



Maria Beatriz Fernandes Banaco

# Produção de bioetanol celulósico: otimização de parâmetros

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Orientadores:

Prof. Doutor Jorge Manuel Santos Rocha  
Prof.<sup>a</sup>. Doutora Maria da Graça Videira Sousa Carvalho

Instituições:

Departamento de Engenharia Química — Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra  
Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta

Este trabalho foi preparado no âmbito do projeto InPaCTus — Produtos e Tecnologias Inovadoras a partir do Eucalipto. POCI-01-0247-FEDER-021874, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Programa Operacional Competitividade e Internacionalização, do Portugal 2020 e no âmbito do projeto financiado pela FCT UID/EQU/00102/2013, Centro de Investigação em Engenharia dos Produtos da Floresta, e pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do COMPETE 2020 — Programa Operacional Competitividade e Internacionalização POCI-01-0145-FEDER-0066910

Cofinanciado por:



Coimbra, setembro 2018

## Agradecimentos:

Antes de mais quero agradecer à minha família por todo o apoio e ajuda que me deram, por sempre me proporcionarem as melhores condições para efetuar o meu trabalho diariamente, principalmente aos meus pais que me instruíram os valores de esforço, de empenho e de profissionalismo e que me facultaram todas as hipóteses de sucesso académico. Além dos meus pais, quero agradecer ao meu irmão Diogo Banaco e ao meu primo João Santos que, apesar de estarem longe, sempre souberam dar palavras de apoio, nos momentos de maior desespero.

Quero também agradecer ao Professor Doutor Jorge Rocha e à Professora Doutora Maria da Graça Carvalho por me orientarem na realização da investigação para a minha dissertação de mestrado e por se mostrarem sempre disponíveis para responderem às minhas questões. Quero agradecer à Engenheira Cátia Mendes, por me ter ajudado e apoiado diariamente, por me passar todos os ensinamentos que aprendi e por todos os bons momentos que foram passados no laboratório B27. Um agradecimento também a todos os professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra que me acompanharam ao longo destes 5 anos.

Quero também agradecer ao meu colega de laboratório, Rodrigo Pimenta, que permitiu desenvolver, em harmonia, esta investigação de dissertação, estando sempre presente e disposto a ajudar sempre que necessário e até mesmo quando não era preciso. Agradecer à minha colega Carolina Curado, que sempre se mostrou muito prestável quando lhe invadia o laboratório B15 para fazer alguma experiência.

Finalmente, mas não menos importante, quero agradecer a todos os meus amigos que estiveram sempre presentes, não só nesta etapa da minha vida, como ao longo destes 5 anos. De destacar os meus colegas de curso do grupo J.A.I.M.E., Joel Sansana, Adriano Dias, Inês Inocência e Eugeniu Strelet, que não só me acompanharam durante as unidades orgânicas de Projeto de Processo e de Dissertação, como ao longo destes 5 anos, nunca esquecendo aqueles momentos de discussão académica ou política. Agradecer também às minhas colegas de curso do grupo DEQas, que não só foram essenciais para momentos de descontração, como de trabalho, principalmente para alertar pontos importantes acerca da dissertação. Um especial agradecimento à minha colega de curso Mariana Alvim, que não só me ajudou tantas vezes na escrita da dissertação, sugerindo sempre pequenas alterações no português, mas também foi sempre o meu pilar, a nível académico, pessoal e de associativismo. Destacar outro especial agradecimentos às minhas grandes amigas Rebeca Rodrigues e Andreia Duque, que me

acompanham há tantos anos, que me conhecem tão bem, que sempre acreditaram em mim e que estavam sempre dispostas a organizar sessões de trabalho e estudo intenso. Um especial agradecimento à Carolina Tadeu que, apesar de estar sempre a alguns quilómetros de distância, esteve sempre disponível para um telefonema semanal para ouvir todos os desenvolvimentos da investigação. Agradecer também a todos os elementos da Direção-Geral da Associação Académica de Coimbra que me deram palavras de apoio sempre que me viam mais aflita ou até mesmo quando fingiam que entendiam alguma coisa quando lhes começava a explicar em que consistia a minha investigação de dissertação. Agradecer também à minha grande amiga Daniela Rosa que, apesar de andar sempre tão ocupada com as mil iniciativas em que se envolve, tirou sempre um tempinho para saber como estava a minha investigação e apoiou-me vezes sem conta, acreditando sempre nas minhas capacidades. Agradecer também aos meus amigos Miguel Medeiros, Ângelo Matos, Bruno Bernardino e João Sousa que me deram palavras de apoio e de incentivo para o desenvolvimento da minha dissertação, reforçando sempre as minhas capacidades.

## Resumo:

O setor automóvel tem-se vindo a expandir ao longo dos séculos XX e XXI, o que tem provocado o aumento da produção e emissão de CO<sub>2</sub> para o ambiente, contribuindo assim para o agravamento da poluição ambiental e do aquecimento global. Não se prevendo a quebra deste setor, é essencial procurar novas alternativas para a diminuição dos gases de efeito estufa, apostando em projetos de inovação e diferenciação que tornem esta indústria mais competitiva, como é o caso da produção de biocombustíveis, ou seja, de bioetanol. É possível utilizar resíduos da indústria papelreira, isto é, recorrer à biomassa lenhocelulósica para a produção de bioetanol celulósico, utilizando o processo de sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF). O principal objetivo foi comparar os resultados obtidos da eficiência de produção de bioetanol celulósico a partir de dois materiais lenhocelulósicos diferentes, recorrendo ao processo SSF à temperatura de 38°C, variando a consistência (3, 6 e 9%) e a carga enzimática (10 e 15 FPU/g<sub>HC</sub>). Desta forma, utilizou-se a solução enzimática Cellic<sup>®</sup> CTec2 e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC<sup>®</sup> 26602<sup>™</sup>) e enquanto biomassa utilizou-se uma pasta de casca de eucalipto e uma pasta de fibra mista virgem. A partir da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) determinou-se a concentração de etanol presente nas amostras de cada pasta. Assim, a concentração máxima de etanol foi de 38,5 g/L às 72 h, com a pasta de fibra mista virgem à consistência de 9% e uma carga enzimática de 15 FPU/g<sub>HC</sub>. Já com a pasta de casca de eucalipto, conseguiu-se atingir uma concentração máxima de 34,7 g/L às 48 h, também a 9% e a 15 FPU/g<sub>HC</sub>. No entanto, com a diminuição da carga enzimática para 10 FPU/g<sub>HC</sub>, de forma a se otimizar o processo, conseguiu-se alcançar altas concentrações de etanol, à consistência de 9%, com ambas as pastas utilizadas. Com a pasta de fibra mista virgem, às 72 h, atingiu-se uma concentração máxima de 35,8 g/L, enquanto com a pasta de casca de eucalipto, às 48 h, atingiu-se 33,2 g/L.

**Palavras-chave:** Biomassa lenhocelulósica, SSF, bioetanol celulósico, consistência, carga enzimática.

## Abstract

The automotive sector has been expanding throughout the 20th and 21st centuries, which has led to increased production and emission of CO<sub>2</sub> into the environment, thus contributing to the worsening of environmental pollution and global warming. Not foreseeing the breakdown of this sector, it is essential to look for new alternatives for the reduction of greenhouse gases, betting on projects of innovation and differentiation that make this industry more competitive, as is the case of the production of biofuels, that is bioethanol. It is possible to use paper industry waste, that is, to use lignocellulosic biomass for the production of cellulosic bioethanol, using the simultaneous saccharification and fermentation process (SSF). The main objective was to compare the results of the production efficiency of cellulosic bioethanol from two different lignocellulosic materials using SSF process at 38°C and varying the consistency (3, 6 and 9%) and enzymatic loading (10 and 15 FPU/g<sub>HC</sub>). In this way, a Cellic<sup>®</sup> CTec2 enzyme solution and *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC<sup>®</sup> 26602<sup>™</sup>) yeast were used and as a biomass a pulp of eucalyptus bark and a mixed fiber pulp were used. From the high-performance liquid chromatography technique, the concentration of ethanol present in samples of each pulp was determined. The maximum concentration of ethanol was 38,5 g/L at 72 h, with mixed fiber pulp at 9% consistency and 15 FPU/g<sub>HC</sub> enzymatic loading. With the eucalyptus bark pulp, a maximum concentration of 34,7 g/L was achieved at 48 h, also at 9% and at 15 FPU/g<sub>HC</sub>. However, with the reduction of enzyme loading to 10 FPU/g<sub>HC</sub>, in order to optimize the process, it was possible to achieve high concentrations of ethanol, at a consistency of 9%, with both pulps. With the mixed fiber pulp at 72 h, a maximum concentration of 35,8 g/L was reached, while the eucalyptus bark pulp at 48 h reached 33,2 g/L.

**Keywords:** Lignocellulosic biomass, SSF, cellulosic bioethanol, consistency, enzymatic loading.



## Índice

1.	Introdução .....	1
1.1.	Impacte ambiental .....	1
1.2.	Motivação.....	1
1.3.	Objetivos .....	2
1.4.	Conteúdo.....	2
2.	Estado da Arte .....	5
2.1.	Biomassa .....	5
2.1.1.	Celulose .....	7
2.1.2.	Hemiceluloses.....	7
2.1.3.	Lenhina .....	8
2.1.4.	Extrativos e cinzas .....	9
2.1.5.	Pré-tratamentos .....	9
2.2.	Produção de pasta e de papel .....	10
2.3.	Produção de bioetanol .....	11
2.3.1.	Pré-tratamento.....	13
2.3.2.	Hidrólise .....	21
2.3.3.	Fermentação.....	24
3.	Materiais e métodos .....	29
3.1.	Caracterização química do material lenhocelulósico.....	29
3.2.	Hidrólise enzimática e Fermentação .....	30
4.	Resultados e discussão .....	33
4.1.	Caracterização química do material lenhocelulósico.....	33
4.2.	Hidrólise enzimática e Sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF) .....	36
4.2.1.	Hidrólise enzimática .....	37
4.2.2.	Sacarificação e Fermentação em Simultâneo (SSF) .....	43
5.	Conclusões .....	58
	Bibliografia .....	62
	Apêndice .....	66
	Anexo I – Procedimento da caracterização química.....	66
	Determinação do teor de sólidos .....	66
	Determinação do teor de cinzas.....	66
	Determinação do teor de lenhina total .....	67
	Determinação dos monossacarídeos por HPLC .....	68
	Determinação do Índice Kappa (IK) .....	70
	Anexo II – Hidrólise Enzimática e Fermentação.....	71
	Determinação de açúcares redutores .....	71

Atividade enzimática .....	74
Hidrólise enzimática .....	75
Sacarificação e Fermentação em Simultâneo (SSF) .....	78
Anexo III – Tabelas de resultados da hidrólise enzimática .....	80
Anexo IV – Tabelas de resultados da sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF) .....	83
Anexo V – Segurança .....	85

## Índice de Figuras:

Figura 2.1 - Estrutura da biomassa lenhocelulósica (adaptado de MENON & RAO, 2012).....	6
Figura 2.2 - Estrutura polimérica da celulose (adaptado de Junior et al., 2006) . <sup>[15]</sup> .....	7
Figura 2.3 - a) Estrutura polimérica da lenhina. b) Unidades precursores da lenhina: (I) álcool p-cumarílico, (II) álcool coniferílico, (III) álcool sinapílico (adaptado de). <sup>[7]</sup> .....	9
Figura 2.4 - Distribuição da área de povoamentos florestais, por espécie dominante, em Portugal continental, em 2010 (adaptado de CELPA, 2016). .....	10
Figura 2.5 - Aquisição e consumo de madeira de eucalipto (adaptado de CELPA, 2016). <sup>[18]</sup> .....	11
Figura 2.6 - Processo de produção de bioetanol celulósico (adaptado de Novozymes). <sup>[22]</sup> .....	12
Figura 2.7 - Pré-tratamentos químicos com ácido.....	14
Figura 2.9 - Processo de produção de bioetanol celulósico, recorrendo a uma hidrólise e fermentação em separado (SHF) (adaptado El-Naggar, N.E.A., Deraz, S., Khalil, A., 2014). <sup>[25]</sup> .....	25
Figura 2.10 - Processo de produção de bioetanol celulósico, recorrendo a uma sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF) (adaptado El-Naggar, N.E.A., Deraz, S., Khalil, A., 2014). <sup>[25]</sup> .....	26
Figura 2.11 - Processo de produção de bioetanol celulósico, recorrendo a uma sacarificação e co-fermentação em simultâneo (SSCF) (adaptado El-Naggar, N.E.A., Deraz, S., Khalil, A., 2014). <sup>[25]</sup> .....	28
Figura 3.1 a) Pasta de casca de eucalipto. b) Pasta de fibra mista virgem.....	29
Figura 4.1 - Cromatogramas de caracterização das pastas em estudo.....	35
Figura 4.2 – Perfil da hidrólise enzimática da pasta de casca de eucalipto; consistência (3 e 6%); carga enzimática (15 FPU/g <sub>HC</sub> ). .....	38
Figura 4.3 - Perfil da hidrólise enzimática da pasta de casca de eucalipto; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/g <sub>HC</sub> ).....	38
Figura 4.4 - Perfil da hidrólise enzimática na pasta de casca de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (15 FPU/g <sub>HC</sub> ).....	39
Figura 4.5 - Perfil da hidrólise enzimática na pasta de casca de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/g <sub>HC</sub> ).....	40
Figura 4.6 - Perfil do rendimento do processo de hidrólise enzimática da pasta de casca de eucalipto; consistência (3 e 6%); carga enzimática (15 FPU/g <sub>HC</sub> ). .....	40
Figura 4.7 - Perfil do rendimento do processo de hidrólise enzimática da pasta de casca de eucalipto; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/g <sub>HC</sub> ).....	41
Figura 4.8 - Perfil do rendimento do processo de hidrólise enzimática da pasta de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (15 FPU/g <sub>HC</sub> ).....	42
Figura 4.9 - Perfil do rendimento do processo de hidrólise enzimática da pasta de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/g <sub>HC</sub> ).....	42
Figura 4.10 – Perfil de concentração de etanol no processo SSF da pasta de casca de eucalipto; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (15 FPU/g <sub>HC</sub> ).....	43
Figura 4.11 – Perfil de concentração de etanol no processo SSF da pasta de casca de eucalipto; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/g <sub>HC</sub> ).....	44
Figura 4.12 - Perfil de concentração de etanol no processo SSF da pasta de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (15 FPU/g <sub>HC</sub> ).....	45
Figura 4.13 - Perfil de concentração de etanol no processo SSF da pasta de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/g <sub>HC</sub> ).....	45
Figura 4.14 – Perfil do rendimento de produção de etanol, em g <sub>EtOH</sub> /g <sub>açúcares</sub> , da pasta de casca de eucalipto; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (15 FPU/g <sub>HC</sub> ).....	46
Figura 4.15 - Perfil do rendimento de produção de etanol, em g <sub>EtOH</sub> /g <sub>açúcares</sub> , da pasta de casca de eucalipto; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/g <sub>HC</sub> ).....	47
Figura 4.16 - Perfil do rendimento de produção de etanol, em g <sub>EtOH</sub> /g <sub>açúcares</sub> , da pasta de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (15 FPU/g <sub>HC</sub> ).....	48

Figura 4.17 - Perfil do rendimento de produção de etanol, em $g_{EtOH}/g_{açúcares}$ , da pasta de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/ $g_{HC}$ ).....	48
Figura 4.18 - Produtividade máxima de etanol no processo SSF da pasta de casca de eucalipto; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 e 15 FPU/ $g_{HC}$ ).....	49
Figura 4.19 - Produtividade máxima de etanol no processo SSF da pasta de fibra virgem mista; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 e 15 FPU/ $g_{HC}$ ).....	50
Figura 4.20 - Perfil de concentração de etanol no processo SSF de ambas as pastas; consistência (9%); carga enzimática (15 FPU/ $g_{HC}$ ).....	50
Figura 4.21 - Perfil do rendimento de produção de etanol de ambas as pastas; consistência (9%); carga enzimática (15 FPU/ $g_{HC}$ ).....	51
Figura 4.22 - Perfil de concentração de etanol de ambas as pastas; consistência (9%); carga enzimática (10 FPU/ $g_{HC}$ ). .....	51
Figura 4.23 - Perfil de rendimento de produção de etanol de ambas as pastas; consistência (9%); carga enzimática (10 FPU/ $g_{HC}$ ).....	52
Figura 4.24 - Amostragem dos ensaios de SSF da pasta de casca de eucalipto e da pasta de fibra mista virgem, às 72 h; consistência (6%); carga enzimática (15 e 10 FPU/ $g_{HC}$ ). .....	53
Figura 4.25 - Amostragem dos ensaios de SSF da pasta de casca de eucalipto e da pasta de fibra mista virgem, às 72 h; consistência (9%); carga enzimática (15 e 10 FPU/ $g_{HC}$ ). .....	53
Figura 4.26 - Cromatograma da pasta de casca de eucalipto, com consistência de 9% e a 10 FPU/ $g_{HC}$ . .....	54
Figura 4.27 - Cromatograma da pasta de fibra mista virgem, com a consistência de 9% a 10 FPU/ $g_{HC}$ . .....	55
Figura 4.28 - Cromatogramas da pasta de casca de eucalipto, a 10 FPU/ $g_{HC}$ , nas diversas consistências. ....	56
Figura 4.29 - Cromatogramas da pasta de fibra mista virgem, a 10 FPU/ $g_{HC}$ , nas diversas consistências. ....	56

## Índice de Tabelas:

Tabela 2.1 - Pré-tratamentos da biomassa lenhocelulósica. ....	20
Tabela 4.1 - Teor de cinzas presente nos materiais lenhocelulósicos. ....	33
Tabela 4.2 - Teor de lenhina total (solúvel e insolúvel) dos materiais lenhocelulósicos.....	34
Tabela 4.3 - Índice kappa e lenhina total dos materiais lenhocelulósicos. ....	34
Tabela 4.4 - Percentagem de celulose, hemiceluloses e hidratos de carbono presentes no material lenhocelulósico. ....	34
Tabela 4.5 - Quantidade de monossacarídeos presentes na pasta de casca de eucalipto, a partir da coluna Rezex RPM - Monosaccharide Pb <sup>2+</sup> . ....	36
Tabela 4.6 - Quantidade de monossacarídeos presentes na pasta de fibra mista virgem, a partir da coluna Rezex RPM - Monosaccharide Pb <sup>2+</sup> . ....	36
Tabela 4.7 - Atividade enzimática à temperatura de 38°C e de 50°C.....	37
Tabela 4.8 - Percentagem de cada composto presente na pasta de fibra mista virgem e na pasta de casca de eucalipto. ....	55
Tabela I.1 - Quantidades de matéria-prima utilizadas para a determinação do teor de sólidos. ....	66
Tabela I.2 – Quantidade de matéria-prima a utilizar para a determinação do teor de cinzas.....	67
Tabela I.3 - Quantidade de matéria-prima a utilizar na hidrólise ácida.....	67
Tabela I.4 - Pesagens para a determinação da lenhina insolúvel. ....	68
Tabela I.5 - Medições para a determinação da lenhina solúvel.....	68
Tabela II.6 - Constituição do meio líquido para a levedura. ....	78
Tabela II.7 - Constituição do meio sólido para a levedura. ....	78
Tabela II.8 - Constituição da solução de nutrientes.....	78
Tabela II.9 - Quantidade de massa húmida de pasta de fibra mista virgem a utilizar no processo SSF. ....	79
Tabela II.10 - Quantidade de massa húmida de pasta de casca de eucalipto a utilizar no processo SSF. ....	79
Tabela IV.11 - SSF da pasta de fibra mista virgem, a 10 FPU/g <sub>HC</sub> .....	85

## Nomenclatura:

5-HMF – 5-hidroximetilfurfural

[EtOH]<sub>medio</sub> – Concentração média de etanol

[EtOH]<sub>t</sub> – Concentração de etanol no instante t

[Glucose] – Concentração de glucose

[KMnO<sub>4</sub>] – Concentração de permanganato de potássio

[Manose] – Concentração de manose

[Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>] – Concentração de tiosulfato de sódio

[pasta] – Concentração de pasta

[Xilose] – Concentração de xilose

%Ac.acet – Percentagem de grupos acéticos

%Ac.uron – Percentagem de grupos urónicos

%Arab – Percentagem de arabinogalactanas

%Cel – Percentagem total de celulose no material lenhocelulósico

%Gal – Percentagem de galactomananas

%Glu – Percentagem de glucanas

%Hem – Percentagem total de hemiceluloses no material lenhocelulósico

%Man – Percentagem de mananas

%Xil – Percentagem de xilanas

ACEL – Associação das Empresas Produtoras de Pasta de Celulose

AFEX – Ammonia Fiber Explosion (Explosão de Fibra de Amónia)

C – Volume

CE – Pasta de casca de eucalipto

CELPA – Associação da Indústria Portuguesa

d – Fator de correção para o consumo de 50% de permanganato

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

f – Fator de conversão de glucose

FAPEL – Associação Portuguesa de Fabricantes de Papel e Cartão

FPU - ( $\mu\text{mol glucose}$ )/(min.(mL enzima))

FV – Pasta de fibra mista virgem

HexA – Ácidos hexenurónicos

HC – Hidratos de carbono

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

IK – Índice Kappa

LT – Lenhina total

$m_{\text{amostra h\u00famida}}$  – Massa de amostra h\u00famida

$m_{\text{amostra seca}}$  – Massa de amostra seca

$m_{\text{cadinho+filtro}}$  – Massa do cadinho de vidro com filtro de fibra de vidro

$m_{\text{cadinho+filtro+res\u00edduo}}$  – Massa do cadinho de vidro com filtro de fibra de vidro e com res\u00edduos

$m_{\text{res\u00edduo}}$  – Massa de res\u00edduo

NREL – National Renewable Energy Laboratory (Laborat\u00f3rio Nacional de Energia Renov\u00e1vel)

P – Produtividade

SHF – Separate Hydrolysis and Fermentation (Hidr\u00f3lise e Fermenta\u00e7\u00e3o em Separado)

SSCF – Simultaneous Sacarification and Co-Fermentation (Sacarifica\u00e7\u00e3o e Co-Fermenta\u00e7\u00e3o em Simult\u00e2neo)

SSF – Simultaneous Sacarification and Fermentation (Sacarifica\u00e7\u00e3o e Fermenta\u00e7\u00e3o em Simult\u00e2neo)

t – Tempo de tiragem da amostra

$V_B$  – Volume do ensaio «branco»

Velocidade produ\u00e7\u00e3o EtOH – Velocidade de produ\u00e7\u00e3o do etanol

$V_{\text{solu\u00e7\u00e3o enzima}}$  – Volume de solu\u00e7\u00e3o de enzima

$V_{\text{solu\u00e7\u00e3o stock}}$  – Volume de solu\u00e7\u00e3o stock

$V_{\text{solu\u00e7\u00e3o tamp\u00e3o citrato}}$  – Volume de solu\u00e7\u00e3o de tamp\u00e3o citrato a 0,05 M

$V_{\text{suspens\u00e3o}}$  – Volume de suspens\u00e3o

$V_T$  – Volume de titulante

W – Massa de pasta seca

$Y_{\text{EtOH/a\u00e7\u00facar}}$  – Rendimento de etanol

# 1. Introdução

## 1.1. Impacte ambiental

Numa época cuja sociedade mundial está instruída para a preservação do meio ambiente, com a diminuição da emissão dos gases de efeito de estufa e com o combate ao aquecimento global, é de realçar a importância do fabrico e consumo de produtos de base «bio» e da aplicação de uma economia circular, destacando assim os pilares que formulam a sustentabilidade – a economia, o ambiente e a sociedade.

A produção de bioetanol tem revelado, nestes últimos anos, um especial interesse no setor automóvel, pois não só permite uma diminuição da emissão dos gases de efeito de estufa, como também se trata de uma solução para a redução da dependência do petróleo e dos produtos derivados deste.<sup>[1]</sup> Este setor contribui para a libertação de cerca de 19% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), que corresponde a 2,11 kg de CO<sub>2</sub>/L de petróleo, e mais de 70% de monóxido de carbono (CO). Este setor é um dos responsáveis pela degradação da qualidade do ar, com as enormes quantidades de gases emitidos.<sup>[2]</sup> Apesar da sociedade começar a estar ciente das consequências dos seus atos, entre os quais o aumento progressivo da emissão de CO<sub>2</sub> devido ao uso excessivo do automóvel, é imperterível começar a procura de resoluções benéficas não só para o ambiente, como para a sociedade e para a economia.

Assim, a produção de bioetanol a partir de material lenhocelulósico rico em celulose, como as pastas de casca de eucalipto e de fibra virgem de pinho e de eucalipto, é uma tecnologia bastante promissora para este setor que substitui o petróleo. Como tal, deve-se estimular a produção de bioetanol, principalmente de segunda geração, pois é uma forma de preservar o meio ambiente.

## 1.2. Motivação

No contexto enunciado acima, uma das motivações para o desenvolvimento deste estudo de produção de bioetanol a partir de material lenhocelulósico é contribuir para a preservação do meio ambiente. Outra motivação para a realização deste estudo é, sem dúvida, tentar criar valor acrescentado aos resíduos lenhocelulósicos que, tantas vezes, não recebem o devido fim. Existe cada vez mais desperdício deste tipo de material, o que tem provocado também problemas e incidentes ambientais, como os incêndios, pois a ausência de limpeza dos terrenos

tem vindo a dificultar a sua extinção. Os incêndios também emitem imenso CO<sub>2</sub> e outros gases perigosos para a saúde humana e para o meio ambiente.

Embora já hajam diversos estudos de produção de bioetanol a partir de material lenhocelulósico, esta investigação diferencia-se dos restantes pois envolve a otimização de alguns parâmetros, de forma a se obter o bioetanol com a maior concentração e com o maior rendimento possível, conseguindo-se ainda maximizar a produtividade de açúcares simples. Quanto à otimização dos parâmetros, o foco foi para a consistência e para a carga enzimática.

### 1.3. Objetivos

O desenvolvimento deste trabalho tem como principal objetivo comparar os resultados obtidos da eficiência da produção de bioetanol celulósico a partir de uma matéria maioritariamente constituída por fibra longa, sendo designada por «softwood», com os resultados obtidos a partir de uma matéria constituída por fibra curta, designada por «hardwood». Recorreu-se a matérias-primas lenhocelulósicas, como a pasta de fibra mista virgem lavada composta por 75% de pinho e 25% de eucalipto e a pasta de casca de eucalipto, mais concretamente de *Eucalyptus globulus*.

### 1.4. Conteúdo

Para a concretização dos objetivos listados, este trabalho experimental inclui, essencialmente, três etapas principais:

- i. A caracterização química da matéria-prima, que envolve a quantificação de cada composto celulósico, hidratos de carbono (celulose e hemiceluloses) e lenhina (solúvel e insolúvel). Para isso, recorre-se a uma hidrólise ácida de modo a ocorrer a quebra total da cadeia polimérica dos hidratos de carbono;
- ii. A hidrólise enzimática, que recorre à utilização de enzimas para a obtenção de açúcares simples, como a glucose e a xilose;
- iii. A sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF), onde se utiliza uma enzima e uma levedura, para a produção de etanol.

Tanto para a identificação e determinação da concentração de açúcares, como para a determinação da concentração de etanol recorre-se à técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) que, após a injeção da amostra no equipamento, fornece um cromatograma

com diversos picos referentes aos açúcares presentes na amostra, permitindo ainda determinar a sua concentração. Mediante os compostos que se querem determinar e a dificuldade em separar alguns açúcares, por apresentarem tempos de retenção muito semelhantes, utiliza-se uma de duas colunas: a Rezex RPM – Monossaccharide  $Pb^{2+}$  ou a Rezex ROA – Organic Acid  $H^+$ . A primeira é utilizada, essencialmente, para determinar os diversos açúcares simples, enquanto a segunda é utilizada para determinar o etanol e os ácidos orgânicos.

Esta dissertação é constituída por sete capítulos, sendo eles a introdução, o estado de arte, os materiais e os métodos, a apresentação e discussão de resultados, as conclusões, a bibliografia e os anexos I e II, onde se descrevem, de forma pormenorizada, os procedimentos efetuados. Nos anexos III e IV apresentam-se as tabelas de resultados obtidos na hidrólise enzimática e na sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF), respetivamente. No anexo V – Segurança, apresentam-se os compostos químicos utilizados ao longo deste trabalho experimental, os perigos que representam e os respetivos cuidados que se devem ter, pois é imprescindível ter o conhecimento desta informação quando se trabalha num laboratório.

O estado de arte é dedicado à biomassa, à produção de pasta e à produção de etanol: apresentam-se os constituintes da biomassa lenhocelulósica, realçam-se as aplicações de elevado valor acrescentado, como a produção de pasta, e descrevem-se as diversas etapas para a produção de etanol. Os diversos processos de pré-tratamento da biomassa (biológicos, mecânicos, químicos e físico-químicos) são apresentados e explicados, seguindo-se a descrição da hidrólise enzimática e da fermentação, com a enumeração dos diversos processos de fermentação. No capítulo dos materiais e métodos expressam-se os diversos procedimentos efetuados. No capítulo seguinte apresentam-se os resultados obtidos e a respetiva discussão. Finalmente, no último capítulo, antes da bibliografia, destacam-se as conclusões obtidas, assim como os futuros trabalhos a desenvolver.



## 2. Estado da Arte

### 2.1. Biomassa

A biomassa é maioritariamente produzida pelas plantas que contêm grandes quantidades de energia armazenada proveniente do sol. Tal acontece pelo processo designado por fotossíntese, que utiliza a energia solar para transformar o dióxido de carbono em hidratos de carbono, isto é, em açúcares e celulose.<sup>[3]</sup> Esta tem sido considerada como o único recurso orgânico sustentável na Terra e equivalente ao petróleo para a produção de combustíveis e produtos químicos com zero emissões de carbono.<sup>[4]</sup> Não se produz um aumento líquido das emissões de dióxido de carbono, pois à medida que as plantas se desenvolvem, estas removem-no da atmosfera.<sup>[3]</sup> Sendo a biomassa lenhocelulósica bio-renovável e abundante na Terra, com excelentes propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade, apresenta um importante papel por ser uma plataforma alternativa aos recursos fósseis, mas também por permitir a produção de biomoléculas e biomateriais.<sup>[4]</sup>

A biomassa lenhocelulósica, comparativamente com outro tipo de biomassa, não entra em competição direta com a indústria alimentar, tratando-se de uma vantagem crucial, uma vez que não levanta críticas do ponto de vista ético. Economicamente, esta também apresenta menores custos e menor tempo de produção. Além disso, a grande quantidade de resíduos lenhocelulósicos provenientes da agricultura, da agroindústria, de resíduos urbanos e da exploração florestal podem ser convertidos em energia ou em produtos de elevado valor acrescentado, de modo a não criarem problemas ambientais pelo seu abandono. A biomassa lenhocelulósica é uma matéria-prima limpa e barata para a obtenção de energia e de químicos, que existe em grandes quantidades e que não depende do local geográfico, assim como permite o melhoramento da economia local com o seu cultivo.<sup>[5][6]</sup> No entanto, a biomassa lenhocelulósica apresenta resistência à degradação enzimática e química, o que exige a modificação física e química das propriedades da matriz lenhocelulósica, recorrendo-se a processos de pré-tratamento que, por vezes, são muito dispendiosos, tanto a nível energético, como a nível operacional.<sup>[4]</sup>

A biomassa lenhocelulósica apresenta como elementos químicos cerca de 50% de carbono (C), 6% de hidrogénio (H<sub>2</sub>), 44% de oxigénio (O<sub>2</sub>) e alguns traços de metais iónicos.<sup>[7]</sup> O conhecimento da sua composição química (componentes fundamentais e complementares) é essencial para saber a finalidade mais adequada. Os componentes fundamentais são parte integrante das paredes da fibra e da lamela média, sendo eles a celulose, as hemiceluloses e a

lenhina, que estão representadas em maiores quantidades. O conjunto da celulose e das hemiceluloses – holoceluloses – constitui a quantidade total de polissacarídeos, que representam entre 65 a 75% da madeira. Os componentes complementares, em pequenas quantidades, são constituídos por cinzas e extrativos, sendo o teor deste último (4 a 10%) um dos mais importantes indicadores de conformidade da biomassa.<sup>[7][8]</sup>

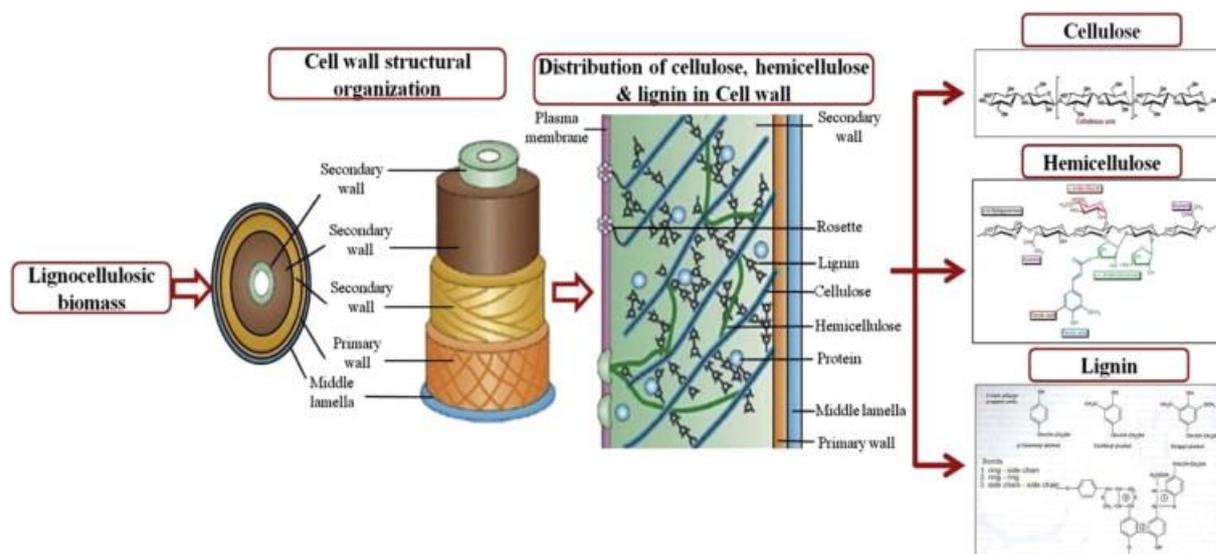


Figura 2.1 - Estrutura da biomassa lenhocelulósica (adaptado de MENON & RAO, 2012).

A composição química de cada constituinte varia consoante o local na árvore, ou seja, a raiz, o tronco ou os ramos; e com a localização geográfica, o clima e as condições do solo.<sup>[7]</sup> Além disso, varia também de espécie para espécie («softwood» ou «hardwood») e dentro da mesma espécie. As «softwoods» ou resinosas correspondem a árvores coníferas, sendo, portanto, gimnospermas. Apresentam fibras com um comprimento entre 2 e 5 mm (fibra «longa»), sendo, no geral, menos densas. Contêm uma textura regular e um cheiro perfumado, apresentam menor resistência ao fogo, são mais elásticas e apresentam uma fraca resistência ao cisalhamento. As «softwoods» apresentam anéis anuais distintos e anéis medulares não distintos e contêm uma maior quantidade de hemiceluloses. Alguns exemplos destas espécies são o pinheiro, o abeto e o cedro. Já as «hardwoods» ou folhosas, que corresponde a uma das matérias-primas a utilizar-se ao longo deste estudo, são angiospermas. Estas apresentam fibras com um comprimento inferior a 2 mm (fibra «curta»), sendo, no geral, mais densas e duras. Não apresentam anéis anuais distintos, ao contrário dos anéis medulares que o são e contêm um maior teor de celulose. Apresentam boa resistência à tensão e ao cisalhamento e são mais resistentes ao fogo. Algumas espécies de «hardwoods» são centenárias. Como exemplos de «hardwoods» tem-se o choupo e o eucalipto, principalmente o *Eucalyptus globulus*, espécie bastante comum em Portugal.<sup>[8][9][10]</sup>

### 2.1.1. Celulose

O maior constituinte da biomassa lenhocelulósica é a celulose, um polímero de cadeia longa linear de unidades de anidroglicose com ligação  $\beta$ -1,4. A unidade de repetição da celulose é a celobiose, que se trata de um dissacarídeo da glicose. Trata-se de um homopolissacarídeo que se encontra na parede celular das plantas, predominantemente nas células da parede secundária, e que confere o suporte estrutural destas espécies.<sup>[7][9][11][12]</sup> O material lenhocelulósico contém entre 35 a 50% de celulose que, no caso das «hardwoods», representa 41 a 46%. As cadeias da celulose mantêm-se juntas por ligações de hidrogénio intermoleculares, apesar de haver uma forte tendência à formação de ligações de hidrogénio intramoleculares, o que confere uma maior rigidez à celulose, assim como a torna insolúvel e resistente à maioria dos solventes orgânicos.<sup>[13][14]</sup> Esta insolubilidade da celulose à maioria dos solventes dificulta o seu isolamento na forma pura, uma vez que está associada com a lenhina e com as hemiceluloses.<sup>[7]</sup> Já a forte tendência à formação de ligações de hidrogénio intra e intermoleculares são provenientes da elevada reatividade do grupo hidroxilo (-OH). Assim, a associação das cadeias de celulose forma microfibrilas que, por sua vez, se associam para formar fibrilas e estas associam-se para construir a parede da fibra e, portanto, a celulose apresenta uma estrutura cristalina alternada com zonas amorfas, com um grau de cristalização elevado que ronda entre os 50 e os 70%. As zonas amorfas da celulose estão mais suscetíveis à degradação enzimática. Possui um grau de polimerização elevado, rondando as 10 000 unidades na madeira. A sua fórmula química é  $(C_6H_{10}O_5)_n$  e a estrutura da cadeia polimérica está representada na Figura 2.2.<sup>[11][15]</sup>

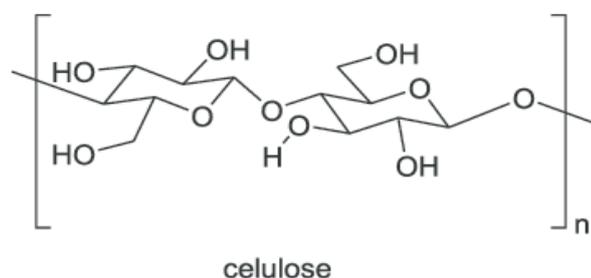


Figura 2.2 - Estrutura polimérica da celulose (adaptado de Junior et al., 2006).<sup>[16]</sup>

### 2.1.2. Hemiceluloses

A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante e representa 25 a 35% da biomassa lenhocelulósica, no caso das «hardwoods».<sup>[15]</sup> Não é quimicamente homogéneo como a celulose, mas é facilmente solúvel por bases e facilmente hidrolisado por ácidos. A

hemicelulose apresenta menor peso molecular que a celulose (com grau de polimerização entre 50 a 300 unidades) e possui ramificações com cadeias laterais curtas que consistem em diversos açúcares. As hemiceluloses são misturas de polissacarídeos sintetizados na madeira provenientes de pentoses, como a xilose, a arabinose e a ramnose; de hexoses, como a glucose, a manose e a galactose; e de ácidos urónicos. A presença de ramnose é mais acentuada nas «hardwoods».<sup>[7][9][11]</sup> Assim, a hemicelulose é composta por uma mistura complexa de polissacarídeos – heteropolímeros –, alguns lineares e outros ramificados, como glucuronoxilanas, glucomananas, arabinogalactanas, arabinoglucuronoxilanas e galactoglucomananas. A composição varia mediante se se trata de uma «hardwood» ou de uma «softwood». As «hardwoods» contêm i) 2 a 5% de glucomananas, compostas por unidades de  $\beta$ -D-glucopiranosose e de  $\beta$ -D-manopiranosose, cuja razão glucose:manose varia entre 1:2 e 1:1, consoante a espécie; ii) 15 a 30% de glucuronoxilanas, que consistem em estruturas lineares de unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosose com ramificações de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurónico e de  $\alpha$ -L-arabinofuranose. Como as hemiceluloses têm zonas amorfas, uma configuração irregular e ramificada e uma baixa massa molecular, absorvem facilmente água, isto é, são hidrofílicas, contribuindo por isso para o intumescimento, a mobilidade interna e o aumento da flexibilidade da fibra.<sup>[7][11][16]</sup> A hidrólise ácida pode levar à formação de produtos de degradação das hemiceluloses, como o furfural, que vai inibir, posteriormente, os processos de fermentação.<sup>[9]</sup>

### 2.1.3. Lenhina

A lenhina é o terceiro polímero mais abundante na natureza e representa 10 a 20% da biomassa lenhocelulósica. Trata-se de uma estrutura molecular muito complexa (Figura 2.3.a)), um polímero fenólico de cadeia longa, que une as fibras entre si. A lenhina é hidrofóbica, insolúvel em água e tem uma elevada massa molecular.<sup>[15]</sup> No entanto, a lenhina exibe alguma solubilidade com solventes, como dioxano ( $C_4H_8O_2$ ), acetona ( $C_3H_6O$ ), 2-metoxietanol ( $C_3H_8O_2$ ), tetra-hidrofurano ( $C_4H_8O$ ), dimetilformamida ( $C_3H_7NO$ ) e dimetilsulfóxido ( $C_2H_6OS$ ).<sup>[18]</sup> Esta apresenta diversos precursores para a sua biossíntese, que estão representados na Figura 2.3.b), onde I corresponde ao precursor da lenhina nas gramíneas; II corresponde ao precursor dominante da lenhina das «softwoods», embora também se encontre na lenhina das «hardwoods»; e III corresponde ao precursor na lenhina das «hardwoods».<sup>[7]</sup> Além disso, a lenhina apresenta vários tipos de ligações entre as diferentes unidades monoméricas, como  $\beta$ -O-4,  $\alpha$ -O-4,  $\beta$ -5, 5-5, 4-O-5,  $\beta$ -1 e  $\beta$ - $\beta$ . Esta está presente na parede celular das plantas e confere rigidez e oferece resistência ao ataque microbiano e à ação oxidativa, assim como confere impermeabilidade.<sup>[9]</sup>



## 2.2. Produção de pasta e de papel

A biomassa lenhocelulósica tem vindo a ser estudada em diversas atividades e cada vez mais se verifica que esta matéria apresenta muitas finalidades de valor acrescentado. Exemplos de aplicações da biomassa lenhocelulósica como matéria-prima são os processos de produção de pasta e papel, de produção de bioetanol, entre outros.

A indústria da pasta e do papel tem provocado um impacto cada vez mais significativo na economia, principalmente a portuguesa, com a grande utilização da madeira do eucalipto como principal matéria-prima, espécie florestal que ocupa uma área de 812 mil hectares em Portugal continental, sendo seguida por 737 mil hectares de sobreiro e 714 mil hectares de pinheiro bravo (Celpa 2016).<sup>[19]</sup>

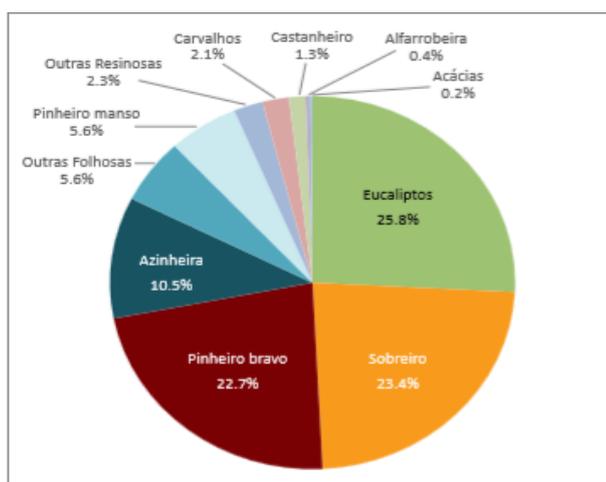


Figura 2.4 - Distribuição da área de povoamentos florestais, por espécie dominante, em Portugal continental, em 2010 (adaptado de CELPA, 2016).<sup>[19]</sup>

A Associação da Indústria Papeleira, CELPA, que resulta da fusão entre a Associação das Empresas Produtoras de Pasta de Celulose (ACEL) e a Associação Portuguesa de Fabricantes de Papel e Cartão (FAPEL), tem a si associada quatro empresas – Grupo Altri, Europac, Renova e The Navigator Company – que são responsáveis por 100% da produção nacional de pastas para papel de fibra virgem e cerca de 80% da produção nacional de papéis, consumindo-se cerca de 7 milhões de metros cúbicos de madeira de eucalipto, cuja aquisição e consumo em 2016 aumentaram 2,8 e 0,5%, respetivamente.<sup>[19]</sup>

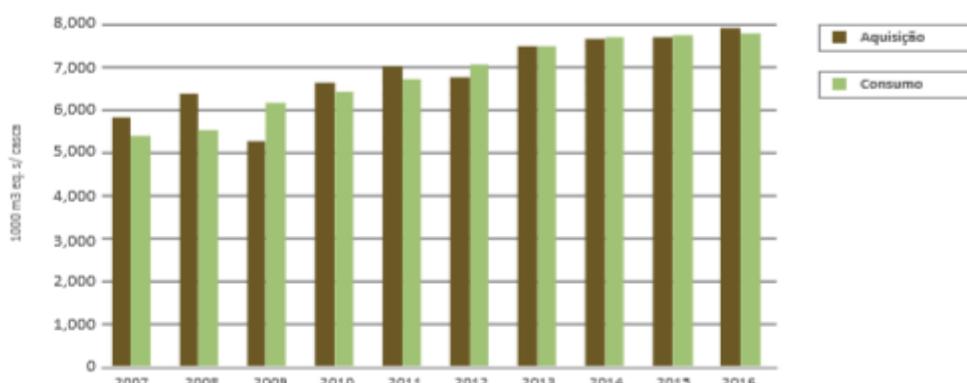


Figura 2.5 - Aquisição e consumo de madeira de eucalipto (adaptado de CELPA, 2016).<sup>[19]</sup>

Segundo a CELPA, em 2016, o setor da pasta e do papel foi favorecido pelo crescimento económico, em que a produção de pasta de fibra virgem aumentou 2,5%, fixando-se em 2 729 mil toneladas, proveniente da subida de 2,5% da pasta de eucalipto e de 2,7% da pasta de pinho. Com isto, em Portugal, o volume de vendas destas empresas, no ano de 2016, fixou-se nos 2,54 mil milhões de euros, que corresponde a 1,37% do Produto Interno Bruto (PIB).<sup>[19]</sup>

### 2.3. Produção de bioetanol

O bioetanol é o combustível líquido sustentável e renovável, do qual se espera um futuro bastante promissor na prevenção da crise energética global e na qualidade do ambiente.<sup>[2]</sup> Trata-se de um combustível alternativo aos já existentes provenientes do petróleo, que recorre a recursos renováveis e biodegradáveis. Espera-se que, com a sua produção e utilização, haja uma redução da dependência dos recursos não renováveis. Os maiores impedimentos para o desenvolvimento de processos comerciais do bioetanol passa pela limitação das técnicas e das tecnologias utilizadas e dos custos associados.<sup>[20]</sup>

Apesar do custo de produção do bioetanol ser muito superior ao dos combustíveis provenientes do petróleo, a utilização do bioetanol no setor automóvel é bastante atraente, pois o seu elevado índice de octanas (108) permite que o bioetanol seja um combustível favorável a ser utilizado em motores de combustão interna, prevenindo a detonação do motor e a ignição precoce, o que leva a altos valores de anti-detonação. Embora o bioetanol tenha um teor de energia 68% menor, comparativamente ao da gasolina, o seu alto teor de oxigénio torna a combustão mais limpa, o que resulta numa menor emissão de substâncias tóxicas. O bioetanol também ajuda à redução das emissões de CO<sub>2</sub> até 80%, comparativamente ao uso de gasolina, promovendo assim um ambiente mais limpo.<sup>[2]</sup>

Nestes últimos anos, tem-se estudado a produção do bioetanol com origens distintas, denominando-se bioetanol de primeira, de segunda e, ainda, de terceira geração, consoante a origem da matéria-prima.

O bioetanol de primeira geração é o biocombustível que, hoje em dia, existe em consideráveis quantidades nos mercados. Corresponde ao etanol de cana-de-açúcar e ao etanol à base de amido ou de milho. A sua produção encontra-se num estado de desenvolvimento pleno relativamente ao processamento e às infraestruturas. No entanto, a sua produção e utilização têm sido alvo de diversas críticas do ponto de vista ético, não só pelo desvio das culturas alimentares, como também das possíveis consequências que provoca no ambiente e nas alterações climáticas.<sup>[21]</sup>

O bioetanol de segunda geração é o biocombustível produzido a partir da celulose e hemiceluloses existentes no material lenhocelulósico. A sua produção está ainda em fase piloto ou de demonstração e, portanto, ainda está pouco desenvolvido comercialmente. O principal obstáculo é o elevado custo de investimento inicial, bem como os maiores custos do produto final, em comparação com os combustíveis fósseis ou muitos biocombustíveis de primeira geração.<sup>[21]</sup> No entanto, não se pode negar que a sua aplicação tem um enorme potencial, se implementado globalmente, uma vez que traz mais benefícios a nível ambiental. Os materiais lenhocelulósicos não competem com a indústria alimentar e permitem que a eficiência de utilização dos terrenos seja mais elevada. A utilização do *Eucalyptus globulus* na produção de combustíveis e de químicos tem sido realçada, devido ao seu crescimento rápido, às suas propriedades favoráveis e à presença elevada de celulose.<sup>[2][22]</sup>

O processo de obtenção de bioetanol a partir de material lenhocelulósico é composto por diversas etapas sequenciais, sendo elas o pré-tratamento, a hidrólise enzimática do material pré-tratado, a fermentação e a destilação. O percurso de produção efetuado influencia a produtividade do bioetanol.<sup>[22]</sup> Ao longo deste trabalho experimental pretende-se efetuar apenas três das quatro etapas – pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação.

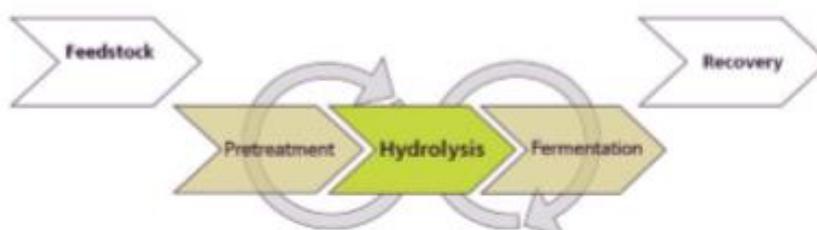


Figura 2.6 - Processo de produção de bioetanol celulósico (adaptado de Novozymes).<sup>[23]</sup>

### 2.3.1. Pré-tratamento

Os principais objetivos do processo de pré-tratamento, como inicializador da produção de biocombustíveis, são aumentar a área de superfície acessível, com a redução das dimensões do material; reduzir o grau de cristalinidade da matriz da celulose; despolimerizar parcialmente a celulose; solubilizar hemiceluloses e/ou lenhina; modificar a estrutura da lenhina; maximizar a digestão enzimática do material pré-tratado; minimizar as perdas de açúcares; e minimizar os custos operacionais e de capital.<sup>[24]</sup> É um processo bastante recomendado e caracterizado como um processo eficiente quando obedece aos seguintes critérios: preserva a fração de hemiceluloses, permite atingir o máximo rendimento de açúcares fermentáveis, previne a degradação prematura dos açúcares; previne a formação de inibidores tanto da hidrólise, como da fermentação; e permite diminuir os custos de processamento e o consumo de energia convencional.<sup>[11]</sup>

Nos materiais lenhocelulósicos, o pré-tratamento serve para a degradação dos componentes rígidos e para a redução do grau de cristalinidade, de maneira a destruir a camada da lenhina que envolve a celulose, ficando esta mais suscetível à hidrólise enzimática para converter em açúcares fermentáveis. Mediante o tipo de pré-tratamento utilizado, os resultados obtidos vão variar, recorrendo-se, por diversas vezes, à combinação de vários métodos de pré-tratamento. Assim, estes métodos estão categorizados segundo pré-tratamentos químicos, biológicos, mecânicos e físico-químicos.<sup>[2]</sup>

#### 2.3.1.1. Pré-tratamento químico

O pré-tratamento químico é a técnica mais utilizada e desenvolvida nesta área, principalmente para a deslenhificação de materiais celulósicos.<sup>[11]</sup> Recorre à utilização de substâncias químicas, cujo objetivo passa por modificar o material lenhocelulósico da melhor forma para o processo de hidrólise.<sup>[2]</sup>

Ao contrário das enzimas, as substâncias químicas são fáceis de obter, são mais baratas e não apresentam tantos problemas de armazenamento. As substâncias químicas degradam a parede lenhocelulósica por meio de uma reação química direta que requer pouca energia.<sup>[2]</sup> Assim, este método permite degradar a hemicelulose, remover a lenhina e, conseqüentemente, a relaxação estrutural da rede lenhocelulósica.<sup>[24]</sup>

Existem vários ácidos utilizados neste tipo de pré-tratamento, cujos mais populares em materiais lenhocelulósicos são o ácido clorídrico (HCl), o ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), o ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) e o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Por vezes, também se utilizam ácidos orgânicos,

como o ácido peracético ( $C_2H_4O_3$ ), o ácido maleico ( $C_4H_4O_4$ ), o ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ ) e o ácido acético ( $C_2H_4O_2$ ).<sup>[2]</sup>

O processo de pré-tratamento com ácido pode ser desenvolvido por dois métodos: concentrado ou diluído. O pré-tratamento com ácido concentrado requer temperaturas moderadas, o que, conseqüentemente, leva a uma diminuição dos custos energéticos, e requer também pouco tempo para a produção de monossacarídeos pela degradação das ligações glicosídicas dos polissacarídeos. No entanto, este método requer elevadas concentrações (30 a 70% (m/m)), das quais decorrem algumas desvantagens como a formação de inibidores à fermentação microbial (tais como, furfural, ácido carboxílico, ácido acético, furano, entre outros), a rápida corrosão do equipamento, os elevados custos de manutenção, a tendência para a degradação dos monossacarídeos e, depois do pré-tratamento, a necessidade de neutralizar o hidrolisado antes da fermentação.<sup>[11][24]</sup> O pré-tratamento com ácido diluído conduz ao mesmo resultado que o pré-tratamento com ácido concentrado, embora se comporte de modo diferente: pode ser efetuado através de um processo descontínuo com baixa temperatura (menos que  $160^\circ C$ ) e com elevada carga de substratos (10 a 40% (m/m)) ou através de um processo contínuo com temperatura elevada (mais que  $160^\circ C$ ) e com baixa carga de substratos (5 a 10% (m/m)). Este método de pré-tratamento é bastante popular na produção de bioetanol a partir de material lenhocelulósico.<sup>[2]</sup> Comparando estes dois métodos, o mais interessante de se utilizar em escala industrial é o pré-tratamento com ácido diluído, uma vez que o método com ácido concentrado tem a si associado mais problemas ambientais e maiores custos operacionais. Além disso, o método com ácido diluído consegue resolver alguns problemas que o método com ácido concentrado apresenta, como a recuperação do ácido, a toxicidade e a especial manutenção contra a corrosão dos materiais. Estes dois métodos são bastante aplicados em material herbáceo, em «hardwoods» e em resíduos agrícolas. A maior desvantagem destes métodos é a formação de produtos secundários inibidores que podem diminuir o rendimento de açúcares devido à conversão de alguns monossacarídeos em furfural e em hidroximetilfurfural, interferindo assim com o processo de fermentação etanólica.<sup>[11]</sup>

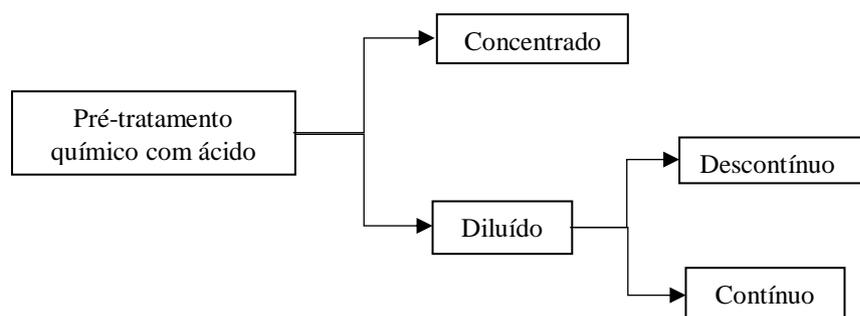


Figura 2.7 - Pré-tratamentos químicos com ácido.

Além do pré-tratamento com ácido, também existe o pré-tratamento alcalino que é um processo de deslenhificação, onde uma quantidade significativa de hemiceluloses é solubilizada, recorrendo-se a bases como hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), hidróxido de potássio (KF), hidróxido de amónio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) e hidróxido de sódio combinado com peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).<sup>[11][24]</sup> Permite a recuperação de sais cáusticos. É aplicado a material lenhocelulósico agrícola, como a palha de milho, o capim, o bagaço, o trigo e a palha de arroz, e ainda a «hardwoods» e «softwoods». A ação da hidrólise alcalina passa pela saponificação das ligações éster intermoleculares das xilanas e de outros componentes, ocorrendo menor degradação de monossacarídeos. O tratamento alcalino de materiais lenhocelulósicos causa a turgescência, o que leva ao aumento da área de superfície interna, a diminuição do grau de polimerização e de cristalinidade, a quebra de ligações entre a lenhina e os hidratos de carbono e a disrupção da estrutura da lenhina, permitindo que a celulose e as hemiceluloses fiquem mais suscetíveis à degradação enzimática.<sup>[24]</sup> Enquanto o pré-tratamento ácido se foca na degradação da maioria das hemiceluloses, o pré-tratamento alcalino atua na degradação da maioria da lenhina.<sup>[2]</sup> A eficácia deste tipo de tratamento depende do substrato e das condições de operação.<sup>[24]</sup> Relativamente às bases utilizadas, o  $\text{NH}_4\text{OH}$  é aplicado como agente de pré-tratamento alcalino para a produção de bioetanol de segunda geração. O  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  permite um melhor acesso enzimático na hidrólise. Já o NaOH permite um maior aumento da superfície interna (por turgescência), o que leva a uma maior degradação da lenhina. Além disso, a sua utilização resulta numa maior porosidade, o que, conseqüentemente, permite um maior rendimento de glucose depois da hidrólise enzimática, pelo ataque às ligações ésteres. É preferível a aplicação de NaOH diluído do que concentrado, visto que origina mais benefícios ambientais e económicos.<sup>[2]</sup>

Outro processo é a deslenhificação oxidativa que provoca a deslenhificação e a turgescência da celulose, melhorando significativamente a sacarificação enzimática. Neste processo, a degradação da lenhina é feita pela enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Esta opera em regime contínuo com elevada carga de biomassa e baixa carga de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este tipo de tratamento tem sido aplicado a uma vasta variedade de biomassa, apesar de ser um método pouco explorado comparativamente a outros métodos de pré-tratamento.<sup>[24]</sup>

A ozonólise é um tratamento que utiliza o ozono para degradar a fração de lenhina e de hemiceluloses do material lenhocelulósico. Este composto é um forte oxidante, solúvel em água

e altamente reativo a componentes que incorporem ligações duplas conjugadas e grupos funcionais com alta densidade de elétrons. O constituinte da biomassa mais suscetível à oxidação é a lenhina, devido à grande quantidade de ligações duplas carbono-carbono (C=C). As suas vantagens são a eficácia na remoção de lenhina, a não produção de resíduos tóxicos nos processos a jusante e as reações ocorrerem à temperatura e pressão ambiental. No entanto, este processo requer uma grande quantidade de ozono, tornando-se um processo caro.<sup>[24]</sup>

Por vezes, recorre-se ao processo «Organosolv» que é um pré-tratamento químico que dissolve a lenhina e as hemiceluloses da biomassa lenhocelulósica. Este método é realizado misturando-se solventes orgânicos com um catalisador inorgânico, tal como NaOH, HCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, que promove a quebra da ligação entre lenhina-lenhina e hidratos de carbono-lenhina. Quando a lenhina é removida, a área de superfície e o volume aumentam consideravelmente, facilitando a acessibilidade da enzima e, conseqüentemente, melhorando a eficácia do processo de fermentação de açúcares. Este método utiliza pequenas quantidades de químicos para neutralizar o hidrolisado e gera uma pequena quantidade de resíduos comparativamente com outros processos. Este método deve ser utilizado com extremo cuidado, uma vez que os solventes orgânicos utilizados – etanol, metanol, fenol, acetona, trietileno glicol e etileno glicol – são combustíveis. Apesar da sua elevada eficiência na produção de bioetanol e, portanto, ser o método mais promissor, este é considerado impraticável industrialmente devido ao elevado custo dos solventes.<sup>[2][24]</sup>

Ainda em estudo, surge o pré-tratamento com líquidos iônicos, considerados reagentes «verdes», que fraturam as estruturas de associação entre as hemiceluloses, lenhina e celulose. Em comparação ao pré-tratamento ácido e alcalino, este permite uma hidrólise enzimática 16,7 vezes mais eficiente, pois os líquidos iônicos conferem uma maior exposição à área superficial, uma menor cristalinidade à celulose e permitem obter menos lenhina. No entanto, o seu efeito na utilização de enzimas e de microrganismos fermentativos é ainda pouco conhecido. Além disso, a recuperação dos líquidos iônicos é bastante complicado, o que pode encarecer o processo.<sup>[2]</sup>

#### 2.3.1.2. *Pré-tratamento biológico*

O pré-tratamento biológico requer microrganismos que tenham a capacidade de degradar os componentes lenhocelulósicos, sendo uma alternativa para o pré-tratamento químico.<sup>[24]</sup>

Os microrganismos típicos usados para alterar a estrutura do material lenhocelulósico são os fungos da podridão castanha, da podridão mole e da podridão branca. A podridão

castanha é capaz de degradar a celulose, enquanto a podridão mole e a podridão branca são capazes de degradar a celulose e a lenhina. No entanto, o agente de pré-tratamento biológico mais evidenciado é a podridão branca.<sup>[2]</sup> Estes microrganismos contêm enzimas que degradam a lenhina, como as peroxidases e as lacases.<sup>[24]</sup>

Este tipo de pré-tratamento é favorável à sustentabilidade do ambiente, pois requer condições ambientais moderadas e, portanto, não necessita de energia adicional excessiva. Além disso, como não recorre a produtos químicos, trata-se de um processo seguro.<sup>[2]</sup> No entanto, este método apresenta diversas desvantagens como baixa eficiência, considerável perda de hidratos de carbono, longo tempo de residência e requerer um cuidadoso controlo das condições de crescimento.<sup>[24]</sup> Além disso, a maioria dos microrganismos consome não só a lenhina, como também uma considerável fração de hemiceluloses e de celuloses. Resumindo, esta abordagem não é favorável à grande escala industrial.<sup>[2]</sup> No entanto, alguns estudos demonstram o interesse de muitos investigadores na utilização de uma abordagem biológica para o processo de pré-tratamento, que permitam ampliar a potencial produção de bioetanol. A utilização de fungos como agentes de pré-tratamento para os materiais ricos em amido é altamente recomendável para a produção de bioetanol de primeira geração.<sup>[2]</sup>

#### *2.3.1.3. Pré-tratamento mecânico*

No pré-tratamento mecânico, o tamanho da biomassa é diminuído através de métodos de corte. Recorre-se a este método de forma a diminuir a cristalinidade da biomassa, melhorando o processo de produção de bioetanol. Esta redução física pode ser feita por fresagem por disco húmido, moagem por esfera, moagem vibratória por esfera, moagem por pressão, moagem por martelos ou moagem por cilindros. Dependendo das técnicas de moagem, a fragmentação mecânica pode proporcionar um aumento de 5 a 25% do produto da hidrólise e um aumento da taxa de hidrólise de 23 a 59%. A maior desvantagem destes métodos é o grande consumo de energia, podendo esta corresponder a 1/3 da energia total aplicada na produção de bioetanol. Para controlar este consumo, uma hipótese pode ser ajustar os tamanhos inicial e final desejado do material.<sup>[2]</sup> O método de moagem por esfera é o mais comum de utilizar, onde o contacto da biomassa com as esferas segundo um movimento cíclico permite reduzir o tamanho das partículas. Além disso, é considerado o método mais favorável para o ambiente, pois não requer a adição de químicos, nem produz inibidores. A sua maior desvantagem é a elevada potência que o equipamento exige e, conseqüentemente, o elevado custo energético.<sup>[24]</sup>

A extrusão é o método de fragmentação mecânica mais avançada. Esta permite aumentar o acesso das enzimas aos hidratos de carbono que ficam mais expostos. Envolve o cisalhamento

e a mistura da matéria-prima que passa através da extrusora a uma certa temperatura, causando deformação da biomassa, física e quimicamente. Este método é reconhecido como um dos métodos de pré-tratamento mais fiáveis para aplicação à escala industrial, sem provocar problemas ambientais.<sup>[2]</sup>

A irradiação por microondas é feita por aplicação de campos eletromagnéticos para provocar o aquecimento interno dos objetos, em vez da transferência superficial de calor, como ocorre no aquecimento convencional. As vantagens deste método são o tempo curto de reação e o aquecimento homogéneo da mistura reaccional.<sup>[24]</sup> Na produção de bioetanol, esta abordagem é exequível para a disrupção da biomassa previamente tratada. No material lenhocelulósico, a radiação micro-ondas ataca as ligações polares, aplicando vibração na estrutura até o material estar internamente aquecido. Assim, a complexa estrutura lenhocelulósica é fraturada, aumentando a área disponível ao subsequente ataque enzimático. Este método é considerado uma ferramenta de apoio a outros métodos de tratamento, de maneira a melhorá-los.<sup>[2]</sup>

#### *2.3.1.4. Pré-tratamento físico-químico*

O pré-tratamento físico-químico com explosão de vapor é um processo termoquímico onde o material lenhocelulósico é exposto a vapor de alta pressão, sendo um processo hidrotérmico combinado com uma súbita mudança da pressão. Este processo requer a adição mínima ou mesmo nenhuma adição de químicos, não provocando problemas ambientais. Inicialmente, uma mistura de biomassa e vapor é mantida a alta temperatura e pressão num reator, promovendo a hidrólise da hemicelulose. O processo termina após ocorrer a rápida depressurização da biomassa.<sup>[2][24]</sup> Normalmente, recorre-se a temperaturas entre os 160 e os 240°C e uma pressão entre 0,7 e os 4,8 MPa.<sup>[24]</sup> Assim, sob altas temperaturas, ocorre a auto-hidrólise dos grupos acetilos que existem nas hemiceluloses, formando ácido acético e acidificando a água. Como tal, a explosão de vapor é mais benéfica para a biomassa rica em hemiceluloses, pois produz uma elevada solubilização destas, conseguindo uma elevada recuperação de xilose (45 a 65%) com um menor uso de energia e, portanto, mais favorável económica e ambientalmente. Desta forma, este processo é bastante aconselhável para a produção de bioetanol. No entanto, a formação de inibidores, como sub-produto deste método, é um dos maiores desafios, pois estes conseguem perturbar a atividade microbiana e, consequentemente, influenciar a etapa de fermentação.<sup>[2]</sup>

Outro método físico-químico é o pré-tratamento com explosão de fibra com amónia (AFEX), que apresenta um princípio muito semelhante ao pré-tratamento com explosão de

vapor, mas, neste caso, o agente de explosão é a amónia. Este processo depende do aumento imediato de pressão, forçando a amónia a romper a estrutura da biomassa e deixando nesta alguns vestígios, o que acaba por ser uma vantagem, uma vez que passa a ser uma fonte de azoto para os microrganismos.<sup>[21]</sup> Outras vantagens deste processo são a eficiente remoção da lenhina; a produção de uma menor quantidade de inibidores; e a retenção de uma quantidade apreciável de hidratos de carbono no substrato. Além disso, trata-se de um processo simples e rápido, sendo a amónia recuperável e reciclável. Durante o processo, a estrutura do material é alterada, resultando no aumento da capacidade de armazenamento de água e no aumento da digestão do substrato através de enzimas, obtendo-se uma elevada recuperação de açúcares. Os parâmetros que influenciam o processo AFEX são a carga de amónia, a temperatura, a pressão, a quantidade de biomassa e o tempo de residência.<sup>[24]</sup>

A explosão com dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) corresponde a um método de pré-tratamento físico-químico, que ocorre de forma similar ao método AFEX e que se baseia na transformação de  $\text{CO}_2$  em ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), aumentando a velocidade de hidrólise do material pré-tratado. Isto é, o aumento da pressão favorece a penetração do  $\text{CO}_2$  na estrutura cristalina do material lenhocelulósico, melhorando a subsequente hidrólise da fração de celulose e de hemiceluloses. Este método apresenta maiores conversões comparativamente ao método de explosão de vapor, maiores custos que o método AFEX e não provoca a produção de inibidores, uma vez que opera a temperaturas médias, prevenindo assim a decomposição intensa de monossacarídeos. Além disso, trata-se de um método não tóxico, não inflamável e que não provoca danos ambientais. No entanto, as suas maiores desvantagens residem na complexidade deste processo.<sup>[24]</sup>

Além destes métodos existe ainda a aplicação de água quente a pressão elevada na biomassa, hidratando a celulose e removendo uma fração de hemiceluloses. A maior vantagem deste método é não utilizar produtos químicos e, conseqüentemente, não é necessário utilizar materiais resistentes à corrosão. Além disso, não requer a redução do tamanho da matéria-prima. A água quente é mantida em contacto com a biomassa durante 15 min, a uma temperatura entre 200 e 230°C. Durante este processo, cerca de 40 a 60% do total da biomassa é dissolvido e as hemiceluloses são removidas em grande extensão.<sup>[24]</sup>

A Tabela 1.1 apresenta os diversos tipos de pré-tratamento do material lenhocelulósico existentes, com as devidas condições de operação e funções.

Tabela 2.1 - Pré-tratamentos da biomassa lenhocelulósica.

<b>Pré-tratamento</b>	<b>Processo</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Biológico		Processo seguro; Não requer energia adicional.	Consome não só lenhina, como hemiceluloses e celulosas; Requer um cuidadoso controlo de condições de crescimento.
Químico	Ácido concentrado	Diminuição dos custos energéticos; Rápida produção de monossacarídeos; Permite degradar lenhina e hemiceluloses.	Formação de inibidores; Rápida corrosão do equipamento; Difícil recuperação do ácido; Maior toxicidade.
	Ácido diluído	Menores problemas ambientais; Menores custos operacionais; Acessível recuperação do ácido; Menor toxicidade.	Formação de produtos secundários inibidores.
	Alcalino	Recuperação de sais cáusticos; Menor degradação dos monossacarídeos; Diminuição do grau de cristalinidade; Disrupção da estrutura da lenhina.	Reagentes mais dispendiosos.
	Deslenhificação oxidativa	Deslenhificação e turgescência da celulose.	
	Ozonólise	Eficiente remoção de lenhina; Condições de operação moderadas (ambiental); Não produz resíduos tóxicos.	Requer grandes quantidades de ozono; Processo dispendioso.
	Organosolv	Dissolve a lenhina e as hemiceluloses; Utiliza pequenas quantidades de químicos; Gera pequenas quantidades de resíduos.	Elevados custos dos solventes; Requer a utilização de solventes combustíveis.
	Líquidos iónicos	Confere menor cristalinidade à celulose; Permite uma maior degradação da lenhina.	Difícil recuperação dos líquidos iónicos.
Mecânico	Moagem	Diminui a cristalinidade da biomassa; Não requer a adição de químicos; Não produz inibidores.	Grande consumo de energia.
	Extrusão	Aumenta o acesso das enzimas aos hidratos de carbono; Não provoca problemas ambientais.	
	Irradiação por microondas	Curto tempo de reação; Aquecimento homogéneo da mistura reacional.	

Físico-químico	Explosão de vapor	Não requer a adição de químicos; Não provoca problemas ambientais; Elevada solubilização das hemiceluloses; Elevada recuperação da xilose; Menor consumo de energia.	Formação de inibidores.
	Explosão de fibra com amónia (AFEX)	Eficiente remoção da lenhina; Produção de uma menor quantidade de inibidores; Retenção de uma quantidade apreciável de hidratos de carbono; Processo simples e rápido.	Requer um aumento imediato da pressão.
	Explosão com CO <sub>2</sub>	Maiores conversões; Não produz inibidores; Método não tóxico e não inflamável.	Maiores custos energéticos.
	Água quente a pressão elevada	Não requer a redução do tamanho da biomassa; Não requer a utilização de químicos; Remoção em grande extensão das hemiceluloses.	

### 2.3.2. Hidrólise

O processo de hidrólise consiste na separação da longa cadeia de hidratos de carbono da celulose, com adição de moléculas de água e que é, normalmente, catalisado por enzimas ou por ácido. Esta etapa é crítica para a produção de bioetanol, uma vez que a qualidade do hidrolisado vai afetar o subsequente processo de fermentação e, portanto, influenciar a produtividade do etanol.<sup>[2]</sup>

Como tal, pode recorrer-se a uma hidrólise ácida ou a uma hidrólise enzimática, tendo em consideração que a enzimática é mais desafiante economicamente devido ao elevado custo das enzimas. No entanto, como as enzimas atuam a temperaturas médias, a hidrólise enzimática não requer elevados custos de operação dos equipamentos, o que não acontece com a hidrólise ácida. Esta última é capaz de degradar gradualmente os monossacarídeos produzidos, o que acaba por ser o maior problema deste tipo de hidrólise.<sup>[2]</sup>

#### 2.3.2.1. Hidrólise enzimática

As enzimas são proteínas com atividade catalítica. As proteínas são polímeros complexos (poliamidas) constituídos por sequências de aminoácidos ligados entre si por uma ligação peptídica. A variedade dos aminoácidos existentes, a sua combinação e a distribuição

especial das cadeias são responsáveis pela diversidade funcional das enzimas. Os aminoácidos são constituídos por 4 grupos diferentes ligados a um carbono C central, sendo eles: grupo amino ( $\text{NH}_3^+$ ), grupo carboxilo ( $\text{COO}^-$ ), átomo de hidrogénio (H) e grupo R variável.<sup>[25]</sup>

Parâmetros como a temperatura e o pH são importantes definir, pois o seu valor influencia a atividade enzimática. A temperatura atua sobre a velocidade da reação enzimática, tal como acontece com qualquer outra reação química. O aumento da temperatura, acima da temperatura de desnaturação, afeta a estrutura terciária da enzima, assim como a estabilidade do complexo enzima-substrato. A estrutura terciária da enzima corresponde à topologia global da molécula desta, resultante dos arranjos estruturais a nível da cadeia peptídica e dos vários tipos de interações que se estabelecem entre as cadeias laterais de aminoácidos próximos. Desta forma, para valores elevados de temperatura, ocorre uma rápida perda da atividade enzimática e, portanto, ocorre a desnaturação da proteína. Já o pH do meio determina as cargas dos aminoácidos que constituem a enzima, que apresentam especial destaque visto que determinam a reatividade das cadeias laterais e, conseqüentemente, as interações determinantes para a estrutura tridimensional das proteínas. Quando o substrato apresenta cargas elétricas, a aproximação deste ao centro ativo da enzima depende igualmente da carga dos resíduos envolvidos na ligação. Como tal, existe um valor de pH para o qual a formação do complexo enzima-substrato é favorecida e o valor da atividade biológica é máximo - pH ótimo. Assim sendo, se a solução se tornar demasiado ácida ou básica, a enzima sofre uma perda da atividade que não recupera quando se reajusta o pH. Já quando a variação do valor do pH é reduzida, em torno do pH ótimo, verifica-se uma variação da atividade reversível.<sup>[25]</sup> Nesta dissertação recorreu-se à solução enzimática Cellic<sup>®</sup> CTec2, fornecida pela Novozymes, cuja temperatura e pH ótimos são 45-50°C e 5,0-5,5, respetivamente.<sup>[23]</sup>

A hidrólise enzimática é a abordagem ideal para decompor a celulose em açúcares simples, visto que opera a condições médias, ou seja, um pH entre 4,8 e 5,0 e uma temperatura entre 45 e 50°C. Além disso, não apresenta problemas de corrosão dos reatores e resulta na formação desprezável de subprodutos com elevado rendimento de açúcar. No entanto, a hidrólise enzimática depende da otimização das condições para a máxima eficiência e sofre de inibição pelo produto final e de restrições estruturais da biomassa. Para superar a inibição pelo produto final e para reduzir o tempo de processamento, pode recorrer-se a uma hidrólise e a uma fermentação combinada, designada por sacarificação e fermentação em simultâneo.<sup>[24]</sup>

A biomassa lenhocelulósica, composta por celulose, hemiceluloses e lenhina, é degradável enzimaticamente. A cristalinidade da celulose afeta o processo de hidrólise, pois quando é elevada, desacelera a velocidade da hidrólise e diminui a adsorção da enzima. A

melhor área para intervir é a zona amorfa da celulose. No entanto, para reduzir a cristalinidade da biomassa, a aplicação do pré-tratamento mecânico é suficiente para esse propósito.

A celulase é a designação genérica da família de enzimas específicas para degradar a celulose. A celulose requer três classes de enzimas celulolíticas mediante tarefas específicas, sendo elas, endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidade. A endoglucanase é formada a partir da 1,4- $\beta$ -D-glucano-hidrolase e ataca as regiões de baixa cristalinidade da fibra da celulose, criando cadeias terminais livres. Isto é, inicia a hidrólise através da ligação  $\beta$ -1,4 da celulose com uma molécula de água e forma pequenas cadeias de terminação livres. A exoglucanase é formada a partir da 1,4- $\beta$ -D-glucanocelobio-hidrolase e atua para degradar a estrutura da celulose, através da alteração das cadeias terminais ao remover as unidades de celobiose. A  $\beta$ -glucosidade hidrolisa a celobiose para produzir glucose. Bactérias (*Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Microbispora*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Ruminococcus*, *Thermomonospora* e *Acetovibrio*) produzem celulases para a hidrólise de materiais celulósicos.<sup>[2][24]</sup>

As enzimas que se utilizam para quebrar as hemiceluloses são mais complexas, apesar de serem mais especificadas para cada propósito. Ao contrário da celulose, as hemiceluloses são mais fáceis de hidrolisar devido à sua estrutura amorfa. Assim, recorre-se a enzimas como xilanase,  $\beta$ -xilosidase, glucuronidase, acetilsterase, galactomanase e glucomanase. Para degradar a xilana recorre-se a enzimas das classes das endo- $\beta$ -1,4-xilanase e das  $\beta$ -xilosidase. As primeiras degradam as longas cadeias da xilana em cadeias mais curtas. Já as segundas, são aplicadas no processo sequencial de redução de oligossacarídeos, onde se produz xilopirranose.<sup>[2][24]</sup>

A lenhina estabelece ligações fortes aos hidratos de carbono, sendo reconhecida por diminuir a acessibilidade das celulases à celulose. Em soluções aquosas, a lenhina tende a ligar-se e a precipitar com proteínas. Além disso, a lenhina inibe a atividade enzimática das celulases, provocando uma hidrólise de baixa eficiência. Isto é, a presença de lenhina na hidrólise não é nada favorável e, como tal, a sua remoção deve ser efetuada ao máximo para que se atinja uma hidrólise da celulose eficaz. Assim, para a produção eficiente de etanol a partir de material celulósico, a remoção de lenhina melhora significativamente a digestão do substrato e, o facto de haver uma pequena quantidade de lenhina, permite uma redução da carga enzimática necessária, ou seja, utilizar uma menor volume de solução enzimática.<sup>[2][24]</sup>

### 2.3.3. Fermentação

A fermentação é um processo crítico para a produção de bioetanol, onde este é produzido diretamente a partir da atividade metabólica do agente de fermentação específico, como uma levedura ou uma bactéria. Corresponde a um processo biológico em que o açúcar é convertido por microrganismos para produzir etanol e CO<sub>2</sub>. Os hidrolisados não são uniformes no que respeita à sua constituição em monossacarídeos, diferentes entre si, e apresentam oligossacarídeos e inibidores ou substâncias de difícil digestão. Teoricamente, a cada kg de glucose consegue-se produzir 0,49 kg de CO<sub>2</sub> e 0,51 kg de etanol.<sup>[2][24]</sup>

Este processo requer condições para os microrganismos se sustentarem, nomeadamente em relação à gama de temperatura e de pH. Os organismos mesófilos utilizados como agentes de fermentação estão confortáveis com temperaturas entre 30 e 38°C, enquanto as bactérias suportam um pH entre 6,5 e 7,5. Já os fungos conseguem resistir em ambientes mais ácidos, com pH entre 3,5 e 5,0. Fatores importantes para o processo de fermentação é a velocidade de crescimento do microrganismo e estabilidade; a tolerância a inibidores, à osmose e ao etanol; e a produtividade.<sup>[2]</sup>

O microrganismo mais utilizado é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que consegue reproduzir-se num meio com um açúcar simples, como a glucose, assim como a partir de um dissacarídeo (sacarose), convertendo hexoses em etanol. Esta levedura apresenta alta resistência ao etanol, consome quantidades significativas de substrato em condições adversas e mostra alta resistência a inibidores presentes no meio. A sua maior desvantagem é não metabolizar a xilose. Relativamente a bactérias, a mais utilizada é a *Zymomonas mobilis* que converte a glucose, a sacarose e a frutose em etanol. Estudos de produção de bioetanol, recorrendo a esta bactéria, mostram um rendimento teórico de etanol de 97%. Tanto a levedura, como a bactéria apresentadas não conseguem fermentar pentoses, como é o caso da xilose. Como tal, exemplos de microrganismos que conseguem fermentá-la são *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* e *Pachysolen tannophilus*. Muitas vezes, recorre-se a microrganismos modificados, ou seja, que sofreram alterações genéticas do seu comportamento e função, de modo a aumentar a capacidade fermentativa.<sup>[2][24]</sup>

Existem três processos de produzir etanol, sendo eles: hidrólise e fermentação em separado (SHF), sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF) e sacarificação e co-fermentação em simultâneo (SSCF).

### 2.3.3.1. Hidrólise e Fermentação em Separado (SHF)

No processo SHF, a hidrólise do material lenhocelulósico e a fermentação dos açúcares a etanol ocorrem em separado. Realizando cada etapa em separado pretende-se otimizar cada etapa e maximizar o aproveitamento da matéria-prima. Assim, o material lenhocelulósico sofre, primeiramente, um pré-tratamento, para de seguida ser hidrolisado enzimaticamente, para produzir os açúcares simples. A solução de açúcares recuperada (hidrolisado) é fermentada a etanol com microrganismos apropriados. O etanol é destilado de seguida.<sup>[2][24]</sup>

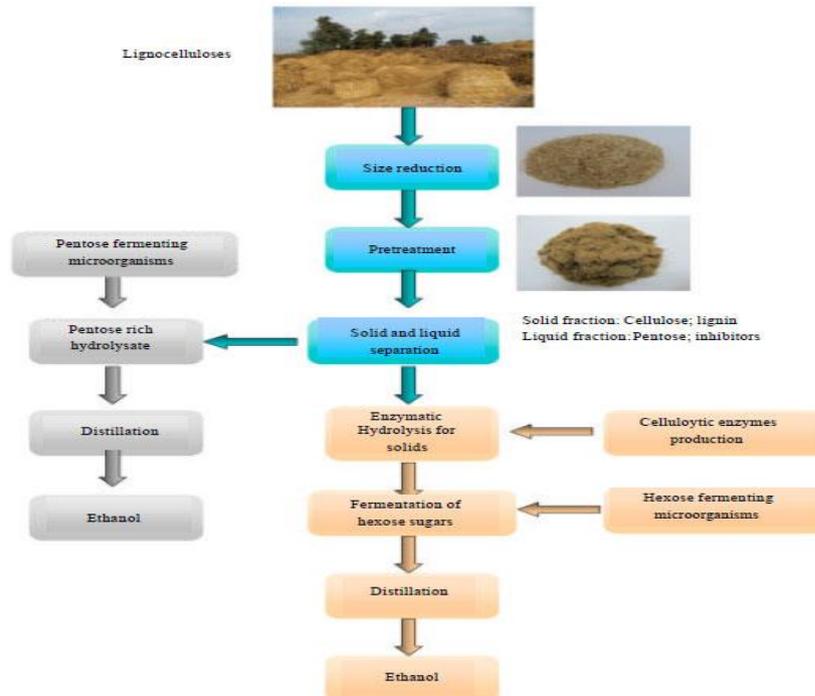


Figura 2.8 - Processo de produção de bioetanol celulósico, recorrendo a uma hidrólise e fermentação em separado (SHF) (adaptado El-Naggar, N.E.A., Deraz, S., Khalil, A., 2014).<sup>[26]</sup>

Para o aproveitamento completo dos açúcares, num primeiro reator efetua-se a fermentação das hexoses. Depois da destilação do etanol, o resto do hidrolisado é escoado para um segundo reator para se efetuar a fermentação das pentoses, seguindo-se a remoção do etanol por destilação.<sup>[2][24]</sup> Desta forma, a glucose do hidrolisado é fermentada separadamente das pentoses, em reatores diferentes. A maior desvantagem deste processo é a formação de inibidores depois da hidrólise, levando a uma redução na velocidade de produção de etanol. Além disso, a este método estão associados elevados custos de capital devido ao número de reatores envolvidos.<sup>[2][27]</sup>

### 2.3.3.2. Sacarificação e Fermentação em Simultâneo (SSF)

No processo SSF, a hidrólise enzimática e a fermentação dos açúcares libertados ocorrem simultaneamente. As enzimas hidrolisam os polissacarídeos para libertar os açúcares que são imediatamente fermentados a etanol, sem que haja qualquer processo de separação entre estas duas etapas.<sup>[2][24]</sup> Neste trabalho experimental efetua-se este processo de fermentação para a produção de bioetanol celulósico.

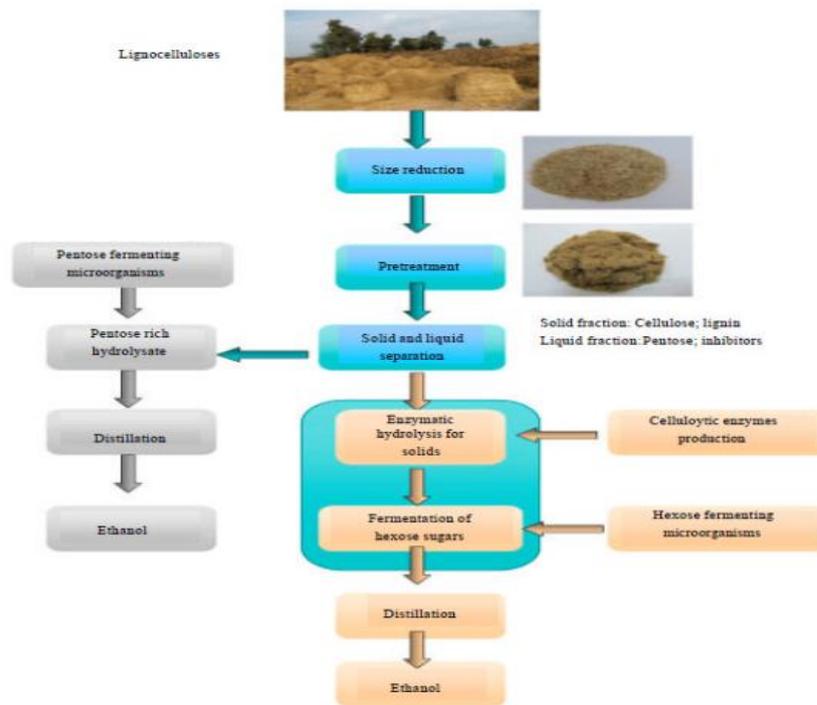


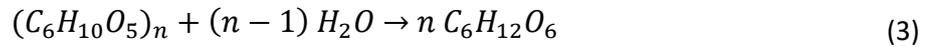
Figura 2.9 - Processo de produção de bioetanol celulósico, recorrendo a uma sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF) (adaptado El-Naggar, N.E.A., Deraz, S., Khalil, A., 2014).<sup>[26]</sup>

Este método é reconhecido por permitir obter elevada produtividade de etanol, uma vez que a eventual inibição pelo açúcar simples intermédio é evitada pelo processo de fermentação imediata, tornando esta abordagem bastante desejável. Além disso, previne a redução dos monómeros formados depois do processo de hidrólise. Estudos revelaram outros benefícios deste processo de SSF, como a aplicação de uma menor quantidade de enzimas, um rápido período de produção e a aplicação de um menor número e menor volume de reatores, o que, conseqüentemente, requer menos custos. Desta forma, verifica-se que através do processo SSF consegue-se atingir uma maior produtividade do que através do processo SHF.<sup>[2][24][28]</sup> Além da concentração de etanol, também é possível determinar a produtividade  $P$  (g/(L.h)) e o rendimento  $Y_{EtOH/açúcar}$  (g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açúcar</sub>), a partir das seguintes expressões, respetivamente.<sup>[28]</sup>

$$P = \frac{[EtOH]_t}{t} \quad (1)$$

$$Y_{EtOH/açúcar} = \frac{[EtOH]_t}{1,1 \times f \times [pasta]} \quad (2)$$

O valor 1,1 corresponde ao fator de conversão da glucose, proveniente da massa molar da celulose e da glucose, tendo em conta a estequiometria da respetiva reação química apresentada:



Onde,

$$\frac{M(C_6H_{12}O_6)}{M(C_6H_{10}O_5)} = \frac{180,16}{162,14} = 1,1 \quad (4)$$

É de realçar o desafio em controlar o ambiente da solução, uma vez que as enzimas e os microrganismos exigem temperatura e pH específicos. A maioria das enzimas encontram-se confortáveis com ambientes de média acidez (pH < 5) e resistem a temperaturas superiores a 40°C. No entanto, estas condições ameaçam a vitalidade de alguns microrganismos.<sup>[2]</sup> Uma triagem do material lenhocelulósico para selecionar o substrato é também a chave para uma produção económica de etanol.<sup>[30]</sup>

#### 2.3.3.3. Sacarificação e Co-fermentação em Simultâneo (SSCF)

No processo SSCF, também as etapas de hidrólise enzimática e de fermentação dos açúcares libertados ocorrem em simultâneo. O que difere em relação ao processo SSF é que, no método em questão, a fermentação da xilose e da glucose ocorrem em conjunto, no mesmo reator.<sup>[24]</sup>

Ao aplicar dois passos ao SSCF, que passa pela hidrólise das xilanas e pela fermentação da xilose antes da glucose, consegue-se melhorar o consumo de xilose. Fermentar a xilose primeiro que a glucose corresponde a uma vantagem, uma vez que alivia o desequilíbrio redox e promove o consumo de xilose devido à presença de oxigénio e outros nutrientes no início, evitando assim a inibição do etanol no consumo da xilose. Portanto, deve-se manter a taxa de libertação de glucose baixa durante o período de fermentação da xilose.<sup>[27]</sup> A xilose e a glucose competem pelo mesmo sistema de transporte responsável pela metabolização destes açúcares em estirpes que os fermentem, como a *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada ou a *Pichia stipitis*. No entanto, a xilose apresenta menor afinidade do que a glucose, o que exige que a concentração de glucose seja baixa, mas não zero, para que se obtenha uma eficiente utilização da xilose.<sup>[31]</sup>

Assim, o SSCF, comparando com o SHF, apresenta diversas vantagens, como a contínua remoção de produtos de hidrólise que inibem as enzimas, o curto período de processamento e o baixo risco de contaminação.<sup>[31]</sup> Além disso, as conversões de açúcares atingidas durante o SSCF são maiores, comparando com as atingidas no processo SHF. Apesar do SSCF apresentar um desempenho superior ao SHF, existem algumas preocupações relativamente ao SSCF, como a discrepância da temperatura ótima entre as enzimas utilizadas na sacarificação e os microrganismos utilizados na fermentação, assim como a inibição das enzimas pelo etanol.<sup>[27]</sup> Já em relação ao processo de SSF, o SSCF também é superior quanto à elevada produtividade e rendimento de etanol.<sup>[31]</sup>

O SSCF trata-se de uma excelente abordagem para manter a concentração de glucose baixa e melhorar a conversão da xilose e, portanto, corresponde a um ótimo processo para a produção de etanol. No entanto, é um processo que ainda não apresenta resultados verdadeiramente satisfatórios em termos de utilização eficiente da xilose e de produção de etanol (concentração e produtividade).<sup>[31]</sup>

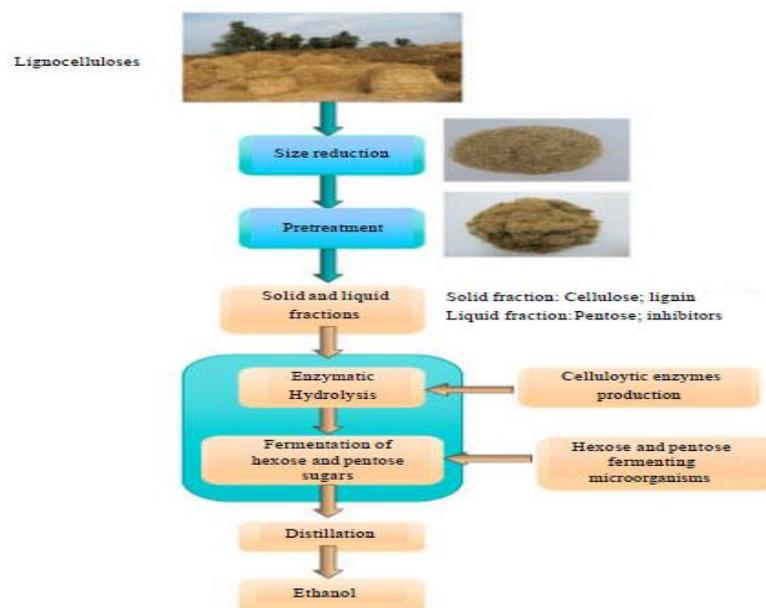


Figura 2.10 - Processo de produção de bioetanol celulósico, recorrendo a uma sacarificação e co-fermentação em simultâneo (SSCF) (adaptado El-Naggar, N.E.A., Deraz, S., Khalil, A., 2014).<sup>[26]</sup>

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Caracterização química do material lenhocelulósico

Como matéria-prima lenhocelulósica usou-se i) pasta kraft de fibra mista virgem, composta por 28% de eucalipto e 72% de pinho, fornecida pela Indústria Papeleira de Viana do Castelo e ii) pasta kraft de casca de eucalipto, fornecida pelo RAIZ. A Figura 3.1 representa as pastas utilizadas neste trabalho de dissertação.

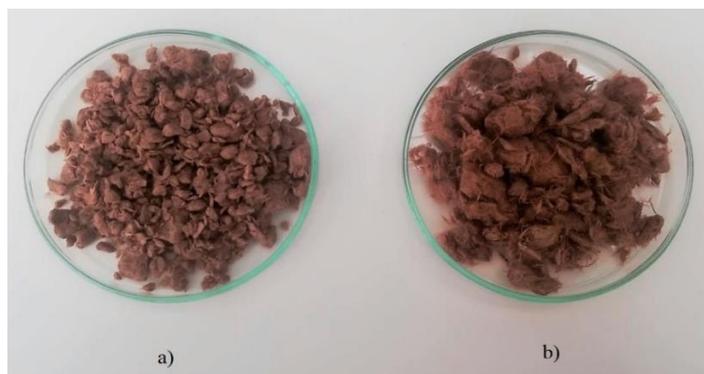


Figura 3.1 a) Pasta de casca de eucalipto. b) Pasta de fibra mista virgem.

A caracterização destas matérias-primas envolveu a determinação do teor de sólidos, do teor de lenhina total (solúvel e insolúvel), do teor de cinzas e do teor de hidratos de carbono, tendo por base os protocolos do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL).<sup>[32]</sup> Além disso, determinou-se o índice kappa das pastas, de forma a estimar rapidamente a quantidade de lenhina total na pasta. Todos os procedimentos utilizados neste trabalho estão, pormenorizadamente, descritos no Anexo I.

Na preparação das amostras, efetuou-se a sua moagem num moinho com um peneiro de 20 mesh (abertura de 0,841 mm), tendo-se depois passado o material obtido num peneiro de 80 mesh (abertura de 0,177 mm). No caso da pasta de fibra mista virgem, antes de se proceder à sua moagem, efetuou-se uma lavagem com água quente, para a remoção de resíduos de «carryover» proveniente da lavagem fabril menos eficiente.

A determinação do teor de sólidos e do teor de cinzas foi feita por gravimetria. No primeiro caso, pesou-se uma amostra antes e após secagem em estufa a 105°C, enquanto no segundo a amostra foi colocada numa mufla a 575°C.

Para a determinação da lenhina total (solúvel e insolúvel) e do teor de hidratos de carbono recorreu-se à hidrólise com ácido sulfúrico. O resíduo, após tratamento ácido, corresponde à lenhina insolúvel (ou lenhina Klason), enquanto a lenhina solúvel foi

determinada por espectrofotometria a um comprimento de onda de 205 nm. A soma da lenhina insolúvel com a lenhina solúvel corresponde à lenhina total presente na amostra. A determinação da concentração dos monossacarídeos no filtrado ácido foi efetuada por HPLC após neutralização do filtrado, seguido de filtração.

O índice kappa foi determinado com recurso à oxidação da pasta com permanganato de potássio, para um consumo deste de ~50% (norma NP 3186). O permanganato remanescente foi determinado por iodometria (adição de iodeto de potássio para gerar iodo, tendo este sido titulado com tiosulfato de sódio).

### 3.2. Hidrólise enzimática e Fermentação

Para os ensaios de hidrólise enzimática a uma temperatura de 50°C, recorreu-se à solução enzimática comercial Cellic<sup>®</sup> CTec2, fornecida pela Novozymes. Fez-se a determinação da atividade enzimática pelo método do Modelo *Filter Paper Unit*, de forma a programar os ensaios, considerando determinados valores de carga enzimática a aplicar – 10 e 15 FPU/g<sub>massa seca</sub>. Estudou-se também o efeito da consistência do material lenhocelulósico: 3, 6 e 9% (massa de material seco em 100 g de suspensão). O «material seco» corresponde à quantidade de hidratos de carbono (HC) presente na amostra.

Nos hidrolisados obtidos efetuou-se a determinação de açúcares redutores e a identificação e quantificação dos monossacarídeos libertados foi realizada por HPLC, usando a coluna Rezex RPM – Monosaccharide Pb<sup>2+</sup>, a operar a 80°C, e utilizando como eluente água ultrapura.

Para determinar os açúcares redutores nos hidrolisados obtidos a partir do material lenhocelulósico, usou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) que é reduzido pelos açúcares redutores. A alteração de cor é analisada pela leitura das absorvâncias num espetrofotómetro com um comprimento de onda de 540 nm e convertida em concentração do açúcar usado para construir a curva de calibração (neste caso em equivalentes de glucose).

No processo SSF, usou-se a solução enzimática Cellic<sup>®</sup> CTec2, fornecida pela Novozymes, e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC<sup>®</sup> 26602<sup>TM</sup>), a uma temperatura de 38°C. Em adição às análises descritas acima, no caso da hidrólise enzimática, determinou-se o etanol e ácidos orgânicos produzidos, por HPLC, usando a coluna Rezex ROA – Organic Acid H<sup>+</sup>, a operar a 60°C, com ácido sulfúrico como eluente.

Todos os procedimentos utilizados estão pormenorizadamente descritos no Anexo II. Além disso, os ensaios relativos à caracterização do material foram efetuados em triplicado, enquanto os ensaios relativos à hidrólise enzimática e ao SSF foram efetuados em duplicado.



## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Caracterização química do material lenhocelulósico

Antes da realização do processo SSF, efetuou-se uma caracterização química do material lenhocelulósico, de modo a se identificar a composição química deste para se averiguar a necessidade de efetuar um pré-tratamento e de identificar as melhores condições de operação dos processos seguintes, como, por exemplo, a enzima e a levedura a utilizar.

Através da Tabela 4.1 verificou-se que o teor de cinzas presente nos materiais lenhocelulósicos é relativamente baixo, de 0,966% no caso da pasta de fibra mista virgem e 1,169% no caso da pasta de casca de eucalipto. O baixo valor deste parâmetro significa que a percentagem de material lenhocelulósico que ficou por incinerar é muito pequena, correspondendo a resíduos indesejados. Logo, ambos os materiais lenhocelulósicos apresentam elevado grau de pureza.

Tabela 4.1 - Teor de cinzas presente nos materiais lenhocelulósicos.

<b>Material lenhocelulósico</b>	<b>m<sub>seca a 40°C</sub> (g)</b>	<b>m<sub>cinzas</sub> (g)</b>	<b>Cinzas (%)</b>	<b>Cinzas<sub>média</sub> (%)</b>
<b>Pasta de Fibra Mista Virgem</b>	1,0289	0,0113	1,0983	0,966
	1,0282	0,0091	0,8850	
	1,0283	0,0094	0,9141	
<b>Pasta de Casca de Eucalipto</b>	0,2058	0,0023	1,1176	1,169
	0,2048	0,0025	1,2207	

Na Tabela 4.2 estão representados os teores de lenhina - solúvel, insolúvel e total – da pasta de fibra mista virgem e da pasta de casca de eucalipto. Verificou-se que o valor da lenhina insolúvel da pasta de fibra mista virgem é muito superior à da pasta de casca de eucalipto (13,22% e 1,48%, respetivamente), apesar de apresentar um teor de lenhina solúvel inferior (0,71% e 1,02%, respetivamente). Assim, a primeira pasta apresenta um elevado teor de lenhina total de 13,93%. Tal era esperado, uma vez que se trata de uma pasta maioritariamente constituída por pinho que corresponde a uma «softwood» e, portanto, contém um maior teor de lenhina. Já a pasta de casca de eucalipto corresponde a uma «hardwood», logo contém um baixo teor de lenhina, como se verificou. Além da origem de cada pasta, ou seja, da espécie que representam, também o tipo de pré-tratamento que estas sofreram, influenciaram o teor de lenhina presente em cada material. Isto é, ambas as pastas sofreram um pré-tratamento kraft, sendo mais intenso na pasta de casca de eucalipto do que na pasta de fibra virgem mista, daí a quantidade de lenhina presente na primeira pasta ser inferior à presente na segunda pasta.

Tabela 4.2 - Teor de lenhina total (solúvel e insolúvel) dos materiais lenhocelulósicos.

<b>Material lenhocelulósico</b>	<b>Lenhina insolúvel (%)</b>	<b>Lenhina solúvel (%)</b>	<b>Lenhina total (%)</b>
<b>Pasta de Fibra Mista Virgem</b>	13,22	0,71	13,93
<b>Pasta de Casca de Eucalipto</b>	1,48	1,02	2,50

Na Tabela 4.3 está representado o índice kappa e a lenhina total de ambas as pastas a serem utilizadas. O valor de cada foi ao encontro do esperado, isto é, que a «hardwood» apresentaria um valor de índice kappa próximo de 15, enquanto a «softwood» apresentaria um valor superior de índice kappa, devido à presença mais acentuada de lenhina. Verificou-se também que a percentagem de lenhina total determinada a partir do IK, é semelhante ao valor desta calculada anteriormente a partir da lenhina solúvel e insolúvel. Relativamente aos ácidos hexenurónicos (HexA), não se teve em conta a sua contribuição no consumo de permanganato de potássio.

Tabela 4.3 - Índice kappa e lenhina total dos materiais lenhocelulósicos.

<b>Material lenhocelulósico</b>	<b>m<sub>húmida</sub> (g)</b>	<b>V<sub>branco</sub> (mL)</b>	<b>V<sub>titulante</sub> (mL)</b>	<b>IK<sub>medio</sub></b>	<b>LT (%)</b>
<b>Pasta de Fibra Mista Virgem</b>	0,6446		2,49		
	0,3456	19,89	8,85	66,73	10,01
	0,3055		10,04		
<b>Pasta de Casca de Eucalipto</b>	1,0637		10,01		
	1,0744	19,79	9,71	15,52	2,33

Observando a Tabela 4.4, constatou-se que a pasta de casca de eucalipto apresentou uma maior quantidade de hidratos de carbono em comparação à pasta de fibra mista virgem. Tal era esperado, uma vez que a primeira se trata de uma «hardwood» que contém mais hidratos de carbono do que as «softwood», que é o caso da segunda pasta. Quanto à percentagem de celulose, ainda se verificou uma diferença entre as duas pastas, o que não aconteceu com a percentagem de hemiceluloses, cuja diferença não foi tão significativa.

Tabela 4.4 - Percentagem de celulose, hemiceluloses e hidratos de carbono presentes no material lenhocelulósico.

<b>Material lenhocelulósico</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>HC<sub>total</sub> (%)</b>
<b>Pasta de Fibra Mista Virgem</b>	61,36	19,88	81,24
<b>Pasta de Casca de Eucalipto</b>	72,31	18,74	91,05

Após se injetar as amostras de hidrolisado no HPLC, com a coluna Rezex RPM – Monosaccharide Pb<sup>2+</sup>, foi possível identificar os monossacarídeos presentes em cada pasta, assim como a concentração destes, uma vez que os diversos monossacarídeos apresentam tempos de retenção diferentes. No cromatograma de ambas as pastas sobressaíram, essencialmente, três monossacarídeos: a glucose, a xilose e a manose. Nesta coluna, o tempo de retenção da manose e da arabinose são muito próximos (17,363 min e 17,010 min, respetivamente), pelo que se torna muito difícil distinguir estes dois monossacarídeos. Assim, não se considerou esta distinção e, portanto, o pico referente à manose tem também em conta a quantidade de arabinose presente no material lenhocelulósico.

A Figura 4.1 representa cromatogramas de cada pasta em estudo provenientes da coluna Rezex RPM – Monosaccharide Pb<sup>2+</sup> e da coluna Rezex ROA – Organic Acid H<sup>+</sup>: a vermelho e a azul, as pastas de casca de eucalipto e de fibra mista virgem na coluna Rezex RPM – Monosaccharide Pb<sup>2+</sup>, respetivamente; a verde e a preto, as pastas de casca de eucalipto e de fibra mista virgem na coluna Rezex ROA – Organic Acid H<sup>+</sup>, respetivamente. Relativamente à coluna Rezex RPM, verificou-se uma maior quantidade de xilose na pasta de casca de eucalipto, o que era esperado, uma vez que se trata de uma «hardwood». Além disso, verificou-se uma maior quantidade de manose na pasta de fibra mista virgem, o que também era normal, pois é uma «softwood». Em relação à coluna ROA, o primeiro pico corresponde à glucose e o segundo pico corresponde à xilose, no caso da pasta de casca de eucalipto, e à manose, no caso da pasta de fibra mista virgem. Nesta coluna, o tempo de retenção da xilose e da manose é muito semelhante, pelo que se torna complicado fazer a distinção destes compostos. Nas Tabelas 4.5 e 4.6, estão representadas as quantidades de cada monossacarídeo presente em cada pasta.

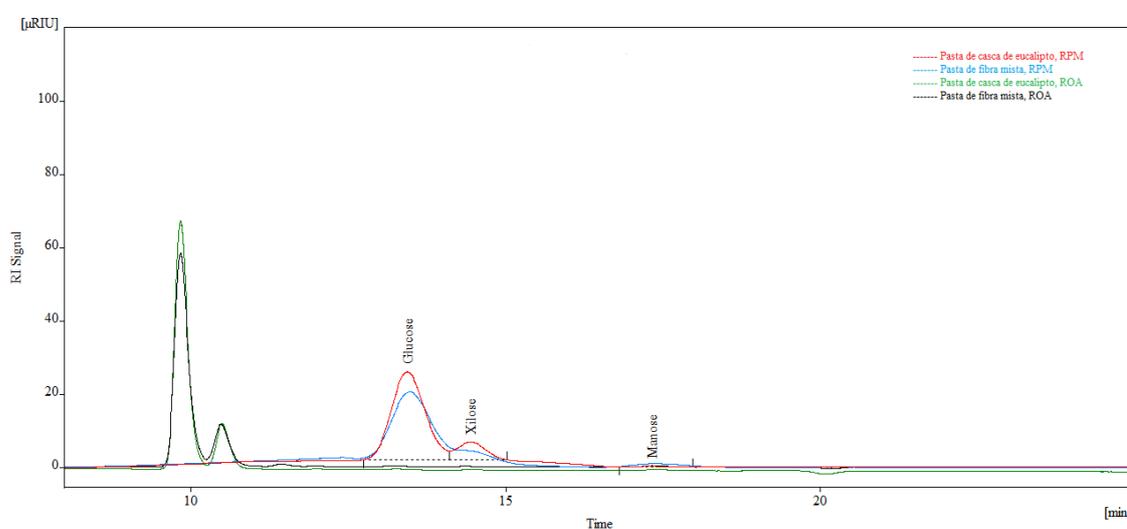


Figura 4.1 - Cromatogramas de caracterização das pastas em estudo.

Tabela 4.5 - Quantidade de monossacarídeos presentes na pasta de casca de eucalipto, a partir da coluna Rezex RPM - Monosaccharide Pb<sup>2+</sup>.

<b>m<sub>seca</sub> a 40°C (g)</b>	<b>[Glucose]</b> (g/L)	<b>[Glucose]</b> (%)	<b>[Xilose]</b> (g/L)	<b>[Xilose]</b> (%)	<b>[Manose]</b> (g/L)	<b>[Manose]</b> (%)
<b>0,3046</b>	2,913	81,13	0,564	15,33	0,058	1,69
<b>0,3096</b>	2,860		0,527		0,062	

Tabela 4.6 - Quantidade de monossacarídeos presentes na pasta de fibra mista virgem, a partir da coluna Rezex RPM - Monosaccharide Pb<sup>2+</sup>.

<b>m<sub>seca</sub> a 40°C (g)</b>	<b>[Glucose]</b> (g/L)	<b>[Glucose]</b> (%)	<b>[Xilose]</b> (g/L)	<b>[Xilose]</b> (%)	<b>[Manose]</b> (g/L)	<b>[Manose]</b> (%)
<b>0,3153</b>	2,333		0,142		0,208	
<b>0,3040</b>	2,403	64,51	0,162	4,04	0,199	5,56
<b>0,3126</b>	2,191		0,130		0,190	

Relativamente à pasta de casca de eucalipto, esta apresenta em maior quantidade glucose, seguida de xilose e uma pequena quantidade de manose. Já a pasta de fibra mista virgem apresenta em maior quantidade glucose, seguida de manose e uma pequena quantidade de xilose. É normal a pasta de casca de eucalipto conter mais xilose do que manose, uma vez que se trata de uma «hardwood», enquanto a pasta de fibra mista virgem é uma «softwood» e daí ocorrer o contrário, ou seja, conter mais manose do que xilose, como é observável na Tabela 4.5 e na Tabela 4.6.

Com os resultados obtidos do teor de cinzas, do teor de lenhina total, do teor de hidratos de carbono e do índice kappa constatou-se que a utilização de ambas as pastas, tal qual, é favorável para os processos a se efetuarem posteriormente, não sendo necessário a aplicação de pré-tratamentos das mesmas para a remoção de resíduos indesejados, visto que a contribuição destes é mínima.

#### 4.2. Hidrólise enzimática e Sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF)

No processo de hidrólise enzimática e de SSF utilizou-se a solução enzimática Cellic<sup>®</sup> CTec2, fornecida pela Novozymes. Antes de se iniciarem estes processos, procedeu-se à análise da atividade enzimática desta solução enzimática, à temperatura de 50°C e de 38°C, que correspondem às temperaturas de operação dos processos de hidrólise enzimática e de SSF, respetivamente. Na Tabela 4.7 está representada a atividade enzimática da solução a utilizar, à temperatura de 38°C e de 50°C.

Tabela 4.7 - Atividade enzimática à temperatura de 38°C e de 50°C.

Temperatura (°C)	Diluição	Quantidade de glucose libertada (mg)	[Enzima] para obter 2 mg de glucose (mL enzima/mL solução)	Atividade enzimática (FPU/mL enzima)
38	151	2,164	0,0058	63,8
	201	1,799		
50	401	2,102	0,0023	160,9
	501	1,854		

Observando a Tabela 4.7, verificou-se que o valor da atividade enzimática da solução à temperatura de 38°C (63,8 FPU/mL enzima) foi inferior ao valor deste parâmetro à temperatura de 50°C (160,9 FPU/mL enzima). Isto significou que, à temperatura de 50°C, a solução enzimática apresentou uma maior velocidade de reação, o que seria esperado, de acordo com o fornecedor.

#### 4.2.1. Hidrólise enzimática

Desta forma, procedeu-se à realização do processo de hidrólise enzimática, à temperatura de 50°C (temperatura ótima correspondente à atividade enzimática máxima), recorrendo-se à solução enzimática Cellic<sup>®</sup> Ctec2, fornecida pela Novozymes. Neste processo, para ambas as pastas utilizadas, estudou-se a influência da carga enzimática, de 10 e 15 FPU/g<sub>HC</sub>, e da consistência, de 3, 6 e 9%, na concentração em equivalentes de glucose ao longo do tempo de hidrólise, em mg/mL, e no rendimento do processo, em %.

A Figura 4.2 representa o perfil da hidrólise enzimática da pasta de casca de eucalipto, à consistência de 3 e 6% e com a carga enzimática de 15 FPU/g<sub>HC</sub>, ou seja, da variação da concentração em equivalentes de glucose ao longo do tempo, com as diversas consistências em estudo. À consistência de 3%, a partir dos 30 min de processo, começou-se a retirar as amostras para análise e terminou-se às 48 h. Verificou-se que a concentração aumentou ao longo do tempo, atingindo-se um máximo de 32,9 mg/mL, às 30 h. Já à consistência de 6%, a primeira amostra retirada foi a partir das 41 h, de modo a permitir que a solução enzimática conseguisse atuar, pois com o aumento da consistência, a massa de pasta húmida utilizada foi muito superior e só a partir desse momento é que a amostra começou a ficar liquefeita e mais homogénea. A esta consistência não se verificou um aumento contínuo da concentração em equivalentes de glucose, havendo um decréscimo desta entre as 41 e as 48 h. A partir desse momento até às 72 h houve um aumento da concentração, atingindo um maior valor às 72 h, de 61,5 mg/mL.

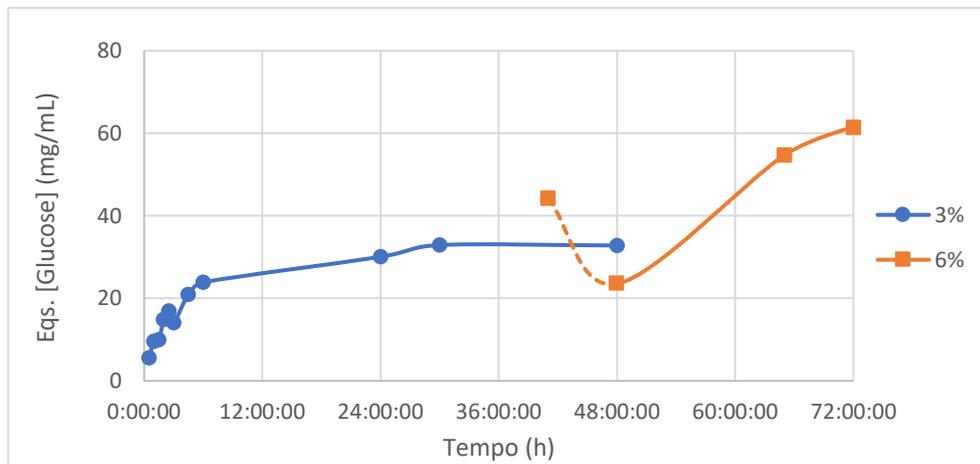


Figura 4.2 – Perfil da hidrólise enzimática da pasta de casca de eucalipto; consistência (3 e 6%); carga enzimática (15 FPU/g<sub>HC</sub>).

A Figura 4.3 representa o perfil da hidrólise enzimática da pasta de casca de eucalipto, à consistência de 3, 6 e 9% e com a carga enzimática de 10 FPU/g<sub>HC</sub>, ou seja, da variação da concentração em equivalentes de glicose ao longo do tempo, com as diversas consistências em estudo. Mais uma vez, não se retiraram as amostras no mesmo momento, em todas as consistências utilizadas, de modo a permitir que, em consistências maiores, a solução enzimática atuasse corretamente e a solução de pasta de casca de eucalipto ficasse liquefeita e mais homogênea. Assim, à consistência de 3%, verificou-se um aumento deste parâmetro até as 24 h, atingindo-se um valor máximo de 30,9 mg/mL, e a partir desse momento houve um decréscimo da concentração até às 48 h. À consistência de 6%, atingiu-se um valor máximo da concentração em equivalentes de glicose de 63,1 mg/mL, às 72 h. À consistência de 9%, a concentração aumentou ao longo do tempo, atingindo-se um valor superior de 109,1 mg/mL, às 72 h.

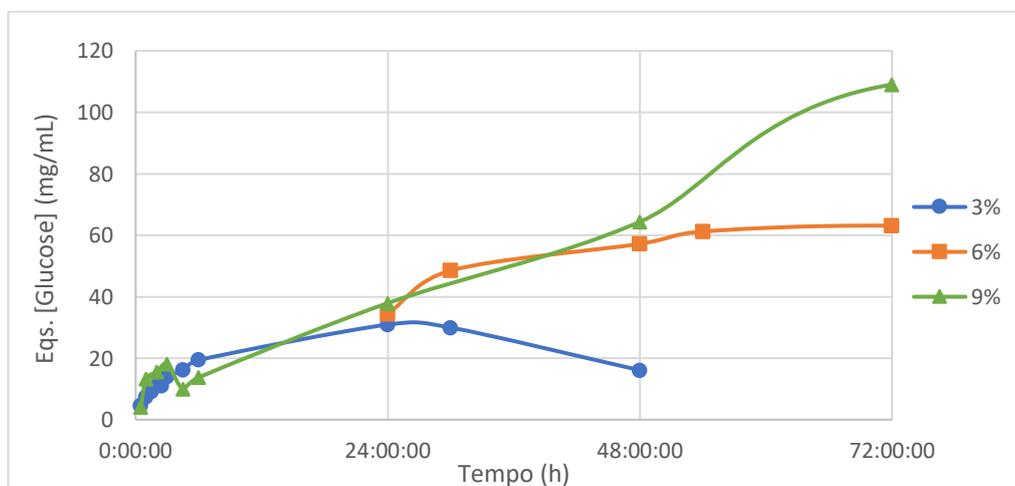


Figura 4.3 - Perfil da hidrólise enzimática da pasta de casca de eucalipto; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/g<sub>HC</sub>).

À consistência de 9%, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>, não se realizou nenhum ensaio com a pasta de casca de eucalipto, visto que com menores consistências já se tinha verificado ótimos resultados e, portanto, seria de se esperar que a uma consistência de 9% tal acontecesse também. Além disso, com esse material lenhocelulósico e com essa consistência, realizou-se um ensaio a 10 FPU/g<sub>HC</sub>, cujos resultados obtidos foram bastante favoráveis para o que se pretendia analisar. A diminuição da carga enzimática era um dos objetivos relativos à otimização do processo, visto que as soluções enzimáticas utilizadas encarecem o processo e, portanto, diminuindo a quantidade utilizada destas soluções, o processo pode-se tornar menos dispendioso.

A Figura 4.4 representa o perfil da hidrólise enzimática da pasta de fibra mista virgem, à consistência de 3, 6 e 9% e com a carga enzimática de 15 FPU/g<sub>HC</sub>, ou seja, da variação da concentração em equivalentes de glucose ao longo do tempo, com as diversas consistências em estudo. Também com esta pasta teve-se em consideração o aumento da consistência e, portanto, começou-se a retirar as amostras em momentos diferentes, aquando a homogeneidade e liquefação da solução. Desta forma, verificou-se que, à consistência de 3% atingiu-se um valor máximo de concentração de 18,1 mg/mL, às 48 h, enquanto à consistência de 6 e 9%, às 72 h, se atingiu o valor de concentração de 50,8 e de 74,8 mg/mL, respetivamente.

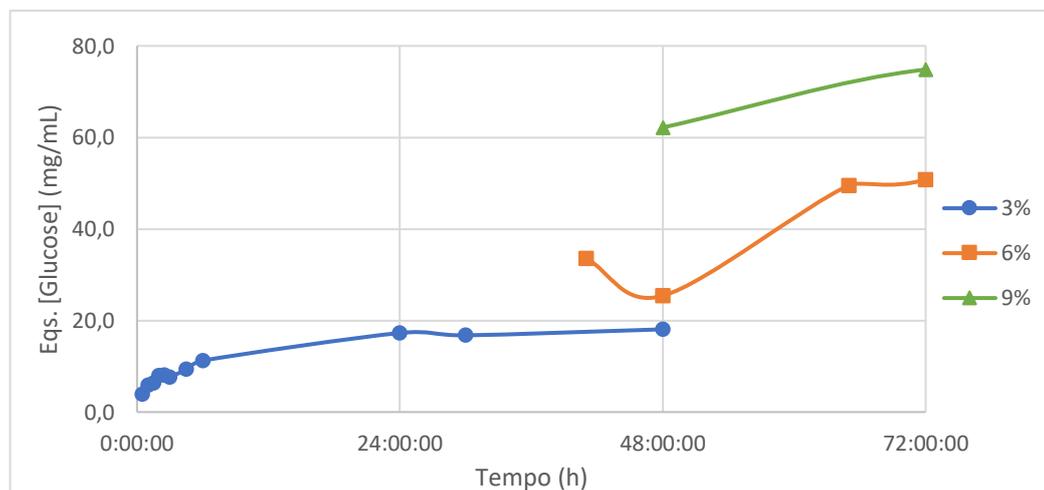


Figura 4.4 - Perfil da hidrólise enzimática na pasta de casca de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (15 FPU/g<sub>HC</sub>).

A Figura 4.5 representa o perfil da hidrólise enzimática da pasta de fibra mista virgem, à consistência de 3, 6 e 9% e com a carga enzimática de 10 FPU/g<sub>HC</sub>, ou seja, da variação da concentração em equivalentes de glucose ao longo do tempo, com as diversas consistências em estudo. À consistência de 3%, atingiu-se um valor máximo de concentração de 17,1 mg/mL, às 30 h, verificando-se um decréscimo desta a partir desse momento até às 48 h. À consistência de 6%, verificou-se um aumento da concentração até às 72 h, cujo valor obtido foi de 53,5 mg/mL.

À consistência de 9%, atingiu-se o valor de concentração em equivalentes de glucose, às 72 h, de 65,9 mg/mL.

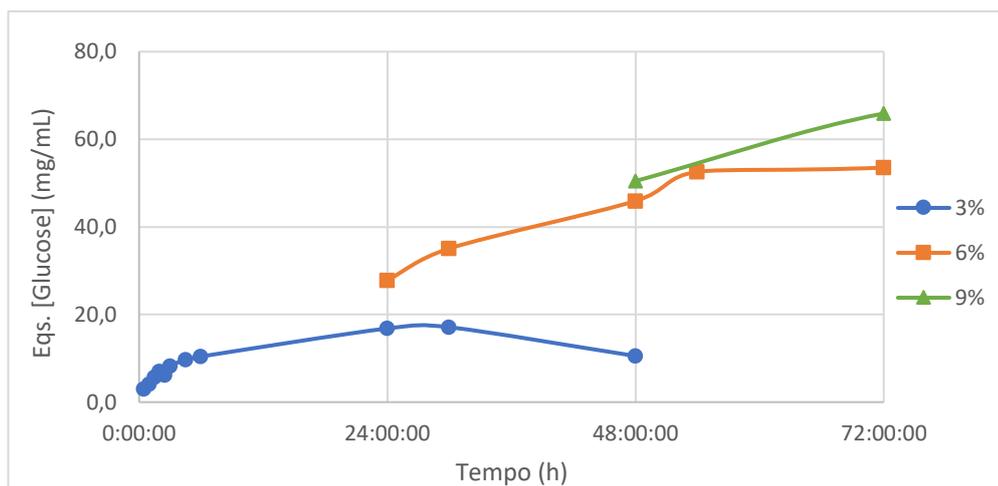


Figura 4.5 - Perfil da hidrólise enzimática na pasta de casca de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/g<sub>HC</sub>).

Comparando os valores de concentração atingidos pelas pasta de fibra mista virgem, constatou-se, que com uma maior carga enzimática obteve-se maiores valores desta variável.

A Figura 4.6 representa o perfil do rendimento do processo de hidrólise enzimática da pasta de casca de eucalipto, à consistência de 3 e 6% e com uma carga enzimática de 15 FPU/g<sub>HC</sub>. À consistência de 3%, atingiu-se um rendimento máximo de 108,5%, às 30 h, enquanto, no caso da consistência a 6%, se obteve um valor máximo de 101,3%, às 72 h. Isto é, obteve-se um maior rendimento à consistência de 3% comparativamente à consistência de 6%.

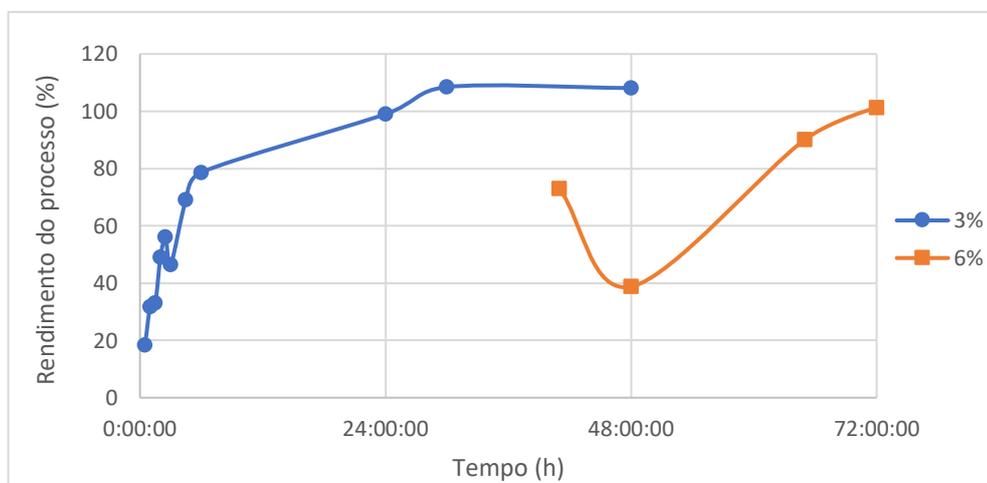


Figura 4.6 - Perfil do rendimento do processo de hidrólise enzimática da pasta de casca de eucalipto; consistência (3 e 6%); carga enzimática (15 FPU/g<sub>HC</sub>).

A Figura 4.7 representa o perfil do rendimento do processo de hidrólise enzimática da pasta de casca de eucalipto, à consistência de 3, 6 e 9% e com uma carga enzimática de 10 FPU/g<sub>HC</sub>. À consistência de 3%, atingiu-se um rendimento máximo do processo próximo de 103%, às 28 h. À consistência de 6%, atingiu-se um valor máximo deste parâmetro de 104,0%, às 72 h. Já à consistência de 9%, às 72 h, o valor de rendimento atingido foi de 119,8%

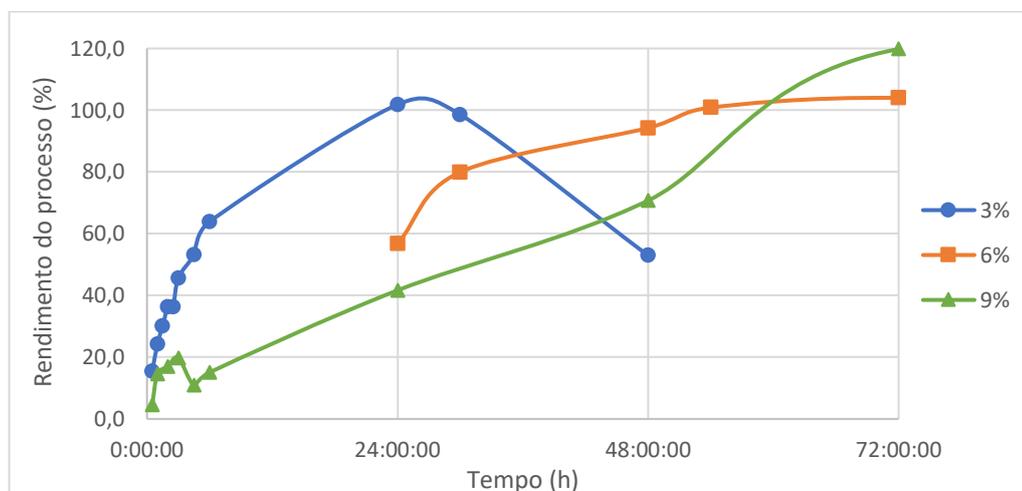


Figura 4.7 - Perfil do rendimento do processo de hidrólise enzimática da pasta de casca de eucalipto; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/g<sub>HC</sub>).

Tanto a partir da Figura 4.6, como da Figura 4.7, observou-se a presença de rendimentos do processo superiores a 100%. Tal pode ter acontecido devido à solução em estudo se tratar de uma mistura de açúcares e, portanto, não conter apenas glucose, mas também outros tipos de açúcares que terão reagido com o DNS, levando a um aumento do rendimento do processo. Daí se converter o valor da absorvância em concentração em equivalentes de glucose. Além disso, também a presença de compostos cromóforos pode ter intensificado a cor da substância, levando a uma leitura de absorvância no espectrofotômetro superior. Comparando os valores obtidos, constatou-se que se atingiu maiores rendimentos do processo a 15 FPU/g<sub>HC</sub> do que a 10 FPU/g<sub>HC</sub>, assim como se alcançou maiores valores deste parâmetro, à medida que a consistência aumentou.

A Figura 4.8 representa o perfil do rendimento do processo de hidrólise enzimática da pasta de fibra mista virgem, à consistência de 3, 6 e 9% e com uma carga enzimática de 15 FPU/g<sub>HC</sub>. À consistência de 3%, atingiu-se um rendimento máximo de 67,2%, às 48 h. No caso da consistência a 6%, alcançou-se um valor máximo de 93,8%, às 72 h. Já à consistência de 9%, atingiu-se um valor de rendimento, às 72 h, de 92,1%.

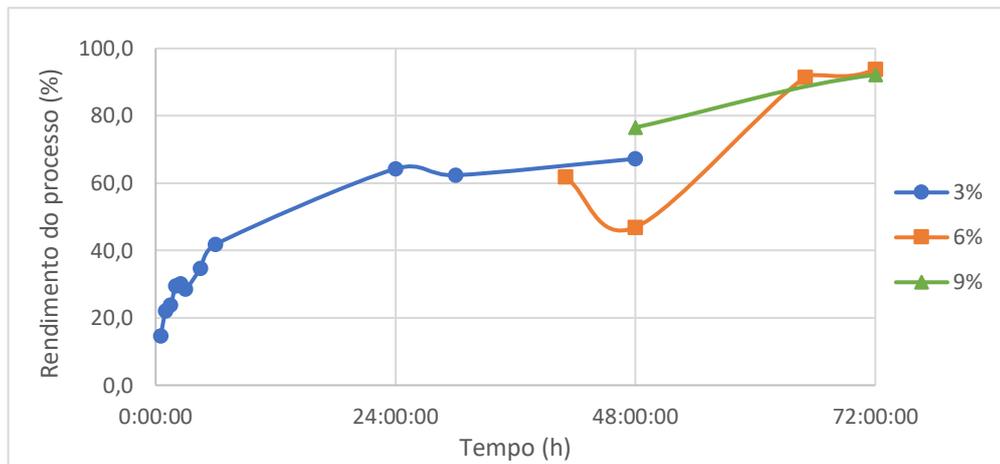


Figura 4.8 - Perfil do rendimento do processo de hidrólise enzimática da pasta de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (15 FPU/g<sub>HC</sub>).

A Figura 4.9 representa o perfil do rendimento do processo de hidrólise enzimática da pasta de fibra mista virgem, à consistência de 3, 6 e 9% e com uma carga enzimática de 10 FPU/g<sub>HC</sub>. À consistência de 3%, atingiu-se um rendimento máximo de 63,8%, às 30 h. No caso da consistência a 6%, alcançou-se um valor máximo de 98,8%, às 72 h. Já à consistência de 9%, atingiu-se um valor de rendimento de 81,1%, às 72 h.

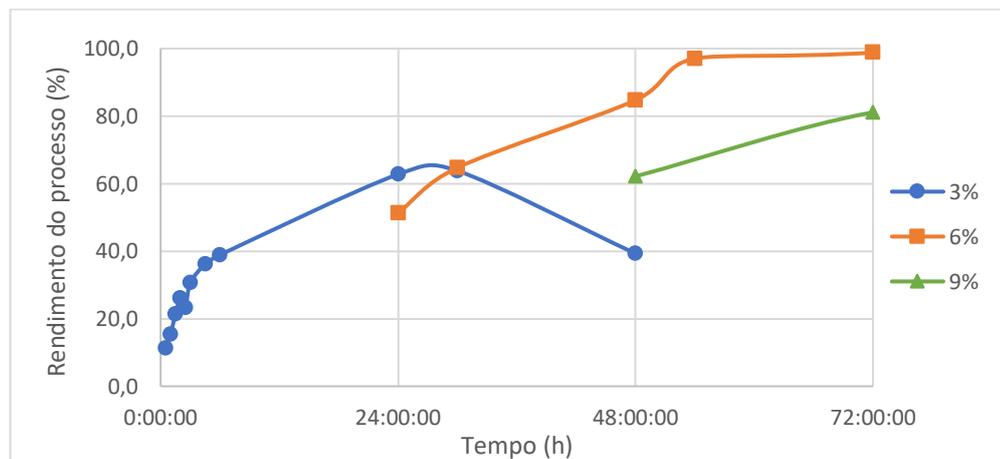


Figura 4.9 - Perfil do rendimento do processo de hidrólise enzimática da pasta de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/g<sub>HC</sub>).

Comparando os valores de rendimento do processo atingidos, constatou-se que estes foram superiores com a maior carga enzimática, ou seja, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>. No entanto, nesta pasta, não se verificou que quanto maior a consistência, maior seria o rendimento atingido, isto é, à consistência de 6% atingiu-se um maior rendimento do que à consistência de 9%, sendo este também atingido mais rapidamente no primeiro caso.

#### 4.2.2. Sacarificação e Fermentação em Simultâneo (SSF)

No processo de sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF) utilizou-se a solução enzimática Cellic<sup>®</sup> CTec2, fornecida pela Novozymes, e ainda a levedura *S. cerevisiae*. Neste processo, para ambas as pastas utilizadas, estudou-se a influência da carga enzimática (a 10 e 15 FPU/g<sub>HC</sub>) e da consistência (3, 6 e 9%) no rendimento do processo de produção de etanol, em g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açúcares</sub>, na concentração de etanol, em g/L, e na produtividade de etanol, em g/(L.h).

A Figura 4.10 representa o perfil de concentração de etanol no processo SSF da pasta de casca de eucalipto, nas várias consistências em estudo (3, 6 e 9%) e a 15 FPU/g<sub>HC</sub>. À consistência de 3%, verificou-se um aumento da concentração de etanol até às 28 h, momento em que se atingiu o valor máximo deste parâmetro de 11,5 g/L, e a partir daí começou a diminuir até às 72 h. À consistência de 6%, a concentração de etanol diminuiu ao longo do tempo, atingindo-se um valor máximo de 24,2 g/L, às 24 h, e um valor mínimo de 21,1 g/L, às 72 h. À consistência de 9%, também se verificou uma pequena diminuição da concentração de etanol ao longo do tempo, atingindo-se um maior valor de 34,7 g/L, às 48 h, que diminuiu para 33,1 g/L, às 72 h.

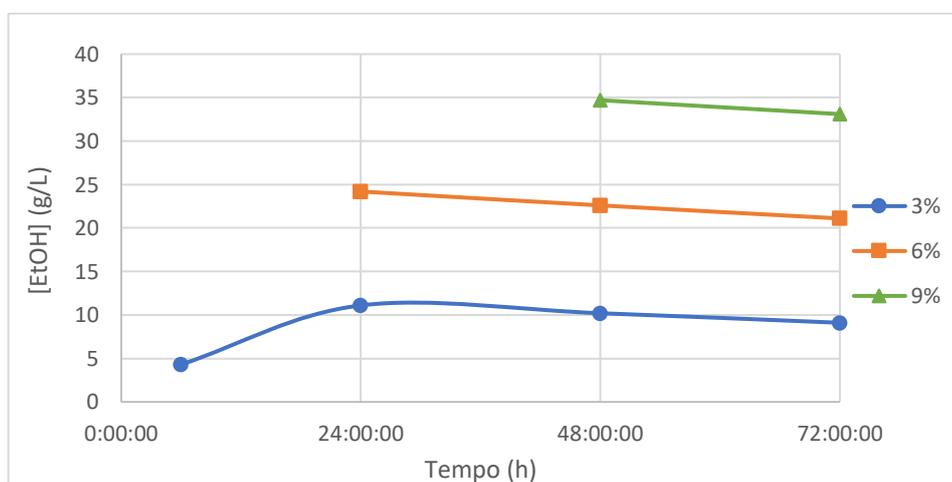


Figura 4.10 – Perfil de concentração de etanol no processo SSF da pasta de casca de eucalipto; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (15 FPU/g<sub>HC</sub>).

A Figura 4.11 representa o perfil de concentração de etanol no processo SSF da pasta de casca de eucalipto, nas várias consistências em estudo (3, 6 e 9%) e a 10 FPU/g<sub>HC</sub>. Verificou-se um comportamento muito semelhante ao representado na Figura 4.10. Assim, à consistência de 3%, atingiu-se uma concentração máxima de etanol de 11,5 g/L. À consistência de 6%, observou-se uma concentração máxima de 23,7 g/L, às 24 h, e mínima de 21,9 g/L, às 72 h. Já à consistência de 9%, atingiu-se uma maior concentração de etanol (33,2 g/L) às 48 h, que diminuiu para 31,2 g/L, às 72 h.

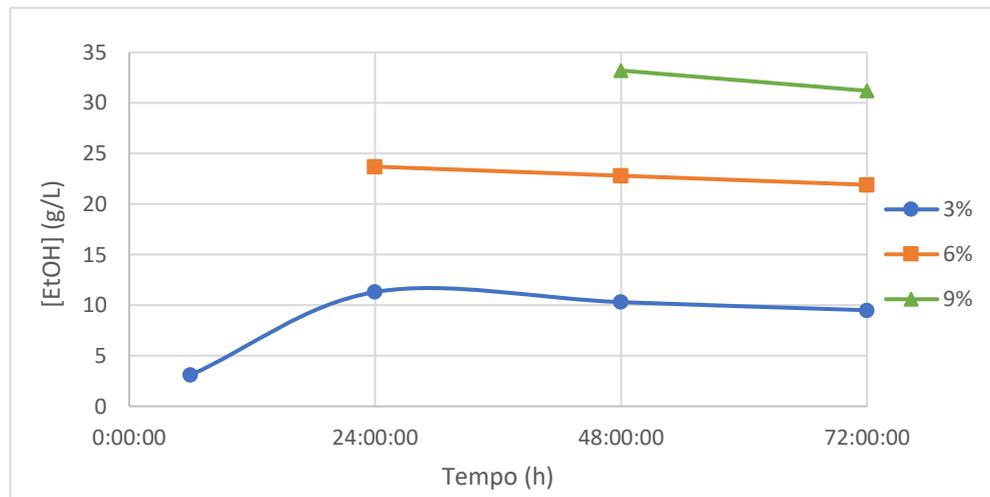


Figura 4.11 – Perfil de concentração de etanol no processo SSF da pasta de casca de eucalipto; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/g<sub>HC</sub>).

Comparando os valores de concentração de etanol atingidos, constatou-se que estes foram superiores no caso dos 15 FPU/g<sub>HC</sub>, com exceção da consistência a 3%, cujos valores máximos atingidos foram iguais nas duas cargas enzimáticas. Relativamente à consistência, verificou-se que à medida de que esta aumentou, o valor da concentração de etanol também aumentou. No entanto, verificou-se que o valor a concentração de etanol diminuiu com o tempo. Tal pode ter ocorrido devido à inexistência de açúcares simples metabolizáveis que levaram a levedura a consumir etanol.

Mediante a consistência a se tratar, o momento inicial para se retirar as amostras variou, começando-se mais cedo a uma menor consistência e mais tarde a uma consistência superior. Isto é, à consistência de 3% começou-se a retirar amostras a partir das 6 h de processo SSF, à consistência de 6% começou-se a partir das 24 h e à consistência de 9% começou-se a partir das 48 h. Esta inicialização em momentos diferentes foi efetuada de modo a permitir que tanto a solução enzimática, como a solução de levedura conseguissem atuar corretamente, já que a quantidade de massa húmida utilizada não foi a mesma e, portanto, o tempo de atuação destas duas soluções no substrato seria diferente.

A Figura 4.12 representa o perfil de concentração de etanol no processo SSF da pasta de fibra mista virgem, nas várias consistências em estudo (3, 6 e 9%) e a 15 FPU/g<sub>HC</sub>. À consistência de 3%, atingiu-se uma concentração máxima de 11,6 g/L, às 54 h. À consistência de 6%, verificou-se um aumento da concentração de etanol até às 48 h, momento em que se atingiu o máximo de 25,5 g/L, havendo uma diminuição desta a partir daí. À consistência de 9%, verificou-se um aumento da concentração de etanol, atingindo-se um maior valor de 38,5 g/L, às 72 h.

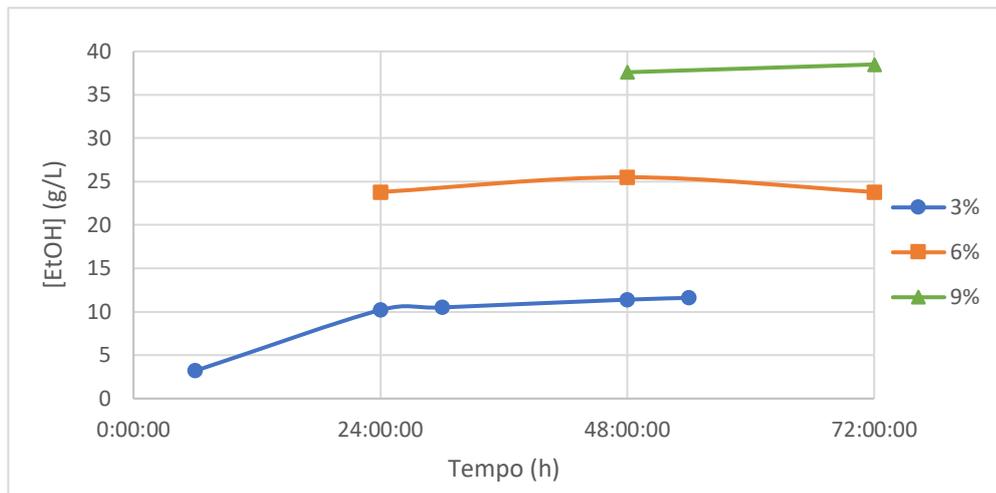


Figura 4.12 - Perfil de concentração de etanol no processo SSF da pasta de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (15 FPU/g<sub>HC</sub>).

A Figura 4.13 representa o perfil de concentração de etanol no processo SSF da pasta de fibra mista virgem, nas várias consistências em estudo (3, 6 e 9%) e a 10 FPU/g<sub>HC</sub>. À consistência de 3%, a concentração de etanol aumentou ao longo do tempo, atingindo um valor máximo de 9,5 g/L, às 54 h. À consistência de 6%, a concentração de etanol também aumentou ao longo do tempo, alcançando-se um valor máximo de 23,8 g/L, às 72 h. À consistência de 9%, a concentração de etanol aumentou ao longo do tempo, sendo o seu maior valor de 35,8 g/L, às 72 h.

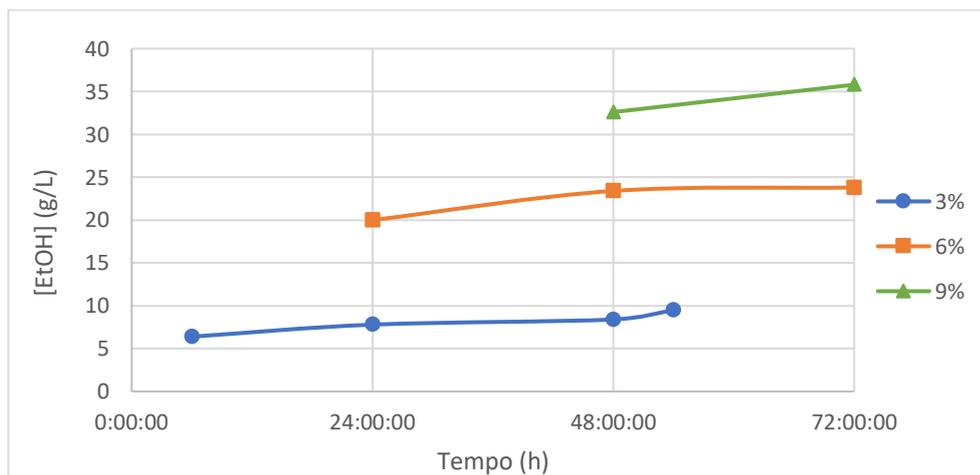


Figura 4.13 - Perfil de concentração de etanol no processo SSF da pasta de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/g<sub>HC</sub>).

Comparando os valores obtidos, constatou-se que estes foram superiores com a maior carga enzimática (15 FPU/g<sub>HC</sub>). Além disso, a concentração de etanol aumentou, à medida que a consistência aumentou. O aumento da variável de acompanhamento com a consistência e com a carga enzimática ocorreu devido à exequibilidade processual proveniente da heterogeneidade da mistura.

A Figura 4.14 representa o perfil do rendimento de produção de etanol da pasta de casca de eucalipto, nas várias consistências, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>. À consistência de 3%, verificou-se um aumento do rendimento até às 30 h, momento em que se atingiu um valor máximo de 0,37 g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açuc</sub>, e a partir daí houve um decréscimo deste até às 72 h. À consistência de 6%, observou-se uma diminuição do rendimento ao longo do tempo, atingindo-se um valor máximo de 0,4 g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açuc</sub>, às 24 h, e um mínimo de 0,35 g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açuc</sub>, às 72 h. À consistência de 9%, verificou-se uma diminuição do rendimento ao longo do tempo, alcançando-se um valor máximo de 0,38 g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açuc</sub>, às 48 h, e um valor mínimo de 0,36 g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açuc</sub>, às 72 h.

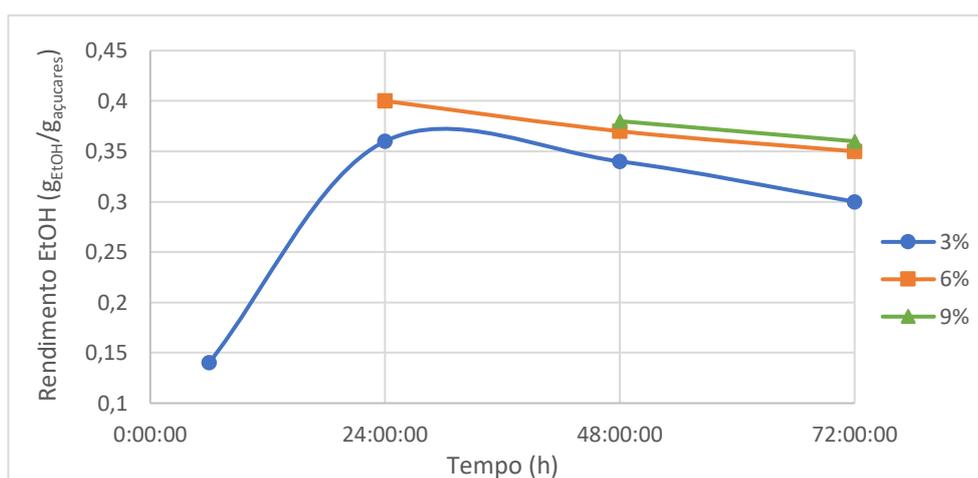


Figura 4.14 – Perfil do rendimento de produção de etanol, em g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açuc</sub>, da pasta de casca de eucalipto; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (15 FPU/g<sub>HC</sub>).

A Figura 4.15 representa o perfil do rendimento de produção de etanol da pasta de casca de eucalipto, nas várias consistências, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>. À consistência de 3%, verificou-se que o rendimento do processo de produção de etanol aumentou até às 30 h, momento em que se atingiu o máximo de 0,38 g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açuc</sub>, e a partir daí houve uma diminuição deste parâmetro. À consistência de 6%, verificou-se uma diminuição do rendimento ao longo do tempo, alcançando-se um valor máximo de 0,39 g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açuc</sub>, às 24 h, e um valor mínimo de 0,36 g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açuc</sub>, às 72 h. À consistência de 9%, observou-se um decréscimo do rendimento ao longo do tempo, atingindo-se um máximo de 0,36 g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açuc</sub>, às 48 h, e um mínimo de 0,34 g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açuc</sub>, às 72 h.

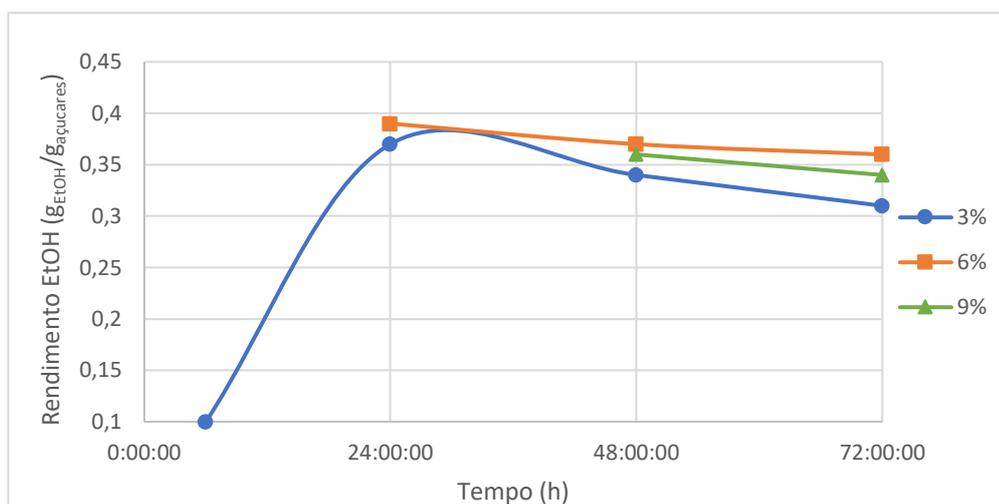


Figura 4.15 - Perfil do rendimento de produção de etanol, em  $g_{EtOH}/g_{açúcares}$ , da pasta de casca de eucalipto; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/g<sub>HC</sub>).

Comparando os valores obtidos do rendimento do processo de produção de etanol, constatou-se que, com exceção do caso da consistência de 9%, estes foram superiores com a carga enzimática menor, ou seja, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>. Desta forma, verificou-se a possibilidade de otimizar o processo, uma vez que se atingiu um maior rendimento de produção de etanol com uma menor carga enzimática, o que significou que se utilizou um menor volume de solução enzimática, solução essa que encarece o processo. Além disso, constatou-se também que, no caso da pasta de casca de eucalipto, o aumento da consistência, não levou ao aumento do parâmetro com ambas as cargas enzimáticas. Assim sendo, relativamente ao rendimento de produção de etanol, confirmou-se que todos os valores estão abaixo do limite teórico de produção de etanol de 0,51 kg por cada kg de glucose consumida.

A Figura 4.16 representa o perfil do rendimento de produção de etanol da pasta de fibra mista virgem, nas várias consistências, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>. À consistência de 3%, verificou-se que o rendimento do processo de produção de etanol aumentou ao longo do tempo, atingindo um valor máximo de 0,38  $g_{EtOH}/g_{açúcares}$ , às 48 h. À consistência de 6%, verificou-se um aumento do rendimento até às 48 h, momento em que se alcançou um valor máximo de 0,47  $g_{EtOH}/g_{açúcares}$ , verificando-se a partir daí um decréscimo do rendimento do processo. À consistência de 9%, observou-se um aumento do rendimento ao longo do tempo, atingindo-se um máximo de 0,47  $g_{EtOH}/g_{açúcares}$ , às 72 h, e um mínimo de 0,46  $g_{EtOH}/g_{açúcares}$ , às 48 h.

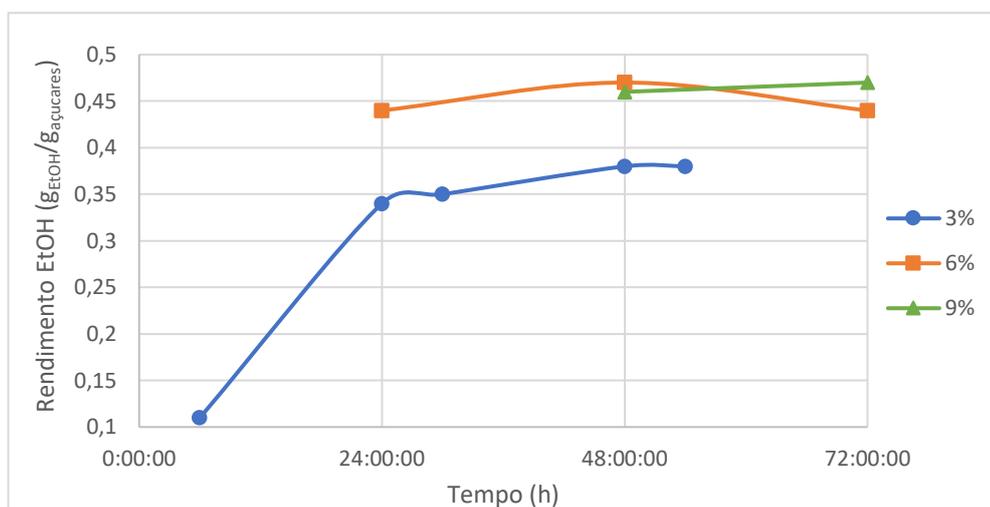


Figura 4.16 - Perfil do rendimento de produção de etanol, em  $g_{EtOH}/g_{açúcares}$ , da pasta de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (15 FPU/ $g_{HC}$ ).

A Figura 4.17 representa o perfil do rendimento de produção de etanol da pasta de fibra mista virgem, nas várias consistências, a 10 FPU/ $g_{HC}$ . Assim, à consistência de 3%, verificou-se um aumento do rendimento do processo ao longo do tempo, sendo este aumento mais acentuado entre as 48 e as 54 h, momento em que se atingiu o valor máximo de 0,35  $g_{EtOH}/g_{açúcares}$ . À consistência de 6%, também se observou que o rendimento aumentou ao longo do tempo, atingindo um máximo de 0,44  $g_{EtOH}/g_{açúcares}$ , às 72 h. O mesmo se verificou à consistência de 9%, cujo valor máximo de rendimento do processo foi também de 0,44  $g_{EtOH}/g_{açúcares}$ , atingido também às 72 h.

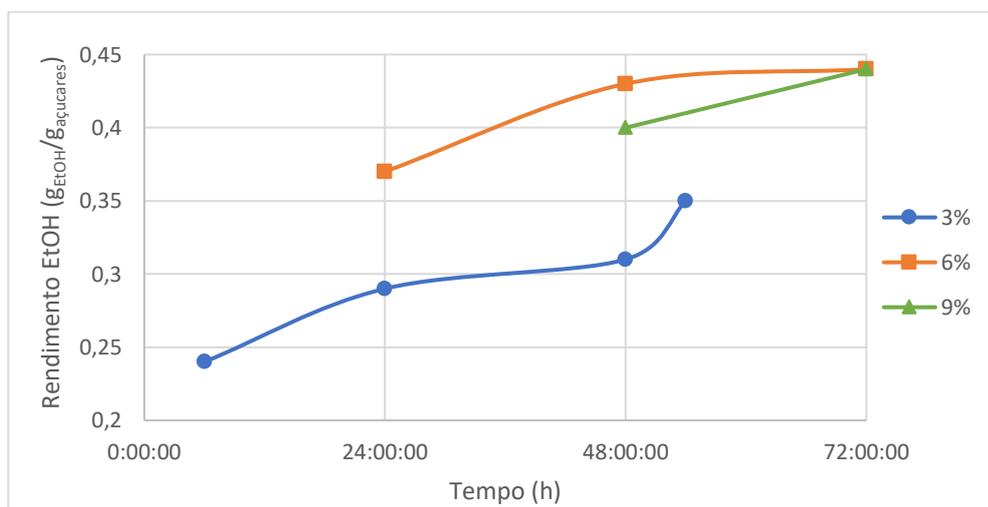


Figura 4.17 - Perfil do rendimento de produção de etanol, em  $g_{EtOH}/g_{açúcares}$ , da pasta de fibra mista virgem; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 FPU/ $g_{HC}$ ).

Comparando os valores de rendimento obtidos pela pasta de fibra mista virgem, constatou-se que se obteve um maior valor deste parâmetro com a carga enzimática de 15 FPU/ $g_{HC}$ . No entanto, relativamente à variação da consistência, constatou-se que se atingiu os

mesmos valores máximos do rendimento do processo para a consistência de 6 e 9%, em cada carga enzimática.

A Figura 4.18 apresenta a produtividade máxima de etanol atingida com a pasta de casca de eucalipto no processo SSF, nas diversas condições de operação. Verificou-se que o maior valor atingido de produtividade foi de 1,01 g/(L.h), à consistência de 6% e com uma carga enzimática de 15 FPU/g<sub>HC</sub>, apesar de, à mesma consistência mas com uma carga enzimática inferior, se ter conseguido atingir um valor muito próximo e elevado de 0,99 g/(L.h). Assim, constatou-se que com uma menor consistência de 6% se conseguiu alcançar produtividades superiores, observando-se uma possível otimização do processo. Além disso, não se verificaram diferenças significativas deste parâmetro, para a mesma consistência e para diferentes cargas enzimáticas, sendo isso uma possível otimização do processo, visto que com uma carga inferior se conseguiu atingir valores semelhantes aos atingidos com uma carga superior.

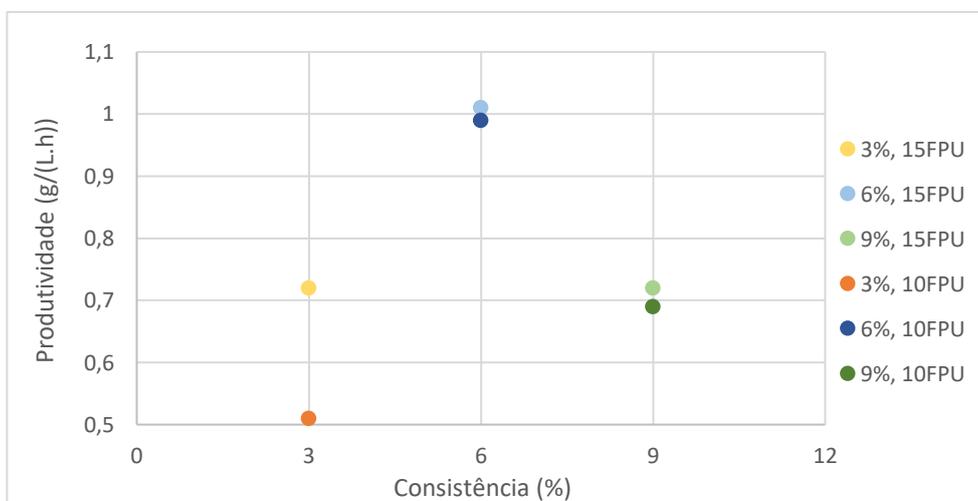


Figura 4.18 - Produtividade máxima de etanol no processo SSF da pasta de casca de eucalipto; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 e 15 FPU/g<sub>HC</sub>).

A Figura 4.19 apresenta a produtividade máxima de etanol atingida com a pasta de fibra mista virgem no processo SSF, nas diversas condições de operação. Verificou-se que o maior valor atingido de produtividade foi de 1,06 g/(L.h), à consistência de 3% e com uma carga enzimática de 10 FPU/g<sub>HC</sub>. À consistência de 6% e uma carga enzimática superior, também se atingiu uma produtividade elevada de 0,99 g/(L.h). Com este material, já se verificou uma diferença de produtividade máxima entre cargas enzimáticas diferentes, mas para a mesma consistência, principalmente para as consistências de 3 e 6%.

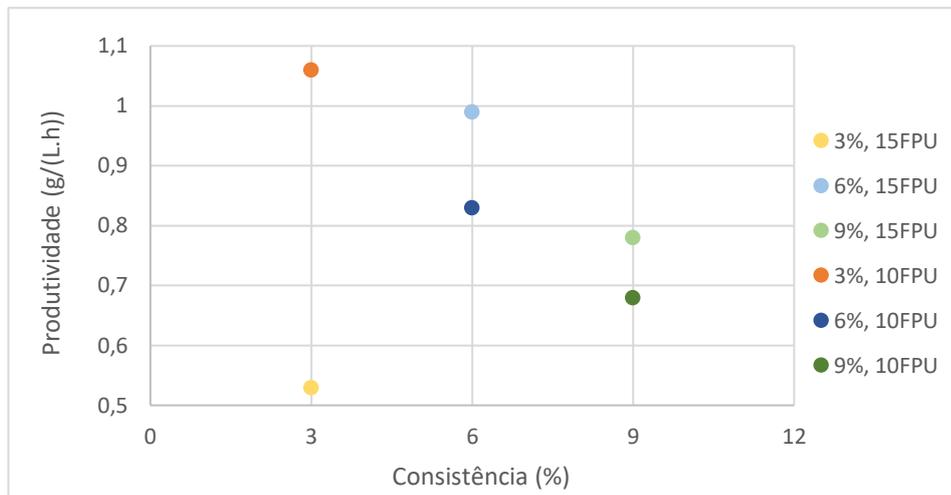


Figura 4.19 - Produtividade máxima de etanol no processo SSF da pasta de fibra virgem mista; consistência (3, 6 e 9%); carga enzimática (10 e 15 FPU/g<sub>HC</sub>).

A Figura 4.20 e a Figura 4.21 representam o perfil de concentração e de rendimento de produção de etanol de ambas as pastas, à consistência de 9% e com a carga enzimática de 15 FPU/g<sub>HC</sub>. Através destas duas figuras, constatou-se que, no caso da fibra mista virgem, a concentração e o rendimento, entre as 48 e as 72 h, aumentaram, atingindo-se valores superiores comparativamente aos obtidos a partir da pasta de casca de eucalipto, que diminuíram durante esse mesmo intervalo de tempo.

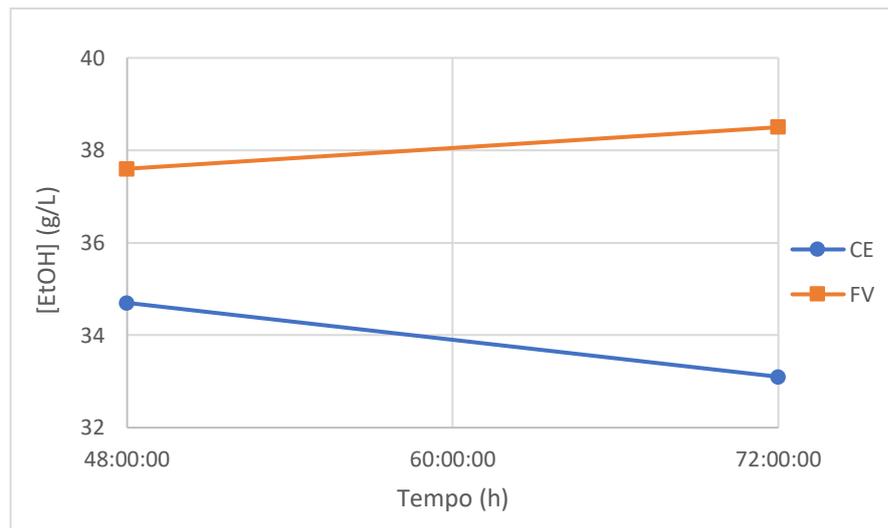


Figura 4.20 - Perfil de concentração de etanol no processo SSF de ambas as pastas; consistência (9%); carga enzimática (15 FPU/g<sub>HC</sub>).

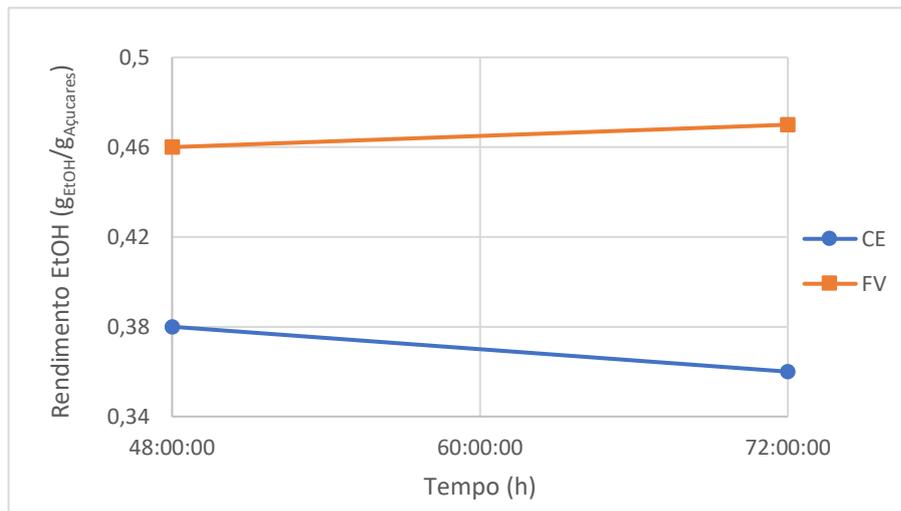


Figura 4.21 - Perfil do rendimento de produção de etanol de ambas as pastas; consistência (9%); carga enzimática (15 FPU/g<sub>HC</sub>).

A Figura 4.22 e a Figura 4.23 representam o perfil de concentração e de rendimento de produção de etanol de ambas as pastas, à consistência de 9% e com a carga enzimática de 10 FPU/g<sub>HC</sub>. Através das duas figuras, constatou-se que, no caso da fibra mista virgem, a concentração e o rendimento, entre as 24 e as 72 h, aumentaram, atingindo-se valores superiores comparativamente aos obtidos a partir da pasta de casca de eucalipto, que, nesse intervalo de tempo, diminuíram. No entanto, às 48 h, a concentração de etanol foi superior na pasta de casca de eucalipto, deixando de o ser a partir das 50 h. Esta diminuição da concentração de etanol, na pasta de casca de eucalipto, pode ter ocorrido devido à inexistência de açúcares simples metabolizáveis que levaram a levedura a consumir etanol.

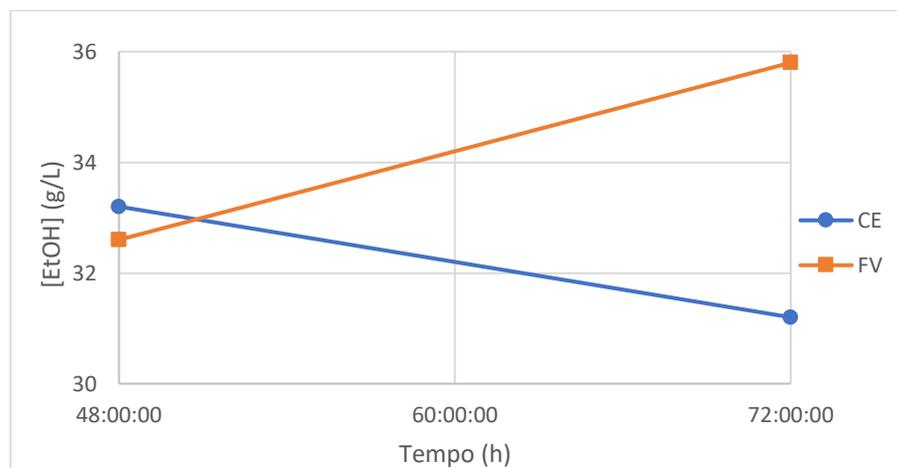


Figura 4.22 - Perfil de concentração de etanol de ambas as pastas; consistência (9%); carga enzimática (10 FPU/g<sub>HC</sub>).

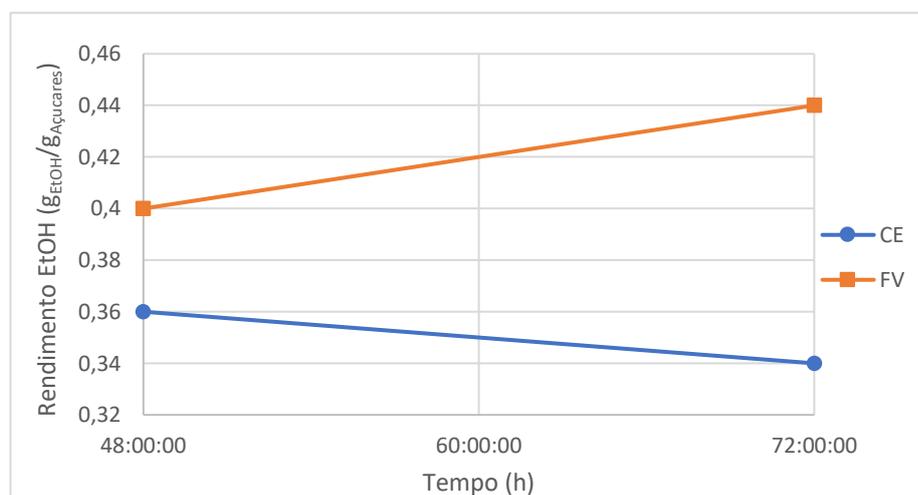


Figura 4.23 - Perfil de rendimento de produção de etanol de ambas as pastas; consistência (9%); carga enzimática (10 FPU/g<sub>HC</sub>).

Analisando todos os resultados obtidos a partir do processo SSF, confirmou-se que com as maiores consistências e maior carga enzimática, se obteve as maiores concentrações de etanol e os maiores rendimentos de produção deste. Isto é, à consistência de 9% e carga enzimática de 15 FPU/g<sub>HC</sub>, atingiu-se elevadas concentrações de etanol com a pasta de fibra mista virgem e com a pasta de casca de eucalipto (38,5 e 34,7 g/L, respectivamente), assim como elevados valores de rendimentos de produção de etanol (0,47 e 0,38 g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açúcares</sub>, respectivamente). No entanto, com a menor carga enzimática (10 FPU/g<sub>HC</sub>) e com a mesma consistência (9%), tanto na pasta de fibra mista virgem, como na pasta de casca de eucalipto, observou-se valores semelhantes de concentração (35,8 e 33,2 g/L, respectivamente) e de rendimentos de produção de etanol (0,44 e 0,36 g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açúcares</sub>, respectivamente). Esta última situação foi de encontro à otimização do processo, uma vez que se conseguiu diminuir uma das variáveis de controlo do processo, a carga enzimática.

Comparando as matérias-primas utilizadas, verificou-se que se obteve melhores resultados de concentração e de rendimento de produção de etanol com a pasta de fibra mista virgem. No entanto, os maiores valores de cada variável de acompanhamento da reação, ou seja, da concentração e do rendimento de produção de etanol, da pasta de casca de eucalipto foram atingidos mais rapidamente do que os da pasta de fibra mista virgem, apesar de serem, maioritariamente, inferiores a estes.

A Figura 4.24 correspondeu à última amostragem dos ensaios do processo SSF à consistência de 6%, de ambas as cargas enzimáticas, com a pasta de casca de eucalipto (duas primeiras amostras do lado esquerdo) e com a pasta de fibra mista virgem (duas últimas amostras do lado direito). Verificou-se que a pasta de casca de eucalipto ficou mais liquefeita

do que a pasta de fibra mista virgem, facilitando a remoção de amostra. Quanto à tonalidade apresentada, observou-se uma tonalidade mais escura na pasta de casca de eucalipto.



Figura 4.24 - Amostragem dos ensaios de SSF da pasta de casca de eucalipto e da pasta de fibra mista virgem, às 72 h; consistência (6%); carga enzimática (15 e 10 FPU/g<sub>HC</sub>).

A Figura 4.25 correspondeu à última amostragem do processo SSF à consistência de 9%, da pasta de casca de eucalipto (lado esquerdo) e da pasta de fibra mista virgem (lado direito). Mais uma vez, verificou-se que a pasta de casca de eucalipto ficou mais liquefeita do que a pasta de fibra mista virgem. Comparando a Figura 4.24 e a Figura 4.25, verificou-se que as soluções da pasta de casca de eucalipto estavam sempre liquefeitas no término do processo SSF, independentemente da carga enzimática e da consistência utilizadas. As soluções de pasta de fibra mista virgem, no término do processo SSF, ainda não se encontravam totalmente liquefeitas.



Figura 4.25 - Amostragem dos ensaios de SSF da pasta de casca de eucalipto e da pasta de fibra mista virgem, às 72 h; consistência (9%); carga enzimática (15 e 10 FPU/g<sub>HC</sub>).

A concentração de etanol foi determinada a partir da injeção das amostras hidrolisadas e fermentadas no HPLC, recorrendo à coluna Rezex ROA – Organic Acid H<sup>+</sup>. Esta além de ter indicado o etanol e a sua concentração, também identificou outros picos no cromatograma

correspondentes a outros compostos, como: a glucose, a arabinose, a celobiose, o ácido acético, o ácido glucurônico, o ácido fórmico, o furfural, o xilitol e o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). Nesta coluna, o tempo de retenção da manose, da xilose e da galactose são muito próximos (10,507 min, 10,573 min e 10,503 min, respetivamente), pelo que se torna muito difícil distinguir estes três monossacarídeos. Assim, não se considerou esta distinção e, portanto, o pico referente à manose tem também em conta a quantidade de xilose e de galactose existente na pasta de fibra mista virgem. No caso da pasta de casca de eucalipto, também não se considerou esta distinção e, portanto, o pico referente à xilose tem também em conta a quantidade de manose e de galactose existentes.

A partir da Figura 4.26 constatou-se que, com a pasta de casca de eucalipto, às 48 h (linha a verde) atingiu-se uma maior concentração de etanol do que às 72 h (linha a preto), sendo este detetado na coluna após os 20 min. Com a xilose também se verificou uma maior concentração às 48 h do que às 72 h, sendo mais significativa esta diferença neste composto do que no etanol. Além disso, verificou-se também a presença de uma grande concentração do xilitol, produto secundário da reação de produção de etanol. Neste composto, a maior concentração foi obtida às 72 h.

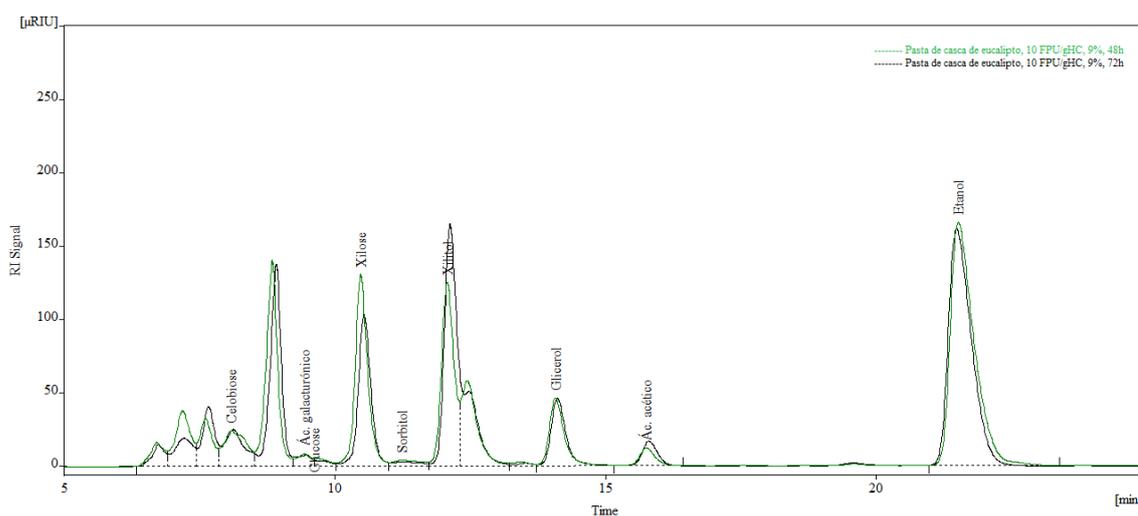


Figura 4.26 - Cromatograma da pasta de casca de eucalipto, com consistência de 9% e 10 FPU/g<sub>HC</sub>.

Através da Figura 4.27 constatou-se que, no caso da pasta de fibra mista virgem, atingiu-se uma maior concentração de etanol e de xilitol às 72 h (linha a verde) do que às 48 h (linha a preto). Neste caso, não se considerou a presença de xilose, mas sim de manose, cuja concentração máxima foi atingida às 48 h.

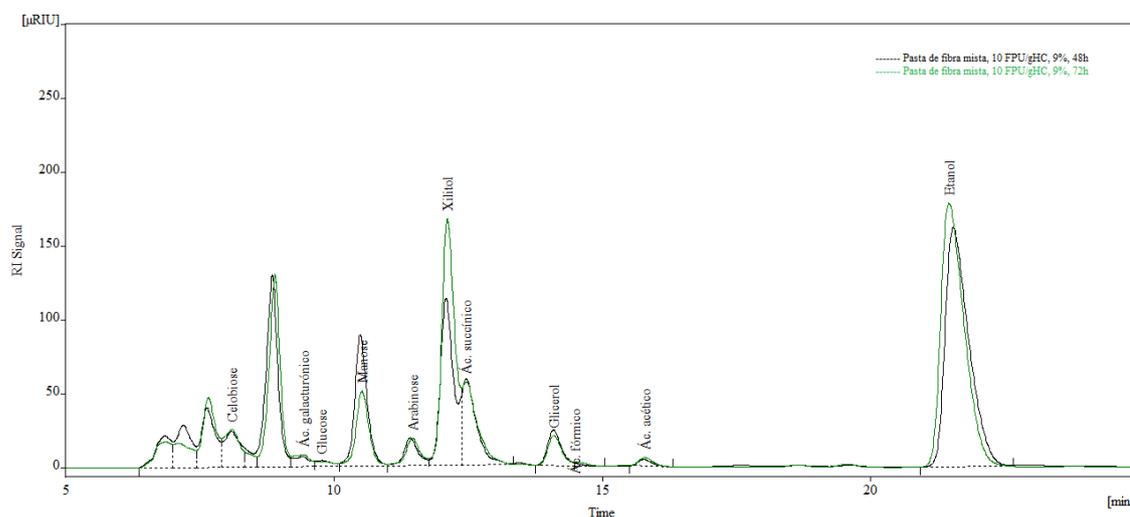


Figura 4.27 - Cromatograma da pasta de fibra mista virgem, com a consistência de 9% a 10 FPU/g<sub>HC</sub>.

Os valores obtidos através da coluna Rezex ROA – Organic Acid H<sup>+</sup> dizem respeito à percentagem de cada composto no monômero. No entanto, é possível determinar a quantidade de cada no polímero, valores que se encontram na Tabela 4.8, tendo em conta os seguintes fatores de conversão: 0,88 (para o caso de açúcares C-5, como a xilose e a arabinose), 0,90 (para o caso de açúcares C-6, como a manose, a galactose e a glucose), 0,717 (para os grupos acetilo), 1,43 (para 5-HMF) e 1,56 (para o furfural).<sup>[32]</sup>

Tabela 4.8 - Percentagem de cada composto presente na pasta de fibra mista virgem e na pasta de casca de eucalipto.

Compostos (%)	Pasta de Fibra Mista Virgem	Pasta de Casca de Eucalipto
<b>Glucose</b>	63,41	73,01
<b>Xilose</b>	3,56	13,49
<b>Manose</b>	8,47	1,13
<b>Galactose</b>	0,00	0,00
<b>Arabinose</b>	1,01	0,38
<b>Grupos acetilo</b>	1,54	0,00
<b>Ácidos urónicos</b>	0,60	0,00
<b>5-HMF</b>	1,06	1,14
<b>Furfural</b>	1,59	1,89

As Figuras 4.28 e 4.29 correspondem aos cromatogramas das pastas de casca de eucalipto e de fibra mista virgem, respetivamente, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>, nas diversas consistências em estudo. Observou-se que, apesar de se variar a consistência, identificaram-se os mesmos composto, mas em quantidades diferentes. Analisando as figuras, verificou-se que, em ambas as pastas, se obteve maior concentração de etanol à consistência de 9% e menor à consistência de 3%. Além disso, tal comportamento também se verificou com os compostos como a manose, a xilose, o xilitol, o glicerol, a glucose, a celobiose, o ácido fórmico e o ácido acético. Mais

uma vez, verificou-se a presença de xilose na pasta de casca de eucalipto e de manose na pasta de fibra mista virgem, visto se tratarem de uma «hardwood» e de uma «softwood», respectivamente.

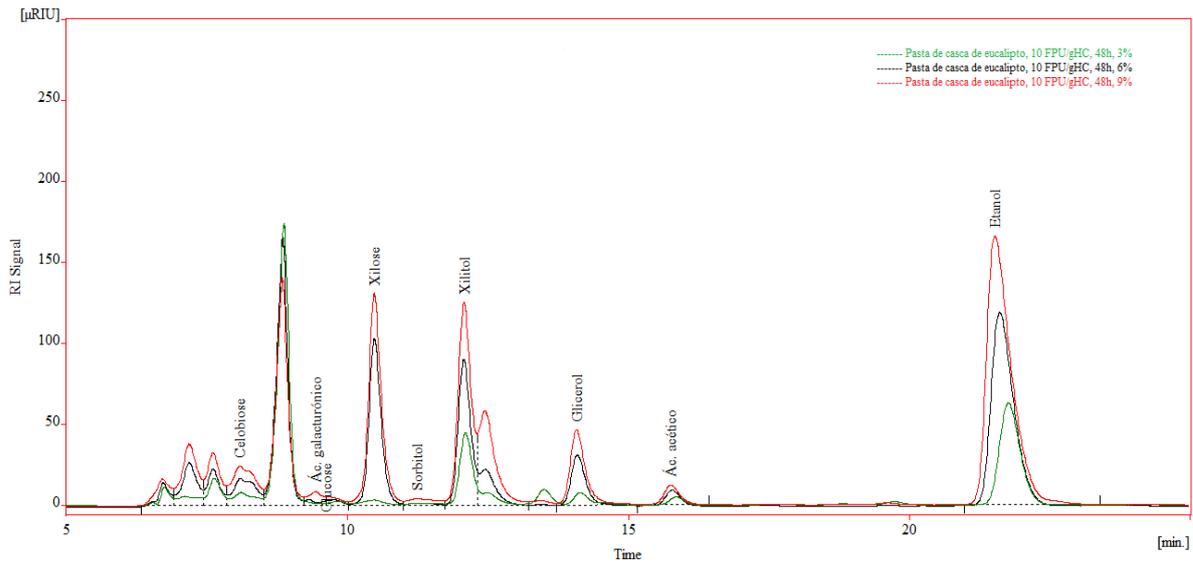


Figura 4.28 - Cromatogramas da pasta de casca de eucalipto, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>, nas diversas consistências.

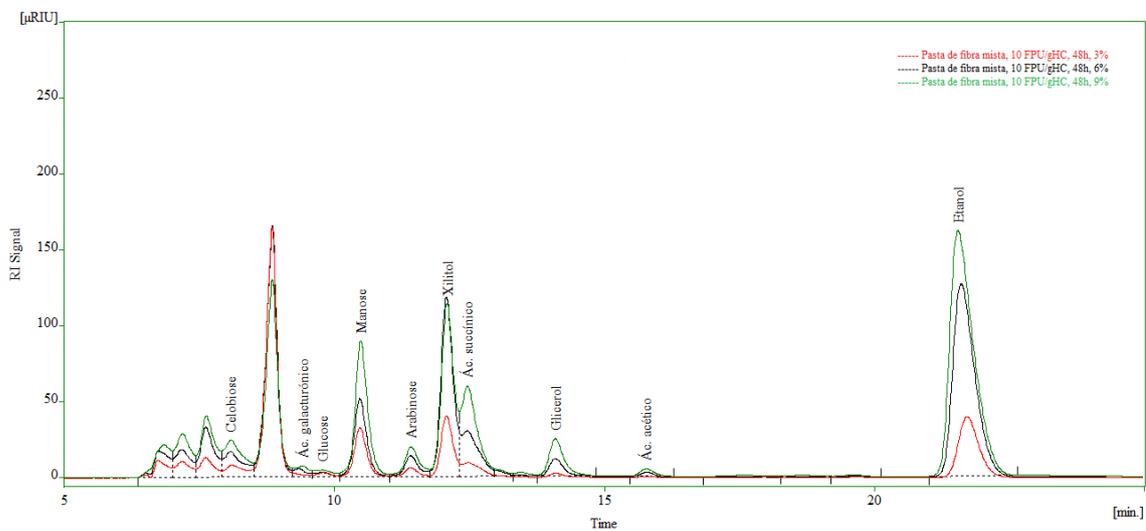


Figura 4.29 - Cromatogramas da pasta de fibra mista virgem, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>, nas diversas consistências.

Com o aumento da consistência, a mistura tornou-se mais viscosa, afetando a agitação e a transferência de massa e de calor. Apesar de se ter atingido a fluidez da mistura, o aumento da consistência dificultou a hidrodinâmica da mistura, uma vez que impediu uma mistura eficiente. A substituição do sistema de agitação convencional por mistura gravimétrica por outras técnicas pode permitir a liquefação, a sacarificação e a fermentação da biomassa.<sup>[33]</sup> Além de influenciar a agitação do material no reator, também pode inibir a solução enzimática e a levedura, o que pode levar a uma diminuição do rendimento total de etanol ou até mesmo à cessação da produção de etanol.<sup>[34]</sup>



## 5. Conclusões

O desenvolvimento desta dissertação teve como principal objetivo comparar os resultados obtidos da eficiência da produção de bioetanol celulósico a partir de uma matéria proveniente de uma «softwood» com os resultados obtidos a partir de uma matéria proveniente de uma «hardwood», otimizando-se variáveis de controlo do processo, como a carga enzimática e a consistência.

Para a concretização do objetivo principal, este trabalho experimental incluiu, essencialmente, três etapas principais:

- i. A caracterização química da matéria-prima, que envolveu a quantificação de cada composto celulósico, hidratos de carbono (celulose e hemiceluloses) e lenhina (solúvel e insolúvel). Para isso, recorreu-se a uma hidrólise ácida de modo a ocorrer a quebra total da cadeia polimérica dos hidratos de carbono;
- ii. A hidrólise enzimática, que recorreu à utilização da solução enzimática Cellic<sup>®</sup> CTec2, fornecida pela Novozymes, para a obtenção de açúcares simples, como a glucose e a xilose;
- iii. A sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF), onde se utilizou a mesma solução enzimática do processo de hidrólise enzimática e ainda a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC<sup>®</sup> 26602<sup>™</sup>), para a produção de etanol.

Tanto para a identificação e determinação da concentração de açúcares, como para a determinação da concentração de etanol recorreu-se à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Este forneceu espectros com diversos picos referentes aos açúcares presentes na amostra, permitindo também a determinação da concentração destes.

O objetivo principal foi concretizado, conseguindo-se desenvolver a produção de bioetanol celulósico com ambas as matérias fornecidas, nas diversas condições de operação, de modo a se otimizar o processo. No entanto, atingiu-se maiores concentrações de etanol com uma maior consistência (9%) e uma maior carga enzimática (15 FPU/g<sub>HC</sub>). Quanto à pasta, aquela que permitiu alcançar maiores concentrações de etanol foi a pasta de fibra mista virgem, ou seja, a matéria designada por «softwood». Ainda assim, à consistência de 9%, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>, também se obteve, com essa mesma pasta, uma concentração de etanol semelhante à atingida a maior carga enzimática. Apesar de se ter produzido mais etanol com a pasta de fibra mista virgem do que com a pasta de casca de eucalipto, de realçar que também se demorou mais tempo a conseguir atingi-la. Desta forma, concluiu-se que foi possível otimizar o processo de

produção de bioetanol celulósico, reduzindo a carga enzimática para 10 FPU/g<sub>HC</sub>, recorrendo-se a um menor tempo de produção aquando a utilização da pasta de casca de eucalipto. De realçar que, para a realização desta dissertação, recorreu-se à utilização de materiais lenhocelulósicos residuais, sem valor comercial, e, apesar disso, conseguiu-se obter resultados bastante satisfatórios na otimização do processo de produção de etanol. Para trabalhos futuros sugere-se:

- i. A realização do processo de hidrólise enzimática e de fermentação em «fed-batch»;
- ii. O estudo de outras enzimas e leveduras na produção de bioetanol celulósico;
- iii. O estudo de outras pastas com estes dois materiais (eucalipto e pinho), mas com diferentes percentagens de lenhina total na produção de bioetanol celulósico;
- iv. A utilização de HPLC em todas as amostragens do processo de hidrólise enzimática;
- v. O estudo do efeito de outros modos de agitação da amostra no processo de hidrólise enzimática e de fermentação, como a agitação mecânica.





## Bibliografia

- [1] Franceschin, G., Sudiro, M., Ingram, T., Smirnova, I., Brunner, G., Bertucco, A. (2011). Conversion of rye straw into fuel and xylitol: a technical and economical assessment based on experimental data. *Chemical Engineering Research and Design*, **89**: 631-640
- [2] Aditiya, H.B., Mahlia, T.M.I., Chong, W.T., Hadi Nur, Sebayang, A.H. (2016). Second generation bioetanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **66**: 631-653
- [3] Altri. (2018). *Biomassa*. Acedido a 10 de julho de 2018, em: <http://www.altri.pt/pt/what-we-do/renewable-energy/biomass>
- [4] Isikgor, F.H., Becer, C.R. (2015). *Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers*. Royal Society of Chemistry. Acedido a 10 de julho de 2018, em: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleHtml/2015/PY/c5py00263j>
- [5] U.S. Energy Information Administration (2018). *Biomass*. Acedido a 10 de julho de 2018, em: [https://www.eia.gov/energyexplained/?page=biomass\\_home](https://www.eia.gov/energyexplained/?page=biomass_home)
- [6] Romaní, A., Garrote, G., Parajó, J.C. (2011). Bioethanol production from autohydrolyzed *Eucalyptus globulus* by Simultaneous Saccharification and Fermentation operating at high solids loading. *Fuel*. **94**: 305-312.
- [7] Pettersen, R. (1984). *The Chemistry of Solid Wood*. Volume 207.
- [8] Severo, E.T.D., Calonego, F.W., Sansígolo, C.A. (2006). Composição química da madeira de *Eucalyptus citriodora* em função das direcções estruturais. *Silva Lusitana*. **14**: 113-126. Acedido a 10 de julho de 2018, em: <http://www.scielo.mec.pt/pdf/slu/v14n1/v14n1a09.pdf>
- [9] Bajpai, P. (2016). *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production*. 1ª edição. Springer.
- [10] Civil Engineering. *Difference between softwood and hardwood*. Acedido a 11 de julho de 2018, em: <https://civiltoday.com/civil-engineering-materials/timber/150-difference-between-softwood-and-hardwood>
- [11] Sjostrom, E. (1993). *Wood chemistry: fundamentals and applications*. Second edition. Academic Press. San Diego.
- [12] McDonald, J.E., Rooks, D.J., McCarthy, A.J. (2012). Methods for the isolation of cellulose – Degrading microorganisms. *Methods in Enzymology*. **510**: 349-374.
- [13] Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., Bohn, A., Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005. 44: p. 3358-3393.
- [14] Wagberg, L., Annergren, G.O. Physicochemical characterization of papermaking fibers, in: *The fundamentals of Papermaking Materials: Transaction of the 11th Fundamental Research Symposium in Held at Cambridge*, C.F. Baker, Editor. 1997, Pira International. p. 1-82.
- [15] Anwar, Z., Gulfraz, M., Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. **7**: 163-173.
- [16] Junior, I.J.S., Veredas, V., Santos, M.A.G., Santana, C.C. (2006). Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantiomericamente puras ou enriquecidas em larga escala. *Química Nova*. **29**: 1027-1037.
- [17] Wang, D. *Structure and Properties of Hemicelluloses*. Acedido a 15 de julho de 2018, em: <http://web.nchu.edu.tw/pweb/users/taiwanfir/lesson/10393.pdf>

- [18] Yang, G., Jaakkola, P. (2011). *Wood chemistry and isolation of extractives from wood*. Saimaa University of Applied Sciences. Acedido a 10 de junho de 2018, em: [http://biotuli-hanke.fi/files/download/Biotuli\\_YangJaakkola2011.pdf](http://biotuli-hanke.fi/files/download/Biotuli_YangJaakkola2011.pdf)
- [19] CELPA – Associação da Indústria Papeleira. (2016). *Boletim Estatístico*. Acedido a 10 de junho de 2018, em: [http://www.celipa.pt/wp-content/uploads/2018/01/Boletim\\_WEB.pdf](http://www.celipa.pt/wp-content/uploads/2018/01/Boletim_WEB.pdf)
- [20] Gray, K.A., Zhao, L., Emptage, M. (2006). Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*. **10**: 141-146.
- [21] Eisentraut, A., (2010). *Sustainable production of second-generation biofuels: Potential and perspectives in major economies and developing countries*. International Energy Agency. Acedido a 10 de julho de 2018, em: [https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/second\\_generation\\_biofuels.pdf](https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/second_generation_biofuels.pdf)
- [22] Romaní, A., Garrote, G., Ballesteros, I., Ballesteros, M. (2013). Second generation bioethanol from exploded Eucalyptus globulus wood. *Fuel*. **111**: 66-74.
- [23] Novozymes. Acedido a 11 de agosto de 2018, em: <http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem010/manual/Ctec2.pdf>
- [24] Canilha, L., Chandell, A.K., Milessi, T.S.S., Antunes, F.A.F., Freitas, W.L.C., Felipe, M.G.A., Silva, S.S. (2012). *Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation*. National Center for Biotechnology Information, for Journal of Biomedicine & Biotechnology. Acedido a 10 de julho de 2018, em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23251086>
- [25] Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R., Gama, M. (2003). *Engenharia Enzimática*. LIDEL – Edições Técnicas, LDA.
- [26] El-Naggar, N.E.A., Deraz, S., Khalil, A. (2014). Bioethanol Production from Lignocellulosic Feedstocks Based on Enzymatic Hydrolysis: Current Status and Recent Developments. *Biotechnology*. **13**: 1-21.
- [27] Jin, M., Gunawan, C., Balan, V., Lau, M.W., Dale, B.E. (2012). *Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of AFEX™ pretreated corn stover for ethanol production using commercial enzymes and Saccharomyces cerevisiae 424A(LNH-ST)*. National Center for Biotechnology Information, for Bioresource Technology. Acedido a 10 de julho de 2018, em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22361075>
- [28] Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G. (2008). *A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks*. National Center for Biotechnology Information, for Biotechnology for Biofuels. Acedido a 10 de julho de 2018, em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2397418/>
- [29] Mendes, C.V.T., Vergara, P., Carbajo, J.M., Villar, J.C., Rocha, J.M.S., Carvalho, M.G.V.S. (2018). *Softwood bioconversion to ethanol: pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation*.
- [30] Krishna, S.H., Chowdary, G.V. (2000). *Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation for the Production of Ethanol from Lignocellulosic Biomass*. American Chemical Society, for Journal of Agricultural and Food Chemistry. Acedido a 10 julho de 2018, em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf991296z>
- [31] Liu, Z., Chen, H. (2016). Simultaneous saccharification and co-fermentation for improving the xylose utilization of steam exploded corn stover at high solid loading. *Bioresource Technology*. **201**: 15-26.

- [32] National Renewable Energy Laboratory. Acedido a 10 de julho de 2018, em: <https://www.nrel.gov/>
- [33] SziJártó, N., Siika-aho, M., Sontag-Strohm, T., Viikari, L. (2010). Liquefaction of hydrothermally pretreated wheat straw at high-solids content by purified *Trichoderma* enzymes. *Bioresource Technology*. **102**: 1968-1974.
- [34] Hoyer, K., Galbe, M., Zacchi, G. (2012). The effect of prehydrolysis and improved mixing on high-solids batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce to ethanol. *Process Biochemistry*. **48**: 289-293.
- [35] Rezex™. Guarantee. Acedido a 6 de setembro de 2018, em: <https://www.brechtbuehler.ch/fileadmin/redacteur/pdf/columns-sampleprep/lc-columns/zhrzx.pdf>
- [36] Yamamoto, M., Iakovlev, M., Banker, S., Tunc, M.S., Heiningen, A. (2014). Enzymatic hydrolysis of hardwood and softwood harvest residue fibers released by sulfur dioxide-ethanol-water fractionation. *Bioresource Technology*. **167**: 530-538.
- [37] Carvalho, M. G. (1999). *Efeitos de Variáveis de Cozimento nas Características Químicas de Pastas kraft de E. globulus*. Universidade de Coimbra.
- [38] Silva, J., Campos, J. M. (2014). *Determinação de Açúcares Redutores pelo Método do DNS*. Acedido a 10 de julho de 2018, em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAg6NkAF/05-determinacao-acucares-redutores-metodo-dns>
- [39] Pubchem. Sulfuric acid. Acedido a 20 de julho de 2018, em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1118>
- [40] Labchem. Sulfuric acid 72% (w/w). Acedido a 20 de julho de 2018
- [41] Pubchem. Calcium carbonate. Acedido a 20 de julho de 2018, em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10112>
- [42] Labchem. Calcium carbonate. Acedido a 20 de julho de 2018
- [43] Pubchem. Potassium permanganate. Acedido a 20 de julho de 2018, em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/516875>
- [44] Roth. Potassium permanganate. Acedido a 20 de julho de 2018
- [45] Pubchem. Potassium iodate. Acedido a 20 de julho de 2018, em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23665710>
- [46] Merck. Iodeto de potássio. Acedido a 20 de julho de 2018
- [47] Pubchem. Sodium sulfite. Acedido a 20 de julho de 2018, em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24437>
- [48] Merck. Tiosulfato de sódio. Acedido a 20 de julho de 2018
- [49] Pubchem. 3,5-Dinitrosalicylic acid. Acedido a 20 de julho de 2018, em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11873>
- [50] ScienceLab. 3,5-Dinitrosalicylic acid. Acedido a 20 de julho de 2018
- [51] Pubchem. Potassium sodium tartrate. Acedido a 20 de julho de 2018, em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9855836>
- [52] ScienceLab. Potassium sodium tartrate. Acedido a 20 de julho de 2018
- [53] Pubchem. Sodium hydroxide. Acedido a 20 de julho de 2018, em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14798>

[54] LabChem. Sodium hydroxide. Acedido a 20 de julho de 2018

[55] Pubchem. Sodium sulfite. Acedido a 20 de julho de 2018, em:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24437>

[56] Merck. Metabissulfito de sódio. Acedido a 20 de julho de 2018

[57] Pubchem. Phenol. Acedido a 20 de julho de 2018, em:  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/996>

[58] Merck. Fenol. Acedido a 20 de julho de 2018

## Apêndice

### Anexo I – Procedimento da caracterização química

#### Determinação do teor de sólidos

Na determinação do teor de sólidos, começou-se por pesar entre 0,5 a 2 g de amostra, com precisão de 0,1 mg, numa caixa de vidro tarada, para ser inserida numa estufa a 105°C, onde permaneceu durante a noite (~12h). Após esse tempo, retirou-se a amostra da estufa e colocou-se num exsiccador durante 20 min, para posterior pesagem da caixa de vidro com e sem amostra (Tabela I.1).

Efetuuou-se o procedimento em triplicado, para cada matéria-prima.

Tabela I.1 - Quantidades de matéria-prima utilizadas para a determinação do teor de sólidos.

<b>Material</b>	<b>m<sub>húmida</sub> (g)</b>	<b>m<sub>secos</sub> (g)</b>	<b>Secura (g/g)</b>	<b>Secura<sub>média</sub> (g/g)</b>
<b>lenhocelulósico</b>				
<b>Pasta de Fibra Mista Virgem</b>	1,0039	0,2332	0,2323	0,2339
	1,0196	0,2398	0,2352	
	1,0105	0,2366	0,2341	
<b>Pasta de Casca de Eucalipto</b>	0,5168	0,1537	0,2974	0,2991
	0,5117	0,1534	0,2998	
	0,5116	0,1535	0,3000	

#### Determinação do teor de cinzas

Na determinação das cinzas, começou-se por colocar um cadinho de porcelana numa mufla, a uma temperatura de 575°C durante 4 h. Retirando o cadinho de porcelana da mufla, colocou-se num exsiccador durante 20 min para arrefecer, para posteriormente ser pesado, com uma precisão de 0,1 mg. No cadinho de porcelana previamente tarado, adicionou-se 0,5 g de amostra (em base seca), tendo sido introduzido na mufla com a seguinte rampa de temperaturas: subida da temperatura desde a ambiente até 105°C, a qual foi mantida durante 12 min; aumentou-se gradualmente a temperatura durante 15 min até atingir 250°C, mantendo-se por 30 min; aumentou-se novamente a temperatura durante 20 min até atingir os 575°C, permanecendo a esta temperatura durante 10 h. Retirou-se o cadinho de porcelana da mufla, colocou-se num exsiccador durante 20 min e pesou-se (Tabela I.2).

Mais uma vez, efetuou-se o procedimento em triplicado, para cada matéria-prima.

Tabela I.2 – Quantidade de matéria-prima a utilizar para a determinação do teor de cinzas.

<b>Material</b>	<b>m<sub>seca</sub> (g)</b>	<b>m<sub>cadinho575°C</sub> (g)</b>	<b>m<sub>cadinho+cinzas575°C</sub> (g)</b>
<b>Pasta de Fibra</b>	1,0289	32,6491	32,6604
<b>Mista Virgem</b>	1,0282	42,0895	42,0986
	1,0283	26,5425	26,5519
<b>Pasta de Casca de</b>	0,2058	37,6616	37,6639
<b>Eucalipto</b>	0,2048	32,6523	32,6548

#### Determinação do teor de lenhina total

Na determinação da lenhina total (solúvel e insolúvel) e do teor de hidratos de carbono recorreu-se à hidrólise ácida. Secou-se um cadinho filtrante de vidro (50 mL, porosidade 2) juntamente com um filtro de fibra de vidro (GF/A, FilterLab, 47 mm) na estufa a 105°C, durante 4 h. Passado esse tempo, retirou-se o cadinho filtrante de vidro da estufa, colocou-se num exsiccador durante 20 min e depois pesou-se (Tabela I.3).

Em paralelo, pesou-se 0,3 g de amostra (em base seca), com uma precisão de 0,1 mg, num tubo de centrífuga (Tabela I.3). De seguida, adicionou-se 3 mL de ácido sulfúrico a 72% (m/m) no tubo de centrífuga e colocou-se num banho de água morna, à temperatura de 30°C durante 60 min, agitando-se a cada 10 min, sem retirar a amostra do banho. Após os 60 min, removeu-se o tubo do banho e verteu-se o seu conteúdo para um frasco autoclavável, adicionando-se 84 g de água destilada, de modo a se diluir o ácido sulfúrico para 4% (m/m). Após este procedimento, colocou-se o frasco na autoclave a 121°C, durante 1 h. Passado esse tempo, retirou-se o cadinho filtrante da estufa, colocou-se num exsiccador durante 20 min e pesou-se juntamente com um filtro de fibra de vidro. Retirou-se o frasco da autoclave e deixou-se arrefecer, de modo a se efetuar a filtração a vácuo do conteúdo, usando o cadinho filtrante com filtro, previamente pesados. Armazenou-se o filtrado recolhido num frasco de armazenamento, para posterior utilização. Lavou-se com 50 mL de água destilada quente o frasco autoclavável e filtrou-se o conteúdo no cadinho.

Efetuuou-se o procedimento em triplicado, para cada matéria-prima.

Tabela I.3 - Quantidade de matéria-prima a utilizar na hidrólise ácida.

<b>Material</b>	<b>Amostra</b>	<b>m<sub>amostra seca</sub> (g)</b>	<b>m<sub>cadinho+filtro</sub> (g)</b>
<b>Pasta de Casca de Eucalipto</b>	1	0,3046	40,2406
	2	0,3096	39,2404
<b>Pasta de Fibra Mista Virgem</b>	1	0,3153	35,8461
	2	0,3040	35,2289
	3	0,3126	35,5500

Na determinação da lenhina insolúvel, colocou-se o cadinho filtrante de vidro com os resíduos na estufa a 105°C, durante 12 h. Após este tempo, retirou-se o cadinho da estufa e inseriu-se num exsiccador, durante 20 min, para posterior pesagem deste (Tabela I.4).

Tabela I.4 - Pesagens para a determinação da lenhina insolúvel.

Material	Amostra	m <sub>cadinho+filtro+resíduo</sub> (g)	m <sub>resíduo</sub> (g)
Pasta de Casca de Eucalipto	1	40,2457	0,0051
	2	39,2436	0,0032
Pasta de Fibra Mista Virgem	1	35,8848	0,0387
	2	35,2665	0,0376
	3	35,5858	0,0358

Na determinação da lenhina solúvel, colocou-se 1 mL do filtrado recolhido num tubo de ensaio, adicionou-se 9 mL de água destilada e agitou-se. No ensaio «branco», colocou-se num tubo de ensaio 1 mL de ácido sulfúrico a 4% (m/m) e 9 mL de água destilada. Recorreu-se a uma cuvete de quartzo para medir a absorvância da amostra de cada tubo, em duplicado, num espectrofotómetro com um comprimento de onda de 205 nm (radiação ultravioleta), contra o «branco» como referência (Tabela I.5). A soma da lenhina solúvel e da lenhina insolúvel corresponde à lenhina total presente na amostra.

Tabela I.5 - Medições para a determinação da lenhina solúvel.

Material	m <sub>amostra seca</sub> (g)	Amostra	Absorvância <sub>a 205nm</sub> (A)
Pasta de Casca de Eucalipto	0,3079	1-A	0,3556
		1-B	0,3872
	0,3096	2-A	0,3369
		2-B	0,3691
Pasta de Fibra Mista Virgem	0,3153	1-A	0,3020
		1-B	0,3153
	0,3040	2-A	0,2203
		2-B	0,2508
	0,3126	3-A	0,1775
		3-B	0,2713

#### Determinação dos monossacarídeos por HPLC

Na determinação dos hidratos de carbono, começou-se por neutralizar cerca de 20 mL do filtrado, recorrendo ao carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>), até que cada amostra tenha um pH próximo de 5. Deixou-se sedimentar o precipitado, de modo a se decantar o líquido, recorrendo-se a um filtro de seringa com porosidade de 0,2 µm, para um tubo Eppendorf e para um frasco.

Injetou-se o conteúdo presente no tubo Eppendorf no HPLC, recorrendo à coluna Rezex RPM – Monosaccharide Pb<sup>2+</sup>, a operar a 80°C, tendo como eluente água ultrapura com um caudal de 0,6 mL/min. Antes de utilizar a água ultrapura no HPLC, fez-se uma filtração desta e colocou-se a água filtrada num equipamento de ultrassom, durante 15 min.

A Figura I.1. representa o cromatograma com os tempos de retenção dos diversos compostos que, neste caso, correspondem aos monossacarídeos identificados pela coluna Rezex RPM – Monosaccharide Pb<sup>2+</sup>.

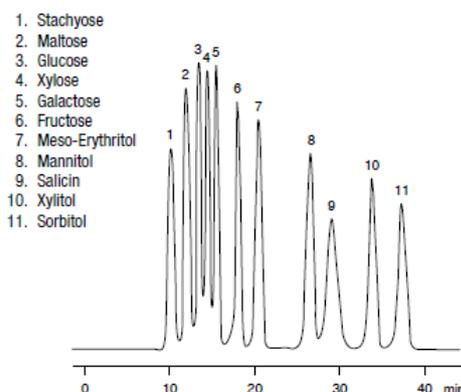


Figura I.1 - Cromatograma de calibração dos monossacarídeos, na coluna Rezex RPM - Monosaccharide Pb<sup>2+</sup>.<sup>[35]</sup>

Retirando-se as concentrações de cada composto presente nas amostras, foi possível determinar a percentagem de celulose, de hemiceluloses e, conseqüentemente, de hidratos de carbono presentes em cada amostra, através das seguintes expressões, tendo em consideração a relação existente manose/glucose nas glucomananas:

- A. Nas «softwoods», como a pasta de fibra mista virgem, a relação manose/glucose é de 4,15/1.<sup>[36]</sup>

$$\%Cel = \%Glu - \frac{\%Man}{4,15} \quad (5)$$

$$\%Hem = \%Xil + \%Man + \%Gal + \%Arab + \%G.acet + \%Ac.uron + \frac{\%Man}{4,15} \quad (6)$$

- B. Nas «hardwoods», como a pasta de casca de eucalipto, a relação manose/glucose é de 1,6/1.<sup>[36]</sup>

$$\%Cel = \%Glu - \frac{\%Man}{1,6} \quad (7)$$

$$\%Hem = \%Xil + \%Man + \%Gal + \%Arab + \%G.acet + \%Ac.uron + \frac{\%Man}{1,6} \quad (8)$$

## Determinação do Índice Kappa (IK)

Na determinação do índice kappa fez-se, primeiramente, um «branco», isto é, sem material lenhocelulósico. Assim, colocou-se 150 mL de água destilada num copo de 400 mL, num banho termostático regulado para a temperatura de 25°C, segurando-o na lateral com uma pinça de garras e colocando um agitador para desintegrar. De seguida, colocou-se num copo de 100 mL, 20 mL de permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>) de 0,01 M e 20 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) de 2,0 M. A medição de KMnO<sub>4</sub> tem que ser rigorosa, mas a de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> não precisa de ser. Segundo a norma NP 3186, o índice kappa da pasta é determinado a partir do número de mililitros de uma solução de permanganato de potássio 0,02 M (KMnO<sub>4</sub>) consumidos por grama de pasta absolutamente seca, sob condições normalizadas, sendo o resultado corrigido para um consumo de 50%. Desta forma, o KMnO<sub>4</sub> vai oxidar a lenhina, tal como é demonstrado na seguinte expressão da reação química.<sup>[37]</sup>



Ao copo de 400 mL com água destilada, adicionou-se mais 10 mL de água destilada para limpar o copo, de modo a se ficar com um volume total de 200 mL. Depois, adicionou-se 10 mL de iodeto de potássio (KI) de 1,0 M, para a solução ficar com uma tonalidade amarelo-alaranjado. Tal é efetuado de modo a que o iodeto de potássio reaja com o permanganato que não foi consumido ao fim de 10 min de reação, dando-se a seguinte reação:<sup>[37]</sup>



É de realçar que no caso do «branco», em princípio, o permanganato adicionado inicialmente deve reagir na totalidade com o iodeto para formar iodo, exceto se a água contiver substâncias que se oxidam. Com isto, titulou-se o iodo com tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) de 0,05 M até a solução mudar de tonalidade para amarelo claro, ocorrendo a seguinte reação química:<sup>[37]</sup>



Nessa altura, adicionou-se o indicador amido, tendo este conferido à solução uma tonalidade azul escura. Continuou-se a titular até a solução ficar incolor. Registou-se o volume de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> consumido. Depois de se fazer o «branco», fez-se o ensaio com a amostra de material lenhocelulósico, começando-se por adicionar o material, previamente pesado, aos 150 mL de água destilada e fazendo-se tal e qual como se fez com o «branco». No entanto, o KI só foi adicionado 10 min após se ter adicionado KMnO<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Com o volume de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

consumido, a massa húmida de amostra e o teor de secura, determinou-se o índice kappa através das seguintes expressões:<sup>[37]</sup>

$$IK = \frac{C \times d}{W} \quad (12)$$

Onde,

$$C = 0,5 \times (V_B - V_T) \times \frac{[Na_2S_2O_3]}{5 \times [KMnO_4]} \quad (13)$$

$$d = 0,89301 + 0,021456 \times C \quad (14)$$

Sabendo o valor do índice kappa, é possível determinar a percentagem de lenhina total presente nas pastas. Como tal, recorre-se à seguinte relação aproximada entre a lenhina total (LT) e o índice kappa (IK), que é influenciada pela espécie de madeira e o tipo de cozimento utilizado.

$$LT (\%) = 0,15 \times IK \quad (15)$$

É de salientar que, além da lenhina, outras estruturas, como os ácidos hexenurónicos, também consomem permanganato, contribuindo para o valor do índice kappa das pastas. Assim, é necessário ter em conta a contribuição destes grupos no valor do IK, através da seguinte expressão:

$$IK = 5,3 \times LT + 0,09 \times HexA \quad (16)$$

## Anexo II – Hidrólise Enzimática e Fermentação

### Determinação de açúcares redutores

Para a determinação dos açúcares simples recorreu-se a alguns reagentes, entre eles o reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) modificado ( $C_7H_4N_2O_7$ ). A sua produção exige o estabelecimento de uma curva de calibração, para posterior determinação da concentração de glucose. A utilização do DNS deve-se ao facto de este reagir com os monossacarídeos, sofrendo redução e alterando, conseqüentemente, a sua tonalidade. Portanto, verifica-se a presença dos açúcares se a tonalidade da solução escurecer, deixando de ter a tonalidade laranja. A redução do DNS origina o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ( $C_7H_6N_2O_5$ ). A Figura II.1 representa a reação química do DNS com um açúcar redutor que, neste caso, corresponde à glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ).<sup>[38]</sup>



(radiação visível). Com todos os valores das absorvâncias, fez-se uma representação gráfica de modo a identificar possíveis «outliers» e aplicou-se uma regressão linear, de forma a se obter a curva de calibração. Ao longo desta dissertação realizaram-se cinco doses de solução de DNS, pelo que foi necessário elaborar uma representação gráfica e aplicar uma regressão linear para cada uma das doses. A Figura II.2 e a Tabela II.2 representam a representação gráfica e a curva de calibração da solução de DNS.

Tabela II.2 - Curva de calibração da solução de DNS.

$m_{\text{glucose}}$ (g)	[Glucose] (mg/mL)	Curva de calibração
0,1261	5,044	[Glucose] (mg/mL) = 8,1723 A + 0,2215

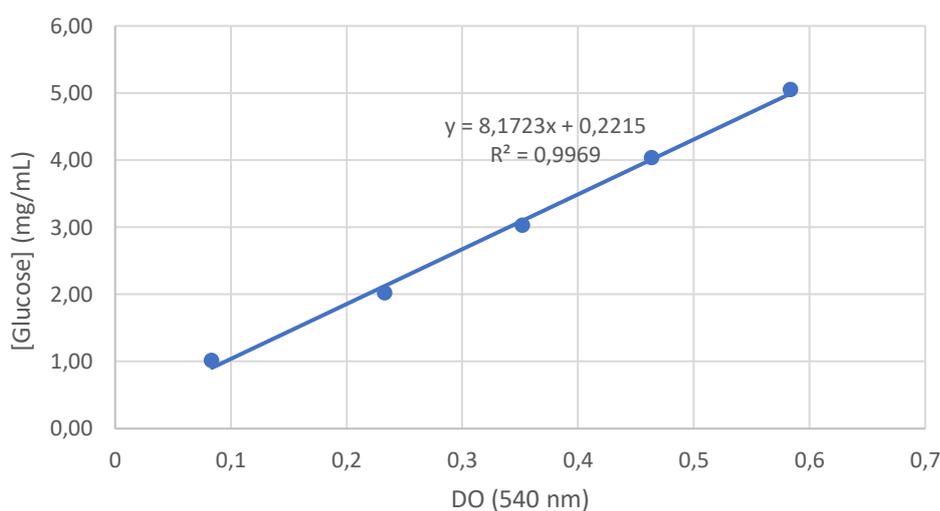


Figura II.2 – Representação gráfica da curva de calibração da solução de DNS.

Para determinar os açúcares redutores nos hidrolisados obtidos do material lenhocelulósico, fez-se uma diluição 1:5, colocando-se 0,2 mL de amostra e 0,8 mL de água destilada em tubos de ensaio, de forma a ter um volume total de 1 mL. De seguida, adicionou-se 1 mL de reagente de DNS normal. Taparam-se os tubos, agitaram-se e inseriram-se num banho de água a ferver durante 5 min, seguindo depois o procedimento descrito acima para as soluções padrão «stock»: tubos em banho de água com gelo e adição de 10 mL de água destilada. Deixou-se repousar durante 15 min e transferiu-se para cuvetes de plástico, para se ler as absorvâncias de cada amostra num espectrofotómetro com um comprimento de onda de 540 nm. Estes valores são convertidos em concentração de açúcar usado para construir a curva de calibração (neste caso, em equivalentes de glucose).

## Atividade enzimática

Neste trabalho foi selecionada a solução enzimática Cellic<sup>®</sup> CTec2, fornecida pela Novozymes. Esta solução teve de ser previamente diluída a fim de determinar a sua atividade e poder conhecer a carga enzimática usada em cada ensaio. Fizeram-se sete soluções com diluições diferentes da solução enzimática inicial – de 1:151 a 1:601, usando-se solução de tampão citrato de 0,05 M, como ilustrado na Tabela II.3.

Tabela II.3 - Diluições das soluções de enzimas.

Diluição	V <sub>solução enzima</sub> (mL)	V <sub>solução tampão citrato</sub> (mL)
<b>1:151</b>	0,10	15
<b>1:201</b>	0,10	20
<b>1:251</b>	0,10	25
<b>1:301</b>	0,10	30
<b>1:401</b>	0,10	40
<b>1:501</b>	0,05	25
<b>1:601</b>	0,05	30

Considerando que a solução enzimática seria usada a duas temperaturas diferentes, consoante o processo SHF ou SSF, determinou-se a atividade enzimática à temperatura de 50°C e de 38°C.

Adicionou-se inicialmente 1 mL de tampão citrato de 0,05 M em todos os tubos de ensaio e ainda 0,5 mL deste ao tubo de ensaio correspondentes aos ensaios «brancos» com e sem substrato. Adicionou-se substrato nos tubos de ensaio, que se trata de uma tira de papel de filtro com medidas específicas enrolado (1,0 x 6,0 cm = ~ 50 mg). De seguida, aqueceram-se todos os tubos de ensaio e ainda as soluções de enzima na incubadora à temperatura de 50°C. Atingida a temperatura desejada, retirou-se tudo da incubadora e inseriu-se 0,5 mL da solução de enzima, com diferentes diluições (1:301 a 1:601), nos respetivos tubos de ensaio. Com isto, inseriram-se novamente todos os tubos de ensaio na incubadora e, no momento em que atingiram 50°C, iniciou-se a contagem do tempo que os tubos deveriam permanecer dentro da incubadora (60 min). Passado esse tempo, removeram-se os tubos da incubadora, adicionou-se 3 mL de DNS modificado, agitaram-se e inseriram-se num banho de água a ferver, durante 5 min. Findo esse tempo, inseriram-se os tubos num banho de água com gelo, durante mais 5 min. Depois, pipetou-se 0,2 mL de cada solução em cuvetes de plástico e adicionou-se 2,5 mL de água destilada. Procedeu-se à leitura da absorvância de cada amostra num espectrofotómetro para um comprimento de onda de 540 nm. Efetuou-se o procedimento em duplicado.

Para determinar o valor correspondente à atividade enzimática, é preciso obter a concentração de enzima que liberta 2 mg de glucose. Isto é, retirado o valor da absorvância de cada amostra, através da curva de calibração, calculou-se a concentração de açúcares redutores em equivalentes de glucose presentes na amostra. No entanto, é preciso corrigir a absorvância lida, subtraindo à absorvância da amostra composta por solução de tampão citrato de 0,05 M, enzima e substrato, a absorvância da amostra composta por solução de tampão citrato de 0,05 M e substrato e ainda a absorvância da amostra composta por solução de tampão citrato de 0,05 M e enzima. Substituindo o resultado final na curva de calibração, obteve-se a concentração de glucose. Analisaram-se as concentrações obtidas e, com as duas concentrações mais próximas de 2 mg, efetuou-se a interpolação de modo a se identificar a concentração de enzima que liberta 2 mg de glucose. A seguinte expressão permite calcular a atividade enzimática, em FPU/(mL enzima).

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{0,37}{[\text{Glucose}]} \quad (17)$$

Onde, o valor 0,37 é proveniente do volume de enzima diluída utilizada (0,5 mL), do tempo de incubação (60 min), da massa de glucose produzida em 60 min (2 mg) e da massa molar da glucose (180 g/mol).

$$\frac{0,37 \mu\text{mol}}{\text{min. mL enzima}} = \frac{2 \text{ mg}}{60 \text{ min}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ mol}}{180 \text{ g}} \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} \times \frac{1}{0,5 \text{ mL enzima}} \quad (18)$$

No caso da temperatura a 38°C, recorrer a diluições da solução enzimática original de 1:151 a 1:301 e efetuou-se o mesmo procedimento que à temperatura de 50°C.

#### Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi aplicada nos processos SHF e SSF, utilizando a solução enzimática Cellic® CTec2, da Novozymes. Em diferentes ensaios, alteraram-se alguns parâmetros como a consistência do material (3, 6 e 9%) e a carga enzimática (10FPU/g<sub>massa seca</sub> e de 15FPU/g<sub>massa seca</sub>).

Para preparar a hidrólise enzimática pesou-se o material lenhocelulósico, em massa húmida, tendo-se em conta a consistência a se utilizar, o teor de secura e a percentagem de hidratos de carbono.

$$m_{\text{amostra húmida}} = \frac{\text{Consistência}}{\%HC \times \%Secura} \quad (19)$$

Além disso, é preciso determinar o volume de solução enzimática necessário utilizar e a devida diluição feita com solução de tampão citrato a 0,05 M. Sabendo a carga enzimática pretendida, ou seja, a quantidade de enzima de FPU's por 1 g de HC, é necessário ter em conta a consistência e ainda a atividade enzimática da enzima à temperatura desejada ( $T = 50^{\circ}\text{C}$ ).

$$V_{enzima} = \frac{\text{Consistência} \times \text{Carga Enzimática}}{\text{Atividade Enzimática}} \quad (20)$$

Nas Tabelas II.4 e II.5 estão representadas as quantidades de massa húmida da pasta de fibra mista virgem e da pasta de casca de eucalipto utilizadas, respetivamente, na hidrólise enzimática nas diversas condições a estudar, ou seja, com as diferentes consistências e cargas enzimáticas.

Tabela II.4 - Quantidade de massa húmida de pasta de fibra mista virgem utilizada na hidrólise enzimática.

<b>Carga Enzimática</b> (FPU/g <sub>massa seca</sub> )	<b>Consistência (g<sub>massa</sub> seca/g<sub>suspensão</sub>)</b>	<b>V<sub>suspensão</sub> (mL)</b>	<b>m<sub>amostra húmida</sub> (g)</b>
<b>15</b>	3	250	31,80
			31,87
<b>10</b>	3	100	12,70
			12,69
<b>15</b>	6	100	25,65
			25,66
<b>10</b>	6	100	25,68
			25,66
<b>15</b>	9	100	38,48
			38,47
<b>10</b>	9	100	38,47
			38,47

Tabela II.5 - Quantidade de massa húmida de pasta de casca de eucalipto a utilizar na hidrólise enzimática.

<b>Carga Enzimática</b> (FPU/g <sub>massa seca</sub> )	<b>Consistência (g<sub>massa</sub> seca/g<sub>suspensão</sub>)</b>	<b>V<sub>suspensão</sub> (mL)</b>	<b>m<sub>amostra húmida</sub> (g)</b>
<b>15</b>	3	100	10,03
			10,04
<b>10</b>	3	100	10,05
			10,03
<b>15</b>	6	100	20,07
			20,06
<b>10</b>	6	100	20,07
			20,06

15	9	100	30,09
			30,09

Adicionou-se a massa húmida de material lenhocelulósico em balões de Erlenmeyer de 250 mL. Em frascos de 5 mL, adicionou-se o volume necessário de solução enzimática e o restante volume foi ocupado com solução de tampão citrato de 0,05 M. No balão de Erlenmeyer, que atua como «controlo», adicionou-se os 5 mL com o respetivo volume de solução enzimática e solução de tampão citrato a 0,05 M, num total de 5 mL e depois perfez-se até 100 mL com a mesma solução de tampão citrato a 0,05 M. Então, verteram-se os frascos de 5 mL com enzima para os balões de Erlenmeyer e agitaram-se. Colocaram-se os balões de Erlenmeyer na incubadora, a uma temperatura de 50°C, com uma velocidade de rotação de 150 rpm, permanecendo lá 30 min.

De seguida, retirou-se 1,5 mL da solução dos balões de Erlenmeyer para se colocar em tubos de ensaio novos, que se inseriram na centrifugadora, durante 5 min a 3500 rpm. Em diversos tempos, começando logo no tempo 0 segundos, retiraram-se amostras da solução contida nos balões de Erlenmeyer para seguir a evolução da produção de açúcares. Na última amostragem, guardou-se a solução, após centrifugação, para se injetar no HPLC, na coluna Rezex RPM – Monossacarídeo Pb<sup>2+</sup>, para a identificação e quantificação dos diversos monossacarídeos presentes, operando com esta coluna a uma temperatura de 80°C e utilizando como eluente água ultrapura.

Em cada amostragem efetuou-se o seguinte procedimento: retirou-se 1,5 mL da solução contida nos balões de Erlenmeyer e colocou-se em tubos de ensaio, que foram posteriormente centrifugados durante 5 min a 3500 rpm. Prepararam-se tubos de ensaio da seguinte forma: um ensaio «tampão» com 1,5 mL de solução de tampão citrato de 0,05 M, um ensaio «controlo» com 1 mL de solução de tampão citrato de 0,05 M e 0,5 mL de solução de «controlo» (composta por um determinado volume de solução de tampão citrato de 0,05 M e de solução enzimática), os restantes tubos de ensaio com 1 mL de solução de tampão citrato de 0,05 M e 0,5 mL de solução centrifugada. Depois, adicionou-se em todos os tubos 3 mL de DNS modificado, agitou-se e colocaram-se todos os tubos num banho de água a ferver, durante 5 min. Seguiu-se o procedimento habitual: banho de água com gelo, 5 min; inserção de 0,2 mL da solução dos tubos de ensaio em cuvetes de plástico, acrescentando 2,5 mL de água destilada; leitura da absorvância num espectrofotómetro com um comprimento de onda de 540 nm; determinação da concentração de açúcares em equivalentes de glucose. Consoante os valores das absorvâncias obtidas, realizaram-se diversas diluições, variando-se o volume de solução de tampão citrato a

0,05 M e o volume de solução retirada dos balões de Erlenmeyer, uma vez que o valor da absorvância tem que estar compreendido entre 0 e 0,8 A.

#### Sacarificação e Fermentação em Simultâneo (SSF)

No processo SSF, usou-se a solução enzimática Cellic<sup>®</sup> CTec2 e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC<sup>®</sup> 26602<sup>™</sup>). Preparou-se um meio sólido e um líquido para a levedura, como apresentado nas Tabelas II.6 e II.7.

Tabela II.6 - Constituição do meio líquido para a levedura.

Compostos	Quantidades utilizadas
Glucose	10 g/L
Extrato de malte	3 g/L
Extrato de levedura	3 g/L
Peptona	5 g/L
Água destilada	500 mL

Tabela II.7 - Constituição do meio sólido para a levedura.

Compostos	Quantidades utilizadas
Glucose	10 g/L
Extrato de malte	3 g/L
Extrato de levedura	3 g/L
Peptona	5 g/L
Agar	15 g/L
Água destilada	250 mL

Além da preparação prévia dos meios sólido e líquidos para a levedura, também foi preciso preparar uma solução de nutrientes, descrito na Tabela II.8.

Tabela II.8 - Constituição da solução de nutrientes.

Compostos	Quantidades utilizadas
Extrato de levedura	150 g/L
Extrato de malte	150 g/L
Peptona	250 g/L
Água destilada	100 mL

Para preparar a solução final, determinou-se o volume de solução tampão de 0,05 M, tendo em conta o volume de solução de nutrientes, de solução de enzimática e do meio líquido

de levedura utilizados, e ainda a massa de material lenhocelulósico (em base húmida). As Tabelas II.9 e II.10 apresentam a massa de pasta de fibra mista virgem e de casca de eucalipto (em base húmida) utilizada no processo SSF, respetivamente.

Tabela II.9 - Quantidade de massa húmida de pasta de fibra mista virgem a utilizar no processo SSF.

<b>Carga Enzimática</b> (FPU/g <sub>massa seca</sub> )	<b>Consistência (g<sub>massa</sub> seca/g<sub>suspensão</sub>)</b>	<b>V<sub>suspensão</sub></b> (mL)	<b>m<sub>amostra húmida</sub></b> (g)
<b>15</b>	3	250	31,76
			31,76
<b>10</b>	3	250	31,76
			31,74
<b>15</b>	6	100	25,65
			25,65
<b>10</b>	6	100	25,65
			25,65
<b>15</b>	9	100	38,49
			38,38
<b>10</b>	9	100	38,48
			38,49

Tabela II.10 - Quantidade de massa húmida de pasta de casca de eucalipto a utilizar no processo SSF.

<b>Carga Enzimática</b> (FPU/g <sub>massa seca</sub> )	<b>Consistência (g<sub>massa</sub> seca/g<sub>suspensão</sub>)</b>	<b>V<sub>suspensão</sub> (mL)</b>	<b>m<sub>amostra húmida</sub></b> (g)
<b>15</b>	3	100	10,03
			10,05
<b>10</b>	3	100	10,03
			10,05
<b>15</b>	6	100	20,07
			20,06
<b>10</b>	6	100	20,07
			20,06
<b>15</b>	9	100	30,09
			30,09
<b>10</b>	9	100	30,09
			30,09

Após todas as soluções e meios estarem preparados, iniciou-se o processo de SSF. Num balão de Erlenmeyer de 250 mL, colocou-se material lenhocelulósico e ainda uma certa quantidade de solução de tampão citrato de 0,05 M. Depois de devidamente fechado com

algodão, papel de alumínio e elástico, colocaram-se todos os balões de Erlenmeyer no autoclave, durante 15 min, a 121°C para esterilização. Após esse tempo, removeram-se do autoclave e colocaram-se numa incubadora à temperatura de 38°C, juntamente com a solução de nutrientes. Junto ao bico de Bunsen, adicionou-se 10 mL de inóculo, ou seja, de suspensão de levedura em fase exponencial de crescimento. Depois adicionou-se 2 mL de solução de nutrientes, para, de seguida se verter a solução de enzima. Com isto, retirou-se 2 mL desta solução preparada para tubos de ensaio para centrifugar durante 5 min, a 3500 rpm. Acabados de centrifugar, removeu-se o sobrenadante para outros tubos de ensaio, de modo a facilitar a remoção deste em etapas posteriores. De seguida, fez-se o mesmo procedimento que na hidrólise enzimática, isto é, adicionou-se, no tubo correspondente ao ensaio «branco», apenas 1,5 mL de solução de tampão citrato de 0,05 M, enquanto nos restantes tubos de ensaio adicionou-se 1 mL de solução de tampão citrato de 0,05 M e 0,5 mL do sobrenadante dos tubos de ensaio que foram centrifugados. Depois, acrescentou-se mais 3 mL de DNS modificado e agitaram-se todos os tubos antes de os colocar num banho de água a ferver, onde devem permanecer durante 5 min. Passado esse tempo, inseriram-se todos os tubos de ensaio num banho de água fria, por mais 5 min. Findo esse tempo, retirou-se 0,2 mL desta solução para cuvetes de plástico e acrescentou-se 2,5 mL de água destilada. Com isto, leu-se a absorvância das amostras no espectrofotómetro com um comprimento de onda de 540 nm. Depois disto, recorrendo-se a filtros de seringa, inseriu-se cerca de 1 mL de sobrenadante que sobrou em tubos de Eppendorf, para posterior injeção no HPLC. Na determinação do etanol e ácidos orgânicos utilizou-se a coluna Rezex ROA – Organic Acid H<sup>+</sup>, a operar à temperatura de 60°C, usando-se como eluente o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Repetiu-se o procedimento até às 72 h, realçando que, a partir das 24 h, foi preciso fazer uma diluição da solução de 1:2, ou seja, adicionou-se 1,25 mL de solução de tampão citrato de 0,05 M e 0,25 mL de sobrenadante dos tubos de ensaio centrifugados.

### Anexo III – Tabelas de resultados da hidrólise enzimática

No processo de hidrólise enzimática realizado, tanto para a pasta de casca de eucalipto, como para a pasta de fibra mista virgem, variaram-se dois parâmetros: a carga enzimática (a 10 e 15 FPU/g<sub>HC</sub>) e a consistência (3, 6 e 9%). Neste processo pretende-se avaliar a influência deste dois parâmetros na concentração de glucose, em mg/mL, e no rendimento do processo, em %.

Para a consistência de 3% obtiveram-se as seguintes tabelas de resultados:

*Tabela III.1 - Hidrólise enzimática na pasta de casca de eucalipto, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>.*

Tempo	Eqs.[Glucose] <sub>media</sub> (mg/mL)	Rendimento <sub>medio</sub> (%)
00:30:00	5,6	18,5
01:00:00	9,7	31,8
01:30:00	10,0	33,1
02:00:00	14,9	49,0
02:30:00	17,0	56,0
03:00:00	14,1	46,4
04:30:00	21,0	69,2
06:00:00	23,9	78,7
24:00:00	30,1	99,0
30:00:00	32,9	108,5
48:00:00	32,8	108,1

*Tabela III.2 - Hidrólise enzimática na pasta de casca de eucalipto, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>.*

Tempo	Eqs.[Glucose] <sub>media</sub> (mg/mL)	Rendimento <sub>medio</sub> (%)
00:30:00	4,7	15,4
01:00:00	7,4	24,2
01:30:00	9,1	30,1
02:00:00	11,0	36,3
02:30:00	11,0	36,3
03:00:00	13,9	45,7
04:30:00	16,1	53,1
06:00:00	19,4	63,9
24:00:00	30,9	101,8
30:00:00	29,9	98,6
48:00:00	16,1	52,9

*Tabela III.3 - Hidrólise enzimática na pasta de fibra mista virgem, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>.*

Tempo	Eqs.[Glucose] <sub>media</sub> (mg/mL)	Rendimento <sub>medio</sub> (%)
00:30:00	3,9	14,7
01:00:00	5,9	22,1
01:30:00	6,4	23,8
02:00:00	7,9	29,5
02:30:00	8,1	30,1
03:00:00	7,7	28,5
04:30:00	9,3	34,8
06:00:00	11,3	41,9
24:00:00	17,3	64,3
30:00:00	16,8	62,4
48:00:00	18,1	67,2

*Tabela III.4 - Hidrólise enzimática na pasta de fibra mista virgem, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>.*

Tempo	Eqs.[Glucose] <sub>media</sub> (mg/mL)	Rendimento <sub>medio</sub> (%)
00:30:00	3,0	11,3
01:00:00	4,1	15,4
01:30:00	5,7	21,4

02:00:00	7,0	26,1
02:30:00	6,2	23,3
03:00:00	8,2	30,6
04:30:00	9,7	36,2
06:00:00	10,4	38,9
24:00:00	16,8	62,8
30:00:00	17,1	63,8
48:00:00	10,5	39,3

Para a consistência de 6% obtiveram-se as seguintes tabelas de resultados:

*Tabela III.5 - Hidrólise enzimática na pasta de casca de eucalipto, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>.*

Tempo	Eqs.[Glucose] <sub>media</sub> (mg/mL)	Rendimento <sub>medio</sub> (%)
41:00:00	44,3	73,0
48:00:00	23,5	38,8
65:00:00	54,7	90,2
72:00:00	61,5	101,3

*Tabela III.6 - Hidrólise enzimática na pasta de casca de eucalipto, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>.*

Tempo	Eqs.[Glucose] <sub>media</sub> (mg/mL)	Rendimento <sub>medio</sub> (%)
24:00:00	34,4	56,7
30:00:00	48,5	79,9
48:00:00	57,2	94,3
54:00:00	61,2	100,9
72:00:00	63,1	104,0

*Tabela III.7 - Hidrólise enzimática na pasta de fibra mista virgem, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>.*

Tempo	Eqs.[Glucose] <sub>media</sub> (mg/mL)	Rendimento <sub>medio</sub> (%)
41:00:00	33,5	61,9
48:00:00	25,4	46,9
65:00:00	49,5	91,5
72:00:00	50,8	93,8

*Tabela III.8 - Hidrólise enzimática na pasta de fibra mista virgem, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>.*

Tempo	Eqs.[Glucose] <sub>media</sub> (mg/mL)	Rendimento <sub>medio</sub> (%)
24:00:00	27,8	51,3
30:00:00	35,1	64,7
48:00:00	45,9	84,7
54:00:00	52,6	97,0
72:00:00	53,5	98,8

Para a consistência de 9% obtiveram-se as seguintes tabelas de resultados:

Tabela III.9 - Hidrólise enzimática na pasta de casca de eucalipto, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>.

Tempo	Eqs.[Glucose] <sub>media</sub> (mg/mL)	Rendimento <sub>medio</sub> (%)
00:30:00	4,1	4,6
01:00:00	13,2	14,5
02:00:00	15,5	17,0
03:00:00	18,0	19,8
04:30:00	10,0	11,0
06:00:00	13,7	15,1
24:00:00	37,9	41,7
48:00:00	64,4	70,7
72:00:00	109,1	119,8

Tabela III.10 - Hidrólise enzimática na pasta de fibra mista virgem, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>.

Tempo	Eqs.[Glucose] <sub>media</sub> (mg/mL)	Rendimento <sub>medio</sub> (%)
48:00:00	62,2	76,5
72:00:00	74,8	92,1

Tabela III.11 - Hidrólise enzimática na pasta de fibra mista virgem, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>.

Tempo	Eqs.[Glucose] <sub>media</sub> (mg/mL)	Rendimento <sub>medio</sub> (%)
48:00:00	50,5	62,1
72:00:00	65,9	81,1

#### Anexo IV – Tabelas de resultados da sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF)

No processo de sacarificação e fermentação em simultâneo realizado, tanto para a pasta de casca de eucalipto, como para a pasta de fibra mista, variaram-se também dois parâmetros: a carga enzimática (a 10 e 15 FPU/g<sub>HC</sub>) e a consistência (3, 6 e 9%). Neste processo pretende-se avaliar a influência deste dois parâmetros no rendimento do processo de produção de etanol, em g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açúcares</sub>, na concentração de etanol, em g/L, e na velocidade de produção de etanol, em g/(L.h).

Para a consistência de 3% obtiveram-se as seguintes tabelas de resultados:

Tabela IV.1 - SSF na pasta de casca de eucalipto, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>.

Tempo	Rendimento <sub>medio</sub> EtOH (g <sub>EtOH</sub> /g <sub>açúcares</sub> )	Rendimento <sub>medio</sub> EtOH (% açúcares)	[EtOH] <sub>medio</sub> (g/L)	Velocidade de produção EtOH (g/(L.h))
06:00:00	0,14	28,0	4,3	0,72
24:00:00	0,36	71,4	11,1	0,46
48:00:00	0,34	65,9	10,2	0,21
72:00:00	0,30	58,6	9,1	0,13

Tabela IV.2 - SSF na pasta de casca de eucalipto, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>.

Tempo	Rendimento EtOH <sub>medio</sub> (gEtOH/gaçucares)	Rendimento EtOH <sub>medio</sub> (% açucares)	[EtOH] <sub>media</sub> (g/L)	Velocidade de produção EtOH (g/(L.h))
06:00:00	0,10	19,8	3,1	0,51
24:00:00	0,37	72,9	11,3	0,47
48:00:00	0,34	66,2	10,3	0,26
72:00:00	0,31	61,6	9,5	0,13

Tabela IV.3 - SSF na pasta de fibra mista virgem, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>.

Tempo	Rendimento EtOH <sub>medio</sub> (gEtOH/gaçucares)	Rendimento EtOH <sub>medio</sub> (% açucares)	[EtOH] <sub>media</sub> (g/L)	Velocidade de produção EtOH (g/(L.h))
06:00:00	0,11	20,9	3,2	0,53
24:00:00	0,34	66,6	10,2	0,42
30:00:00	0,35	68,4	10,5	0,35
48:00:00	0,38	74,1	11,4	0,24
54:00:00	0,38	75,5	11,6	0,16

Tabela IV.4 - SSF da pasta de fibra mista virgem, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>.

Tempo	Rendimento EtOH <sub>medio</sub> (gEtOH/gaçucares)	Rendimento EtOH <sub>medio</sub> (% açucares)	[EtOH] <sub>media</sub> (g/L)	Velocidade de produção EtOH (g/(L.h))
06:00:00	0,24	46,6	6,4	1,06
24:00:00	0,29	57,1	7,8	0,33
48:00:00	0,31	61,2	8,4	0,17
54:00:00	0,35	69,4	9,5	0,18

Para a consistência de 6% obtiveram-se as seguintes tabelas de resultados:

Tabela IV.5 - SSF da pasta de casca de eucalipto, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>.

Tempo	Rendimento <sub>medio</sub> EtOH (gEtOH/gaçucares)	Rendimento <sub>medio</sub> EtOH (% açucares)	[EtOH] <sub>medio</sub> (g/L)	Velocidade de produção EtOH (g/(L.h))
24:00:00	0,40	78,2	24,2	1,01
48:00:00	0,37	72,9	22,6	0,47
72:00:00	0,35	68,3	21,1	0,29

Tabela IV.6 - SSF da pasta de casca de eucalipto, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>.

Tempo	Rendimento <sub>medio</sub> EtOH (gEtOH/gaçucares)	Rendimento <sub>medio</sub> EtOH (% açucares)	[EtOH] <sub>medio</sub> (g/L)	Velocidade de produção EtOH (g/(L.h))
24:00:00	0,39	76,5	23,7	0,99
48:00:00	0,37	73,5	22,8	0,47
72:00:00	0,36	70,7	21,9	0,30

Tabela IV.7 - SSF da pasta de fibra mista virgem, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>.

Tempo	Rendimento <sub>medio</sub> EtOH (gEtOH/gaçucares)	Rendimento <sub>medio</sub> EtOH (% açucares)	[EtOH] <sub>medio</sub> (g/L)	Velocidade de produção EtOH (g/(L.h))
24:00:00	0,44	86,2	23,8	0,99
48:00:00	0,47	92,2	25,5	0,53

<b>72:00:00</b>	0,44	86,3	23,8	0,33
-----------------	------	------	------	------

Tabela IV.8 - SSF da pasta de fibra mista virgem, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>.

<b>Tempo</b>	<b>Rendimento<sub>medio</sub> EtOH (g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açúcares</sub>)</b>	<b>Rendimento<sub>medio</sub> EtOH (% açúcares)</b>	<b>[EtOH]<sub>medio</sub> (g(L))</b>	<b>Velocidade de produção EtOH (g/(L.h))</b>
<b>24:00:00</b>	0,37	72,3	20,0	0,83
<b>48:00:00</b>	0,43	84,6	23,4	0,49
<b>72:00:00</b>	0,44	86,1	23,8	0,33

Para a consistência de 9% obtiveram-se as seguintes tabelas de resultados:

Tabela IV.9 - SSF da pasta da casca de eucalipto, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>.

<b>Tempo</b>	<b>Rendimento<sub>medio</sub> EtOH (g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açúcares</sub>)</b>	<b>Rendimento<sub>medio</sub> EtOH (% açúcares)</b>	<b>[EtOH]<sub>medio</sub> (g(L))</b>	<b>Velocidade de produção EtOH (g/(L.h))</b>
<b>48:00:00</b>	0,38	74,7	34,7	0,72
<b>72:00:00</b>	0,36	71,3	33,1	0,46

Tabela IV.10 - SSF da pasta de casca de eucalipto, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>.

<b>Tempo</b>	<b>Rendimento<sub>medio</sub> EtOH (g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açúcares</sub>)</b>	<b>Rendimento<sub>medio</sub> EtOH (% açúcares)</b>	<b>[EtOH]<sub>medio</sub> (g(L))</b>	<b>Velocidade de produção EtOH (g/(L.h))</b>
<b>48:00:00</b>	0,36	71,4	33,2	0,69
<b>72:00:00</b>	0,34	67,2	31,2	0,43

Tabela IV.11 - SSF da pasta de fibra mista virgem, a 15 FPU/g<sub>HC</sub>.

<b>Tempo</b>	<b>Rendimento<sub>medio</sub> EtOH (g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açúcares</sub>)</b>	<b>Rendimento<sub>medio</sub> EtOH (% açúcares)</b>	<b>[EtOH]<sub>medio</sub> (g(L))</b>	<b>Velocidade de produção EtOH (g/(L.h))</b>
<b>48:00:00</b>	0,46	90,7	37,6	0,78
<b>72:00:00</b>	0,47	93,0	38,5	0,54

Tabela IV.0.11 - SSF da pasta de fibra mista virgem, a 10 FPU/g<sub>HC</sub>.

<b>Tempo</b>	<b>Rendimento<sub>medio</sub> EtOH (g<sub>EtOH</sub>/g<sub>açúcares</sub>)</b>	<b>Rendimento<sub>medio</sub> EtOH (% açúcares)</b>	<b>[EtOH]<sub>medio</sub> (g(L))</b>	<b>Velocidade de produção EtOH (g/(L.h))</b>
<b>48:00:00</b>	0,40	78,8	32,6	0,68
<b>72:00:00</b>	0,44	86,5	35,8	0,50

## Anexo V – Segurança

Em laboratório, uma pessoa está, diariamente e constantemente, exposta a uma panóplia de compostos químicos com diferentes propriedades. Como tal, todos os que trabalham neste espaço devem estar cientes das principais propriedades dos compostos químicos, dos seus perigos associados e dos cuidados necessários a ter. A segurança é, então, um assunto fulcral que se deve destacar em qualquer ambiente de trabalho, de forma a prevenir qualquer tipo de incidente.

Ao longo deste trabalho experimental utilizaram-se diversos compostos químicos enumerados de seguida, com os respetivos perigos e cuidados associados:

- Ácido sulfúrico a 72% (m/m) – este composto químico é bastante corrosivo e, como tal, é necessário tomar algumas precauções, uma vez que este composto é corrosivo para todos os tecidos do corpo. A sua inalação, aquando a forma de vapor, pode causar severos problemas pulmonares. O contacto com os olhos pode provocar a perda total da visão. O contacto com a pele provoca severas queimaduras. A sua ingestão provoca severa irritação na boca e no estômago e, portanto, a exposição crónica pode causar traqueobronquite, estomatite, conjuntivite e gastrite. Assim, evitar respirar vapores e lavar a pele exposta cuidadosamente, sendo essencial a utilização de proteção nos olhos e na cara (óculos ou máscara), bata e luvas. Em caso de ingestão, enxaguar a boca e não induzir o vómito; no caso de contacto com a pele, retirar toda a roupa contaminada e enxaguar a pele com água; em caso de inalação, sair para uma zona ao ar livre e repousar numa posição que não dificulte a respiração; e no caso de contacto com os olhos, lavar cuidadosamente com água durante vários minutos. Além disso, evitar a libertação para o meio ambiente, pois é prejudicial para este.<sup>[39][40]</sup>
- Carbonato de cálcio – este composto químico é irritante e, portanto, pode provocar a irritação dos olhos e da pele e problemas respiratórios, como tosse. Desta forma, evitar respirar poeira e lavar a pele exposta cuidadosamente. Utilizar luvas de proteção e ainda proteção para os olhos. Em caso de contacto com a pele, lavar com bastante água e sabão; em caso de contacto com os olhos, retirar as lentes de contacto (caso tenha) e lavar cuidadosamente com água durante vários minutos. Utilizar e armazenar em locais bem ventilados.<sup>[41][42]</sup>
- Permanganato de potássio – este composto químico é prejudicial para o meio ambiente, pelo que a sua libertação para o ambiente tem que ser evitada. Em caso de derrame, recolher de imediato. Utilizar luvas de proteção e luvas de proteção. Em caso de inalação, proporcionar ar fresco; em caso de contacto com a pele, enxaguar a pele com água; em caso de contacto com os olhos, retirar as lentes de contacto (caso tenha) e lavar cuidadosamente com água durante vários minutos; em caso de ingestão, enxaguar a boca.<sup>[43][44]</sup>
- Iodeto de potássio – este composto químico é comburente que, em situações de incêndios, pode agravar bastante o incidente. Como tal, é necessário tomar precauções, como não misturar com combustíveis, compostos de metal pesado,

ácidos e alcalis. Além disso, este composto químico também é corrosivo, podendo provocar problemas oculares. Assim, utilizar proteção ocular e, em caso de contacto com os olhos, retirar lentes de contacto (caso tenha) e enxaguar cuidadosamente os olhos durante alguns minutos.<sup>[45][46]</sup>

- Tiosulfato de sódio – este composto químico é irritante. Assim, evitar respirar vapores e lavar a pele exposta cuidadosamente. Utilizar e armazenar em zonas ventiladas. Utilizar proteção ocular, bata e luvas de proteção. Em caso de contacto com a pele, enxaguar com água; em caso de inalação, sair para uma zona ao ar livre e repousar numa posição que não dificulte a respiração; em caso de contacto com os olhos, retirar as lentes de contacto (caso tenha) e enxaguar cuidadosamente com água e sabão; em caso de irritação da pele, contactar um médico.<sup>[47][48]</sup>

- Ácido 3,5-dinitrosalicílico – este composto químico é corrosivo e irritante, podendo causar problemas respiratórios e irritação da pele e dos olhos. Assim, evitar respirar vapores e lavar a pele exposta cuidadosamente. Utilizar proteção ocular, bata e luvas de proteção. Em caso de contacto com os olhos, remover lentes de contacto (caso tenha) e enxaguar cuidadosamente com água; em caso de contacto com a pele, lavar imediatamente com água a pele contaminada, mas, se se tratar de um grande derramamento na pele, lavar com um sabão desinfetante e cobrir a pele contaminada com um creme antibacteriano; em caso de inalação, sair para uma zona ao ar livre, bem ventilada. Em caso de ingestão, não induzir ao vômito, examinar os lábios e a boca e verificar se estão danificados.<sup>[49][50]</sup>

- Tartarato duplo de potássio e sódio – este composto químico pode provocar pequenas irritações na pele e nos olhos. Assim, utilizar proteção ocular, bata e luvas de proteção. Em caso de contacto com os olhos, retirar as lentes de contacto (caso tenha) e lavar cuidadosamente os olhos durante alguns minutos; em caso de contacto com a pele, enxaguar com água e com sabão; em caso de inalação, sair para uma zona ao ar livre, bem ventilada; em caso de ingestão, não induzir ao vômito.<sup>[51][52]</sup>

- Hidróxido de sódio – este composto químico é corrosivo, provocando severas queimaduras e pode causar perda total da visão. Não respirar vapores e lavar a pele exposta cuidadosamente. Utilizar proteção facial e ocular, bata e luvas de proteção. Em caso de ingestão, enxaguar a boca e não induzir ao vômito; em caso de contacto com a pele, remover de imediato toda a roupa contaminada e enxaguar com água a pele; em caso de inalação, sair para uma zona de ar livre, bem ventilado, e repousar numa posição favorável à respiração; no caso do contacto com os olhos, retirar as

lentes de contacto (caso tenha) e enxaguar cuidadosamente com água durante alguns minutos.<sup>[53][54]</sup>

- Metabissulfito de sódio – este composto químico é corrosivo e irritante, causando lesões oculares graves e na presença de ácidos liberta gases tóxicos, o que exige uma preocupação especial. Utilizar proteção ocular, bata e luvas de proteção. Em caso de contacto com os olhos, retirar as lentes de contacto (caso tenha) e enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos; no caso de contacto com a pele, retirar de imediato a roupa contaminada e lavar a pele com água; no caso de inalação, sair para uma zona arejada.<sup>[55][56]</sup>

- Fenol – este composto químico é corrosivo e tóxico por ingestão, contacto com a pele ou inalação. Pode provocar queimaduras na pele e lesões oculares graves. É suspeito de provocar anomalias genéticas, podendo afetar diversos órgãos internos após exposição prolongada e repetida. Utilizar luvas de proteção, bata e proteção ocular e facial. Em caso de ingestão, enxaguar a boca e não induzir o vómito; em caso de contacto com a pele, lavar abundantemente com sabão e água; em caso de inalação, sair para uma zona de ar livre, bem ventilada, e repousar numa posição favorável à respiração; em caso de contacto com os olhos, retirar as lentes de contacto (caso tenha) e enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos.<sup>[57][58]</sup>