**Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos**

FABRÍCIO HEITOR MARTELLI

**Determinação e caracterização físico-química e espectroscópica de
gramíneas para obtenção de etanol de segunda geração**

São Carlos

2014

Fabício Heitor Martelli

**Determinação e caracterização físico-química e espectroscópica de
gramíneas para obtenção de etanol de segunda geração**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química Analítica e Inorgânica, no Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Química Analítica e Inorgânica.

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Wilson Tadeu Lopes da Silva

São Carlos

2014

“... para mim, é impossível existir sem sonho. A vida na sua totalidade me ensinou como grande lição que é impossível assumi-la sem risco.”

Paulo Freire

Aos meus pais Heitor e Iraci (in memoriam), pois mesmo que não possam partilhar deste momento junto a mim, acredito que onde estejam também realizaram um sonho.

À minha esposa Lilian sempre presente.

À Helena, minha filha.

Às minhas irmãs Priscila e Michelle.

Agradecimentos

À Deus por me amparar em todos os momentos de minha vida, me dar forças para superar as dificuldades e mostrar os caminhos nas horas incertas.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Wilson Tadeu Lopes da Silva, pelo apoio, confiança, paciência, incentivo e que aceitou o desafio.

Aos técnicos e analistas da Embrapa Instrumentação, principalmente ao Paulo Lasso, Matteo, Viviane, Alice, Edilene e Marcelo.

À pesquisadora Cristiane Farinas que cedeu o laboratório de Agroenergia para a realização das análises dos resíduos de gramíneas.

Ao Prof. Dr. Ernesto Chaves Pereira de Souza e Prof. Dr. Francisco Trivinho-Strixino que no início da graduação me inspiraram para a pesquisa e aconselharam sobre a vida.

Aos amigos e colegas de Embrapa Instrumentação Cléber, Úrsula, Bianca, Francis e Camila.

Aos amigos-irmãos Priscila Ike e Alex, Leandro e Lucimara, Marcelo e Iara.

À Secretaria de Saúde Municipal de São Carlos, Divisão de Vigilância Sanitária - VISAM e local de trabalho que concilei durante estes estudos.

Aos amigos de VISAM que souberam diferenciar o trabalho diário do acadêmico, principalmente Claudinei Trigueirinho com quem dividia minhas alegrias e angústias, à Daniela Anunciação, ambos da equipe do PRÓAGUA e Valcenir Beltrami. Aos chefes que por ali passaram durante este período Eduardo Santini, Marcus Petrilli e Fernanda Cereda.

Aos amigos Josiane, Leandro e Edmar.

À Comunidade Sagrada Família, pelos momentos de fé e partilha.

Ao prof. Dr. Marcelo Ayres e prof. Dr. Parella que cederam as amostras de gramíneas para a realização deste trabalho.

À Embrapa Instrumentação pelo acolhimento e atenção.

Ao Instituto de Química de São Carlos - USP, pelo apoio institucional e à secretaria da pós-graduação.

Resumo

A busca por combustíveis renováveis tem se expandido cada vez mais no mundo moderno, devido à preocupação com a redução do volume de emissões de gases causadores do efeito estufa. No presente trabalho descreve-se a caracterização físico-química e espectroscópica de gramíneas com potencial para geração de Etanol 2G (Sorgo Biomassa, Capim Elefante, Capim Marandu, Capim Mombaça). As matrizes vegetais foram caracterizadas por diferentes técnicas, incluindo Análise Elementar, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C , difração de raios X (DR-X), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura acoplada com detector de energia dispersiva (MEV-EDS). Os componentes extraídos foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por espectroscopia de absorção eletrônica (UV-VIS). O bagaço de cana apresentou maior teor de C com 45,0%, o colmo do Capim-Marandu apresentou maior concentração de O com 46,1%; a concentração de H para todos os materiais ficaram próximas dos 5%; as folhas do Capim-Marandu apresentaram 4,5% de teor de S; as folhas de Capim-Ellefante e do Sorgo apresentaram maior concentração de N que tiveram como média 2%. As análises da composição lignocelulósica por via ácida diluída mostraram que os colmos possuem maior concentração de celulose, hemicelulose e lignina, enquanto as folhas apresentaram maiores teores de inorgânicos (cinzas). As análises por RMN dos materiais brutos mostraram as mesmas tendências de composição orgânica. A DR-X mostrou uma maior presença de celulose cristalina nos colmos, bem como a presença de materiais silicatados na folhas. As análises por FTIR indicaram nos colmos as maiores intensidades de sinal na região das bandas de polissacarídeos ($1030\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$). As folhas apresentaram um sinal peculiar de ligações C-O-C em carbonatos na forma fina e intensa (*sharp*) na região de 1380 cm^{-1} . Também foi empregado o método de Van Soest para caracterização da composição geral da biomassa, sendo os resultados não comparáveis com os observados pelo método em via ácida, superestimando a quantidade de celulose e subestimando os valores de lignina. Com as imagens de MEV foi possível identificar estruturas internas dos materiais estudados, comprovando o ordenamento das fibras vegetais. Apesar das folhas possuírem menor teor de celulose, este polissacarídeo está mais amorfo, comparada com os colmos. No geral, os resultados mostraram que as diferentes gramíneas possuem muita similaridade química-estrutural, fato que deve possibilitar o uso de um mesmo processo de hidrólise, independentemente da fonte.

Palavras-chave: Etanol 2G, Espectroscopia em gramíneas, Caracterização de biomassa.

Abstract

The search for renewable fuels has been increasing in the modern world, due to this worrying about the reduction in the volume of emissions of greenhouse. In this study we describe the physical-chemical and spectroscopic characterization and the grass potential in generating 2G Ethanol (Sorgum, Marandu, Elephant and Mombaça). The plant matrices were characterized by different techniques, including Elemental Analysis, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ^{13}C , X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR), scanning electron microscopy coupled with energy dispersive detector (SEM-EDS). The extracted components were evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC) and spectroscopy of electronic absorption (UV-VIS). Sugarcane bagasse showed higher C content with 45.0%, the stem Marandugrass had the higher O with 46.1%; H concentration for all materials were closer than 5%; the Marandugrass leaves showed 4.5% of the sulfur content; leaves Elephantgrass and sorghum showed higher N which had the average 2%. Analyses of lignocellulosic composition by acid way showed that stems contain higher concentrations of cellulose, hemicellulose and lignin, since leafs presented higher contents of inorganics (ash). NMR analyses of the raw materials showed the same tendency of organic composition. XRD showed higher content of cristaline cellulose in the stem, as well as, the presence of silicate materials in the leafs. FTIR indicated the major stems signal intensities of the bands in the region of polysaccharides ($1030\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$). The leaves had a peculiar C-O-C signal connection in the form of sharp carbonates in the region 1380 cm^{-1} . It was also used the Van Soest method regarding to general characterization of the biomass, but the results were not comparable to the acid way method, because it overvalues the cellulose contents and undervalues the lignin ones. By the SEM images, they were identified internal structures of the studied materials, proving the system of the ordered plant fibers. Despite leafs presented lower contents of cellulose, this polysaccharide is amorphous, comparing to stems. In general, results showed that these different grasses have chemical-structural similarities, which probably makes possible the use of the same hydrolysis process, independently of the biomass source.

Keywords: 2G Ethanol, Spectroscopy in grasses, biomass characterization.

Lista de Figuras

Figura 1- Gráfico de produção de etanol no Brasil em bilhões de litros.....	20
Figura 2- Modelo de produção de Etanol 1G.....	21
Figura 3- Modelo de produção de Etanol 2G.....	24
Figura 4 - Estrutura dos materiais lignocelulósicos constituídos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina.....	25
Figura 5- (a) Conformação unitária do polímero de celulose. Os números 1 a 6 representam os carbonos presentes na estrutura, adaptado de AOUADA et al., 2008, destaca-se o Carbono 4 (C4) e Carbono 6 (C6) e (b) espectro de RMN ^{13}C no estado sólido (CP-MAS) assinaturas típicas dos carbonos da celulose, identificação dos picos em C4 e C6, regiões não cristalinas (N.C.) e deslocamento em ppm.....	26
Figura 6- Parede celular vegetal. Parede primária e secundária (A) e camadas da parede secundária (B) S1, S2 e S3.....	26
Figura 7- Representação da molécula de celulose.....	29
Figura 8- Monossacarídeos constituintes das polioses.....	31
Figura 9- Estruturas de xilose; principal componente da hemicelulose. Em azul β -D-glicose; em vermelho α -D-xilose; em preto α -D-galactose e em marrom resíduos de α -L-fucose.....	31
Figura 10 - Monômeros precursores da lignina (a) álcool trans-para-cumárico, (b) álcool trans-coniferílico e (c) álcool trans-sinapílico.....	33
Figura 11- Modelo estrutural de lignina com destaque para os precursores.....	34
Figura 12- Modelos de associação dos componentes celulares macromoleculares.....	36
Figura 13- Regiões cristalinas (azul) e desordenadas ou amorfas (vermelha), na celulose.....	36
Figura 14- RMN ^{13}C / CP-MAS da celulose I α I β	37
Figura 15- Modelos teóricos de celulose I α (esquerda) em destaque e celulose I β (direita).....	38
Figura 16- eixos e ângulos de rotação de uma célula unitária.....	39
Figura 17 – Estrutura cristalina da celulose I β : (a) projeção da cela unitária ao longo do plano a-b e (b) projeção da célula unitária para o plano de difração.....	39
Figura 18- Capim-Marandu.....	41
Figura 19- Capim-elefante.....	42
Figura 20- Capim-Mombaça.....	43

Figura 21- Sorgo biomassa.....	44
Figura 22- Cana-de-açúcar.....	46
Figura 23- Mecanismo de hidrólise ácida – degradação das ligações glicosídicas.....	50
Figura 24- Formação de furfural e HMF pela degradação de polissacarídeos em meio ácido.....	51
Figura 25- Espectro de RMN ¹³ C /CP-MAS de fios de algodão.....	56
Figura 26- Espectro de RMN ¹³ C /CP-MAS de Celulose em fase cristalina e amorfa.....	57
Figura 27- Vibrações características dos átomos. Os sinais + e – significam vibrações perpendiculares ao plano do papel.....	59
Figura 28- Espectro de FTIR de bambu com diferentes tratamentos da fibra vegetal.....	61
Figura 29- Espectro de absorção na região UV da lignina obtida em diferentes concentrações de H ₂ SO ₄ – Bagaço integral – BI.....	65
Figura 30- Representação esquemática da Lei de Bragg.....	66
Figura 31- Difração de Raios-X de amostra de celulose demonstrando os planos cristalino e amorfo.....	69
Figura 32- Célula do detector de ultravioleta para CLAE.....	72
Figura 33- Esquema de um detector refratométrico por deflexão.....	73
Figura 34- Desenho esquemático da coluna do microscópio eletrônico de varredura convencional.....	74
Figura 35- Modelos representativos das interações atômicas decorrentes da perturbação do material com o feixe primário (A), sinais resultantes da interação do feixe de elétrons primários com a amostra. Diagrama esquemático apresentando o volume de interação do feixe de elétrons em um alvo sólido (B).....	75
Figura 36- Esquema de plantio do Sorgo, Capim-marandú, Capim-elefante, Capim-mombaça.....	78
Figura 37- Espectros de FTIR, onde A: Bagaço de cana, B: Colmo de Sorgo, C: Folha de sorgo.....	102
Figura 38- Espectros de FTIR para plantas inteiras, onde A: Capim-Marandu, B: Capim-Mombaça, C: Capim-Elefante.....	103
Figura 39- Espectro de FTIR para Capim-Marandu, onde A: Planta Inteira, B: Folha e C: Colmo.....	104

Figura 40- Espectro de FTIR para Capim-Elefante, onde A: Planta Inteira, B: Folhas e C: Colmo.....	105
Figura 41- Espectro de FTIR para Capim-Mombaça, onde A: Planta inteira, B: Colmos e C: Folhas.....	105
Figura 42- FTIR do colmo de Capim-Mombaça com diferentes cortes, onde A: 45 dias, B: 45 dias rebrota, C: 90 dias, D: 90 dias rebrota, E: 135 dias e F: 180 dias.....	106
Figura 43- Espectro de FTIR para cinzas de Capim-Mombaça – Colmo.....	107
Figura 44- Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS para os materiais estudados, onde A: Bagaço de cana; B: Capim-Marandu-Colmo; C: Capim-elefante – Colmo; D: Capim-Mombaça – Colmo; E: Sorgo – Colmo; F: Capim-Marandu – Folhas; G: Capim-Elefante – Folhas; H: Capim-Mombaça- Folhas; I: Sorgo - Folhas; J: Capim-Marandu – Planta Inteira; K: Capim-Elefante – Planta Inteira; e L: Capim-Mombaça – Planta Inteira.....	109
Figura 45- Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS onde A: Bagaço de cana; B: Capim-Marandu - Colmo; C: Sorgo – colmo; D: Capim-Mombaça – Colmo e E: Capim-elefante – Colmo.....	114
Figura 46- Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS para Capim-Mombaça – Colmo.....	115
Figura 47- Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS onde A: Bagaço de cana; B: Planta inteira de Capim-Mombaça; C: Planta inteira de Capim-Elefante e D: Planta inteira de Capim-Marandu.....	116
Figura 48- Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS para as biomassas estudadas, onde A: colmo de Capim-Marandu; B: folhas de Capim-Marandu e C: Planta inteira de Capim-Marandu.....	117
Figura 49- Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS para as biomassas estudadas, onde A: colmo de Capim-Elefante; B: folhas de Capim-Elefante e C: Planta inteira de Capim-Elefante.....	117
Figura 50- Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS para as biomassas estudadas, onde A: colmo de Capim-Mombaça; B: folhas de Capim-Mombaça e C: Planta inteira de Capim-Mombaça.....	118
Figura 51- Difrátogramas das biomassas estudadas.....	119
Figura 52- Difrátogramas de Sorgo Biomassa, onde A: Colmo; B: Folhas.....	121
Figura 53- Difrátogramas de Capim-Marandu, onde A: Colmo; B: Planta Inteira e C: Folhas.....	122
Figura 54- Difrátogramas de Capim-Mombaça, onde A: Colmo; B: Planta Inteira e C: Folhas.....	122
Figura 55- Difrátogramas de Capim-Elefante, onde A: Colmo; B: Planta Inteira e C: Folhas.....	123
Figura 56- Espectro de EDS para a amostra de folha de Capim-Elefante.....	124

Figura 57- Gráfico de distribuição de fase para as folhas de Capim-Elefante - Sulfato de Potássio e Cobre Hexahidratado - $K_2Cu(SO_4)_2 \cdot (H_2O)_6$	125
Figura 58- Espectro de EDS para a amostra de folha de Capim-Mombaça.....	126
Figura 59- Espectro de EDS para a amostra de folha de Capim-Marandu.....	127
Figura 60- Micrografia da folha do Capim-Elefante com pilosidade/tricomas (a) e estrutura estriada da fibra vegetal – vista frontal (b) – 200X.....	128
Figura 61- Micrografia da folha do Capim-Elefante – corte transversal. Esclerênquima (E) - 7000X e 1000X.....	128
Figura 62- MEV de Estrutura de colmo do Capim-Elefante – Células vegetais hexagonais de parênquima (a) - 200X; em (b) halos indicados pelas setas (V) são vasos condutores envoltos por células vegetais de esclerênquima (E) e parênquima (P) - 500X; (c) poro no interior do vaso condutor (V) – 7000X; (d) Estrutura de colmo vista lateral das células vegetais – 200X; (e) parte externa do colmo recoberta com cera e sílica – 500X.....	130
Figura 63- MEV de Folha de Capim-Marandu, (a) vista frontal da estrutura estriada – 200X; (b) superfície composta por pilosidade – 100X; (c) corte transversal da folha com destaque para os vasos condutores – 500X; (d) estrutura base das folhas, onde a seta indica um vaso condutor – 1000X; (e) estrutura na forma de rede anelar e delgada da parte interna de um vaso condutor – 3000X; e (f) esclerênquima– 7000X.....	131
Figura 64- MEV de Corte lateral de estrutura de colmo do Capim-Marandú e microfibrilas em (a); Parte interna do colmo, indica um vaso condutor (V), a presença de colênquima (Co) e parênquima (P), na parte superficial da epiderme há presença de pilosidade conforme (b); células de parênquima presentes no colmo (c); e em (d) paredes celulares vegetais do parênquima, espessura de 125 nm.....	132
Figura 65- MEV (a) vista frontal da estrutura foliar – 500X; (b) parte interna da folha com presença de vasos condutores, parênquima e esclerênquima – 500X; (c) e (d) esclerênquima presente na folha – 3000X e 7000X, espessura das paredes em torno de 2 μm	133
Figura 66- MEV de Estruturas externas do colmo de Capim-Mombaça – presença de ceras (a) – 200X e microcristais de sílica – 7000X(b).....	133
Figura 67- MEV (a) feixes de fibras das células presentes nos colmos de Capim-Mombaça, vista lateral – 200X; (b) vista superior das microfibrilas presentes nos colmos – 200X; (c) corte transversal do colmo, presença de esclerênquima esponjoso indicado pela seta, vasos condutores e parênquima – 200X; (d), (e) e (f) estruturas anelares helicoidais	

dos vasos condutores com diâmetro de 11 μm e espessuras das microfibrilas das paredes de 1 μm134

Figura 68- MEV (a) Vista frontal da folha de Sorgo, com aglomerados de cera – 500X; (b) aglomerados de cera na epiderme; (c) corte transversal da folha indicando presença de esclerênquima esponjoso (E) envolta dos feixes de vasos condutores (V); (d) e (e) feixes de vasos condutores com espessura de 1 μm135

Figura 69- MEV com corte lateral dos feixes de fibras presentes no colmo de Sorgo em (a) – 200X; (b) vista superior do corte transversal da medula com vasos condutores (V), esclerênquima (E) e parênquima (P) – 200X; (c) organização do parênquima – 500X e (d) organização do esclerênquima esponjoso – 7000X.....136

Figura 70- (a) Vista da superfície da amostra de bagaço de cana (colmo) – 2.500X e (b) amostra de bagaço de cana moída com fibras fraturadas – 500X.....137

Lista de Tabelas

Tabela 1- Principais características da parede celular vegetal.....	27
Tabela 2- Produtividade média do etanol por área para diferentes culturas.....	28
Tabela 3- Comparação das características da celulose e polioses.....	32
Tabela 4- Grupos e ângulos de cristalização.....	38
Tabela 5- Composição química de <i>Brachiaria brizantha</i> cv Marandu em base seca.....	42
Tabela 6- Composição química de <i>Panissetum purpureum</i> cv Napier em base seca.....	43
Tabela 7- Composição química de <i>Panicum maximum</i> cv mombaça em base seca.....	44
Tabela 8- Composição química de Sorgo em base seca.....	45
Tabela 9- Quantidade de cana-de-açúcar processada pelas usinas brasileiras em Ton.....	45
Tabela 10- Principais regiões de deslocamentos químicos espectro por CP/MAS ^{13}C - RMN no estado sólido.....	56
Tabela 11- Principais bandas de absorção de funções orgânicas na região de Infravermelho Médio.....	62
Tabela 12- Porcentagem de umidade e Matéria Seca das biomassas selecionadas.....	89
Tabela 13- Teor de cinzas em base seca das diferentes partes dos materiais vegetais estudados.....	90
Tabela 14- Análise Elementar (CHNS-O) dos materiais vegetais.....	92
Tabela 15- Relação H/C, O/C, C/N e C/S para os materiais vegetais.....	93
Tabela 16- Teor de Lignina Klason insolúvel nos materiais vegetais.....	94
Tabela 17- Teor de Lignina Insolúvel nos materiais vegetais.....	95
Tabela 18- Teor de Lignina Total encontrado nos materiais vegetais.....	96
Tabela 19- Teores de celulose e hemicelulose encontrados nos materiais vegetais.....	97
Tabela 20- Valores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas - % Rendimento em base seca.....	99
Tabela 21- Composição geral dos materiais – % Rendimento em base seca.....	100
Tabela 22- Atribuição dos deslocamentos químicos (ppm) para as gramíneas selecionadas.....	108
Tabela 23- Intensidades relativas (porcentagem da área total) das bandas nos espectros de RMN ^{13}C /CP-MAS de amostras vegetais.....	110

Tabela 24- Índices de Cristalinidade paras as biomassas vegetais.....	120
Tabela 25- Resultados quantitativos para análise de EDS para folha de Capim-elefante.....	124
Tabela 26- Resultados quantitativos para análise de EDS para folha de Capim-Mombaça.....	126
Tabela 27- Resultados quantitativos para análise de EDS para folha de Capim-Marandu.....	127

Lista de Abreviaturas e siglas

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CP-MAS: Cross-polarization – Magic Angle Spin (Polarização cruzada – giro do ângulo mágico)

DRX: difração de raios-X

EDS: Energy Dispersive Spectroscopy (Espectroscopia de energia dispersiva)

Etanol 1G: Etanol de 1ª geração

Etanol 2G: Etanol de 2ª geração

FDA: Fibra detergente ácido

FDN: Fibra detergente neutro

FTIR: Fourier Transformer Infrared (Infravermelho com transformada de Fourier)

HMF: 5-hidroximetilfurfural

HPLC: High Pressure Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta pressão)

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC: Índice de cristalinidade

LK: Lignina Klason

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

NREL: National Renewable Energy Laboratory (Laboratório Nacional de Energia Renovável)

PROALCOOL: Programa nacional do álcool

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear do Carbono 13

TCD: Thermal conductivity detector (detector de condutividade térmica)

TGA: Thermogravimetry analysis (análise termogravimétrica)

TMS: tetrametilsilano

WDS: Wavelength dispersive Spectroscopy (Espectroscopia de comprimento de onda dispersiva)

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

1.

INTRODUÇÃO.....	18
1.1 – Biomassa vegetal como fonte de combustíveis.....	18
1.2 – Etanol 1G.....	19
1.3 – Etanol 2G e materiais lignocelulósicos.....	21
1.4 – Peculiaridades na produção do etanol 2G.....	23
1.5 – Composição química das biomassas vegetais.....	28
1.5.1 – Celulose.....	29
1.5.2 – Hemicelulose.....	30
1.5.3 – Lignina.....	32
1.5.4 – Cinzas e extrativos.....	34
1.6 – A celulose, hemicelulose e lignina nos tecidos vegetais.....	35
1.7 – Gramíneas como fonte de etanol 2G.....	40
1.7.1 – Capim-Marandu – <i>Brachiaria brizantha</i> cv Marandu.....	41
1.7.2 – Capim-elefante – <i>Pennisetum purpureum</i> cv Napier.....	42
1.7.3 – Capim-Mombaça – <i>Panicum maximum</i> cv mombaça.....	43
1.7.4 – Sorgo biomassa – <i>Sorghum bicolor</i> - genótipo 2010202007.....	44
1.7.5 – Cana-de-açúcar - <i>Saccharum spp.</i>	45
1.8 – Ferramentas e técnicas utilizadas para caracterização de biomassas.....	46
1.8.1 – Caracterização da biomassa por via úmida.....	46
1.8.1.1 – Determinação quantitativa de lignina- Hidrólise em meio ácido.....	46
1.8.1.2 – Reações de polissacarídeos – meio ácido.....	49
1.8.2 – Métodos instrumentais de análise.....	52
1.8.3 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear ¹³ C – RMN.....	53
1.8.4 - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR.....	57

1.8.5 – Espectroscopia na região do ultravioleta (UV-Vis).....	63
1.8.6 – Espectroscopia de Difração de Raios-X (DR-X).....	65
1.8.7 – Análise elementar (CHNS-O).....	69
1.8.8 – Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE em materiais vegetais.....	70
1.8.9 – Microscopia eletrônica de varredura– MEV e Espectroscopia de energia dispersiva – EDS.....	73
2- OBJETIVOS.....	77
2.1 – Objetivos específicos.....	77
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	78
3.1 – Biomassas de interesse e pesquisa.....	78
3.2 – Pré-tratamento das amostras.....	79
3.3 – Teor de umidade.....	79
3.4 – Teor de cinzas.....	80
3.5 – Composição da biomassa.....	80
3.5.1 – Hidrólise em meio ácido- H ₂ SO ₄ 72% v/v.....	80
3.5.2 - Determinação de lignina insolúvel na fração sólida.....	81
3.5.3 - Determinação de lignina solúvel na fração líquida.....	81
3.5.4 – Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, Furfural e hidroximetilfurfural na fração líquida – Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.....	83
3.6 - Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV e EDS.....	86
3.7 - Análise por Difração de raios X – DRX.....	86
3.8 - Análise por Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier – FTIR.....	87
3.9 – Espectroscopia de RMN ¹³ C /CP-MAS.....	87
3.10 – Análise Elementar (C, H ,N, S-O).....	88
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
4.1- Caracterização das gramíneas.....	89
4.2- Cálculo do teor de umidade.....	89
4.3- Teor de cinzas.....	90
4.4- Análise Elementar.....	91
4.5 – Composição geral dos materiais – Lignina, celulose e hemicelulose.....	94
4.5.1- Lignina insolúvel.....	94

4.5.2- Lignina solúvel.....	95
4.5.3 –Lignina total.....	96
4.6- Determinação de polissacarídeos.....	97
4.7– Compilação de dados encontrados- % Rendimento.....	98
4.8–Método alternativo de determinação de composição geral (Van Soest).....	100
4.9- Análises espectroscópicas.....	101
4.9.1 – Análises por Infravermelho Médio (FTIR).....	101
4.9.2 – Análises por RMN ¹³ C/CP-MAS.....	108
4.10 – Análise de Difração de Raios –X (DR-X).....	118
4.11 – Análise morfológica utilizando Microscopia Eletrônica de varredura acoplada com detector de Espectroscopia por Energia Dispersiva (MEV/EDS).....	123
5 – CONCLUSÕES.....	138
6- REFERÊNCIAS.....	139

1. INTRODUÇÃO

A demanda mundial por combustíveis renováveis tem se expandido rapidamente nos últimos anos, devido à preocupação com a redução do volume de emissões de gases causadores do efeito estufa, como determina o protocolo de Kyoto. Além disso, incertezas a respeito da disponibilidade futura de recursos não renováveis e tensões geopolíticas em regiões produtoras de petróleo têm despertado grande interesse no mundo por fontes renováveis de energia (NAPOLÃO, 2005).

O Brasil apresenta uma série de vantagens que o qualificam a liderar a agricultura de energia renovável em escala mundial. A primeira é a possibilidade de dedicar novas terras às culturas de biomassa, sem a necessidade de reduzir a produção de alimentos. Segundo o último censo IBGE possuímos 9.862.683 ha plantados de cana de açúcar, 15.093.352 ha de milho, 29.635.430 ha de soja, frente aos 172.000.000 ha destinados à pastagem. Nestas pastagens existem pouco mais de 201 milhões de bovinos e bubalinos, que resultam em 1,17 cabeças de gado.ha⁻¹, sendo possível uma expansão de plantio de certas culturas de gramíneas para obtenção de energia sem influenciar na criação de gado no país (IBGE, 2014; IBGE, 2007; MAPA; 2014).

O país possui a base para o plantio e produção de bioenergia devido à alta intensidade de radiação solar que recebe durante todo o ano, por situar-se entre as faixas tropical e subtropical em nosso planeta. E ainda, possui ampla diversidade de clima e exuberância de biodiversidade (MAPA, 2006).

1.1 - BIOMASSA VEGETAL COMO FONTE DE COMBUSTÍVEIS

Com o conceito de globalização e a busca por fontes energéticas mais limpas, com baixa emissão de gases de efeito estufa, a conscientização mundial necessitou de fontes energéticas mais renováveis e que encontrassem como esteio a proteção ambiental, surgindo à perspectiva de produção de combustíveis a partir da matéria orgânica renovável, denominada de biomassa. Esta, por sua vez, acumula energia química, que para os vegetais provém da conversão da energia luminosa derivada da fotossíntese, levando a evolução industrial para um conceito racional e mais sustentável (MARABEZI, 2009).

Os biocombustíveis são fontes energéticas de origem biológica, não fóssil e renovável. Apresentam um futuro promissor, pois a demanda mundial por esse tipo de energia tende a crescer. Conforme convenções ambientais, algumas vantagens são a diminuição das emissões de dióxido de carbono, óxidos de enxofre e nitrogênio, menor geração de partículas poluentes e fixação de CO₂ pelas biomassas.

1.2 ETANOL 1G

O Brasil é conhecido internacionalmente por sua vasta extensão de terras produtivas para agricultura, destacando-se na produção de alimentos como frutas, cereais, leguminosas, verduras e grãos. Outro fator importante, em que o país se destaca é na pecuária, com criação de gado de leite e corte para alimentação e vestuário, sendo que para este fim, o país desenvolveu técnicas e inovação no plantio de gramíneas para alimentação e pastoreio de rebanhos. A produção de energia é, também, destacada com a cana-de-açúcar, bem como biomassa florestal comercial.

Em meados da década de 1970, com a necessidade de redução de importações de petróleo devido a primeira grande crise deste derivado fóssil, o governo brasileiro criou o Programa Brasileiro de Álcool - PROÁLCOOL, advindo principalmente da cana-de-açúcar e provocando o primeiro grande impacto no setor sucroalcooleiro brasileiro (MENEZES, 1980).

O PROÁLCOOL teve por objetivo desenvolver uma tecnologia alternativa de combustível para veículos providos de motor à explosão com ciclo Otto, pois a primeira grande crise do petróleo aumentou o preço do barril, logo o etanol supriria a necessidade brasileira, como alternativa de combustível e promover a criação de emprego no Brasil, tanto na zona rural com toda a indústria agrícola, quanto no meio urbano com as siderurgias e metalurgias como as fábricas de automóveis. No Brasil e União Europeia utiliza-se do etanol anidro, ainda, para aumentar a octanagem da gasolina, na proporção de 20~25%, em substituição ao tetraetilchumbo, que liberava para o ambiente partículas de chumbo quando em combustão, nocivas à saúde.

As pesquisas nessa área de combustíveis alternativos têm continuamente avançado no país, tanto nas instituições públicas quanto na esfera privada. E ganharam um novo impulso com o sucesso dos carros bicombustíveis na primeira década do século XXI, mais precisamente de 2006 até então.

A figura 1 apresenta a evolução da indústria sucroalcooleira brasileira na produção de etanol em safras colhidas entre 2008-2014, onde o Brasil ocupa a segunda posição mundial na produção deste insumo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, cuja fonte principal advém do milho.

Figura 1: Gráfico de produção de etanol no Brasil em bilhões de litros (UNICA, 2013).

No balanço de produção mundial de etanol de 2008, o Brasil ocupava a segunda posição com 37,3%, atrás dos Estados Unidos com 51,9% deste mercado. Já em 2011 o Brasil continuou em segundo lugar na produção mundial, no entanto, com menos participação e competitividade; enquanto o país produzia a demanda de 24,1%, os Estados Unidos saltaram para 62,8%, impulsionados pela Lei de Energia que estabeleceu desde 2007 volumes mínimos de consumo anual deste combustível até 2022 (UNICA, 2012; ERENO, 2007; LICHTS, 2008; SUCDEN, 2012).

O etanol de primeira geração – etanol 1G é aquele obtido através da fermentação alcoólica dos açúcares presentes em certos materiais vegetais. A primeira etapa é a moagem desta matéria, onde é obtido um caldo rico em sacarose, após são adicionadas soluções ácidas para estabilização e em seguida microorganismos que iniciarão a fermentação. As enzimas liberadas pelos microorganismos transformam a sacarose em frutose e glicose e, em seguida, a etapa de fermentação destes açúcares, formando o etanol 1G, dióxido de carbono e liberando energia térmica.

O etanol 1G é separado pelo processo de destilação e obtido na concentração de 96 °GL, em certas destilarias pode ser acrescentado óxido de cálcio para desidratar o etanol até 100 °GL (BUDNY e SOTERO, 2007; ROTHER, 2006).

No caso dos Estados Unidos a fonte principal de obtenção do etanol é o amido presente no milho, enquanto que no Brasil a cultura escolhida é a cana-de-açúcar, como fonte de sacarose. Outras fontes são utilizadas como potenciais na produção de etanol, como a beterraba e o sorgo.

A Figura 2 demonstra brevemente as etapas principais na produção de etanol 1G a partir da cana-de-açúcar e milho.

Figura 2: Modelo de produção de Etanol 1G – Adaptado de Venturelli (2013).

1.3 - ETANOL 2G E MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A pesquisa desenvolvida para novas fontes alternativas de energia deve-se levar em consideração dois fatores: a última grande crise econômica, que teve seu ápice no ano de 2010, e que assola até hoje boa parte dos países, e as quebras de safras agrícolas que afetaram a produção e o mercado mundial de alimentos, inclusive o de etanol de primeira geração, produzido mundialmente (FORBES, 2012).

Frente a esta nova perspectiva surge no cenário mundial o conceito de etanol de segunda geração - etanol 2G, correspondendo ao etanol de fonte lignocelulósica, que utiliza como matéria-prima derivados da biomassa vegetal para a sua fabricação,

principalmente a celulose. Essas matérias-primas, em suma, são provenientes de resíduos e excedentes da produção agrícola - como a palha do milho, as folhas/ palhas, colmos de diversos vegetais como o bagaço da cana-de-açúcar, lascas de madeiras, cascas de sementes e gramíneas forrageiras. Estes materiais surgem como alternativas fundamentais para produção do etanol 2G (SILVA, et al, 2010; BIOFUELS, 2012).

Estudos apontam um alto crescimento no plantio de sorgo como biomassa principal na obtenção de etanol de segunda geração, principalmente em países como Estados Unidos, Índia e Filipinas (FAO, 2011; BNDES, 2008, FILHO, 2008).

Plantas industriais em escala piloto e em países como Estados Unidos e Filipinas já produzem etanol lignocelulósico a partir de resíduos de biomassa – colmo e folhas de sorgo, palhas de milho e cana-de-açúcar. As perspectivas da PETROBRAS são de que até 2015 o Brasil estará operando uma usina de Etanol 2G em parceria com empresas estadunidenses (PETROBRAS, 2012).

Deter uma tecnologia para obtenção de bioenergia relaciona-se diretamente com a soberania nacional e, principalmente, torna o país mais competitivo no mercado internacional de etanol, além de contribuir com a redução de gases de efeito estufa e ciclagem de Carbono no solo.

Os estudos de gramíneas como fonte de biomassa na geração de energia se expandem e revelam que o etanol 2G é uma alternativa viável e vantajosa como substitutivo aos combustíveis derivados do petróleo. Neste processo, estão incluídas como as biomassas provenientes do capim-elefante, capim-mombaça, capim-marandu, switchgrass, triticale, sorgo e outras gramíneas forrageiras conhecidas no Brasil e outros países que comportam tal adaptação vegetal ao clima e solo (SOLOMON et al, 2006; SOMMA, et al, 2010).

Estudos mostraram, ainda, que é possível obter até 11 mil litros de etanol 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 (MIRANDA, 2010).

As matérias-primas de origem lignocelulósica, contêm em geral (m/m) cerca de 30 a 60% de celulose, 20 a 40% de hemicelulose e 10 a 20% de lignina. Grande parte da celulose e da hemicelulose pode ser convertida em açúcares fermentecíveis, durante a hidrólise enzimática. Os açúcares liberados serão convertidos em etanol durante a fermentação e outros subprodutos do processo poderão ser obtidos. O etanol 2G, como já

citado é um dos subprodutos de maior interesse para geração de energia limpa, e caracterizar algumas biomassas visando a produção deste combustível é uma necessidade (CASTRO e PEREIRA, 2010; ICIDCA, 1990; CARMONA et al, 2013).

A produção de etanol 2G 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 de etanol produzido, através de destilação (MOSIER et al., 2005).

O etanol 2G representa para o Brasil mais produção sem aumento da área plantada, aumento do percentual de etanol por hectare plantado de 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).

1.4 – PECULIARIDADES NA PRODUÇÃO DO ETANOL 2G.

A produção de etanol 2G apresenta uma série de dificuldades oriundas das características da biomassa. Menciona-se neste sentido a persistente barreira ao ataque hidrolítico constituída pela ligação química entre a celulose e hemicelulose e a associação covalente entre a lignina e a hemicelulose. No processo de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, a lignina atua como uma barreira física para as enzimas que podem ser irreversivelmente capturadas pela lignina e, conseqüentemente, influenciar na quantidade de enzima requerida para a hidrólise, assim como dificultar a recuperação da enzima após a hidrólise. Além disso, a natureza cristalina da celulose representa uma limitação adicional para a hidrólise (LU, et al, 2002; CARDONA et al, 2010).

Uma etapa de pré-tratamento é justificada, pois visará o aumento de susceptibilidade da biomassa vegetal através da desagregação de lignina e hemicelulose, redução do caráter cristalino da celulose e o incremento da porosidade do material, resultando ao final, na liberação de moléculas de celulose e hemicelulose e, sua possível conversão em açúcares, utilizando processos químicos, termoquímicos e/ou enzimáticos, para então produzir o etanol por meio de processos fermentativos (ZHANG, 2006; SOCCOL *et al.*, 2010; KELLER et al., 2003).

A Figura 3 apresenta de maneira esquemática a produção de etanol 2G a partir de algumas biomassas conhecidas.

Figura 3: Modelo de produção de Etanol 2G.

Dois fatores são limitantes para a ampliação da tecnologia de produção do etanol 2G, o primeiro é o alto custo das enzimas necessárias para a hidrólise lignocelulósica, portanto, a busca por novas fontes de enzimas capazes de contribuir para este processo é de grande interesse industrial e o segundo fator limitante seria a etapa de hidrólise visando à obtenção de monossacarídeos, onde apresenta ainda dificuldades tecnológicas devido a fatores físico-químicos do processo e fatores estruturais da biomassa que prejudicam o acesso até a celulose (ALMEIDA, 2009; DELABONA *et al.*, 2012; MOSIER *et al.*, 2005; ZHUANG *et al.*, 2007; CARDONA *et al.*, 2010).

No interior das fibras vegetais é exibida uma organização estrutural composta por tecido parenquimatoso, cuja função é armazenar o fluído rico em açúcar e vasos fibrovasculares internos que são responsáveis pela sustentação, além de conduzirem alimentos e produtos elaborados ao longo das folhas das plantas.

As microfibras de celulose fornecem força à parede celular e é o principal componente químico para obtenção do etanol 2G. Outros emaranhados de fibras composto de hemicelulose e lignina completam a estrutura complexa dos materiais lignocelulósicos. Ter acesso à celulose é dificultado por todos estes compostos responsáveis principalmente pela sustentação e transporte de nutrientes nas plantas.

Figura 4 - Estrutura dos materiais lignocelulósicos constituídos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina. Adaptado de RITTER 2008.

Desde a década de 1980, estudos por Ressonância Magnética Nuclear - RMN ^{13}C , já apontavam que uma hidrólise ácida em materiais celulósicos favoreceria o ataque em regiões desordenadas, aumentando a cristalinidade e o ordenamento do mesmo, principalmente as regiões conhecidas como C4 e C6. Quanto maior a resolução dos picos C4, C6 e C1, maior seria a cristalinidade no interior destas cadeias (ATALLA e VANDERHART, 1983).

Estes autores também avaliaram a celulose nativa nos materiais lignocelulósicos, possuindo mais de uma forma cristalina. Esta celulose é classificada como nativa, pois não sofreu qualquer tratamento, sendo naturalmente encontrada no material e sem passar por processos que aumentem a cristalinidade.

Na Figura 5 observamos as assinaturas de ressonância de diferentes sítios de ligação do Carbono na celulose e deslocamentos químicos típicos da celulose.

Figura 5: (a) Conformação unitária do polímero de celulose. Os números 1 a 6 representam os carbonos presentes na estrutura, adaptado de AOUADA et al., 2008, destaca-se o Carbono 4 (C4) e Carbono 6 (C6) e (b) espectro de RMN ^{13}C no estado sólido (CP-MAS) assinaturas típicas dos carbonos da celulose, identificação dos picos em C4 e C6, regiões não cristalinas (N.C.) e deslocamento em ppm (ATTALLA e ISOGAI, 1998).

Na Figura 6 encontra-se a organização celular típica de vegetais, onde destacam-se as paredes primárias e secundárias na célula vegetal.

Figura 6: Parede celular vegetal. Parede primária e secundária (A) e camadas da parede secundária (B) S1, S2 e S3. Adaptado de BUCKERIDGE, 2012.

A parede primária apresenta menor cristalinidade e a secundária é densamente organizada, conforme a quantidade de celulose encontrada entre as duas paredes celulares. No entanto estas características são mais pronunciadas em plantas menores, apresentando maior caráter cristalino nas gramíneas, quando se comparado com as plantas superiores (HANNA, 1974).

A Tabela 1 apresenta algumas características distintas entre as duas paredes celulares nos vegetais.

Tabela 1: Principais características da parede celular vegetal

Parede Primária	Parede Secundária
Pode conter até 65% de água	~10% de água
25% de celulose	50~80% de celulose
25 % de hemicelulose	5~10% hemicelulose
35 % pectinas	15~30% lignina
1-8% de proteínas	Ausência de proteínas

Retirado de BUCKERIDGE, 2012.

Torna-se necessário, então, intensificar as tecnologias para produção de etanol lignocelulósico. Por se tratar de uma tecnologia de produção de biocombustível, é imprescindível avaliar e caracterizar os materiais empregando-se diferentes técnicas espectroscópicas às diversas biomassas vegetais, visando o fornecimento sustentável de matéria prima para produção de biocombustível lignocelulósico.

A maior dificuldade no setor de etanol 2G é o desenvolvimento de novas enzimas capazes de hidrolisar o material lignocelulósico, pois as patentes existentes demandam alto valor para a produção em larga escala, tornando o insumo inviável. A fase de obtenção de enzimas a partir de microrganismos celulolíticos apresenta, em termos econômicos, a etapa mais cara do processo de obtenção dos açúcares mediante hidrólise enzimática, respondendo por cerca de 50% dos custos globais. (WYMAN, 2001)

Além dos altos custos dos preparados enzimáticos, estes apresentam baixa atividade específica, da ordem de 10 a 1000 vezes menores que a atividade das amilases empregadas na obtenção do etanol a partir de biomassa amilácea, a partir de culturas de milho (HOWARD et al., 2003).

A escolha do melhor pré-tratamento está diretamente ligada ao tipo de matriz vegetal. Matrizes advindas de plantas superiores demandarão pré-tratamentos múltiplos

com ácidos, bases e agentes oxidantes, já matrizes derivadas de gramíneas passarão por tratamentos mais simplificados como a escolha da concentração ideal de ácido no processo de hidrólise da matéria seca ou até mesmo tratamentos de alto rendimento com enzimas específicas para o material vegetal escolhido (MARABEZI, 2009).

Outro fator é a dificuldade de adaptação de antigas usinas de etanol 1G para etanol 2G, momento este que o mercado de produção de etanol 1G brasileiro vive uma quebra de safra, graças às perdas com a alteração climática. As adaptações envolvem investimento em automação, escolha das gramíneas ou outro material vegetal na forma de resíduos agrícolas, pré-tratamento mais eficiente e, se possível, desenvolvimento de enzimas capazes de hidrolisar o material com alto rendimento de açúcares (NOVACANA, 2014).

A Tabela 2 apresenta uma realidade e a perspectiva da produtividade de algumas biomassas vegetais já utilizadas na produção de Etanol, ressaltam-se os valores encontrados para as gramíneas no potencial para produção de Etanol 2G.

Tabela 2: Produtividade média do etanol por área para diferentes culturas

Material	Produção de Etanol em L.ha⁻¹
Milho – etanol 1G	4000
Cana-de-açúcar – etanol 1G	7000
Beterraba – etanol 1G	6500
Gramíneas – etanol 2G*	11000

Fonte: BNDES p.71, 2008/ *Etanol 2G (potencial), Capim-elefante, sorgo, switchgrass. MIRANDA, 2010.

1.5 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS BIOMASSAS VEGETAIS

A composição química das biomassas vegetais tende a apresentar pequenas variações em função do vegetal ao qual origina, bem como localização dos cultivos, o clima de determinada região. Em geral é composta de três polímeros principais: celulose ($C_6H_{10}O_5$)_x, outras polioses como a hemicelulose ($C_5H_8O_4$)_m e lignina $C_9H_{10}O_3.(OCH_3)_{0,9-1,7}$, além de extrativos como óleos e cinzas que variam de proporção com tipo de material estudado (ARIN e DEMIRBAS, 2004).

A celulose é responsável pela rigidez e firmeza das plantas, a lignina associada à celulose na parede celular vegetal, possui a função de conferir rigidez, impermeabilidade e

resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais, já a hemicelulose é parte das paredes celulares dos tecidos vegetais, possui a função de revestimento da superfície das fibras de celulose e pectina, presente na parede primária da célula vegetal, permitindo a ligação entre elas e é capaz de se ligar a ramificações de celulose e lignina, constituindo a parede rígida vegetal e fornecendo certa elasticidade (KEPLER, et al 2006).

1.5.1 – CELULOSE

A celulose é um polissacarídeo linear, formado por unidades do monossacarídeo β -D-glicose (Figura 7) ligadas por enlaces glicosídicos nas posições 1e 4 do monômero. No processo de polimerização, a glicose perde água, formando longas cadeias de celulose que contem 5000–10.000 unidades. Ligações de hidrogênio intra e intermoleculares são formadas entre as longas cadeias de celulose originando microfibrilas cristalinas insolúveis em água (FENGEL e WEGENER, 1989).

A unidade estrutural do polímero de celulose é chamada de celobiose e consiste em duas moléculas de glicose anidras, como produto da hidrólise da celulose, conforme figura abaixo.

Figura 7: – Representação da molécula de celulose. Adaptado de RAMOS, 2003.

As posições de 1-6 são as conformações dos carbonos presentes na molécula de celulose. Destaque para as ligações glicosídicas 1-4.

A celulose é composta por seis carbonos e é um dos maiores constituintes em gramíneas.

Em termos estruturais, a celulose é o componente que se apresenta em maior quantidade das paredes celulares, e devido ao seu aspecto fibrilar fornece resistência à estrutura. Desta maneira, a celulose pode ser considerada como o “esqueleto” principal da planta, rodeada e incrustada pelas frações de hemiceluloses e de lignina (CURVELO, 1992; EK et al., 2009).

1.5.2 – HEMICELULOSE

As hemiceluloses fazem parte de um grupo de polioses, são polissacarídeos compostos por diversas unidades de açúcar, em proporções que também são variadas, ao contrário da celulose que é formada exclusivamente por unidades de D-glicose. Os monômeros presentes nas polioses são β -D-xilose, β -D-manose, β -D-glicose, α -L-arabinose, α -D-galactose, ácido β -D-glicourônico, ácido β -D-galactourônico e ácido α -D-4-metilglicourônico, mostrados na Figura 4 (FENGEL; WEGENER, 1984). Pode-se observar que dentre as unidades existem pentoses, monossacarídeos com cinco átomos de carbono, e hexoses, monossacarídeos com seis átomos de carbono, o que altera muito as propriedades das macromoléculas formadas pelos mesmos.

As diversas fontes lignocelulósicas, como madeiras de folhosas ou de coníferas, possuem porcentagens diferentes de polioses totais e também porcentagens diferentes de açúcares que os formam. O bagaço de cana-de-açúcar e os capins, de maneira geral, possuem principalmente xilose como açúcar constituinte das polioses (FENGEL; WEGENER, 1984; MIRANDA 2010).

Em termos estruturais, as hemiceluloses possuem a função de “intermediar” as frações de celulose e de lignina, interagindo com ambas. A similaridade química e estrutural entre os dois polissacarídeos, celulose e hemiceluloses, seria o responsável por suas associações, visto que ambos possuem a característica da formação de ligações de hidrogênio. Da mesma maneira, a associação entre as hemiceluloses e a lignina ocorre devido ao caráter amorfo de ambos, assim a massa molar menor das hemiceluloses permitiria, por sua vez, a posterior deposição de lignina (CURVELO, 1992; EK et al., 2009).

Figura 8: - Monossacarídeos constituintes das polioes. Adaptado de PITARELO, 2007.

Nos casos específicos deste trabalho, como o bagaço de cana, o sorgo e os capins, o principal açúcar constituinte da hemicelulose é a xilose (FENGEL; WEGENER, 1984). Como observado na Figura 8, algumas das unidades de açúcares que compõem as polioes possuem cinco átomos de carbono, sendo denominadas pentoses, outras, porém, possuem seis átomos de carbono, sendo denominadas hexoses. As polioes não são, portanto um composto químico definido, mas sim uma classe de compostos poliméricos presentes em vegetais fibrosos, possuindo cada um destes componentes propriedades características.

Figura 9: Estruturas de xilose; principal componente da hemicelulose. Em azul β-D-glicose; em vermelho α-D-xilose; em preto α-D-galactose e em marrom resíduos de α-L-fucose.

Algumas diferenças entre a celulose e as hemiceluloses podem ser encontradas descritas a seguir, na Tabela 3.

Tabela 3: Comparação das características da celulose e polioses

Celulose	Polioses
Unidades de glicose ligadas entre si (celobiose)	Unidades variadas de açúcares
Grau de polimerização elevado	Grau de polimerização baixo
Forma de arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Forma regiões amorfas e cristalinas	Forma somente regiões amorfas
É atacada lentamente por ácido mineral diluído a quente	É atacada rapidamente por ácido mineral diluído a quente

Adaptada de RODRÍGUEZ- ZÚÑIGA, 2010 e BIANCHI, 1995.

1.5.3 – LIGNINA

A lignina é um macropolímero ramificado e amorfo, sua estrutura é bastante heterogênea formando uma rede de anéis aromáticos unidos, principalmente por ligações alquil-aril-éter. As unidades monoméricas precursoras da lignina são as hidroxilas fenólicas dos álcoois trans-p-cumarílico, trans-coniferílico e álcool trans-sinapílico, a sua representação química dos monômeros pode ser observada na Figura 5. (FENGEL e WEGENER, 1989)

O complexo lignocelulósico é resistente à conversão por agentes químicos e enzimáticos, pois a lignina se encontra fortemente ligada à hemicelulose e às fibras de celulose.

A degradação da lignina é causada principalmente pela hidrólise das ligações tipo β -aril-éter, que são as mais predominantes, formando unidades modificadas de lignina, no entanto, ocorrem também reações de condensação de fragmentos da lignina formando moléculas de peso molecular mais elevado (SUN et al., 2004).

Figura 10 - Monômeros precursores da lignina (a) álcool trans-para-cumárico, (b) álcool trans-coniferílico e (c) álcool trans-sinapílico. (Adaptado de WHETTEN e SEDEROFF 1992).

A classificação da lignina pode ser explicada estabelecendo uma relação entre as espécies vegetais e padrões de substituição aromáticos, como as coníferas, as folhosas e as gramíneas. Estes ácidos trans-p-cumárico, trans-coniferílico e trans-sinapílico são precursores de grupos p-hidroxifenílicos, guaiacila e siringila, respectivamente, presentes na lignina de diversos tipos vegetais. Para as coníferas são classificadas quase que exclusivamente por unidades guaiacila, para as folhosas unidades de guaiacila e siringila e pequenas unidades p- hidroxifenila, já para as gramíneas a quantidade de p- hidroxifenila é um pouco maior da encontrada em coníferas ou folhosas, porém sempre em proporção menor que as outras unidades funcionais (MARABEZI, 2009).

Em termos morfológicos, a lignina é uma substância amorfa localizada na lamela média, bem como na parede secundária, sendo o último componente incorporado na parede celular durante o crescimento celular, interpenetrando as fibrilas celulósicas e “colando” células diferentes. Esta interpenetração resulta no fortalecimento e enrijecimento das paredes celulares sendo, portanto, o componente responsável pela resistência mecânica à compressão dos vegetais. A lignina também atua no transporte de água, nutrientes e metabólitos por tornar a parede celular hidrofóbica (inibe o inchamento de uma célula em contato com a água), podendo ser considerada a chave para a evolução das plantas vasculares. Ademais, a lignina atua na proteção a planta contra microorganismos, pois dificulta a penetração das enzimas degradadoras dos polissacarídeos (FENGEL; WEGENER, 1984; EK et al., 2009).

A porcentagem de lignina presente nas matérias-primas vegetais apresenta uma grande variação, passando de uma quantidade quase nula em matérias-primas fibrosas

como o algodão a quantidades de até 39%, dependendo do tipo de madeira. Visto que a madeira é um material muito comum, e devido ao alto conteúdo de lignina, este é um dos biopolímeros mais abundantes na Terra (BALOGH et al., 1989; EK et al., 2009).

A Figura 11 é apresentada o modelo estrutural da lignina proposto por CHRISTOPHER et al.

Figura 11: Modelo estrutural de lignina com destaque para os precursores. Adaptada de CHRISTOPHER, et al 2014.

Os caules ou colmos dos vegetais apresentam maior concentração de lignina seguida das folhas, graças ao caráter morfológico e estrutural característico da lignina.

1.5.4 – CINZAS E EXTRATIVOS

Os materiais lignocelulósicos constituem-se também por uma extensa variedade de grupos químicos orgânicos de baixa massa molar, os quais podem ser extraídos por solventes polares ou apolares. São exemplos de extrativos: ácidos graxos, ceras, alcalóides,

proteínas, fenóis, açúcares simples, pectinas, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amido, glicosídeos, saponinas e óleos essenciais.

A biomassa vegetal contém, ainda, quantidades de espécies inorgânicas (expressas como as cinzas), como os sais e óxidos de potássio, cálcio e magnésio seguidos de manganês e sódio, além de silicatos, chegando a aproximadamente 10% da biomassa vegetal em algumas gramíneas, sendo que esta quantidade varia de acordo com o porte da planta e a proximidade de suas folhas com o solo e para os extrativos na ordem de 5% (YU et al., 2008; ICIDCA, 1990; MARTELLI et al., 2013).

1.6 - A CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA NOS TECIDOS VEGETAIS.

A partir de estudos relacionados à produção de celulose para a indústria - como a degradação oxidativa da matéria vegetal, análises de Difração de Raios-X, Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C e Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV, entre outros foram propostos vários modelos para a associação de celulose, lignina e polioses nos tecidos vegetais, sendo que em todos eles, as polioses aparecem como uma fase intermediária entre regiões altamente organizadas de celulose e regiões amorfas de lignina (Figura 12).

Desde estudos de Atalla e Vanderhaart nos anos 1980, a existência de cristalinidade na celulose demonstrava uma relação intermolecular; as similaridades químicas e estruturais entre os diferentes polissacarídeos seriam os responsáveis pela inter-relação da celulose e as polioses, através de ligações de hidrogênio. Por sua vez, foi observado e estudado o caráter cristalino da celulose e sua fase amorfa ao longo das paredes celulares vegetais. As fases mais internas da celulose associavam a um caráter mais cristalino e a superficial mais amorfo. O caráter amorfo das polioses e sua menor massa molar permitem, por sua vez, a posterior deposição de lignina (CURVELO, 1992).

Figura 12: Modelos de associação dos componentes celulares macromoleculares. (FENGEL e WENEGER, 1984). a) PRESTON (1962); b) MARCHESSAULT (1964); c) KERR e GÖRING (1975); d) FENGEL (1970); e) HEITNER (2010), *apud* NOVO, 2012.

A celulose nativa nos tecidos vegetais é composta por regiões cristalinas e regiões desordenadas ou amorfas, conforme Figura 13. A estrutura da celulose favorece a organização em conjuntos, como a celobiose, com a ordem de cristalinidade mantida junta por ligações de hidrogênio.

Figura 13: Regiões cristalinas (azul) e desordenadas ou amorfas (vermelha), na celulose. (Adaptado de DAVIS, et al. 2010).

A celulose nativa cristalina encontra-se geralmente como um *mix* de celulose Ia e de celulose Ib, como formas polimórficas. As proporções destas conformações podem

variar dependendo da fonte de celulose, conforme cita-se no item 1.8. As plantas superiores, como as coníferas e o milho possuem uma proporção maior de celulose I β .

Estudos determinaram que a celulose I β é mais estável do que a celulose I α e a conversão da I α para I β é irreversível (DAVIS, 2010).

A análise por espectroscopia de RMN ^{13}C (CP-MAS) confirmou a existência de celulose I α e celulose I β em materiais vegetais (Figura 14). Os espectros das duas celulosas são únicos, especialmente ao pico assinado do C1 da molécula, com deslocamento ~ 106 ppm (SUN, 2004; DAVIS, 2010).

Figura 14: RMN ^{13}C / CP-MAS da celulose I α I β . (Adaptado de DAVIS, et al., 2010)

Os modelos teóricos de celulose I α (esquerda) e celulose I β (direita) na Figura 17 indicam modelagens diferentes para as ligações de hidrogênio. Modelos obtidos a partir de análises de Difração de Elétrons mostraram que a celulose I α possui uma célula unitária triclinica e a celulose I β possui uma célula unitária monoclinica, quando tratamos de sistemas de cristalização (VANDERHART, 1984; HAYASHI, et al., 1998; DAVIS, 2010).

Figura 15: Modelos teóricos de celulose Ia (esquerda) em destaque e celulose Ib (direita). Adaptado de DAVIS, 2010.

O sistema de cristalização é um grupo pontual da malha cristalina, isto é, o conjunto de simetrias de rotação e reflexão permitidas ao manter fixo um ponto da malha em aglomerados cristalinos, ignorando os átomos ou moléculas contidos em cada célula unitária. A análise geométrica dos sistemas de cristalização permite concluir que existem sete sistemas distintos, embora dentro de alguns deles seja possível distinguir subcategorias em função dos centros de simetria (TAYLOR, 1994).

A Tabela 4 apresenta os grupos e os ângulos de cristalização de sete formas geométricas.

Tabela 4: Grupos e ângulos de cristalização

Sistema de cristalização	Eixos	Ângulos entre os eixos
Cúbico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Tetragonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Ortorrômico	$a \neq b \neq c \neq a$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$
Romboédrico ou Trigonal	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
Monoclínico	$a \neq b \neq c \neq a$	$\alpha = \gamma = 90^\circ; \beta \neq 90^\circ$
Triclínico	$a \neq b \neq c \neq a$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma$ (todos $\neq 90^\circ$)

Fonte: Wikipedia. Enciclopédia livre

A designação dos eixos e dos ângulos entre os eixos é a que resulta do diagrama apresentado na Figura 16.

Figura 16: eixos e ângulos de rotação de uma célula unitária. Adaptado de TAYLOR, 1994.

A Figura 17 descreve a estrutura cristalina da celulose I β . Na Figura 19b, tem-se a visão lateral das cadeias centrais de uma cela unitária; duas ligações de hidrogênio intramoleculares, O (2) H–O (6) e O (3) H–O (5), que enrijecem a cadeia e duas ligações de hidrogênio intermoleculares do tipo O (3)–O(6')H e O(3')–O(6)H são reveladas (OH *et al.*, 2005).

Figura 17 – Estrutura cristalina da celulose I β : (a) projecção da cela unitária ao longo do plano a-b e (b) projecção da célula unitária para o plano de difração. Fonte: KLEMM *et al.* 2005, apud GURGEL, 2007.

Da combinação dos eixos e ângulos resultam sete sistemas básicos de cristalização, no entanto, concentrou-se neste trabalho em dois sistemas, o monoclinico e o triclinico. O primeiro monoclinico requer um eixo de rotação binário e um plano reflexo; permite 13 grupos espaciais.

Os cristais deste sistema em geral apresentam apenas um eixo de simetria binário, ou um único plano de simetria, ou a combinação de ambos. Possuem três eixos cristalográficos, todos com comprimentos diferentes. Dois eixos formam um ângulo

oblíquo entre si, sendo o terceiro perpendicular ao plano formado pelos outros dois. Já o sistema triclínico agrupa todos os casos que não podem ser acomodados em qualquer dos restantes sistemas, exibindo apenas simetria translacional ou inversão. Permite apenas 2 grupos espaciais. Os cristais com este sistema caracterizam-se pela ausência de eixos ou planos de simetria, apresentando três eixos cristalográficos com comprimentos desiguais e oblíquos entre si, é, ainda, a menor ordem de simetria dos sistemas (TAYLOR, 1994; GIACOVAZZO, et al 1992; VAINSHTEIN, 1994).

1.7 GRAMÍNEAS COMO FONTE DE ETANOL 2G

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 sendo realizados em alguns países. Dentre as mais estudadas nos Estados Unidos e na Europa temos: o “Switchgrass” (*Panicum virgatum*), o Miscanto. (*Miscanthus spp*), o capim-amarelo (*Phalaris arundinacea*) e a cana-do-reino (*Arundo donax*) (MARAFON et al, 2012).

No Brasil, o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), o capim-mombaça (*Panicum maximum*), o capim-marandu ou braquiária (*Brachiaria brizantha*), o sorgo-biomassa (*Sorghum bicolor*), têm despertado grandes interesses de estudos, a maior parte deles com foco nas potencialidades das biomassas para a produção de etanol 2G e de pellets para queima em fornos de geração de energia. Estas gramíneas apresentam vantagens em relação às demais fontes de biomassa como a madeira, dentre elas: maior produtividade por hectare, menor ciclo produtivo (45~180 dias), podendo aproveitar a rebrota como ciclo produtivo, menor manejo, possibilidade de mecanização total do cultivo, fonte de energia renovável e utilização de solos marginais, ou seja, solos pobres em micronutrientes, mas com potencial de correção de fertilidade (AYRES, 2010).

Estudos já apontam o potencial de utilização de todas as partes das gramíneas para obtenção de etanol 2G e, não apenas, as palhadas ou os colmos. Estas pesquisas são desenvolvidas junto com pesquisadores colaboradores dos Estados Unidos (MIRANDA, 2010; PARRELLA, 2012).

Nos EUA, uma vez estabelecidas, as plantações de capim-elefante produziram de 5,2 ~ 11,1 toneladas de biomassa por hectare, dependendo do período do ano. A produção

oscila de acordo com a precipitação e incidência luminosa, as gramíneas obtêm a maior parte de sua umidade durante a primavera e meio do verão (VOGEL, 2012).

1.7.1 – CAPIM-MARANDU – *Brachiaria brizantha* cv Marandu

A palavra “marandu” do Tupi-guarani significa “novidade”. Considerada uma gramínea que inovou as pastagens no Brasil, desde 1967, tendo suas primeiras plantações no Estado de São Paulo. Conhecido também como “braquiaraço”, teve grande adaptabilidade de clima, solo e região, além de resistência às pragas como a cigarrinha (OLIVEIRA et al., 2007).

Tem sua origem no sul da África e na região tropical, assemelhando seu clima ao do Brasil. Possui ciclos de cultivos razoavelmente curtos, em torno de 90~180 dias. Pode atingir até 2,5m de altura. Pode produzir de 10 a 12 ton.ha⁻¹.ano⁻¹ de matéria seca - MS (SOARES FILHO et al., 2002; GIMENES et al, 2011).

Figura 18: Capim-Marandu – Fonte: *MF Rural*.

No Brasil, o plantio atingiu mais de 60 milhões de hectares no ano de 2010, onde mais de 50% abrange a região da Amazônia Legal. Utilizado principalmente como forrageira na nutrição animal. Possui grande tolerância aos solos ácidos e com altos níveis de alumínio. Resistente à seca persistente (MEIRELLES, 99).

A Tabela 5 exprime a quantidade média em base seca de alguns componentes presentes no capim marandu. A metodologia empregada foi a técnica fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), calculado pelo método sequencial de Van Soest (1967).

Tabela 5: Composição química de *Brachiaria brizantha* cv Marandu em base seca

Celulose %	Lignina%	Hemicelulose%	Cinzas%	Proteína Bruta %
38,2	5,7	25,8	9,0	6,6

Retirado de FRANÇA et al; 2007; PARIS et al; 2009.

1.7.2 – CAPIM-ELEFANTE – *Pennisetum purpureum* cv Napier

O capim-elefante é originário do continente Africano, mais especificamente da África Tropical, tendo sido descoberto em 1905 pelo coronel Napier. Espalhou-se por toda África e foi introduzido no Brasil em 1920. Hoje, encontra-se difundido nas cinco regiões brasileiras. A planta pode atingir até 5m de altura, retém até 80% de água em sua estrutura, adapta-se a diferentes tipos de solo, com exceção dos solos mal drenados.

Além de ser utilizado como nutrição animal, o capim-elefante é muito estudado na peletização e geração de energia através de sua queima, substituindo o gás natural, a lenha e o carvão em muitas indústrias cerâmicas (FISHER, 2005).

Pesquisas têm mostrado que esses capins podem produzir de 120 a 160 toneladas de matéria fresca. $\text{ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$. Maior produtividade, cerca de 50 toneladas de Matéria Seca/ha/ano), menor extensão de áreas para uma dada produção, menor ciclo produtivo (dois cortes por ano) e maior assimilação de Carbono (PEREIRA et al, 1999; FLORES et al., 2012).

Figura 19: Capim-elefante – Fonte: *Ruralcentro*.

A Tabela 6 exprime a quantidade média em base seca de alguns componentes presentes no capim elefante. A metodologia empregada foi a técnica fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), calculado pelo método sequencial de Van Soest (1967).

Tabela 6: Composição química de *Pennisetum purpureum* cv Napier em base seca

Celulose %	Lignina%	Hemicelulose%	Cinzas%	Proteína Bruta %
44,4	10,43	26,90	6,79	3,90

Retirado de PEREIRA, 1999.

1.7.3 – CAPIM-MOMBAÇA – *Panicum maximum* cv mombaça

O capim-mombaça foi introduzido no Brasil em 1969, coletado próximo a Korogwe na Tanzânia (África), é capaz de tolerar pragas como a cigarrinha. Possui uma altura média de 1,65 m, podendo atingir até 2,50 m e tendo baixa tolerância aos solos úmidos. Exige uma precipitação em torno de 700 mm ao ano, produzindo até 30 toneladas de matéria seca. $\text{ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$. Pesquisas têm mostrado que este capim pode produzir até 95 toneladas de matéria fresca. $\text{ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$, possuindo, ainda, grande massa foliar (SALES et al, 2002; MULLER et al, 2002).

Figura 20: Capim-Mombaça – Fonte: SENAL Sementes

A Tabela 7 exprime a quantidade média em base seca de alguns componentes presentes no capim mombaça. A metodologia empregada foi a técnica fibra detergente

neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), calculado pelo método seqüencial de Van Soest (1967).

Tabela 7: Composição química de *Panicum maximum* cv mombaça em base seca

Celulose %	Lignina%	Hemicelulose%	Cinzas%	Proteína Bruta %
39,08	11,62	26,32	7,95	3,91

Retirado de DIAS et al; 2007

1.7.4 – SORGO BIOMASSA – *Sorghum bicolor* - genótipo 2010202007

As culturas deste sorgo atingem a altura de 5,5 m em 6 (seis) meses. Foi desenvolvido como um híbrido experimental para nutrição animal, no entanto, apresenta qualidade para gerar energia, com poder energético bem próximo da cana-de-açúcar e do capim-elefante. No Brasil a produção pode atingir 150 toneladas de matéria fresca.ha⁻¹.ano⁻¹ e até 50 toneladas de matéria seca.ha⁻¹.ano⁻¹ (PARRELLA et al, 2013).

O sorgo biomassa, também denominado de forrageiro é resistente a pragas e a doenças. Necessita de índice de pluviosidade de 500 mm/ano. Possui ainda, potencial de mais de dois cortes por ano, levando em consideração a distribuição das chuvas ao longo do ano (PARRELLA et al, 2013; PEDREIRA, 2003).

Figura 21: Sorgo biomassa – Fonte: EMBRAPA Milho e Sorgo; Nexteppe sementes.

A Tabela 8 exprime a quantidade média em base seca de alguns componentes presentes no sorgo. A metodologia empregada foi a técnica fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), calculado pelo método seqüencial de Van Soest (1967).

Tabela 8: Composição química de Sorgo em base seca

Celulose %	Lignina%	Hemicelulose%	Cinzas%	Proteína Bruta %
31,2	4,9	27,3	3,4	6,8

Retirado de PEDREIRA et al; 2003; PESCE, 2000

1.7.5 – CANA-DE-AÇÚCAR - *Saccharum spp*

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. Planta-se cana em regiões geográficas estratégicas, definidas quanto ao clima, como no Centro-Sul e no Norte-Nordeste do país, o que permite dois períodos de safra no ano. A produção de cana-de-açúcar no Brasil atingiu na safra 2011/2012 um total de aproximadamente 560 milhões de toneladas. A região Centro-Sul é a maior produtora de cana-de-açúcar no Brasil (UNICA, 2013).

Tabela 9. Quantidade de cana-de-açúcar processada pelas usinas brasileiras em Ton.

Região/ Safra	2007/2008	2008/2009	2009/2010	2010/2011	2011/2012
Centro-Sul	431.113.534	504.963.237	541.961.785	556.944.891	493.159.243
Norte-Nordeste	61.268.052	64.099.738	60.231.407	63.187.068	66.056.134
Brasil Total	492.381.586	569.062.975	602.193.192	620.131.959	559.215.377

Fonte: União da Indústria de Cana-de-açúcar, 2013; UNICA.

A composição química do bagaço já é conhecida, apresentando pequenas variações em função do tipo da cana empregada e da localização geográfica dos cultivos. Ao todo o bagaço é composto por celulose, polioses e lignina, como principais componentes

macromoleculares. A celulose é o principal componente da parede celular e representa 41 a 44% do bagaço, a lignina representa de 20 a 22%, as polioses representam 25 a 27% e o restante, cerca de 10%, são componentes minoritários de baixo peso molecular, extrativos e substâncias minerais (ICIDCA, 1990).

Sua utilização concentrou-se em produtos derivados da sacarose: açúcar e álcool. Por outro lado, existe a utilização do bagaço de cana-de-açúcar em ração animal, na geração de energia pela sua queima em caldeiras além do potencial na produção de etanol 2G.

A cana possui uma leve semelhança estrutural com relação às gramíneas anteriores, principalmente com o sorgo biomassa e o capim-elefante.

Figura 22: Cana-de-açúcar – Fonte: *EMBRAPA Meio Ambiente*.

1.8 - FERRAMENTAS E TÉCNICAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE BIOMASSAS

1.8.1 – CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA POR VIA ÚMIDA

1.8.1.1 - DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE LIGNINA – HIDRÓLISE EM MEIO ÁCIDO

A determinação da composição de materiais em meio ácido é uma técnica de análise muito utilizada para caracterizar materiais lignocelulósicos, para avaliar os efeitos dos tratamentos químicos, físicos e biológicos, no entanto, a utilização desta para a avaliação do potencial energético para alguns cultivares de gramíneas é algo inovador (LIN; DENCE, 1992; MARABEZI, 2009).

Não existe, ainda, um método proposto de quantificação que satisfaça totalmente as variedades de materiais vegetais existentes, dentre eles as gramíneas em questão. Conseguimos encontrar metodologias para polpas de madeiras, cana-de-açúcar e, para gramíneas, adaptações de metodologias já existentes como as Normas da National Renewable Energy Laboratory – NREL/TP-510-42618/ U.S. Department of Energy – USDE e uma validação de método descrita por Gouveia (2009).

No entanto, os métodos propostos para determinação de lignina são descritos basicamente com o isolamento da lignina em uma condição que proporcione o mínimo de modificação em sua estrutura nativa. Consequentemente, não existe uma fórmula estrutural definida da lignina pela qual é possível desenvolver uma medida universal de quantificação. Deve-se, assim, levar em consideração as reações envolvidas para seu isolamento e a utilização de reagentes em quantidades estequiométricas, a fim de se chegar a condições ideais de seu isolamento, sem excesso de reagentes ou perdas consideráveis do material a ser analisado (KLOCK, et al, 2005).

Os métodos mais utilizados para determinação de lignina são classificados em diretos e indiretos. No primeiro a lignina insolúvel é isolada após tratamento ácido como um produto/resíduo de filtração e nos métodos indiretos a lignina solúvel em meio ácido pode ser calculada pela diferença de absortividades entre a lignina e a quantidade de polissacarídeos presentes na amostra.

No caso de tratamentos ácidos utilizando o H_2SO_4 , concentrações entre 68 ~ 78%, principalmente 72% são utilizadas no início do tratamento, seguido por etapas de diluição desta concentração, a fim de se obter a hidrólise completa dos polissacarídeos (MARABEZI, 2009, KLOCK et al, 2005).

A hidrólise ácida tem por finalidade a desestruturação e solubilização total ou parcial dos polissacarídeos (celulose e polioses) presentes na biomassa vegetal, obtendo, ainda, o isolamento da lignina. A utilização de H_2SO_4 a 72% para o isolamento seguido de aquecimento deste meio reacional, a uma temperatura de 45° C, e seguida de diluição para uma concentração em torno de 3~4% até a completa hidrólise, é chamada método de Lignina Klason - LK. Neste processo, adaptado para o bagaço de cana das Normas NREL – 2008 (SLUITER et al, 2008) e validado por Gouveia (2009), pode-se caracterizar quimicamente as amostras de interesse. O material insolúvel, composto de lignina e minerais é calcinado e a quantidade de lignina é obtida por diferença entre as massas. O cálculo da lignina insolúvel pode ser determinado conforme a Equação 1 abaixo:

$$\%L_{Ki} = \frac{M_K - M_C}{M_A} \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde: L_{Ki} – Lignina Klason insolúvel; M_K – massa de lignina insolúvel seca; M_C – massa de cinzas; M_A – massa da amostra seca.

Para o cálculo da lignina solúvel utiliza-se a espectroscopia na região do ultravioleta-visível. O método consiste na capacidade da lignina solúvel em absorver radiação eletromagnética, sendo a amostra dissolvida em solvente, medindo-se a absorbância em um comprimento de onda característico da lignina, correspondente ao comprimento de onda de 280 nm (FENGEL e WENEGGER, 1989; NREL, 2008).

O cálculo da lignina solúvel em meio ácido será determinado conforme a Equação 2, utilizada por Rocha *et al*, 1993:

$$C_{lig} = 4,187 \cdot 10^{-2}(A_T - A_{pd}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: C_{lig} = concentração de lignina solúvel em $g.L^{-1}$; A_T = absorbância da solução de lignina junto aos produtos de degradação em 280 nm; $A_{pd} = C_1 \cdot \epsilon_1 + C_2 \cdot \epsilon_2$ – absorbância em 280 nm dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e hidroximetilfurfural), concentrações C_1 e C_2 serão previamente determinadas por HPLC – CLAE e ϵ_1 e ϵ_2 são as absorvidades molares respectivamente $146,85 L.g^{-1}cm^{-1}$ e $114,00 L.g^{-1}cm^{-1}$. Os índices $4,187 \cdot 10^{-2}$ e $3,279 \cdot 10^{-4}$ são respectivamente o coeficiente angular e linear da curva de calibração da lignina descrita por Rocha *et al* (1993).

O cálculo da lignina total é a somatória das porcentagens de lignina insolúvel e lignina solúvel obtida.

Outros métodos analíticos para isolamento da lignina foram descritos por Van Soest (1964) e Van Soest e Wine (1967) e comumente utilizados para caracterização de forrageiras utilizadas em nutrição animal são os de Fibra Detergente Ácido (FDA) e Fibra Detergente Neutro (FDN). Por meio de detergente em meio neutro, o conteúdo celular solúvel, constituído de proteínas, gorduras, carboidratos solúveis, pectinas e outros constituintes solúveis em água, é separado da parede celular, que é solúvel (FDN) e basicamente constituída de celulose, hemicelulose, lignina e proteína lignificada. O mesmo autor propôs também um detergente em meio ácido a fim de solubilizar a fração solúvel

mais hemicelose, obtendo-se, assim um resíduo insolúvel denominado de Fibra Detergente Ácido (FDA), constituído basicamente de lignina e celulose (VAN SOEST, 1964 apud SILVA et al, 1990).

A técnica FDA tem como principal obstáculo à solubilização parcial dos componentes de lignina sendo que particularmente em gramíneas, valores de 2 a 4 vezes inferiores foram encontrados contrastando a metodologia de FDA com a lignina de Klason (JUNG et al. 1997; TRAXLER, 1998). Comparando os dois métodos, Hatfield et al. (1994) destacaram que a maior diferença entre esses dois procedimentos é a sequência na qual a concentração de ácido e a temperatura são utilizadas para a hidrólise dos polissacarídeos e consideraram que principalmente para gramíneas, o método lignina Klason mais adequado do que FDA.

1.8.1.2 - REAÇÕES DE POLISSACARÍDEOS – MEIO ÁCIDO

Os materiais vegetais são compostos por celulose, hemicelulose, lignina, e pequenas quantidades de extrativos e sais minerais. Os componentes estruturais são distribuídos em uma estrutura lamelar (FENGEL e WENEGER, 1989). A hidrólise em meio ácido é essencial para a conversão dos polissacarídeos presentes nestes materiais, principalmente a celulose. No entanto, o forte arranjo cristalino da celulose, os efeitos de proteção da lignina, bem como das hemiceluloses, tornam difícil o acesso de enzimas e a catálise ácida para as ligações $\beta 1 \rightarrow 4$ glicosídicas, constituindo um sério obstáculo para a hidrólise (CANETTIERI et al, 2007).

A hidrólise ácida é uma reação de degradação de ligações glicosídicas, o principal mecanismo molecular de hidrólise ácida, que foi confirmado por modelos e estudos, é ilustrado na Figura 18 (FENGEL; WENEGER, 1984). A etapa de hidrólise em ácido concentrado ocorre com a quebra das ligações glicosídicas e o mecanismo compreende três etapas.

Figura 23: Mecanismo de hidrólise ácida – degradação das ligações glicosídicas (FENGEL; WENEGER, 1984).

Inicialmente o próton do ácido interage rapidamente com o oxigênio glicosídico que liga duas unidades de açúcar (I), formando o ácido conjugado (II). Essa etapa é seguida por uma clivagem da ligação C-O formando um carbocátion cíclico (III), estabilizado por ressonância. Finalmente uma molécula de água é adicionada ao carbocátion, resultando em um produto final estável com liberação de H^+ .

As propostas atuais utilizam ácido sulfúrico diluído, no entanto a escolha do ácido e de sua concentração depende do tipo de amostra e do objetivo final da hidrólise (MARABEZI, 2009).

O comportamento hidrolítico das ligações glicosídicas é influenciado por dois fatores. O primeiro é a conformação das unidades de açúcares, e o outro é o efeito indutivo. Os anéis furanosídicos são hidrolisados mais rapidamente que os anéis piranosídicos, devido ao maior ângulo de tensão na conformação das unidades nos anéis de cinco átomos quando comparado aos anéis piranosídicos livres de tensão (MARABEZI, 2009; NOVO, 2012).

O termo efeito indutivo descreve o fato de diferentes substituintes causarem uma alteração na densidade eletrônica no oxigênio do anel. Substituintes eletrofílicos como grupos carboxila ou carbonila reduzem a intensidade da protonação e dificultam a quebra da ligação C-O (FENGEL; WENEGER, 1984).

Após a etapa de adição de ácido concentrado, esta é seguida de aquecimento em banho termostatzado, durante este processo podem, também, ocorrer reações de

desidratação. Dependendo da concentração do ácido e da temperatura aplicada, numerosos produtos de degradação serão formados. A desidratação catalisada por ácidos conduz à formação de anidroaçúcares com ligações glicosídicas intramoleculares, resultantes da eliminação de moléculas de água (ROCHA et al, 1997; PEREIRA-JUNIOR, 2006).

As ligações são facilmente hidrolisadas, formando subprodutos, desde produtos com características aromáticas até compostos condensados. Os mais importantes produtos de degradação, considerando o potencial de utilização, são o Furfural (2-Furaldeído) formado a partir de pentoses e ácidos urônicos, e Hidroximetilfurfural (5-hidroximetil-2-furaldeído - HMF), derivado de hexoses. Se a temperatura é elevada, a molécula cíclica de HMF pode decompor-se em Ácido Levulínico e Ácido Fórmico (Figura 24).

Figura 24: Formação de furfural e HMF pela degradação de polissacarídeos em meio ácido (extraído de MARABEZI, 2009).

Reações de oxidação envolvendo polissacarídeos em meio ácido são importantes e também ocorrem simultaneamente com a degradação hidrolítica. Em princípio os grupos hidroxilas das unidades de açúcares e os grupos terminais de -di, -oligo e polissacarídeos podem sofrer ataque oxidativo. Os grupos convertidos são aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos. A estrutura do anel pode ser preservada ou pode ser quebrada por clivagem

pelo oxigênio do anel ou das ligações C-C, contudo essas reações não causam a quebra de todas as cadeias de polissacarídeos (MARABEZI, 2009).

Conforme descrito por Rocha et al (1997) a etapa concluinte segue com adição de água, onde ocorre a hidrólise em meio ácido diluído seguida de aquecimento e autoclavagem com temperatura de 121 °C e posterior filtração com análise do filtrado para quantificação de açúcares.

Ferramentas espectroscópicas podem ser utilizadas para elucidação de informações extraídas de determinada amostra vegetal, a fim de se obter uma análise eficiente, coletando informações sobre a composição, as suas propriedades moleculares e estruturais dos materiais vegetais.

A caracterização das propriedades estruturais e morfológicas da biomassa vegetal é essencial para definir condições operacionais precisas e adequadas especialmente em processos de elevada heterogeneidade e grandes volumes de matéria-prima, como na produção industrial de etanol 2G (FARINAS et al., 2010).

Um dos principais fatores que determinam o processamento da biomassa para fins energéticos é a sua composição química a qual, em geral, é bastante variável dependendo da espécie e da genética da planta, das condições ambientais no crescimento e dos métodos de colheita e armazenamento (LIN; DENCE, 1992; YU, 2008).

Atualmente, a caracterização da biomassa pode ser feita através de diversos métodos químicos em via úmida e via seca, destrutivos e não destrutivos. Os métodos não destrutivos são de grande interesse, principalmente por necessitar de condições mínimas no preparo da amostra, além disso, não há degradação química do material, preservando suas propriedades ou até mesmo reaproveitamento da amostra para outras análises. Os métodos químicos podem ser demorados e caros, inviabilizando a sua aplicação no monitoramento em tempo real de determinadas culturas vegetais (FARINAS et al., 2010).

1.8.2 – MÉTODOS INSTRUMENTAIS DE ANÁLISE

Existe uma grande necessidade do uso de métodos rápidos e precisos de caracterização de materiais naturalmente heterogêneos, como os lignocelulósicos. Os métodos espectroscópicos são baseados na interação da radiação eletromagnética com as substâncias químicas. A natureza desta interação depende das propriedades de cada substância. As frequências nas quais a radiação é absorvida ou emitida são únicas para cada molécula.

Várias técnicas espectroscópicas têm sido amplamente utilizadas nas pesquisas com biomassa, tais como Ressonância Magnética Nuclear do ^{13}C com Polarização Cruzada de giro no ângulo mágico – RMN ^{13}C /CP-MAS, Infravermelho com Transformada de Fourier - FTIR, Ultravioleta na região do visível UV/Vis, Difração de Raios-X - DR-X, Análise Termogravimétrica – TGA e Análise Elementar C, H, N, S-O.

As técnicas termoanalíticas/ termogravimétricas são definidas como métodos nos quais se mede a variação de uma determinada propriedade física de uma amostra em função do tempo ou da temperatura. A análise termogravimétrica (TGA) é uma das técnicas termoanalíticas onde é medida a perda de massa da amostra em função do tempo, ou em função da temperatura. A análise termogravimétrica fornece informações sobre o conteúdo dos componentes voláteis como solventes ou água, sobre o comportamento de decomposição e conteúdo de cinzas (MARABEZI, 2009).

A técnica de análise de superfície e morfologia como a Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV é muito utilizada, podendo ser acoplada com detector para Espectroscopia de Energia Dispersiva – EDS, além de análises de cinzas para mensuração de inorgânicos na forma de óxidos, silicatos e carbonatos. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE é utilizada para caracterização de açúcares, separação da lignina solúvel e demais produtos de degradação (MARTIN-NETO et al., 2007).

1.8.3 - ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C - RMN

A espectroscopia de ^{13}C RMN é basicamente uma espectroscopia de absorção, onde sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência em uma frequência governada pelas características estruturais da molécula (CARVALHO et al., 2004).

Um experimento de RMN consiste essencialmente em posicionar a amostra entre os pólos de um campo eletromagnético e aplicar uma radiofrequência variável. A excitação do núcleo do estado fundamental para um estado de energia mais alto resulta na absorção de radiação a uma frequência própria, dando um espectro o qual consiste de uma ou mais linhas de ressonância. Um espectro de ^{13}C RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades. O número e a intensidade dessas linhas estão relacionados com a estrutura da molécula (CARVALHO et al., 2004).

A ^{13}C RMN é a principal técnica que permite identificar possíveis mudanças estruturais sobre os compostos celulósicos, que refletem em alteração de suas propriedades nas células vegetais. A técnica não é destrutiva, preservando a amostra para outras análises, economizando solventes e permitindo a avaliação *in situ* dos materiais vegetais estudados (HULT et al, 2000; CHUNILALL et al, 2013).

As informações obtidas com esta técnica, para com os materiais celulósicos, relacionam-se ao grau de alifaticidade e aromaticidade das amostras, identificação de compostos como lignina, celulose, hemicelulose, ácidos carboxílicos e outros (STEVENSON, 1994; PRESTON, 1996; KONO et al, 2002).

Com a técnica de ^{13}C RMN, podemos fazer um estudo direcionado para um determinado núcleo, sendo esta uma das grandes vantagens da técnica. É atualmente a técnica instrumental mais usada para caracterização de materiais celulósicos, sendo possível à utilização de amostras líquidas e sólidas (SANTOS, 2008; ZUCKERSTÄTTER et al., 2009).

No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações, tais, como, baixa sensibilidade devido à pequena abundância natural da maioria dos núcleos, entre eles o ^{13}C (~1,1%), chamado de núcleo raro, e os tempos de relaxação muito longos que exigem experimentos com longa duração.

No caso de medidas de estado sólido para a obtenção de espectros de alta resolução, devem ser resolvidos os três problemas a seguir, conforme descrito por Carvalho, et al., (2004):

- 1 – alargamento de sinal devido à anisotropia;
- 2 – baixa sensibilidade devida aos longos tempos de relaxação spin-rede dos núcleos raros (^{13}C);
- 3 – alargamento devido às interações dipolares heteronucleares (^{13}C , ^1H).

Estas três interações anisotrópicas estão presentes também nos líquidos, mas, felizmente, são eliminadas pelo rápido movimento isotrópico browniano das moléculas.

Nas últimas décadas com o desenvolvimento de técnicas novas e sofisticadas, tais como: desacoplamento de alta potência, técnica de rotação segundo o ângulo mágico (MAS) e polarização cruzada (CP), houve um grande avanço e melhoria destas limitações da ^{13}C RMN de estado sólido.

A maioria dos trabalhos envolvendo materiais celulósicos tem sido desenvolvida com amostras no estado sólido (utilizando-se polarização cruzada e rotação no ângulo

mágico: CP/MAS ^{13}C - RMN), devido ao menor tempo requerido para a obtenção dos espectros.

A técnica de desacoplamento de alta potência permite eliminar o alargamento das linhas no espectro de ^{13}C provocado principalmente pelas interações dipolares entre os núcleos de ^{13}C e ^1H . O campo local que surge sobre os núcleos raros de ^{13}C é devido à presença de núcleos abundantes, como exemplo, prótons. O desacoplamento é feito via redução do momento magnético dos núcleos de ^1H que são abundantes, pela aplicação de um campo de radiofrequência que mantém o momento de dipolo magnético do mesmo em alta rotação (CARVALHO et al., 2004).

A técnica de Rotação Segundo o Ângulo Mágico - MAS é usada para eliminar os vestígios da interação dipolar ^{13}C - ^1H e os efeitos da anisotropia sobre o deslocamento químico através da rotação da amostra segundo um determinado ângulo, denominado ângulo mágico ($54^{\circ}44'$) em relação ao campo magnético aplicado.

A técnica de Polarização Cruzada - CP permite aumentar a sensibilidade dos núcleos raros e reduzir os longos tempos de relaxação spin-rede, mediante a transferência da magnetização de spins de núcleos abundantes como ^1H para os spins de núcleos raros como ^{13}C , contribuindo também ao aumento da resolução pelo incremento de magnetização total (JELINSKI e MELCHIOR, 2000).

A utilização destas três técnicas combinadas simultaneamente conduz a obtenção de espectros de melhor resolução em sólidos.

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear - CP/MAS ^{13}C - RMN em estado sólido permite o monitoramento dos núcleos do isótopo ^{13}C e com isto a determinação compostos aromáticos e alifáticos nas amostras e de maneira indireta a concentração de certos compostos.

No entanto, os espectros no estado sólido de biomassa apresentam sinais em formatos largos e com sobreposição, o que impede uma atribuição exata de seu deslocamento.

A Tabela 10 apresenta as assinaturas características para as biomassas vegetais estudadas. conforme MAO, et al., 2010; POPESCU, et al., 2011; XIAO et al., 2011; WIKBERG e MAUNU, 2004.

Tabela 10: Principais regiões de deslocamentos químicos espectro por CP/MAS ^{13}C - RMN no estado sólido.

Deslocamento Químico (ppm)	Tipos de Carbono
170	Grupos Carboxílicos de Hemicelulose
155	Grupos Éster de Sirigila e Guaiacila de Lignina
145	Grupos não-esterificados de Sirigila e Guaiacila de Lignina
133	Grupos não-esterificados de Sirigila e Guaiacila de Lignina
116	Grupo Guaiacila de Lignina
106	C-1 de Celulose
88	C-4 cristalino de Celulose
85	C-4 amorfo de Celulose
75-73	C-2, C-3 e C-5 de Celulose
65	C-6 – cristalino de Celulose
63	C-6 – amorfo de Celulose
56	Grupos metoxi de Lignina
32	Cadeias de metilenos lineares de lipídeos, estruturas de cutina e alifáticos.
22	-CH ₃ em grupos acetil de Hemicelulose

Fonte: MAO, et al., 2010; POPESCU, et al., 2011; XIAO et al., 2011; WIKBERG e MAUNU, 2004.

A Figura 25 mostra um espectro característico de biomassa vegetal, obtido pela técnica CP-MAS.

Figura 25: Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS de fios de algodão (ZUCKERSTÄTTER, 2009).

A Figura 26 apresenta conformações distintas entre a celulose nativa cristalina e amorfa em matérias comerciais padronizados.

Figura 26: Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS de Celulose em fase cristalina e amorfa. (ATALLA et al, 1980)

1.8.4 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER - FTIR

A chamada radiação de infravermelho (IV) corresponde à parte do espectro eletromagnético entre a região visível e as microondas. A região de maior interesse espectroscópico está situada entre $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ (STEVENSON, 1994).

O espectro de IV é característico da molécula como um todo, porém certos grupos funcionais dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência independentemente da estrutura do restante da molécula. É justamente devido à presença dessas bandas características de grupos que é possível obter informações sobre a estrutura das moléculas, através da consulta de tabelas e do simples exame do espectro (SILVERSTEIN, 2001).

A intensidade das bandas pode ser expressa como sendo absorvância (A) ou em porcentagem de transmitância (T%). A transmitância é a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide. A absorvância é o logaritmo, na base 10, do recíproco da transmitância, isto é: $A = \log_{10} (1/T)$ (SILVERSTEIN, 2001).

Absorção na região do infravermelho é causada por movimentos rotacionais e vibracionais dos grupos moleculares e ligações químicas de uma molécula. Essencialmente, existem duas vibrações fundamentais: deformação, onde as posições dos átomos mudam em relação ao eixo de ligação original, e, estiramento, onde os átomos permanecem no mesmo eixo da ligação, porém a distância entre os átomos aumenta e diminui.

Quando luz infravermelha de mesma frequência de vibração de deformação ou de estiramento incide na amostra a energia é absorvida e a amplitude de vibração é aumentada.

Devido à energia de absorção na frequência de ressonância, o detector do espectrômetro de infravermelho capta um pico de absorção naquele comprimento de onda. (STEVENSON, 1994).

Vibrações típicas de um grupo de átomos são ilustradas na Figura 27.

Figura 27: Vibrações características dos átomos. Os sinais + e – significam vibrações perpendiculares ao plano do papel. (Stuart, 1996)

A aplicação desta técnica permite identificar tanto estruturas moleculares (componentes alifáticos e aromáticos, peptídicos), como grupos funcionais reativos (COOH, OH, C=O, NH₂).

A espectroscopia de infravermelho tem sido extensivamente usada na pesquisa de materiais celulósicos, pois fornece considerável entendimento sobre a natureza, a reatividade e o arranjo estrutural de grupos funcionais contendo oxigênio, a ocorrência de carboidratos e proteínas, e o grau de pureza da amostra quanto a contaminantes inorgânicos como metais, sais, óxidos, carbonatos e silicatos (FAN et al, 2012).

Os espectros de infravermelho podem revelar as interações entre grupos orgânicos, como os carboxílicos e metais, visto que a coordenação dos grupos funcionais orgânicos com metais provoca deslocamento na frequência de absorção das ligações do íon carboxilato, o que permite a identificação da natureza (iônica ou covalente) da ligação organometálica (TSUBOI, 1957; VINKLER et al, 1976; HERNANDEZ et al, 1993).

Os espectros na região do infravermelho dos materiais celulósicos são relativamente simples, possuindo bandas de absorção, geralmente alargadas. A complexidade do ambiente químico que envolve os grupamentos funcionais dos materiais celulósicos resulta em uma série de sobreposições de bandas de absorção. A espectroscopia

nessa região apresenta limitações para a caracterização estrutural, mas pode ser muito útil no indicativo da presença e do comportamento dos grupamentos funcionais (KATAOKA; KONDO, 1998; HIGGINS et al, 2003).

Segundo Benites et al. (1999), a introdução da técnica da transformada de Fourier na determinação dos espectros de infravermelho proporcionou avanços como maior velocidade na leitura dos espectros, permitindo a obtenção de um somatório de muitos espectros, proporcionando uma melhoria na definição dos sinais e exatidão na análise; redução do custo do equipamento, tornando-se um método simples e barato comparado a outras técnicas espectroscópicas, além da pequena quantidade de amostra requerida na análise. A execução de várias varreduras para diminuição dos ruídos é facilitada devido a utilização de um computador na obtenção da transformada de fourier. Uma transformada de fourier converte o domínio de tempo na forma de domínio de frequência (SKOOG et al, 2000).

A espectroscopia na região do infravermelho médio com Transformada de Fourier - FTIR possibilita a identificação de vários tipos de ligações químicas e estruturas existentes numa molécula. Entre as diversas funções químicas orgânicas presentes nos materiais celulósicos que podem ser caracterizadas por FTIR podem se citar: radicais hidroxila-OH, radicais metila e metileno CH_2 e CH_3 , estruturas $\text{C}=\text{O}$ de carbonilas e carboxilas, ligações $\text{C}=\text{C}$ presente em estruturas aromáticas, $-\text{COO}^-$ de acetatos, entre outros (STEVENSON, 1994).

A técnica representa um método acessível e de interpretação simples. Contudo matrizes complexas como os lignocelulósicos resultam em espectros sem bandas/picos definidos devido aos abundantes modos vibracionais presentes. A sua interpretação precisa de ferramentas matemáticas para análise e correlação com outros métodos analíticos.

A espectroscopia de FTIR é usada também na diferenciação de microfibrilas de celulose quanto à sua origem e tipo de polimorfismo cristalino (ATALLA E VANDERHART, 1999).

As amostras vegetais podem apresentar o espectro de FTIR conforme Figura 28, onde os principais grupos funcionais e respectivas regiões de absorção são conhecidas com estiramento de $-\text{OH}$ (3400 cm^{-1}); estiramento de C-H alifático (2920 e 2850 cm^{-1}), estiramento de $\text{C}=\text{O}$ (1700 cm^{-1}), estiramento $\text{C}=\text{C}$ de grupos aromáticos e deformação angular do carboxileto (1600 cm^{-1}), estiramento C-N-H de amidas ($1517\sim 1513\text{ cm}^{-1}$), estiramento de C-O ($1226\sim 1230\text{ cm}^{-1}$) e estiramento C-O de polissacarídeos ($1103\sim 1105\text{ cm}^{-1}$).

Figura 28: Espectro de FTIR de bambu com diferentes tratamentos da fibra vegetal (LIU e FEI, 2013).

A Tabela 11 apresenta as regiões de absorção de interesse no espectro de FTIR para o trabalho.

Tabela 11: Principais bandas de absorção de funções orgânicas na região de Infravermelho Médio.

Comprimento de onda (cm⁻¹)	Bandas atribuídas Referências	Referências
3400~3200	Estiramento O-H (celulose Ligação de H)	Gilbert et al., 1993; Kumar et al., 2009; Pandey, 1999
2900~2850	Estiramento C-H (grupos metil da celulose)	Gilbert et al., 1993; Kumar et al., 2009; Pandey, 1999
1740~1735	C=O de Éster, Fortes grupos carbonil em ramificação de Hemicelulose	Guo et al., 2008; Kumar et al., 2009; Pandey, 1999; Sun e Tomkinson, 2004
1710~1715	Estiramento C=O (Ácidos caboxílicos/grupo éster em Lignina)	Kumar et al., 2009; Pandey, 1999
1650~1630	Absorção de H ₂ O, C=O com Ligação de H	Gilbert et al., 1993; Guo et al., 2008; Pandey, 1999; Liu, 2005
1610~1600	Vibração estrutural de aromáticos + estiramento C=O de Lignina	Kumar et al., 2009; Pandey, 1999
1518~1514	C=C (Anéis guaiacila de lignina)	Corredor et al., 2009; Pandey, 1999; Sun et al., 1998
1435~1440	Deformação C-H assimétrica de celulose	Corredor et al., 2009; Pandey, 1999; Gastaldi et al., 1998
1389~1373	Deformação C-H simétrica de celulose / presença de silicatos e carbonatos (Sharp)	Gastaldi et al., 1998; Gilbert et al., 1993; Pandey, 1999; Castilhos et al., 2008; Martelli, 2014
1340~1330	Deformação O-H no plano	Pandey, 1999
1270~1275	C-O de anéis guaiacila e estiramento C-O	Pandey, 1999
1238~1230	Deformação O-H no plano	Gilbert et al., 1993
1207~1200	Deformação O-H no plano	Gilbert et al., 1993; Pandey, 1999
1136~1126	C-O-C de ligação β 1,4 glicosídica de celulose	Gilbert et al., 1993
1080	C-O de Alcool secundário	Pandey, 1999
900~904	Estiramento de anéis de glicose, Deformação C-H de celulose.	Kumar et al., 2009; Pandey, 1999

Adaptado e retirado de THEERARATTANANOON, 2012.

Trabalhos utilizando a técnica de FTIR foram utilizados, ainda, para calcular o índice de cristalinidade do material vegetal, como o método proposto por Nelson & O'Connor (1964), utilizando a razão entre a absorbância 1372 cm^{-1} (C-H angular) e a absorbância 2900 cm^{-1} (C-H axial). A intensidade de 2900 cm^{-1} é o padrão interno de correção da amostra e independe das mudanças da cristalinidade. A de 1372 cm^{-1} faz a medição de intensidade de acordo com a variação da cristalinidade (NELSON & O'CONNOR, 1964a e 1964b; TOMAZ et al, 1994).

1.8.5 - ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA (UV-VIS)

A técnica baseia-se na absorção de energia por uma molécula nas regiões do ultravioleta (UV) e do visível (Vis) do espectro eletromagnético. A absorção da molécula é dependente de sua estrutura eletrônica, podendo causar alterações na energia eletrônica da mesma e resultar na excitação de um elétron presente em um orbital no estado fundamental para um orbital excitado de maior energia.

Através da técnica de espectroscopia de absorção é possível quantificar a intensidade de luz absorvida por um material assim como medir a posição das bandas de absorção em um determinado intervalo de comprimentos de onda. A intensidade de absorção é chamada de absorbância e depende da probabilidade de interação entre a radiação incidente e as moléculas, como também da diferença entre o estado fundamental e o estado excitado (SILVERSTEIN, 2001).

A quantidade de luz que a amostra irá absorver é descrita pela Lei de Lambert-Beer que é a relação entre a intensidade da luz incidida na solução (I_0) e a intensidade da luz saindo da solução (I), ou seja,

$$I = I_0 e^{-\epsilon lc} \quad \text{Equação 3}$$

onde ϵ é absortividade molecular ou coeficiente de extinção, l o comprimento da cubeta através da qual a luz passa e c , a concentração da amostra.

A absorbância se relaciona com a transmitância $T = (I/I_0) = e^{-\epsilon lc}$ de um material através da equação:

$$A = -\ln(T) \quad \text{Equação 4}$$

Portanto,

$$A = - \ln (I/I_0) = \epsilon lc \quad \text{Equação 5}$$

As transições eletrônicas observadas em moléculas são caracterizadas por orbitais do estado fundamental e do estado excitado. Logo, torna-se relevante conhecer suas características.

Os orbitais moleculares geralmente encontrados no estado fundamental (ligantes - HOMO) de moléculas orgânicas são os seguintes:

Orbitais σ - formados por ligações simples. A densidade eletrônica assume simetria cilíndrica em torno da ligação química.

Orbitais π - se encontram envolvidos em ligações múltiplas. Os elétrons estão delocalizados e interagem com facilidade com a vizinhança.

Orbitais n - os orbitais ocupados pelos elétrons livres dos heteroátomos, como oxigênio e nitrogênio. Esse tipo de orbital não se encontra envolvido em ligações químicas e detém as características do orbital atômico.

Os orbitais (antiligantes - LUMO) importantes nos estados excitados de moléculas são:

Orbitais σ^* - conhecido como *sigma* antiligante. Apesar de ter simetria cilíndrica, possuem um plano nodal entre os átomos.

Orbitais π^* - denominado como *Pi* antiligante. No estado fundamental eles se apresentam delocalizados, entretanto, possuem um plano nodal ao longo do eixo da ligação.

A lignina absorve fortemente na região UV devido à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ de suas ligações duplas C=C (HALTTUNEN et al., 2001). Embora existam algumas diferenças nos espectros em UV de diferentes ligninas, um espectro em UV típico de lignina apresenta, geralmente, um máximo de absorção entre 280 nm e 300 nm, devido a estruturas guaiacil e siringil e, outro máximo próximo a 230 nm, característico de grupos fenólicos não condensados (FENGEL e WEGENER, 1989; WU; FUKAZAWA; OHTANI, 1990; CURVELO, 1992; HALTTUNEN et al., 2001; FERNANDES, 2005; GOMES, 2009; MARABEZI, 2009). Um espectro na região do UV típico de lignina é mostrado na Figura 29.

Figura 29: Espectro de absorção na região UV da lignina obtida em diferentes concentrações de H_2SO_4 – Bagaço integral – BI, (MARABEZI, 2009).

Os teores de lignina solúvel obtidos para o bagaço diminuíram com o aumento da concentração de ácido; a tendência observada na diminuição dos teores de lignina solúvel com o aumento da concentração de ácido pode ser justificada, pois em concentrações de ácido sulfúrico maiores as reações de condensação da lignina ocorrem em maior extensão. Para os cálculos foram utilizadas as absorções em 215 e 280 nm, que correspondem aos máximos de absorção da lignina, contudo nos espectros obtidos por Marabezi (2009) não se observou a banda em 215nm.

A espectroscopia de UV-Vis está entre os mais convenientes e usuais métodos para análise quantitativa e qualitativa de lignina em solução. Devido à natureza aromática da lignina, ela absorve fortemente luz ultravioleta.

1.8.6 - ESPECTROSCOPIA DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DR-X)

A difração pode ser definida como um fenômeno de espalhamento de radiação eletromagnética por um arranjo periódico de centros de espalhamento, com espaçamento da mesma ordem de magnitude do comprimento de onda da radiação incidente (SMITH, 1981).

Esse método baseia-se no fato de que os comprimentos de onda destes raios são comparáveis às distâncias interatômicas dos cristais, sendo possível haver interações e os consequentes efeitos de interferência. Quando a estrutura é ordenada, possuindo certa regularidade, como no caso dos cristalitos, as interferências são acentuadas, podendo-se distinguir essas estruturas das desordenadas. Portanto, a difração de raios X pode ser utilizada para avaliar as mudanças estruturais provenientes de tratamentos do material celulósico e seus derivados (AWADEL-KARIM et al, 1999).

Considerando uma amostra cristalina que apresente dois ou mais planos cristalinos, as condições para que ocorra difração de raios X dependerão da diferença de caminho percorrido pelos raios X e o comprimento de onda da radiação incidente. Um feixe de raios X incide sobre um conjunto de planos cristalinos, cuja distância interplanar é d . O ângulo de incidência (θ) que é medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos. Os feixes refletidos por dois planos subsequentes apresentarão difração, isto é, se a diferença entre os caminhos óticos for um número inteiro de comprimento de onda, um feixe de raios X será observado. Caso contrário, não se observará qualquer sinal. Esta condição é expressa pela Lei de Bragg ($n\lambda = 2d \sin\theta$) onde n é um número inteiro (ordem de difração), λ é o comprimento de onda da radiação incidente, d é a distância interplanar para o conjunto de planos hkl da estrutura cristalina e θ é medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos (Figura 30).

Figura 30: Representação esquemática da Lei de Bragg. Apud MORGADO, 2009.

A intensidade difratada, dentre outros fatores, é dependente do número de elétrons no átomo, e estes estão distribuídos no espaço de tal forma que os vários planos da estrutura cristalina possuem diferentes densidades de átomos ou elétrons, assim desta forma as intensidades difratadas dependem dos planos cristalinos.

Experimentalmente, na difratometria é realizada uma medida do ângulo formado entre o feixe incidente e o difratado (2θ) em função da intensidade do feixe difratado.

O padrão de difração obtido por contagens de um detector é um gráfico da intensidade, medida em contagens por segundo, em função da posição angular. A posição angular do feixe difratado depende dos espaçamentos entre os planos de átomos na amostra e do comprimento de onda da radiação. A posição das linhas de difração contém dados para identificação de fases, determinação do parâmetro de célula, mudanças de fase (polimorfismo) e os valores da distância interplanar (d) (SMITH, 1981).

Um método de cálculo do índice de cristalinidade foi desenvolvido por SEGAL et al (1959) no qual o percentual de celulose cristalina (%C) é determinada pela diferença da intensidade entre o pico de maior intensidade (I_{002}) e o pico de menor intensidade (I_{am}), sendo o pico de maior intensidade o pico cristalino e o de menor a porção amorfa, seguindo a equação (HENG e KOO, 2001; WANG et al., 2006; GÜMÜŞKAYA e USTA, 2006):

$$\%IC = [(I_{002} - I_{am})/I_{002}] \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

I_{002} = intensidade no pico cristalino à aproximadamente $2\theta \sim 22^\circ$

I_{am} = intensidade da parte representativa à região amorfa à aproximadamente 17° .

A determinação da estrutura da celulose por raios-X desempenhou um papel importante no começo da ciência dos polímeros e do conceito de moléculas de cadeia longa. O progresso da investigação estrutural e o seu impacto pode ser avaliada e estudada em determinados estágios deste desenvolvimento (ZUGENMAIER, 2008).

Os primeiros resultados encontrados através da difração de raios-X foram as orientações dos cristalitos nas fibras de celulose de bambu e cânhamo, sem dados estruturais detalhados conforme Nishikawa e Ono (1913); Nishikawa, (1914); Scherrer (1918), aplicando a técnica hoje denominada de diagrama de Debye-Scherrer, realizou uma

investigação mais aprofundada, chegando a conclusão da existência de uma estrutura amorfa na celulose. Independentemente, Herzog e Jancke (1920a) e Scherrer (1920), observaram um padrão de interferência a partir de celulose em pó e celulose nativa a partir de um filme fundido a partir de viscose e concluíram que uma estrutura cristalina estava presente associada com a parte amorfa. Padrões de fibra foram obtidos por irradiação de feixes de fibras de várias fontes nativas com equipamento monocromático de raios-X por Herzog e Jancke (1920b) e Herzog et al. (1920).

A celulose nativa de diferentes fontes, incluindo madeira, apresentou o mesmo padrão, isto é, a mesma estrutura contendo cristalitos ou microfibrilas de celulose. O conceito de micelas foi introduzido no final de 1920 por Hermann et al (1930), com partes amorfas e cristalinas ao longo das cadeias.

Sugiyama et al. (1990), propuseram por difração de elétrons, que a celulose nativa I consiste em duas células unitárias, um arranjo com duas cadeias, I β monocíclica e uma tricíclica I α , vindo a comprovação em 1991 Sugiyama et al (1991) através da microdifração na fibra de *Microdictyon tenuius*.

A celulose nativa é constituída por duas famílias, uma com I α rica em conteúdo de estrutura (celulose, algas bacterianas) e uma com I β rica em teor de estrutura (planta superior de celulose, por exemplo, rami), sendo I β termodinamicamente mais estável. A longa cadeia com arranjo paralelo foi confirmada por análises atuais de raios-X, por estudos de modelagen e por evidência direta (ZUGENMAIER, 2008).

Os planos cristalinos da unidade espacial da celulose são representados por picos de diferentes intensidades no difratograma de raios-x (Figura 31). A celulose tipo I apresenta difrações próximas aos seguintes ângulos de difração 2θ : 23° (plano 002), 21° (plano 021), 17° (plano 101') e 15° (plano 101).

Figura 31: Difração de Raios-X de amostra de celulose demonstrando os planos cristalino e amorfo (BANSAL et al, 2010).

1.8.7 – ANÁLISE ELEMENTAR (CHNS-O)

Essa técnica está baseada na combustão de uma amostra do material para a determinação das quantidades de carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio.

Após sua combustão, os gases produzidos como os óxidos de Nitrogênio, CO_2 , SO_2 e H_2O , são transportados por uma corrente de hélio ou argônio para a superfície de cobre metálico no interior do reator, separados por coluna de Cromatografia Gasosa - CG e finalmente detectados por um detector Condutividade Térmica (TCD). A análise elementar é um método utilizado para a determinação da composição elementar dos materiais lignocelulósicos, se baseia na detecção de quatro componentes (nitrogênio, carbono, hidrogênio e enxofre). O teor de oxigênio é obtido por diferença a 100%.

A composição dos materiais lignocelulósicos é afetada por diversos fatores, como material de origem, disponibilidade de água, parte do vegetal que é estudada como folhas e caule, uso do solo e clima (WETSEL, 1992; AIKEN e COTSARIS, 1995; WESTERHOFF e ANNING, 2000).

Os materiais vegetais são mais concentrados em carbono e oxigênio, seguidos de hidrogênio, enxofre e nitrogênio (SEYE et al, 2000; BIACHI, 1995).

Segundo a literatura, os conteúdos dos principais constituintes nas amostras vegetais têm valores médios de 39,7 - 49,2% para o carbono, 3,2-6,2% para o hidrogênio, 42,6-52,0% para o oxigênio, 0,4-4,3% para o nitrogênio e 0,1-1,5% para o enxofre. (BIACHI, 1995; SEYE et al, 2000; BRUM, 2007; PAULA, 2010). Esta proporção é caracterizada em função da quantidade de espécies químicas presentes nos vegetais e distribuídas, principalmente, em três grandes constituintes: celulose, hemicelulose e lignina, além de proteínas e óleos essenciais.

A razão atômica H/C é frequentemente associada ao grau de condensação ou de alifaticidade dos materiais lignocelulósicos, sendo que maiores valores de H/C indicam maior quantidade de grupos alifáticos, típicos de ceras e óleos presentes nos materiais vegetais. O aumento desta razão para valores acima de um, implica em uma diminuição da aromaticidade nas amostras (BRAVARD e RIGHI, 1991).

A razão atômica O/C permite estimar a abundância de grupos funcionais que contém oxigênio indicando, como grupos metoxílicos, carboxílicos, fenólicos e álcoois, e, portanto, é um indicador do grau de oxidação. A razão atômica C/N e C/S indica o grau de incorporação mineral nos materiais vegetais (SWIFT, 1996).

1.8.8 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE EM MATERIAIS VEGETAIS

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiente - CLAE é uma técnica utilizada para caracterização de açúcares, lignina solúvel e demais produto de degradação, que são separados em colunas específicas, conforme a polaridade. Gerakmente o sinal é detectado através de detector de Índice de Refração da amostra líquida ou por detector de ultravioleta, acoplados ao equipamento. A técnica necessita de um bom preparo das amostras para maior confiabilidade do método empregado para separação dos materiais, uma vez que etapas de separação de lignina e quantificação de açúcares dependem de amostras com o mínimo de impurezas para não interferirem no cálculo final destes materiais.

A CLAE é uma técnica que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sobre altas pressões. Ela tem a

capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade.

O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. A fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é atravessada pela fase móvel. São as forças físicas e químicas que atuam entre os solutos e as duas fases são responsáveis pela retenção dos solutos sobre a coluna cromatográfica. A diferença na magnitude dessas forças que determina a resolução e, portanto a separação dos solutos individuais. As forças elementares que agem sobre as moléculas são de cinco tipos: Forças de dispersão de London ou forças de Van der Waals; Interações de dipolo induzido; Ligações de hidrogênio; Interações dielétricas; Interações eletrostáticas e coulombianas. As variáveis que afetarem essas forças intermoleculares irão influenciar o grau de separação obtido pela passagem dos solutos através da coluna cromatográfica (SKOOG, et al., 2000).

Uma variedade de detectores tem sido desenvolvidos para CLAE e melhoria desta técnica. Um detector ideal para a CLAE seria aquele com as seguintes características: a) Alta sensibilidade e baixo limite de detecção; b) Resposta rápida a todos os solutos; c) Insensibilidade a mudanças nas temperaturas e na vazão da fase móvel; d) Resposta independente da fase móvel; e) Pequena contribuição ao alargamento do pico pelo volume extra da cela do detector; f) Resposta que aumente linearmente com a quantidade do soluto; g) Não destruição do soluto; h) Segurança e conveniência de uso; e i) Informação qualitativa do pico desejado (SNYDER e KIRKLAND, 1979).

Para quantificação de lignina solúvel e carboidratos presentes em materiais vegetais são utilizados dois detectores principais, o detector por absorbância no Ultravioleta e Visível – UV-Vis, utilizado no cálculo de quantificação de Furfural e Hidroximetilfurfural e o detector por Índice de Refração - IR, utilizado na quantificação de açúcares.

Em detectores por absorbância no ultravioleta e no visível, o seu funcionamento baseia-se na absorbância de luz por parte da amostra ao passar através dela uma radiação eletromagnética; normalmente isto ocorre no ultravioleta em um dado comprimento de onda. Existem dois tipos de detectores de luz ultravioleta: o de comprimento de onda variável (espectrofotômetros), de aplicação mais variada e sensível e o chamado fotométrico que funciona com um ou dois comprimentos de onda fixos. Este último é sensível e suficiente para se conseguir bons resultados com todos os compostos que absorvem luz no comprimento de onda em que ele funciona. Este tipo de detector é

normalmente insensível a variações de vazão e temperatura. A maioria dos detectores de comprimento de onda fixos operam em um comprimento de onda de 254 nm e um de 280 nm, resultado da absorbância de luz em 254 nm e da emissão de luz em 280 nm por uma substância fosforescente. As sensibilidades atingidas chegam à ordem de 0,001 unidades de absorbância e, se o composto absorve intensamente na faixa de UV, é possível detectar quantidades de amostras da ordem de nanogramas (10^{-9} g) (COLLINS e GUIMARÃES, 1988). A Figura 32 apresenta o desenho de uma célula para CLAE.

Figura 32- Célula do detector de ultravioleta para CLAE. Retirado de SKOOG (2000).

O detector de índice de refração acompanha continuamente a diferença de índice de refração entre a fase móvel pura e o efluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra. A resposta deste detector é universal e sua sensibilidade é moderada, geralmente da ordem de micrograma. Este nível de concentração corresponde a uma diferença no índice de refração entre a amostra e a fase móvel de aproximadamente 10^{-7} unidades de índice de refração. Para observar esta diferença é necessário um controle de temperatura com variação na ordem de $\pm 0,001$ °C, o que normalmente é conseguido por circulação de água com uma boa fonte termostatzada através do refratômetro, uso de forno específico para coluna ou um bom controle da temperatura ambiente. Além deste problema com a temperatura, existem ainda outros: a sensibilidade às variações de vazão e mudanças na composição da fase móvel, que impedem o uso de gradiente por ser difícil encontrar um par de solventes com índices de refração idênticos. Qualquer mudança na composição da mistura mudará o índice de refração da fase móvel, então, o lado da referência terá que

mudar o que é quase impossível (CIOLA, 1998). A figura 33 apresenta o esquema de um tipo de detector por índice de refração.

Figura 33- Esquema de um detector refratométrico por deflexão. Retirado de SKOOG (2000).

1.8.9 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV E ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA/EDS

A análise micro estrutural se faz necessária para a análise de materiais vegetais, pois é a partir dela que podemos entender as correlações microestrutura-defeito-propriedades e também prever as estruturas típicas do material. As captações corretas dessas informações forneceram características da amostra como: topografia, composição, cristalografia entre outras. Uma das grandes vantagens do MEV é a elevada profundidade de foco e a possibilidade de combinar a análise com uma visão macroestrutural da amostra vegetal (LIU et al, 2005).

A caracterização dos materiais é de fundamental importância para o entendimento de suas propriedades, visto que essas são determinadas por constituintes e defeitos presentes nas respectivas microestruturas das paredes celulares vegetais.

Na microscopia eletrônica de varredura, é possível analisar superfícies irregulares, por apresentar excelente profundidade de foco (cerca de 300 vezes melhor do que a do microscópio óptico), com uma resolução média de 4nm, com uma faixa útil de aumento de 10 a 300.000x (PADILHA, 1985).

O microscópio eletrônico de varredura é geralmente utilizado para observações de amostras espessas, basicamente não transparentes a elétrons, com obtenção de imagens com aparência tridimensional. Informações topológicas podem ser obtidas utilizando-se

elétrons de baixa energia (50 eV), enquanto que informações sobre números atômicos ou orientações são obtidas a partir de elétrons de alta energia. O microscópio de varredura eletrônica consiste basicamente de uma coluna óptico-eletrônica, e de uma câmara para amostras em sistema de vácuo, com controle eletrônico e tratamento de imagens, que são construídas ponto a ponto, de modo semelhante à imagem de televisão. Um feixe de elétrons de alta energia é focalizado numa região da amostra, causando emissão de elétrons com grande espalhamento de energia, que são coletados e amplificados para geração de um sinal elétrico. Este sinal é utilizado para modular a intensidade de um feixe de elétrons num tubo de raios catódicos, que registra sincronicamente a área da amostra analisada, seguindo um caminho geometricamente similar (PADILHA e AMBROZIO, 1985; MANSUR et al, 2005).

Figura 34: Desenho esquemático da coluna do microscópio eletrônico de varredura convencional. Fonte: Laboratório de Filmes Finos – IF-USP.

A interação do feixe de elétrons de alta energia com a superfície de uma amostra resulta, como citado acima, na emissão de elétrons, mas também pode levar à emissão de raios-X, dentro de uma faixa de distribuição de energia. Também pode ocorrer a emissão de luz visível, chamada de radiação catodoluminescente, de menor energia em relação aos raios-X (KESTENBACH et al, 1997).

Os elétrons gerados e emitidos podem ser divididos em três tipos: retroespalhados, secundários e Auger. Os elétrons retroespalhados podem ser emitidos devido a espalhamento elástico ou inelástico, ou ainda devido a espalhamento de plasmons (oscilações coletivas e quantizada de elétrons). Elétrons secundários são de baixa energia, com profundidade na amostra em torno de 10nm, formados pela excitação de elétrons fracamente ligados ao núcleo, devido à interação com elétrons primários ou elétrons espalhados de qualquer tipo, de alta energia. No caso de elétrons de camadas internas de um átomo que são arrancados por feixe de elétrons de alta energia, o átomo pode retornar ao seu nível de energia original por movimentação de elétrons de camadas mais externas. Neste processo, existe liberação de energia acompanhada ou pela emissão de outro elétron ou pela emissão de um fóton (BOTTA, 2002).

A emissão de fóton resulta no espectro de raios-X e a emissão de elétrons e é conhecida como efeito Auger. As energias tanto do fóton como do elétron emitidos são características dos elementos que as geraram, levando a uma identificação química do material analisado (MCMULLAN, 2006).

Figura 35: Modelos representativos das interações atômicas decorrentes da perturbação do material com o feixe primário (A), sinais resultantes da interação do feixe de elétrons primários com a amostra. Diagrama esquemático apresentando o volume de interação do feixe de elétrons em um alvo sólido (B). Fonte: Adaptado de Laboratório de Filmes Finos – IF-USP.

Os raios-X emitidos podem ser analisados, pois estão diretamente relacionados aos números atômicos dos constituintes da amostra e aos comprimentos de onda da radiação emitida. Dois tipos de espectrometria de raios-X são comumente utilizados: por dispersão de energia (EDS) e por dispersão de comprimento de onda (WDS).

No caso de EDS, técnica utilizada neste trabalho, parte-se do princípio de que a energia de um fóton (ϵ) está relacionada com a frequência da onda eletromagnética (ν) pela equação $E = h\nu$, onde h é constante de Planck. A energia do fóton emitido está diretamente relacionada ao tipo de elemento químico, já que depende do número atômico Z . Para EDS, tem-se que fótons com energias correspondentes a todo o espectro de raios-X atingem o detector quase que simultaneamente, possibilitando a análise de todos os comprimentos de onda ao mesmo tempo. Dessa forma, pode-se mapear toda a superfície da amostra estudada, verificando-se a presença dos átomos existentes em determinada região (SMITH, 1955; FEI, 2012).

Para materiais vegetais, muitas vezes necessita-se de congelar a amostra vegetal com nitrogênio líquido, a fim de se obter o melhor corte da amostra e melhor ângulo para incidência do feixe de elétrons, além de manter a parede celular vegetal sem efeitos de esmagamento provocados pelo corte da amostra, diminuindo o impacto da lâmina sobre as células vegetais (LOVESUTTI et al, 2013; MARTELLI et al, 2013).

RODRÍGUEZ- ZÚÑIGA (2010) e THEERARATTANANOON (2012) observaram as superfícies morfológicas do bagaço de cana e do sorgo biomassa, respectivamente, antes e após o tratamento das fibras com ácido e enzimas hidrolíticas, sendo possível identificar as paredes celulares vegetais, bem como os entrelaçamentos das fibras celulósicas.

2- OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho é caracterizar materiais vegetais utilizando técnicas físico-químicas e espectrofotométricas com base no estudo da composição destes materiais como futura fonte de produção de Etanol 2G.

2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar materiais vegetais de gramíneas como a cana-de-açúcar, capim-elefante, capim-mombaça, capim-marandú e sorgo biomassa; com relação à sua morfologia.

Caracterizar a composição química dos materiais vegetais fontes (celulose, lignina e hemicelulose) presente nestes materiais.

Prover subsídios para futuros ensaios de hidrólise enzimática e melhorias desta técnica para a produção mais eficiente de Etanol 2G.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – BIOMASSAS DE INTERESSE E PESQUISA

As gramíneas do tipo Sorgo-Biomassa genótipo 2010202007 (*Sorghum bicolor*) foram cedidas pela EMBRAPA Milho e Sorgo, o Capim-Marandú (*Brachiaria brizantha* cv *Marandu*), Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum* cv *Napier*) e Capim-Mombaça (*Panicum Maximum* cv *mombaça*) foram cedidas pela EMBRAPA Cerrados e o bagaço de cana-de-açúcar, gentilmente cedido pelo Centro de Tecnologia Canavieiro – CTC, onde estava triturado, lavado com água à 60 °C e peneirado à 5 Mesh de abertura de malha.

As amostras advindas dos Centros de Pesquisa da EMBRAPA Milho e Sorgo e da EMBRAPA Cerrados passaram por plantio em 02 canteiros, com 03 repetições cada e distância de 5 metros para cada canteiro, conforme esquema abaixo:

Figura 36: Esquema de plantio do Sorgo, Capim-marandú, Capim-elefante, Capim-mombaça.

Foram colhidas com 90 dias de plantio, no ano de 2010, amostragem na forma de “bulk”, mistura de ao menos 10 plantas aleatórias, fracionadas em picadeiras para forrageira, as partes das plantas foram separadas na forma de colmo, folhas e planta inteira. As amostras foram secas por 3 dias em estufa à 60°C e enviadas para São Carlos – SP, via EMBRAPA Instrumentação como parte deste trabalho

3.2 – PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras foram trituradas em moinho de facas tipo Willy à 5 Mesh (4mm) de abertura de malha e em seguida peneiradas à 80 Mesh (0,177mm) e secas a temperatura de 105 °C.

Estas amostras, agora na forma de pó, foram reservadas e submetidas às análises química, morfológica e estrutural, após os devidos preparos específicos para cada uma das técnicas utilizadas na caracterização. Para análises de MEV utilizou-se, além do prepararo citado, partes das plantas sem trituração, afim de se ter uma melhor análise morfológica das partes integrais dos vegetais.

3.3 – TEOR DE UMIDADE

A determinação do teor de umidade da biomassa foi baseada no procedimento padrão do NREL “Determination of Total Solids in Biomass” (SLUITER *et al.*, 2005a).

As placas de Petri foram previamente secas a 105°C em uma estufa, deixadas em um dessecador para esfriarem até a temperatura ambiente, e posteriormente foram pesadas em uma balança analítica (M1). Amostras de aproximadamente 1,00 g foram pesadas nas placas de Petri e tiveram suas massas anotadas (M2).

As amostras foram posicionadas em estufa à 105 °C e secas até a massa constante. As amostras foram secas por 24 h. Após este período, as mesmas foram retiradas da estufa e colocadas em um dessecador até atingirem a temperatura ambiente. Após esta etapa foram então pesadas tendo suas massas anotadas (M3). Para todas as amostras de biomassa foram realizados ensaios em triplicata.

A fórmula utilizada para cálculo da umidade está descrita abaixo:

$$\% \text{ umidade} = \left(1 - \frac{(M3-M1)}{(M2-M1)}\right) \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

M1 = massa da placa vazia, em g

M2 = massa da placa + amostra úmida, em g

M3 = massa da placa + amostra seca, em g

3.4 – TEOR DE CINZAS

Cadinhos de porcelana foram numerados e pesados em uma balança analítica tendo suas massas anotadas (M1). Pesou-se cerca de 1,00 g do material, descontando o teor de umidade, nos cadinhos previamente pesados (M2). O material foi calcinado na mufla a 800°C, com as rampas de temperatura de acordo com a Norma NREL, SLUITER, et al., 2008 modificada, pois o patamar superior atingiu 800°C ao invés de 575°C, indicado pela norma, pois em primeira análise a coloração das amostras apresentou material sem sinais de calcinação completa.

Após este período, a mufla já programada, teve sua temperatura diminuída. Posteriormente, os cadinhos foram transferidos para um dessecador até resfriamento à temperatura ambiente, em seguida, efetuadas as pesagens dos materiais. Onde se obteve a massa (M3). As análises foram realizadas em triplicata.

O teor de cinzas foi obtido pela seguinte expressão:

$$\% \text{ cinzas} = \frac{(M3-M1)}{(M2-M1)} \times 100 \quad \text{Equação } 8$$

Onde:

M1 = massa do cadinho calcinado vazio, em g

M2 = massa do cadinho + amostras de biomassa (descontado o valor de umidade) , em g

M3 = massa do cadinho + cinzas, em g

3.5 – COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA

3.5.1 – HIDRÓLISE EM MEIO ÁCIDO - H₂SO₄ 72% v/v

Aproximadamente 1 g das amostras de biomassa foi pesada com precisão de 0,1 mg e transferida para béquer de 50 mL e tratadas com 10 mL de H₂SO₄ 72% v/v, sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado a 45 °C por 7 min.

As amostras foram transferidas quantitativamente para erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se o volume de 275 mL de água destilada para continuidade da hidrólise em meio ácido diluído 4% v/v.

Os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 121°C. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à

temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro qualitativo.

A fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, o qual teve o seu volume posteriormente completado com água destilada.

A solução foi armazenada para análises posteriores de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, HMF e lignina solúvel, conforme validação de GOUVEIA et al, 2009.

3.5.2 - DETERMINAÇÃO DE LIGNINA INSOLÚVEL NA FRAÇÃO SÓLIDA

A lignina insolúvel foi determinada de acordo com o método Klason utilizado por GOUVEIA *et al*, 2009.

Os materiais retidos no papel de filtro, conforme citado no *item 3.5* foram lavados com 1500 mL de água destilada, transferidos para pesa-filtros para secagem em estufa a 100 °C até massa constante.

As percentagens de ligninas insolúveis foram calculadas em relação à massa de amostras secas, conforme a Equação 1 já citada:

$$\%L_{Ki} = \frac{M_K - M_C}{M_A} * 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde: %L_{Ki} – Lignina Klason insolúvel; M_K – massa de lignina insolúvel seca; M_C – massa de cinzas; M_A – massa da amostra seca.

3.5.3 - DETERMINAÇÃO DE LIGNINA SOLÚVEL NA FRAÇÃO LÍQUIDA

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro de UV (NREL, 2008).

Um fundo de escala foi utilizado a partir de uma solução diluída de H₂SO₄ a 4% em água deionizada. Após a leitura do fundo de escala, realizou-se a diluição de cada alíquota hidrolisada em um fator de 20x com água deionizada onde se transferiu para a cubeta de quartzo com 1cm de caminho óptico e realizou-se análise pela medida de absorbância em 280 nm.

Os espectros das ligninas foram obtidos em triplicata com reprodutibilidade de até $\pm 0,05$ unidades de absorvância na faixa de 190-400 nm, em um aparelho Shimadzu, modelo UV-1601PC instalado na Embrapa Instrumentação.

O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme as equações abaixo:

$$C_{\text{lig}} = 4,187 \cdot 10^{-2}(A_T - A_{\text{pd}}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad \text{Equação 2}$$

$$A_{\text{PD}} = C_1 \varepsilon_1 + C_2 \varepsilon_2 \quad \text{Equação 9}$$

$$\% \text{Lignina solúvel} = \frac{(C_{\text{lignina insolúvel}} \cdot \text{VF} \cdot \text{FD})}{\text{M1}} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

Onde:

A_T : absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação a 280 nm;

A_{PD} : absorvância, a 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF) calculados através da Equação 9 cujas concentrações C_1 e C_2 foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e ε_1 e ε_2 são as absortividades de furfural e HMF (146,85 e 114,00 L g⁻¹ cm⁻¹);

Os índices $4,187 \cdot 10^{-2}$ e $3,279 \cdot 10^{-4}$ são respectivamente o coeficiente angular e linear da curva de calibração da lignina descrita por Rocha et al (1993).

$C_{\text{lignina solúvel}}$: concentração da lignina solúvel obtido através da Equação 7 e 8, em g/L,

VF: volume do hidrolisado filtrado, 0,5 L,

FD: fator de diluição para leitura da absorvância, 20, e

M1: massa de biomassa utilizada na hidrólise descontado o teor de umidade, em g.

Logo a % Lignina total foi calculada com a seguinte equação:

$$\% \text{ Lignina Total} = \% \text{ Lignina } L_{\text{KI}} + \% \text{ Lignina solúvel} \quad \text{Equação 11}$$

3.5.4 - DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS, ÁCIDOS ORGÂNICOS, FURFURAL E HIDROXIMETILFURFURAL NA FRAÇÃO LÍQUIDA – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE

Antes da determinação de carboidratos e de ácido orgânico por cromatografia líquida de alta eficiência, os líquidos filtrados do *item 3.5* foram aplicados em membrana de ésteres de celulose com 0,45 µm.

Utilizou-se de curvas de calibração de analitos para quantificação dos carboidratos e produtos de decomposição utilizando CLAE. A curva foi delineada utilizando soluções de concentrações conhecidas correlacionadas com suas respectivas áreas integradas no cromatograma. Os resultados são utilizados para calcular uma concentração desconhecida de açúcares e produtos de degradação dada uma área gerada pelo cromatograma.

Foram preparadas soluções padrões de concentração variável para confecção destas curvas de calibração para a celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural. Para o furfural e 5-hidroximetilfurfural as concentrações variaram de 0,004-0,280 g.L⁻¹, para celobiose, ácido galacturonionico, ácido glucorionico, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, ácido fórmico e etanol as concentrações variaram de 0,5-2,5 g.L⁻¹.

Os fatores usados para converter açúcares monoméricos em anidromônômeros são 0,90 para a glicose e 0,95 para a celobiose. De maneira similar, xilose e arabinose tiveram suas correções efetuadas utilizando um fator de 0,88. Por meio da determinação da concentração de ácido acético é possível transformá-la em teores de hemicelulose, utilizando para isso um fator de conversão de 0,72. As áreas dos picos correspondentes ao furfural e 5-hidroximetilfurfural foram utilizadas para calcular sua concentração na amostra utilizando para isso um fator de conversão de 1,37 e 1,2, respectivamente. Os fatores são calculados baseados na adição de água nos polissacarídeos durante a hidrólise com ácido diluído (KAAR *et al.*, 1991 a,b; ROCHA, et al, 1997).

- Cálculo do teor de carboidratos:

$$\% \text{ carboidratos} = \frac{(C_{\text{CLAE}} \cdot CA \cdot V_{\text{filtrado}})}{M1} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

Onde:

C_{CLAE} : concentração quantificada por CLAE, em $g.L^{-1}$;

CA: anidro correção para cálculo da concentração. Para a glicose, celobiose, xilose e arabinose temos, 0,90; 0,95; 0,88 e 0,88, respectivamente, GOUVEIA, 2009;

$V_{filtrado}$: volume do hidrolisado filtrado, 0,5 L; e

M1: massa de matéria vegetal utilizada na hidrólise descontado o teor de umidade, em g.

- Logo o cálculo do teor de celulose será:

$$\% \text{ Celulose} = [(0,90 \cdot GLI) + (0,95 \cdot CELO) + (1,20 \cdot HMF) + (3,09 \cdot AF)] \quad \text{Equação 13}$$

Onde:

GLI= % em massa de glicose, CELO=% em massa de celobiose, HMF = % em massa de 5-hidroximetilfurfural e AF = % em massa de ácido fórmico.

Para cálculo da hemicelulose teremos:

$$\% \text{ Hemicelulose} = [(0,88 \cdot XI) + (0,88 \cdot ARA) + (0,72 \cdot AC) + (1,37 \cdot FUR)] \quad \text{Equação 14}$$

Onde:

XI = % em massa de xilose; ARA = % em massa de arabinose; AC = % em massa de ácido acético e FUR = % em massa de furfural.

- **Cálculo do teor de Ácido Acético/Acetatos:**

$$\% \text{ Acetatos} = \frac{(C_{ACLAE} \cdot FC \cdot V_{filtrado})}{M1} \times 100 \quad \text{Equação 15}$$

Onde:

C_{ACLAE} : concentração de ácido acético quantificado por CLAE, em g/L;

FC: fator de conversão do ácido acético, 0,72;

$V_{filtrado}$: volume do hidrolisado filtrado, 0,5 L e

M1: massa de biomassa utilizada na hidrólise descontado o teor de umidade, em g

- **Cálculo do teor de Furfural:**

$$\% \text{ Furfural} = \frac{(C_{FCLAE} \cdot FC \cdot V_{filtrado})}{M1} \times 100 \quad \text{Equação 16}$$

Onde:

C_{FCLAE} : concentração de furfural quantificado por CLAE, em g/L;

FC: fator de conversão do furfural, 1,37;

V_{filtrado} : volume do hidrolisado filtrado, 0,5 L

M1: massa de biomassa utilizada na hidrólise descontado o teor de umidade, em g

- Cálculo do teor de 5 – Hidroximetilfurfural - HMF

$$\% \text{ HMF} = \frac{(C_{\text{HCLAE}} \cdot \text{FC} \cdot V_{\text{filtrado}})}{M1} \times 100 \quad \text{Equação 17}$$

Onde:

C_{HCLAE} : concentração de ácido acético quantificado por CLAE, em g/L

FC: fator de conversão do 5-hidroximetilfurfural, 1,20

V_{filtrado} : volume do hidrolisado filtrado, 0,5 L

M1: massa de biomassa utilizada na hidrólise descontado o teor de umidade, em g

Nas análises de carboidratos e ácido orgânico, foi utilizado um Cromatógrafo – SHIMADZU, modelo CR 7A. Detector – Índice de Refração SHIMADZU R10-6A e Detector – UV (254nm) da SHIMADZU SPD-10A, pertencente a EMBRAPA Instrumentação.

As condições das análises para lignina solúvel foram:

- Coluna C-18 (200 x 4 mm, Hewlett-Packard);
- fase móvel: solução de acetonitrila/água 1:8 contendo 1% de ácido acético v/v;
- fluxo de 0,8 mL. min⁻¹;
- detector UV/VIS a 274 nm; e
- temperatura ambiente de 25 °C.

As condições das análises para carboidratos e ácidos orgânicos foram:

- Coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad)
- fase móvel: H₂SO₄ 0,005 mol L⁻¹;
- fluxo de 0,6 mL. min⁻¹;
- temperatura do forno: 45 °C; e
- detector de índice de refração.

3.6 - ANÁLISES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV e EDS

Amostras de biomassa já fracionadas em colmo, folhas e planta inteira foram secas em estufa a 60°C.

Após secagem, foram colocadas em dessecador até temperatura ambiente. As amostras foram congeladas em Nitrogênio líquido e realizou-se o corte das amostras em tamanho adequado para colocação no suporte/ “stub”. Este procedimento faz-se necessário devido o contato físico do metal da tesoura com as partes das plantas *in natura* causarem um achatamento das paredes celulares, prejudicando a magnificação da imagem.

As amostras foram presas em suporte de alumínio com fita de carbono, as mesmas foram submetidas ao recobrimento com tinta de prata e em seguida a um recobrimento de ~10 nm de ouro com a técnica de *Spitter Coat* e mantidas em dessecador até o momento da análise.

As fotomicrografias foram obtidas em um Microscópio Eletrônico de Varredura JSM-6510 / JEOL com detector de EDS Ultradry 6742A / Thermo Scientific instalado na Embrapa Instrumentação de São Carlos. A potência do feixe de elétrons variou de 5 a 20 kV, conforme a qualidade das imagens escolhidas e, também, devido as variações de penetração do feixe de elétrons nas diferentes superfícies das amostras.

3.7 - ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X – DRX

Os espectros de Difração de Raios X – DRX correspondentes às amostras de biomassa *in natura* foram adquiridos com o propósito de avaliar a cristalinidade da celulose presentes nestes materiais. As amostras foram colocadas em suporte com as fibras na forma de pó. A granulometria era de 80 mesh.

O equipamento utilizado foi um difratômetro da marca Shimadzu, modelo XRD 6100, tubo de cobre e filtro de níquel ($\text{CuK}\alpha = 1,5418 \text{ \AA}$). Goniômetro horizontal, radiação a 50kV (100 mA) instalado no laboratório de Difração de Raios-X da EMBRAPA Instrumentação.

Os difratogramas foram obtidos no modo de varredura continua no intervalo de $2\theta = 10^\circ - 30^\circ$ e velocidade de 1° min^{-1} .

O índice de cristalinidade da celulose (IC%) foi calculado segundo metodologia sugerida por SEGAL, *et al.* (1959) utilizando a Equação 6.

$$\%IC = [(I_{002} - I_{am})/I_{002}] \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

I_{002} = intensidade no pico cristalino 2 θ .

I_{am} = intensidade da parte representativa à região amorfa à aproximadamente

O erro da técnica para quantificação dos índices de cristalinidade da pode variar até de 9% (TASKER et al. 1994; LENGOWSKI, 2012). Utilizou-se como ferramenta o programa “*Match!*” versão 2.2.3 para obtenção de um gráfico de distribuição das fases e uma base de dados cristalográficos fornecidos gratuitamente pela desenvolvedora do software (BALAS, et al, 2007).

3.8 - ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER – FTIR

A espectroscopia na região do infravermelho (4000 - 400 cm^{-1}) é uma técnica de grande importância na análise qualitativa de biomassas vegetais, sendo muito utilizada na área de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas.

As pastilhas foram preparadas a partir de 100 mg de KBr e 1,0 mg de cada amostra de biomassa selecionada com granulometria de 80 mesh e já secas em estufa a 105 °C.

A mistura foi homogeneizada para logo ser prensada sob vácuo por 2 min com uma pressão de 5 kgf.cm^{-2} moldando as pastilhas para análise.

Os espectros foram obtidos a partir de 32 varreduras no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} em um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Spectrum 100N, pertencente a EMBRAPA Instrumentação de São Carlos. A linha de base foi corrigida entre 1810 e 790 cm^{-1} .

3.9 – ESPECTROSCOPIA DE RMN ^{13}C /CP-MAS

As medidas foram realizadas em um espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear da marca Varian Unity 400 MHz Inova / Oxford, que opera na frequência de 400 MHz para ^1H , utilizando sondas para amostras sólidas, pertencente a Embrapa Instrumentação. As amostras previamente separadas e secas foram acondicionadas em rotores cilíndricos de zircônia com diâmetro de 5 mm. Os deslocamentos químicos foram

referenciados com Tetrametilsilano - TMS como padrão interno. O tempo de aquisição em todos os espectros foi de 1 h. A frequência de ressonância foi de 100,58 MHz (^{13}C), tempo de contato de 1 ms, tempo de relaxação de espera de 1s, tempo de aquisição de 12 ms e linha de ampliação (Line Broadening - LB) de 0 (FACEY, 2007). A varredura foi de 0-200 ppm com velocidades de rotação de 9 kHz.

3.10 – ANÁLISE ELEMENTAR (C, H, N, S-O)

As análises foram realizadas na EMBRAPA Instrumentação utilizando equipamento de Análise Elementar Perkin-Elmer, modelo 2400 Series II - CHNS-O. As amostras vegetais foram previamente peneiradas a 80 Mesh e secas à 105°C. Pesou-se 8 mg de material em porta amostra de estanho específico para a análise elementar, após fechamento foi inserido no amostrador automático do equipamento. As análises foram realizadas em duplicata.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- CARACTERIZAÇÃO DAS GRAMINEAS

4.2- CÁLCULO DO TEOR DE UMIDADE

Como preparação das amostras, os materiais de interesse foram secos e calculou-se o teor de umidade e matéria seca. A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para os teores de umidade das amostras após 24h de secagem.

Tabela 12: Porcentagem de umidade e Matéria Seca das biomassas selecionadas

Amostras de biomassas	% Umidade	% Matéria Seca
Bagaço de cana	$6,39 \pm 0,12$	$93,61 \pm 0,24$
Sorgo - Colmo	$7,38 \pm 0,14$	$92,62 \pm 0,25$
Sorgo - Folha	$8,11 \pm 0,41$	$91,89 \pm 0,41$
Capim Mombaça - Planta Inteira	$7,40 \pm 0,22$	$92,60 \pm 0,22$
Capim Mombaça - Folhas	$8,08 \pm 0,31$	$91,92 \pm 0,31$
Capim Mombaça - Colmo	$7,24 \pm 0,11$	$92,76 \pm 0,30$
Capim Marandu - Planta Inteira	$7,69 \pm 0,17$	$92,31 \pm 0,23$
Capim Marandu - Folhas	$8,21 \pm 0,39$	$91,79 \pm 0,39$
Capim Marandu - Colmo	$7,21 \pm 0,09$	$92,79 \pm 0,29$
Capim-elefante Napier - Planta Inteira	$7,37 \pm 0,18$	$92,63 \pm 0,27$
Capim-elefante Napier - Folhas	$7,57 \pm 0,27$	$92,43 \pm 0,27$
Capim-elefante Napier - Colmo	$7,30 \pm 0,10$	$92,70 \pm 0,18$

Analisando a Tabela 12 nota-se que as folhas das biomassas apresentam um teor maior de umidade quando comparado com as outras partes da planta.

O maior teor de umidade nas folhas pode ser devido ao menor teor de lignina presente nas folhas destes materiais, uma vez que a lignina tem menor afinidade a água, deixando as folhas com maior umidade, quando comparado com os colmos das plantas, que apresentam maior concentração de lignina.

O principal objetivo da secagem do material é minimizar a proliferação de microrganismos que possam degradar o material até o final das análises e ser subsídio para cálculo de outros resultados em sua base seca, como por exemplo, na análise elementar de CHNS-O.

4.3- TEOR DE CINZAS

Os valores obtidos e os encontrados na literatura para os teores de cinzas das diferentes partes das amostras vegetais estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Teor de cinzas em base seca das diferentes partes dos materiais vegetais estudados.

Materiais	Cinzas %				Referências
	Folha	Colmo	Planta inteira	Valores de referência	
Bagaço de cana	-	$3,6 \pm 0,2$	-	3,4	Nassar, 1996
Sorgo	$6,1 \pm 0,3$	$3,3 \pm 0,2$	-	3,4	Pedreira, 2003
Capim-Mombaça	$9,1 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,2$	7,95	Dias, 2007
Capim-Marandú	$11,1 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,2$	$9,4 \pm 0,3$	9,0	França, 2009
Capim-Elefante	$10,1 \pm 0,3$	$4,1 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,2$	6,79	Pereira, 1999

Os valores encontrados apresentam grandes variações entre as partes das plantas estudadas, fator explicado pela função característica de cada estrutura celular no vegetal.

As folhas apresentam maior teor de cinzas quando comparadas com os colmos, fato explicado pelo material possuir mais silicatos, carbonatos e óxidos de metais como K, Na e Ca (FREITAS et al, 2011).

Outro fator que pode explicar a diferença entre o colmo e a folha é que a maior concentração de lignina presente no colmo faz com que a concentração dos sais dissolvidos em água seja menor. A lignina presente em maior quantidade nos colmos possui um caráter hidrofóbico e a passagem da água através da parede secundária vegetal é extremamente lenta. A parede secundária é mais desenvolvida nos colmos onde existe maior rigidez e sustentação da planta. Por outro lado, a água e os sais dissolvidos passam facilmente pela parede primária que é mais robusta nas folhas dos vegetais e possui menos lignina; com o crescimento e desenvolvimento desta estrutura, acabam transportando os sais metálicos e distribuindo ao longo das folhas. O silício é considerado um macronutriente de extrema importância para o crescimento e desenvolvimento das plantas, particularmente nas gramíneas, onde é importante para a resistência mecânica do tecido e resistência contra estresses ambientais e patógenos (CUTTER, 1986; LIMA et al, 1999; CENNATEK, 2011; LIMA, 2013).

A localização geográfica do plantio, a técnica empregada para manejo e fatores como temperatura média anual e o índice de pluviosidade irão influenciar diretamente na concentração destes materiais (CONRAD et al, 1995).

Quando comparamos os colmos do sorgo com o bagaço de cana, verifica-se uma pequena variação, também explicado pelas características estruturais destes vegetais, onde seu porte é bem semelhante ao da cana-de-açúcar, e o teor de cinzas acompanhou esta semelhança em torno de 3%.

Já para as outras gramíneas, o teor de cinzas para os colmos variou de 2,3% e 5%, de acordo com o tamanho estrutural das gramíneas estudadas.

As folhas apresentaram, conforme já citado, o maior teor de cinzas, que variou de 6,1% e 11,1%, onde o maior valor encontrado foi para a folha do capim-marandu.

O bagaço de cana utilizado para comparação apresentou valores próximos dos encontrados em literatura, já para as outras gramíneas os valores apresentaram um valor médio entre as folhas e os colmos estudados. (NASSAR et al, 1996; PEREIRA, 1999 PEDREIRA, 2003; DIAS, 2007; FRANÇA, 2009)

4.4- ANÁLISE ELEMENTAR

A análise elementar foi utilizada para avaliar a %C, %H, %N, %S e %O nas amostras de gramíneas *in natura* em comparação com o bagaço de cana. A celulose corresponde à fração mais homogênea, em termos químicos, estudada nas biomassas. A celulose foi primeiramente descrita em 1838 pelo químico francês Anselme Payer. O mesmo determinou a fórmula molecular mínima por análise elementar como sendo $C_6H_{10}O_5$ e observou sua isomeria com o amido. (KLEMM et al., 2005; NOVO, 2012)

No caso das amostras em questão, por estarem sem qualquer tratamento, as frações de celulose, lignina, hemicelulose e outros extrativos correspondem aos teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio, enxofre e oxigênio do conjunto.

Os valores foram obtidos e corrigidos em base seca dos materiais vegetais estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14: Análise Elementar (CHNS-O) dos materiais vegetais

Amostra	% C	% H	% O*	% S	% N
Bagaço de cana	45,0±1,6	4,8±0,1	42,8±0,5	3,0±0,1	0,7±0,1
Sorgo - Colmo	43,0±0,3	5,1±0,1	44,2±0,1	3,6±0,1	0,8±0,1
Sorgo - Folha	41,5±2,5	4,6±0,1	42,8±0,7	2,9±0,1	2,1±0,1
Capim-Mombaça - Planta Inteira	38,8±2,1	5,1±0,2	45,7±0,7	3,8±0,3	0,9±0,1
Capim-Mombaça - Folhas	37,6±2,1	5,0±0,2	43,3±0,6	4,0±0,1	1,1±0,1
Capim-Mombaça - Colmo	43,6±0,4	4,9±0,2	44,9±0,3	3,7±0,4	0,5±0,1
Capim-Marandu - Planta Inteira	39,0±2,7	5,1±0,1	41,6±0,8	3,9±0,4	1,0±0,1
Capim-Marandu - Folhas	37,7±1,4	5,1±0,2	40,3±0,5	4,5±0,4	1,2±0,1
Capim-Marandu - Colmo	39,3±0,3	5,1±0,1	46,1±0,1	3,9±0,1	0,5±0,1
Capim-elefante - Planta Inteira	41,7±2,1	5,0±0,2	43,5±0,7	3,6±0,2	1,5±0,1
Capim-elefante - Folhas	40,9±0,8	4,7±0,1	38,5±0,3	3,4±0,2	2,3±0,1
Capim-elefante - Colmo	41,3±1,5	5,0±0,1	44,6±0,4	3,5±0,1	1,5±0,1

* Obtido por diferença.

A Tabela 14 apresenta uma série de dados obtidos através da técnica de análise elementar CHNS-O. Verifica-se que os valores atribuídos a %C nas amostras variam de 37~45%, tendo o bagaço de cana apresentado o maior teor em torno de 45% de Carbono.

Os teores encontrados de %C, %H e %O são atribuídos, principalmente, aos polissacarídeos presentes nas amostras, além de frações de lignina e hemicelulose, pois os materiais encontram-se *in natura*.

Para os valores encontrados de %S e %N, esta análise leva em consideração a presença de proteínas e ceras nas amostras vegetais, principalmente nas folhas. Outro fator é que estes elementos na forma de óxidos ou íons complexos estão diretamente referenciados ao crescimento e desenvolvimento dos vegetais. Gramíneas com déficit de Nitrogênio ou Enxofre apresentarão folhas amareladas, mal desenvolvidas, além de um baixo rendimento de material lignocelulósico, por isso a análise destes elementos faz-se necessária. O Enxofre e o Nitrogênio estão correlacionados com a formação de proteínas, aminoácidos e vitaminas nos compostos vegetais (MAY, et al., 2013; OLIVEIRA et al, 2007).

A maior concentração de Enxofre foi identificada para a amostra de Capim-marandu – Folhas, que pode ser relacionada com o teor de cinzas, onde apresenta, também, o maior teor para este parâmetro, fator que tende pela alta concentração de sais e óxidos inorgânicos, principalmente de sulfatos de metais como cálcio, magnésio e potássio

(FREITAS et al, 2011). O Capim-mombaça – Planta inteira e Capim-marandú – Colmo apresentaram maior teor de Oxigênio.

A Tabela 15 apresenta a relação (H/C), (O/C), (C/N) e (C/S) dos materiais estudados.

Tabela 15: Relação H/C, O/C, C/N e C/S para os materiais vegetais.

Amostra	H/C	O/C	C/N	C/S
Bagaço de cana	1,3	0,7	77,2	39,3
Sorgo - Colmo	1,4	0,8	61,2	32,1
Sorgo - Folha	1,3	0,8	22,8	37,8
Capim-Mombaça - Planta Inteira	1,6	0,9	49,7	27,0
Capim-Mombaça - Folhas	1,6	0,9	41,4	25,0
Capim-Mombaça - Colmo	1,3	0,9	97,9	31,7
Capim-Marandu - Planta Inteira	1,6	0,8	47,4	26,6
Capim-Marandu - Folhas	1,6	0,8	38,0	22,5
Capim-Marandu - Colmo	1,6	0,9	80,5	26,8
Capim-elefante - Planta Inteira	1,4	0,8	31,8	31,3
Capim-elefante - Folhas	1,4	0,7	20,4	31,9
Capim-elefante - Colmo	1,4	0,8	31,5	31,2

Nesta tabela percebe-se que a relação C/N e C/S nos colmos dos materiais é alta comparada às folhas, fator que pode contribuir para a incorporação de enxofre e nitrogênio no material (SWIFT, 1996).

A razão H/C é frequentemente associada ao grau de condensação ou de aromaticidade, e este, por sua vez, pode ser associado à quantidade de lignina, sendo que o aumento desta para valores acima de 1 implica em uma diminuição da aromaticidade nas amostras e uma tendência de possuir menos lignina. A relação H/C mais baixa do bagaço da cana-de-açúcar mostra que este material apresenta uma maior proporção de estruturas insaturadas, principalmente anéis aromáticos característicos de lignina. Valores H/C maiores podem ser relacionados, também com estruturas de óleos e ceras presentes nas folhas dos materiais.

Ao contrário, o maior valor da relação O/C observado no Capim Marandú-Colmo, Capim-Mombaça – Colmo, Capim-Mombaça - Folhas e Capim-Mombaça - Planta Inteira, mostram uma maior tendência relativa de grupos oxigenados, principalmente correlacionados aos polissacarídeos.

4.5 – COMPOSIÇÃO GERAL DOS MATERIAS – LIGNINA, CELULOSE E HEMICEULOSE

As análises em meio contendo H_2SO_4 após tratamento térmico em autoclave, tiveram como produtos de separação na análise gravimétrica uma solução contendo lignina solúvel, ácidos orgânicos e carboidratos e uma fração sólida contendo lignina insolúvel, conforme descrito no *itens 3.5*.

4.5.1 - LIGNINA INSOLUVEL

A lignina insolúvel - L_{KI} foi obtida conforme descrito no item 3.6, sendo os valores apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Teor de Lignina Klason insolúvel nos materiais vegetais

Amostras	% L_{KI}	Valores de referência	Referência
Bagaço de cana	$19,02 \pm 0,71$	$19,76 \pm 0,07$	MARABEZI, 2009
Sorgo - Colmo	$20,60 \pm 0,02$	20,29	THEERARATTANANOON, 2010
Sorgo - Folha	$18,60 \pm 0,71$	-	-
Capim-Mombaça - Planta Inteira	$17,68 \pm 0,76$	-	-
Capim-Mombaça - Folhas	$14,54 \pm 0,02$	-	-
Capim-Mombaça - Colmo	$20,38 \pm 0,01$	11,62*	DIAS, 2007
Capim-Marandu - Planta Inteira	$14,60 \pm 0,08$	-	-
Capim-Marandu - Folhas	$14,23 \pm 0,72$	-	-
Capim-Marandu - Colmo	$17,24 \pm 0,01$	5,7*	FRANÇA, 2007
Capim-elefante - Planta Inteira	$16,13 \pm 0,69$	-	-
Capim-elefante - Folhas	$12,02 \pm 0,80$	-	-
Capim-elefante - Colmo	$16,76 \pm 0,41$	10,43*	PEREIRA, 1999

* Obtidos a partir de FDA e FDN (VAN SOEST, 1967)

Pode-se observar que o teor de lignina insolúvel nas folhas é menor do que o teor encontrado nos colmos de mesma espécie. Fato explicado devido a lignina estar presente em maior concentração nos colmos, agindo na forma estrutural de sustentação destes vegetais (RAVEN et al, 2001; CUTTER, 1986) .

O colmo do Sorgo apresentou maior teor de lignina insolúvel e o segundo maior foi o colmo do capim-mombaça. Ambas as culturas apresentam grande massa foliar. No caso

do sorgo seu tamanho pode chegar até 6,0 m de comprimento e o capim-mombaça 2,5 m (SALES et al, 2002; MULLER et al, 2002; PARRELLA, 2013; PEDREIRA, 2003).

As folhas do capim-marandu apresentaram o menor teor de lignina insolúvel, podendo ser explicado por apresentar menor massa foliar e menor estrutura vegetal.

Os valores encontrados de L_{KI} para o bagaço de cana e o sorgo são próximos entre estes materiais vegetais, quando comparamos com os resultados obtidos em literatura esta proximidade é ainda maior.

4.5.2 - LIGNINA SOLÚVEL

A lignina solúvel foi obtida conforme descrito no item 3.7 onde utilizamos das *Equações 2, 9 e 10* para cálculo do teor de Lignina Solúvel na fração líquida - %Lignina solúvel. A Tabela 17 demonstra a distribuição da %Lignina Solúvel encontrada nos materiais lignocelulósicos.

Tabela 17: Teor de Lignina Insolúvel nos materiais vegetais

Amostras	%Lignina Insolúvel
Bagaço de cana	$4,28 \pm 0,73$
Sorgo - Colmo	$4,39 \pm 0,75$
Sorgo - Folha	$4,24 \pm 0,08$
Capim-Mombaça - Planta Inteira	$4,04 \pm 0,15$
Capim-Mombaça - Folhas	$5,01 \pm 0,56$
Capim-Mombaça - Colmo	$3,54 \pm 0,23$
Capim-Marandu - Planta Inteira	$7,53 \pm 0,07$
Capim-Marandu - Folhas	$7,98 \pm 0,05$
Capim-Marandu - Colmo	$6,05 \pm 0,51$
Capim-Elefante - Planta Inteira	$5,49 \pm 0,11$
Capim-Elefante - Folhas	$5,36 \pm 0,23$
Capim-Elefante - Colmo	$6,10 \pm 0,25$

A tabela aponta os maiores valores encontrados para as folhas do capim-marandú e os menores valores para os colomos do capim-mombaça. Em termos de hidrólise percebe-se que a lignina presente nas folhas do capim-marandú foi mais solúvel em meio ácido, quando comparada com os outros materiais vegetais. Pode-se atentar, ainda, que o ácido utilizado acaba solubilizando outros materiais consigo, além da lignina, como ceras, óleos e outros resíduos presentes nas folhas, aumentando a absorção no UV.

4.5.3 - LIGNINA TOTAL

A Tabela 18 indica os valores encontrados para %Lignina Total através da Equação 11, presente no *item 3.7*.

Tabela 18: Teor de Lignina Total encontrado nos materiais vegetais.

Amostras	%LIGNINA TOTAL
Bagaço de cana	23,30 ± 0,72
Sorgo - Colmo	24,99 ± 0,38
Sorgo - Folha	22,84 ± 0,40
Capim-Mombaça - Planta Inteira	21,72 ± 0,53
Capim-Mombaça - Folhas	19,56 ± 0,29
Capim-Mombaça - Colmo	23,92 ± 0,12
Capim-Marandu - Planta Inteira	22,14 ± 0,07
Capim-Marandu - Folhas	22,21 ± 0,38
Capim-Marandu - Colmo	23,29 ± 0,26
Capim-Elefante - Planta Inteira	21,62 ± 0,40
Capim-Elefante - Folhas	17,38 ± 0,51
Capim-Elefante - Colmo	22,86 ± 0,83

Verifica-se que o teor de lignina em todas as amostras de colmo das amostras vegetais é maior do que o encontrado nas folhas, conforme observado, também, por FUKUSHIMA e SAVIOLI (2001), onde encontraram maiores teores de lignina no caule/colmo em relação à folha, quando empregaram três técnicas de quantificação da lignina.

Observa-se que para esta macromolécula a maior concentração foi encontrada para o colmo/caule do Sorgo em torno de 25%, onde era esperado, pois é um dos maiores vegetais, em porte e tamanho que empregamos no trabalho.

A lignina é um polímero estrutural para as plantas, no colmo possui funções de sustentar a planta, dando mais rigidez as paredes celulares, fornecendo um revestimento estável, evitando o ataque químico, físico e biológico. Esta observação já era esperada, uma vez que todos os colmos/caules apresentaram maior teor de lignina quando comparado com as outras partes das plantas. A interação da lignina com a celulose e hemicelulose determina a estrutura robusta da parede celular dos materiais lignocelulósicos. (RABELO, 2010).

4.6 - DETERMINAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

Para a determinação dos teores de celulose, celobiose, xilose, arabinose, ácido galacturônico, ácido glicurônico, ácido fórmico, hemicelulose, etanol e ácido acético foram utilizadas as *Equações 12, 13, 14, 15, 16 e 17*.

Não foram identificadas concentrações/sinais de celobiose, etanol, ácido fórmico, ácido glicurônico e ácido galacturônico nas amostras em solução analisadas por CLAE. Os dois últimos são produtos de degradação/oxidação dos monossacarídeos galactose e glicose.

A celobiose seria encontrada caso a hidrólise ácida não fosse efetiva. Já o ácido fórmico seria um subproduto de degradação/oxidação do HMF. A Tabela 19 indica valores encontrados para %Celulose e %Hemicelulose.

Tabela 19: Teores de celulose e hemicelulose encontrados nos materiais vegetais

Amostras	%CELULOSE	%HEMICELULOSE
Bagaço de cana	39,93 ± 0,73	25,16 ± 0,85
Sorgo - Colmo	41,40 ± 0,75	25,59 ± 0,74
Sorgo - Folha	38,26 ± 0,08	22,76 ± 0,60
Capim-Mombaça - Planta Inteira	43,20 ± 0,15	24,27 ± 0,22
Capim-Mombaça - Folhas	41,88 ± 0,77	23,17 ± 0,24
Capim-Mombaça - Colmo	43,93 ± 0,86	25,55 ± 0,23
Capim-Marandu - Planta Inteira	40,94 ± 0,04	21,16 ± 0,28
Capim-Marandu - Folhas	39,69 ± 0,05	20,46 ± 0,24
Capim-Marandu - Colmo	43,41 ± 0,40	24,10 ± 0,51
Capim-Elefante - Planta Inteira	43,13 ± 0,11	22,75 ± 0,28
Capim-Elefante - Folhas	42,33 ± 0,23	20,23 ± 0,36
Capim-Elefante - Colmo	44,04 ± 0,21	24,78 ± 0,25

Pode-se perceber, ao analisar os teores fornecidos pela tabela, que os colmos apresentaram maior concentração de celulose quando comparados com a planta inteira e as folhas de uma mesma espécie vegetal. O Colmo/caule do Capim-Elefante apresentou maior teor de celulose, seguido de Colmo/caule de Capim-Mombaça, Colmo/caule do Capim-Marandu, Colmo/caule do Sorgo e Bagaço de cana.

Quando se compara os valores de celulose entre as folhas, a gramínea que apresentou maior teor foi a do Capim-Elefante seguida da mesma ordem citada anteriormente. Dentre as plantas inteiras, a gramínea que apresentou maior teor foi a do Capim-Mombaça.

Os resultados vão ao encontro do porte das gramíneas, espessura de seus colmos/caules e o transporte de nutrientes que cada uma pode comportar. Observam-se dados plausíveis referentes ao Capim-Elefante e Mombaça.

Salienta-se que todas as biomassas trabalhadas possuem uma tendência maior de conter celulose quando comparadas com o bagaço de cana, que apresentou aproximadamente 40% de celulose.

Para os teores de hemicelulose verifica-se que o Colmo/caule do Sorgo e da Mombaça apresentaram valores maiores. No entanto, os caules apresentaram maiores teores de hemicelulose quando comparados com os teores encontrados nas folhas. As folhas do Capim-Elefante apresentaram menor teor de hemicelulose.

O fato de se encontrar maiores teores de celulose e hemicelulose nas partes de caules/colmos pode estar diretamente correlacionado com a estrutura de sustentação que estas exercem nas gramíneas, devendo esta estrutura suportar adequadamente o peso do vegetal.

4.7 – COMPILAÇÃO DE DADOS ENCONTRADOS - % RENDIMENTO

A Tabela 20 apresenta uma compilação dos valores encontrados de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas das amostras analisadas.

Conforme dados encontrados em literatura, teremos como teor de extrativos para algumas gramíneas a ordem de 2,3~5% da massa seca destas gramíneas, embora este parâmetro não fora analisado neste trabalho. (NOVO, 2012; TRIANA, 1990; RABELO, 2010; ICIDCA, 1990; MARABEZI, 2009)

Tabela 20: Valores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas - % Rendimento em base seca.

Amostras	%CELULOSE	%HEMICELULOSE	%LIGNINA TOTAL	%CINZAS	% Rendimento
Bagaço de cana	39,93 ± 0,73	25,16 ± 0,85	23,30 ± 0,72	3,65 ± 0,19	92,05
Sorgo - Colmo	41,40 ± 0,75	25,59 ± 0,74	24,99 ± 0,38	3,33 ± 0,17	95,31
Sorgo - Folha	38,26 ± 0,08	22,76 ± 0,60	22,84 ± 0,40	6,08 ± 0,26	89,95
Capim- Mombaça - Planta Inteira	43,20 ± 0,15	24,27 ± 0,22	21,72 ± 0,53	5,71 ± 0,23	94,90
Capim- Mombaça - Folhas	41,88 ± 0,77	23,17 ± 0,24	19,56 ± 0,29	9,06 ± 0,27	93,67
Capim- Mombaça - Colmo	43,93 ± 0,86	25,55 ± 0,23	23,92 ± 0,12	2,34 ± 0,11	95,76
Capim-Marandu - Planta Inteira	40,94 ± 0,04	21,16 ± 0,28	22,14 ± 0,07	9,42 ± 0,27	93,66
Capim-Marandu - Folhas	39,69 ± 0,05	20,46 ± 0,24	22,21 ± 0,38	11,15 ± 0,31	93,51
Capim-Marandu - Colmo	43,41 ± 0,40	24,10 ± 0,51	23,29 ± 0,26	4,95 ± 0,22	95,76
Capim-Elefante - Planta Inteira	43,13 ± 0,11	22,75 ± 0,28	21,62 ± 0,40	4,68 ± 0,21	94,18
Capim-Elefante - Folhas	42,33 ± 0,23	20,23 ± 0,36	17,38 ± 0,51	10,14 ± 0,29	91,09
Capim-Elefante - Colmo	44,04 ± 0,21	24,78 ± 0,25	22,86 ± 0,83	4,06 ± 0,20	95,73

Ao somarmos os valores de extrativos encontrados em literatura o rendimento em massa de gramínea aumenta no intervalo de 95-100%. Pode-se explicar o rendimento abaixo de 100% em alguns materiais pela presença de resíduos que podem ter aderido ao material e que se solubilizaram durante a hidrólise ácida, ou ainda, a uma pequena solubilização.

Conforme observado na Tabela 20 percebe-se que os colmos/caule possuem maior teor de lignina bem como celulose, como já observado em outros materiais vegetais por Hatfield et al (1994) e Fukushima e Hatfield (2001).

4.8 – MÉTODO ALTERNATIVO DE DETERMINAÇÃO DE COMPOSIÇÃO GERAL (VAN SOEST)

Como método de comparação, realizou-se a análise de composição geral dos materiais vegetais pelo método de nutrição animal que utiliza a técnica desenvolvida por Van Soest (1967) através da Fibra Detergente Neutro (FDN) e Fibra Detergente Ácido (FDA). Este método é utilizado em rotina de caracterização de gramíneas para nutrição animal.

As análises foram realizadas pela Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos-SP, os resultados obtidos são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Composição geral dos materiais – % Rendimento em base seca

Amostras	% MS	% FDA	% FDN	% LIG	% CEL	% HEM	% CINZAS	% Rendimento Total
Bagaço de cana	93,61	64,53	87,82	8,58	55,12	23,29	3,65	90,64
Sorgo - colmo	92,62	65,24	78,00	9,32	55,43	12,75	3,33	80,83
Sorgo - folhas	91,89	41,26	67,69	5,22	36,88	26,43	6,08	74,61
Capim - Mombaça - Planta inteira	92,60	66,18	77,15	8,48	55,44	10,97	5,71	80,61
Capim - Mombaça - Folhas	91,92	50,42	69,15	4,63	43,08	18,73	9,06	75,50
Capim - Mombaça - colmo	92,76	72,75	86,59	12,07	59,91	13,84	2,34	88,16
Capim - Marandu - Planta inteira	92,31	58,44	75,62	6,69	50,14	17,18	9,42	83,43
Capim - Marandu - Folhas	91,79	42,33	67,41	3,11	36,67	25,08	11,15	76,01
Capim - Marandu - colmo	92,79	65,37	81,30	7,61	56,78	15,93	4,95	85,26
Capim - Elefante - Planta inteira	92,63	68,07	80,45	9,96	56,14	12,37	6,68	85,15
Capim - Elefante - Folhas	92,43	44,97	66,90	5,13	36,38	21,93	10,14	73,58
Capim - Elefante - colmo	92,20	68,46	74,58	10,54	57,92	6,12	4,06	78,64

%MS = Massa seca; %FDA = Fibra Detergente Ácido; %FDN = Fibra Detergente Neutro; %LIG = Lignina; %CEL = Celulose; %HEM = Hemicelulose.

Verifica-se que o método FDA fornece valores de lignina 3-5 vezes menores que o método Klason. O método FDA subestima a concentração de lignina devida sua perda na solubilização do meio ácido, conforme verificado em outros materiais vegetais por Kondo

et al (1987) e. Lowry et al (1994). A FDA tem como principal obstáculo à solubilização parcial dos componentes de lignina sendo que particularmente em gramíneas (JUNG et al. 1997; TRAXLER, 1998).

O método Klason possui uma medida mais precisa de concentração de lignina para gramíneas quando comparado com o método FDA. Comparando os dois métodos, Hatfield et al (1994) destacaram que a maior diferença entre esses dois procedimentos é a sequência na qual a concentração de ácido e a temperatura são utilizadas para a hidrólise dos polissacarídeos e consideraram que principalmente para gramíneas, o método lignina Klason é o mais adequado do que o método de Van Soest (1967) (HATFIELD et al, 1994; JUNG et al, 1989).

O rendimento do processo acaba sendo prejudicado pela solubilização em meio ácido de outros produtos de degradação, levando ao rendimento variável entre os materiais vegetais em torno de 73% a 91%, subestimando a lignina que solubiliza no meio muito degradante e superestimando a celulose, obtendo valores muito diferentes em comparação com o método Klason.

4.9- ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

4.9.1 – ANÁLISES POR INFRAVERMELHO MÉDIO (FTIR)

Os espectros de FTIR das gramíneas estudadas mostram bandas de absorção que podem ser atribuídas aos maiores componentes estruturais dos materiais vegetais: celulose, hemicelulose e lignina (Figuras 37 a 43).

As regiões representativas para hemicelulose são relacionadas nos espectros em $1727-1720\text{ cm}^{-1}$ como sendo estiramento de ramificações em carbonila de éster $\text{C}=\text{O}$, vibrações de ácido carboxílico e cetonas nas polioses (KUMAR et al, 2009).

As bandas relacionadas à celulose localizam-se nas regiões entre $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ referentes ao estiramento OH de celulose e de alcoois e fenóis (GILBERT, 1993; KUMAR et al, 2009; PANDEY, 1999). Na região de $2900-2850\text{ cm}^{-1}$ ficam compreendidos os estiramentos CH de grupos metil da celulose e estiramento CH_2 de grupos alifáticos em ceras e resinas (ZHANG, 2006; GILBERT, 1993; PANDEY, 1999). Em $1314-1337\text{ cm}^{-1}$ identificam-se as deformações simétricas de grupos CH de celulose. Na assinatura da região de 1405 cm^{-1} temos as deformações assimétricas de CH da celulose, entre $1240-$

1160 cm^{-1} vibração de anéis sobrepostos com estiramento C-OH e grupos laterais C-O-C de vibração glicosídica em celulose, em particular 1100 cm^{-1} e 1043 cm^{-1} (GILBERT, 1993; ELANTHIKKAL et al, 2010; KAUSHIK e SINGH, 2011). Em 900 cm^{-1} encontram-se as assinaturas de deformação de ligação glicosídica C1-H vibração do anel e dobramento OH de ligações glicosídicas entre unidades anidroglicosos em celulose (KUMAR et al, 2009; PANDEY, 1999).

As regiões de absorção representativas em lignina estão compreendidas em 1635-1645 cm^{-1} com estiramento C=O de anéis aromáticos, 1580 cm^{-1} absorção de H_2O e vibrações C=O com ligações de hidrogênio associadas com ligações duplas α - β de grupos propanoides em estruturas de lignina e 1503 a 1517 cm^{-1} com estiramentos C=C de anéis guaiacila em lignina, principalmente compostos fenólicos (KUMAR et al, 2009; PANDEY, 1999; CORREDOR et al, 2009; GUO et al, 2008; LIU, 2005). Em torno de 1435 cm^{-1} encontram-se as absorções dos anéis dos grupos siringila na lignina. Em 1230-1251 cm^{-1} encontram-se as vibrações C-O do anel guaiacila em lignina (CORREDOR et al, 2009; GUO et al, 2008; KUMAR et al, 2009; GASTALDI et al, 1998; PANDEY, 1999; SUN e TOMKINSON, 2004).

Figura 37: Espectros de FTIR, onde A: Bagaço de cana, B: Colmo de Sorgo, C: Folha de sorgo.

A região compreendida de 400-700 cm^{-1} está reservada para compostos inorgânicos como silicatos, sulfatos e carbonatos de sódio, potássio e magnésio.

O bagaço de cana e o colmo do sorgo (Figura 37) são semelhantes entre si principalmente nas regiões de caracterização de celulose entre 1160 cm^{-1} e 1043 cm^{-1} , 3400 cm^{-1} e na região de 1380 cm^{-1} atribuída ao sinal de estiramento CO em carbonatos. Para lignina o colmo apresenta um sinal mais acentuado quando comparado com o bagaço de cana em torno de 1640 cm^{-1} , no entanto, esta característica se inverte no sinal de hemicelulose em 1730 cm^{-1} , quando o bagaço de cana apresenta um sinal de maior intensidade.

A folha do sorgo biomassa difere-se do colmo principalmente nos sinais característicos de celulose em regiões com bandas alargadas de 3400 cm^{-1} e uma tendência na redução da intensidade em 1100 cm^{-1} ; é observada esta tendência de redução para a lignina em 1510 cm^{-1} , 1400 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} e a presença de sinais nas regiões de compostos alifáticos em 2900 cm^{-1} atribuídos para os óleos presentes nestas partes vegetais.

Figura 38: Espectros de FTIR para plantas inteiras, onde A: Capim-Marandu, B: Capim-Mombaça, C: Capim-Elefante.

O espectro de FTIR na Figura 39 indica que a banda fina na região de 1384 cm^{-1} é intensa para o Capim-Marandu e Capim-Mombaça, correlacionando aos estiramentos C-O de carbonatos, conforme as análises de cinzas presentes na Tabela 20 indicam que o Capim-Marandu é o que possui maior teor de cinzas, seguido do Capim-Mombaça e Capim-Elefante. Essa banda poderia ser também atribuída à ligação N-H, relativa principalmente às proteínas. Entretanto, a análise elementar das amostras presente na Tabela 14, revelou pequena quantidade de N e em ordem inversa à intensidade do sinal observado por FTIR.

Figura 39: Espectro de FTIR para Capim-Marandu, onde A: Planta Inteira, B: Folha e C: Colmo.

Figura 40: Espectro de FTIR para Capim-Elefante, onde A: Planta Inteira, B: Folhas e C: Colmo.

Figura 41: Espectro de FTIR para Capim-Mombaça, onde A: Planta inteira, B: Colmos e C: Folhas.

As Figuras 39, 40 e 41 apresentam os espectros por FTIR de Capim-Marandu, Capim-Elefante e Capim-Mombaça, respectivamente. As setas indicam as assinaturas na região de 1380 cm^{-1} atribuídas aos carbonatos presentes nestas gramíneas. É possível comparar as partes das plantas para esta região, onde a maior intensidade é encontrada nas folhas, seguida da planta inteira e os menores sinais estão presentes nos colmos destes materiais, principalmente nos espectros de colmo do Capim-Marandu e Capim-Elefante.

Figura 42: FTIR do colmo de Capim-Mombaça com diferentes cortes, onde A: 45 dias, B: 45 dias rebrota, C: 90 dias, D: 90 dias rebrota, E: 135 dias e F: 180 dias.

A Figura 42 apresenta espectros do Capim-Mombaça com diferentes cortes que variam 45 dias, 45 dias rebrota, 90 dias, 90 dias rebrota, 135 dias e 180 dias, respectivamente, representando as plantas cortadas com dias normais; as rebrotas são os períodos de dias após o primeiro corte, logo a rebrota é um segundo corte da planta.

As setas indicam o incremento na região de 1385 cm^{-1} , onde se observa a diminuição deste sinal conforme a planta adquire um amadurecimento, podendo indicar que quanto mais nova a planta maior será a inclusão de silicatos, sulfatos e carbonatos nas plantas devido a proximidade com o solo. Quanto mais nova a planta, maior será o contato

com o solo e seu aumento de incremento de materiais inorgânicos como silicatos e carbonatos nos clusters das paredes celulares vegetais. Outra comparação é a absorção na região típica de lignina compreendida entre 1580 cm^{-1} e 1610 cm^{-1} , onde estas intensidades ficam mais caracterizadas na planta madura com o aparecimento de dois ombros. A região de 1510 cm^{-1} atribuída à hemicelulose, 1250 cm^{-1} atribuída à lignina e a região de 1030 cm^{-1} atribuída à celulose, conforme as plantas se desenvolvem ocorrem o alargamento das paredes celulares vegetais e aumento destes compostos principais estruturais, sendo observado o alargamento destas bandas.

Um sinal fino e intenso foi observado na forma de “*sharp*” principalmente nas folhagens das gramíneas, sendo atribuído ao estiramento C-O de carbonatos na região de $1389\text{-}1386\text{ cm}^{-1}$, já observado por Castilhos et al (2008). Após calcinação das amostras o sinal identificado nesta região foi mantido, indicando presença de material inorgânico.

Figura 43: Espectro de FTIR para cinzas de Capim-Mombaça – Colmo.

A Figura 43 apresenta o FTIR para as cinzas do colmo de Capim-Mombaça destacando a região de 1380 cm^{-1} . Percebe-se que a intensidade do sinal permaneceu na região atribuída à ligação C-O de carbonatos. A calcinação ocorreu com um patamar de $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2h, para garantir a queima e oxidação total do material vegetal. Pode-se observar que o espectro possui outras regiões compreendidas por ligações Si-O-Si atribuídas à absorção de silicatos como as de 1035 cm^{-1} e 500 cm^{-1} .

4.9.2 - ANÁLISES POR RMN ^{13}C /CP-MAS

Semelhante à análise FTIR, a análise de RMN ^{13}C /CP-MAS em estado sólido é uma técnica qualitativa que pode ser utilizada para determinar a estrutura química e composição entre as amostras de biomassa.

As amostras vegetais foram selecionadas para os espectros RMN ^{13}C /CP-MAS (Figuras de 31-35, respectivamente). Para cada tipo de biomassa, os espectros da amostra foram comparados e analisados. As assinaturas dos deslocamentos químicos nos sinais no espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS foram resumidos na Tabela 22.

As atribuições de cada sinal foram elucidadas a partir da literatura de MAO et al, 2010; POPESCU, et al, 2011; XIAO et al, 2011; WIKBERG e MAUNU, 2004.

Tabela 22: Atribuição dos deslocamentos químicos (ppm) para as gramíneas selecionadas

Deslocamento químico (ppm)		Grupos de base
Identificação	Deslocamentos	
1	22	Grupos acetatos em hemicelulose
2	32	Cadeias de metilenos lineares de lipídeos, estruturas de cutina e alifáticos
3	55	Carbono aril metoxila de lignina ($-\text{OCH}_3$)
4	64	Carbono C-6 de celulose e carbono C-Alquila de lignina
5	71	Carbonos C2, C3 e C5 da celulose.
6	74	Sobreposição de carbonos C-2, C-3 e C-5 em celulose; alargamento da sobreposição de carbonos C-2, C-3 e C-5 de hemicelulose
7	83	Sobreposição de carbonos C-2, C-3 e C-5 em celulose; alargamento da sobreposição de carbonos C-2, C-3 e C-5 de hemicelulose
8	88	Sobreposição de carbono C-4 de hemicelulose; carbono C-4 de celulose
9	106	Carbono C-1 da celulose
10	115	Grupos Guaiacila em Lignina
11	155	Oxigênio substituinte dos carbonos (C-3 e C-4) dos anéis aromáticos, grupos fenólicos de lignina.
12	175	Grupos carbonilas de lignina e grupos carboxila em hemicelulose.

A Tabela 22 exemplifica regiões características dos materiais lignocelulósicos identificados. Onde as regiões de identificação de lignina estão compreendidas em 3 (53-56 ppm), 4 (61-64 ppm), 10 (110-120 ppm), 11 (150-160 ppm) e 12 (170-180 ppm).

Figura 44: Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS para os materiais estudados, onde A: Bagaço de cana; B: Capim-Marandu-Colmo; C: Capim-elefante – Colmo; D: Capim-Mombaça – Colmo; E: Sorgo – Colmo; F: Capim-Marandu – Folhas; G: Capim-Elefante – Folhas; H: Capim-Mombaça- Folhas; I: Sorgo - Folhas; J: Capim-Marandu – Planta Inteira; K: Capim-Elefante – Planta Inteira; e L: Capim-Mombaça – Planta Inteira.

Tabela 23: Intensidades relativas (porcentagem da área total) das bandas nos espectros de RMN ^{13}C /CP-MAS de amostras vegetais.

Amostras	Identificação das linhas											
	1	2	3	4	5 e 6	7	8	9	10	11	12	
Bagaço de cana	2,75	0,75	3,35	14,17	43,21	9,20	4,55	15,27	3,07	1,57	2,24	
Sorgo - colmo	3,00	3,54	4,09	15,53	42,46	8,30	3,21	13,71	2,74	1,00	2,43	
Sorgo - folhas	2,47	6,06	2,97	12,26	42,41	7,61	3,51	14,26	3,04	1,18	4,17	
Capim - Mombaça - Planta inteira	2,50	2,06	4,15	14,35	42,32	10,00	3,46	14,12	3,08	1,53	2,55	
Capim - Mombaça - Folhas	1,82	2,49	2,27	12,41	44,38	10,19	3,31	14,86	3,53	1,55	3,08	
Capim - Mombaça - colmo	2,04	0,68	5,01	15,51	44,33	8,89	3,01	14,37	2,84	1,57	1,72	
Capim – Marandu - Planta inteira	1,98	1,38	2,89	13,82	43,24	9,51	4,04	16,55	2,64	1,59	2,49	
Capim - Marandu - Folhas	1,83	1,63	2,35	12,38	43,58	9,94	3,69	14,77	3,91	1,25	4,62	
Capim - Marandu - colmo	2,44	1,35	3,77	15,27	46,08	8,98	2,76	15,14	1,70	0,91	1,69	
Capim - Elefante - Planta inteira	2,48	1,46	4,29	14,25	42,56	9,52	4,01	14,73	2,73	1,36	2,54	
Capim - Elefante - Folhas	3,14	2,88	4,27	13,07	41,85	9,91	2,67	13,59	2,42	1,13	5,17	
Capim - Elefante - colmo	2,28	1,23	4,70	15,69	46,24	7,98	2,63	14,73	2,49	1,25	1,93	

Para estas regiões encontramos o Capim-Mombaça como a gramínea em destaque, principalmente o colmo do Capim-Mombaça apresentando maiores intensidades nas linhas 3 e 11 (Tabela 23). Na linha 4 observa-se o colmo do Capim-Elefante como a maior contribuição, no entanto, deve-se levar em consideração a correlação desta região com a região de Carbono C-6 de celulose. A região 10 dos grupos guaiacila de Lignina foi mais representativa para as folhas do Capim-Marandu seguidas das folhas do Capim-Mombaça. A região 12 correspondente aos grupos carbonilas de lignina e grupos carboxila em hemicelulose foi mais representativa para as folhas do Capim-Elefante, seguidas das folhas do Capim-Marandu e folhas do Sorgo. O bagaço de cana apresentou um sinal próximo do colmo do Capim-Mombaça na região da linha 11, representando os oxigênios substituintes dos Carbonos C-3 e C-4 dos anéis aromáticos, o restante das regiões para lignina em bagaço de cana apresentaram resultados intermediários com relação às outras partes dos materiais vegetais. A menor percentagem encontrada para as regiões correspondentes dos grupos aromáticos de lignina nas linhas 10, 11 e 12 foi para o colmo do Capim-Marandu.

As principais unidades de lignina nestas gramíneas são guaiacila (G) e siringila (S). O sinal a 147,5 ppm correspondeu ao C-3 e C-5 em unidades Siringila e os carbonos C-3 das unidades Guaiacila. O sinal em 153 ppm correspondeu ao C-3 e C-5 de carbono de unidades de Siringila e C-4 de carbono de unidades de Guaiacila.

Os grupos metoxi em lignina foram apresentados em torno de 57 ppm, representando a linha 3. A intensidade relativa dos sinais de lignina, especialmente nas regiões de 147,5 ppm e 57 ppm, é mais intenso nos colmos do Capim-Mombaça, podendo ser comparado com os valores encontrados nestes resíduos, conforme Tabela 20 na seção 4.7, que apresentou maiores percentagens de lignina para o Colmo do Sorgo e do Capim-Mombaça, já a Tabela 21 destaca o maior valor para o colmo do Capim-Mombaça.

A celulose nativa está representada na linha 4 como sendo a contribuição do C-6; linhas 5, 6 e 7 para os Carbonos C-2, C-3 e C-5; a linha 8 para o Carbono C-4 e a linha 9 para o Carbono C-1 da celulose. As linhas 7 e 8 contribuem, ainda, com as sobreposições de carbonos respectivos de hemicelulose.

A maior contribuição e percentagem para C-6 foi identificada pela linha 4 com o Colmo do Capim-Elefante, seguido do Colmo do Sorgo, Colmo de Capim-Mombaça e Colmo de Capim-Marandu. O bagaço de cana apresentou um valor inferior a estas gramíneas. Os Carbonos C-2, C-3 e C-5 por apresentarem sobreposição de picos, foram identificados nas regiões principais das linhas 5 e 6 (71-74 ppm), a linha 7 apresenta

sobreposição dos Carbonos C2, C-3 e C-5 de Hemicelulose nos materiais. Para as linhas 5 e 6 a maior percentagem das áreas dos picos foram encontradas para o Colmo do Capim-Elefante, Colmo de Capim-Marandu, Folhas do Capim-Mombaça, Colmos do Capim-Mombaça, respectivamente. O colmo e a folha do Capim-Mombaça apresentaram um valor bem próximo sendo o primeiro 44,33% e o segundo 44,38%. O Bagaço de cana apresentou um valor inferior quando comparado com estas partes vegetais, em torno de 43,21%. A linha 8 representa a região de Carbono C-4 em celulose e sobreposições de C-4 em Hemicelulose, a maior contribuição em percentagem indica a do bagaço de cana, a Planta inteira do Capim-Marandu e Planta inteira do Capim-Elefante, respectivamente. A linha 9 representa a região de Carbono C-1, onde a Planta inteira do Capim-Marandu, bagaço de cana e Colmo de Capim-Marandu apresentaram respectivamente os maiores valores em percentagem de área.

Os colmos dos materiais vegetais apresentaram maior intensidade na região de celulose, podendo ser observado na Figura 44.

Comparando os dados obtidos a partir das integrais das áreas dos gráficos para as linhas 4, 5 e 6 com os dados de resíduos da Tabela 20, o Colmo do Capim-Elefante apresentou a maior percentagem em celulose com 44,04%, seguido do Colmo do Capim-Mombaça com 43,93%; ao comparar com a Tabela 21 as maiores percentagens de celulose são encontradas para o Colmo do Capim-Mombaça que apresenta 59,91% e o Colmo do Capim-Elefante com 57,92 %, alternando a ordem.

A hemicelulose está representada junto a linha 1 identificada pelos grupos acetatos deste material; as linhas 6 e 7 representam alargamentos da sobreposição dos Carbonos C-2, C-3 e C-5 de hemicelulose e colaboração, também, de sobreposição de C-2, C-3 e C-5 da celulose; a linha 8 apresenta sobreposição de C-4 de hemicelulose e C-4 de celulose e a linha 12 representa grupos de carbonila em hemicelulose e sobreposição de grupos carbonilas em lignina.

As folhas dos materiais apresentaram intensidade considerável nas regiões de hemicelulose. Para a região 12 destacam-se as folhas do Capim-Elefante, Capim-Marandu e Sorgo, respectivamente e o bagaço de cana apresentou um valor inferior. A região 1 identificada pelos sinais de acetato em hemicelulose foram mais significativas para as folhas do Capim-Elefante. A região 7 apresentou maior intensidade de sinal para as folhas do Capim-Mombaça, seguido da Planta inteira de Capim-Mombaça, Folhas de Capim-Marandu e folhas de Capim-Elefante, o bagaço de cana apresentou um sinal inferior a estes. A região 8 ficou destacada pela maior intensidade encontrada para o bagaço de cana,

seguido da Planta inteira do Capim-Marandu, Planta inteira do Capim-Elefante e folhas do Capim-Marandu.

Quando comparamos os valores das intensidades de sinal destas gramíneas na Figura 44 com os valores dos resíduos da Tabela 20, os colmos dos materiais estudados apresentaram maior percentagem em massa de hemicelulose; quando comparamos os valores obtidos da Tabela 21 as folhas do Sorgo, folhas do Capim-Marandu, bagaço de cana e folhas do Capim-Elefante apresentaram respectivamente maiores concentrações.

Os valores encontrados nos resíduos analisados coincidem com as intensidades identificadas nos espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{CP-MAS}$.

Sinais referentes às estruturas alifáticas de cutina e lipídeos estão representados pela linha 2. As maiores intensidades foram encontradas nas folhas do Sorgo, Colmo do Sorgo, folhas de Capim-Elefante e Folhas de Capim-Mombaça, respectivamente, onde estas estruturas alifáticas podem ser de origem dos óleos e ceras presentes nestas folhas e no colmo do Sorgo, evitando, assim a perda de água para o ambiente e controlando a transpiração vegetal (LINCOLN e ZEIGER, 2006).

A Figura 45 apresenta espectros de RMN do bagaço de cana e os colmos das outras gramíneas estudadas.

Figura 45: Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS onde A: Bagaço de cana; B: Capim-Marandu - Colmo; C: Sorgo – colmo; D: Capim-Mombaça – Colmo e E: Capim-elefante - Colmo.

Os espectros apresentados na Figura 45 indicam a presença de sinais relacionados à celulose, hemicelulose, cutina e lignina ao longo destas fibras. São verificados sinais de espectro que vão de 21-175 ppm, conforme observado, também, por Atalla et al (1980) e Vanderhart (1980). Os espectros são bastante similares, no entanto, algumas regiões estão em destaque como a linha 2, onde o Sorgo-Colmo apresenta maior intensidade de sinal que é compreensível quando comparado com os dados da Tabela 23 e com as imagens obtidas por MEV, por ser uma parte vegetal que possui grande quantidade de ceras.

Figura 46: Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS para Capim-Mombaça – Colmo

Na Figura 46 foram apresentadas as linhas de celulose em fase cristalina e amorfa. Os dois sinais/ ombros em 63,5 e 65 ppm são atribuídos ao C-6 da celulose (65 ppm, celulose cristalina, 63,5 ppm celulose amorfa). As duas linhas/ ombros em 84 e 89 ppm estão relacionados ao C-4 da celulose (89 ppm atribuída a celulose cristalina no interior das camadas vegetais e 84 ppm atribuída a cristalinidade de superfície da camada vegetal) (HACKNEY et al., 1994; ATALLA 1999 e 1983; SPACCINI, 2008; MORGAN, et al, 1994; SUN, et al, 2004).

As áreas obtidas na Tabela 23, junto à linha 4, podem ser comparadas com os índices de cristalinidade obtidos na Tabela 24 no item 4.10, indicando ser o material mais cristalino o Capim-Elefante – Colmo, seguido de Sorgo-Colmo, Capim-Mombaça-Colmo e Capim-Marandu - Colmo.

Figura 47: Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS onde A: Bagaço de cana; B: Planta inteira de Capim-Mombaça; C: Planta inteira de Capim-Elefante e D: Planta inteira de Capim-Marandu.

A Figura 47 indica que os espectros comparativos destas partes vegetais são bem parecidos, com destaque para a região da linha 1 (~20 ppm), correspondente aos sinais característicos de hemicelulose. A Tabela 20 apresenta os valores encontrados para os resíduos vegetais e indica o Bagaço de cana com maior quantidade de hemicelulose, quando comparado com as plantas inteiras, esta informação é confirmada com as áreas obtidas na Tabela 23. A planta inteira apresenta um mix do material vegetal (colmo + folhas) e a sobreposição destas intensidades resultam em um alargamento dos ombros na linha 4, correspondentes ao carbono C-6 de celulose e carbono C-Alquila de lignina.

Quando comparamos um grupo específico de gramíneas, como nas Figuras 48, 49 e 50 verificamos que o sinal em 22 ppm, de hemicelulose, fica evidenciado para o colmo, enquanto o sinal de 32 ppm, de cutina (óleos, ceras) fica destacado para as folhas dos capins.

O sinal em 56 ppm referente ao carbono metoxil da lignina fica melhor definido nos colmo dos capins, principalmente no Capim-Mombaça.

Figura 48: Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS para as biomassas estudadas, onde A: colmo de Capim-Marandu; B: folhas de Capim-Marandu e C: Planta inteira de Capim-Marandu.

Figura 49: Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS para as biomassas estudadas, onde A: colmo de Capim-Elefante; B: folhas de Capim-Elefante e C: Planta inteira de Capim-Elefante.

Figura 50: Espectro de RMN ^{13}C /CP-MAS para as biomassas estudadas, onde A: colmo de Capim-Mombaça; B: folhas de Capim-Mombaça e C: Planta inteira de Capim-Mombaça.

As regiões atribuídas à celulose, principalmente nas regiões de C-2, C-3 e C-5 (72-75 ppm) é mais intensa nos colmos do Capim-elefante.

Os resultados de RMN ^{13}C /CP-MAS estão de acordo com os obtidos pelos métodos de via úmida.

4.10 – ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS –X (DR-X)

O Índice de cristalinidade (IC) foi utilizado para estimar a cristalinidade de materiais lignocelulósicos presentes nas gramíneas, esta cristalinidade, em suma, é correlacionada principalmente pela quantidade de celulose do material, pois dentre os principais componentes vegetais a celulose possui o maior caráter cristalino, conforme já descrito por Kumar et al. (2009).

A cristalinidade é um fator importante para a acessibilidade às microfibrilas de celulose pelas enzimas de celulase e, assim, pode-se determinar a taxa de hidrólise (além do conteúdo de lignina e hemicelulose / distribuição de tamanho de partícula, porosidade da parede da célula (PARK et al, 2010)

Foram calculados os IC através dos difratogramas de Raio-X e pela equação sugerida por Seagal (1959). As setas indicam a localização aproximada dos ângulos nas fases cristalina de maior intensidade (22°) e amorfa de menor intensidade (18°).

Na Figura 51 constam todos os difratogramas das amostras vegetais, onde é possível perceber que os colmos das gramíneas estudadas e o bagaço de cana apresentaram maior intensidade no ângulo de 22° , seguidos das plantas inteiras na parte intermediária do gráfico e, logo abaixo, encontram-se as folhas dos materiais estudados, sendo a ordem da cristalinidade apresentada de forma decrescente.

Figura 51: Difratogramas das biomassas estudadas.

A Tabela 24 apresenta os valores encontrados de %IC para os materiais vegetais estudados e de acordo.

Tabela 24: Índices de Cristalinidade para as biomassas vegetais

Amostras	%IC
Bagaço de cana	54,67 ± 2,23
Sorgo - Colmo	51,65 ± 3,35
Sorgo - Folha	37,05 ± 3,09
Capim Mombaça - Planta Inteira	52,64 ± 3,89
Capim Mombaça - Folhas	44,41 ± 3,79
Capim Mombaça - Colmo	53,16 ± 4,75
Capim Marandu - Planta Inteira	48,14 ± 4,02
Capim Marandu - Folhas	33,51 ± 3,47
Capim Marandu - Colmo	50,88 ± 4,81
Capim-elefante - Planta Inteira	53,50 ± 1,98
Capim-elefante - Folhas	37,34 ± 1,41
Capim-elefante - Colmo	55,13 ± 2,05

A maior %IC encontrada dentre as amostras foi para o colmo de Capim-Elefante, seguido de bagaço de cana, colmo de Capim-Mombaça, colmo de Sorgo, colmo de Capim-Marandu. As plantas inteiras apresentaram um índice médio de 50%, tendo um destaque para a Planta inteira do Capim-elefante com 53,50%. Em comparação com os dados obtidos por RMN $^{13}\text{C}/\text{CP-MAS}$ e dos resíduos estudados o Capim-Elefante apresentou maior concentração de celulose, ou seja, em conformidade com a %IC encontrada. Os menores índices foram identificados para as folhas das gramíneas com uma média de 37%, com destaque para as folhas do Capim-Mombaça que apresentaram um índice de 44,41%.

Os colmos e o bagaço de cana apresentaram os maiores índices de cristalinidade que são caracterizados, principalmente, pela celulose presente nestas partes vegetais, seguido da planta inteira e das folhas, com o menor índice apresentado. As folhas por sua vez, apresentam maiores quantidades de óleos e cutina e uma menor quantidade de celulose, garantindo a estas partes vegetais um menor índice de cristalinidade.

A Figura 52 apresenta os difratogramas para o Sorgo Biomassa, onde percebemos que a maior intensidade de cristalinidade está localizada no colmo e a menor intensidade nas folhas. Comparando este difratograma com os resultados de resíduos e com o RMN $^{13}\text{C}/\text{CP-MAS}$ do colmo e folha do Sorgo, a intensidade de cristalinidade acompanha a tendência encontrada no colmo, estando coerente com as quantidades de celulose nesta parte vegetal.

Figura 52: Difrátogramas de Sorgo Biomassa, onde A: Colmo; B: Folhas.

Foi identificada a presença de um sinal/ ombro em 14,4° para todas as folhas das gramíneas, distinguindo do sinal encontrado nos colmos destas amostras, conforme evidenciado na Figura 53, sugerindo a identificação nesta região de um material nanoestruturado e cristalino derivado de sílica/ silicato, conforme observado por Balas, et al (2007) e Carmona, et al (2013). Estes resultados estão de acordo com os dados observados por FTIR e comparados com a quantidade de cinzas nestas partes vegetais.

Figura 53: Difrátogramas de Capim-Marandu, onde A: Colmo; B: Planta Inteira e C: Folhas.

Figura 54: Difrátogramas de Capim-Mombaça, onde A: Colmo; B: Planta Inteira e C: Folhas.

Figura 55: Difratomogramas de Capim-Elefante, onde A: Colmo; B: Planta Inteira e C: Folhas.

As Figuras 54 e 55 representam os difratogramas para as gramíneas Capim-Mombaça e Capim-Elefante respectivamente, onde as observações já discutidas anteriormente acompanham os comentários da Figura 54, com uma ressalva para o gráfico do Capim-Elefante, onde são observados dois ombros, sendo um em 14° e o outro em 24° , indicando a presença de materiais inorgânicos em fase cristalina.

4.11 – ANÁLISE MORFOLÓGICA UTILIZANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ACOPLADA COM DETECTOR DE ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA (MEV/EDS)

Juntamente com os estudos cristalográficos, utilizou-se como análise complementar e para uma maior caracterização das fases cristalinas a técnica de MEV/EDS que será apresentada no tópico a seguir, onde se constatou a presença de Cobre, Zinco, Potássio, Silício, Oxigênio, Cálcio, Cobre e outros elementos em menor proporção na superfície das gramíneas, os resultados são apresentados na Tabela 25.

Tabela 25: Resultados quantitativos para análise de EDS para folha de Capim-elefante.

Linha do Elemento	Contagem	Peso (%)	Átomo (%)
<i>C K</i>	374	2.40	4.15
<i>O K</i>	10795	54.29	70.58
<i>Mg K</i>	1304	2.10	1.80
<i>Al K</i>	527	0.64	0.50
<i>Si K</i>	14097	14.86	11.00
<i>P K</i>	653	0.70	0.47
<i>S K</i>	689	0.67	0.43
<i>Cl K</i>	2268	2.49	1.46
<i>K K</i>	6869	8.20	4.36
<i>Ca K</i>	3203	4.27	2.22
<i>Cu K</i>	840	4.18	1.37
<i>Zn K</i>	864	5.21	1.66
<i>Total</i>		100.00	100.00

A Tabela 25 apresenta a contagem destes elementos presentes na superfície da folha, bem como a porcentagem em peso de cada material. Os majoritários são Oxigênio, Silício e Potássio, seguidos de Zinco, Cálcio e Cobre. Embora o Silício e o Oxigênio estivessem em maiores proporções, não foi a fase que melhor se identificou no retículo cristalino.

Figura 56: Espectro de EDS para a amostra de folha de Capim-Elefante.

Comparando o espectro de EDS e a Tabela 25 com o gráfico de distribuição de fases dos materiais (Figura 57), foi possível identificar a fase que melhor se comportou com o difratograma das folhas do Capim-Elefante. A melhor fase identificada para o retículo cristalino presente no material foi o Sulfato de Potássio e Cobre Hexahidratado – $K_2Cu(SO_4)_2 \cdot (H_2O)_6$. Embora o software tenha indicado este composto cristalino era de se esperar um material composto, também, por silicatos, por estar presente em grande quantidade nos materiais estudados. No entanto pode-se indicar que os silicatos presentes nos materiais estudados não se encontram na forma cristalina e, sim, na forma amorfa.

Figura 57: Gráfico de distribuição de fase para as folhas de Capim-Elefante - Sulfato de Potássio e Cobre Hexahidratado - $K_2Cu(SO_4)_2 \cdot (H_2O)_6$.

A folha do Capim-Elefante foi escolhida porque apresentou em seu difratograma picos com maior relevância e significância, mantendo o comportamento das folhas das gramíneas estudadas. A melhor fase encontrada foi identificada com o código nº 01-086-0760 do banco de dados da biblioteca do programa “*Match!*”.

Para complementação da identificação dos materiais presentes na superfície das folhas utilizamos da ferramenta EDS que estava acoplada ao MEV.

Figura 58: Espectro de EDS para a amostra de folha de Capim-Mombaça.

O espectro de EDS para a folha de Capim-Mombaça apresentou maiores intensidades para os sinais de Oxigênio, Silício, Cobre, Potássio e Cálcio, respectivamente, conforme observado na Tabela 26.

Tabela 26: Resultados quantitativos para análise de EDS para folha de Capim-Mombaça.

Linha do Elemento	Contagem	Peso (%)	Átomo (%)
<i>C K</i>	234	2.57	4.33
<i>O K</i>	6979	56.94	72.02
<i>Mg K</i>	944	2.46	2.04
<i>Al K</i>	309	0.62	0.46
<i>Si K</i>	8167	14.18	10.22
<i>S K</i>	627	1.00	0.63
<i>Cl K</i>	2492	4.56	2.60
<i>K K</i>	2908	5.88	3.04
<i>Ca K</i>	2139	4.78	2.41
<i>Cu K</i>	832	7.02	2.24
<i>Total</i>		100.00	100.00

Figura 59: Espectro de EDS para a amostra de folha de Capim-Marandu.

O espectro de EDS para a folha de Capim-Marandu apresentou maiores intensidades para os sinais de Oxigênio, Silício, Cobre, Magnésio e Potássio, respectivamente, conforme observado na Tabela 27.

Tabela 27: Resultados quantitativos para análise de EDS para folha de Capim-Marandu.

Linha do Elemento	Contagem	Peso (%)	Átomo (%)
<i>C K</i>	215	2.48	4.28
<i>O K</i>	7085	52.30	67.87
<i>Mg K</i>	2060	5.03	4.30
<i>Al K</i>	328	0.64	0.49
<i>Si K</i>	10514	17.65	13.05
<i>P K</i>	501	0.89	0.59
<i>Cl K</i>	2092	3.69	2.16
<i>K K</i>	2569	4.90	2.60
<i>Ca K</i>	1557	3.24	1.68
<i>Cu K</i>	720	5.61	1.83
<i>Zn K</i>	377	3.56	1.13
<i>Total</i>		100.00	100.00

As imagens de MEV das amostras de folhas e colmos das gramíneas (Figuras 60 a 70) apresentaram diferenças morfológicas. As folhas apresentam depósitos sedimentados na sua superfície proveniente de ceras e óleos, além de rugosidades, idênticas de material estriado e certos materiais destas partes vegetais possuem pilosidades, também conhecidos como tricomas, como o Capim-Elefante e observado por Chaves et al (2002). Os tricomas podem possuir funções distintas como proteção contra predadores, liberação de substâncias desagradáveis, urticantes, regulação de umidade e aumento da absorção de água.

Conforme já citado, as gramíneas possuem como macronutriente a sílica, em muitos casos é amorfa, para estas folhas de gramíneas não descartamos a presença de sílica (LIMA, 2013).

Figura 60: Micrografia da folha do Capim-Elefante com pilosidade/tricomas (a) e estrutura estriada da fibra vegetal – vista frontal (b) – 200X.

Figura 61: Micrografia da folha do Capim-Elefante – corte transversal. Esclerênquima (E) - 7000X e 1000X.

A Figura 61a apresenta a organização interna da folha do Capim-Elefante, a espessura das paredes celulares vegetais varia de 0,2-0,5 μm e o diâmetro dos anéis de esclerênquima medem aproximadamente 6 μm . A Figura 61b apresenta a fratura da medula com o vaso condutor (halo) rodeado por células delgadas do esclerênquima (E) ricas em lignina e celulose.

A Figura 62 possibilita a identificação um tecido formado por células de menor espessura denominadas de parênquima (P), que é constituído por células geralmente poliédricas e isodiamétricas e com vacúolo possuindo funções para, preenchimento, transporte de líquidos e gás, além de servir como uma reserva de nutrientes e uma região onde os feixes vasculares permanecem envoltos (E) (LOPES, 2008).

A Figura 63c apresenta uma imagem mais aproximada da estrutura interna do feixe condutor presente na medula do Capim-Elefante. Nota-se a presença de poros que servem de ductos entre os vasos condutores.

Figura 62: MEV de Estrutura de colmo do Capim-Elefante – Células vegetais hexagonais de parênquima (a) - 200X; em (b) halos indicados pelas setas (V) são vasos condutores envolvidos por células vegetais de esclerênquima (E) e parênquima (P) - 500X; (c) poro no interior do vaso condutor (V) – 7000X; (d) Estrutura de colmo vista lateral das células vegetais – 200X; (e) parte externa do colmo recoberta com cera e sílica – 500X.

As células vegetais de parênquima nos colmos de Capim-Elefante apresentam um diâmetro médio de 50 μm e os vasos condutores em torno de 70 μm .

As folhas do Capim-Marandu apresentam, também, em sua superfície ceras, silica e pilosidades, conforme Figura 63a e 63b.

Figura 63: MEV de Folha de Capim-Marandu, (a) vista frontal da estrutura estriada – 200X; (b) superfície composta por pilosidade – 100X; (c) corte transversal da folha com destaque para os vasos condutores – 500X; (d) estrutura base das folhas, onde a seta indica um vaso condutor – 1000X; (e) estrutura na forma de rede anelar e delgada da parte interna de um vaso condutor – 3000X; e (f) esclerênquima – 7000X.

Os colmos do Capim-Marandu apresentam grandes quantidades de células de parênquima em formato hexagonal (P), conforme Figura 64 (b) e (c).

Figura 64: MEV de Corte lateral de estrutura de colmo do Capim-Marandú e microfibrilas em (a); Parte interna do colmo, indica um vaso condutor (V), a presença de colênquima (Co) e parênquima (P), na parte superficial da epiderme há presença de pilosidade conforme (b); células de parênquima presentes no colmo (c); e em (d) paredes celulares vegetais do parênquima, espessura de 125 nm.

O colênquima (Co) é uma estrutura localizada logo abaixo da epiderme, constituído principalmente por celulose e pectina, possui função de sustentação e plasticidade mecânica (LOPES, 2008).

A estrutura interna das plantas consiste em feixes vasculares e microporos nas paredes de celulose dos vasos condutores, onde são utilizados para a ventilação e metabolismo (THEERARATTANANOON, 2012; LIMA, 2013).

As folhas de Capim-Mombaça apresentam em sua superfície uma camada de cera e sílica (Figura 65a), conforme já observado nas outras plantas, no entanto, não apresenta

pilosidade. Foram identificadas células vegetais de parênquima em menor quantidade quando comparado com as folhas de Capim-Elefante e do Capim-Mombaça, conforme observado na Figura 65b, contendo poros na ordem de 10 μm de diâmetro.

Figura 65: MEV (a) vista frontal da estrutura foliar – 500X; (b) parte interna da folha com presença de vasos condutores, parênquima e esclerênquima – 500X; (c) e (d) esclerênquima presente na folha – 3000X e 7000X, espessura das paredes em torno de 2 μm .

Figura 66: MEV de Estruturas externas do colmo de Capim-Mombaça – presença de ceras (a) – 200X e microcristais de sílica – 7000X(b).

Figura 67: MEV (a) feixes de fibras das células presentes nos colmos de Capim-Mombaça, vista lateral – 200X; (b) vista superior das microfibrilas presentes nos colmos – 200X; (c) corte transversal do colmo, presença de esclerênquima esponjoso indicado pela seta, vasos condutores e parênquima – 200X; (d), (e) e (f) estruturas anelares helicoidais dos vasos condutores com diâmetro de 11 μm e espessuras das microfibrilas das paredes de 1 μm .

A estrutura externa do colmo apresentou uma quantidade considerável de cera e sílica, a parte interna dos colmos do Capim-Mombaça apresentou certa diferenciação quando comparado com as estruturas das gramíneas já revisitadas. O esclerênquima é do tipo esponjoso observado em outras estruturas de gramíneas conforme relatado por

Ghavami e Marinho (2004) e os feixes de vasos condutores apresentam estruturas na forma anelar e justaposta.

A Figura 68 apresenta a estrutura existente nas folhas do Sorgo biomassa, com destaque para a presença de ceras, parênquima esponjoso e vasos condutores com anéis helicoidais, conforme observado anteriormente no Capim-Mombaça.

Figura 68: MEV (a) Vista frontal da folha de Sorgo, com aglomerados de cera – 500X; (b) aglomerados de cera na epiderme; (c) corte transversal da folha indicando presença de esclerênquima esponjoso (E) envolta dos feixes de vasos condutores (V); (d) e (e) feixes de vasos condutores com espessura de 1µm.

Figura 69: MEV com corte lateral dos feixes de fibras presentes no colmo de Sorgo em (a) – 200X; (b) vista superior do corte transversal da medula com vasos condutores (V), esclerênquima (E) e parênquima (P) – 200X; (c) organização do parênquima – 500X e (d) organização do esclerênquima esponjoso – 7000X.

Os colmos do Sorgo apresentam certa quantidade de vasos condutores na região central da medula, sendo esta envolta por células de esclerênquima e parênquima. As fibras existentes na camada externa do colmo organizam-se na direção longitudinal, conforme observado na Figura 69a. Na Figura 69d é possível identificar o esclerênquima composto em sua maioria por células mortas e rico em lignina.

A Figura 70 apresenta a estrutura do bagaço de cana estudado. A imagem 70a foi extraída da tese de Rodríguez-Zúñiga (2010) que desenvolveu pesquisa utilizando o bagaço de cana in natura.

Figura 70: (a) Vista da superfície da amostra de bagaço de cana (colmo) – 2.500X e (b) amostra de bagaço de cana moída com fibras fraturadas – 500X.

As imagens da superfície do bagaço de cana aproximam-se das obtidas do colmo do Sorgo com os feixes de fibras sobrepostas 70a e presença de sílica e ceras sobre a superfície 70b.

As imagens das gramíneas proporcionaram informações esclarecedoras do ponto de vista estrutural das amostras, as quais são altamente planejadas afim de prover uma melhor organização interna, o arranjo compacto pode dificultar o acesso do agente hidrolisante a esta estrutura, também observado por Lovezutti et al., (2013). Ressalta-se ainda que as amostras analisadas não haviam passado por nenhum tipo de pré tratamento e portanto mantinham suas fibras sem maiores alterações. Talvez seja necessária uma limpeza prévia dos materiais para a retirada do excesso de cera, óleos e gorduras, que provavelmente dificultarão o acesso das enzimas ao material, quando do processamento da biomassa por hidrólise catalítica.

5 – CONCLUSÕES

As diferentes fontes vegetais estudadas são parecidas quando comparamos a origem das matrizes, pois são todas gramíneas. No entanto as diferenças surgem no âmbito estrutural e de composição de cada material, podendo diferenciar as partes de cada vegetal como as folhas e os colmos.

Do ponto de vista morfológico, em uma avaliação qualitativa, não foram observadas diferenças com relação às diferentes plantas estudadas. Estas diferenças são claras, quando se observa colmo e folha. Os colmos apresentam estruturas internas organizadas e presença de vasos condutores, enquanto a parte externa uma camada de revestimento por ceras. Já as folhas apresentam estrutura com pouca vascularidade e são revestidas por óleos. A análise de EDS indicou a maior presença de silicatos nas folhas.

A caracterização química mostrou poucas diferenças na composição geral dos materiais (celulose, hemicelulose, lignina e inorgânicos), quando analisados na sua totalidade. Quando comparadas as partes de cada vegetal, os colmos apresentaram maiores teores de celulose, hemicelulose e lignina, enquanto as folhas apresentaram maiores valores de cinzas, indicando maior quantidade de inorgânicos. Na média, os resultados mostraram que os colmos têm 6,5 % a mais de celulose, comparados com as folhas. As análises por espectroscopia de RMN dos materiais sem tratamento prévio, mostraram esta mesma tendência. Entretanto, apesar das folhas possuírem um menor teor de celulose, os difratogramas obtidos por DR-X, essas mostraram menores índices de cristalinidade, fato este que pode indicar um maior acesso das enzimas hidrolíticas, com maior eficiência da produção de açúcares fermentáveis.

Apesar dos materiais estudados necessitarem ainda de uma amostragem mais abrangente, pelas similaridades observadas, fica claro que o mesmo processo industrial é passível de se aplicado na hidrólise da celulose, independentemente do tipo de gramínea. Se forem separadas as folhas dos colmos, provavelmente as eficiências deverão ser diferentes. Desta forma, fica clara a continuidade do trabalho no sentido de que sejam realizados ensaios de fermentação com estas fontes vegetais, utilizando enzimas específicas, para que se possa testar a hipótese descrita acima.

6- REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M.N. Celulases e hemicelulases de espécies endofíticas de *Acremonium*. Tese de Mestrado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa. Brasil. 2009.
- AOUADA, F.A.; DE MOURA, M.R.; DA SILVA, W.T.L.; MUNIZ, E.C.; MATTOSO, L.H.C. Development and characterization of pH- and ionic-strength sensitive hydrogels based on polyacrylamide and methylcellulose for use in controlled release of pesticides. *Journal of Applied Polymer Science*, 2009.
- AIKEN, G.; COTSARIS, E. Soil and Hydrology: their effect on NOM. *Journal american Water Works Association*. p. 36-45. 1995.
- ARIN, G.; DEMIRBAS, A. Mathematical modeling the relations of pyrolytic products from lignocellulosic materials. *Energy Sources*. v.26:p.1023–1032, 2004.
- ATALLA, R. H.; GAST, J. C.; SINDORF, D. W.; BARTUSKA, V. J.; MACIEL, G. E. The ¹³C NMR Spectra of cellulose polymorphs. *The Institute of paper chemistry*. Appleton. Wisconsin. IPC technical paper series. n.90. 1980.
- ATALLA, R.H.; VANDERHART, D.L. In *Native Cellulose: A Composite of Two Distinct-Crystalline Forms*. *SCIENCE*, Vol 223, 1983.
- ATALLA, R.H.; ISOGAI, A. Recent Developments in Spectroscopic and Chemical Characterization of Cellulose. In: Dumitriu, S. *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility*. Second Edition. Marcel Decker. 123-157. 1998.
- ATALLA, R.H.; VANDERHART, D.L. The role of solid state ¹³C NMR spectroscopy in studies of the nature of native celluloses. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. vol 15. P 1-19. 1999.
- AWADEL-KARIM, S.; NAZHAD, M. M.; PASZNER, L. Factors Affecting Crystalline Structure of Cellulose during Solvent Purification Treatment. *Holzforschung*, v. 53, p. 1–8. 1999.
- AYRES, M. Embrapa avalia novas fontes para produzir etanol. *Embrapa Cerrados*. Notícia completa. 2010.

BALAS, F.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M.; OTERO-AREAN, C.; CONDEA, F.; MATESANZ, E.; ESQUIVIAS, L.; RAMÍREZ-CASTELLANOS, J.; GONZALEZ-CALBET, J.; VALLET-REGÍ, M. Structural characterization of nanosized silica spheres. *Solid State Sciences*. Volume 9. p351–356. 2007.

BALOGH, D.T., CURVELO, A.A.S., GROOTE, R.A.M.C. Solvent effect on organosolv lignin from *Pinus caribaea hondurensis* (part I). In: *BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS*, 1, 1989, São Carlos. Proceedings. São Carlos. Universidade de São Paulo, p.313-320, 1989.

BANSAL, P.; HALL, M.; REALFF, M. J.; LEE, J.H.; BOMMARIUS, A S. Multivariate statistical analysis of X-ray data from cellulose: A new method to determine degree of crystallinity and predict hydrolysis rates. *Bioresource Technology*. Vol. 101, Pag 4461–4471. 2010

BENITES, V.M.; MENDONÇA, E.S.; SCHAEFER, C.E.R.; MARTIN NETO, L. Caracterização dos ácidos húmicos extraídos de um Latossolo Vermelho-Amarelo e de um Podzol por análise termodiferencial e pela espectroscopia de absorção no infravermelho. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. Viçosa, v.23, p.543-551. 1999.

BIANCHI, M. L. Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolve.. Dissertação de Mestrado em Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 76p, 1995.

BIOFUELS – Biofuels European. 2012. Disponível em:
http://www.biofuelstp.eu/cell_ethanol.html#cel. Acesso em 09Ago2013.

BOTTA, F. W.J.; JORGE, J. A.M. Microscopia Eletrônica de Varredura e sua utilização na resolução de problemas industriais. Apostila. Curso da Associação Brasileira de Metalurgia e Materiais – ABM). São Paulo. 2002.

BRASIL - Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social – BNDES. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável / organização. Rio de Janeiro, 2008

BRASIL – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Banco de dados agregados.SIDRA. 2007. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acessado em 08Mar2011.

BRASIL – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Banco de dados agregados. SIDRA. 2014. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em 14Abr2014.

BRASIL – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Serviços e Sistemas. Animal e Vegetal. 2014. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal>>. Acesso em 14Abr2014.

BRASIL – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Política Agrícola. 2006. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/politica-agricola>>. Acesso em 14Abr2014.

BRASIL – Petróleo Brasileiro S.A. – PETROBRÁS. Produção de biocombustíveis. 2012. Disponível em: <<http://www.tecnologiaetanol2g.com.br/site/home.php>> . Acesso em 22Set2013.

BRAVARD, S.; RIGHI, D. Characterization of fulvic and humic acids from an oxisol-spodosol toposequence of amazonia, Brazil. *Geoderma*, vol. 48. p151-162. 1991.

BRUM, S.S. Caracterização e modificação química de resíduos sólidos do beneficiamento do café para produção de novos materiais . Dissertação. Lavras.UFLA, 138p. 2007.

BUCKERIDGE, M. S. Aulas teóricas. Meristemas. Instituto de Biociências, Departamento de Botânica. Universidade de São Paulo - USP, 2012.

BUDNY, D. e SOTERO, P. Brazil Institute Special Report: The Global Dynamics of Biofuels. Brazil Institute of the Woodrow - Wilson Center. 2008. Disponível em <<http://www.wilsoncenter.org/program/brazil-institute>>. Acesso em 08Ago2013.

CANETTIERI, E.; ROCHA, G.J.M.; DE CARVALHO, J.R.; SILVA, J.B.A. Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of the Eucalyptus grandis residue using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* Vol 98, p422–428. 2007.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*. v. 101, p. 4754–4766, 2010.

CARMONA, V. B.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, W. T. L.; MATTOSO, L. H. C.; MARCONSINI, J. M. Nanosilica from Rice husk: extraction and Characterization. *Industrial Crops and Products* 43, 291– 296. 2013.

CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CARVALHO, E.R.; MARTIN-NETO, L.; MILORI, D.M.B.P.; ROCHA, J.C.; ROSA, A.H. Interactions of chlorine with tropical aquatic fulvic acids and formation of intermediates observed by fluorescence spectroscopy. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, n. 53, p. 421. 2004.

CENNATEK. Feasibility of improving biomass combustion though extraction of nutrients. 2011. Disponível em:

<http://www.ofa.on.ca/uploads/userfiles/files/improving_biomass_combustion_%20%20%20nutrient_extraction-2_raac.pdf>. Acesso em: 01jul2013.

CHAVES, A. L. F.; SILVA, E. A. M.; AZEVEDO, A. A.; CANO, M. A. O.; MATSUOKA, K. Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* jacq. (colonião) e *Chloris gayana* kunth. (capim-rhodes) – Poaceae. *Acta Bot. Bras.* vol.16 no.4 São Paulo. 2002.

CHRISTOPHER, L. P.; YAO, B.; JI, Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. Vol. 2. Art.12. *Front. Energy Res.*, 2014.

CHUNILALL, V.; BUSH, T.; LARSSON, P. T. Supra-Molecular Structure and Chemical Reactivity of Cellulose I Studied Using CP/MAS ¹³C-NMR. *Cellulose. Fundamental Aspects*. Intek Science. 2013.

COLLINS, C. H. & GUIMARÃES, L. F. L., Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins, C. H. & Braga, G. L.; *Introdução a Métodos Cromatográficos*, 3. ed., Ed. UNICAMP, São Paulo, p 179 – 243.1988.

CONRAD, J. H.; McDOWELL, L. R.; ELLIS, G. L. Minerais para ruminantes em pastejo em regiões tropicais. Campo Grande: CNPGC/EMBRAPA. 90 p. 1995.

CORREDOR, D.Y. et al. Evaluation and Characterization of Forage Sorghum as feedstock for Fermentable Sugar Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 158, pp. 164-179. 2009.

CURVELO, A. A. S. Processo de deslignificação organossolve. 94f. Tese (Livre Docência. Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 94p, 1992.

CUTTER, E.G. Anatomia Vegetal. Parte I - Células e Tecidos. 2ª ed. Roca. São Paulo. 1986.

CUTTER, E.G. Anatomia Vegetal. Parte II - Órgãos. Roca. São Paulo. 1987.

DAVIS, J. B.; RIGNALL, T.; HIMMEL, M. Changes in cellulose morphology of pretreated yellow poplar during enzymatic hydrolysis. National Bioenergy Center. National Renewable Energy Laboratory. U.S. Department of Energy by Midwest Research Institute. Battelle Bechtel. 2010.

DELABONA, P.S., FARINAS C.S., DA SILVA, M., AZZONI S., PRADELLA, J.G.C., Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresource Technology*, vol. 107, p.517-521, 2012.

DENCE, C. W. The de termination of lignin,” In: *Methods of Lignin Chemistry*, Lin, S. Y., and Dence, C. W. Springer-Verlag, Berlin, 33-61. 1992.

DIAS, F. J.; JOBIM, C. C.; CECATO, U.; BRANCO, A. F. SANTELLO, G. A. Composição química do capim-mombaça (*Panicum maximum* cv. Mombaça) adubado com diferentes fontes de fósforo sob pastejo. *Acta Sci. Anim. Sci. Maringá*, v. 29, n. 1, p. 9-16. 2007.

ELANTHIKKAL, S.; GOPALAKRISHNAPANICKER, U.; VARGHESE, S.; GUTHRIE, J. T. Cellulose microfibrils produced from banana plant wastes: isolation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 80, p852–859. 2010.

ERENO, D. Álcool de celulose. Revista Pesquisa FAPESP, Edição 133, Março, 2007.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRICKSSON, G. Pulp and paper chemistry and technology, wood chemistry and wood biotechnology. De Gruyter. Berlin, p.1-320, 2009.

FAO – Food and agriculture organization. Nações Unidas. Ethanol production from sweet sorghum. 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/T4470E/t4470e07.htm>>.

Acesso em 20/06/2011.

FARINAS, C.S.; MARTIN-NETO, L.; GIORDANO, R.C. Instrumentação e Automação na Agroindústria da Cadeia Cana-Etanol. In: Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. Editora Blucher, São Paulo, 2010.

FACEY, G. A. NMR Facility Manager. Department of Chemistry. University of Ottawa. Marie Curie Private. Ottawa, Ontario. Canada. Disponível em: <<http://u-of-o-nmr-facility.blogspot.com.br/search?q=LINE+BROADENING>>. Acessado em 04Dez2014.

FEI Company. Introduction to Electron Microscopy. 15p. 2012. Disponível em:

<http://www.fei.com>. Acesso em 10Jul2013.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastucture, reactions. New York: Walter de Gruyter, 613p., 1984.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood Chemistry, Ultrastructure, reactions, Walter de Gruyter, Berlin. 1989.

FERNANDES, L. et al. In vitro wood decay of *Eucalyptus grandis* by the basidiomycete fungus *Phellinus flavomarginatus*. International Biodeterioration & Biodegradation.

London, v. 55. p. 187-193. 2005.

FILHO, F. B. B.. Cadernos do CEAM /Energia e Biomassa . Universidade de Brasília – UNB. Centro de Estudos Avançados Multidisciplinares. Núcleo de Estudos Agrários – Brasília V. 8. N. 33, 2008.

FISHER, J. Wood pellets-best practice, market potential and perspectives. German Finnish Workshop on Renewable Energy Technology. Jyväskylä. Germany. 2005.

FLORES, R. A; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; COLLIER, L. S.; MORAIS, R. F.; PRADO, R. M. Adubação nitrogenada e idade de corte na produção de matéria seca do capim-elefante no Cerrado. *Rev. bras. eng. agríc. ambient.* vol.16 n.12. 2012.

FORBES. 2012. Disponível em:

<<http://www.forbes.com/sites/williampentland/2012/07/28/the-coming-food-crisis-blame-ethanol/>>. Acesso em 13Jun2012.

FRANÇA, A.F.S.; BORJAS, A.L.R.; OLIVEIRA, E.R.; SOARES, T.V.; MIYAGI, E.S. Parâmetros nutricionais do capim-tanzânia sob doses crescentes de nitrogênio em diferentes idades de corte. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v.8, p.695-703. 2007.

FREITAS, K. R.; ROSA, B.; NASCIMENTO, J. L.; BORGES, R.T.; BARBOSA, M. M.; SANTOS, D. C. Composição química do capim-mombaça (*Panicum maximum*) submetido à adubação orgânica e mineral. *Ci. Anim. Bras. Goiânia.* v.12, n.3, p. 407-414. 2011.

FUKUSHIMA, R. S.; DOHORITY, B. A. Feasibility of using lignin isolated from forages by solubilization in acetyl bromide as a standard for lignin analysis. *Journal of Animal Science*, v. 78, p. 3135- 3143. 2000.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Extraction and isolation of lignin and its utilization as a standard to determine lignin concentration through a spectrophotometric method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 3133-3139. 2001.

FUKUSHIMA, R. S.; SAVIOLI, N. M. F. Correlação entre digestibilidade in vitro da parede celular e três métodos analíticos para a avaliação quantitativa da lignina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 2, n 2, p. 302-309. 2001.

FUN, M.; DAI, D.; HUANG, B. Fourier Transform Infrared Spectroscopy for natural fibres. *Fourier Transform. Material Analysis*. Dr. Salih Salih. InTech. 2012.

GASTALDI, G.; CAPRETTI, G.; FOCHER, B.; COSENTINO, C. Characterization and properties of cellulose isolated from the *Crambe abyssinica* hull. *Ind. Crops. Prod.* Vol. 8, p205-218. 1998.

- GHAVAMI, K; MARINHO, A. B. Propriedades físicas e mecânicas do colmo inteiro do bamboo da espécie *Guadua augustifolia*. Revista brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. V. 9, n.1, p107-114. 2005.
- GIACOVAZZO, C. ; MONACO, H. L.; VITERBO, D.; SCORDARI, F.; GILLI, G.; ZANOTTI, G.; CATTI, M. International Union of Crystallography. Oxford University Press. Ed. Xv, 654p. Oxford. 1992.
- GILBERT, C.; KOKOT, S.; MEYER, U. Application of DRIFT spectroscopy and chemometrics for the comparison of cotton fabrics. Appl. Spectrosc. p741-748. 1993.
- GIMENES, F. M. A.; SILVA, S. C.; FIALHO, C. A.; GOMES, M. B.; BERNDT, A.; GERDES, L.; COLOZZA, M. T. Ganho de peso e produtividade animal em capim-Marandu sob pastejo rotativo e adubação nitrogenada. Pesq. agropec. bras. Brasília, v.46, n.7, p.751-759. 2011.
- GOMES, E.; AGUIAR, A.P.; CARVALHO, C.C.; BONFÁ, M.R.B.; DA SILVA, R. and BOSCOLO, M. Ligninases production by Basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. Brazilian Journal of Microbiology, vol. 40, no. 1, p. 31-39. 2009.
- GOUVEIA, E.R., NASCIMENTO, R.T., SOUTO-MAIOR, A.M. Validação de Metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. Química Nova, Vol. 32, Nº 6, 1500-1503, 2009.
- GUO, G.L.; CHEN, W.H.; CHEN, W.H.; MEN, L.C.; HWANG, W.S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. Bioresource Tech 99(14), p 6046-6053. 2008.
- GÜMÜŞKAYA, E.; USTA. M. Dependence of chemical and crystalline structure of alkali sulfite pulp on cooking temperature and time. Carbohydrate polymers, v. 65, p. 461-468. 2006.
- GURGEL, L. V. A. Mercerização e modificação química de celulose e bagaço de cana-de-açúcar com anidrido succínico e trietilenotetramina: preparação de novos materiais quelantes para a adsorção de Pb(II), Cd(II), Cr(VI) e Cu(II). Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Ouro Preto. 180 f. 2007.

HACKNEY, J. M.; ATALLA, R. H.; VANDERHART, D. L. Crystalline structure of *Acetobacter xylinum* cellulose in the presence of water-soluble/Y-1,4-linked polysaccharides: ¹³C-NMR evidence. *Int. J. Biol. Macromol.* Volume 16, Number 4. 1994.

HANNA, W.W.; MONSON, W.G.; BURTON, G.W. Leaf surface effects on in vitro digestion and transpiration in isogenic lines of sorghum and pearl millet. *Crop Science*, v.14, p.837-838, 1974.

HAYASHI N., et al. Selective degradation of cellulose I α component in *Cladophora* cellulose with *Trichoderma viride* cellulase. *Carbohydrate Research*. vol.305, p.109-116. 1998.

HATFIELD, R.D.; JUNG, H.J.G.; RALPH, J. et al. A comparison of the insoluble residues produced by klason lignin and acid detergent lignin procedures. *Journal of Science Food Agriculture*, v.65, p.51-58. 1994.

HALTTUNEN, M.; VYÖRYKKÄ, J.; HORTLING, B.; TAMMINEN, T.; BATCHELDER, D.; ZIMMERMANN, A.; VUORINEN, T. Study of residual lignin in pulp by UV resonance Raman spectroscopy. *Holzforschung*. Vol. 55. p631-638. 2001.

HEITNER, C.; DIMMEL, D.; SCHMIDT, J. A. Lignin and lignans advances in chemistry. Boca Raton: Taylor & Francis, 2010. 629 p.

HENG, P.W.S.; KOO, O.M.Y.. A study of the effects of the physical characteristics of microcrystalline cellulose on performance in extrusion spheronization. *Pharmaceutical Research*, v.18, n.4, p. 480-487. 2001.

HERRMANN, K.; GERNGROSS, O.; ABITZ, W.. Zur röntgenographischen Strukturforschung des Gelatinemicells. *Zeitschrift für Physikalische Chemie B*. v. 10. p.371–394, 1930.

HERNANDEZ, T.; MORENO, J.I.; COSTA, F. Infrared spectroscopic characterization of sewage sludge humic acids. Evidence of sludge organic matter-metal interactions. *Agrochimica*, v. 37, p. 12-17. 1993.

HERZOG, R.O.; JANCKE, W.; POLANYI, M.. Röntgenspektrographische Beobachtungen an Zellulose. II. v.3, p.343–348. 1920.

HERZOG, R.O.; JANCKE, W.. Röntgenspektrographische Beobachtungen an Zellulose. Zeitschrift für Physikalische, v. 3. p.196–198. 1920a.

HERZOG, R.O.; JANCKE, W.. Über den physikalischen Aufbau einiger hochmolekularer organischer Verbindungen. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, v. 53. p.2162–2164. 1920b.

HIGGINS, H. G.; STEWART, C. M.; HARRINGTON, K. J. Infrared spectra of cellulose and related polysaccharides. J. Polym. Sci., vol 51. p59–84. 2003.

HOWARD, R. L., ABOTSI, E., JANSEN VAN RENSBURG, E. L., HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. African Journal of Biotechnology, vol. 2, p602-619, 2003.

HULT, E.L.; LARSSOM, P. T.; IVERSEN, T. A comparative CP/MAS ^{13}C NMR study of cellulose structure in spruce wood and kraft pulp. Cellulose. Vol.7, p35-55. 2000.

ICDCA – Instituto Cubano de Investigaciones de los derivados de la caña de azúcar. Manual de los derivados de la caña de azúcar. México: CEPLACEA, 447p, 1990.

JELINSKI, L.W.; MELCHIOR, M.T. High-Resolution NMR of solids. Applied Spectroscopy Reviews, v. 35. p. 25-93. 2000.

JUNG, H.J.G.; HIMMELSBACH, D.S. Isolation and characterization of wheat straw lignin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 37, p. 81-87. 1989.

JUNG, H.G., MERTENS, D.R.; PAYNE, A.J. Correlation of acid detergent lignin and Klason lignin with digestibility of forage dry matter and neutral detergent fiber. J. Dairy Sci. vol 80, p1622-1628. 1997.

LICHTS, F.O. The global ethanol market continues to expand at a rapid pace. World Ethanol & Biofuels Report, 2008.

LIMA FILHO, O. F.; GROTHGE-LIMA, M. T.; TSAI, S. M. Supressão de patógenos em solos induzida por agentes abióticos: o caso do silício. *Informações Agronômicas*, v. 87, p. 8-12.1999.

LIMA, M. A. Caracterização bioquímica e biofísica da enzima B-glicosidade bg11 de *Aspergillus niger* e avaliação de potenciais biomassas para produção de Bioetanol. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular. IFCS. Universidade de São Paulo.249p. 2013.

LINCOLN ,T.; ZEIGER, E. Secondary Metabolites and Plant Defense". Em: *Plant Physiology*, Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Capítulo 13. 2006.

LIU, R., YU, H., HUANG, Y. Structure and morphology of cellulose in wheat straw. *Cellulose*. Vol. 12, p25-34. 2005.

LIU, Z.; FEI, B. Characteristics of Moso Bamboo with Chemical Pretreatment. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*. China. 2013.

LOPES, S. G. B. C. . Bio Volume único. 2. ed. Saraiva, v. 1. 860 p. 2008.

LOVEZUTTI, B; MARTELLI, F. H.; DA SILVA, W. T. L. Caracterização físico-química e morfológica de biomassa de Capim-Elefante, Capim-Mombaça. *Brachiaria, Sorgo Embrapa e Bagaço de cana-de-açúcar. III Symposium on Agricultural and Agroindustrial Waste Management*. São Pedro, SP. Brasil. 2013.

KATAOKA, Y.; KONDO, T. FT-IR Microscopic Analysis of Changing Cellulose Crystalline Structure during Wood Cell Wall Formation. *Macromolecules*. Vol 31. p 760-764. 1998.

KAUSHIK, A.; SINGH, M. Isolation and characterization of cellulose nanofibrils from wheat straw using steam explosion coupled with high shear homogenization. *Carbohydrate Research*. 346(1), 76-85. 2011.

KELLER, F.A.; HAMILTON, J.E.; NGUYEN, Q.A. Microbial pretreatment of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.105–108, p. 27–41, 2003.

KEPPLER, F; HAMILTON, JT; BRASS, M; RÖCKMANN, T . "Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions". Nature vol. 439, 2006.

KESTENBACH, H. J.; NOCITE, N. C. P. S.; FILHO, R. G.; LOOS, J.; PETERMANN, J. Resolução Lamelar num Novo Microscópio Eletrônico de Varredura. Polímeros: Ciência e Tecnologia. 1997.

KLASON, P. Svensk Papperstidn, vol. 26. 319p. 1923.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. Angewandte Chemie International Edition. v. 44, n. 22, p. 3358-3393.2005.

KLOCK, U. et al. Química da madeira. 3.ed. Curitiba. 86p. Apostila. 2005.

KONDO, T.; MIZUNO, K.; KATO, T. Some characteristics of forage plant lignin. Japanese Agricultural Research Quarterly, Tsukuba, v. 21, p. 47-52. 1987.

KONO, H.; YUNOKI, S.; SHIKANO, T.; FUJIWARA, M.; ERATA, T.; TAKAI, M. CP/MAS (13)C NMR study of cellulose and cellulose derivatives. Complete assignment of the CP/MAS (13)C NMR spectrum of the native cellulose. J Am Chem Soc. Vol 124. 2002.

KUMAR, R.; MAGO, G.; BALAN, V.; WYMAN, C.. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. Bioresource Tech. 100, 3948-3962. 2009.

LENGOWSKI, E. C. Caracterização e predição da cristalinidade de celulose através de espectroscopia no infravermelho e análise multivariada. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. 73 f. 2012..

LIN, S. Y. Ultraviolet Spectrophotometry, In: Methods of Lignin Chemistry, Lin, S. Y. and Dence, C. W. Springer-Verlag, Berlin, 217-232. 1992.

LIU, R.; YU, H., HUANG, Y. Structure and morphology of cellulose in wheat straw. Cellulose. Vol 12, p25-34. 2005.

LOWRY, J.B., CONLAN, A.C., SCHLINK, A.C. et al. Acid detergent dispersible lignin in tropical grasses. *J. Sci. Food Agric.*, 65:41-49. 1994

LU, Y.; YANG, B.; GREGG, D.; SADDLER, J. N.; MANSFIELD, S. D.; *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 98, p641, 2002.

PAULA, L. E. R. Produção e avaliação de briquetes de resíduos lignocelulósicos. Dissertação. Lavras. UFLA, 72p. 2010.

MANSUR, H. S. et al., Lignin-Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate Biocomposites: SEM/EDX and FTIR Characterization. *Key Engineering Materials*, V 284-286, p745; p745-748. 2005.

MAO, J.D.; HOLTMAN, K.M.; FRANQUI-VILLANUEVA, D. Chemical structures of corn stover and its residue after dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis: insight into factors limiting enzymatic hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* 58, p11680-11687. 2010.

MARABEZI, K. Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar. 2009. Dissertação de mestrado. Ciências Físico-Química. 158p.

MARAFON, A. C.; CÂMARA, T. M. M.; SANTIAGO, A. D.; RANGEL, J. H. A. Cenário energético brasileiro e o potencial do capim-elefante como fonte de matéria-prima para a produção de energia renovável. Embrapa Tabuleiros Costeiros. Artigos. 2012.

MARTELLI, F. H.; LOVEZUTTI, B; DA SILVA, W. T. L. Caracterização por CPMAS RMN ¹³C e DRX de gramíneas vegetais Capim-Elefante, Capim-Mombaça, Brachiaria, Sorgo e Bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol lignocelulósico. III Symposium on Agricultural and Agroindustrial Waste Management. São Pedro, SP. Brasil. 2013.

MARTIN-NETO, L.; MILORI, D.M.B.P.; DA SILVA, W.T.L.; SIMÕES, M.L. EPR, FTIR, Raman, UV–Visible absorption, and Fluorescence spectroscopies in studies of NOM. In: Huang, P.M.; Senesi, N. *Biophysico-Chemical Processes in Environmental Systems*. John Wiley & Sons, Hoboken. p. 646-711, 2009.

MAY, A. et al. Cultivo de Sorgo Sacarino em Áreas de Reforma de Canaviais. Circular Técnica n186. Embrapa Milho e Sorgo. 2013.

MCMULLAN, D. Scanning electron microscopy 1928–1965. Scanning Vol. 17. 175p. 2006.

MEIRELLES, P. R. L.; MOCHIUTTI, S. Formação de Pastagens com capim marandu. Recomendações Técnicas/99, nº 7, p. 1-3, Embrapa Amapá. 1999.

MENEZES, T. J. B. Etanol, o combustível do Brasil. [Edições Ceres](#). Editora Agronômica Ceres, 233p, 1980.

MIRANDA, C. Biofuel production from water hyacinth in the Pantanal Wetland. USDA. Agricultural Research Service. Ecohydrology & Hydrobiology. Vol 12, nº 1, p77-84, 2010.

MORGADO, D. L. Biocompósitos a partir de celulose de linter: filmes de acetatos de celulose/celulose e quitosana/celulose. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2009.

MORGAN, K. R.; HEMMINGSON, J. A.; RICHARD, H.; STANLEY, R. A. A ^{13}C solid-state NMR study of ion-exchange derived from natural polysaccharides resins. Carbohydrate Research, v262, p185-194. 1994.

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

MULLER, M. S. FANCELLI, A. L. DOURADO-NETO; D.; GARCIA, A.; OVEJERO, R. F. L. Produtividade do Panicum maximum cv. Mombaça irrigado sob pastejo rotacionado. Scientia Agricola, v.59, n.3, p.427-433. 2002.

NAPOLÊÃO, B. A. Biodiesel: alternativa econômica, social e ambiental para o Brasil. Informe Agropecuário. Belo Horizonte, v.26, p.3-9, 2005.

NASSAR, M. M.; ASHOUR, E. A.; WAHID, S. S. Thermal characteristics of bagasse. Journal of Applied Polymer Science, v. 61, p. 885-890. 1996.

NELSON, M.L.; O'CONNOR, R.T. Relation on certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part I: Spectra of lattice types I, II, III and of amorphous cellulose. Journal of Applied Polymer Science, New Orleans, vol 8. p1311-1324. 1964a.

NELSON, M.L.; O'CONNOR, R.T. Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice. Part II: A new infrared ration for estimation of crystallinity in cellulose I and II. *Journal of Applied Polymer Science*, New Orleans, vol8. p.1325-1341. 1964b.

NISHIKAWA, S.;ONO, S.. Transmission of X-rays through fibrous, lamellar and granular substances. *Proceedings Mathematical Physical Society Tokyo*, v. 7, p.131–138. 1913.

NISHIKAWA, S.. On the spectrum of X-rays obtained by means of lamellar or fibrous substances. *Proceedings Mathematical Physical Society Tokyo*, v. 7, p.296–298. 1914.

NOVACANA. Portal da cana: Etanol, açúcar e cogeração. Moagem fica aquém da expectativa e vendas de etanol crescem no centro-sul do país. Notícias. Disponível em: <<http://www.novacana.com>> . Acesso em 10Jun2014.

NOVO, L. P. Determinação da relação dos parâmetros de solubilidade de Hansen de solventes orgânicos com a deslignificação organossolve de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado. Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo.139p, 2012.

NREL - NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Laboratory Analytical Procedures (LAP). Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis Spectroscopy. 2007. Disponível em: <www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html> Acesso em 04Jul2013.

NREL - NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Laboratory Analytical Procedures (LAP) Method, 2009. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. 2008b. Disponível em: <www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html> Acesso em 30Mar2012.

NREL – NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Standard biomass analytical procedures, 2008a. Disponível em: <www.nrel.gov/biomass/energy_analysis.html> Acesso em 04Jul2012.

OLIVEIRA, P. P. A.; MARCHESIN, W.; CERQUEIRA, P. H.; HERLING, V. R. Guia de identificação de deficiências nutricionais em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Comunicado Técnico nº 76. São Carlos-SP. 2007.

PADILHA, A.F.; AMBRÓZIO, F. F. Técnicas de Análise Microestrutural” – Hemus Ed. Ltda. 1985.

PANDEY, K.K. A study of chemical structure of soft and hardwood polymers by FTIR spectroscopy. Journal of Applied Polymer Sciences 71, 1969–1975. 1999.

PARIS, W.; CECATO, U.; BRANCO, A. F.; BARBERO, L. M.; GALBEIRO, S. Produção de novilhas de corte em pastagem de Coastcross-1 consorciada com Arachis pintoi com e sem adubação nitrogenada. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v. 38, n. 1, p. 122-129. 2009.

PARK, S.; BAKER, J.O.; HIMMEL, M.E.; PARILLA, P.A.; JOHNSON, D.K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. Biotechnol. Biofuels. vol3, 1-10. 2010.

PARRELLA, R. Embrapa avalia sorgo biomassa como alternativa de energia renovável em Mato Grosso. Pesquisa FAPESP. Edição 193. 2012.

PARRELLA, R. Sorgo biomassa: cultura promissora para geração de energia. Embrapa Milho e Sorgo. Agronegócios. Energias Renováveis. Notícias. 2013. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/>>. Acessado em 17Ago2013.

PEDREIRA, M. S. R.; REIS, R. A.; BERCHIELLI, T. T.; MOREIRA, A. L. ; COAN, R. M. Características Agronômicas e Composição Química de Oito híbridos de Sorgo (*Sorghum bicolor*. Bras. Zootec., v.32, n.5, p.1083-1092. 2003.

PEREIRA, J.A.; AZEVEDO, A. R.; SALES, R. O.; PIMENTEL, J. C. M.; ALVES, A. A.; CASTRO, A. B. Composição química da silagem de capim-elefante cv Napier (*Pennisetum purpureum*, Schum) com diferentes níveis de Leucena cv Cunningham (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit). Rev. Cient. de Prod. Anim. Vol.1, n.2, p191-204. 1999.

PEREIRA-JUNIOR, N. Biotecnologia de materiais lignocelulósicos para a produção química. EQ/UFRJ. Prêmio Abiquim de Tecnologia. 2006.

PESCE, D.M.C.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUES, J.A.S. Análise de vinte genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L. Moench) de porte médio e alto, pertencentes ao ensaio nacional. Revista Brasileira de Zootecnia, v.29, n.4, p.978-987. 2000.

PITARELO, A.P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. Dissertação de Mestrado em Química. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2007.

POPESCU, C.; LARSSON, P.T.; VASILE, C. Carbon-13 CP/MAS solid state NMR and X-ray diffraction spectroscopy studies on lime wood decayed by *Chaetomium globosum*. Carbohydr Polym. Vol 83, p808-812. 2011.

PRESTON, C. M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. Soil Science, v. 161, n. 3, p. 144-166. 1996.

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas. São Paulo. 2010.

RITTER, S. K., Calling All Chemists “Chemists and chemical engineers will be providing the thousands of technologies needed to achieve a more sustainable world. Chemical & Engineering News. V. 86, N° 33, p. 59-68, 2008.

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

ROCHA, G.J.M., SILVA, F.T., SCHUCHARDT, U. Improvement of a rapid UV spectrophotometric method for determination of lignin in alkaline solutions. In: Program and Abstracts of the III Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignin and other Wood Components. Belo Horizonte, September 8th–10th, 73pp. 1993.

RODRÍGUES-ZÚÑIGA, U. F. Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulases específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração. Tese de Doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos – EESC. Universidade de São Paulo - USP, 2010.

ROTHER, L. [With Big Boost From Sugar Cane, Brazil is satisfying its fuel needs](http://www.nytimes.com/). The New York Times. 2008. Disponível em <<http://www.nytimes.com/>>. Acesso em 28Abr2008.

SALES, M. F. L.; VALENTIM, J. F.; ANDRADE, C. M. S. Capim-Mombaça formação e manejo de pastagens no Acre. Embrapa Acre. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012.

SANTOS, C. H. Análises espectroscópicas da matéria orgânica de solos sob aplicação de águas residuárias. Dissertação de Mestrado. São Carlos, IQSC, 147p. 2008.

SCHERRER, P.. Bestimmung der Grosse und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Rontgenstrahlen. Gottinger Nachr. p. 98–100. 1918.

SCHERRER, P.. Bestimmung der inneren Struktur und der Grose von Kolloidteilchen mittels Rontgenstrahlen, 3. ed. Spamer, Leipzig. 1920.

SEAGAL, L.; CREELY, J.J.; MARTIN, A.E.; CONRAD, SEGAL, L.; CREELY, J.J.; MARTIN, 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, v.29, n.10, p.786-794. 1959.

SEYE, O.; CORTEZ, L.A.B.; GÓMEZ, E.O. Estudo cinético da biomassa a partir de resultados termogravimétricos. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL (AGRENER), 3., 2000, Campinas. Anais... Campinas: Agrener. 2000.

SILVA, R. C.; SILVA, H. C. DUTRA DE OLIVEIRA, J. E. Conteúdos de celulose, hemicelulose e lignina em dieta hospitalar hipocalórica. Alim. Nutr. São Paulo. Vol. 2, p65-71. 1990.

SILVA, A.S., INOUE, H., ENDO, T., YANO, S., BON, E.P.S. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. Bioresource Technology, ed 101, p 7402-7409, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6a edição, LTC. Rio de Janeiro, RJ, 2001.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Analytical chemistry: an introduction. 7th ed. Colonia Polanco. Brooks/Cole. Thomson learning. 2000.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of Ash in Biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1-8. 2005.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL), 1-16, 2008.

SMITH, K. C.A.; OATLEY, C.W. The scanning electron microscope and its fields of application. British Journal of Applied Physics. vol 6. 1955.

SMITH, K.D. Metals Handbook: Diffraction Methods, v.10, p.326-355, 1981.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Wiley, New York. 1979.

SOARES FILHO, C. V.; RODRIGUES, L. R. A.; PERRI, S. H. V. Produção e valor nutritivo de dez gramíneas forrageiras na região Noroeste do estado de São Paulo. Maringá, v. 24, n. 5, p. 1377-1384. 2002

SOCOL, C.R. et al . Bioethanol from ligno-celluloses: Status and perspectives in Brazil. Bioresource Technology, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SOLOMON, B. D.; BARNES, J. R.; HALVORSEN, K. E. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. Biomass and Bioenergy, ed31, p416-425, 2007.

SOMMA, D.; LOBKOWICZ, H.; DEASON, J. P. Growing America's fuel: an Analysis of corn and cellulosic ethanol feasibility in the United States. Clean Technology. Environ Policy. ed 12, p373–380, 2010.

SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Dipartimento Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali. Università di Napoli Federico. Portici. Italy. Centro Interdipartimentale per la Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (CERMANU). Clean journal. Vol36 (2), p152 – 157. 2008.

STEVENSON, F. J. Humus Chemistry: genesis, composition, reactions, 2. ed. New York. John Wiley, p. 496. 1994.

- STUART, B. Modern infrared spectroscopy. John Wiley & Sons. New York and Chichester, pp. 120. 1996.
- SUCDEN - Sucres & Denrées group. 2012. Disponível em <http://www.sucden.com/statistics/11_u-s-ethanol-market>. Acesso em 11Dez2012.
- SUGIYAMA, J.; OKANO, T.; YAMAMOTO, H.; HORII, F.; ODANI, H. Experimental evidence for a triclinic system in native cellulose. Abstracts of papers of the American Chemical Society 199, Cell, parte 1, Boston. Pag.31. 1990.
- SUGIYAMA, J.; VUONG, R.; CHANZY, H. Electron diffraction study on the two crystalline phases occurring in native cellulose from an algal cell wall. Macromolecules, v. 24, p.4168–4175.1991.
- SUN, J.X.; SUN, X.F.; ZHAO, H.; SUN, R.C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. Polymer Degradation and Stability. Vol.84, p331-339, 2004.
- SUN, R.; SUN X.F.; TOMKINSON J. Hemicelluloses and their Derivatives. In: Hemicelluloses: Science and Technology, Gatenholm, P. and M. Tenkanen (Eds.). American Chemical Society, USA, pp: 2-22. 2004.
- SWIFT, R.S. Organic matter characterization. Methods of soil analysis. Chemical methods. Madison, Soil Science Society of America/American Society of Agronomy. Book Series. Part 3. p.1011-1069. 1996.
- TASKER, S.; BADYAL, J.P.S.; BACKSON, S.C.E.; RICHAARDS, R.W. Hydroxyl accessibility in celluloses. Polymer, vol. 35, pag. 4717. 1994.
- TAYLOR, J. C. Rietveld made easy: a practical guide to the understanding of the method and successful phase quantifications. National Library of Australia Cataloguing-in-Publication. Hinczak, Ihor. 1994.
- TOMAZ, R. M. A. G.; BITTENCOURT, E.; SABINO, N. P.; KONDO, J. I. Metodologia e técnicas experimentais. Determinação dos índices de cristalinidade de fibras celulósicas. Bragantia. Campinas. Vol. 53. P121-126. 1994.
- THEERARATTANANOON, K. Evaluation and characterization of pelleted biomass from selected resources for ethanol production. Dissertation submitted in partial fulfillment

of the requirements for the degree doctor of philosophy. Department of Biological and Agricultural Engineering. College of Engineering. Kansas State University. Manhattan. Kansas. 2012.

TRAXLER, M.J., FOX, D.G., VAN SOEST, P.J. et al. Predicting forage indigestible NDF from lignin concentration. *J. Anim. Sci.*, 76:1469-1480. 1998.

TRIANA, O.; LEONARD, M.; SAAVEDRA, F.; FERNÁNDEZ, N.; GÁLVEZ, G.; PEÑA, E. Atlas del bagazo de la caña de azúcar. México. GEPLACEA/PNUD/ICIDCA, 143p. 1990.

TSUBOI, M. Infrared spectrum and crystal structure of cellulose. *J. Polym. Sci.*, vol.25. p 159–171. 1957.

UNICA – União da indústria de cana-de-açúcar. Documentos. Produção de Etanol. 2012. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 12Abr2013.

UNICA – União da indústria de cana-de-açúcar. Documentos. 2013. Produção de Etanol. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 12Abr2013.

VANDERHART, D. L. Studies of Microstructure in Native Cellulose Using Solid-State ¹³C NMR. *Macromolecules*. V.17, 1465-1472. 1984.

VAINSHTEIN, B. K. Fundamentals of crystals. Symmetry, and methods of structural crystallography – Vol 1. Springer-Verlag. 480p. Berlin. 1994.

VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous feed. A rapid method of the determination of fiber and lignin. *Journal of Association of Official Agricultural Chemistry*, v.46, p.829-835. 1963.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its applications to forrages. *Journal Animal Science*, v.26, n.1, p.119-129. 1967.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B. Systems of analysis for evaluating fibrous feeds. In: PIDGEN, W.J.; BALCH, C.C.; GRAHAM, M. (Eds.). *Standardization of analytical methodology for feeds*. Ottawa: International Development Research Center, 1980.

- VENTURELLI, M. Automação de biorrefinarias de etanol de Segunda Geração. Artigos. Controle de Processos. 2013. Disponível em: <<http://automacaoindustrial.info>>. Acesso em 26Set2013.
- VINKLER, P.; LAKATOs, B.; MEISEL, J. Infrared spectroscopic investigations of humic substances and their metal complexes. *Geoderma*, v. 15, p. 231-242. 1976.
- VOGEL, K. Etanol de grama é melhor que o do milho. *Scientific American Brasil*. USDA. 2012. Disponível em: <http://www2.uol.com.br/sciam/noticias/etanol_de_grama_e_melhor_que_o_do_milho.html>. Acesso em 11Abril2013.
- WANG, B.; SAIN, M.. Isolation of nanofibers from soybean source and their reinforcing capability on synthetic polymers. *Composites science and technology*, v.67, p. 2521-2527. 2007.
- WESTERHOFF, P.; ANNING, D. Concentration and characteristics of organic carbon in surface water in Arizona: influence of urbanization. *Journal of Hydrology*. vol236, p202-222. 2000.
- WETZEL, R.G. Gradient-dominated ecosystems – sources and regulatory function of dissolved organic-matter in freshwater ecosystems. *Hydrobiologia*. Vol. 229, p181-198. 1992.
- WIKBERG, H.; MAUNU, S.L. Characterization of thermally modified hard- and softwoods by ¹³C CPMAS NMR. *Carbohydr Polym*. vol58. p461-466. 2004.
- WHETTEN, R.W.; SEDEROFF, R. R. Lignin biosynthesis. *Plant Cell*, Vol.7, 1995.
- WYMAN, C. E., Twenty years of trials, triulations and research progress in bioethanol technology – Selected key events along the way. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 91, 2001.
- WU, J.; FUKAZAWA, K.; OHTANI, J. Lignin analysis in some tropical hardwoods using ultraviolet microscopy. *Res. Bull. Coll. Exp. Forests, Hokkaido Univ*. vol. 47. p353–366. 1990.

XIAO, L.P.; SUN, Z.J.; SHI, Z.J.; XU, F.; SUN, R.C. Impact of hot compressed water pretreatment on the structural changes of woody biomass for bioethanol production. *Bioresources*. Vol 6. p1576-1598. 2011.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot-Compressed Water and Its Comparisons with Other Hydrolysis Methods. *Energy & Fuels*, v.22, p.46–60, 2008.

ZHANG, P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. Vol. 24, p. 452- 481, 2006.

ZHUANG, J.; MARCHANT, M.A; NOKES, S. E. STROBEL, H J. Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol. *Applied Engineering in Agriculture*. v. 23, p. 679-687, 2007.

ZUCKERSTÄTTER, G.; SCHILD, G.; WOLLBOLDT, P.; RÖDER, T.; WEBER, H. K.; SIXTA, H. The elucidation of cellulose supramolecular structure by ^{13}C CP-MAS NMR. *Lenzinger Berichte*. Vol 87. p38-46. 2009.

ZUGENMAIER, P. Crystalline Cellulose and Derivatives: Characterization and Structures, *Springer Series in Wood Science*, Berlin , p. 175-206. 2008.