, J; Inhibition Performance of Lignocellulose Degradation Products on Industrial Cellulase Enzymes During Cellulose Hydrolysis. **Biochem Biotechnol**, v.159, p.696–707, 2009.

KLYNKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 10-26, 2004.

KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P.; Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Ind. Eng. Chem, Res.** 48, p.3713–3729, 2009.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos avançados**, vol.24, n.68, p. 223-253, ISSN 0103-4014, 2010.

LEATHERS, T. D. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi, **FEMS Yeast Research**, v.3, p. 133-140, 2003

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M. LADISH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.96, p.673-686, 2005.

OGEDA, T. L. E PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática da biomassa. **Química Nova**, v.33, n.7, p.1549-1558, 2010.

O’SULLIVAN, A.C. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, v.4, p. 171-207, 1997.

RABELO, SARITA CÂNDIDA. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática em bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2010.

RAYMAN, P.R. Minha experiência com *Brachiaria brizantha*. Campo Grande, **Rayman’s Seeds Sementes de Pastagens Tropicais**, 3p., 1983.

RILEY, C. Bioethanol: A Renewable Transportation Fuel from Biomass. **AIChE Spring Conference**, 2002.

SCOT CONSULTORIA, Carta Insumos – Vão começar as vendas de semente de capim. <<http://www.scotconsultoria.com.br/noticias/cartas/32143/carta-insumos---vao-comecar-as-vendas-de-sementes-de-capim.htm>>. Acesso em: 28/01/2014

SILVA, J. A.; SILVA, F. L. H.; ALVES, R. R. N.; SANTANA, D. P.; Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e °brix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v.29, n.4, p. 695-698, 2006.

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.A.G.; Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4820–4825, 2010.

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, **Biomass and Bioenergy**, v.10, p. 367-375, 1996.

VALLS, J.F.M. & SENDULSKY, T. Descrição botânica. In: Documentos da EMBRAPA, *Brachiaria brizantha* cv. marandu, Campo Grande – MS, p.11, 1984.

XUE, B-L.; LI, M-F.; XU, F.; SUN, R-C.; JONES, G. Microwave-enhanced alkali treatment of *Pinus yunnanensis*: Physicochemical characterization of dissolved lignins. **Industrial Crops and Products**, v.36, p.209-216, 2012.

WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4 xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological Reviews**, v. 52(3), p. 305-317, 1988.

WYMAN, C. E. Biomass Ethanol: Technical Progress. Opportunities and Commercial Challenges. **Annu. Rev. Energy Environ.**, v. 24, p. 189-226, 1999.

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIKARI, L. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility; Dumitriu, S., ed.; cap. 43. Dekker: New York, 2005.

## OBJETIVOS

### **Geral**

O objetivo deste trabalho é estudar/avaliar a viabilidade da associação entre o pré-tratamento químico alcalino e a radiação de micro-ondas para a produção de bioetanol combustível a partir *Brachiaria brizantha* cv marandu.

### **Específicos**

- Determinar o teor de extraíveis, celulose, hemicelulose e lignina no material lignocelulósico selecionado: variedade local de gramínea (*Brachiaria brizantha* cv. marandu).

- Avaliar o efeito da concentração de hidróxido de sódio sobre o material lignocelulósico, em particular, sobre o teor de celulose.

- Avaliar o efeito do tempo e da potência da radiação de micro-ondas em meio alcalino sobre o material lignocelulósico, em particular, sobre o teor de celulose.

- Otimizar as condições do pré-tratamento químico auxiliado por micro-ondas para a produção de bioetanol por hidrólise enzimática, para o material lignocelulósico selecionado.

- Avaliar a quantidade de açúcares redutores produzidos por hidrólise enzimática após o pré-tratamento químico para a *Brachiaria brizantha* cv. marandu.

## USO DE PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO ASSOCIADO COM RADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS SOBRE *BRACHIARIA BRIZANTHA* CV. MARANDU PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL

**Resumo:** Os biocombustíveis de segunda geração possuem potencial superior aos muitos da primeira geração de biocombustíveis em termos de balanços de energia, redução de emissão de gases de efeito estufa, exigência do solo e competição pela terra, alimentos, fibras e água. O objetivo do trabalho é o estudo da viabilidade da associação entre o pré-tratamento químico alcalino e a radiação de micro-ondas para a produção de bioetanol combustível a partir da *Brachiaria brizantha* cultivar marandu. O material lignocelulósico apresentou ótimos resultados quando submetidos ao pré-tratamento, obtendo quantidades de celulose três vezes maiores (64,65%) em relação ao material sem pré-tratamento (22,8%) e com a deslignificação de 67,3%, sugerindo que a associação entre a radiação de micro-ondas e o pré-tratamento alcalino apresenta um grande potencial para a produção de bioetanol. A quantidade máxima liberada de açúcares redutores totais ( $\text{g L}^{-1}$ ) obtida com o pré-tratamento alcalino associado à radiação de micro-ondas foi igual a  $14,09 \text{ g L}^{-1}$ , enquanto o material sem pré-tratamento atingiu  $8,95 \text{ g L}^{-1}$ .

**Palavras-chave:** biocombustíveis, lignocelulósicos, açúcares

**Abstract:** The second-generation of biofuels have higher potential than many of the first generation biofuels in terms of energy balance, reducing the emission of greenhouse gases, soil requirements and competition for land, food, fiber and water. The objective is to study the feasibility of association between the alkaline chemical pretreatment and microwave radiation for the production of bioethanol fuel from *Brachiaria brizantha* cultivate marandu. The lignocellulosic material showed excellent results when subjected to pre-treatment , obtaining amounts of cellulose three times higher (64.65%) compared to the material without pre-treatment (22.8%) andwith a 67.3% of delignification, This suggests that the association between the microwave radiation and alkaline pre-treatment shows great potential for the bioethanol production of bioethanol. The maximum amount of total reducing sugars released ( $\text{g L}^{-1}$ ) obtained with the alkaline pre- treatment followed by microwave radiation was equal to  $14.09 \text{ g L}^{-1}$ , whereas the material without pre-treatment reached  $8.95 \text{ g L}^{-1}$ .

**Key words:** Biofuels, Lignocellulosic, Sugars

## 1. INTRODUÇÃO

A importância do etanol está aumentando por causa de uma série de razões, tais como o aquecimento global e as mudanças climáticas. O bioetanol vem recebendo grande interesse a nível internacional, nacional e regional. O etanol tem potencial como um substituto valioso da gasolina no mercado de combustíveis de transporte (SARKAR et al., 2012).

Com esta problemática os biocombustíveis surgem como alternativa viável e podem substituir as dependências do petróleo como fonte de combustível para veículos. No Brasil a cana-de-açúcar é a cultura que possui maior destaque na produção de etanol combustível, competindo com a produção de açúcar no país, ficando assim o etanol em segundo plano porque os donos de usinas sucroalcooleiras ditam os preços no mercado interno tanto na produção de açúcar, quanto na do etanol (KOHLHEPP, 2010).

Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) o conceito de biocombustíveis são todos aqueles que derivam de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia. Os dois principais biocombustíveis líquidos que são utilizados no Brasil são o etanol extraído de cana-de-açúcar e, em escala crescente, o biodiesel, que é produzido a partir de gorduras animais ou de óleos vegetais e é adicionado ao diesel de petróleo em proporções que podem variar (ANP, 2012).

Os biocombustíveis de segunda geração possuem potencial superior aos muitos das primeiras gerações de biocombustíveis em termos de balanços de energia, redução de emissão de gases de efeito estufa, exigência do solo e competição pela terra, alimentos, fibras e água. O principal motivo pela qual ainda não tenham sido de fato colocados para a comercialização, apesar do seu potencial muito grande, é que as tecnologias de produção envolvidos não são tecnicamente comprovadas em escalas comerciais e os custos estão significativamente mais elevados do que os de primeira

geração de biocombustíveis. Portanto, ainda há muito trabalho a ser feito para a melhoria dos processos existentes e para o desenvolvimento de novas tecnologias eficientes (PEREGO & BIANCHI, 2010).

Os capins do gênero *Brachiaria* são atualmente os que apresentam maior expressão no quadro de pastagens cultivadas no Brasil, e chegam a ocupar cerca de 60 milhões de hectares, com o principal intuito de servir de alimentação para o rebanho brasileiro de bovinos de corte. Entre as diversas espécies desse gênero, destacam-se a *Brachiaria decumbens* e a *Brachiaria brizantha*, que juntas ocupam mais da metade da área com pastagens cultivadas do país (ALMEIDA, 2003). A utilização de espécies e/ou cultivares de *Brachiaria* foi proporcionada pelo conjunto de características que tonaram esta cultivar a melhor em relação ao custo/benefício. Este fato ocorre pela adaptação a condições adversas de solo e clima, principalmente, pela adaptação a solos com baixa e média fertilidade, além de apresentarem produções satisfatórias de forragem (FAGUNDES et al., 2005).

Em geral, o processo biológico de conversão de biomassa lignocelulósica em etanol envolve: (1) pré-tratamento, que se faz necessário para remover a lignina e hemicelulose e com isso poder disponibilizar celulose, (2) a despolimerização de polímeros de carbono hidratado auxiliado por um complexo de enzimas de celulase para liberação de açúcares livres, (3), o processo fermentativo de açúcares hexoses e/ou pentoses para produzir etanol, (4) destilação do etanol (CANILHA et al., 2012).

Segundo Peng et al. (2013) quando comparado com aquecimento de condução/convecção, que basicamente se dá por transferência superficial de calor, a irradiação de micro-ondas usa a capacidade de interação direta entre o objeto e a biomassa aplicando um campo eletromagnético para criar calor. A irradiação de micro-ondas foi aplicada com sucesso no pré-tratamento da biomassa causando a fragmentação e inchaço, degradando a lignina e a hemicelulose na biomassa (CHEN et al., 2011). Para libertar mais monossacarídeos e açúcares redutores, a adição de produtos químicos, alcalinos e/ou ácidos, no pré-tratamento de algumas biomassas juntamente com a irradiação do micro-ondas era necessário, tais como bagaço de cana-de-açúcar, capim zebra, sorgo, palha de trigo (PENG et al., 2013).

Neste trabalho foi utilizado o pré-tratamento alcalino, que é usado para separar a lignina da biomassa lignocelulósica (BINOD et al., 2012). A associação do pré-tratamento alcalino com a radiação de micro-ondas foi investigada, objetivando a



obtenção de maiores teores de celulose para posterior transformação em etanol de 2ª geração e melhor aproveitamento do material lignocelulósico.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Caracterização do material lignocelulósico

Porções do material lignocelulósico de uma variedade local de gramínea (*Brachiaria brizantha* cv. marandu), foram obtidas junto a produtores da região de Rio Verde - GO em março de 2012 e 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 conforme a metodologia relatada por Lin et al. (2010) e Li et al. (2004).

A influência da associação entre a radiação de micro-ondas e a etapa de pré-tratamento químico alcalino foi investigada através de um planejamento fatorial em dois níveis com um controle, considerando como variáveis a concentração do álcali, a razão líquido/sólido, o tempo de irradiação e a potência da radiação de micro-ondas conforme a Tabela 1.

Exp. (E)	Concentração (0,5-5%)	Razão L/S (50-250mL)	Tempo (10-60min)	Potência (10-20%)
Bruto	-	-	-	-
E1	0,5	50	10	10
E2	0,5	50	10	20
E3	0,5	50	60	10
E4	0,5	50	60	20
E5	0,5	250	10	10
E6	0,5	250	10	20
E7	0,5	250	60	10
E8	0,5	250	60	20
E9	5	50	10	10
E10	5	50	10	20
E11	5	50	60	10
E12	5	50	60	20

E13	5	250	10	10
E14	5	250	10	20
E15	5	250	60	10
E16	5	250	60	20

Tabela 1: Planejamento fatorial do pré-tratamento químico alcalino associado à radiação de micro-ondas.

Porções do pó lignocelulósico foram tratadas com hidróxido de sódio em concentrações de 0,5 e 5% (m/v), e razões de 10:1 e 50:1 (v/m) entre a solução alcalina e o pó lignocelulósico e submetidas à radiação de micro-ondas em diferentes potências (10% e 20%), e tempos (10 e 60 minutos, sendo um minuto irradiando e um minuto em descanso). Após o tratamento, a mistura foi filtrada e os resíduos sólidos foram analisados para determinação da sua composição e caracterização morfológica.

Com o método de espectroscopia de infravermelho foi possível determinar a cristalinidade da celulose, bem como diferenciar a celulose amorfa da celulose cristalina, além de poder observar o comportamento dos outros componentes da biomassa (hemicelulose e lignina), para isso, foi utilizado o modelo FTIR-UATR-NIRA Frontier PerkinElmer.

## 2.2. 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 50<sup>0</sup>, com uma fonte de cobre com linha em Cu K $\alpha$  1,54 Å em 40 KV e 30mA.

Para a determinação da cristalinidade do material lignocelulósico um dos métodos utilizados foi o método de raio-x na biomassa expresso pelo índice de cristalinidade (CRI), a qual foi determinada pela equação descrita por Segal et al. (1959):

$$Cri = 100 \times [(I_{002} - I_{amorphous}) / I_{002}] \quad (1)$$

Em que  $I_{002}$  é a intensidade da parte cristalina da biomassa (por exemplo, celulose), a cerca de  $2\theta = 22,5^\circ$  e o  $I_{amorphous}$  é o pico para a porção amorfa (isto é, celulose, hemicelulose e lignina) a cerca de  $2\theta = 18,7^\circ$ , conforme relatado na literatura.

### 2.3. Determinação dos Teores de Açúcares Redutores Totais e Atividade Enzimática da Celulase

Partiu-se de uma solução padrão de glicose (dextrose)  $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , preparada em tampão citrato  $0,05 \text{ M}$ , sendo realizadas diluições de  $0$  a  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ . Em cada tubo de ensaio foram adicionados  $1,0 \text{ mL}$  de tampão citrato e  $0,5 \text{ mL}$  de cada uma das soluções de glicose, aquecidas por  $60$  minutos a  $50^\circ\text{C}$ . Posteriormente foram adicionados a cada tubo de ensaio  $3,0 \text{ mL}$  do reagente ácido dinitrosalicílico (DNS) e fervidos a  $95^\circ\text{C}$ , transferidos para um banho de gelo e adicionados  $20 \text{ mL}$  de água para leitura no espectrofotômetro (Bioespectro –SP-220) a  $540 \text{ nm}$ . Os teores de açúcares redutores totais foram determinados pela mesma metodologia, retirando alíquotas do fermentado.

Para a determinação da atividade enzimática foi utilizado o método de Ghose (1987) em que consiste encontrar uma concentração do extrato enzimático que libere aproximadamente  $2 \text{ mg}$  de glicose em um tempo de  $60$  minutos. Desta forma, encontrar-se-á atividade do extrato enzimático, em Filter Paper Unit (FPU).

As amostras foram preparadas, utilizando tampão citrato de sódio  $0,05\text{M}$  com  $\text{pH } 4,8$ , sendo sete diluições diferentes do extrato enzimático comercial de celulase pura (ns 22086),  $1:20$ ,  $1:30$ ,  $1:40$ ,  $1:60$ ,  $1:80$ ,  $1:100$  e  $1:120$ .

Foram preparados em tubos de ensaio, adicionando  $1 \text{ mL}$  de tampão citrato, uma fita de papel de filtro Whatman nº 1,  $1 \times 6\text{mm}$  ( $50 \text{ mg}$ ), e  $0,5 \text{ mL}$  de extrato enzimático diluído. Foram preparados controles com o papel de filtro, com a enzima e com o tampão citrato separadamente. Em seguida, os tubos reacionais e controles foram incubados em banho-maria à  $50^\circ\text{C}$ , por  $60$  minutos. Passado o tempo de reação, foram adicionados  $3\text{mL}$  do reagente DNS. Todos os tubos foram fervidos por  $5$  minutos, resfriados em água gelada e adicionados  $20 \text{ mL}$  de água destilada. A leitura da absorvância foi feita em  $540 \text{ nm}$ .

Por regressão linear e interpolação dos dados, foi determinada a concentração da enzima a qual produz  $2 \text{ mg}$  de glicose e o cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando a Equação 2:

$$\text{FPU/mL} = 0,37/\text{conc. extrato enzimático} \quad (2)$$

Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

## 2.4. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 2 g do material lignocelulósico e um coquetel enzimático com 10 FPU da enzima comercial, sob agitação constante a 150 rpm e 50 °C. A hidrólise foi acompanhada durante 6 dias, com medida da concentração de açúcar diariamente, até a sua estabilização.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Composição físico-química de *Braquiaria Brizantha* cv marandu após o pré-tratamento alcalino.

A caracterização do material foi feita em duplicata, determinando assim a quantidade de gorduras (extraíveis), hemicelulose, lignina e celulose presente no material após o pré-tratamento químico consorciado com o micro-ondas e para o material bruto sem qualquer tratamento. Na Tabela 2, podem ser observados os valores médios e os desvios padrões encontrados para os constituintes majoritários do material lignocelulósico.

Experimento	Extraíveis	Hemicelulose	Lignina	Celulose
Bruto	8,20 ± 1,3	23,85 ± 5,6	45,25 ± 4,2	22,80 ± 0,1
E1	1,80 ± 0,6	21,45 ± 1,5	28,70 ± 2,4	48,05 ± 3,3
E2	2,50 ± 0,3	17,45 ± 1,8	30,70 ± 2,4	49,35 ± 4,5
E3	5,50 ± 0,1	24,95 ± 7,4	28,85 ± 2,2	40,70 ± 9,8
E4	1,65 ± 1,1	33,30 ± 3,1	34,50 ± 0,6	30,60 ± 3,5
E5	2,95 ± 0,5	18,90 ± 4,7	30,35 ± 1,8	47,80 ± 3,4
E6	0,85 ± 0,2	35,70 ± 0,7	32,60 ± 4,5	30,85 ± 3,6
E7	2,95 ± 0,2	11,60 ± 2,7	40,95 ± 6,9	44,50 ± 4,0
E8	1,80 ± 1,7	30,05 ± 6,7	25,15 ± 4,3	43,00 ± 9,3
E9	2,00 ± 0,6	31,90 ± 2,3	37,20 ± 2,3	28,90 ± 0,6
E10	2,40 ± 0,7	22,05 ± 0,6	18,60 ± 8,8	56,95 ± 7,4
E11	2,75 ± 0,2	2,35 ± 2,3	52,15 ± 4,2	42,70 ± 6,8
E12	2,85 ± 0,4	30,75 ± 5,9	15,45 ± 0,5	51,00 ± 5,1

E13	2,10 ± 0,7	38,60 ± 5,2	28,15 ± 1,2	31,10 ± 7,2
E14	2,90 ± 0,0	31,80 ± 2,3	26,65 ± 5,4	38,65 ± 7,7
E15	3,15 ± 1,3	44,30 ± 2,3	43,95 ± 2,8	8,60 ± 3,7
E16	3,15 ± 1,2	17,35 ± 2,3	14,80 ± 0,6	64,65 ± 0,6

Tabela 2: Valores médios e desvio padrão dos resultados obtidos após caracterização do material.

Quando analisados os resultados referentes a quantidade de extraíveis na biomassa lignocelulósica pode-se notar que no material Bruto (8,2%) a quantidade de extraíveis está de acordo com os resultados descritor por Klinke et al., (2004) que relata para madeiras, a quantidade de substâncias minoritárias são equivalentes a 4-8% e que incluem nesta fração grande variedade de terpenos, que são polímeros de isopreno; resinas, nas quais se encaixam vários compostos não voláteis como óleos, ácidos graxos, álcoois, resinas ácidas, fitosterol, dentre outros; e os fenóis, que por sua maioria são representados pelos taninos. Para os valores de extraíveis encontrados no material lignocelulósico pode-se perceber que os menores valores encontrados foram o E6 (0,85% ± 0,2) e o E4 (1,65% ± 1,1). Ressalta-se que todos os resultados observados obtiveram redução nos níveis de gorduras quando comparados com o material bruto (8,15% ± 1,3), sendo duas ou três vezes menores, em que o menor valor encontrado foi o do experimento 6 (0,85% ± 0,2) e o que extraiu menor quantidade foi o experimento 3, apresentando os maiores teores de extraíveis residuais (5,50% ± 0,1).

Para a quantidade de hemicelulose na biomassa lignocelulósica pode-se observar valores que variaram de 2,35% ± 2,3 (E11) até 44,30% ± 2,3 (E15). Para hemicelulose o menor resultado obtido indicou um teor de 2,35%, sendo dez vezes menor que o encontrado no material bruto (23,85% ± 5,6), diminuindo drasticamente a quantidade de pentoses no material lignocelulósico, destacando-se como ótimas condições para a retirada de hemicelulose. Já para o E15 (44,30% ± 2,3), foi observado um comportamento oposto ao E11 e outros experimentos, pois o teor de hemicelulose aumentou, quase dobrando, o que leva a crer que ocorreu a diminuição drástica de algum ou alguns dos outros componentes, tornando a quantidade de hemicelulose maior. O E15 apresentou comportamento diferente dos demais experimentos observados não somente para a hemicelulose mas também para a quantidade de celulose retirada do material lignocelulósico, diminuindo para 8,60% ± 3,7, tendo decrescido

pela metade quando comparado com o material bruto, quanto a isso é importante observar a grande variação nos resultados.

Para os resultados referentes a lignina, nota-se em alguns experimentos o poder de deslignificação do pré-tratamento químico auxiliado por micro-ondas, destacando o experimento 16, em que se obteve  $14,80\% \pm 0,6$ , porém alguns experimentos não obtiveram resultados expressivos como o E16, como é o caso do experimento 11, com a maior quantidade de lignina observada ( $52,15\% \pm 4,1$ ), pode-se observar também que quase todos os resultados foram menores que o do material bruto ( $45,25\% \pm 4,2$ ). O E16 ( $14,8\% \pm 0,6$ ) obteve melhor resultado em relação à lignina, sendo três vezes menor que o material bruto, ou seja, conseguiu-se a deslignificação de 67,3%, que pode facilitar a atuação das enzimas sobre a celulose presente no material. O experimento E11 foi o único em que a quantidade de lignina sofreu um pequeno acréscimo ( $52,15\% \pm 4,2$ ), isso se deve a grande quantidade de hemicelulose retirada da biomassa lignocelulósica ficando com apenas  $2,35\% \pm 2,3$  da mesma, e preservando a lignina no material.

Chaudhary et al. (2012) utilizaram vários pré-tratamentos alcalinos, principalmente hidróxido de sódio, em concentrações de 1, 2, 4 e 7% (m/v) a 30°C deixados por 12, 24 e 48 horas para deslignificação da *Saccharum spontaneumat*, uma gramínea encontrada na Ásia, e obteve o máximo de 47,8% de deslignificação utilizando 7 % de NaOH em solução aquosa, por 48 h e carga de 10% da biomassa, corroborando com os resultados deste trabalho quando comparados o total de deslignificação da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu que foi cerca de 67,29%, evidenciando a maior eficiência na remoção da lignina para o pré-tratamento alcalino associado a radiação de micro-ondas; através de concentrações alcalinos menores (5%), e tempos de pré-tratamento também comparativamente reduzidos (60 minutos).

Analisados os resultados referentes a celulose, observa-se grande perda de celulose no experimento 15, com o menor valor médio encontrado ( $8,60\% \pm 3,7$ ). A comparação com o material bruto, indica que os teores de lignina, extraíveis e celulose reduziram bastante, enquanto a hemicelulose foi preservada, causando a sua elevação relativa (de 23,85% para 44,30%). Após o estudo de caracterização do material e levando em consideração os resultados obtidos pode-se destacar o experimento 16 que obteve a maior quantidade de celulose evidenciada ( $64,65\% \pm 0,6$ ) sendo três vezes maior do que o encontrado no material bruto ( $22,8\% \pm 0,1$ ), que teoricamente aumentaria o rendimento de conversão de celulose em açúcares fermentáveis e possivelmente maior produtividade de etanol. Segundo Perego & Bianchi (2010) a digestibilidade enzimática

da celulose na biomassa sem pré-tratamento é baixa (<20% de rendimento) por causa das suas características estruturais, com isso para tornar a hidrólise enzimática mais eficaz, deve-se fazer algum tipo de processo de pré-tratamento para quebrar a estrutura cristalina do material lignocelulósico e remover a lignina para expor celulose e hemicelulose.

Após a análise de todos os resultados encontrados, o experimento 16 se destacou quanto a diminuição de gorduras no material ( $3,15\% \pm 1,2$ ), deslignificação da biomassa ( $14,80\% \pm 0,6$ ) favorecendo a quebra do material lignocelulósico evidenciando a celulose e hemicelulose, e preservação da hemicelulose ( $17,35\% \pm 2,3$ ) que possivelmente irá gerar teores menores de inibidores como furfural e hidróximetilfurfural (HMF) para posterior hidrólise enzimática e, principalmente, foram obtidos maiores teores de celulose ( $64,65\% \pm 0,6$ ), que é o foco deste trabalho. Isto sugere que as condições do experimento 16 são as melhores dentro do planejamento fatorial usado, sendo que as condições experimentais para o mesmo foram concentração de hidróxido de sódio a 5%, razão líquido/sólido 50:1, potência do micro-ondas ajustada para 20% e tempo de radiação em 60 minutos.

Tal fato está de acordo com resultados apresentados por Lim & Lee (2013) sobre a utilização de pré-tratamentos, em que utilizaram como matéria-prima um misto de *Pinus rigida* e *Pinus densiflora*, que tratam de madeiras macias, juntamente com pré-tratamentos ácidos constando aumento na quantidade de celulose, de 46,36% para 55,13-64%.

Kashaninejad & Tabil (2011) utilizaram o efeito do micro-ondas juntamente com pré-tratamentos químicos para avaliar mudanças ocorridas em palha de trigo e cevada, e as amostras foram imersas em água, solução de hidróxido de sódio e de cálcio em concentrações diferentes (1 e 2 % w/v) e em seguida, exposta a radiação de micro-ondas a três níveis de potência (295, 603 e 713 W) e concluíram que amostras de palha de trigo e cevada pré-tratadas pela técnica micro-ondas/alcalino tiveram menor hemicelulose, lignina e celulose do que as amostras não tratadas, indicando que o pré-tratamento micro-ondas/alcalino desintegra a estrutura do material lignocelulósico, dissolvendo os componentes, contradizendo com resultados apresentados neste trabalho, neste caso a retirada da lignina, extraíveis e hemicelulose aconteceram em maiores quantidades, aumentando os teores relativos de celulose no material, como observado no E16, em que a quantidade de celulose no capim pré-tratado ( $64,65\% \pm 0,6$ ) foi três vezes maior do que a encontrada no material sem tratamento ( $22,8\% \pm 0,1$ ),

evidenciando a seletividade do pré-tratamento alcalino associado à radiação de micro-ondas na deslignificação do material lignocelulósico.

Pode-se afirmar que para os extraíveis quando houve aumento da concentração do hidróxido de sódio de 0,5 para 5%, bem como do tempo de irradiação de micro-ondas (de 10 para 60 minutos) resultou em menor extração dos materiais apolares, sendo 0,16% e 0,8%, respectivamente. Já o aumento da razão líquido/sólido (0,2%) e da potência do micro-ondas (0,6%) causaram maior liberação dos materiais extraíveis e uma pequena variação nos teores médios dos extraíveis, conforme mostra a Tabela 3.

	Extraíveis	Hemicelulose	Lignina	Celulose
Médias Gerais	2,6%	25,8%	30,5%	41%
Concentração	- 0,16%	- 3,2%	+1,9%	+1,5%
Razão Sólido/Líquido	+ 0,2%	- 5,5%	+ 0,4%	+ 4,9%
Tempo	- 0,8%	+ 2,9%	- 2,9%	+ 0,7%
Potência	+ 0,6%	- 3,1%	+ 11,5%	- 9,1%

Tabela 3: Valores médios e Efeitos principais calculados para os resultados da Tabela 2

Para os efeitos das variáveis na hemicelulose, afirma-se que quando a concentração, a razão líquido/sólido e a potência do micro-ondas aumentam, causam menor extração da hemicelulose e quando se aumenta o tempo de 10 minutos para 60 minutos se extrai mais hemicelulose, conforme mostra a Tabela 3. As médias da hemicelulose (25,8%) variam muito quando comparadas aos 16 experimentos, isso se deve a grande diferença de resultados encontrados dentro do croqui experimental, com valores que variam de 2,35% (E11) até 44,15 (E15).

Na lignina, encontra-se grande extração pela alteração da potência de 10% para 20%, e com pequenos acréscimos de extrações em razão da mudança de concentração de hidróxido de sódio de 0,5% para 5% e razão líquido/sólido de 10:1 para 50:1, porém quando varia o tempo há um decréscimo na extração (-2,9%) conforme ilustrado na Tabela 3. Assim como para a hemicelulose, os valores médios da lignina variam bastante, com média de 30,5%, isso se dá por causa dos valores que variam de 14,80% no experimento E16 até 52,15% no experimento E15, porém, a média encontrada para a lignina ficou abaixo do valor médio do material bruto ( $45,25 \pm 4,2$ ).

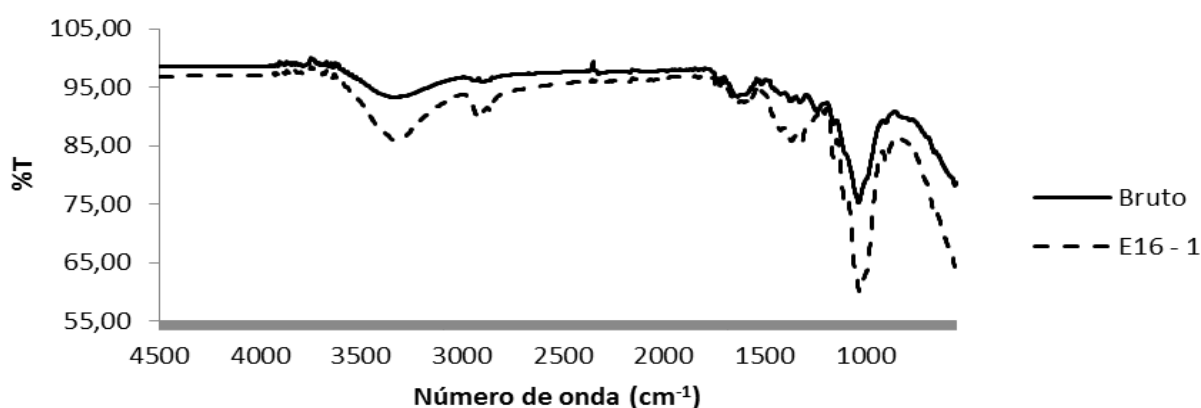
Na média encontrada para a celulose (41%) pode-se observar o efeito das variáveis dentro do croqui experimental, em que os valores variaram muito, de 8,6% (E15) até



64,65% (E16). Quando comparado ao material bruto ( $22,80 \pm 0,1$ ) a média dos 16 experimentos ainda supera a quantidade de celulose obtida na biomassa em quase o dobro, mostrando no geral, o quão eficiente é o pré-tratamento alcalino auxiliado por micro-ondas na manutenção de celulose na biomassa. Quando se varia a razão líquido/sólido de 10:1 para 50:1 há um acréscimo de 4,9% de celulose na biomassa, o que ocorre também com a variação da concentração de hidróxido de sódio, de 0,5% para 5% há também um acréscimo de 1,5% de celulose na biomassa e o tempo de radiação no micro-ondas acrescenta 0,7% de celulose quando variado de dez minutos para 60 minutos, porém quando variado a potência há perda de 9,1% da celulose, ou seja, não é interessante a variação de potência para obtenção de celulose.

De acordo com Kumar et al. (2009) alguns pontos da reta de espectroscopia devem ser analisados para que o estudo do material lignocelulósico pré-tratado mostre os efeitos nos compostos analisados.

A Figura 1 mostra os resultados comparando a curva do material bruto com a curva obtida pelo experimento com melhores resultados (E16).



**Figura 1:** Espectrometria do material sem tratamento e o material com melhor resultado (E16).

Após análise dos picos fornecidos pela espectrometria, pode-se observar que as ligações de hidrogênio na celulose foram rompidas pelo pré-tratamento alcalino associado à radiação de micro-ondas ( $3348 \text{ cm}^{-1}$ ) e que há remoção da celulose pelo pré-tratamento alcalino ( $2900 \text{ cm}^{-1}$ ), porém há diminuição mínima da lignina ( $1745 \text{ cm}^{-1}$ ), também com uma pequena remoção de lignina e da hemicelulose observada na posição de banda  $1720 \text{ cm}^{-1}$ .

Quando analisado a banda  $1595 \text{ cm}^{-1}$ , observa-se que o material bruto sem tratamento possui maior conteúdo de lignina do que o material lignocelulósico com pré-

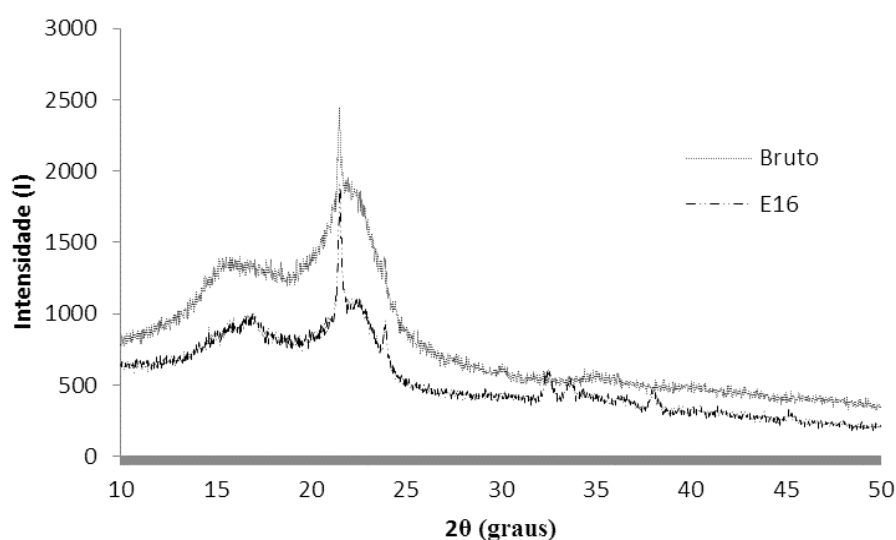
tratamento do hidróxido de sódio em consórcio com o micro-ondas, que também pode ser observado para os grupos acetil (hemicelulose), em que o uso do pré-tratamento diminui a quantidade de grupos acetil (hemicelulose) observados na banda  $1245\text{ cm}^{-1}$ , em conformidade com os resultados obtidos por Kumar et al. (2009) que concluiu que é evidente que a maior remoção de xilano resultaria em maior remoção do grupo acetil.

Para o material pré-tratado também foi possível observar a remoção de celulose amorfa conforme a banda  $900\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.2 Cristalinidade dos materiais lignocelulósicos

Segundo Kim & Holtzaple (2006), para a biomassa real é muito difícil determinar a verdadeira cristalinidade da celulose. Isto se deve ao fato que os métodos de raios-x usados convencionalmente acabam incluindo a hemicelulose e lignina, e também a celulose amorfa. No entanto, os pré-tratamentos termoquímicos podem alterar a estrutura cristalina da celulose, porque acabam perturbando as ligações de hidrogênio das cadeias de celulose (Mosier et al., 2005) e com isso as medições do índice de cristalinidade (CRI) por raios-x ainda são a melhor opção para estimar seus impactos sobre a cristalinidade de biomassa.

O índice de cristalinidade foi determinado para o material sem e com pré-tratamento. A Figura 2 mostra os difratogramas de intensidade dos picos em função do ângulo de Bragg  $2\theta$  para a *Brachiaria brizantha* cv. marandu pré-tratada com solução alcali e irradiação de micro-ondas e do material bruto.



**Figura 2:** Difratograma para a *Braquiaria brizantha* cv. marandu bruto e com o melhor pré-tratamento.

Para a *Brachiaria brizantha* cv. maradu foi encontrado um índice de cristalinidade da celulose (CRI) de 31,3% para o material bruto e de 22,0% para o material com maiores quantidades de celulose (E16), que corrobora com os resultados obtidos por Kumar et al. (2009), que observaram a diminuição na cristalinidade do material conforme o pH aumentava, ou seja, quando usado o pré-tratamento alcalino a cristalinidade diminuía e quando se usava o pré-tratamento ácido a cristalinidade aumentava, com isso, para o material sem tratamento foi determinado um CRI de 49,9 e com o pré-tratamento alcalino houve a diminuição para 47,9, em experimento conduzido sobre a planta denominada de álamo, pertencente à família *Salicaceae* encontrada em regiões de clima temperado próximo a pântanos. Nesta mesma perspectiva Laureano-Perez et al. (2005), também obteve diminuição na cristalinidade para a palha de milho quando submetido ao pré-tratamento alcalino, diminuindo de 50,3 para 36,3.

### **3.3. Determinação dos Teores de Açúcares Redutores Totais e Atividade Enzimática da Celulase**

Para a curva de calibração da glicose foi encontrada a equação  $y = 0,1376x - 0,0119$ , com o  $R^2 = 0,9955$ .

Com os resultados de absorbâncias das soluções padrão, foi construído um gráfico de absorbância em função da massa de glicose e se obteve a equação usada para encontrar a massa de glicose liberada em 60 minutos.

Para a enzima celulase comercial, foi encontrada a atividade enzimática igual a  $35,8 \text{ FPU mL}^{-1}$ , que foi utilizada para os cálculos dos teores enzimático necessários para as etapas de hidrólise.

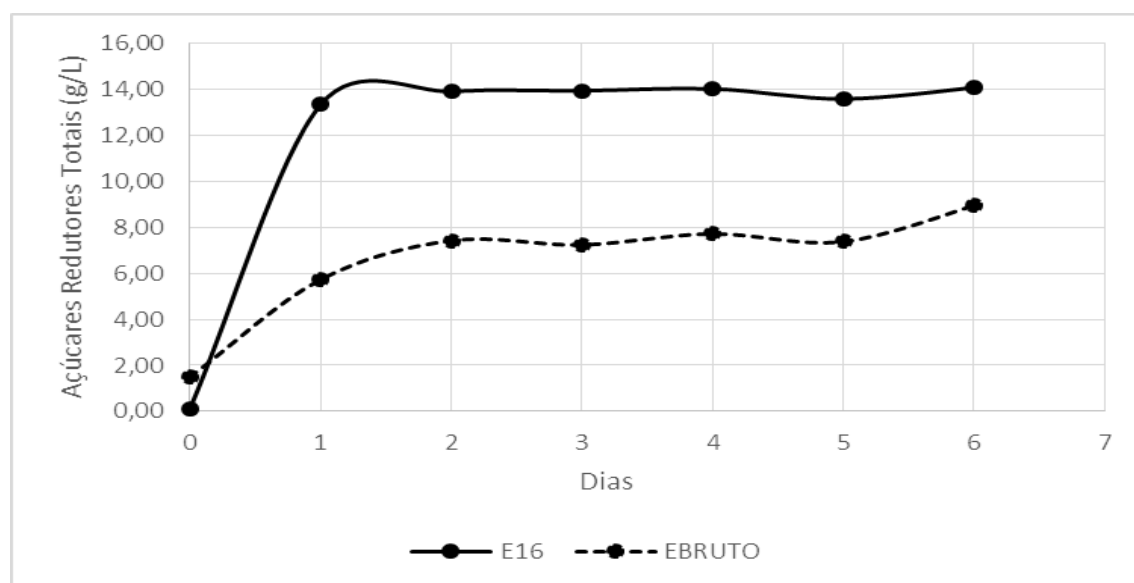
Para a enzima  $\beta$ -glicosidase não foi feita a determinação de FPU, segundo o fabricante das enzimas, para a mistura com a celulase basta adicionar a razão de 4% v/v em relação a celulase.

### **3.4. Hidrólise enzimática**

Para a hidrólise enzimática do material lignocelulósico, foi utilizado cerca de 5 FPU por grama de material lignocelulósico. Foi selecionado o material com maior teor de celulose e menor de lignina, (experimento 16) e também foi realizada a hidrólise sobre o material bruto para comparação.

Após o pré-tratamento, o material foi filtrado, lavado e seco. Cerca de 2 g do material foram pesados e acrescentados 100 mL de tampão citrato. Em seguida, foram adicionados cerca de 0,280 mL de celulase (ns22086) que corresponde aproximadamente a 10 FPU, e foi misturado a 0,010 mL de  $\beta$ -glucosidade, no qual corresponde a 4% v/v da celulase adicionada e mantidos em banho-maria a 45 °C e agitação constante.

A hidrólise enzimática foi acompanhada por 6 dias, com coletas diárias de alíquotas para quantificação dos açúcares liberados. Observou-se que nas primeiras 24 horas as enzimas conseguiram obter quase que o máximo de açúcares possíveis conforme mostra a Figura 3, e a quantidade máxima liberada de açúcares redutores ( $\text{g L}^{-1}$ ) foi obtido no sexto dia que chegou a 14,09  $\text{g L}^{-1}$  no experimento 16 e para o Bruto foi de 8,95  $\text{g L}^{-1}$  obtidos também no sexto dia, levando a dizer que após o pré-tratamento alcalino auxiliado pelo micro-ondas, dobrou a quantidade de açúcares no meio. Corroborando com estudos feitos por Silva & Cruz (2010) que após tratar o bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico 2% (m/v), conseguiu obter 13,4  $\text{g L}^{-1}$  de açúcares redutores, ficando bem próximo do encontrado neste trabalho que foi de 14,09  $\text{g L}^{-1}$ .



**Figura 3:** Teores de Açúcares Redutores Totais ( $\text{g L}^{-1}$ ) produzidos pelas hidrólise enzimática de *Brachiaria Brizantha*

Nos resultados encontrados por Chaudhary et al. (2012), em que foi utilizado pré-tratamento com amônia em uma gramínea, *Saccharum spontaneumat*, e posterior hidrólise com ácido sulfúrico tratados com concentrações diferentes, isto é, 30%, 40%, 50%, 60% e 70% (v/v) de ácido sulfúrico por 2, 4 e 6 horas para solubilizar a celulose polimérica e hemicelulose em 30 °C com 10% (w/v) de carga de biomassa, foram

encontrados resultados inferiores aos descritos neste trabalho, em que a melhor hidrólise ácida descrita que foi a de 60% (v/v) de ácido sulfúrico por 4 horas obteve apenas 8,96 g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores totais, sendo quase a metade do que foi encontrado neste trabalho (14,09 g L<sup>-1</sup>).

Carvalho et al. (2011) também utilizou a *Braquiaria brizantha* cv. marandu para seus trabalhos utilizando pré-tratamento com solução de ácido sulfúrico 1,5% v/v, e foram utilizados 7,5 mL e a amostra foi mantida por 30 minutos em autoclave a 121 °C. Para a etapa de hidrólise enzimática foi utilizado um extrato enzimático comercial (Novozymes, 200 FPU mL<sup>-1</sup>), composto de celobiase, exo e endo-glucanases, e para cada grama de biomassa (peso seco) foram adicionados 20 FPU, a hidrólise foi realizada em erlenmeyers de 250mL, durante 18 horas. Neste trabalho foi possível atingir concentrações de aproximadamente 26 g L<sup>-1</sup> de glicose a partir da biomassa pré-tratada, que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho, a quantidade de açúcares pode ter sido menor por causa da quantidade de enzimas no meio, sendo a metade da utilizada por Carvalho et al.

Para Pacheco et al. (2012) foi utilizado para avaliação e determinação das condições ótimas de hidrólise enzimática para a *Braquiaria brizantha*, 30, 60, 120 e 240 FPU do extrato enzimático comercial Cellic®CTec2 (Novozymes) por grama de substrato seco, e se obteve resultados com a mesma concentração de glicose ao término da hidrólise, aproximadamente 88 g L<sup>-1</sup>, em diferentes tempos, sendo a quantidade elevada de açúcar obtido, uma vez que neste trabalho foi obtido. Utilizando 30 FPU g<sup>-1</sup> de material seco são necessárias 72 horas de hidrólise, para 60 FPU g<sup>-1</sup> de material seco em 56 horas a mesma conversão é atingida. Utilizando 120 e 240 FPU g<sup>-1</sup> de material seco, a hidrólise se completou em 48 horas, indicando o grande potencial das enzimas utilizadas para a hidrólise de materiais lignocelulósicos.

#### 4. CONCLUSÃO

A *Brachiaria brizantha* cultivar marandu pré-tratada com hidróxido de sódio e auxiliada por radiação de micro-ondas, promoveu a desglinificação de cerca de 67%, e promoveu a elevação no teor de celulose, atingindo cerca de 64%. O teor de açúcares redutores totais foram de 14,09 g L<sup>-1</sup>, enquanto o material sem pré-tratamento atingiu apenas 8,95 g L<sup>-1</sup>.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R.G.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; EUCLIDES, V.P.B. ET AL. Disponibilidade, composição botânica e valor nutritivo da forragem de pastos consorciados, sob três taxas de lotação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.36-46, 2003.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: an overview. **Bioresource Technology**, v.101, p.4851-4861, 2010.

BINOD, P.; SATYANAGALAKSHMI, K.; SINDHU, R.; JANU, K. U.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY A.; Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, v.37, p.109-116, 2012.

BOGDAN, A.V. **Tropical pasture and fodder plants**. London: Longman, p-475, 1977.

BONOMI, A. Termo de referência do “*III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise*” – Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol. São Paulo, 2006.

BUCKERIDGE, M., SANTOS, W.D., DE SOUZA, A.P., As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: Cortez, L.A.B. (Coord.), Edgard Blucher (Eds.), **Etanol: Pesquisa & Desenvolvimento**. 2009

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T.S.S; ANTUNES, F.A.F; FREITAS, W.L.C; FELIPE, M.G.A; SILVA, S.S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2012, p.0-15, 2012.

CARVALHO, F.B.P.; PACHECO, T.F.; RODRIGUES, D.S.; GONÇALVES, S.B.; CARVALHO, M.A.; MACHADO, C.M.M. Produção de etanol a partir da forrageira *Brachiaria Brizantha* cv. Marandu. **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos**. 2011.

CHANG, V.S. & HOLTZAPPLE, M.T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.84, p.5–37. 2000.

CHAUDHARY, G.; SINGH, L.K.; GHOSH, S. Alkaline pretreatment methods followed by acid hydrolysis of *Saccharum spontaneum* for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v.124, p.111-118, 2012.

CHEN, W.H.; TU, Y.J.; SHEEN, H.K. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. **Appl. Energ.** v.88, p.2726–2734, 2011.

COAN, R.M.; VIEIRA, P.F.; SILVEIRA, R.N. ET AL. Efeitos do inoculante enzimático-bacteriano sobre a composição química, digestibilidade e qualidade das silagens dos capins Tanzânia e Mombaça. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 38. Piracicaba, 2001. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 2001. P.124-126.

CONAB, Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2011. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília: Conab, 2011.

DEMIRBAS, A.; Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. **Energy Sources**, v.27, p.327-33, 2005.

FAGUNDES, J.L.; FONSECA, D.M.; GOMIDE, J.A.G. et. al. Acúmulo de forragem em pastos de *Brachiaria Decumbens* adubados com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.4, p.397-403, 2005.

GONG, C.S., In: Tsao, G.T. (Ed.), Recent Advances in D-xylose Conversion by Yeasts, **Annual Reports of Fermentation Processes**, vol. 6, p. 253–291, 1983.

JING, X; ZHANG, X; BAO, J; Inhibition Performance of Lignocellulose Degradation Products on Industrial Cellulase Enzymes During Cellulose Hydrolysis. **Biochem Biotechnol**, v.159, p.696–707, 2009.

KASHANINEJAD, M.; TABIL L.G. Effect of microwave-chemical pretreatment on compression characteristics of biomass grinds. **Science Direct**. V.108, p.36-45, 2011.

KIM, S. & HOLTZAPPLE, M.T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. **Bioresour. Technol.** v.97 (4), p.583–591, 2006.

KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P.; Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Ind. Eng. Chem, Res.** 48, p.3713–3729, 2009.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos avançados**, vol.24, n.68, p. 223-253, ISSN 0103-4014, 2010.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B.E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.121, p.1081–1099, 2005.

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.

LIM, W.S.; LEE, J.W. Influence of pretreatment condition on the fermentable sugar production and enzymatic hydrolysis of dilute acid-pretreated mixed softwood. **Bioresource Technology**. 2013.

LIN, L.; YAN, R.; LIU, Y.; JIANG, W. In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass waste based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. **Bioresource Technology**, v.101, p.8271-8223, 2010.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M. LADISH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technonology**, v.96, p.673-686, 2005.

OGEDA, T. L. E PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática da biomassa. **Química Nova**, v.33, n.7, p.1549-1558, 2010.

PACHECO, T. F.; MENDES, T. D.; CARVALHO, F. B. P.; RODRIGUES D. S.; MACHADO, C. M. M.; AYRES, M. Avaliação do potencial de biomassas na produção de etanol lignocelulósico. **XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ**. 2012.

PEREGO, C. & BIANCHI, D. Biomass upgrading through acid–base catalysis. **Chemical Engineering Journal**, v.161, p.314-322, 2010.

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.

RAYMAN, P.R. Minha experiência com *Brachiaria brizantha*. Sementes de Pastagens tropicais, p.3, 1983.

SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E.S. Comparison of SHF and SSF processes from sugar cane bagasse for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v.33- 4, p.904-908, 2010.

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K.; Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v.37, p.19-27, 2012.

SEGAL, L.; CREELY, J.J.; MARTIN JR., A.E.; CONRAD, C.M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Text. Res.** v. 29, p.786–794, 1959.

SILVA, J. A.; SILVA, F. L. H.; ALVES, R. R. N.; SANTANA, D. P.; Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e °brix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v.29, n.4, p. 695-698, 2006.

SILVA, M. M.; CRUZ, S. H. Hidrólise de bagaço de cana de açúcar para obtenção de etanol. **Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**, Resumo Simples, 2010.

SOCOL, 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.A.G.; Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4820–4825, 2010.

VALLS, J.F.M. & SENDULSKY, T. Descrição botânica. In: Documentos da EMBRAPA, *Brachiaria brizantha* cv. marandu, Campo Grande – MS, p.11, 1984.

XUE, B-L.; LI, M-F.; XU, F.; SUN, R-C.; JONES, G. Microwave-enhanced alkali treatment of *Pinus yunnanensis*: Physicochemical characterization of dissolved lignins. **Industrial Crops and Products**, v.36, p.209-216, 2012.

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIKARI, L. **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**; Dumitriu, S., ed.; cap. 43. Dekker: New York, 2005.