



PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E RADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS EM *BRACHIARIA BRIZANTHA* PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL

Geraldo Pereira de Souza Neto¹, Carlos Frederico de Souza Castro², Luciano Moraes Lião³, Rodrigo Martins Moreira⁴ & Mariana da Silva Barros⁵

RESUMO: Os biocombustíveis de segunda geração possuem potencial superior aos de primeira geração sob diversos aspectos. O objetivo do trabalho é o estudo da viabilidade da associação entre o pré-tratamento químico alcalino e a radiação de micro-ondas para a produção de bioetanol combustível a partir da *Brachiaria brizantha*, cultivar marandu. Amostras de biomassa foram limpas, lavadas e trituradas em moinho de facas, e mantidas sob refrigeração até uso. Um planejamento fatorial foi usado para avaliar a influência da concentração do álcali (NaOH), Razão Líquido/Sólido, tempo de irradiação de micro-ondas e potência da radiação. Foram determinados os teores de Celulose, Hemicelulose e Lignina para cada condição. A cristalinidade da biomassa obtida foi determinada por difratometria de raios X. Os teores de açúcares redutores foram quantificados por método colorimétrico DNS. Foram realizadas hidrólises enzimáticas na biomassa bruta e pré-tratada para quantificar os teores de açúcares liberados. O material lignocelulósico apresentou ótimos resultados quando submetido ao pré-tratamento, obtendo quantidades de celulose três vezes maiores (64,65%) em relação ao material sem pré-tratamento (22,8%) e com a deslignificação de 67,3%, sugerindo que a associação entre a radiação de micro-ondas e o pré-tratamento alcalino apresenta grande potencial para a produção de bioetanol. A quantidade máxima liberada de açúcares redutores totais (g L^{-1}) obtidos com o pré-tratamento alcalino associado à radiação de micro-ondas foi $14,09 \text{ g L}^{-1}$, enquanto o material sem pré-tratamento atingiu $8,95 \text{ g L}^{-1}$.

PALAVRAS-CHAVE: biocombustíveis, lignocelulósicos, carboidratos, fermentação.

ALKALINE PRE-TREATMENT ASSOCIATED WITH MICROWAVE RADIATION ON *BRACHIARIA BRIZANTHA* FOR ETHANOL PRODUCTION

ABSTRACT: The second-generation of biofuels have higher potential than many of the first generation biofuels on many aspects. Our objective was to study the feasibility of association between the alkaline chemical pretreatment and microwave radiation for bioethanol production from *Brachiaria brizantha* cultivate marandu. Biomass samples were cleaned, washed and milled, and kept under refrigeration until use. A factorial design evaluated the impact of alkali concentration (NaOH), Liquid/Solid ratio, irradiation time and irradiation potency. Cellulose, Hemicellulose and Lignin contents were determined for every experimental condition. Crystallinity Index was calculated from X Ray Diffractograms. Reducing sugars content was determined by DNS colorimetric method. Enzymatic hydrolysis were performed on the raw and pretreated sugarcane bagasse and released reducing sugar content were determined. The lignocellulosic material showed excellent results when subjected to pre-treatment, obtaining amounts of cellulose three times higher (64.65%) compared to material without pre-treatment (22.8%) and with a 67.3% of delignification. This suggests that the association between the microwave radiation and alkaline pre-treatment shows great potential for bioethanol production. The maximum amount of total reducing sugars released (g L^{-1}) obtained with the alkaline pre-treatment followed by microwave radiation was 14.09 g L^{-1} , whereas the material without pre-treatment reached 8.95 g L^{-1} .

KEYWORDS: biofuels, lignocellulosic, carbohydrates, fermentation.

1 INTRODUÇÃO

A gasolina, derivada do petróleo, é o combustível predominante para uso na frota de veículos de motores a combustão. Atualmente, existem cerca de 600 milhões de carros de passeio no mundo, os quais consomem aproximadamente 3,5 bilhões de litros de gasolina por dia. Praticamente todo o transporte de passageiros utiliza gasolina (Guo et al., 2015).

A biomassa é a única matéria-prima renovável capaz de gerar combustível líquido. E a produção de etanol é uma das tecnologias comerciais disponíveis atualmente. O etanol de celulose, além de possuir potencial superior em termos de balanços de energia, possibilita a redução da emissão de gases de efeito estufa, bem como a exigência do solo. Entretanto, a sua comercialização ainda é dificultada pelas tecnologias de produção ineficazes ou pelos custos mais elevados do que os combustíveis de primeira geração (Perego & Bianchi, 2010; Sarkar et al., 2012).

^{1,2 3 4 5} E-mails: quimica.geraldo@gmail.com ;
carlosfscastro@gmail.com ; lucianolião@ufg.br ;
rodrigomartins.gestaoamb@gmail.com ;
marianashelen@gmail.com

No Brasil, a cana-de-açúcar é a cultura que possui maior destaque na produção de etanol combustível, competindo com a produção de açúcar no país e com a produção de alimentos (Kohlhepp, 2010).

Os capins do gênero *Brachiaria* representam a maior área de pastagens cultivadas no Brasil, atingindo cerca de 60 milhões de hectares, com o principal intuito de servir de alimentação para o rebanho brasileiro de bovinos de corte. Entre as diversas espécies desse gênero, destacam-se a *Brachiaria decumbens* e a *Brachiaria brizantha*, as quais ocupam mais da metade desta área no país (Almeida et al., 2003).

As espécies e/ou cultivares de *Brachiaria* apresentam um conjunto de características, que determinam a sua melhor relação custo/benefício, conduzindo a sua preferência como pastagens. Tais características envolvem adaptação a condições adversas de solo e clima, principalmente, pela adaptação a solos com baixa e média fertilidade, além de apresentarem produções satisfatórias de forragem (Fagundes et al., 2005).

Em geral, o processo biológico de conversão da biomassa em etanol envolve diversas etapas: Pré-tratamento para remoção da lignina e hemicelulose e disponibilização da celulose, hidrólise enzimática ou química para a despolimerização da celulose e produção de sacarose livre, processo fermentativo para conversão dos carboidratos em etanol e subprodutos, e, por fim, purificação do etanol através da sua destilação (Canilha et al., 2012).

Os pré-tratamentos constituem em etapa inicial crucial no processo para obtenção do etanol, estes devem apresentar um conjunto de características desejáveis para que possam ser aplicados industrialmente. Entre elas, destacam-se despolimerização da celulose, solubilização da hemicelulose e lignina, incremento da hidrólise enzimática e minimização da perda de carboidratos fermentescíveis; além de ter custo operacional e de capital mínimos (Canilha et al., 2012).

Dentre os possíveis pré-tratamentos, podemos destacar os ataques químicos - ácidos e alcalinos - e o aquecimento, por fontes convencionais ou por radiação de micro-ondas. Segundo Peng et al. (2013), em comparação com o aquecimento convencional por condução/convecção, a radiação de micro-ondas interage diretamente com a biomassa, transferindo energia para gerar calor *in situ*.

Diversos trabalhos apontam para o sucesso do uso da radiação de micro-ondas no pré-tratamento de diferentes biomassa, oferecendo maior controle sobre o aquecimento e racionalização de energia, conduzindo a economia de recursos. Dentre os seus efeitos, podemos citar a desestruturação da biomassa, o aumento da área superficial, a diminuição do tamanho médio das partículas e a diminuição da cristalinidade da celulose (Chen, Tu, e Sheen, 2011; Kashaninejad & Tabil, 2011).

A associação entre os pré-tratamentos químicos e a radiação de micro-ondas vem se destacando recentemente, onde diversos trabalhos indicam a sua eficiência da remoção da lignina (Xue et al., 2012), solubilização da hemicelulose, aumento da área superficial (Chen, Tu e Sheen, 2011), redução da cristalinidade em bagaço de cana-de-açúcar e aumento do teor de açúcares redutores (Binod et al., 2012).

Assim, o objetivo foi investigar a associação entre o pré-tratamento alcalino e a radiação de micro-ondas em gramínea *Brachiaria brizantha* cv. marandu na produção de etanol.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A gramínea (*Brachiaria brizantha* cv. marandu) foi obtida junto a produtores do município de Rio Verde, Goiás, em março de 2012. Foi lavada em água corrente para remover quaisquer sujidades e seca em estufa com circulação forçada de ar, a 40 °C, até massa constante. Em seguida, foi triturada em moinho de facas (2 mm) até a obtenção de um pó homogêneo e armazenada em sacos plásticos, sob refrigeração.

As determinações de hemicelulose, lignina e celulose foram feitas conforme a metodologia relatada por Lin et al. (2010) e Li et al. (2004).

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

O planejamento fatorial em dois níveis para quatro variáveis gerou um total de 16 condições experimentais, as quais foram conduzidas em triplicatas, conforme a Tabela 2. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação pelo teste F de Fischer, a 95% de confiança.

Tabela 1 - Valores Reais e codificados para as variáveis do planejamento fatorial 2² usado para avaliar a influência dos mesmos sobre a composição da gramínea *Brachiaria brizantha*

Valores Codificados	Valores Reais				
	Concentração alcalina (m/v)	Razão (v/m)	Líquido/Sólido	Tempo de Irradiação (minutos)	Potência do Micro-ondas (%)
-1	0,5%	10/1		10 min	10%
+1	5,0%	50/1		60 min	20%

Tabela 2 - Matriz de codificação do planejamento fatorial 2², indicando a distribuição das quatro variáveis em dois níveis

Ensaio	Concentração alcalina	Razão		Tempo de Irradiação	Potência do Micro-ondas
		Líquido/Sólido			
1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	-1
4	+1	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	-1	+1
11	-1	+1	+1	-1	+1
12	+1	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1	+1

Porções do pó homogêneo (cerca de 1g) obtido a partir da *Brachiaria brizantha* foram pré-tratadas com soluções aquosa de hidróxido de sódio a 0,5 e 5% (m/v), nas razões de 10:1 e 50:1 (v/m) entre a solução alcalina e a biomassa e submetidas à radiação de micro-ondas em diferentes potências (10% e 20%), em tempos de 10 e 60 minutos de irradiação, com alternância de um minuto em descanso para evitar que material seque. Após o pré-tratamento, a mistura foi filtrada e os resíduos sólidos foram analisados para determinação da composição e caracterização espectrofotométrica (FTIR-UATR-NIR Frontier, PerkinElmer), bem como avaliação da cristalinidade do material.

A cristalinidade da biomassa foi determinada por difratometria de raios-x (difratômetro DRX-6000, Shimadzu), sob condições normais de temperatura e pressão atmosférica, com ângulos entre 10 a 50°, com fonte de cobre com linha em Cu K α 1,54 Å em 40 KV e 30mA. O índice de cristalinidade (CrI) da celulose foi calculado, conforme Segal et al (1959):

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

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

Os açúcares redutores totais foram quantificados por método do ácido 3,5-dinitrosalicílico, conforme proposto por Miller (1959). A partir de solução padrão de glicose (dextrose) 10,0 g L⁻¹, preparada em tampão citrato 0,05

M, sendo realizadas diluições para concentrações entre 0 a 10 g L⁻¹. Em cada tubo de ensaio, foram adicionados 1,0 mL do tampão citrato e 0,5 mL de cada uma das soluções de glicose, aquecidas por 60 minutos a 50°C. Posteriormente, foram adicionados a cada tubo de ensaio 3,0 mL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e fervidos a 95°C, após transferidos para banho de gelo e adicionados 20 mL de água para leitura no espectrofotômetro (Biospectro, modelo SP-220) a 540 nm.

Para a determinação da atividade enzimática foi utilizado o método proposto por Ghose (1987), o qual consiste em determinar a concentração do extrato enzimático que

libere aproximadamente 2 mg de glicose em um tempo de 60 minutos. Desta forma, encontrar-se-á atividade do extrato enzimático, em Filter Paper Unit (FPU).

As amostras foram preparadas, utilizando tampão citrato de sódio 0,05M com pH 4,8, sendo sete diluições diferentes (1:20, 1:30, 1:40, 1:60, 1:80, 1:100 e 1:120 v/v) do complexo enzimático comercial celulolítico (Novozyme, ns22086).

Foram preparados em tubos de ensaio, adicionando 1mL de tampão citrato (pH 4,8), uma fita de papel de filtro Whatman nº 1 (cerca de 50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático diluído. Como controles foram usados o papel de filtro, com a enzima e com o tampão citrato separadamente. Os açúcares redutores totais foram quantificados e por regressão linear e interpolação dos dados, foi determinada a concentração da enzima a qual produz 2 mg de glicose e o cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando a Eq. 2:

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

A hidrólise enzimática foi realizada em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 2 g da biomassa e um coquetel enzimático com 10 FPU da enzima comercial, sob agitação constante a 150 rpm, pH 4,8 (tampão citrato) e 50 °C. A hidrólise foi acompanhada durante 6 dias, com medida da concentração de açúcar diariamente, até a estabilização.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição da biomassa foi realizada determinando os teores extraíveis de hemicelulose, lignina e celulose presentes após o pré-tratamento químico alcalino em associação à radiação de micro-ondas e para o material bruto sem qualquer pré-tratamento (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores médios e desvios padrão dos constituintes de *Brachiaria brizantha* bruta e após os pré-tratamentos realizados

Experimento	Extraíveis	Hemicelulose	Lignina	Celulose
Bruto	8,20 ± 1,3	23,85 ± 5,6	45,25 ± 4,2	22,80 ± 0,1
1	1,80 ± 0,6	21,45 ± 1,5	28,70 ± 2,4	48,05 ± 3,3
2	2,50 ± 0,3	17,45 ± 1,8	30,70 ± 2,4	49,35 ± 4,5
3	5,50 ± 0,1	24,95 ± 7,4	28,85 ± 2,2	40,70 ± 9,8
4	1,65 ± 1,1	33,30 ± 3,1	34,50 ± 0,6	30,60 ± 3,5
5	2,95 ± 0,5	18,90 ± 4,7	30,35 ± 1,8	47,80 ± 3,4
6	0,85 ± 0,2	35,70 ± 0,7	32,60 ± 4,5	30,85 ± 3,6
7	2,95 ± 0,2	11,60 ± 2,7	40,95 ± 6,9	44,50 ± 4,0
8	1,80 ± 1,7	30,05 ± 6,7	25,15 ± 4,3	43,00 ± 9,3
9	2,00 ± 0,6	31,90 ± 2,3	37,20 ± 2,3	28,90 ± 0,6
10	2,40 ± 0,7	22,05 ± 0,6	18,60 ± 8,8	56,95 ± 7,4
11	2,75 ± 0,2	2,35 ± 2,3	52,15 ± 4,2	42,70 ± 6,8
12	2,85 ± 0,4	30,75 ± 5,9	15,45 ± 0,5	51,00 ± 5,1
13	2,10 ± 0,7	38,60 ± 5,2	28,15 ± 1,2	31,10 ± 7,2
14	2,90 ± 0,0	31,80 ± 2,3	26,65 ± 5,4	38,65 ± 7,7
15	3,15 ± 1,3	44,30 ± 2,3	43,95 ± 2,8	8,60 ± 3,7
16	3,15 ± 1,2	17,35 ± 2,3	14,80 ± 0,6	64,65 ± 0,6

Quando analisados os resultados referentes a quantidade de extraíveis na biomassa lignocelulósica, nota-se que a gramínea *Brachiaria brizantha*, sem qualquer tipo de pré-tratamento, apresenta um teor de extraíveis em cerca de 8,2%, o qual está em acordo com a literatura. Carvalho et al. (2011) relatam teores médios de 1,75% para o extrato etéreo, entretanto estes referem-se à valores em massa úmida, sem processos de secagem; enquanto que Welker et al. (2015) cita valores de até 20% de lignina.

Os valores de extraíveis encontrados na biomassa submetida aos pré-tratamentos, situam-se entre 0,85% ± 0,2 e 5,50% ± 0,1. Ressalta-se que todos os pré-tratamentos obtiveram redução nestes teores, quando comparados com o material bruto sem pré-tratamento,

indicando a sua remoção em menor ou maior grau, os diferentes tratamentos resultados em teores de extraíveis estatisticamente diferentes ($p < 2,2e-12$).

Para a quantidade de hemicelulose na biomassa de *Brachiaria brizantha*, foram obtidos valores entre 2,35% ± 2,3 a 44,30% ± 2,3. Sendo que o menor resultado obtido (2,35%) indicaremoção de cerca de 90% em relação ao material bruto (23,85%), diminuindo

drasticamente a quantidade de pentoses no material lignocelulósico, destacando-se como ótimas condições para a remoção seletiva de hemicelulose, e também com diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p < 3,8e-17$).

Em outra condição experimental (experimento 15, Tabela 2), foi observado um comportamento oposto, pois

o teor de hemicelulose aumentou ($44,30\% \pm 2,3$), quase dobrando, indicando diminuição drástica nos demais componentes, tornando a quantidade relativa de hemicelulose maior. Em particular, destaca-se a diminuição da celulose nestas condições experimentais ($8,60\% \pm 3,7$), com possível solubilização expressiva; e a leve variação no teor de lignina ($43,95\% \pm 2,8$).

Em relação à lignina, nota-se (Tabela 3), a capacidade deslignificante do pré-tratamento alcalino associado à radiação de micro-ondas, onde foram obtidos teores entre $14,80\% \pm 0,6$ e $52,15\% \pm 4,1$. Praticamente todas as condições experimentais usadas no planejamento fatorial resultaram na redução dos teores de lignina, sendo que o menor teor obtido resultou em cerca de 67% de remoção da lignina presente na biomassa bruta, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 3,7e-18$). Tais condições deslignificantes podem resultar em incremento da hidrólise enzimática sobre a celulose presente na gramínea. Apenas uma condição experimental ocorreu um pequeno acréscimo ($52,15\% \pm 4,2$) no teor de lignina, devendo-se a significativa remoção de hemicelulose, resultando em teor de $2,35\% \pm 2,3$ e constituindo uma condição para a retirada seletiva de hemicelulose.

Chaudhary, Singh e Ghosh (2012) utilizaram vários pré-tratamentos alcalinos em *Saccharum spontaneum* e obtiveram máximo de 47,8% de deslignificação, utilizando 7% de NaOH em solução aquosa, por 48 h e carga de 10% da biomassa, corroborando com os resultados deste trabalho quando comparados o total de deslignificação da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu que foi cerca de 67,29%, evidenciando a sua maior eficiência na remoção da lignina para o pré-tratamento alcalino associado a radiação de micro-ondas.

A celulose apresentou teores entre $8,60\% \pm 3,7$ e $64,65\% \pm 0,6$, com $p < 1,3e-17$, evidenciando teores estatisticamente diferentes entre os tratamentos (ver Tabela 3). Em todas as condições testadas, exceto em uma (experimento 15), os teores de celulose foram superiores em relação à biomassa bruta sem pré-tratamento. A condição experimental 15, com o menor teor de celulose obtido ($8,60\% \pm 3,7$), apresentou-se como ótima para a preservação seletiva da hemicelulose, elevando consideravelmente o teor de 23,85% para 44,30% de hemicelulose. A comparação com a biomassa bruta, sem pré-tratamento, indica que os teores de lignina, extraíveis e celulose reduziram bastante, enquanto a hemicelulose foi preservada, causando a sua elevação relativa.

O maior teor de celulose obtido ($64,65\% \pm 0,6$) resultou em aumento de mais de 280%, em relação ao material bruto ($22,8\% \pm 0,1$). Tal incremento em celulose leva a maior disponibilidade de carboidratos fermentescíveis e possivelmente maior produtividade de etanol.

Segundo Perego & Bianchi (2010), a digestibilidade enzimática da celulose na biomassa sem pré-tratamento é baixa (<20% de rendimento) por causa das suas características estruturais recalcitrantes; desta maneira,

para tornar a hidrólise enzimática mais eficaz, deve-se fazer algum tipo de processo de pré-tratamento para quebrar a estrutura cristalina do material lignocelulósico e remover a lignina para expor a celulose e hemicelulose.

Após a análise de todos os resultados encontrados dentre as condições usadas no planejamento fatorial (Tabela 2), o experimento 16 se destacou quanto a diminuição de extraíveis ($3,15\% \pm 1,2$), capacidade deslignificante ($14,80\% \pm 0,6$), redução da hemicelulose ($17,35\% \pm 2,3$) e obtenção de elevadores teores de celulose ($64,65\% \pm 0,6$), provavelmente, favorecendo a desestruturação da biomassa de *Brachiaria brizantha* e com a geração de menores níveis de inibidores fermentativos, como furfural e hidróximetilfurfural.

Outros resultados apresentados por Lim & Lee (2013) sobre um misto de *Pinus rigida* e *Pinus densiflora* também indicam aumentos nos teores de celulose, atingindo valores entre 55 a 64%.

Kashaninejad & Tabil (2011), ao utilizaram a radiação de micro-ondas com conjunto com pré-tratamentos químicos alcalinos sobre palha de trigo e cevada, concluíram que as amostras apresentaram menores teores de hemicelulose, lignina e celulose do que as amostras não tratadas, indicando que o pré-tratamento micro-ondas/alcalino desestrutura o material lignocelulósico, dissolvendo os componentes, contradizendo com resultados apresentados neste trabalho. Entretanto, no pré-tratamento proposto por Kashaninejad & Tabil (2011), a radiação de micro-ondas foi aplicada até que umidade da amostra atingisse 12% b.u.

Como no presente trabalho foram observados aumentos dos teores de hemicelulose e celulose, pode-se inferir a necessidade de otimizar as condições do pré-tratamento para cada tipo de biomassa lignocelulósica em particular, já que o pré-tratamento químico alcalino associado à radiação de micro-ondas apresenta seletividade na solubilização dos constituintes da amostra.

A significância dos efeitos das variáveis e suas possíveis interações foram obtidas através da análise de variância (ANAVA), em função dos teores de extraíveis, hemicelulose, lignina e celulose determinados conforme o planejamento fatorial descrito anteriormente.

Assim, para os extraíveis, as variáveis tempo e potência foram significativas a 5% de confiança, sendo efeito positivo para o tempo, aumentando o teor de extraíveis; e efeito negativo para a potência da radiação de micro-ondas aplicada (Tabela 4). Ainda, foi verificada a ocorrência de interação significativa entre a concentração alcalina e a potência da radiação aplicada.

Tabela 4- Valores médios e desvios padrão para cada constituinte da biomassa *Brachiaria brizantha* em função dos níveis das variáveis do planejamento fatorial

	Extraíveis	Hemicelulose	Lignina	Celulose
Concentração				
0,5%	2,506 ± 0,192	27,388 ± 0,955*	31,475 ± 0,977	41,856 ± 1,423
5%	2,662 ± 0,192	24,175 ± 0,955*	29,619 ± 0,977	40,319 ± 1,423
RazãoLS				
1:10	2,681 ± 0,192	23,025 ± 0,955*	30,769 ± 0,977	43,531 ± 1,423*
1:50	2,487 ± 0,192	28,538 ± 0,955*	30,325 ± 0,977	38,644 ± 1,423*
Tempo				
10	2,188 ± 0,192*	27,231 ± 0,955*	29,119 ± 0,977	41,456 ± 1,423
60	2,981 ± 0,192*	24,331 ± 0,955*	31,975 ± 0,977	40,719 ± 1,423
Potência				
10%	2,906 ± 0,192*	24,256 ± 0,955*	36,288 ± 0,977*	36,544 ± 1,423*
20%	2,262 ± 0,192*	27,306 ± 0,955*	24,806 ± 0,977*	45,631 ± 1,423*

*Médias significativamente diferentes entre si a 95% de confiança (teste F)

Para a hemicelulose, todas as variáveis foram significativas sobre os teores encontrados e também foram verificadas interações secundárias entre a concentração e as demais variáveis, além de interação entre o tempo e a potência da radiação. A concentração alcalina e o tempo apresentaram efeitos negativos, levando à redução dos teores de hemicelulose; enquanto que a razão líquido-sólido e a potência da radiação de micro-ondas tiveram efeitos positivos (Tabela 4).

Somente a variável potência de radiação apresentou efeito significativo negativo sobre a lignina, conduzindo a menores teores com o aumento da potência da radiação. Também foram verificadas interações secundárias entre a potência com a concentração alcalina e a potência com o tempo de irradiação (Tabela 4).

Para a celulose, as variáveis razão líquido-sólido (Razão LS) e potência da radiação de micro-ondas apresentaram efeitos significativos (Tabela 4); onde a razão líquido-sólido teve efeito negativo com teores menores de celulose; e a potência da radiação de micro-ondas teve efeito positivo, levando a teores maiores de celulose na biomassa de *Brachiaria brizantha*.

De acordo com Kumar et al. (2009), os efeitos dos pré-tratamentos alcalinos dependem do conteúdo de lignina da biomassa lignocelulósica usada. Em geral, estes envolvem temperaturas e pressões menores do que outros tipos de pré-tratamentos. Também aumentam o índice de cristalinidade pela remoção de substâncias amorfas (lignina e hemicelulose), reduzindo os teores de lignina a cerca de 10%, o que foi verificado também no presente trabalho.

Através de análise comparativa dos espectros de infravermelho (Figura 2), pode-se observar que as ligações de hidrogênio na celulose foram rompidas pelo pré-tratamento alcalino associado à radiação de micro-ondas (3348 cm^{-1}) e que há remoção da celulose pelo pré-tratamento alcalino (2900 cm^{-1}), porém há diminuição mínima da lignina (1745 cm^{-1}), também com pequena remoção de lignina e hemicelulose observada na posição de banda 1720 cm^{-1} .

Quando analisado a banda em 1595 cm^{-1} , observa-se que o material bruto sem tratamento possui maior conteúdo de lignina do que o material pré-tratado, o que também

pode ser observado para os grupos acetil (hemicelulose), com sua diminuição, observados pela banda em 1245 cm^{-1} , em conformidade com os resultados obtidos por Kumar et al. (2009), que concluiu que é evidente que a maior remoção de xilano resultaria em maior remoção do grupo acetil.

Para o material pré-tratado também foi possível observar a remoção de celulose amorfa (banda 900 cm^{-1}).

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

O índice de cristalinidade (CrI) foi determinado para o material sem e com pré-tratamento, sendo encontrados valores de 31,3% para o material bruto e de 22,0% para o material pré-tratado com maiores quantidades de celulose (experimento 16, Tabela 2), o que corrobora com os resultados obtidos por Kumar et al. (2009) e Laureano-Perez et al (2005), indicando a diminuição da cristalinidade em pré-tratamentos alcalinos.

Na hidrólise enzimática do material lignocelulósico foram utilizados 5 FPU por grama de biomassa de *Brachiaria brizantha* bruta e após o pré-tratamento (condições 16, Tabela 2). As condições do experimento 16 foram selecionadas por apresentarem o maior teor de celulose e o menor de lignina e a biomassa bruta sem pré-tratamento foi hidrolisada para efeito de comparação.

Após o acompanhamento da hidrólise enzimática, observou-se que nas primeiras 24 horas as enzimas conseguiram atingir quase que o máximo de açúcares possíveis (Figura 1), e a quantidade máxima liberada de açúcares redutores obteve-se a 14,09 g L^{-1} na

biomassa pré-tratada e para a biomassa bruta foi de 8,95 g L⁻¹, significando que, após o pré-tratamento alcalino associado à radiação de micro-ondas, dobrou a quantidade de açúcares hidrolisados no meio.

Tais resultados são corroborados por estudos feitos por Binod et al. (2012) que, ao comparar o pré-tratamento alcalino com NaOH (1%) e a sua associação com a radiação de micro-ondas, obteve uma elevação de cerca de 25% no teor de açúcares redutores hidrolisados.

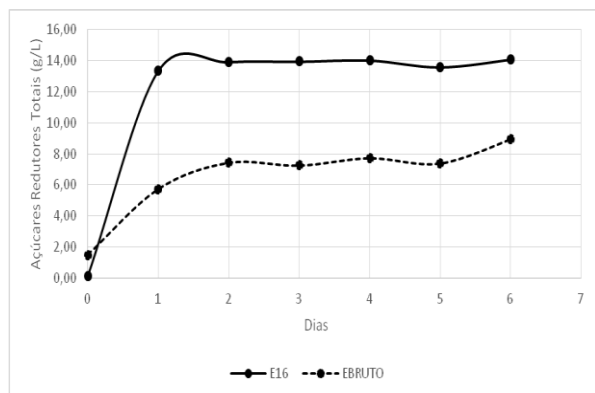


Figura 1 - Teores de Açúcares Redutores Totais (g L⁻¹) produzidos pelas hidrólises enzimáticas de *Brachiaria Brizantha* cv. marandu bruto e após o pré-tratamento alcalino com radiação de micro-ondas.

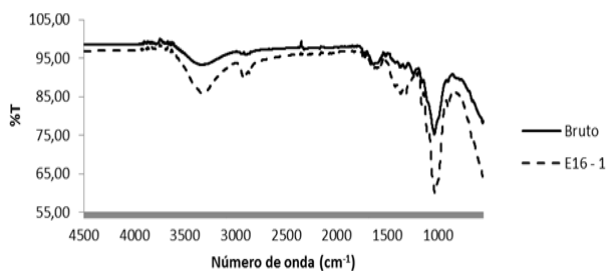


Figura 2 - Espectrometria do material sem tratamento e o material com melhor resultado (E16).

Nos resultados encontrados por Chaudhary, Singh e Ghosh (2012), no qual foi utilizado um pré-tratamento com amônia em uma gramínea, *Saccharum spontaneum*, e, posterior hidrólise com ácido sulfúrico tratados com várias concentrações (30 - 70% (v/v)) de ácido sulfúrico para solubilizar a celulose polimérica e hemicelulose; a melhor hidrólise ácida descrita que foi a de 60% (v/v) de ácido sulfúrico por 4 horas, com um teor de 8,96 g L⁻¹ de açúcares redutores totais, sendo quase a metade do que foi encontrado neste trabalho (14,09 g L⁻¹).

Carvalho et al. (2011) também utilizaram a biomassa da gramínea *Brachiaria brizantha* cv. marandu em seus trabalhos, com pré-tratamento com ácido sulfúrico, e foram utilizados 7,5 mL da solução ácida por grama de biomassa seca, por 30 minutos em autoclave a 121 °C.

Para a hidrólise enzimática, foi utilizado um complexo celulolítico comercial (Novozymes, 20 FPU g⁻¹ de biomassa seca), durante 18 horas. Foram obtidas concentrações de aproximadamente 26 g L⁻¹ de glicose a partir de soluções com 100 g L⁻¹ da biomassa pré-tratada, permitindo uma hidrólise de cerca de 50% da celulose disponível.

4 CONCLUSÃO

A *Brachiaria brizantha* cv marandu, pré-tratada com hidróxido de sódio sob radiação de micro-ondas, atingiu uma desglinificação de cerca de 67%, e obteve a elevação no teor de celulose, até cerca de 64%. O teor de açúcares redutores totais foram de 14,09 g L⁻¹, enquanto o material sem pré-tratamento atingiu apenas 8,95 g L⁻¹, representando um incremento de 57%.

Dentre os pré-tratamentos analisados os autores sugerem que o melhor experimento para a obtenção de bioetanol foi o 16, apresentando maiores teores de celulose disponíveis para a hidrólise enzimática.

5 REFERÊNCIAS

- Binod, P.; Satyanagalakshmi, K.; Sindhu, R.; Janu, K.U.; Sukumaran, R.K.; Pandey, A. Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, Amsterdam v. 37, p. 109–116, 2012. doi:10.1016/j.renene.2011.06.007
- Canilha, L.; Chandel, A.K.; Milessi, T.S.S.; Antunes, F.A.F.; Freitas, W.L.C.; Felipe, M.G.A.; Da Silva, S.S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, London, v. 2012, Article ID 989572, 15 páginas. doi:10.1155/2012/989572
- Carvalho, F.B. de P.; Pacheco, T.F.; Rodrigues, D. de S.; Gonçalves, S.B.; Carvalho, M.A.; Machado, C.M.M. Produção de Etanol a partir da forrageira *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos 13, 2011, Caxias do Sul. **Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Caxias do Sul, 2011.
- Chaudhary, G.; Singh, L.K.; Ghosh, S. Alkaline pretreatment methods followed by acid hydrolysis of *Saccharum spontaneum* for bioethanol production. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 124, p. 111–118, 2012. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.067
- Chen, W.H.; Tu, Y.J.; Sheen, H.K. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. **Applied Energy**, Amestredam, v. 88, p. 2726–2734, 2011. doi:10.1016/j.apenergy.2011.02.027

- De Almeida, R.G.; Nascimento Junior, D.; Euclides, V.P.B.; Macedo, M.C.M.; Da Fonseca, D.M.; Brâncio, P.A.; Garcez Neto, A.F. Disponibilidade, Composição Botânica e Valor Nutritivo da Forragem de Pastos Consorciados, sob Três Taxas de Lotação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, p. 36–46, 2003. doi:10.1590/S1516-35982003000100005
- Fagundes, J.L.; Fonseca, D.M. da, Gomide, J.A.; Nascimento Junior, D. do, Vitor, C.M.T.; Morais, R.V. de, Mistura, C.; Reis, G. da C.; Martuscello, J.A. Acúmulo de forragem em pastos de Brachiaria decumbens adubados com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 397–403, 2005. doi:10.1590/S0100-204X2005000400012
- Ghose, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure Applied Chemistry**, Research Triangle Park, v. 59, p. 257–268, 1987. doi:10.1351/pac198759020257
- Guo, M.; Song, W.; Buhain, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 42, p. 712–725, 2015. doi:10.1016/j.rser.2014.10.013
- Kashaninejad, M.; Tabil, L.G. Effect of microwave-chemical pre-treatment on compression characteristics of biomass grinds. **Biosystems Engineering**, Amsterdam v. 108, p. 36–45, 2011. doi:10.1016/j.biosystemseng.2010.10.008
- Kim, S.; Holtzapfel, M.T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 97, p. 583–591, 2006. doi:10.1016/j.biortech.2005.03.040
- Kohlhepp, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, p. 223–253, 2010. doi:10.1590/S0103-40142010000100017
- Kumar, P.; Barrett, D.M.; Delwiche, M.J.; Stroeve, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial and Engineering Chemistry (Analytical Edition)**, Washington, v. 48, p. 3713–3729, 2009. doi:10.1021/ie801542g
- Laureano-Perez, L.; Teymour, F.; Alizadeh, H.; Dale, B.E. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass: Characterization of Pretreated Corn Stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Hoboken, v. 124, p. 1081–1100, 2005. doi:10.1385/ABAB:124:1-3:1081
- Li, S.; Xu, S.; Liu, S.; Yang, C.; Lu, Q. Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 85, p. 1201–1211, 2004. doi:10.1016/j.fuproc.2003.11.043
- Lim, W.-S.; Lee, J.-W. Influence of pretreatment condition on the fermentable sugar production and enzymatic hydrolysis of dilute acid-pretreated mixed softwood. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 140, p. 306–311, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2013.04.103
- Lin, L.; Yan, R.; Liu, Y.; Jiang, W. In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, p. 8217–8223, 2010. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.084
- Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426–428, 1959. doi:10.1021/ac60147a030
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapfel, M.; Ladisch, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 96, p. 673–686, 2005. doi:10.1016/j.biortech.2004.06.025
- Peng, H.; Li, H.; Luo, H.; Xu, J. A novel combined pretreatment of ball milling and microwave irradiation for enhancing enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 130, p. 81–87, 2013. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.167
- Perego, C.; Bianchi, D. Biomass upgrading through acid-base catalysis. **Chemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 161, p. 314–322, 2010. doi:10.1016/j.cej.2010.01.036
- Sarkar, N.; Ghosh, S.K.; Bannerjee, S.; Aikat, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, Amsterdam, v. 37, p. 19–27, 2012. doi:10.1016/j.renene.2011.06.045
- Segal, L.; Creely, J.J.; Martin Jr., A.E.; Conrad, C.M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, Newbury Park, v. 29, p. 786–794, 1959. doi:10.1177/004051755902901003
- Welker, C.; Balasubramanian, V.; Petti, C.; Rai, K.; DeBolt, S.; Mendu, V. Engineering Plant Biomass Lignin Content and Composition for Biofuels and Bioproducts. **Energies**, Basel, v. 8, p. 7654–7676, 2015. doi:10.3390/en8087654
- Xue, B.L.; Li, M.F.; Xu, F.; Sun, R.C.; Jones, G. Microwave-enhanced alkali treatment of Pinus yunnanensis: Physicochemical characterization of the dissolved lignins. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 36, p. 209–216, 2012. doi:10.1016/j.indcrop.2011.09.008