



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

Itana Neiva Batista¹, Walysson Bernardo Rodrigues Santos², Flávia Lucila Tonani de Siqueira³, Guilherme Benko de Siqueira⁴ & Paulo Ricardo Américo Glória⁵

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

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

POTENTIAL ETHANOL PRODUCTION FROM DIFFERENT BRACHIARIA SPECIES

ABSTRACT: Energy alternatives, through renewable energy sources, have been the subject of worldwide researches. Thus, the lignocellulosic material consists of an interesting alternative of raw material. In this work, the potential ethanol production of four Brachiaria species was studied. The experimental design was completely randomized, with four treatments (Brachiaria) and four replications. The data obtained were submitted to the Shapiro-Wilk normality test and later to the analysis of variance by the test F. The means of the treatments and their respective unfolding were compared by the Scott-Knott test at 5% probability. The levels of neutral and acid detergent fiber and digestibility were experimentally assayed and ethanol production was estimated by stoichiometry. Differences were observed between the brachiaria species for the potential of second generation ethanol production, as a function of the amount of digestible neutral detergent fiber. *B. decumbens* and *B. brizantha* cv. Marandu presented lower potential of second generation ethanol production when compared to *B. ruziziensis* and Convert HD364.

KEYWORDS: Digestibility, 2G ethanol, potential, hydrolysis.

1 INTRODUÇÃO

Alternativas energéticas, por meio de fontes renováveis de energia, tem sido objeto de pesquisas no mundo inteiro, seja por motivos econômicos, geopolíticos ou ambientais (RABELO, 2010). Sendo assim, o material lignocelulósico consiste em uma alternativa interessante de matéria-prima, pois é abundante, permanente, subutilizado e, por tanto, tende a custos menores que a biomassa cultivada para o propósito de geração de etanol convencional, diminui a competição pelo uso da terra e se trata de um resíduo (não alimento) (LYND et al

2002). Além disso, é formado principalmente pelos biopolímeros renováveis, celulose, hemicelulose e lignina (SUN et al., 2011).

Nesse sentido, o melhoramento das forrageiras do gênero *Brachiaria* visando à produção de combustíveis pode ser uma alternativa interessante para a viabilização de um processo competitivo de produção de etanol lignocelulósico. Portanto, objetivou-se com esse trabalho avaliar as potencialidades de produção de Etanol de segunda geração a partir de quatro espécies de braquiárias (*Decumbens*, *Brizantha* cv. Marandu, *Ruziziensis* e Convert HD364).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local, tratamentos e delineamento experimental

O estudo foi conduzido no Laboratório de Solos da Universidade Federal do Tocantins (UFT). Foram avaliadas quatro fontes de biomassa lignocelulósica (parte aérea da planta), o capim *Brachiaria decumbes*, a

¹, ², ³, ⁴ e ⁵ Emails: itananeiva@gmail.com
walyssonbernardo@gmail.com;
flaviatonani@mail.uft.edu.br; guibenko@uft.edu.br;
pauloricardouft@live.com

Brachiaria híbrida Convert HD 364, *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Brachiaria ruzizienses*, mediante a ação do emprego de um pré-tratamento promotor de hidrólise, posteriormente associado à digestão por complexos enzimáticos comerciais. Todas as espécies de brachiarias foram semeadas ao mesmo tempo e colhidas com 60 dias de crescimento, contados após corte de uniformização dos *stands*. No tratamento enzimático (hidrólise enzimática) foi utilizada a associação dos complexos enzimáticos Cellic® HTec2 e Cellic® CTec2, obtidos a partir de cepas de *Trichoderma reesei*, da empresa Novozymes.

2.2 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (Braquiárias) e quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e quando necessários foram normalizados. Posteriormente foi realizada a análise de variância pelo teste F a 5% de significância. As médias dos tratamentos e dos seus respectivos desdobramentos foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os procedimentos estatísticos serão realizados através do programa estatístico Assistat 7.7 conforme Silva e, Azevedo (2016). Para análise de regressão simples foi utilizado o programa SAS 9.2 (SCHLOTZHAUER., 2009). 2.2 Parâmetros avaliados

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

2.3 Preparo da biomassa

Foram coletadas amostras referentes a cada fonte de biomassa pré-seca, que foram mantidas em estufa à temperatura de 60 °C até peso constante. Estas amostras foram moídas em moinho de facas com peneira de 20 “mesh” e mantidas em dessecador.

2.4 Determinação de componentes pelo método Van Soest

O método proposto por Van Soest (1994) foi utilizado para a determinação da composição de forrageiras por permitir um melhor fracionamento dos diversos componentes da fração fibrosa. Para a determinação do FDN foi realizado o seguinte procedimento: 1,0 g de amostra foi submetida a um processo de lavagem da parede celular onde o conteúdo celular é retirado do material quando submetido à lavagem por 60 minutos em 100 mL de solução de fibra de detergente neutro a quente (aproximadamente 105 °C).

Para a análise das fibras em detergente ácido pesou-se 1,0 g de amostra sendo submetida ao mesmo procedimento de lavagem a quente que o descrito para FDN. Terminado este processo, a amostra foi filtrada

com auxílio de uma bomba de vácuo e lavada primeiramente com água quente (90 a 100 °C) duas vezes, e em seguida com acetona outras duas vezes. A amostra foi levada a uma estufa para secar a 60 °C. Depois foi esfriada em um dessecador para que fosse feita a pesagem.

2.5 Pré-tratamento

O material foi submetido a um pré-tratamento intercalado entre ataque ácido (H₂SO₄ a 1% v/v, 3g material/10 ml solução) e básico (NaOH a 4% v/v, 3g material/20 ml solução) da fibra por 60 min à temperatura de 120 °C a 125 °C em autoclave em cada etapa do processo. Terminado o pré-tratamento, a amostra foi filtrada utilizando uma bomba de vácuo e lavou-se por duas vezes com água quente (90 a 100 °C), e outras duas vezes com acetona, até que as fibras se tornem incolor em toda a amostra. A amostra foi seca em estufa a 60 °C .

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

2.6 Hidrólise enzimática

O meio reacional consistiu de 1,0 g do substrato, 16 mL do tampão citrato de sódio/ácido cítrico (0,05 M, pH = 4,8) das enzimas diluídas em frascos erlemeyer de 250 mL. As reações enzimáticas se deram em incubadora “shaker” a 48 °C, agitação de 180 rpm, durante 72 horas. A dosagem dos complexos enzimáticos CellicCTec2 e HTec2 foi baseada na proporção relativa de FDA e hemicelulose (FDN-FDA) em relação ao FDN contido na amostra; foi usado o nível de dosagem correspondente a 6,0% da FDA como complexo enzimático, que é o nível indicado pelo fabricante, e a hidrólise foi realizada em quadruplicata, assim como no pré-tratamento.

2.7 Determinação da fração fermentescível da fibra (açúcares solúveis)

Após a hidrólise enzimática com a associação dos complexos enzimáticos Cellic Ctec2 e CellicHTec2, pode-se estimar os açúcares fermentescíveis. Para tanto, a metodologia utilizada tomou por princípio a quantificação da fração da fibra em detergente neutro que sofreu hidrólise enzimática pela diferença entre o peso inicial da amostra submetida à hidrólise e seu peso ao final da hidrólise. Pelo fato de ser um mix de enzimas, a digestibilidade observada no material se dá exclusivamente sobre o substrato de FDN que gera açúcares solúveis e passíveis de serem fermentados. Assim a fibra em detergente neutro digestível refere-se à fração da FDN que sofreu hidrólise enzimática e liberou açúcares livres para a potencial fermentação etílica.

Temos assim, uma quantificação indireta da proporção de açúcares solúveis obtidos a partir da hidrólise enzimática do material.

2.8 Estimativa da produção de etanol

Segundo Finguerut et al. (1985), a estimativa do rendimento do processo fermentativo se deu de forma estequiométrica pela aplicação da equação de Gay – Lussac que, para efeito de cálculo, considera que cada 100 Kg de Açúcar Redutor Total (ART) (expressos em glicose e hemicelulose) fermentado, produzem-se 51,1 Kg de etanol. Porém segundo os mesmos autores valores mais aproximados para o cálculo do rendimento de etanol, desprezando-se as massas de fontes nitrogenadas, sais e admitindo-se que a produção de CO₂ (em massa) iguala-se à produção etanol, reportaram eficiência de rendimento de 46,49 kg etanol/100 açúcares totais. Com base neste parâmetro o rendimento de etanol foi calculado neste trabalho.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Pré-tratamento

O presente trabalho apresenta a proporção de material insolúvel recuperado após pré-tratamento (o que

chamaremos de material pré-tratado e equivaleria à fibra bruta) e faremos o paralelo com a quantidade de FDN presente no material. Desta forma, pode-se avaliar o grau de perda da fração fibrosa (majoritariamente composta por Hemicelulose) que pode ter ocorrido durante o pré-tratamento para as diferentes espécies de braquiárias.

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

A partir das considerações apresentadas sobre o pré-tratamento, estão apresentados na tabela 1 a seguir, os resultados observados para o pré-tratamento. Nesta tabela ficam explícitas as proporções de perda da fração fibrosa solubilizada com o pré-tratamento e a comparação entre a fração insolúvel (pré-tratamento) e a concentração de FDN observada nas amostras.

Tabela 1 – Material Insolúvel após pré-tratamento (%MS), Fibra em detergente neutro (% MS) e perda por solubilização da hemicelulose (% MS) para diferentes espécies de braquiárias.

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

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

A partir da análise dos dados apresentados na Tabela 1, constata-se que a fração insolúvel após o pré-tratamento corresponde a fração fibrosa (que foi posteriormente submetida a hidrólise enzimática) e que deve se aproximar dos resultados esperados para fibra bruta e não fibra em detergente neutro (FDN). Assim, a subtração direta da fração Pré-tratamento (conforme descrita na Tabela 1) com a fração FDN resulta na perda de parte da fibra por solubilização. Pode-se observar também que o grau de solubilização da fibra no pré-tratamento foi semelhante para todas as espécies de braquiárias não sendo observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre elas.

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

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

Os teores de FDN e FDA das diferentes espécies de Braquiárias são apresentados na Tabela 2. O teor de hemicelulose foi determinado pela diferença entre fibras em detergente neutro (FDN) e fibras em detergente ácido (FDA).

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

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

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

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

Entende-se por coeficiente de digestibilidade da Fibra o percentual de fibra passível de digestão enzimática, expressa como % Fibra. Já a fibra em detergente neutro digestível representa a quantidade de FDN potencialmente digestível na gramínea, e está expressa como % da matéria seca. A diferença entre elas é que a primeira (CD_{Fibra}) se refere ao coeficiente de digestibilidade da Fibra, e a segunda ($FDN_{digestível}$), se refere ao coeficiente de digestibilidade da fibra (CD_{Fibra}) multiplicado pelo teor (proporção relativa) de FDN na amostra, ou seja, à quantidade de FDN digestível. Cabe ressaltar aqui na descrição desta metodologia que, em função do pré-tratamento se assemelhar à metodologia de determinação da fibra bruta, optamos por denominar o coeficiente de digestibilidade da fração fibrosa como coeficiente de digestibilidade da fibra (CD_{Fibra}) apenas

uma vez que foi observada perda de hemicelulose no pré-tratamento.

Na Tabela 3 estão apresentados os dados para o coeficiente de digestibilidade da fibra (CD_{Fibra}) e fibra em detergente neutro digestível ($FDN_{digestível}$) para as diferentes espécies de braquiárias. Foi observado efeito significativo entre as espécies de braquiárias tanto para o CD_{Fibra} , quanto para a quantidade de fibra em detergente neutro digestível ($FDN_{digestível}$). Entre as espécies de braquiárias estudadas, a *B. decumbense* a *B. brizantha* cv. Marandu foram as que apresentaram menor ($p < 0,01$) coeficiente de digestibilidade da fibra (CD_{Fibra}) e consequentemente, menor $FDN_{digestível}$ ($FDN_{digestível}$). A *B. ruziziensis* e a Braquiária híbrida Convert HD364 apresentaram teores de CD_{FB} e $FDN_{digestível}$ mais elevados ($p < 0,05$) que as primeiras, porém não diferindo entre si ($p < 0,01$).

Tabela 3 - Coeficiente de digestibilidade da fibra (CD_{Fibra}), Fibra em detergente neutro digestível ($FDN_{digestível}$) e Produção potencial de Etanol (Etanol Potencial) a partir das Braquiárias: decumbens, brizantha cv Marandu, ruziziensis e Convert HD 364.

Gramíneas	CD_{Fibra} (% Fibra)	$FDN_{digestível}$ (% MS)	Etanol Potencial (ml/ kg MS _{pré-tratado})
B. decumbens	17,91 B	13,80 B	81,31 B
B. BrizanthacvMarandu	20,09 B	15,25 B	90,68 B
<i>B. Ruziziensis</i>	28,22 A	20,70 A	121,96 A
Convert HD364	29,34 A	22,46 A	135,15 A
CV (%)	15,26	16,72	16,35

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

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

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

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

Segundo Jung e Deetz (1993), o acesso limitado das enzimas ao centro de reação do carboidrato parece ser o maior fator restritivo à degradação da parede celular das forrageiras, em decorrência da lignificação. Isto explica o menor coeficiente de digestibilidade apresentado pela *B. decumbes*, seguida pela *B. brizantha* cv. Marandu. Assim, em acordo com os valores encontrados por Paciullo et al (2001), entre as espécies estudadas, o

B. decumbes foi a que apresentou teor mais elevado de lignina (4,0%), sendo que as duas outras espécies não diferiram entre si (3,1%). Por isso a mais baixa digestibilidade em colmo de *B. decumbes* pode ser atribuída ao teor elevado de lignina.

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

Braquiária Convert HD364 apresentou características semelhantes a *B. ruiziensis* em relação a qualidade da fibra.

3.2.2- Rendimento de bioetanol

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

A *B. decumbens* e a *B. brizantha* cv. Marandu foram as que apresentaram os menores coeficiente de digestibilidade da fibra (CD_{Fibra}) e quantidade de fibra digestível ($FDN_{\text{digestível}}$) ($p < 0,05$) entre as espécies de Braquiárias estudadas. Foram observados para a *decumbens* e *brizantha* um coeficiente de digestibilidade da fibra (CD_{Fibra} : 17,91 e 20,09 %FDN) e quantidade de fibra digestível ($FDN_{\text{digestível}}$: 13,80 e 15,25 %MS_{pré-tratado}), respectivamente. Os potenciais de geração de etanol observados tiveram o mesmo agrupamento de médias, sendo para as braquiárias *decumbens* e *brizantha* de 81,31 ml/kg MS_{pré-tratado} e 90,68 ml/kg MS_{pré-tratado} respectivamente.

Entretanto, a Braquiária híbrida Convert HD364 e a *B. ruiziensis* não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$) para CD_{Fibra} e $FDN_{\text{digestível}}$, resultando em uma produção potencial de etanol também semelhante entre ambas, tendo sido observado valores de 135,15 e 121,96 ml/Kg MS_{pré-tratado}, respectivamente. Uma vez que CD_{Fibra} e a $FDN_{\text{digestível}}$ tenham sido semelhantes para as duas braquiárias (*ruiziensis* e covert HD364), também não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) para a produção potencial de etanol entre elas.

Contudo, Santos (2016), chegou a um valor superior de 347,13 rendimento de etanol em (mL/Kg MS) para braquiária CONVERT HD364 devido o material ter recebido adubação nitrogenada. Já o bagaço de cana-de-açúcar produziu, com o processo fermentativo, 46,1 g/L de etanol, ou seja, 90,2% do rendimento teórico de uma fermentação alcoólica, com produtividade de 12,3 g etanol/L.h.

3.3- Regressão Linear

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

O ajuste do modelo de regressão apresentou elevado coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9804$) o que representa uma elevada capacidade do modelo em prever a produção potencial de etanol a partir da quantidade de fibra em detergente neutro digestível.

Além disso, o coeficiente de regressão foi significativo dentro do modelo ($P < 0,01$).

A amplitude da quantidade de fibra digestível ($FDN_{\text{digestível}}$) observada entre as espécies, corrobora com o teste de médias que sugeriu agrupamentos das médias para a mesma variável ($FDN_{\text{digestível}}$), o que pode ser explicado pelo efeito que a qualidade da fibra (estrutura química, arranjo espacial das moléculas de celulose, hemicelulose e lignina) exercem sobre o potencial de hidrólise enzimática dos carboidratos e posterior produção de etanol.

4 CONCLUSÃO

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

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

5 REFERÊNCIAS

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

JUNG, H. G.; DEETZ, D. A. Cell wall lignification and degradability. In H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield, and J. Ralph, eds. Forage Cell Wall Structure and Digestibility. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, USA. 1993, p. 315-326.

HUGHES, N. R. G.; VALLE, C. B. SABATEL, V.; BOOCK, J. Shearing strengt as na additional selectin criterion for quality in Brachiaria pasture ecotypes. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 135, n. 2, p.1 23-130, 2000.

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

PACIULLO, D. S. C.; GOMIDE, J. A.; QUEIROZ, D. S.; SILVA, E. A. M. Composição química e digestibilidade In Vitro de lâminas foliares e colmos de gramíneas forrageiras, em função do nível de inserção no perfilho, da idade e da estação de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 964-974, 2001.

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

SANTOS, W. B. R. **Estimativa da produção potencial de etanol da Braquiária híbrida Convert HD 364.** 2016.60.

SILVA, F. A. S, AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African. Journal. Agricultural. Research.**, Lagos, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, Sept.2016. DOI: 10.5897/AJAR2016.11522.

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

SUN, N; RODRIGUEZ, H; RAHMAN, M; ROGERS, R.D. Where are ionic liquid strategies most suited in the pursuit of chemicals and energy from lignocellulosic biomass? **Chemical Communications.**, Tuscaloosa, v. 47, n. 5, p. 1405-1421, 2011.. DOI: 10.1039/c0cc03990j.

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

SCHLOTZHAUER, S. D. **Elementary Statistics Using SAS.** Cary: SAS Institute, 2009.