



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO POTENCIAL DE ETANOL DA BRAQUIÁRIA  
HÍBRIDA CONVERT HD364 SUBMETIDA A DOSES CRESCENTES DE  
ADUBAÇÃO NITROGENADA**

**Mestrando: Walysson Bernardo Rodrigues Santos**

**Orientador: Dr<sup>a</sup>. Flávia Lucila Tonani de Siqueira**

**Co-orientador: Dr. Guilherme Benko de Siqueira**

**PALMAS – TO**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO POTENCIAL DE ETANOL DA BRAQUIÁRIA  
HÍBRIDA CONVERT HD364 SUBMETIDA A DOSES CRESCENTES DE  
ADUBAÇÃO NITROGENADA**

**Mestrando: Walysson Bernardo Rodrigues Santos**

**Orientador: Dr<sup>a</sup>. Flávia Lucila Tonani de Siqueira**

**Co-orientador: Dr. Guilherme Benko de Siqueira**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Agroenergia.

**PALMAS – TO**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Walysson Bernardo Rodrigues

Estimativa do potencial de produção de bioetanol da brachiária híbrida CONVERT HD364. /  
Walysson Bernardo Rodrigues Santos. Palmas. - 2016.

66p.; il.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Lucila Tonani de Siqueira

Co-orientador: Prof. Guilherme Benko de Siqueira

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal do Tocantins.

1. Sustentáveis - Brasil. 2. Etanol - Brasil 3. Doses de nitrogênio - Brasil 4. Biomassa lignocelulósica - Brasil. I. Santos, Walysson Bernardo Rodrigues. II. Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal do Tocantins. III. Estimativa da produção potencial de etanol da braquiária CONVERT HD 364 submetida a doses crescentes de adubação nitrogenada. / Walysson Bernardo Rodrigues Santos. Palmas. - 2015

**ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO POTENCIAL DE ETANOL DA BRAQUIÁRIA  
HÍBRIDA CONVERT HD364**

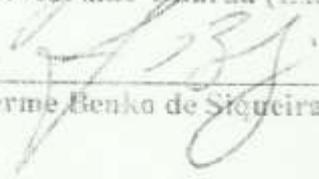
**COMISSÃO EXAMINADORA**



Prof. Dr<sup>a</sup>. Flávia Lucila Tonani de Siqueira (Presidente- UFT)



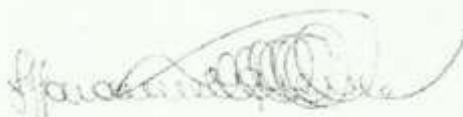
Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda (Examinador Interno - UFT)



Prof. Dr. Guilherme Benko de Siqueira (Examinador Externo)

Palmas, 06/07/2016

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



Prof<sup>a</sup>. Dra. Flávia Lucila Tonani de Siqueira

*“Entregue o seu caminho ao Senhor, confie nele  
e Ele tudo por ti fara”*

Salmo 37:6

## **AGRADECIMENTOS**

Ao bondoso Deus, que mostrou-se presente durante toda essa caminhada, criando todas as providencias à realização deste trabalho.

Aos meus pais, Joaquim Rodrigues de Moraes Sobrinho e Rute Pereira dos Santos, por todo amor, dedicação, incentivo e presença nos momentos mais difíceis.

À profa. Dra. Flávia Lucila Tonani de Siqueira, pela orientação, amizade, disponibilidade, conhecimentos transmitidos e estímulo durante todo o trabalho.

Ao prof. Dr. Guilherme Benko de Siqueira pela ajuda, conhecimentos transmitidos, os quais foram imprescindíveis para conclusão do trabalho.

Ao prof. Dr. Emerson Guarda pela contribuição na finalização do presente trabalho.

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

À comunidade técnica da Universidade Federal do Tocantins de forma geral, pela contribuição com conhecimento, vidrarias, instalações e reagentes para realização das análises.

Aos colegas de disciplinas pela companhia, em especial Itana Neiva Batista, Maria de Fátima Ribeiro pela parceria durante realização do trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração, condução assim como na elaboração do texto do presente trabalho.

## Lista de Figuras

Figura 1.	Composição típica da parede celular.....	15
Figura 2.	Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.....	17
Figura 3.	Visões das diferentes distribuições cristalinas e amorfas na microfibrila de celulose.....	18
Figura 4.	Esquema morfológico da parede da célula vegetal.....	20
Figura 5.	Esquema da associação celulose- hemicelulose- lignina na célula vegetal.....	20
Figura 6.	Esquema da produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica.....	23
Figura 7.	Efeito do pré-tratamento no material lignocelulósico.....	26

## Lista de Tabelas

Tabela 1.	Diferença entre celulose e hemicelulose.....	19
Tabela 2.	Métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	27
Tabela 3.	Comparação das características dos métodos de hidrólise.....	29
Tabela 4.	Composição bromatológica da braquiária CONVERT HD364 .....	32
Tabela 5.	Fração fibrosa (%FB) obtida após pré-tratamento (pré hidrólise) e diferença para FDN como porcentagem de matéria seca.....	48
Tabela 6.	Teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e hemicelulose, expressos em porcentagem da matéria seca original da forrageira submetida a doses crescentes de adubação nitrogenada.....	49
Tabela 7.	Coeficiente de digestibilidade ( $CD_{FDN}$ ) da braquiária CONVERT HD364 submetida a doses crescentes de adubação nitrogenada e hidrolisada por diferentes complexos enzimáticos.....	51
Tabela 8	FDN digestível da braquiária CONVERT HD364 submetida a doses crescentes de adubação nitrogenada e hidrolisada por diferentes complexos enzimáticos.....	53
Tabela 9	Rendimento de etanol (mL/Kg/MS) para braquiária CONVERT HD364 submetida a doses crescentes de adubação nitrogenada e hidrolisada por diferentes complexos enzimáticos.....	54
Tabela 10	Ajuste de regressão linear simples e múltipla para estimativa do potencial de produção de etanol (mL/Kg/MS) para os complexos enzimáticos Cellic CTec2 e Cellic HTec2.....	56

## SUMÁRIO

VIII

Lista de Figuras .....	7
Lista de Tabelas .....	8
INTRODUÇÃO GERAL .....	11
CAPITULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	13
1. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....	14
2. COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....	16
2.1 Celulose .....	16
2.2 Hemicelulose .....	18
2.3 Lignina .....	20
2.4 Outros componentes .....	20
3. ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR VEGETAL .....	21
4. ETANOL DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....	22
4.1 Etapas para produção do etanol lignocelulósico .....	24
4.1.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica .....	25
4.1.2 Hidrólise da biomassa .....	28
4.1.3 Fermentação do material lignocelulósico .....	29
5. GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL .....	30
5.1 Braquiária CONVERT HD364 .....	30
6. EFEITO DO NITROGÊNIO NAS GRAMÍNEAS E NA PRODUÇÃO DE ETANOL .....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
CAPITULO II: ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO POTENCIAL DE ETANOL DA BRAQUIÁRIA HÍBRIDA CONVERT HD364 SUBMETIDA A DOSES CRESCENTES DE ADUBAÇÃO NITROGENADA .....	40
RESUMO .....	41

ABSTRACT .....	42
INTRODUÇÃO .....	43
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
2.1 Local e tratamentos .....	44
2.2 Preparo da biomassa .....	45
2.3 Pré-tratamento do material .....	45
2.4 Parâmetros avaliados.....	46
2.5 Hidrólise enzimática .....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1 Caracterização do material pré-tratado para hidrólise enzimática.....	48
3.2 Fibra em Detergente Neutro (FDN), Fibra em Detergente Ácido (FDA) e Hemicelulose.....	49
3.3 Coeficiente de digestibilidade da fibra detergente neutro ( $CD_{FDN}$ ) e FDN digestível .....	51
3.3.1 Coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro ( $CD_{FDN}$ ).....	51
3.3.2 FDN digestível .....	53
3.4 Rendimento de etanol .....	54
3.5 Regressão linear .....	55
4. CONCLUSÃO.....	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
Anexos .....	63

## **INTRODUÇÃO GERAL**

A instabilidade mercadológica do petróleo, aliada à crescente preocupação das emissões de gases agravantes do efeito estufa, impulsionaram pesquisas de fontes energéticas alternativas e viabilização de sua utilização. O Brasil tornou-se líder mundial e pioneiro em pesquisa e produção de biocombustíveis, seja em sua forma isolada, como no caso do etanol ou através da misturas em combustíveis fósseis, como na gasolina e no uso de óleos vegetais/animais no diesel.

Atualmente a principal matéria prima utilizada na produção do etanol de primeira geração é a cana-de-açúcar, mas seguindo o pioneirismo, e, acompanhando interesse de países industrializados como os Estados Unidos e da Europa, o etanol de segunda geração - obtido através de fontes lignocelulósicas que não competem com a alimentação (MARQUES, 2012) - usando o bagaço e a palha proveniente do primeiro processo de produção, é uma realidade nacional, sendo produzido comercialmente desde 2014 (RAÍZEN, 2014). O crescente interesse de utilização dessa tecnologia se justifica pelo fato das incertezas dos combustíveis fósseis, da crescente demanda e da necessidade de segurança energética, assim como utilização mais viável economicamente de um resíduo nobre com grande potencial.

Entretanto, para obtenção em larga escala do etanol de segunda geração, alguns entraves são observados, destacando o processo tecnológico envolvido no pré-tratamento da matéria prima, que requer a utilização de tecnologias complexas, com rotas ácidas e/ou básicas para remoção da lignina, onerando o processo produtivo. Por outro lado, a grande disponibilidade e diversidade de biomassa lignocelulósica, principalmente gramíneas, torna-se imperativo e atraente no futuro próximo a sua utilização para fins energéticos, uma vez que atualmente 11% do consumo global de energia primaria total é proveniente de biomassa, com perspectivas de acréscimo para os próximos anos (MENDES, 2014).

Dentre as vantagens, pesquisadores desde final da década de 1980, apontam na utilização de gramíneas como matéria prima de produção de etanol

de segunda geração: adaptação e boa amplitude nas condições edafoclimáticas nacionais, podendo ser cultivadas em áreas marginais onde outras culturas energéticas não são recomendadas; ciclo perene, diminuindo o custo de produção, uma vez que, após estabelecida, torna-se necessária apenas a manutenção do potencial produtivo e, permitirem diversos cortes, necessitando apenas de pesquisas mais específicas e maiores incentivos para produção (USBERTI FILHO, 1988).

De acordo com Somma et al., (2010), estudos de gramíneas como fonte de biomassa na geração de energia expandem-se e revelam o etanol de segunda geração como alternativa viável e vantajosa em substituição dos derivados do petróleo, além de possuírem distribuição em todos os continentes do globo terrestre (SINGH; MISHRA, 1995). Sabendo que a adubação está intimamente ligada a produção foliar das forragens, e que o Nitrogênio é o macronutriente de maior responsabilidade para esse resultado, torna-se imperativo a pesquisa a cerca desse tema, visando o aumento dessa possibilidade, fazendo com que essa fonte seja mais atrativa quanto á sua utilização para fins energéticos.

Diante disso, o capim CONVERT HD364 (nome comercial dado a braquiária híbrida cultivar mulato II), pela empresa Dow AgroSciences, detentora dos direitos de sua comercialização, surge como uma possível alternativa energética. Possuindo alta eficiência fotossintética, alcançando até 100 cm de altura e boa projeção vertical e horizontal de cobertura vegetal, além de elevado volume e densidade de folhas (GUIOT e MELÉNDEZ, 2002). Tornando como possível matéria prima lignocelulósica, no contexto da utilização de gramíneas forrageiras na produção de etanol de segunda geração.

## **CAPITULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

## 1. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

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

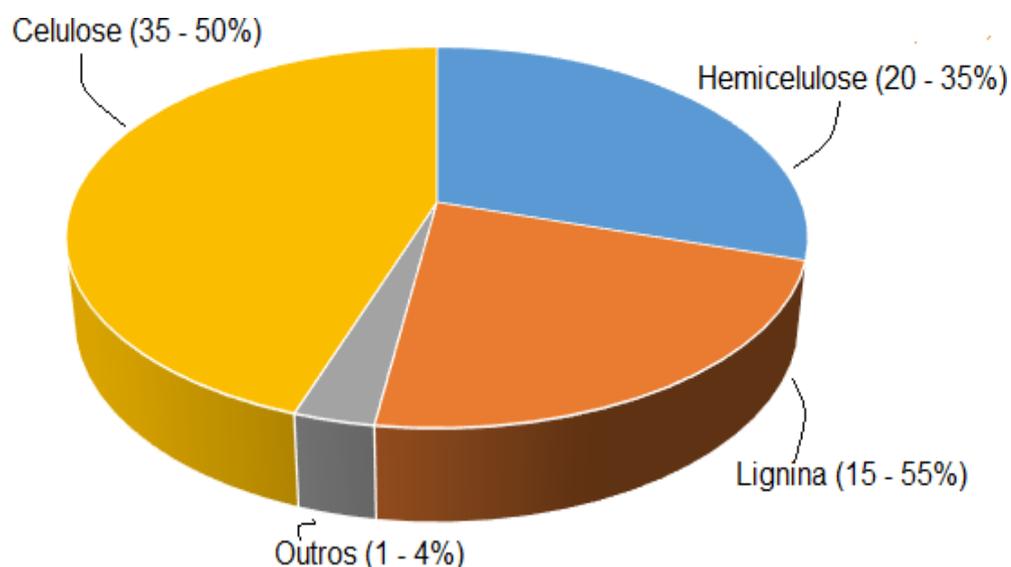
Frente as matérias primas amplamente utilizadas, como o petróleo e a cana de açúcar, destaca-se por ser a mais abundante, contínua e renovável fonte de carbono não-fóssil da terra (SINGH; MISHRA, 1995), e com distribuição em todo o globo terrestre, não concentrada apenas em algumas regiões como o petróleo, (HAHN-HAGERDAL et al., 2006). São exemplos de materiais lignocelulósicos: o bagaço da cana de açúcar, sabugo de milho, farelo de cevada, palha de arroz, palha de trigo, casca de aveia, palha de sorgo, palha de milho, semente de algodão, jornal, resíduos urbanos, casca de soja, resíduos da indústria do suco, como casa, sementes (AGUIAR, 2010; BIOFUELS, 2012; MENDES, 2014).

Biomassas forrageiras são consideradas materiais lignocelulósicas, constituídas de fibras de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses e lignina, tendo em sua composição química: celulose, hemicelulose, cinzas e extrativos (SANTOS et al., 2012), formada por tecidos constituídos por células com parede celular, cujas formas e tamanhos são variáveis conforme a espécie vegetal e tecido histológico inserido. A integridade destes tecidos depende da parede celular que em termos de estrutura, é formada pelas diversas camadas compostas por microfibrilas celulósicas orientadas no espaço de forma definida.

A parede celular possui como principais componentes químico-estruturais a celulose, a hemicelulose e a lignina. Tipicamente, a celulose (polímero de glicose) é a maior fração constituinte da parede celular, da ordem de 35-50%. Seguida da

hemicelulose (polímeros predominantemente constituídos de xilose, mas pode ter arobinose, galactose, glucose, manose e outros açúcares e derivados), na ordem 20-35% e a terceira fração, da ordem de 15 a 55% é de lignina (polímero de fenilpropeno que não pode ser decomposto à açúcar). Além de outros componentes presentes em menor quantidade, como: pectina, proteínas, extrativos e cinza (WYMAN, 1994). Tais distribuições de frações são mostradas na Figura 1.

**Figura 1.** Composição típica da parede celular



Fonte: Adaptação de WYMAN (1994).

Os três principais componentes da parede celular representam substratos que podem ser convertidos em produtos com potencial biotecnológico e energético e, fornece benefícios ambientais, econômicos e estratégicos em grande escala. Internamente as cadeias de celulose e hemicelulose são fixadas pela lignina e compactadas por ligações de hidrogênio, promovendo rigidez à planta, a lignina atua unindo esses componentes e agindo como barreira física ao ataque de microrganismos e água. A hemicelulose, proporciona a ligação entre a celulose e a lignina formando a rede fibrosa. Portanto, os dois maiores obstáculos

que impedem a hidrólise da celulose de materiais lignocelulósicos são: recalcitrância da própria celulose cristalina, proveniente da estrutura linear das cadeias de celulose compactadas e microfibrilas, e a alta proteção que a lignina garante à estrutura celulósica, atuando como uma barreira física contra o ataque enzimático (RABELO, 2010).

Sendo assim, devido essa estreita associação entre a celulose, hemicelulose e lignina, torna-se necessário submeter este material a um pré-tratamento para alteração dessa estrutura, permitindo que a lignocelulose fique mais acessível às enzimas que convertem os polissacarídeos a açúcares fermentescíveis. Essa sistemática configura como um dos principais desafios para produção em maior escala de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos. (RAMOS, 2003; TURA, 2014).

## **2. COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**

Segundo Tura (2014), os materiais lignocelulósicos são compostos de biopolímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose), lignina, extrativos e minerais em uma estrutura em menor quantidade. A celulose e a hemicelulose compreendem a maioria do material lignocelulósico e são os substratos que potencialmente serão utilizados para a produção de etanol de segunda geração (GÍRIO, 2010).

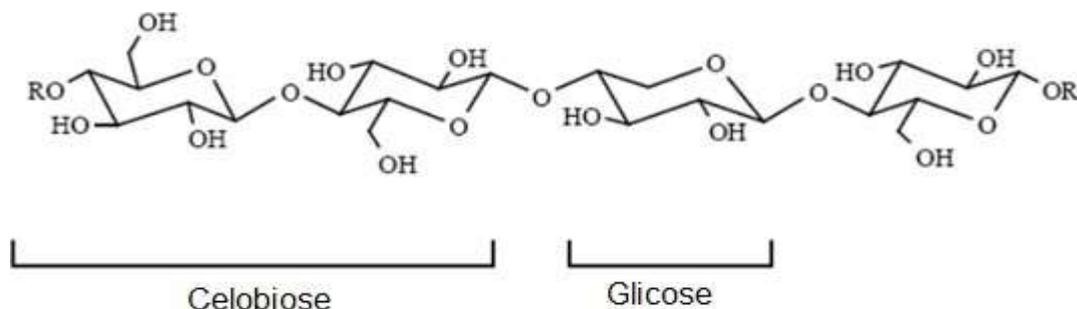
Os três maiores componentes poliméricos (celulose, hemicelulose e lignina) constituem 97-99% da massa seca dos lignocelulósicos, podendo possuir quantidades distintas em diferentes fontes lignocelulósicas (MOSIER et al., 2005).

### **2.1 Celulose**

A celulose é o principal componente da parede celular vegetal, considerada um glucano, ou seja, um polissacarídeo formado por unidades de glicoses unidas por ligações do tipo  $\beta$  (1-4) e cuja unidade repetitiva é a celobiose que é formada por anéis de  $\beta$ -D-glicopiranos e unidas por ligações do tipo  $\beta$ -D (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas (Figura 2). As moléculas de celulose são unidas por um complexo cristalino

denominado microfibrila, dispostas em relação à molécula adjacente de forma antiparalelas (FENGEL e WEGENER, 1989; GALDEANO, 2001).

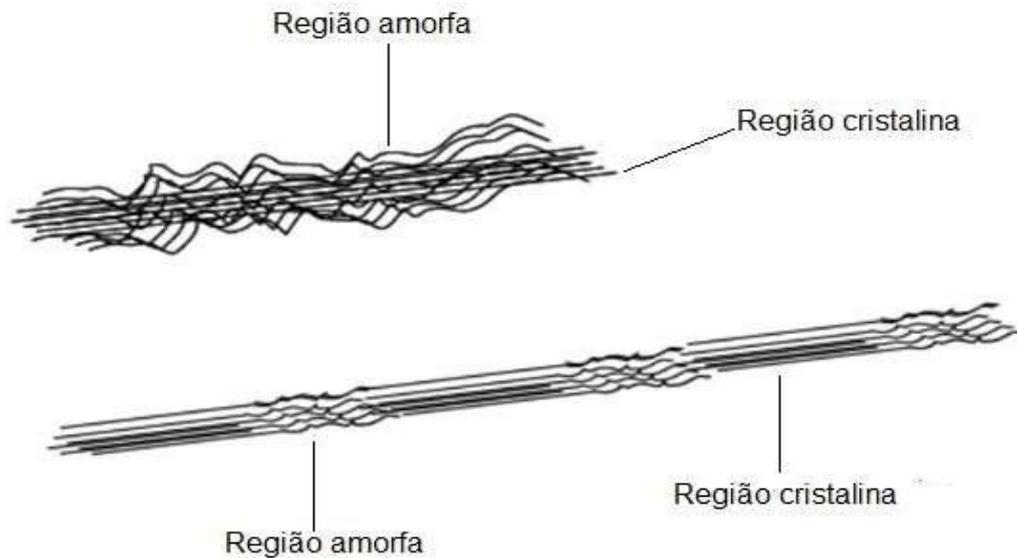
**Figura 2.** Estrutura da Celulose, parte central da cadeia molecular.



Fonte: Rabelo, 2010.

A ligação de várias celbioses constituem a cadeia linear de celulose, que ligam-se fortemente por ligações de hidrogênio formando fibrilas elementares, contendo tanto em regiões cristalinas como amorfas (LYND et al., 2002; RAMOS, 2003). A região cristalina é altamente ordenada, devido às numerosas ligações de ponte de hidrogênio intra e intermolecular. Já a região amorfa é menos ordenada apresentando orientação randomizada (Figura 3). A degradação da celulose cristalina é muito lenta quando comparada à porção amorfa, por isto, a degradação é iniciada nas partes amorfas, mais susceptíveis de serem hidrolisadas (GALDEANO, 2001; GARCIA, 2009).

**Figura 3.** Visões das diferentes distribuições cristalinas e amorfas na microfibrila de celulose.



Fonte: Rabelo, 2010.

A proporção entre as áreas cristalinas e amorfas variam de uma celulose para outra e são expressas em índice de cristalinidade (percentagem da área cristalina) (RAMOS, 2003). Estas características, juntamente com o envoltório de lignina, conferem à macromolécula de celulose grande resistência à hidrólise, representando desafio para a utilização desses materiais em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração (ARANTES e SADDLER, 2010).

## 2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolímero curto, formado por cadeias ramificadas de açúcares, que incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldohexoses, como glicose, manose e galactose, contendo ainda ácidos hexurônicos, como os ácidos  $\beta$ -D-glucurônico, D-4 Ometilglucurônico e  $\beta$ -D-galacturônico, e deoxiexoses (MENDES, 2014). Diferentemente da celulose,

apresenta baixa massa molecular (100-200 unidades glicosídicas) e não contém regiões cristalinas, sendo, portanto, mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas (SUN e CHENG, 2005).

Estruturalmente são mais parecidas com a celulose do que com a lignina, sendo depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação e sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003). Entretanto algumas diferenças podem ser observadas conforme apresentado na tabela 1 e

**Tabela 1.** Diferenças entre celulose e hemicelulose

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

Fonte: Bianchi (1995).

Apesar de constituídas por açúcares, existem diferenças reacionais entre a hemiceluloses e a celulose, devido a estrutura física de cada. Hemiceluloses são totalmente amorfas e menos resistentes ao ataque de agentes químicos, e, embora não haja evidências que a celulose e a hemicelulose estejam unidas quimicamente, as ligações de hidrogênio e a interpenetração física existente entre elas resulta em importantes propriedades para as fibras, contribuindo para o intumescimento, a mobilidade interna e o aumento da flexibilidade das fibras (BIANCHI, 1995).

### **2.3 Lignina**

De acordo com Tura (2014), é uma macromolécula tridimensional encontrada na parede celular vegetal, formada pela polimerização dos álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico, hidrofóbica e extremamente resistente à decomposição.

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

Além de lignina, celulose e hemicelulose, outros compostos minoritários estão presentes nos materiais lignocelulósicos (FENGEL & WEGENER, 1989).

### **2.4 Outros componentes**

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

Os extrativos podem ser extraídos com solventes orgânicos ou aquosos e determinam algumas características da planta como cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, sabor e propriedades abrasivas (FENGEL e WEGENER, 1989). Os não-extrativos consistem em compostos inorgânicos como sílica, carbonatos e oxalatos. Estes componentes podem gerar problemas na

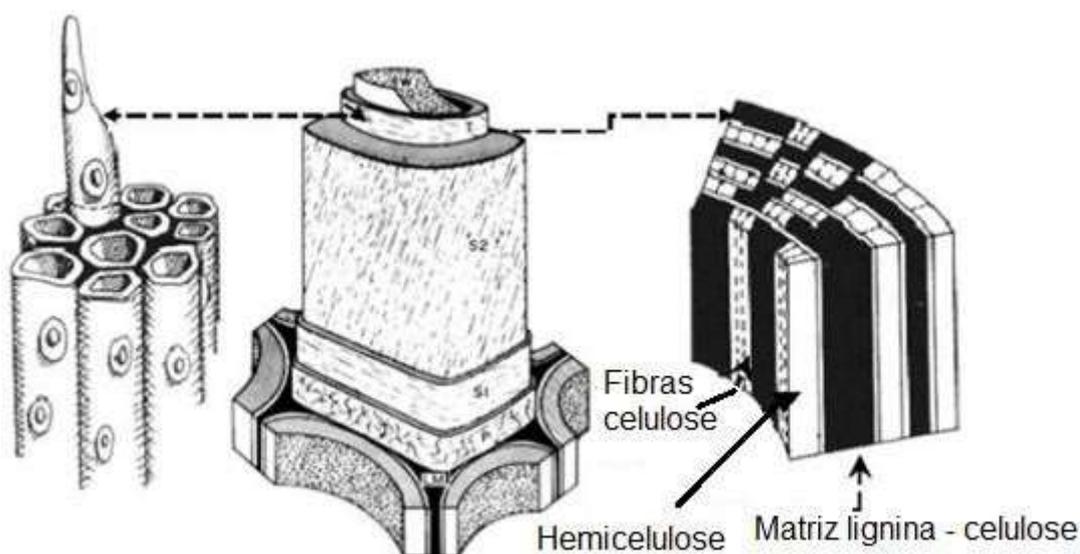
bioconversão devido à presença de inibidores durante o pré-tratamento do material (McMILLAN, 1996).

### 3. ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR VEGETAL

De acordo com Fengel e Wegener (1989), a parede celular vegetal é dividida em parede primária, parede secundária e parede terciária. Sendo composta na maioria por celuloses separadas pela lamela média, camada fina, composta por alta concentração de lignina.

A parede primária é a camada mais fina da parede celular e a primeira a ser depositada nas células. Celulose e hemicelulose são predominantes na região da parede celular e a lignina é distribuída por toda essa estrutura, apresentando concentração máxima na lamela média (Figura 4).

**Figura 4.** Esquema morfológico da parede da célula vegetal.

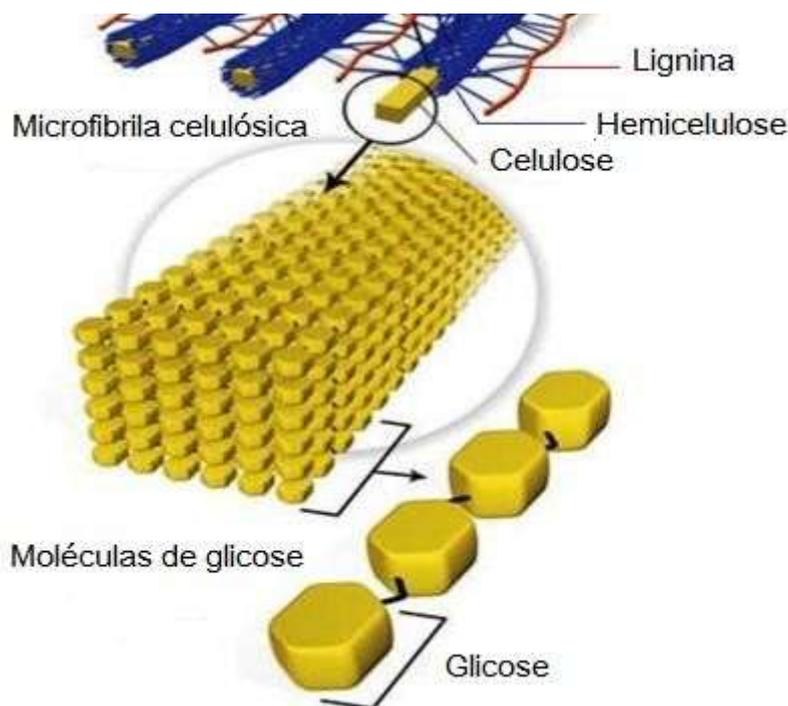


Fonte: Mendes, 2014.

A celulose é presente na forma de microfibrilas e os microcapilares circundantes da armação da parede celular são preenchidos com hemicelulose e lignina (Figura 5). A hemicelulose liga-se através de ligações de hidrogênio às

microfibrilas da celulose, formando uma rede que fornece a espinha dorsal estrutural da parede celular da planta. Enquanto a lignina em algumas paredes celulares conferem força adicional e resistência a pragas e doenças nas plantas.

**Figura 5.** Esquema da associação celulose - hemicelulose - lignina na célula vegetal.



Fonte: Santos et. al., 2012.

#### 4. ETANOL DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Segundo Martelli (2014), o crescente interesse no desenvolvimento de fontes alternativas de energia, como a utilização de material lignocelulósico para produção de etanol de segunda geração, foi impulsionado pelas quebras de safras agrícolas mundiais, que afetam diretamente a produção do etanol de primeira geração e também a crise economia culminada em 2010, que assola diversos países até hoje.

Surgindo então uma nova perspectiva para o cenário energético mundial, com vasta possibilidade de utilização de diversos materiais como fonte

energética, uma vez que utiliza-se como matéria prima a biomassa vegetal, com destaque para a celulose, presente nesse material. O esquema de produção do etanol a partir de biomassa lignocelulósica é apresentado na Figura 6.

**Figura 6.** Esquema de produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica.



Fonte: MARTELLI, 2014.

Nos Estados Unidos a utilização do sorgo para essa finalidade apresenta-se em grande expansão, assim como na Índia e nas Filipinas, com presença de plantas piloto, para produção a partir das palhas de milho, colmo e folhas de sorgo e da cana de açúcar. No Brasil, estima-se que até o meados da década de 2010, usinas pilotos estejam sendo operadas em parceria com indústrias internacionais (FAO, 2011; PETROBRAS, 2012).

De acordo com Carmona et al., (2014), grande parte da celulose e hemicelulose encontrada no material lignocelulósico pode ser convertido em açúcares fermentescíveis, através da hidrólise enzimática/ácida. E outros subprodutos do processo poderão ser obtidos durante a fermentação desses açúcares, sendo o etanol, o de maior interesse, por se tratar de um combustível.

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

O etanol de segunda geração representa para o Brasil: maior produção sem aumento da área cultivada, aumento do percentual de produção por hectare plantado da biomassa, utilização de matéria prima renovável, sustentabilidade na produção, racionalidade no uso dos recursos naturais e mais etanol no mercado interno e possivelmente externo (PETROBRAS, 2012).

O estudo da utilização de gramíneas como fonte dessa biomassa, apresenta-se como uma alternativa viável e vantajosa à ser empregada junto ou como substitutivo às empregadas e disponíveis atualmente (SOMMA et al., 2010). E além de contribuir para redução da emissão de gases de efeito estufa e ciclagem de carbono no solo, o controle de uma tecnologia para produção de bioenergia, relaciona-se diretamente com a soberania nacional, tornando o país mais competitivo a nível internacional (MARTELLI, 2014).

#### **4.1 Etapas para produção do etanol lignocelulósico**

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

De acordo com Cardona et al., (2010), características intrínsecas aos materiais lignocelulósicos causam dificuldade na produção do etanol. Nesse sentido, destacam-se a ligação química entre a celulose e hemicelulose e a ligação entre a lignina e hemicelulose, constituindo persistente barreira ao ataque

hidrolítico. No processo enzimático, a lignina atua como uma barreira física para as enzimas que podem ser irreversivelmente capturadas pela lignina e a natureza cristalina da celulose representa uma limitação adicional ao processo.

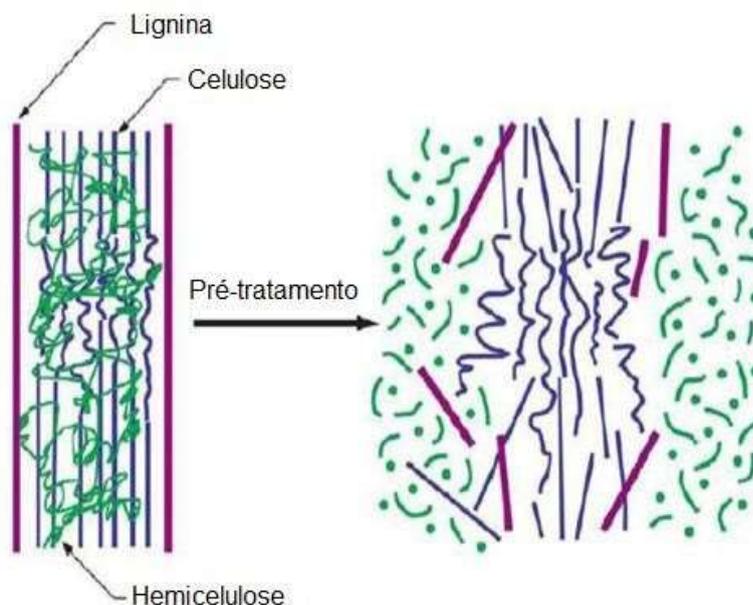
Por isso, Sarkar et al., (2012), salienta a importância da etapa do pré-tratamento do material lignocelulósico, pois o mesmo visar a desagregação da lignina e hemicelulose, redução do caráter cristalino da celulose e um incremento a porosidade do material, configurando maior susceptibilidade à hidrólise enzimática/ácida e conseqüentemente possível maior conversão em açúcares fermentescíveis.

#### **4.1.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica**

Segundo Santos et al., (2012), o pré-tratamento do material lignocelulósico é de extrema importância no processo de obtenção de açúcares fermentescíveis, consistindo no rompimento da barreira protetora da lignina e conversão da estrutura recalcitrante da biomassa a fim de tornar os carboidratos mais acessíveis ao ataque químico/enzimático, aumentando 80% ou mais a obtenção de açúcares fermentescíveis (HAMELINCK et al.,2005).

O pré-tratamento influencia diretamente no custo das demais etapas da produção (RABELO, 2010). Sendo imprescindível portanto que seja eficiente em termos de rendimento, seletividade, funcionalidade, simplicidade operacional, segurança, higiene industrial e utilização reduzida de insumos químicos e energia (BAUDEL, 2006). O efeito do pré-tratamento é apresentado na Figura 7.

**Figura 7.** Efeito do pré-tratamento no material lignocelulósico



Fonte: WOLF, 2011.

E pode ser agrupado em quatro categorias: físico, químico, biológico ou uma combinação de todos esses.

O pré-tratamento físico é baseado na redução mecânica das partículas da biomassa para aumentar a área de superfície e em alguns casos, pela redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose e promovendo a ação enzimática (OGEDA et al., 2010).

O tratamento químico é o mais utilizado na indústria e pode ser ácido, alcalino ou oxidativo. No pré-tratamento ácido, utiliza-se soluções de reagentes ácidos diluídas de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico ( $NHO_3$ ) e ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), entretanto devido ao poder corrosivo e a

necessidade de recuperação desses reagentes para viabilização econômica, apresentam-se dificuldades em sua utilização (AGBOR et. al., 2011).

A Tabela 2 resume algumas técnicas de pré-tratamentos avaliadas para os materiais lignocelulósicos com o objetivo de facilitar a hidrólise enzimática (RABELO, 2007).

**Tabela 2.** Métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

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

Fonte: MENDES, 2014.

Diversas vantagens e desvantagens são apresentadas conforme o tipo de pré-tratamento estabelecido (GARZON FUENTES, 2009). Por isso, o utilizado deve-se adequar à facilidade e as singularidades das condições presentes e apresentar eficiência quanto à sua finalidade, que consiste na redução do grau de cristalinidade da celulose, dissociação do complexo lignina - celulose, aumento da área superficial da biomassa e maximização do rendimento em açúcares.

#### **4.1.2 Hidrólise da biomassa**

De acordo com Rabelo (2010), existem três técnicas basicamente para hidrólise de materiais lignocelulósicos, sendo elas através de: ácidos concentrados, ácidos diluídos ou por enzimas, apresentando cada uma vantagens e desvantagens.

Na utilização de ácidos concentrados, a celulose e hemicelulose são degradadas por soluções aquosas de ácidos minerais, tais como o sulfúrico, clorídrico e fosfórico, em baixas temperaturas (abaixo de 100°C). Entretanto, a utilização desse método requer equipamentos resistentes à corrosão, devido a utilização desses ácidos, além de, tipicamente a hemicelulose ser hidrolisada mais rapidamente comparada a fração de celulose, ficando portanto os monossacarídeos da hemicelulose expostos por maior tempo no meio reacional, levando a degradação e perda de açúcares. Outra peculiaridade dessa técnica é a necessidade de recuperação do ácido utilizado, por razões econômicas e ambientais (SZENGYEL, 2000).

Segundo Wyman (1994), no processo de utilização de ácidos diluídos, as condições de hidrólise da hemicelulose e celulose podem ser otimizadas, pois parte de cada uma delas são hidrolisadas separadamente, podendo a hemicelulose ser removida após o primeiro passo da hidrólise. Contudo, altas temperaturas aplicadas na segunda parte (200°C aproximadamente), provoca degradação de açúcares e de lignina solúvel, causando inibição durante o processo de fermentação (CLARK e MACKELI, 1984; LARSSON et al., 1998).

No processo de hidrólise enzimática, a biomassa primeiramente é submetida ao pré-tratamento, com finalidade de aumentar ação das enzimas. Durante esse processo a hemicelulose é hidrolisada e na hidrólise propriamente dita, através de enzimas celulasas a celulose é quebrada do material lignocelulósico, esse método origina uma menor quantidade de subprodutos, e também resulta em alto rendimento de açúcares fermentescíveis. Apresentando vantagens importantes quando comparado a utilização dos ácidos, no contexto de

produção de etanol de material lignocelulósico, atingindo altos rendimentos após a conversão (RABELO, 2010).

A tabela 3 apresenta características de cada método de hidrólise do material lignocelulósico apresentado.

**Tabela 3.** Comparação das características dos métodos de hidrólise.

Tipo de hidrólise	Consumo	Temperatura (°C)	Tempo	Rendimento de Glicose
Ácido concentrado	30-70% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40	2-6 horas	90%
Ácido diluído	< 1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	aprox. 200	3 minutos	50-70%
Enzimática	Celulase	50	1,5 dias	75-95%

Fonte: Adaptação de Hamelinck et al., 2005.

Todavia, torna-se necessário a viabilização do uso das enzimas, considerando o elevado custo das mesmas, para que o processo de produção de possa ser mais competitivo em relação as demais rotas de produção de biocombustíveis de larga escala.

#### 4.1.3 Fermentação do material lignocelulósico

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

## 5. GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

Os principais usos das gramíneas como insumo energético atualmente são para a produção de energia térmica como na queima em fornos de carvão vegetal na forma de peletização além do uso tradicional na nutrição animal. No entanto, estudos com diversas gramíneas usadas como culturas energéticas vêm crescendo nos Estados Unidos e na Europa (MARTELLI, 2014).

Contudo, desde o final da década de 1980, observa-se interesse no estudo de gramíneas forrageiras como matéria prima na produção de etanol de segunda geração. Usberti Filho et al., (1988), aponta uma série de variáveis favoráveis à essa utilização, tais como: facilidade de plantio e cultivo; boa amplitude de adaptação à grande parte das condições ambientais; possibilidade do cultivo em áreas marginais; baixo investimento, frente à outras culturas bioenergéticas e possibilidade de diversas colheitas, uma vez que na maioria são plantas perenes.

No cenário nacional os capins do gênero *Brachiaria* estão entre as gramíneas mais amplamente utilizadas. Características intrínsecas desses matérias, como a facilidade de estabelecimento e boa produtividade, tolerância ao ataque de pragas e a solos de baixa a média fertilidade, e ao manejo inadequado, assim como sua versatilidade as tornaram muito popular e utilizadas (ALMEIDA, 2014).

Em pesquisas por materiais com maior produção forrageira, valor nutritivo e caracterizas mais favoráveis à utilização, foi lançado em 2005 pelo CIAT um híbrido de *Brachiaria* spp., denominado capim Mulato II (CIAT 36087), conhecido comercialmente como CONVERT HD364, o qual tem despertado grande interesse aos produtores pecuaristas devido seu potencial produtivo, e conseqüentemente também na área de pesquisas para sua utilização para fins energéticos, como produção de etanol de segunda geração (ARGEL et al., 2007)

### 5.1 Braquiária CONVERT HD364

CONVERT HD364 é o nome comercial dado à Braquiária híbrida cultivar Mulato II (CIAT 36087) pela empresa Dow AgroSciences atualmente detentora

dos direitos de comercialização desse material. Esse capim é resultado de 20 anos de pesquisa genética em braquiárias realizadas pelo programa de forragens tropicais do CIAT em colaboração com outras instituições de pesquisa, como a Embrapa. Constitui em um híbrido resultante de três gerações de cruzamento, iniciados em 1989 entre *Brachiaria ruziziensis* clone 44-6 tetraploide sexual e *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, tetraploide apomítica (ALMEIDA, 2014).

A CONVERT HD364 é uma gramínea perene e vigorosa, de crescimento semi-ereto, que pode alcançar até 1 m de altura sem incluir a inflorescência. Seus talos são cilíndricos, pubescentes e vigorosos de coloração verde intenso com 55 a 80 cm de comprimento, podendo apresentar hábito semi-decumbente com capacidade de enraizamento quando em estreito contato com o solo (como, por exemplo, por pisoteio dos animais). Com número de folhas variando de 9 a 10 por talo, que se projeta vertical e horizontalmente até a cobertura vegetal, compondo elevada densidade e volume, são lineo-triangulares (lanceoladas) de aproximadamente 3,8 cm de largura com coloração verde intenso e abundante pubescência em ambos os lados da lâmina. A lígula é curta e membranosa e a inflorescência é uma panícula com 4 a 6 ráculos, com fileira dupla de espiguetas, que tem aproximadamente 5 mm de comprimento e 2 mm de largura. Estas apresentam, durante a antese, estigmas de cor creme, contrastando com todas as demais cultivares comerciais do gênero *Brachiaria*, que apresentam estigmas de cor alaranjada e o sistema radicular é profundo e ramificado.

Possuindo, segundo Argel (2007), boa adaptação a uma ampla faixa de localidades, incluindo aquelas com solos ácidos e de baixa fertilidade, característicos de regiões tropicais, e com moderada umidade. Com necessidade de precipitações pluviométricas anuais mínimas de 600 mm, não tolerando solos encharcados e com produção de 25 a 35 toneladas de matéria seca por ano, e apresentando ainda, média a alta exigência em fertilidade de solo (PIRES, 2006).

Pequeno (2014), trabalhando com três capins: *Brachiaria brizanta* cv. Marandu, Tifton 86 (*Cynodon* spp.) e CONVERT HD364, irrigados e não irrigados sob diferentes níveis de adubação, concluiu ser a CONVERT HD 364, uma boa

opção de diversificação e intensificação de produção, apresentando alta produção de forragem e valor nutritivo superior à outros capins, quando bem adubado, manejado e irrigado. As características bromatológicas da CONVERT HD364 são apresentadas na tabela 4.

**Tabela 4.** Composição bromatológica da braquiária CONVERT HD364.

<b>MS %</b>	<b>PB%</b>	<b>FDA%</b>	<b>FDN%</b>	<b>Lignina%</b>
20	15	32	62	6,32

Fonte: adaptada de book CONVERT, 2012.

Teodoro (2011), em estudo de suas características produtivas sem adubação e colhido com diferentes alturas de resíduo, concluiu que o CONVERT HD364 apresenta boa produção de forragem, assim como maior teor de proteína bruta, quando comparado ao Marandu (DEMSKI, 2013). Os teores de fibra em detergente neutro, fibra em deter

Sendo intrínseco assim a importância do efeito da adubação na produção de forragem desse material, principalmente da nitrogenada, que concerne um dos objetivos desse trabalho. Considerando que maior a quantidade produzida, conseqüentemente mais provável a viabilidade dessa planta como fonte lignocelulósica para produção de bioetanol de segunda geração.

## **6. EFEITO DO NITROGÊNIO NAS GRAMÍNEAS E NA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Segundo Horchani et al., (2011), o nitrogênio é o principal nutriente para manutenção da produtividade das gramíneas, estando relacionado ao seu ciclo de desenvolvimento, presente como constituinte de proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas e interferindo diretamente no processo fotossintético, por ser um constituinte da molécula de clorofila.

Esse nutriente promove a ativação de tecidos meristemáticos da planta, aumentando o índice de área foliar e produção de matéria seca. Estando

relacionado ainda tanto ao aparecimento quanto a mortalidade de perfilhos e seu déficit aumenta a quantidade de gemas dormentes, configurando menor desenvolvimento da planta (ADESE, 2006; MOREIRA et al., 2006). Plantas com suprimento têm rápida recuperação do tecido foliar, a partir das gemas aéreas, enquanto que as com menor suprimento, têm baixa recuperação (ALEXANDRINO et al., 2005).

Segundo Souza (2014), o nitrogênio influencia grande parte das características morfogênicas do híbrido CONVERT HD 364, tais como: a taxa de aparecimento, alongamento e comprimento das folhas, número de perfilho, alongamento do pseudocolmo e senescência de folhas.

Por estar relacionado a todo processo de desenvolvimento da planta e consequentemente da parede celular vegetal, representado pela celulose, hemicelulose e lignina, esse nutriente relaciona-se a capacidade produtiva do etanol, uma vez que o processo produtivo se dá pela hidrólise desses componentes objetivando tornar os açúcares ali presentes passíveis à fermentação (CASTAGNARA et al., 2011).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESE, B. L. **Características morfofisiológicas e acúmulo de forragem em capim Mombaça submetido a regimes de desfolhação**. 2006. Tese (Doutorado em Zootecnia), Viçosa, Minas Gerais. Universidade Federal de Viçosa – UFV, 221p. 2006.

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

AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**. v. 29, n. 6, p.675-685, 2011. Disponível em: ><http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0734975011000607?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 26 jun. 2016.

ALEXANDRINO, E.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; MOSQUIM, P. R. REGAZZI, A. J.; ROCHA, F. C. Características morfogênicas e estruturais na rebrotação da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu submetida a três doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n.6, p.1372-1379, 2005.

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

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

ARGEL, P. J.; MILES, J. W.; GUIOT, J. D.; CUADRADO, H.; LASCANO, C. E. **Cultivar mulato II (*Brachiaria hybrid CIAT 36087*): high-quality forage grass, resistant to the spittlebug and adapted to well-drained acid tropical soils**. Cali: International Center for Tropical Agriculture, 2007. 21p.

BAUDEL, H. M. Pré-tratamento e hidrólise In: Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para produção de etanol, projeto programa de pesquisas em políticas públicas. 3, 2006. Campinas, São Paulo. Unicamp. 2006. Disponível em: [www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/hidrolise%20Baudel%20Apresenta%E7%E3o.pdf](http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/hidrolise%20Baudel%20Apresenta%E7%E3o.pdf). Acesso em: 22 jun. 2016.

BIOFUELS PLATFORM (2012). Disponível em: < <http://www.biofuels-platform.ch/en/home/index.php> >. Acesso em: 20 jun. 2016.

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

DEMSKI, J. B. **Desempenho e comportamento de vacas lactantes em cultivares de braquiárias**. 2013. Dissertação (mestrado). Instituto de Zootecnia. Nova Odessa. São Paulo, 2013.

CLARK, T. A.; MACKIE, K. L.; DARE, P. H.; McDONALD, A. G. Steam explosion of the softwood *Pinus radiata* with sulphur dioxide addition, II characterization. **Journal of Wood Chemistry and Technology**. v.9, pág135-166, 1989.

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

FAGUNDES, J. L.; FONSECA, D. M.; GOMIDE, J. A. Acúmulo de forragem e pastos de *Brachiaria decumbens* adubados com nitrogênio. In: **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.4, 2005.

FAO STATISTICAL YEARBOOK - *World Food and Agriculture*, pg 138. ISSN 2225- 7373, 2011.

FENGEL, D.; WEGENER, G.; *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, Walter de Gruyter: Berlin, 1989.

FORBES. 2012. Disponível em:  
<http://www.forbes.com/sites/williamopentland/2012/07/28/the-coming-food-crisis-blame-ethanol/>. Acesso em: 13 fev. 2016.

GALDEANO, M. C. **Caracterização e aplicação de casca de aveia modificada por tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino associado à extrusão**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.

GARCIA, D. R. **Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior**. Universidade Estadual De Campinas, 2009.

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

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 4775–4800, 2010.

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

GUIOT, G.J.D. MELÉNDEZ, N. F. 2003. Brachiaria híbrida (CIAT 36061): Excelente alternativa para produção de carne y leche em zonas tropicales. **Boletín Técnico**. Villahermosa Tabasco, México. 16p.

HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORNA-GRAUSLUND, M. F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. Bioethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v.24, n.12, p.549-556, 2006.

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

HOFVENDAHL, K; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. **Enzyme and Microbial Technology** , v. 26, n. 2-4, p.87-107, 2000. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0141022999001556?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 14 de mai. 2016.

HORCHANI, F.; ASCHI-SMITI, S.; BROUQUISSE, R. Involvement of nitrate reduction in the tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants to prolonged root hypoxia. **Acta physiologiae plantarum**. Amsterdam, v. 32, n. 6, p. 1113-1123, 2011.

LARSSON, S., PALMQVIST, E., HAHN-HAGERDAL, B., et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme Microb. Technol.** v.24, pág151-159, 1998.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MARQUES, L. M. V. A. **Produção de bioetanol a partir de resíduos agroindustriais**. 2012. 69p. Dissertação (Mestrado de Energias Renováveis e Gestão de Energia) – Universidade do Algarve. Faro, 2012.

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

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

NASCIMENTO, J. R. A. **Monitoramento em tempo real de processos fermentativos por espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS)**. 2012. 145 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.

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

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

MIRANDA, C. Biofuel production from water hyacinth in the Pantanal Wetland. USDA. Agricultural Reserch Service. **Ecology & Hydrology**. v.12, n1. pág 77-87, 2010.

MOREIRA, L. M.; MARTUSCELLO, J. A.; FONSECA, D. M. Perfilhamento, acúmulo de forragem e composição bromatológica do capim-braquiária adubado com nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.9, p.1675-1684, 2009.

ODEGA, T. L.; PETRI, T. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**. v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2011.

PEQUENO, D. N. L. **Agronomic performance and adaptation of the CROPGRO – Perennial Forage Model to predict growth of three tropical forage grasses under irrigated andrainfed conditions**. 2014. 114p.. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

PIRES, W. **Manual de pastagem: formação, manejo e recuperação**. Viçosa: Ed. Aprenda Fácil, 2006. São Paulo. p.64-74.

RABELO, A. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 180p. Dissertação (Mestrado em engenharia química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2007.

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

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

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

SARKAR, N.; GOSH, S. K.; BANNERJEE, S. AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes. **Renewable Energy Índia**, p.19-27, 2012.

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

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

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

SOUZA, W. R. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. 123p. 2013.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, maio 2002. **Elsevier B.V.** Disponível em: <<http://api.elsevier.com>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

SZENGYEL, Z. Ethanol from wood cellulase enzyme production. 2000. PhD Tesis. Lund University, Sweden, p. 54, 2000.

RAÍZEN. Tecnologia em energia renovável: etanol de segunda geração. Disponível em:<http://www.raizen.com.br/energia-do-futuro-tecnologia-em-energiarenovavel/etanol-de-segunda-geracao>. Acesso em: 17 fev. 2016.

TEODORO, M. S. R. Características produtivas e bromatológicas dos capins marandu e mulato II. 2011. 58p.. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2011.

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

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

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

WOLF, L. D. Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligomêros – Dissertação – Universidade Federal de São Carlos, 2011.

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

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. **Bioresour. Technol.** v.96, 1959.

**CAPITULO II: ESTIMATIVA DA PRODUÇÃO POTENCIAL DE ETANOL DA  
BRAQUIÁRIA HÍBRIDA CONVERT HD364 SUBMETIDA A DOSES  
CRESCENTES DE ADUBAÇÃO NITROGENADA**

## **RESUMO**

A crescente demanda energética mundial atrelada a preocupação quanto a emissão de gases agravantes do aquecimento global, tornam imprescindíveis desenvolvimento de sistemas energéticos mais sustentáveis. Dentro desse contexto, a utilização de biomassa vegetal para produção de biocombustíveis como o etanol, se apresenta como grande atrativo para pesquisas. Diante disso, nesse trabalho foi estudado o efeito da adubação nitrogenada na produção de biomassa da braquiária híbrida CONVERT HD364, submetida a hidrólise por dois complexos enzimáticos estimando a capacidade produtiva de etanol a partir desse material. Os níveis de adubação nitrogenada foram: 0, 100, 200 e 300 Kg N.ha<sup>-1</sup> e os complexos utilizados: Cellic CTec2 e Cellic HTec2. O delineamento experimental, inteiramente casualizado em Esquema Fatorial 4x2, com quatro repetições. A dose de 300 Kg N.ha<sup>-1</sup> com utilização do complexo Cellic HTec2 apresentou maior produção de etanol (351,66 mL/Kg MS), e embora pequeno, houve efeito da adubação na produção como um todo desse biocombustível para o material estudado.

**Palavras-chave:** sustentáveis, etanol, doses de nitrogênio, biomassa lignocelulósica.

## **ABSTRACT**

Growing global energy demand linked to concerns about the issue of aggravating gases of global warming, make it essential development of more sustainable energy systems. Within this context, the use of plant biomass for biofuels such as ethanol is presented as a major attraction for research. Thus, this work was studied the effect of nitrogen fertilization on biomass production of hybrid braquiária CONVERT HD364, comparing the hydrolysis of two enzyme complexes and the production capacity of ethanol from this material. The nitrogen fertilizer levels were 0, 100, 200 and 300 kg N.ha<sup>-1</sup> and used complex: Cellic CTec2 and Cellic HTec2. The experimental design was completely randomized in factorial scheme 4x2, with four replications. The dose of 300 kg N.ha<sup>-1</sup> with use of Cellic HTec2 complex showed higher ethanol production (351, 66 mL / Kg / MS), and although small, was no effect of fertilization on production as a whole this biofuel to the material studied

**Key-words: Sustainable, ethanol, nitrogen, lignocellulosic biomass.**

## INTRODUÇÃO

A necessidade de ampliação da matriz energética, aliada a demanda crescente por combustíveis e preocupação quanto a emissão de gases agravadores do efeito estufa, impulsionaram o desenvolvimento de sistemas energéticos mais sustentáveis que utilizam matérias primas renováveis, como a biomassa vegetal na produção de etanol de segunda geração.

Tradicionalmente, da fermentação e destilação de açúcares provenientes de materiais como a cana-de-açúcar e amido de milho, obtém-se o etanol combustível de primeira geração, entretanto, esse modelo produtivo necessita de grandes quantidades de insumos e áreas, causando impactos na biodiversidade, no solo e água. Logo, a viabilidade desse modelo torna-se questionável, dada a ocupação de áreas agricultáveis e ao duplo propósito do uso dos grãos (MAIRESSE, 2015).

A utilização da biomassa lignocelulósica torna-se uma fonte de matéria prima atraente a ser utilizada, pois é abundante, permanente, subutilizada e possui custos menores que a biomassa cultivada com propósito de geração do etanol convencional, e seu aproveitamento diminui a competição do uso da terra, pois trata-se de um resíduo e não um alimento (LYND et al., 2002; FAO, 2014).

Segundo Carvalho (2009), o distanciamento da disputa alimento-energia, quando utilizado matérias primas lignocelulósicas, reforçam a ideia de que o desenvolvimento de uma fonte energética eficiente pode ter efeito decisivo na consolidação da tecnologia de segunda geração tanto para o mercado interno (em regiões não produtoras de cana-de-açúcar) quanto para o mercado externo.

Nesse contexto, a utilização de braquiárias, como material lignocelulósico, apresenta características favoráveis para produção do etanol combustível, destacando a adaptabilidade às condições climáticas variadas, boa produtividade e capacidade hidrolítica, somado ao fato do melhoramento genético ser voltado para obtenção de cultivares ainda mais produtivas e conseqüentemente mais viáveis para o emprego energético (BATISTA, 2016).

Diante do potencial da biomassa lignocelulósica, sobretudo pelas características favoráveis, surge a braquiária híbrida CONVERT HD364, como uma opção a ser pesquisada visando a produção de etanol de segunda geração, uma vez que esse material foi desenvolvido geneticamente para regiões tropicais e para variedade de condições edafoclimáticas encontradas (ARGEL, 2007).

Contudo, mesmo com diversos pontos favoráveis, o potencial dos biopolímeros presentes nesses materiais ainda não foi plenamente explorado e a estreita associação entre a celulose, hemicelulose e lignina, configuram um desafio à popularização desse bioprocessos, além de que a quantidade desses constituintes podem ser influenciados por diversos fatores, como fertilidade do solo, especialmente pelo macronutriente nitrogênio (AGBOR et al., 2011, SUN et al., 2010).

Diante de todos os desafios, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de doses crescentes de adubação nitrogenada no potencial de produção de etanol da braquiária híbrida CONVERT HD364, após hidrólise por dois complexos enzimáticos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Local e tratamentos**

O estudo foi conduzido no laboratório de solos e aproveitamento de resíduos da Universidade Federal do Tocantins (UFT). A biomassa estudada foi a braquiária híbrida cultivar Mulato II (CIAT 36087) CONVERT HD364, submetida a quatro diferentes níveis de adubação nitrogenada, oriundas da ureia, sendo constituídos por: 0, 100, 200 e 300 kg.ha<sup>-1</sup> e o emprego de dois complexos enzimáticos: Cellic CTec2 e Cellic HTec2, com finalidade de produção de etanol.

Para o primeiro tratamento empregou-se o complexo enzimático Cellic CTec2 batelada VCNI0013 e, no segundo utilizou-se o complexo Cellic HTec2 batelada VHN00003, da empresa Novozymes. Ambos complexos, promovem a conversão do material de hidratos de carbono em açúcares simples antes da

fermentação. O produto Cellic CTec2 é uma mistura de celulases agressivas, com alto percentual de  $\beta$ -glucosidase e hemicelulase. O Cellic HTec2 contém endoxilanase que tem alta especificidade para a hemicelulose solúvel.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em Esquema Fatorial 4x2, com quatro repetições, resultando em 32 parcelas.

## **2.2 Preparo da biomassa**

Foram coletas amostras referentes a cada nível de adubação nitrogenada e secas em estufa de ventilação forçada a 65°C até obterem peso constante. Em seguida essas amostras foram moídas em moinho de facas com peneira de 20 mesh.

## **2.3 Pré-tratamento do material**

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

A metodologia utilizada para o pré-tratamento assemelha-se à determinação de fibra bruta (FB), descrita por Silva e Queiroz (2012), diferindo nas concentrações do ácido e da base que são 1,25% para ambos. Nesse sentido no presente trabalho, a proporção de material pré-tratado (resíduo obtido após o pré-tratamento) equivale a FB. Esses valores foram comparados aos teores de FDN, com finalidade de avaliar o potencial grau de perda de hemicelulose que ocorreria eventualmente durante o pré-tratamento

## 2.4 Parâmetros avaliados

Os parâmetros avaliados foram: fibra em detergente neutro (FDN); fibra em detergente ácido (FDA); hemicelulose; coeficiente de digestibilidade do material ( $CD_{FDN}$ ); quantidade de FDN digestível e a estimativa de produção de etanol.

Os teores de FDN e FDA foram determinados pela metodologia descrita por Van Soeste (1979). Pesou-se 1,0 grama de amostra seca que passou por processo de hidrólise em solução de fibra em detergente neutro por 60 minutos à temperatura de 120 a 125 °C no equipamento banho metabólico. Após findando esse tempo a amostra passou por filtração à vácuo, sendo lavada com água quente em abundância e acetona por duas vezes, até clarificação da amostra. Em seguida a amostra resultante do processo da hidrólise básica, foi filtrada a vácuo e submetida a secagem em estufa de ventilação forçada até peso constante.

Para determinação de FDA, seguiu-se a mesma marcha descrita para FDN, diferindo-se apenas a solução utilizada para a hidrólise, passando a ser detergente ácido. Para determinação da hemicelulose, foi considerado a diferença entre os teores obtidos para FDN e FDA.

O coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro ( $CD_{FDN}$ ) foi determinado pela diferença do peso final do material pré-tratado hidrolisado (ácido/base) em relação ao inicial, não hidrolisado (equivalente ao teor de FDN), sendo expresso em porcentagem de FDN (% FDN).

A quantidade de FDN digestível, por sua vez, verificado a partir do conhecimento do grau de hidrólise enzimática do material pré-tratado ( $CD_{FDN}$ ), multiplicado pelo teor de FDN (% MS) da amostra, resultando em uma quantidade de fibra em detergente neutro digestível, expresso em porcentagem de matéria seca (% MS).

Estimada a quantidade de açúcares fermentescíveis, presentes na celulose e hemicelulose, obtida pela diferença do peso final (após hidrólise enzimática) e inicial (antes da hidrólise enzimática), considerou-se para efeito de cálculo de rendimento de etanol a equação estequiométrica de Gay-Lussac, que estabelece

que cada 100 Kg de açúcares redutores total, produz-se 51,1 kg do biocombustível (FINGUERUT et al., 1985).

## **2.5 Hidrólise enzimática**

Com finalidade de liberar os açúcares fermentáveis, as amostras foram sujeitas a hidrólise enzimática, por meio dos complexos Cellic CTec2 e Cellic HTec2. O meio reacional consistiu de 1 g do substrato, 26 µL do complexo enzimático diluído em 16 mL de solução tampão citrato de sódio/ácido cítrico (0,05 M, pH = 4,8) em frascos erlemeyer de 125 mL. As reações enzimáticas se deram em incubadora *shaker* a 48°C com agitação de 180 rpm, durante 72 horas.

A dosagem de Cellic CTec2 foi baseada no teor de celulose contido em cada substrato; foi usado o nível de dosagem correspondente a 6,0% do complexo enzimático por grama de celulose do substrato. A dosagem do tratamento que associou os complexos enzimáticos foi de 6% de Cellic CTec2 e 6% de Cellic HTec2 por grama de celulose (NOVOZYMES, 2015).

## **2.6 Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias dos tratamentos e dos seus respectivos desdobramentos foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o software estatístico "SISVAR".

A normalidade de distribuição dos erros foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e para as análises de regressão foi utilizado o software SAS University Edition.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização do material pré-tratado para hidrólise enzimática

A metodologia empregada na realização do pré-tratamento da gramínea CONVERT HD364 assemelha-se a descrita por Silva e Queiroz (2012), para determinação de fibra bruta (FB) e uma das grandes críticas a esta metodologia são as perdas de parte da hemicelulose após a filtragem (BATISTA, 2016). Este fato inclusive levou a substituição da avaliação da fração fibrosa, que era feita pela determinação da FB, pelo método de Weende e passou a adotar as frações FDN e FDA (método de Van Soest), como sendo mais representativa da fração fibrosa em materiais lignocelulósicos. Na tabela 5 são apresentados os teores de fibra, proporção relativa de material recuperado no pré-tratamento (equivalente a FB), e a diferença entre fibra em detergente neutro (FDN) do material estudado.

**Tabela 5.** Fração fibrosa (%FB) obtida após pré-tratamento (pré hidrólise) e diferença para FDN como porcentagem da matéria seca.

<b>Fração Fibrosa (%FB) equiv. FB</b>				
<b>Pré hidrólise/ níveis de adubação</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>300</b>
<b>Cellic CTec2</b>	0,69 Aa	0,65 Aa	0,60 Ab	0,66 Aa
<b>Cellic HTec2</b>	0,69 Aa	0,65 Aa	0,66 Ba	0,67 Aa
<b>CV</b>	5,91%			

<b>Diferença para FDN (%MS)</b>				
<b>Complexos enzimáticos/ níveis de adubação</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>300</b>
<b>Cellic CTec2</b>	0,058 Aa	0,004 Aa	-0,084 Ab	-0,044 Ab
<b>Cellic HTec2</b>	0,057 Aa	-0,004 Ab	-0,025 Ab	-0,030 Ab
<b>CV</b>	11,61 %			

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

A partir da comparação dos resultados apresentados observa-se que a porcentagem de diferença para FDN em relação ao pré-tratamento foi muito

baixa, próxima a zero, podendo inferir portanto, que não ocorreu grande perda de hemicelulose durante esse processo.

Através da análise de variância do pré-tratamento, pôde-se constatar efeito casual e significativamente maior de perda de hemicelulose ( $p < 0,05$ ) no tratamento 200 e 300 Kg de  $N.ha^{-1}$  submetido ao complexo enzimáticos Cellic CTec2. Cabendo ressaltar que a fração fibrosa recuperada no pré tratamento diferiu no nível 200 Kg de  $N.ha^{-1}$  entre os complexos, sendo menos para o Cellic CTec2 que atua diretamente na celulose, porém esta perda tem representatividade de 0,12% comparado a FDN original do material em estudo.

### **3.2 Fibra em Detergente Neutro (FDN), Fibra em Detergente Ácido (FDA) e Hemicelulose**

Os principais componentes da fração fibrosa nos vegetais são a celulose, hemicelulose e lignina. Segundo Bianchi et al., (2007), fibra corresponde a uma denominação geral aplicada a diversos materiais compostos de hidrogênio e carbono, representados especialmente por celulose, hemicelulose e lignina, constituindo a parede celular dos vegetais. Sendo possível estimar as frações digestíveis, não digestíveis e pouco digestíveis através de análise da fibra presente na matéria prima.

A fibra em detergente neutro (FDN) é a fração bromatológica que agrupa os três componentes da parede celular (celulose, hemicelulose e lignina). A fibra em detergente ácido (FDA) corresponde à celulose e lignina, uma vez que a hemicelulose é solubilizada em meio ácido. E a hemicelulose pode ser estimada pela diferença entre FDN e FDA (VAN SOEST, 1994). A caracterização da fração fibrosa entre os tratamentos são apresentados na tabela 6.

**Tabela 6.** Teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e hemicelulose, expressos em % da MS original da forrageira submetidas a doses crescentes de adubação nitrogenada.

<b>Fração Fibrosa</b>	<b>CV (%)</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>300</b>	<b>Média</b>
<b>FDN</b>	1,52	63,75 b	65,25 b	69,00 a	70,50 a	67,12
<b>FDA</b>	5,41	43,25 a	42,00 a	42,50 a	43,00 a	42,87
<b>Hemicelulose</b>	8,79	20,50 b	23,00 b	26,75 a	26,75 a	24,25

Médias seguidas de mesma letra minúscula (na linha) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Pode-se observar que houve incremento nos teores de FDN por meio da adubação nitrogenada na gramínea CONVERT HD364, sendo que para os níveis de 200 e 300 Kg de N.ha<sup>-1</sup> ocorreram concentrações significativamente mais elevadas ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos demais níveis. Entretanto, esse incremento não se apresentou proporcional entre os demais componentes da parede celular vegetal, considerando ausência de diferença significativa para os teores de fibra em detergente ácido (FDA), sendo portanto atribuído ao aumento no teor de celulose.

Em trabalho realizado por Alves (2016), foi reportado teor médio de FDN de 60,0 % (base seca) para a braquiária híbrida CONVERT HD364, estando portanto os valores obtidos próximos ao relatado. Já os teores de FDA observados no presente estudo na ordem de 42% (base seca), corroboram com os resultados obtidos por Teodoro et. al., (2012) e Faria Filho (2012), que observaram valores entre 38,0 e 43,0% respectivamente, sendo porém, superiores ao valor de 26,0% observado por Alves (2016) para a mesma gramínea.

Em relação a hemicelulose, componente presente na fibra juntamente com a celulose e lignina, observou-se incremento significativo ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos com níveis de adubação nitrogenada maiores, sendo observado teores entre 20,5% e 24,25% (base seca), estando entre aqueles verificados por Bianchini et al., (2007), que relata de 10% a 25% para a mesma gramínea. O acréscimo de hemicelulose, pode ser justificado pelo comportamento dos teores de FDN e FDA à adubação do material estudado.

### 3.3 Coeficiente de digestibilidade da fibra detergente neutro ( $CD_{FDN}$ ) e FDN digestível

Entende-se por coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro o percentual de fibra passível de digestão enzimática, expressa como % FDN. Já a fibra em detergente neutro digestível (FDN digestível) representa a quantidade de FDN potencialmente digestível na gramínea e está expressa como porcentagem da matéria seca (% MS). A diferença entre ambos é que  $CD_{FDN}$  se refere ao coeficiente de digestibilidade do FDN do material, e o segundo (FDN digestível), ao coeficiente de digestibilidade ( $CD_{FDN}$ ) multiplicado pelo teor (proporção relativa) de FDN na amostra.

Após essas considerações o  $CD_{FDN}$  e o FDN digestível serão apresentados a seguir.

#### 3.3.1 Coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro ( $CD_{FDN}$ )

É importante salientar que o coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro ( $CD_{FDN}$ ) é influenciado pela natureza química e arranjo dos componentes presentes da parede celular, diferentemente do FDN digestível, que reflete a magnitude de digestão da fração fibrosa como um todo em porcentagem de matéria seca pré-tratada. Os dados observados para ( $CD_{FDN}$ ), são apresentados na tabela 7.

**Tabela 7.** Coeficiente de digestibilidade ( $CD_{FDN}$ ) da braquiária CONVERT HD364 submetida a doses crescentes de adubação nitrogenada e hidrolisada com diferentes complexos enzimáticos.

Doses de N/complexos enzimático	0	100	200	300
<b>Cellic CTec2</b>	0,74 Aa	0,59 Bb	0,51 Bb	0,76 Aa
<b>Cellic HTec2</b>	0,77 Aa	0,68 Aa	0,73 Aa	0,77 Aa

Médias seguidas de mesma letra (maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas) não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. Coeficiente de Variação (CV) = 8,96%.

Observa-se que ocorreu interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre os complexos enzimáticos e adubação nitrogenada, com diminuição significativa para os níveis de 100 e 200 Kg N.ha<sup>-1</sup> para o complexo Cellic CTec2. É possível que com aumento da adubação nitrogenada e incremento do FDN pelo aumento da hemicelulose, conforme vista na tabela 5, tenha ocorrido diluição da concentração de celulose, influenciando negativamente a ação do complexo Cellic CTec2, que é mais específico para esse componente.

Entretanto esperava-se que o mesmo comportamento fosse apresentado para o tratamento de 300 Kg N.ha<sup>-1</sup>, o que por sua vez não foi observado. É provável que grandes quantidades de adubação tenha favorecido o crescimento da touceira e conseqüentemente o dossel da planta, aumentando a quantidade de folhas sombreadas na parte inferior da planta. De acordo com Buxton (1996), a quantidade e intensidade luminosa podem afetar a lignificação e digestibilidade da fibra, sendo que, quanto menor a quantidade de luz, menor a lignificação do material, justificando o valor apresentado.

O nível zero de adubação também resultou em valores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) para o CD<sub>FDN</sub>. A fertilidade do solo menor decorrente da não aplicação de adubação influenciou o crescimento das plantas desse tratamento, conseqüentemente menor produção foliar e formação de dossel. Segundo Jung e Moore (2001), partes vegetativas mais expostas a luminosidade, assim como maior temperatura do solo próximo a planta, causada pela falta de sombreamento de sua parte superior, diminuem a produção de lignina, resultando em maior digestibilidade da parte fibrosa, justificando o resultado observado.

Hatfiel et al., (1999) e Moore e Hatfiel (2001), relatam também que a fertilidade do solo influenciam os constituintes da parede celular vegetal, representados pela celulose, hemicelulose e lignina, principalmente, e, salientam também que baixa fertilidade associada a alta luminosidade, umidade do solo e temperatura, colaboram para menor lignificação das plantas.

Para os níveis intermediários de adubação 100 Kg N.ha<sup>-1</sup> e 200 Kg N.ha<sup>-1</sup>, não foi observado interação significativa. Pode-se deduzir que esses teores não

atuaram de forma tão expressiva nos fatores que podem alterar a constituição da parede celular, tendo em vista que a lignificação e digestibilidade da fibra estão relacionados às respostas fisiológicas à diversos fatores ambientais que a planta é submetida e não somente à fertilidade do solo (JUNG e MOORE, 2001).

### 3.3.2 FDN digestível

Os dados para FDN digestível em relação aos complexos enzimáticos e níveis de adubação nitrogenada estão apresentados nas tabelas 7.

**Tabela 8.** FDN digestível da braquiária CONVERT HD364 submetida doses crescentes de adubação nitrogenada e hidrolisada com diferentes complexos enzimáticos em porcentagem (%)

<b>FDN digestível/ níveis de adubação(Kg.ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>300</b>
<b>Cellic CTec2</b>	47 Ab	38 Ac	35 Ac	53 Aa
<b>Cellic HTec2</b>	49 Aa	44 Aa	50 Ba	54 Aa

Médias seguidas de mesma letra (maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas) não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. Coeficiente de Variação (CV) = 8,89%.

Foi observada interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre os complexos enzimáticos e adubação nitrogenada para o parâmetro avaliado, apresentando efeito negativo em relação aos níveis intermediários de adubação (100 e 200 Kg N.ha<sup>-1</sup>) quando utilizado o complexo Cellic CTec2. Este efeito pode ter ocorrido devido ao incremento significativo da FDN e da hemicelulose (tabela 5) sem alteração do teor de FDA para os níveis de adubação.

De acordo com Novozymes (2015), o complexo enzimático Cellic CTec2 atua mais especificamente na celulose, e devido a adubação nitrogenada não ter favorecido o aumento desse componente, a hidrólise por esse complexo foi atuante em uma menor concentração relativa de celulose dos níveis de adubação nitrogenada maiores.

No entanto, com o aumento na hemicelulose, favorecido pela adubação, a atuação da Cellic HTec2 foi mais eficiente, pois trata-se de um composto enzimático com maior potencial de atuação na hemicelulose da parede vegetal (NOVOZYMES, 2015).

Observado o FDN digestível, o rendimento de etanol por nível de adubação nitrogenada em relação aos complexos enzimáticos Cellic CTec2 e Cellic HTec2, será apresentado.

### 3.4 Rendimento de etanol

De acordo com Castagnara et al., (2011), a adubação nitrogenada promove aumento nas taxas de reações enzimáticas e químicas na planta, afetando a oferta de fotoassimilados, influenciando as características morfogênicas e estruturais da fibra, tais como celulose, hemicelulose e lignina que estão diretamente ligadas ao rendimento de etanol.

A capacidade de conversão em etanol do material lignocelulósico está diretamente associado a quantidade de açúcares presentes na fibra do matéria, encontrados da fração de celulose e hemicelulose. O rendimento de etanol para a braquiária CONVERT HD364 é representado na tabela 6.

**Tabela 9.** Rendimento de etanol em (mL/Kg MS) para braquiária CONVERT HD364, submetida a doses crescentes de adubação nitrogenada e hidrolisada por diferentes complexos enzimáticos.

<b>Etanol</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>300</b>
<b>Cellic CTec2</b>	307,11 Ab	249,64 Ac	229,76 Bc	347,13 Aa
<b>Cellic HTec2</b>	319,54 Aa	288,31 Ab	326,82 Aa	351,66 Aa

Médias seguidas de mesma letra (maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas) não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de significância. Coeficiente de Variação (CV) = 8,88%.

Pode-se observar que para o complexo enzimático Cellic CTec2 houve interação significativa quanto ao rendimento de etanol em relação aos diferentes níveis de adubação, diferentemente do observado em relação ao Cellic HTec2, que não apresentou interação significativa. Entretanto, comparando os dois complexos enzimáticos o Cellic HTec2, mostrou-se mais eficiente na conversão dos açúcares presentes no material estudado.

O complexo enzimático Cellic CTec2, seguindo a digestibilidade da fibra, apresentou-se mais eficiente para os níveis de 300 Kg N.ha<sup>-1</sup> e 0 Kg N.ha<sup>-1</sup> respectivamente, ocorrendo menor produção potencial de etanol para 100 e 200 Kg N.ha<sup>-1</sup>. Devido a maior atuação do complexo Cellic CTec2 na celulose, pode-se inferir que a menor proporcionalidade desse componente no material estudado, observado sobretudo pelos teores de FDN, justifica o baixo rendimento de etanol observado para os níveis intermediários de adubação.

O complexo Cellic HTec2 mostrou-se pouco variável quanto ao potencial rendimento de etanol, possuindo apenas para o nível de 100 Kg N.ha<sup>-1</sup> menor valor em relação aos demais, mostrando maior eficiência comparado ao outro complexo. Essa ocorrência pode ser atribuída a especificidade de atuação do complexo à hemicelulose e ao seu alto teor na braquiária CONVERT HD364 analisada (NOVOZYMES, 2015).

Contudo, Batista (2016), relata rendimentos de etanol para braquiária híbrida CONVERT HD364 de 148,56 mL/Kg/MS, estando portanto os valores apresentados nesse presente estudo muito superiores, comprovando o efeito da adubação nitrogenada na produção desse biocombustível.

Ainda segundo o mesmo autor a *B. decumbens*, *ruzzizienses* e *brizantha* possuem rendimento de 89,38; 134,06 e 99,68 mL/Kg/MS respectivamente, tendo portanto a braquiária híbrida avaliada, mesmo sem adubação nitrogenada (0 Kg N.ha<sup>-1</sup>) apresentado rendimentos mais vantajosas para utilização como matéria prima lignocelulósica na produção de etanol de segunda geração.

### **3.5 Regressão linear**

Na estimativa de produção potencial de etanol de etanol a partir de uma fonte lignocelulósica, a quantidade de fibra digestível, apresenta-se como variável determinante de produtividade. Por isso, os ajustes de regressão realizados tiveram como objetivo, investigação dos efeitos de interação significativa ( $p < 0,05$ ) observadas na análise de variância dos dados.

No ajuste da curva de regressão utilizando como parâmetro o coeficiente de digestibilidade ( $CD_{FDN}$ ), expresso em porcentagem de FDN, não foi possível explicar os efeitos observados na produção de etanol (mL/Kg/MS pré-tratada), por meio do modelo simples de regressão, mostrando que houve atuação de outra variável nessa predição, surgindo necessidade de inclusão do efeito da adubação nitrogenada, resultando portanto em uma regressão multivariada.

O fato da adubação nitrogenada ter exercido influência na composição da fibra, tanto em quantidade como natureza química, mostra-se como possível explicação pela falta de robustez, justificando a necessidade de sua inclusão no modelo.

Quando utilizado o FDN digestível como variável preditora para estimar a produção potencial de etanol, o modelo de regressão linear simples foi capaz de prever com bastante acurácia os efeitos observados, não exigindo portanto, a inclusão do efeito da adubação nitrogenada no modelo. Uma vez que esse parâmetro representa efetivamente a quantidade de fibra hidrolisada em açúcares simples, que são prontamente utilizáveis para fermentação e produção do etanol.

São apresentados nos anexos desse trabalho as análises de variâncias das regressões linear simples e multivariada, assim como o nível de significância de seus parâmetros.

Na tabela 10 são apresentadas as equações de regressão. Utilizando o  $CD_{FDN}$  como parâmetro, determinou-se três modelos (ajustes), sendo considerado individualmente o complexo Cellic CTec2, Cellic HTec2 e ambos conjuntamente. Para variável FDN digestível, apenas um modelo considerando todos os dados.

**Tabela 10.** Ajustes de regressão linear simples e múltipla para estimativa do potencial de produção de etanol (mL/Kg MS<sub>pré-tratada</sub>) para os complexos enzimáticos Cellic CTec2 e Cellic HTec2 analisadas conjuntamente e separadas.

Enzimas	Equação	R <sup>2</sup>
Regressão Linear Múltipla - CD <sub>FDN</sub>		
Cellic CTec2	Etanol = 440,10825* x CD <sub>FDN</sub> + 0,10749* x N - 19,30194*	0,99
Cellic HTec2	Etanol = 424,62081* x CD <sub>FDN</sub> + 0,11789* x N - 10,05895 <sup>NS</sup>	0,97
CTec2 e HTec2	Etanol = 436,03433* x CD <sub>FDN</sub> + 0,11243* x N - 10,05895 <sup>NS</sup>	0,99
Regressão Linear Simples – FDNd		
CTec2 e HTec2	Etanol = 647,3887* x FDNd - 10,05895 <sup>NS</sup>	0,99

**Legenda:**

**CD<sub>FDN</sub>:** coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro, %MS<sub>pré-tratada</sub>;

**FDNd:** FDN digestível, %MS;

**N:** adubação nitrogenada, kg de nitrogênio/ha/ano;

**Símbolo \*:** significativo (p<0,05), nível de significância do parâmetro na regressão;

**Símbolo <sup>NS</sup>:** não significativo (p>0,05), nível de significância do parâmetro na regressão;

**R<sup>2</sup>:** coeficiente de determinação do ajuste de regressão;

Conforme apresentado na tabela acima, os coeficientes que multiplicam o CD<sub>FDN</sub> e FDN digestível (termo “b” da equação) em cada ajuste, mostraram-se significativos (p<0,05), evidenciando a importância da variável independente na estimativa de produção do bioetanol. Já o termo “a” (ponto teórico de intersecção da curva com o eixo Y), mostrou-se apenas significativo para o complexo enzimático Cellic CTec2 para variável CD<sub>FDN</sub>, sugerindo sua importância na estimativa de produção do etanol, confirmada pela interação observada na análise de variância.

Para os demais ajustes das curvas de regressão, o termo “a” da equação, mostraram-se como componente necessário para minimizar soma dos desvios da regressão, sendo o efeito captados entre as variáveis eficientemente pelo termo “b” da equação. Podendo portanto inferir que a adubação nitrogenada exerceu efeito positivo, embora que pequeno na produção potencial de etanol da braquiária CONVERT HD364, por meio do aumento da fibra (FDN), evidenciado pelo incremento da hemicelulose.

#### **4. CONCLUSÃO**

Para produção de etanol a partir do material lignocelulósico proveniente da braquiária CONVERT HD364, foi observada diferença na efetividade dos complexos enzimáticos analisados Cellic CTec2 e Cellic HTec2, sendo o último mais eficiente para a matéria prima estudada.

As doses crescentes de adubação nitrogenada geraram efeito positivo, embora pequeno na produção potencial do etanol em função da composição de fibra produzida em sua decorrência e do complexo enzimático utilizado.

A dose de 300 Kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio foi a que proporcionou maior estimativa de rendimento de etanol (351,66 mL/Kg MS), seguida por 200, 0 e 100 kg.ha<sup>-1</sup> respectivamente (326; 319,54 e 288,31 mL/Kg MS).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIN, D. E. Histological and physical factors affecting digestibility at forages. **Agron. J.** n.81, p.17–25. 1989.

ALVES, E. S. G. Produtividade, composição bromatológica e dinâmica do perfilhamento da brachiaria híbrida CONVERT HD 364 sob alturas de corte. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Goiás. Escola de veterinária e zootecnia (EVZ). Programa de pós-graduação em zootecnia. Goiânia, 2016.

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

ARGEL, P. J.; MILES, J. W.; GUIOT, J. D.; CUADRADO, H.; LASCANO, C. E. **Cultivar mulato II (*Brachiaria* hybrid CIAT 36087)**: high-quality forage grass, resistant to the spittlebug and adapted to well-drained acid tropical soils. Cali: International Center for Tropical Agriculture, 2007. 21p.

BIANCHINI, W.; RODRIGUES, E.; JORGE, A. M.; ANDRIGHETO, C. Importância da fibra na nutrição de bovinos. **Revista eletrônica de veterinária**. v. 3, n.202. 2007.

BUXTON, D. R. Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. **Anim. Feed Sci.** v.59: p.37-49. 1996.

CASTAGNARA, D. D.; ZOZ, T.; KRUTZMANN, A.; UHLEIN, A.; MESQUITA, E. E.; NERES, M. A.; OLIVEIRA, P. S. R. Produção de forragem, características estruturais e eficiência de utilização do nitrogênio em forrageiras tropicais sob adubação nitrogenada. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.32, n.4, pág 1637-1648. 2011.

FARIA FILHO E.M. Produção animal, valor nutricional e aspectos morfológicos de braquiárias. [Dissertação]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2012. p.54.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In...45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p.255-258.

FINGUERUT, J.; LUCREDI, H. A.; LEIMER, K. H.; ROSSEL, C. E. V. Estequiometria da fermentação alcoólica a partir do caldo de cana. **Boletim Técnico Opersucar**, São Paulo, Brasil, n.33, p. 45-48, 1985.

FORD, C.W., I.M. MORRISON, AND J.R. WILSON. Temperature effects on lignin, hemicelulose and cellulose of tropical and temperate grasses. **Aust. J. Agr. Res.** v.30 p.621–633. 1979.

HATFIELD, R.D., H.G. JUNG, J. RALPH, D.R. BUXTON, AND P.J. WEIMER. 1994. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. **J. Sci. Food Agr.** v.65 p.51–58. 1994.

HATFIELD, R.D., J. RALPH, AND J.H. GRABBER. 1999. Cell wall structural foundations: molecular basis for improving forage digestibilities. **Crop Sci.** V.39 p.27–37. 1999.

HENDERSON, M.S., AND D.L. ROBINSON. 1982. Environmental influences on yield and *In vitro* true digestibility of warm-season perennial grasses and the relationships to fiber components. **Agron. J.** v.74 p.943–946. 1982.

JUNG, H-J. G.; MOORE, K. J. Lignin and fiber digestion. **Journal range manage.** p.420-430. 2001.

KEPHART, K.D. AND D.R. BUXTON. Forage quality responses of C3 and C4 perennial grasses to shade. **Crop Sci.** v.33 p.831–837. 1993.

LIMA, M A. de. **Caracterização bioquímica e biofísica da enzima  $\beta$ -glicosidase Bgl1 de *Aspergillus niger* e avaliação de potenciais biomassas para produção de bioetanol.** 2013. 249 p. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Física Aplicada Biomolecular, Instituto de Física de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

MAIRESSE, M. H. **Potencial de biomassa de *Ipomea batatas* (L.) Lam. Na produção de etanol lignocelulósico.** Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Tocantins. Programa de pós-graduação em agroenergia. Palmas, 2016.

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

NOVOZYMES, **Novozymes Cellic® CTec2 and HTec2** - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic. Disponível em: <[www.bioenergy.novozymes.com](http://www.bioenergy.novozymes.com)>. Acesso em 01 de junho de 2016.

RAÍZEN. Tecnologia em energia renovável: etanol de segunda geração. Disponível em:<http://www.raizen.com.br/energia-do-futuro-tecnologia-em-energiarenovavel/etanol-de-segunda-geracao>. Acesso em: 17 fev. 2016.

SILVA, F. V. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. **Revista Liberato**. Novo Hamburgo, v.13, n.20, p.01, jul.2012.

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

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

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 83, n. 1, p. 1-11, maio 2002. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0960-8524(01)00212-7. Disponível em: <<http://api.elsevier.com>>. Acesso em: 14 fev. 2016.

TEODORO, M.S.R.; COSTA, K.A.P.; DIAS, F.J.S.; SIMON, G. A.; SAENZ, E. A. C.; SEVERIANO, E. C.; CRUVINEL, W.S. Bromatologic Composition Of Marandu And Mulato II Grasses Under Cut Residual. *Glob. Sci. Tech.* 2012;5(3):137–146. Portuguese.

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

## Anexos

**Quadro 1.** Análise de Variância da Regressão linear múltipla e parâmetros da regressão da estimativa da produção potencial de bioetanol a partir das variáveis  $CD_{FDN}$  (coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro - %FDN) e N (nitrogênio, Kg N/ha/ano) para o complexo enzimático Cellic CTec2.

Number of Observations Read	16
Number of Observations Used	16

Analysis of Variance					
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	44153	22077	1203.00	<.0001
Error	13	238.56718	18.35132		
Corrected Total	15	44392			

Root MSE	4.28384	R-Square	0.9946
Dependent Mean	283.41478	Adj R-Sq	0.9938
Coeff Var	1.51151		

Parameter Estimates						
Variable	Label	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	Intercept	1	-19.30194	6.26492	-3.08	0.0088
FDND	FDND	1	440.10825	9.18364	47.92	<.0001
Nitrogenio	Nitrogenio	1	0.10749	0.00958	11.22	<.0001

**Quadro 2.** Análise de Variância da Regressão linear múltipla e parâmetros de regressão da estimativa da produção potencial de bioetanol a partir das variáveis  $CD_{FDN}$  (coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro - %FDN) e N (nitrogênio, Kg N/ha/ano) para o complexo enzimático Cellic HTec2.

<b>Number of Observations Read</b>	16
<b>Number of Observations Used</b>	16

<b>Analysis of Variance</b>					
<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F Value</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Model</b>	2	15308	7653.86495	279.78	<.0001
<b>Error</b>	13	355.63677	27.35667		
<b>Corrected Total</b>	15	15663			

<b>Root MSE</b>	5.23036	<b>R-Square</b>	0.9773
<b>Dependent Mean</b>	321.58901	<b>Adj R-Sq</b>	0.9738
<b>Coeff Var</b>	1.62641		

<b>Parameter Estimates</b>						
<b>Variable</b>	<b>Label</b>	<b>DF</b>	<b>Parameter Estimate</b>	<b>Standard Error</b>	<b>t Value</b>	<b>Pr &gt;  t </b>
<b>Intercept</b>	Intercept	1	-10.05895	15.23545	-0.66	0.5206
<b>FDND</b>	FDND	1	424.62081	20.55818	20.65	<.0001
<b>Nitrogenio</b>	Nitrogenio	1	0.11789	0.01172	10.06	<.0001

**Quadro 3.** Análise de Variância da Regressão linear múltipla e parâmetros de regressão da estimativa da produção potencial de bioetanol a partir das variáveis CD<sub>FDN</sub> (coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro - %FDN) e N (nitrogênio, Kg N/ha/ano) para os complexos enzimáticos Cellic CTec2 e Cellic CHtec2 conjuntamente.

<b>Number of Observations Read</b>	32
<b>Number of Observations Used</b>	32

<b>Analysis of Variance</b>					
<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F Value</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Model</b>	2	71097	35548	1671.00	<.0001
<b>Error</b>	29	616.93561	21.27364		
<b>Corrected Total</b>	31	71714			

<b>Root MSE</b>	4.61234	<b>R-Square</b>	0.9914
<b>Dependent Mean</b>	302.50189	<b>Adj R-Sq</b>	0.9908
<b>Coeff Var</b>	1.52473		

<b>Parameter Estimates</b>						
<b>Variable</b>	<b>Label</b>	<b>DF</b>	<b>Parameter Estimate</b>	<b>Standard Error</b>	<b>t Value</b>	<b>Pr &gt;  t </b>
<b>Intercept</b>	Intercept	1	-17.53431	5.61523	-3.12	0.0040
<b>FDND</b>	FDND	1	436.03433	7.85383	55.52	<.0001
<b>Nitrogenio</b>	Nitrogenio	1	0.11243	0.00729	15.42	<.0001

**Quadro 4.** Análise de Variância da Regressão linear simples e parâmetros de regressão da estimativa da produção potencial de bioetanol a partir das variáveis FDNd (fibra em detergente neutro digestível, %MS<sub>pré-tratada</sub>) para os complexos enzimáticos Cellic CTec2 e Cellic HTec2 conjuntamente.

<b>Number of Observations Read</b>	32
<b>Number of Observations Used</b>	32

<b>Analysis of Variance</b>					
<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F Value</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Model</b>	1	71697	71697	131744	<.0001
<b>Error</b>	30	16.32651	0.54422		
<b>Corrected Total</b>	31	71714			

<b>Root MSE</b>	0.73771	<b>R-Square</b>	0.9998
<b>Dependent Mean</b>	302.50189	<b>Adj R-Sq</b>	0.9998
<b>Coeff Var</b>	0.24387		

<b>Parameter Estimates</b>						
<b>Variable</b>	<b>Label</b>	<b>DF</b>	<b>Parameter Estimate</b>	<b>Standard Error</b>	<b>t Value</b>	<b>Pr &gt;  t </b>
<b>Intercept</b>	Intercept	1	0.26361	0.84284	0.31	0.7566
<b>FDNd</b>	FDNd	1	647.38887	1.78361	362.97	<.0001