



Produção de Açúcares para Bioetanol a partir da Palha de Milho de Fitorremediação de Solos

PEDRO FILIPE MARTINS DOS REIS

novembro de 2020

PRODUÇÃO DE AÇÚCARES PARA BIOETANOL A PARTIR DA PALHA DE MILHO DE FITORREMEDIAÇÃO DE SOLOS

Pedro Filipe Martins dos Reis
1181279

2020

Instituto Superior de Engenharia do Porto
Departamento de Engenharia Mecânica



PRODUÇÃO DE AÇÚCARES PARA BIOETANOL A PARTIR DA PALHA DE MILHO DE FITORREMEDIAÇÃO DE SOLOS

Pedro Filipe Martins dos Reis
1181279

Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Engenharia do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Energias Sustentáveis, realizada sob a orientação da Doutora Nídia de Sá Caetano e coorientação do Doutor Wilson Galvão de Moraes Júnior.

2020

Instituto Superior de Engenharia do Porto
Departamento de Engenharia Mecânica



JÚRI

Presidente

Doutor Manuel Carlos Malheiro de Carvalho Felgueiras
Professor Adjunto do Instituto Superior de Engenharia do Porto

Orientador

Doutora Nídia de Sá Caetano
Professora Coordenadora do Instituto Superior de Engenharia do Porto

Coorientador

Doutor Wilson de Galvão Morais Júnior
Investigador do Instituto Superior de Engenharia do Porto

Arguente

Doutor António Augusto Areosa Martins
Investigador, LEPABE – Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

AGRADECIMENTOS

Manifesto a minha gratidão à Doutora Nídia de Sá Caetano, pela orientação da dissertação e atenção disponibilizada, durante estes meses atípicos e exigentes para todos nós.

Ao Doutor Wilson G. M. Júnior, também deixo uma palavra de agradecimento, pelo auxílio e disponibilidade prestados no laboratório.

Por fim, à minha família e amigos, o meu agradecimento por todo o apoio e incentivo que deram durante este tempo, principalmente durante este ano complicado. Em especial, agradeço à Carolina Andrade pelo suporte incondicional, tornando todos os obstáculos ultrapassáveis.

A Prof.ª Nídia de Sá Caetano, orientadora desta dissertação, é membro integrado do LEPABE – Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente Biotecnologia e Energia, financiado pela Unidade de Investigação UID/EQU/00511/2020 - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia – LEPABE - financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC).

Esta dissertação foi realizada no âmbito do:

- Projeto PHYTOENERGY - PTDC/BTA-BTA/28761/2017 - POCI-01-0145-FEDER-028761, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e com o apoio financeiro da FCT/MCTES através de fundos nacionais (PIDDAC);
- Bolsa *Marie Skłodowska-Curie* com o número 867473, financiada pelo Programa de investigação e inovação *Horizon 2020* da União Europeia.



PALAVRAS CHAVE

Bioetanol; Biomassa lignocelulósica; Contaminação com metais pesados; Fitorremediação; Palha de milho

RESUMO

O uso intensivo de combustíveis fósseis tem levantado desafios ambientais, económicos e sociais, tais como o agravamento do aquecimento global e a escassez de reservas de petróleo bruto, o que provoca a necessidade de utilização de recursos mais sustentáveis.

A biomassa é uma fonte viável para a produção de biocombustíveis e outros bio-produtos, como o bioetanol, que é visto como o biocombustível mais promissor para o futuro. A biomassa lignocelulósica, como a palha de milho, é uma matéria-prima interessante para a produção de etanol, visto que é globalmente abundante e não compete para uso do solo com outras culturas alimentares.

Outra problemática corrente é o aumento de poluentes orgânicos e metais pesados no solo, derivados do rápido crescimento económico e industrial, que têm de ser tratados. A planta do milho apresenta propriedades fitorremediativas, tais como a fitoacumulação de metais pesados. O resíduo da palha de milho proveniente da fitorremediação de metais pesados em solos, é uma fonte interessante e potencialmente sustentável para a produção de etanol lignocelulósico, valorizando um resíduo que de outra forma seria descartado.

Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a possibilidade de valorização de uma biomassa lignocelulósica (palha de milho) resultante da fitorremediação de um solo contaminado com metais pesados como o zinco (Zn) e o cádmio (Cd), através da obtenção de açúcares para produção de bioetanol.

O processo de produção de bioetanol lignocelulósico requer pré-tratamento da biomassa para uma produção eficiente. O pré-tratamento com ácido diluído aplicado antes da hidrólise enzimática tem sido uma das alternativas mais usadas. Este estudo focou-se na otimização das etapas de pré-tratamento com ácido diluído e de hidrólise enzimática, aplicados a caules de milho colhidos num solo de controlo e em solos contaminados com metais pesados (de fitorremediação), avaliando o efeito dos metais no processo geral. A otimização do pré-tratamento foi feita usando 3,3 g de biomassa e

50 mL de solução de HCl ou de HNO₃, a 60 rpm, variando 3 parâmetros, de acordo com um *Central Composite Design* (CCD) ortogonal, com 3 pontos centrais: temperatura (63,2, 70,0, 80,0, 90,0 e 96,8 °C), tempo de reação (5, 80, 190, 300 e 375 min) e concentração de ácido (1,0, 2,0, 3,5, 5,0 e 6,0% v/v). Devido à avaria do equipamento HPLC, os resultados do pré-tratamento com ácido diluído não puderam ser avaliados, pelo que foi decidido que as condições de pré-tratamento empregues antes da hidrólise enzimática seriam 6,6 g de palha de milho + 100 mL de solução de HCl a 3,5% v/v, a uma temperatura de 80 °C, durante 360 min, com 60 rpm de agitação.

Para a otimização da hidrólise enzimática, foram consideradas 3 variáveis, segundo um CCD ortogonal, com 3 pontos centrais: temperatura (29,0, 32,2, 37,0, 41,8 e 45,0 °C), tempo de contacto (2,0, 10,8, 24,0, 37,2 e 46,0 h) e volume de enzima, *Ultraflo*, da *Novozymes*, (50, 140, 275, 410 e 500 µL). Os açúcares redutores presentes no hidrolisado resultante da hidrólise enzimática, foram quantificados pelo método DNS. As condições ótimas para a biomassa do solo de Controlo ocorreram à temperatura de hidrólise de 32,2 °C, tempo de reação de 10,8 h e volume de enzima de 140 µL. No que diz respeito aos resultados da otimização da biomassa do solo contaminado de Estarreja, foram inconclusivos, possivelmente devido a variações não controladas das condições de operação, que ocorreram para algumas amostras. A concentração máxima de açúcar obtida foi 60,3 g/L (760,1 g_{açúcar}/kg_{biomassa}) para a biomassa do solo de Controlo, e 34,4 g/L (388,3 g_{açúcar}/kg_{biomassa}) para a biomassa do solo de Estarreja. O modelo de previsão para a palha de Controlo, encontrado pelo *software JMP*, revelou a conversão teórica de 61,0 g/L de açúcar nos hidrolisados.

KEYWORDS

Bioethanol; Corn stover; Heavy metal contaminated soil; Lignocellulosic biomass; Phytoremediation

ABSTRACT

The intensive use of fossil fuels has raised environmental, economic, and social challenges, such as worsening of global warming and scarcity of crude oils reserves, which triggers the need of using more sustainable resources. Biomass is a viable source to produce biofuels and other bio-products, like bioethanol that is seen as the most promising biofuel for the near and long future. Lignocellulosic biomass, such as corn stover is an interesting feedstock for ethanol production, because it is globally abundant and does not compete for land with other food crops.

Another current issue is the increase of organic and heavy metal pollutants in soil, originated by fast economic and industrial growth, that need to be treated. Maize plant presents phytoremediation properties such as heavy metal phytoaccumulation. Corn stover from phytoremediation of soils contaminated with heavy metal is an interesting and potentially sustainable feedstock for lignocellulosic ethanol production, valorizing a residue that otherwise would have been discarded.

Thus, this work aims to evaluate the possibility of valorization of a lignocellulosic biomass (corn straw) resulting from the phytoremediation of a soil contaminated with heavy metals such as zinc (Zn) and cadmium (Cd), through conversion to sugars for bioethanol production

Lignocellulosic bioethanol requires a pretreatment step for efficient production. Dilute acid pretreatment applied before enzymatic hydrolysis has been one of the most conducted configurations. This study focused on optimizing dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis conditions applied to corn stalks collected from a control soil and from phytoremediation of heavy metal contaminated soils and evaluate the potential effect of metal contaminants on the overall process. The optimization of the acid pretreatment step was performed using 3.3 g of biomass and 50 mL of HCl or HNO₃ solution at 60 rpm, and considered 3 parameters based on orthogonal Central Composite Design (CCD) with 3 central points: temperature (63.2, 70.0, 80.0, 90.0 and 96.8 °C),

reaction time (5, 80, 190, 300 and 375 min) and acid concentration (1.0, 2.0, 3.5, 5.0 and 6.0% v/v). Due to HPLC failure, results of dilute acid pretreatment could not be analyzed, thus it was decided to set the pretreatment conditions to be applied prior to enzymatic hydrolysis as 6.6 g corn stover + 100 mL HCl 3.5% v/v, heated at 80 °C for 360 min at 60 rpm stirring.

The optimization of the enzymatic hydrolysis considered 3 parameters based on an orthogonal CCD with 3 central points: Temperature (29.0, 32.2, 37.0, 41.8 and 45.0 °C), contact time (2.0, 10.8, 24.0, 37.2 and 46.0 h) and enzyme (Ultraflo, from Novozymes) dosage (50, 140, 275, 410 and 500 µL). Reducing sugars in the hydrolysate resulting from enzymatic hydrolysis were determined using DNS method. Optimal conditions found for Control biomass were a hydrolysis temperature of 32.2 °C, contact time of 10.8 h, and an enzyme load of 140 µL. Concerning the results of the optimization of the hydrolysis of biomass grown on contaminated soil of Estarreja, they were inconclusive, possibly due to uncontrolled differences in operating conditions during some of the experiments. Maximum sugar yield obtained was 60.3 g/L (760.1 $g_{sugar}/kg_{biomass}$) for Control biomass, and 34.4 g/L (388.3 $g_{sugar}/kg_{biomass}$) for Estarreja biomass. The prediction model for Control stover, found by JMP software, revealed a theoretical yield of 61.0 g/L of sugar in hydrolysates.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Lista de Siglas

AFEX	<i>Ammonia Fiber Explosion</i>
AIL	Teor de Lenhina Insolúvel
ASL	Teor de Lenhina Solúvel
Ca(OH) ₂	Hidróxido de Cálcio
CCD	<i>Central Composite Design</i>
Cd	Cádmio
CH ₃ CH ₂ OH	Etanol
CI	Teor de Carbono Inorgânico
CO ₂	Dióxido de Carbono
COT	Teor de Carbono Orgânico Total
CT	Teor de Carbono Total
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EDDS	Ácido etilenodiamina-N, N'-disuccínico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogénio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
HMF	5-(hidroximetil)furfural
HNO ₃	Ácido Nítrico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IEA	<i>International Energy Agency</i>
RFA	<i>Renewable Fuels Association</i>
SHF	Hidrólise e Fermentação Separadas
SSF	Sacarificação e Fermentação Simultâneas
UE	União Europeia
Zn	Zinco

Lista de Abreviaturas

%T	Teor de sólidos totais
a	Absortividade
A	Absorbância
A _d	Teor de Cinzas
A _z	Teor de Azoto
b	Comprimento de caminho da célula
C _{HCl}	Concentração de ácido clorídrico
Conc. Ácido	Concentração de ácido
C _{rs}	Concentração de açúcares redutores
C _{rs} Ot.	Concentração de açúcares redutores estimada
df	Fator de diluição
E _L	Dose de enzima
f	Fator de conversão de azoto para proteínas
K	Massa de resíduo de filtração, após 105 °C
m ₁	Massa recipiente vazio, após 105 °C
m ₂	Massa recipiente com amostra húmida
m ₃	Massa recipiente com amostra seca, após 105 °C
m _a	Massa recipiente vazio, após 550 °C
M _{ad}	Teor de Humidade
m _b	Massa recipiente com amostra, após 105 °C
m _c	Massa recipiente com amostra incinerada, após 550 °C
m _α	Massa do cadinho com o filtro de vidro e resíduo obtido, após 130 °C
m _β	Massa do cadinho com o filtro de vidro e resíduo obtido, após 550 °C
p _t	Teor de Proteínas
t	Tempo
T	Temperatura
V _b	Volume de titulante gasto no branco
V _{filt}	Volume filtrado na análise de lenhina insolúvel
V _{ta}	Volume de titulante gasto
W ₁	Massa de amostra de palha
wc	Teor de Celulose

Lista de Unidades

% (m/m)	percentagem em massa
% (v/v)	percentagem em volume
°C	grau Celsius
cm	centímetro
g	grama
g/kg	grama por quilograma
g/L	grama por litro
g _{açúcar} /kg _{biomassa}	grama de açúcar por quilograma de biomassa
gal	<i>gallon</i>
h	hora
kg	quilograma
L	litro
L/g.cm	litro por grama centímetro
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mol/L	mol por litro
nm	nanómetro
s	segundo
ton	tonelada
µL	microlitro

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - COMPOSIÇÃO MÉDIA DA BIOMASSA TERRESTRE MUNDIAL (ADAPTADO DE [1])	3
FIGURA 2 - ESTRUTURA DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA (RETIRADO DE [33])	12
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA CELULOSE (ADAPTADO DE [35])	12
FIGURA 4 - PRODUÇÃO MUNDIAL DE BIOETANOL (COMBUSTÍVEL)	14
FIGURA 5 - SEQUÊNCIA TÍPICA DE PROCESSOS NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL (ADAPTADO DE [32])	17
FIGURA 6 - EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO EM MATERIAL LIGNOCELULÓSICO (ADAPTADO DE [34])	18
FIGURA 7 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A GLICOSE USANDO O MÉTODO DNS	45
FIGURA 8 - <i>PREDICTION PROFILER</i> (CONTROLO)	47
FIGURA 9 - [P·E] <i>SURFACE PLOT</i> (CONTROLO)	48
FIGURA 10 - [T·E] <i>SURFACE PLOT</i> (CONTROLO)	48
FIGURA 11 - [T·P] <i>SURFACE PLOT</i> (CONTROLO)	48
FIGURA 12 - <i>PREDICTION PROFILER</i> (ESTARREJA)	50
FIGURA 13 - [T·E] <i>SURFACE PLOT</i> (ESTARREJA)	50
FIGURA 14 - [P·E] <i>SURFACE PLOT</i> (ESTARREJA)	50
FIGURA 15 - [T·P] <i>SURFACE PLOT</i> (ESTARREJA)	50
FIGURA 16 - [P·E] <i>SURFACE PLOT</i> PREVISTO	52
FIGURA 17 - [T·E] <i>SURFACE PLOT</i> PREVISTO	52
FIGURA 18 - [T·P] <i>SURFACE PLOT</i> PREVISTO	52

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - RESUMO DAS VANTAGENS/DESVANTAGENS DOS MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO.....	21
TABELA 2 - COMPARAÇÃO ENTRE A HIDRÓLISE COM ÁCIDO DILUÍDO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	25
TABELA 3 - VALORES DAS VARIÁVEIS USADOS NO PRÉ-TRATAMENTO.....	36
TABELA 4 - PLANEAMENTO DO PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO.....	37
TABELA 5 - VALORES DAS VARIÁVEIS USADOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	38
TABELA 6 - PLANEAMENTO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	39
TABELA 7 - RESULTADOS DA CARATERIZAÇÃO DA BIOMASSA.....	43
TABELA 8 - RESULTADOS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA A PALHA DOS SOLOS DE CONTROLO E ESTARREJA.....	46
TABELA 9 - RESULTADOS ESTIMADOS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA A BIOMASSA DE CONTROLO ...	51

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Enquadramento geral	2
1.2	Objetivos da Dissertação.....	4
1.3	Conteúdo da Dissertação	4
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1	Fitorremediação.....	9
2.2	Biomassa Lignocelulósica	11
2.2.1	Palha de milho.....	13
2.3	Bioetanol	13
2.3.1	Mercado de bioetanol – produção e consumo	14
2.3.2	Debate <i>food vs fuel</i>	15
2.3.3	Processo de produção de bioetanol.....	16
2.4	Contributo da Dissertação	28
3	DESCRIÇÃO TÉCNICA	33
3.1	Caraterização da Biomassa	33
3.1.1	Teor de humidade	33
3.1.2	Teor de cinzas.....	33
3.1.3	Teor de lenhina.....	34
3.1.4	Teor de celulose	35
3.1.5	Teor de carbono orgânico	35
3.1.6	Teor de proteínas	35
3.2	Pré-tratamento	36
3.3	Hidrólise Enzimática	38
3.4	Quantificação de açúcares pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43

4.1	Caraterização da biomassa	43
4.2	Pré-tratamento ácido.....	44
4.3	Hidrólise enzimática.....	45
4.3.1	Concentração de açúcares redutores.....	45
4.3.2	Parâmetros e interações significativos na hidrólise enzimática.....	47
4.3.3	Estimativa dos resultados da hidrólise enzimática.....	51
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	57
5.1	Conclusões	57
5.2	Sugestões de trabalhos futuros	58
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
6.1	Normas.....	69
6.2	Legislação	69
7	ANEXOS	73
7.1	Anexo 1 – <i>Fit Model</i> (Controlo).....	73
7.2	Anexo 2 – <i>Fit Model</i> (Estarreja).....	77

INTRODUÇÃO

- 1.1 Enquadramento Geral
- 1.2 Objetivos da Dissertação
- 1.3 Conteúdo da Dissertação

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, vivemos numa sociedade profundamente dependente dos recursos energéticos, mais precisamente de hidrocarbonetos fósseis, que se encontram disponíveis em quantidades cada vez menores devido à sua exploração intensiva. Causada por um enorme crescimento demográfico e consequente crescimento industrial, a utilização excessiva destes recursos está a deixar o planeta com reservas muito limitadas de combustíveis fósseis.

Para além da problemática da sua crescente escassez, a utilização destes compostos à escala mundial levanta desafios ambientais, sociais e económicos, uma vez que constituem a fonte principal de energia e de químicos usados [1]. Para conseguir cobrir a atual procura energética mundial, sem esgotar nenhum reservatório e construir um futuro com desenvolvimento sustentável, a sociedade humana tem de adotar um plano de utilização de recursos energéticos com base noutra tipo de matérias-primas.

Estas novas fontes de energia devem obedecer a todos os pilares de uma economia sustentável. Deverão fornecer um serviço benéfico a nível social, ser economicamente viáveis e também não danificar qualquer condição do meio ambiente.

Para este fim, cada vez mais a biomassa é considerada como uma alternativa viável, com a produção de biocombustíveis que podem ser equiparados, por exemplo, a gasolina e gasóleo, a partir de matéria biológica. A biomassa é cada vez mais um recurso promissor, visto que é geralmente acessível por ser barata e estar dispersa no território na maior parte dos países. No entanto, existem casos de produção de biocombustíveis que não são exemplo de sustentabilidade. Casos como este são a produção de biocombustíveis a partir de biomassa produzida especificamente para esse objetivo, utilizando culturas alimentares que não vão servir de alimento e que ainda vão desgastar o solo de uma região. Situações como esta não representam alternativas adequadas para o problema energético mundial e podem ainda fazer aumentar o preço de certos alimentos a nível global [2].

Para desenvolver uma produção de biocombustíveis sustentável e que satisfaça as necessidades da humanidade, cada vez mais os resíduos biológicos são uma interessante fonte de matéria-prima. A sua utilização pode levar a uma economia mais circular e introduzir conceitos como o de biorrefinaria, aproveitando assim o máximo da matéria natural.

1.1 Enquadramento geral

Os biocombustíveis podem ser categorizados em combustíveis de primeira, de segunda, de terceira ou de quarta geração [3]. Os de primeira geração são os produzidos a partir de matéria comestível como girassol, soja, milho, trigo ou cana-de-açúcar, enquanto que, os de segunda geração são produzidos a partir de materiais lignocelulósicos tais como resíduos agrícolas, florestais, entre outros [1]. Na terceira geração de biocombustíveis englobam-se os que são produzidos a partir de algas, como as microalgas, que apresentam elevado potencial para serem a fonte de matéria-prima para diversos bioprodutos. A quarta geração é composta pelos biocombustíveis formados a partir de organismos geneticamente manipulados pela bioengenharia, tais como, algas, cianobactérias, culturas agrícolas [3].

Os materiais lignocelulósicos são considerados como a fonte alternativa mais sustentável para produção de combustíveis e outros químicos, tendo em conta que reduzem a competição por solo fértil [4]. Este tipo de material biológico tem sido alvo de muitos estudos, com o objetivo de se viabilizar a produção de diversos produtos e combustíveis a partir destes, diminuindo a necessidade de consumo de culturas alimentares para fins energéticos [5]. O bioetanol é um biocombustível visto como um potencial substituto para uma fração dos combustíveis líquidos produzidos a partir de petróleo. Este composto, também designado de álcool etílico, pode ser misturado com gasolina até 10% (E10), em volume, sem qualquer alteração nos motores atuais, mas pode ser aumentado até 85% de etanol (E85), com algumas modificações [6]. Apesar de alguns países, como os Estados Unidos da América (EUA) e o Brasil, já produzirem grandes quantidades de etanol, estes países usam principalmente milho e cana-de-açúcar, respetivamente, pelo que este biocombustível não pode ser considerado sustentável. Têm-se realizado esforços para conseguir produzir bioetanol viavelmente a partir de resíduos agrícolas (lignocelulósicos), como a palha de milho, que é uma das matérias lignocelulósicas mais abundantes no planeta [7], contribuindo deste modo para a resolução do problema dos resíduos, enquanto os mesmos são usados na produção de biocombustíveis.

Nesse contexto, um outro problema corrente é o incremento da emissão de poluentes orgânicos e metais pesados, originado pelo rápido crescimento económico e industrial. Alguns destes compostos persistem na natureza em geral, e nos solos em particular, em concentrações maiores do que aquelas que o planeta naturalmente consegue tolerar [8] de modo a regenerar-se e recuperar.

A fitorremediação é uma técnica de tratamento ambiental que tem sido empregue para tratar alguns destes compostos acumulados no solo. Esta técnica utiliza plantas para absorver certos contaminantes de um local, permitindo fazer a recuperação desse espaço. É possível aplicar esta tecnologia a solos, sedimentos ou até massas de água [9], resultando no final plantas que potencialmente acumularam alguns contaminante e que, por esse motivo, necessitam de um destino adequado. A capacidade que certas espécies de plantas têm em armazenar determinadas substâncias poluentes, aliada ao

seu potencial bioquímico para originar produtos economicamente interessantes, revela como é possível reestruturar certas partes do processo para manter a relevância no mercado, mas, controlar o impacto ambiental e o uso de recursos.

Assim, os resíduos da fitorremediação constituem uma possível fonte de material lignocelulósico para as indústrias transformadoras de biomassa. A sua utilização na síntese de biocombustíveis e outros materiais leva a uma gestão de recursos mais sustentável, aproveitando uma matéria que, de outra forma, seria completamente desprezada em termos de potencial comercial.

A biomassa apresenta uma grande variedade de tipos de espécies em termos de estrutura química e de estrutura morfológica. Independentemente do fenótipo, existem cinco grandes grupos de componentes da biomassa no planeta. Os componentes podem ser categorizados em lípidos, amido, celulose, hemicelulose, lenhina e proteínas [1].

É possível observar na Figura 1 que os componentes principais da biomassa lignocelulósica (celulose, hemicelulose e lenhina) são bastante abundantes no planeta, constituindo um manancial de recursos muito interessantes a utilizar como matéria-prima das chamadas biorrefinarias.

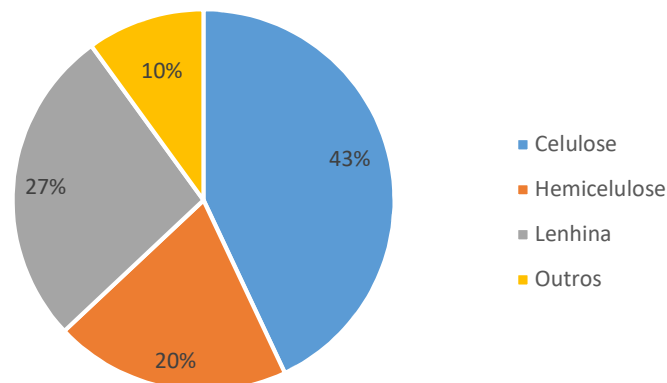


Figura 1 - Composição média da biomassa terrestre mundial (adaptado de [1])

O conceito de biorrefinaria apresenta, atualmente, várias definições. Uma das definições mais concretas foi a proposta pelos membros da *International Energy Agency* (IEA), na *Bioenergy Task 42*, que descreve a biorrefinaria como o *processamento sustentável de biomateriais para dar origem a uma vasta gama de produtos comerciáveis e também a energia*. Segundo a mesma definição, a biorrefinaria pode então ser “um conceito, uma infraestrutura, um processo, uma central, ou até um aglomerado de infraestruturas” [10]. Este conceito é análogo ao das refinarias petrolíferas, que conseguem fabricar vários tipos de materiais e combustíveis derivados de hidrocarbonetos fósseis a partir de uma única matéria-prima [4]. Esta metodologia pode ser um dos principais pilares para o desenvolvimento de uma indústria realmente mais sustentável e uma economia mais circular, diminuindo o consumo excessivo de recursos naturais e, conseqüentemente de culturas alimentares.

Um dos biocombustíveis com maior importância de momento é o bioetanol, com um grande interesse comercial e sendo expectável que continue a ser necessário em grande escala no futuro, apesar dos recentes e fortes esforços de introdução da energia elétrica nos transportes. Podendo ser sintetizado a partir de biomassa lignocelulósica, há uma vasta gama de fontes possíveis para produzir bioetanol, nomeadamente os resíduos agrícolas, que existem em grande quantidade e que, por vezes são desperdiçados e não aproveitados antes da sua eliminação em destino final. Uma das formas de aquisição de resíduos deste tipo é o reaproveitamento de resíduos de fitorremediação de solos. Nesta situação, os materiais biológicos seriam não só usados para a remoção de compostos de um solo contaminado, como posteriormente a biomassa seria usada para a síntese de bioetanol.

Esta forma de atuar e usar um recurso para um determinado fim, e após esta utilização, valorizar o referido recurso para outra finalidade, constitui um dos pilares da gestão moderna da indústria para construir uma economia mais sustentável e circular.

1.2 Objetivos da Dissertação

Este trabalho tem como objetivo principal avaliar a possibilidade de valorização de uma biomassa lignocelulósica (palha de milho) resultante da fitorremediação de um solo contaminado com metais pesados como o zinco (Zn) e o cádmio (Cd), através da obtenção de açúcares para produção de bioetanol, pretendendo avaliar o potencial impacto da presença destes contaminantes da biomassa, no rendimento do processo.

Os objetivos intermédios deste trabalho são: a) otimizar as condições do pré-tratamento ácido da palha de milho; b) otimizar as condições de hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada; c) estudar a viabilidade da obtenção de açúcares para a produção de bioetanol a partir de matéria lignocelulósica contaminada com metais pesados, comparando-a com idêntica biomassa produzida em solo não contaminado. Desta forma, o trabalho enquadra-se numa estratégia de uso mais sustentável dos recursos naturais do planeta.

A biomassa utilizada neste estudo é proveniente dos resíduos de fitorremediação dos solos contaminados com metais pesados das minas de Panasqueira e de Estarreja, bem como de um solo não contaminado, na sequência do trabalho de investigação da Doutora Ana G. Marques, no âmbito do projeto PHYTOENERGY.

1.3 Conteúdo da Dissertação

O presente documento divide-se em cinco capítulos. No primeiro capítulo realizou-se um breve enquadramento do trabalho e a introdução à temática em estudo e mencionaram-se os objetivos da presente dissertação. No segundo capítulo fez-se uma revisão bibliográfica, sobre os processos de fitorremediação e produção de bioetanol de biomassa lignocelulósica. No terceiro capítulo descreve-se o trabalho experimental realizado, referindo quais os materiais e metodologias utilizadas. No quarto capítulo

apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos, interpretando-os e comparando-os com outros estudos semelhantes. No quinto capítulo enumeram-se as conclusões do trabalho e aspetos a ter em conta num próximo estudo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- 2.1 Fitorremediação
- 2.2 Biomassa Lignocelulósica
- 2.3 Bioetanol
- 2.4 Contributo da Dissertação

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo pretende-se fazer uma caracterização dos processos de fitorremediação e de produção de bioetanol reportados na bibliografia. Não se pretende apenas definir cada uma das técnicas em questão, mas também especificar como elas se podem relacionar no âmbito de uma economia mais sustentável, bem como as dificuldades inerentes a estas atividades.

2.1 Fitorremediação

A crescente e contínua contaminação dos ecossistemas por parte de efluentes industriais e atividade agropecuária apresenta um risco para a saúde humana, principalmente para as nações subdesenvolvidas e em desenvolvimento [11]. Os contaminantes consequentes, tais como metais pesados e compostos orgânicos, prevalecem no meio em que são lançados, se não forem devidamente remediados. Estes compostos têm portanto de ser tratados, senão podem provocar perturbações no meio onde se encontram e eventualmente entrar em contacto com a população humana, através de fontes de água ou solos agrícolas contaminados [12]. Os metais pesados mais frequentemente encontrados e provenientes de atividades antropogénicas são o chumbo, o cádmio, o cobalto, o cobre, o mercúrio, o níquel, o selénio e o zinco, e, a sua toxicidade é bem conhecida [13].

A fitorremediação é uma técnica que consiste na utilização de várias espécies de plantas verdes para tratar ou remediar contaminantes em água, solo ou ar, de um determinado local [14]. Pode ser usada para tratar locais contaminados com pesticidas, metais pesados, solventes, explosivos, hidrocarbonetos poliaromáticos, crude e até lixiviados de aterro [12]. Esta técnica não é, de todo, recente, no entanto, tem vindo a ganhar cada vez mais interesse por ser a alternativa economicamente mais viável aos tratamentos físico-químicos mais convencionais de solo e água. Apresenta-se como uma metodologia mais eficaz, muito pouco dispendiosa e ecologicamente amigável.

A fitorremediação, em termos técnicos, consiste em dois processos separados, o primeiro pelos componentes microbianos associados às raízes e o segundo pela capacidade das próprias plantas em transformar materiais tóxicos em produtos metabólicos não tóxicos [11].

A fitorremediação tira partido da capacidade notável que as plantas têm em captar, concentrar, desintoxicar e até metabolizar diferentes compostos nas suas proximidades [11]. Quando presentes em locais contaminados por metais, as plantas podem ser usadas para estabilizar ou remover os contaminantes metálicos através de mecanismos

que constituem o processo de fitorremediação, tais como: a fitoextração; a fitoestabilização e a rizofiltração [12,15]. A fitoextração, ou fitoacumulação, consiste na captação pelas plantas dos contaminantes no meio e a sua conseqüente translocação e acumulação noutras partes da planta, acima do solo [12,16]. A mobilização de metais pesados para o caule ou estruturas adjacentes é um processo bioquímico importante e desejável para uma fitoextração eficaz [17]. As espécies que conseguem reter quantidades invulgarmente grandes de metais são denominadas hiperacumuladoras [12]. São classificadas desta forma, as plantas que têm a capacidade de captar mais de 1% de manganês, 0,1% de cobalto, cobre, chumbo, níquel e zinco, ou 0,01% de cádmio em matéria seca presente no solo (% v/v), e, mais de 400 espécies foram descritas como tendo esta capacidade [10,16,18]. A fitofiltração, constituída pela blastofiltração, caulofiltração e rizofiltração, é a adsorção ou absorção de metais pelos constituintes da planta conduzindo a uma diminuição da sua concentração em águas subterrâneas [12,17]. A blastofiltração e a caulofiltração são realizadas pela ação de plântulas e rebentos, respetivamente. A rizofiltração, como o nome indica, ocorre quando a filtração é realizada pelas raízes, retendo os contaminantes. Este processo é normalmente usado para remover metais como chumbo, cádmio, cobre, níquel, zinco e crómio, visto que estes são retidos principalmente pelas raízes [19,20] e é um processo semelhante ao da fitoextração, que difere por ser usado maioritariamente para o tratamento de água subterrânea [12]. Quanto à fotoestabilização, é um processo que limita o movimento de metais para o solo mais profundo e para eventuais lençóis freáticos. Este mecanismo previne a propagação do contaminante através de sorção pelas raízes, precipitação e formação de complexos [17].

As plantas consideradas como ideais para serem usadas na fitorremediação são as que têm um crescimento rápido, elevada biomassa, raízes profundas, são fáceis de colher, apresentam elevada tolerância e capacidade de acumulação de vários metais nas suas partes aéreas e colhíveis [11,21]. No entanto, as espécies hiperacumuladoras apresentam habitualmente um crescimento lento, baixa produção de biomassa, seletividade para um só metal, dificuldade para serem empregues em atividades agrónomicas e incapacidade de crescer em todos os solos ou climas [13]. Algumas famílias designadas como hiperacumuladoras são as *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Euphorbiaceae*, *Asterraceae*, *Lamiaceae* ou *Scrophulariaceae* [22,23]. A espécie *Thlaspi caerulescens*, tida como a melhor hiperacumuladora de metais, principalmente de zinco e cádmio, tem algumas das desvantagens referidas anteriormente, tais como o crescimento lento e a baixa produção de biomassa [13,24,25]. Certas plantas apresentam elevada capacidade de captação e tolerância aos metais, tais como salgueiros (*Salix viminalis*), a planta do milho (*Zea mays*), mostarda-castanha (*Brassica juncea*), e o girassol (*Helianthus annuus*) [26], pelo que podem ser usadas na fitorremediação de solos contaminados.

A planta do milho, que é cultivada mundialmente, tem potencial para a fitorremediação, apresentando certas características bastante interessantes para esta técnica, como um sistema extenso de raízes fibrosas, resiliência a condições adversas, rápido crescimento e produção abundante de sementes em cultivo repetitivo. Apesar de não ser relatada

como uma espécie hiperacumuladora, tem uma capacidade elevada de acumulação de metais como o cádmio, zinco e chumbo. Esta capacidade pode ainda ser aumentada por adição de agentes quelantes como EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) ou EDDS (ácido etilenodiamina-N, N'-disuccínico). A *Zea mays* foi a espécie utilizada neste estudo, e, é uma biomassa interessante, não só pela capacidade moderada que tem em reter os metais referidos, como ainda para ser posteriormente valorizada como fonte de bioenergia [27].

Segundo Meers [28], para o processo de fitoextração se tornar numa técnica realmente aplicável, o processo de extração tem de se tornar mais eficaz ou a biomassa produzida tem de ser economicamente valorizada após a operação de extração. No estudo realizado por Meers, esta planta, apesar não ser tão eficaz como outras culturas na remediação de solos altamente contaminados, apresenta-se como a biomassa com maior potencial, contendo o menor teor de metais nas partes que se podem colher e proporcionando o maior crescimento de biomassa [28]. Esta estratégia pode ser considerada um subtipo de fitoextração, a “fitoatenuação”, onde se procura realizar uma descontaminação mais gradual, a partir de solos marginais, e, poder ter algum tipo de valorização económica da biomassa. A utilização de *Zea mays* enquadra-se perfeitamente dentro deste conceito [27].

2.2 Biomassa Lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos são basicamente resíduos agrícolas (palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar, cascas de arroz), resíduos florestais (madeira, ramos, lascas de madeira, serragem de madeira) e culturas energéticas (*switchgrass*, *miscanthus*, erva, cana-de-açúcar) [29].

A biomassa lignocelulósica é o recurso natural mais abundante no mundo, podendo ser usada para a produção de combustíveis e outros químicos. O seu uso pode levar à diminuição na competição do uso de terras de cultivo entre culturas alimentares e culturas energéticas. Os biocombustíveis originados a partir deste tipo de material apresentam baixas emissões de gases com efeito de estufa, reduzindo o impacto ambiental [30].

A matéria biológica lignocelulósica é composta prioritariamente por celulose, hemicelulose e lenhina. Estes compostos arranjam-se entre si, formando complexas estruturas tridimensionais não uniformes [31], como se observa na Figura 2. A celulose e a hemicelulose são polímeros compostos por hidratos de carbono e estão ligados à lenhina principalmente por ligações de hidrogénio, mas também por ligações covalentes [32].

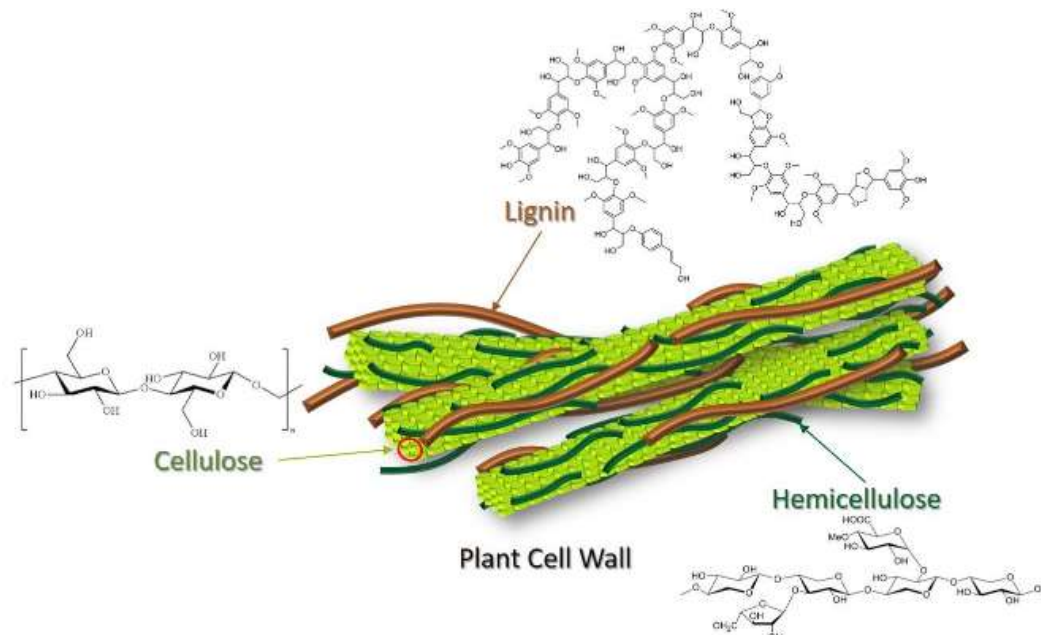


Figura 2 - Estrutura de biomassa lignocelulósica (retirado de [33])

A celulose é um polímero que, geralmente, representa o componente principal deste tipo de biomassa. É um polissacarídeo linear composto por uma cadeia de unidades de d-glicose unidas por ligações do tipo β -1,4-glicosídicas [31]. A união de duas unidades de glicose por este tipo de ligação glicosídica constitui uma unidade de celobiose [34], tal como ilustrado na Figura 3.

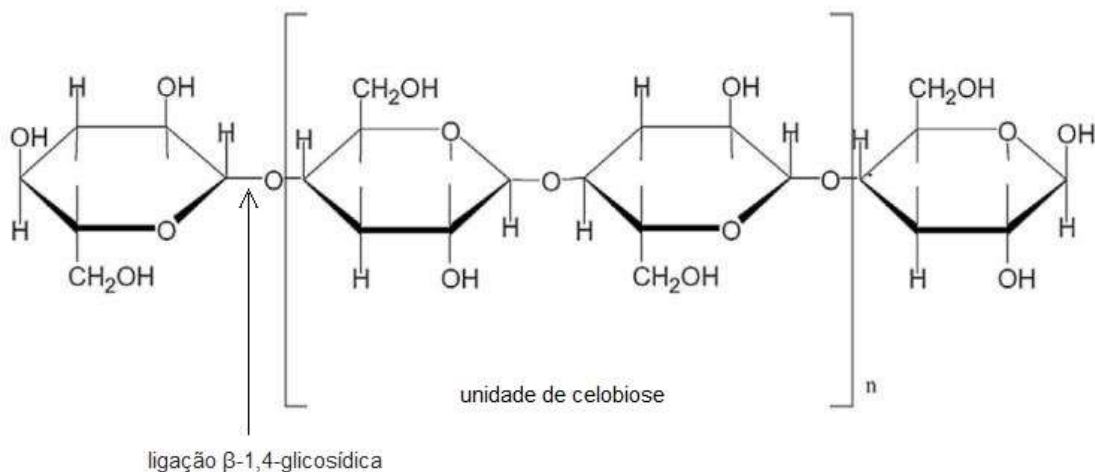


Figura 3 - Estrutura Química da Celulose (adaptado de [35])

A celulose é composta por dois tipos de região, as regiões cristalinas, com maior grau de polimerização, e as regiões amorfas. A parte amorfa da celulose é uma zona onde as ligações moleculares estão arranjadas mais desordenadamente, e, é precisamente nestes pontos que a hidrólise tem mais possibilidade de ser bem sucedida, pois são zonas mais suscetíveis a quebrar [36].

A seguir à celulose, as hemiceluloses constituem o segundo maior componente deste tipo de materiais. As hemiceluloses são polímeros heterogêneos ramificados, compostos por pentoses como a xilose e a arabinose, e também por hexoses como a

glucose, a manose e a galactose [29,30]. Existem vários tipos de hemiceluloses, mas a mais comum é o xilano. Na maioria das plantas, o xilano é composto por uma estrutura base homopolimérica de cadeias de β -D-xilopirranose [32].

A lenhina é o terceiro dos componentes principais da biomassa lignocelulósica e é a substância que se interliga com a celulose e as hemiceluloses, conferindo-lhes proteção contra disruptões externas. Este composto é um polímero complexo de fenilpropanóides, constituído por álcoois coniferílicos, sinapílicos e p-cumarílicos [37], que atua como um cimento ao suportar os componentes celulares da planta e que confere a rigidez típica deste tipo de materiais [31]. A lenhina apresenta elevada resistência à degradação química e enzimática [32].

2.2.1 Palha de milho

A biomassa utilizada neste estudo foi a palha de milho, mais concretamente a parte do caule da planta. A denominada palha de milho corresponde aos caules, folhas e cascas que são deixados no solo após a colheita do milho. Esta palha é predominantemente formada por celulose, hemicelulose e lenhina, que em percentagem representa, respetivamente, 35,1-39,5%, 20,7-24,6% e 11,0-19,1%, do total de compostos deste material [38]. Estima-se que é produzido um kg de palha de milho por cada kg de grão de milho, o que, anualmente, equivale a um milhar de milhão de toneladas (ton), a nível global. A sua disponibilidade mundial em grande quantidade, aliada ao seu alto teor em hidratos de carbono tornam-na numa das matérias-primas com mais potencial para a produção de biocombustíveis [39].

2.3 Bioetanol

O designado bioetanol, ou apenas etanol, é um álcool etílico de fórmula molecular $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. O composto incolor e translúcido tem sido usado nas bebidas alcoólicas há centenas de anos, mas também apresenta diversas aplicações na área industrial, como em detergentes, revestimentos ou produtos farmacêuticos [32]. Para além das aplicações referidas anteriormente, esta substância química pode ser usada como combustível de transporte, equiparado à gasolina. De momento, é o combustível líquido com maior utilização em todo o planeta [29]. Apesar do etanol ter começado a ser usado como combustível há mais de um século, só começou a ser considerado como uma alternativa no mercado entre 1970 e 1980.

O bioetanol é visto como um combustível bastante promissor para enfrentar a crise energética global e a degradação ambiental crescente. Um dos atributos mais interessantes que apresenta é o elevado índice de octanas (*anti knocking value*), 108, que é superior ao da gasolina. Embora a gasolina possua um maior conteúdo energético do que o etanol, este biocombustível tem uma combustão mais limpa e emite menos substâncias tóxicas, numa perspetiva de ciclo de vida, devido ao seu alto teor em oxigénio. O bioetanol pode contribuir para uma redução de até 80% na emissão de

dióxido de carbono (CO₂), promovendo assim o uso de energia mais limpa e um futuro mais sustentável [40].

Este álcool pode ser sintetizado artificialmente a partir de petróleo ou gás natural, ou então produzido biologicamente a partir da fermentação de açúcares provenientes de culturas amiláceas, culturas ricas em açúcar e culturas lignocelulósicas [32].

2.3.1 Mercado de bioetanol – produção e consumo

2.3.1.1 Panorama Mundial

Segundo a *Renewable Fuels Association* (RFA), em 2019, a produção mundial total de bioetanol para combustível foi de 29,1 mil milhões de *gallons* (gal), o que equivale a cerca de 110,2 mil milhões de litros [41]. Atualmente, os Estados Unidos da América (EUA) e o Brasil são claramente os dois grandes produtores de bioetanol a nível global. Os EUA têm representado 54% de toda a produção mundial (59,8 mil milhões de litros), e o Brasil contribuído com 30% (32,6 mil milhões de litros). Os EUA produzem o seu bioetanol maioritariamente a partir de milho [41], enquanto que o outro grande produtor, o Brasil, utiliza cana-de-açúcar como fonte de biomassa sacarina [6]. De acordo com esta associação, a União Europeia (UE) representa apenas 5% de toda a produção no planeta, com 1440 milhões de galões. Entre 2014 e 2019 as contribuições de cada país na síntese de etanol têm-se mantido relativamente constantes, com apenas a Índia a conseguir um incremento relevante de produção deste combustível [41].

Com base nos dados providenciados pela RFA é possível representar graficamente a produção de bioetanol de cada país, como se observa na Figura 4.

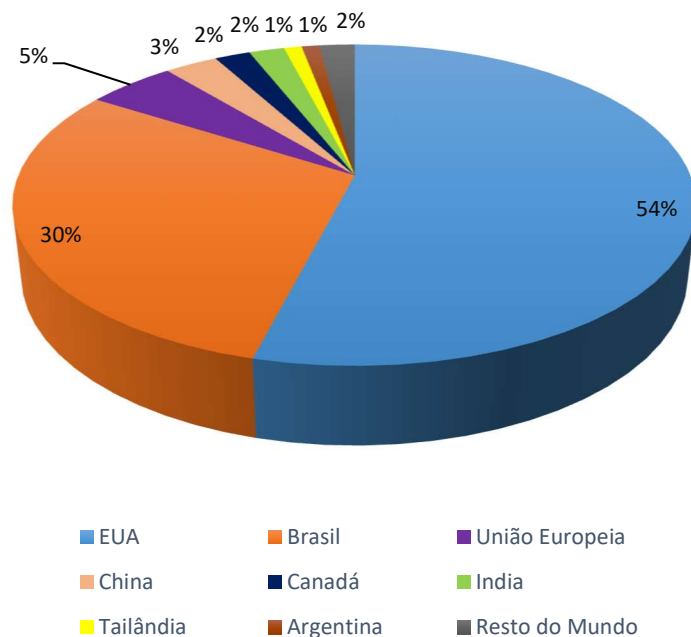


Figura 4 - Produção Mundial de Bioetanol (combustível)

2.3.1.2 Panorama Europeu e Nacional

A Diretiva 2009/28/CE estabeleceu uma meta de 20% para a energia proveniente de fontes renováveis na UE, e ainda, o valor de 10% para a quota de mercado das fontes de energia renováveis, nos combustíveis, para o setor dos transportes. Em 2018, com a entrada em vigor da diretiva 2018/2001, as metas acima referidas foram alteradas para 32% de energia total de fontes renováveis, e, para 14% como a percentagem mínima de energia renovável nos combustíveis de transporte, até ao ano 2030. Os biocombustíveis avançados (produzidos a partir de palhas, bagaços, biorresíduos e outros materiais lignocelulósicos), são contabilizados duplamente para esta meta percentual de energia renovável nos combustíveis de transporte. Portugal definiu ainda a meta mais ambiciosa de 47%, para a energia proveniente de fontes renováveis no consumo final bruto em 2030, como aprovado no Decreto-Lei nº162/2019, e manteve o valor de 10% para a energia renovável nos combustíveis de transporte.

De acordo com dados disponibilizados no relatório da *USDA Foreign Agricultural Service's Global Agricultural Information Network*, sobre a utilização de biocombustíveis na UE, é possível constatar como o mercado de bioetanol tem evoluído nos estados-membros. Em termos de consumo, é estimado que em 2019 tenham sido usados cerca de 7,2 mil milhões de litros de etanol como combustível e como químico industrial. Segundo este relatório, a produção de bioetanol, para as mesmas finalidades, atingiu os 6,18 mil milhões de litros, com 5,5 mil milhões de litros deste líquido produzidos especificamente para serem usados como combustível. É importante referir ainda que, deste volume de etanol para combustíveis, apenas 10 milhões foram sintetizados a partir de material celulósico [42].

Na Europa, a principal cultura para a produção de bioetanol é o trigo, seguido do milho (ambos ricos em amido). Em terceiro lugar encontra-se o etanol de culturas ricas em açúcares (como a beterraba), após este, o etanol de outros cereais e materiais ricos em amido, e, só por último lugar se encontram as matérias lignocelulósicas e restantes fontes de biomassa [6].

2.3.2 Debate *food vs fuel*

O debate *food vs fuel* consiste no dilema ético de usar terra de cultivo para produzir biocombustíveis em vez de alimentos [43]. Esta problemática começou a levantar discussões logo no princípio dos anos 2000 e tinha dois principais aspetos como foco de crítica: o primeiro, que a procura dos biocombustíveis levaria a um impacto nos preços dos alimentos, aumentando-os, afetando as populações mais pobres no sul do planeta [44,45,46,47,48]; e o segundo, que a produção destes bioprodutos iria gerar competição pelas áreas de cultivo já existentes ou então levar a uma exploração de novas áreas [49,50]. Embora tenha sido demonstrada a correlação entre a produção de biocombustíveis de primeira geração e a subida de preços de alimentos como milho e trigo [51,52,53], a maior parte das afirmações sobre a inviabilidade dos biocombustíveis baseia-se numa visão demasiado simples e unidirecional, não representando

completamente o impacto total do processo [43]. A maior parte das culturas alimentares é usada para diferentes produtos finais, possuindo flexibilidade na sua utilização para além de apenas para alimentação. Um exemplo disto é a forma como a biorrefinaria consegue aproveitar o mesmo material vegetal para produzir comida, energia e outros produtos de valor [43]. Os fundamentos base deste debate não consideravam os biocombustíveis de segunda geração, pois não havia dados suficientes para tal. No entanto, a biomassa lignocelulósica apresenta-se como umas das melhores soluções para a geração de combustíveis biológicos, com cultivos próprios deste material ou então aproveitando os resíduos lignocelulósicos de outros processos.

2.3.3 Processo de produção de bioetanol

O processo de síntese de bioetanol depende do tipo de matérias-primas usadas. De forma simplificada, o bioetanol é produzido pela atividade metabólica de microrganismos que fermentam açúcares, convertendo-os em álcool etílico. Quando se utilizam materiais ricos em açúcares, como é o caso da cana-de-açúcar, não é necessário nenhum tratamento prévio do material para que este possa ser fermentado [32]. No caso de materiais amiláceos e lignocelulósicos, já são precisos tratamentos acrescidos, especialmente no segundo tipo de matéria referida.

Na produção de etanol a partir de matéria lignocelulósica, como a palha de milho, a estrutura da celulose e das hemiceluloses tem de ser quebrada, originando monómeros (açúcares simples) que consigam ser fermentados por leveduras ou bactérias [34]. Para esta finalidade, é convencional esta biomassa ser submetida a processos de trituração, pré-tratamento e hidrólise, podendo ainda ser realizada uma desintoxicação caso exista algum composto tóxico na mistura [32]. Tipicamente, a produção de bioetanol segue a seguinte sequência de processos:

- Trituração da biomassa – redução de tamanho das partículas por processos mecânicos
- Pré-tratamento – quebra das moléculas de lenhina para facilitar o acesso aos polissacarídeos
- Hidrólise das cadeias de açúcar – com libertação de moléculas de açúcares simples
- Fermentação – conversão dos açúcares simples a etanol
- Destilação – separação do etanol do licor, para remoção da água

Este conjunto de processos observa-se na Figura 5.

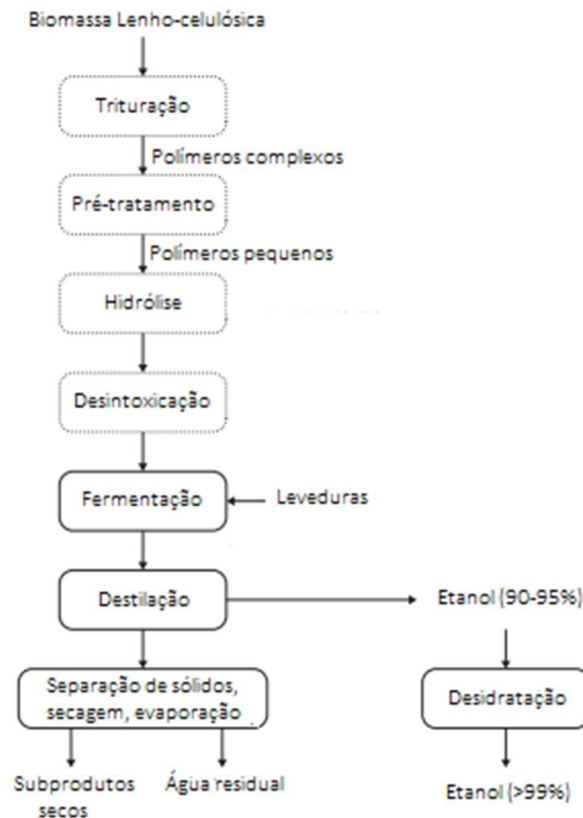


Figura 5 - Sequência típica de processos na produção de bioetanol (adaptado de [32])

2.3.3.1 Pré-tratamento

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é essencial, principalmente para permitir uma hidrólise mais eficaz da celulose em açúcares mais simples (glicose). Enquanto que, a hemicelulose é relativamente simples de hidrolisar, a celulose encontra-se mais protegida pela estrutura lignocelulósica da planta, e para se consiga uma maior acessibilidade à celulose, a biomassa precisa de sofrer um pré-tratamento. Esta etapa altera o tamanho, a estrutura e a composição química da biomassa, para que haja uma maior produção de monómeros de açúcar, mais rapidamente [34].

A mais valia do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos tem sido reconhecida há bastante tempo [54] e este tratamento tem como principais finalidades remover a lenhina e a hemicelulose, reduzir a cristalinidade da molécula de celulose e aumentar a porosidade deste tipo de materiais, melhorando significativamente a eficácia da hidrólise. Segundo Sun e Cheng [55], o pré-tratamento deve atingir os seguintes requisitos: 1) aumentar a produção de açúcares ou a consequente capacidade de serem formados durante a hidrólise, 2) impedir a degradação ou perda de hidratos de carbono, 3) impedir a formação de subprodutos que sejam inibidores nos processos de hidrólise ou fermentação e 4) ter um melhor custo-benefício.

Na Figura 6 é possível observar esquematicamente a estrutura de um material lignocelulósico e a importância que o pré-tratamento pode ter na destruição das ligações lignocelulósicas:

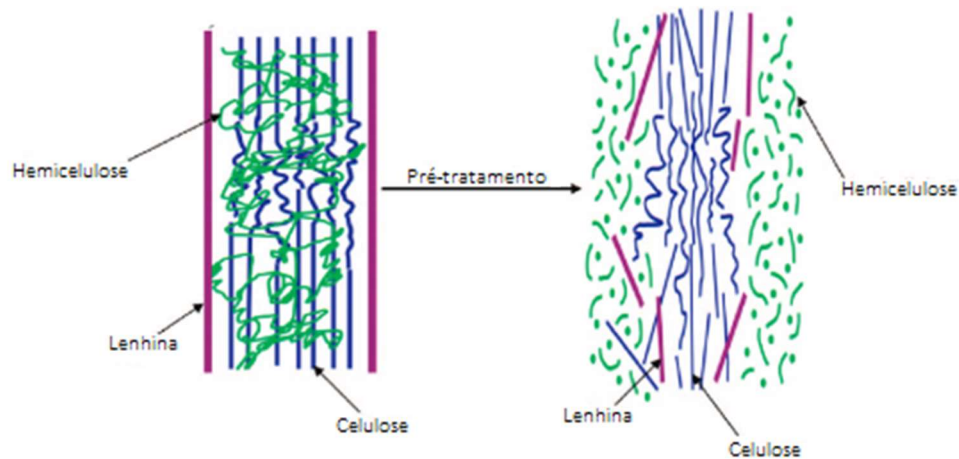


Figura 6 - Efeito do pré-tratamento em material lignocelulósico (adaptado de [34])

É possível categorizar as diferentes técnicas de pré-tratamento da biomassa consoante as diferentes metodologias utilizadas: Tratamento físico; tratamento físico e químico; tratamento químico, tratamento biológico; tratamento térmico; ou a combinação de alguns dos anteriores [34].

Com base nas revisões dos métodos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, enumeram-se as seguintes técnicas de pré-tratamento (resumidos na Tabela 1) [34,55]:

Pré-tratamento físico

- **Fragmentação mecânica** - Neste tipo de tratamento físico, a biomassa passa por um conjunto de transformações mecânicas, tais como moagem, trituração ou pequenos cortes, no âmbito de reduzir a cristalinidade da celulose. A exigência energética deste processo é muitas vezes superior ao conteúdo energético presente neste tipo de biomassa. É considerado um pré-tratamento economicamente inviável para utilização em grande escala.

Pré-tratamento térmico

- **Pirólise** - A pirólise tem sido considerada para o pré-tratamento deste tipo de material porque provoca a decomposição da celulose em carvão residual e compostos gasosos, a temperaturas superiores a 300 °C. Esta técnica demonstra bons resultados ao provocar um aumento significativo de eficácia da hidrólise ácida, em condições moderadas.

Tratamento físico-químico

- **Explosão com vapor** - A matéria lignocelulósica pode ser tratada com vapor a altas pressões. Neste método a matéria é submetida a vapor saturado a alta pressão e, em seguida, a pressão é reduzida drasticamente, provocando que os materiais entrem em descompressão explosiva. A hemicelulose é degradada e a lenhina é transformada, resultando num aumento da eficácia da hidrólise posterior. Este é o método mais frequentemente usado no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica

[54]. Esta técnica não tem tanta exigência energética como a fragmentação mecânica e não tem custos de reciclagem nem ambientais. As limitações associadas a este processo são a formação de compostos que podem ser inibidores das etapas posteriores, a destruição de alguma quantidade de xilano e a degradação incompleta da lenhina [56].

- Ammonia Fiber Explosion (AFEX) - A AFEX, explosão de fibras com amoníaco, é um processo que faz reagir a biomassa com amoníaco líquido, a pressões e temperaturas elevadas, durante um certo intervalo de tempo, até que a pressão é subitamente reduzida. Apenas uma pequena porção de hemicelulose e lenhina é removida pela AFEX. Esta técnica pode provocar um aumento significativo nas taxas de sacarificação de várias ervas e culturas herbáceas. Embora os materiais tratados com esta técnica apresentem uma maior digestibilidade, materiais com maior quantidade de lenhina são menos afetados por este processo. Uma das maiores valias da AFEX é a reduzida produção de inibidores para as etapas seguintes [1].
- Explosão com dióxido de carbono - Consiste na utilização de um fluído no estado supercrítico, neste caso dióxido de carbono. Um fluído supercrítico representa um composto na forma gasosa, que é comprimido a temperaturas acima do seu ponto crítico, de forma a adquirir uma densidade semelhante à de um líquido. É uma técnica desenvolvida para conseguir operar a temperaturas mais reduzidas do que as da explosão com vapor e menos dispendiosa que o método AFEX. Auxiliando na degradação da hemicelulose e celulose, este método apresenta-se com melhor custo-benefício e também com menor formação de subprodutos inibidores do que a explosão vapor.

Tratamento químico

- Pré-tratamento com ozono - O tratamento com ozono é uma das formas mais eficazes de degradar a lenhina presente nos materiais lignocelulósicos, sem produzir subprodutos tóxicos. Este processo é principalmente viável na degradação da lenhina, com as hemiceluloses a serem menos afetadas e as celulosas a não serem afetadas de todo. Apesar deste processo poder ser realizado a temperatura ambiente e pressão normal, as grandes quantidades de ozono necessárias, tornam-no num processo bastante dispendioso.
- Pré-tratamento ácido - O tratamento da biomassa com ácidos pode resultar na melhoria da hidrólise enzimática e têm sido usados tanto ácidos muito concentrados como pouco concentrados, para esta finalidade. Embora, os ácidos concentrados tenham capacidade para digerir a celulose, a sua utilização requer reatores especializados, devido ao seu efeito corrosivo e perigoso. A utilização de ácidos diluídos, como o ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 4%, tem mostrado bons resultados no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Estes ácidos pouco concentrados são tipicamente usados em duas gamas de temperaturas: temperaturas altas ($T > 160$ °C) e temperaturas baixas ($T < 160$ °C). A temperaturas mais elevadas a formação de

compostos tóxicos e potencialmente inibidores da fermentação, como o 5-(hidroximetil)furfural, é mais provável. O uso de ácido diluído permite uma elevada conversão de xilano a xilose, mesmo condições moderadas, e também consegue remover a maior parte das restantes hemiceluloses. A remoção das hemiceluloses aumenta a digestibilidade da celulose [57]. A hidrólise da celulose pode até ser alcançada por este método, usando temperaturas elevadas. Apesar das vantagens referidas, o pré-tratamento com ácido diluído pode apresentar efeitos negativos na hidrólise enzimática e custos habitualmente superiores aos dos métodos AFEX e explosão com vapor. Tem sido aplicado em numerosos resíduos tal como os da produção de milho (cascas, palha e espigas), e, Lu et al. [58] demonstraram a elevada sacarificação de xilano a xilose e um aumento da suscetibilidade da biomassa à hidrólise enzimática, com as condições ótimas a ocorrerem à concentração de 2% de ácido e temperatura de 120 °C. O pré-tratamento com ácido diluído pode ainda ser melhorado ao ser combinado com outros métodos, como o pré-tratamento alcalino, promovendo a remoção da lenhina, o que não é possível com o uso isolado de ácido [57].

- Pré-tratamento alcalino - Também o pré-tratamento com recurso a bases tem sido usado na produção de bioetanol, com o efeito do pré-tratamento a variar com a quantidade de lenhina do material em estudo [54]. Nesta técnica utilizam-se gamas de temperaturas inferiores às do pré-tratamento ácido e é possível a remoção de lenhina, como previamente referido. Tipicamente, os agentes do tratamento alcalino são bases como o hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), entre outros [40]. O hidróxido de cálcio tem-se mostrado a base mais eficaz no pré-tratamento e a menos dispendiosa.
- Deslenhificação oxidativa - A degradação biológica da lenhina pode ser catalisada pela enzima peroxidase quando existe peróxido de hidrogénio (H₂O₂) no meio. Foi demonstrado que este tipo de tratamento aplicado em bagaço de cana-de-açúcar provocou uma solubilização de cerca de 50% das hemiceluloses e lenhina, com baixa concentração de H₂O₂ (2%). O mesmo estudo também confirmou uma consequente eficácia de conversão de celulose em glicose de 95% [59].
- Método *Organosolv* – Este processo consiste em juntar um solvente orgânico com um catalisador ácido inorgânico (ácido clorídrico ou ácido sulfúrico), formando uma mistura que consegue quebrar as ligações internas da lenhina e das hemiceluloses. Os solventes mais comuns neste método são metanol, etanol, acetona, etilenoglicol, trietilenoglicol e álcool tetrahidrofurfurílico [60]. O processo resulta resumidamente numa pré-hidrólise e deslenhificação da biomassa, realizada por um solvente orgânico e, usualmente, por soluções aquosas de ácido. Os solventes usados têm de ser removidos do reator para não causarem uma eventual inibição nas fases seguintes e geralmente são reciclados para diminuir o custo do processo.

Tratamento Biológico

- Relativamente aos restantes métodos, o pré-tratamento biológico não tem elevada dependência energética nem requer equipamentos caros. O processo biológico emprega vários tipos de fungos (*rot fungi*), sendo um método mais seguro e ambientalmente amigável. É possível usar uma combinação de diferentes tipos de fungos para degradar a lenhina e as hemiceluloses. Apesar das vantagens referidas, o pré-tratamento biológico apresenta normalmente uma velocidade de reação bastante reduzida, sendo muito lentos.

Pré-tratamento por *Pulsed-Electric-Field* (PEF)

- Neste tipo de pré-tratamento é aplicada uma pequena descarga de alta tensão numa amostra colocada entre dois elétrodos. Esta técnica pode ter efeitos bastante significativos na estrutura dos tecidos de plantas, devido ao campo elétrico de alta intensidade em contacto aplicado a partir das membranas celulares. Os pulsos elétricos podem ser usados para criar poros permanentes na membrana celular, o que melhora a acessibilidade de ácidos e enzimas aos tecidos vegetais, aumentando a eficiência da degradação da celulose.

Tabela 1 - Resumo das vantagens/desvantagens dos métodos de pré-tratamento

Método de Pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens
Fragmentação Mecânica	-Diminui a cristalinidade da celulose	-Alto consumo energético
Pirólise	-Decompõe a celulose	-Requer temperaturas elevadas -Produz cinzas
Explosão com vapor	-Degrada as hemiceluloses -Altera a estrutura da lenhina	-Subprodutos inibidores -Disrupção incompleta da lenhina
AFEX	-Remove (limitadamente) lenhina e hemiceluloses -Não produz inibidores	-Pouco eficiente para biomassa com alto teor em lenhina
Explosão com CO ₂	-Elevado custo-benefício -Não produz inibidores	-Não interage com lenhina nem hemicelulose
Ácido	-Hidrolisa a hemicelulose em xilose -Aumenta a digestibilidade da celulose	-Forma subprodutos inibidores -Elevado custo -Corrosão de equipamento
Alcalino	-Remove hemiceluloses e lenhina	-Longo tempo de residência -Origina sais que são incorporados na biomassa
Organosolv	-Hidrolisa lenhina e hemiceluloses	-Elevado custo -Solventes têm de ser tratados e reciclados
Biológico	-Baixo consumo energético -Degrada lenhina e hemiceluloses	-Tratamento muito lento

2.3.3.2 Hidrólise

Esta fase de produção do etanol tem como finalidade degradar os polímeros de celulose e hemiceluloses em pequenos açúcares fermentáveis. A hidrólise permite separar as cadeias de hidratos de carbono por adição da molécula de água e é usualmente catalisada por enzimas ou por químicos, como ácidos [32,61]. A eficácia desta parte do processo é de extrema importância visto que vai afetar o sucesso de toda a produção do álcool, tendo em conta que os microrganismos apenas conseguem fermentar açúcares simples e não as cadeias longas de hidratos de carbono [40].

Tipicamente, são empregues três formas de hidrólise para a obtenção de açúcares para a produção de biocombustíveis, sendo elas com uso de ácido diluído, ácido concentrado ou por via enzimática [62].

Hidrólise Ácida

Começando pela hidrólise ácida, esta técnica foi desenvolvida no século 19 e início do século 20 [34], e consiste na reação de um ácido com o material lignocelulósico, durante um certo período de tempo e uma temperatura estipulados. Este processo origina monómeros de açúcar das cadeias de celulose e hemiceluloses [32]. Podem ser usados vários tipos de ácidos, diluídos ou concentrados [63], tais como o sulfúrico, sulfuroso, clorídrico, fluorídrico, fosfórico, nítrico e fórmico [64] citando [65]. O ácido sulfúrico é o mais investigado para esta finalidade, mas o ácido clorídrico também tem sido bastante usado [32,64] citando [66].

A principal vantagem do uso ácidos na hidrólise das cadeias açucaradas da biomassa lignocelulósica é o facto de não precisar de um pré-tratamento, conseguindo penetrar na lenhina e degradar as celulosas e hemicelulosas [64].

Relativamente ao uso de ácido concentrado, este método apresenta-se bastante eficaz na hidrólise da celulose, mesmo a temperaturas e pressões moderadas, conseguindo até atingir os 90% de eficácia teórica da conversão para açúcares simples da celulose [64] citando [67]. No entanto, os ácidos concentrados são perigosos, sendo tóxicos e bastante corrosivos, e requerem reatores resistentes a estas condições para poderem ser usados [55]. Estas características estão associadas a um elevado custo de manutenção e investimento, dificultando que os ácidos concentrados sejam economicamente viáveis para este tipo de processos [32,63].

No que diz respeito à hidrólise por ácidos diluídos, esta é a técnica usada mais frequentemente na hidrólise conduzida por químicos [61,63]. Este método pode também ser usado como pré-tratamento de matérias lignocelulósicas, antecedendo a hidrólise enzimática [32,61,63]. Uma das maiores vantagens desta metodologia é a taxa elevada de conversão de xilano a xilose que é possível obter. Esta alta formação de xiloses é crucial para tornar a produção de etanol um processo economicamente mais viável, visto que o xilano constitui cerca de um terço de todos os hidratos de carbono neste tipo de material [55] citando [68]. Para a celulose ser degradada com ácido diluído são necessárias temperaturas superiores às empregues para as hemicelulosas [32,64].

No entanto, o aumento da temperatura também origina um aumento de produção de inibidores [66]. A hidrólise ácida origina a formação de sub-produtos resultantes da degradação dos açúcares como o furfural e o 5-(hidroximetil)furfural (HMF), respetivamente resultantes da desidratação das pentoses e hexoses [66]. O ácido acético, resultante da degradação das hemiceluloses, juntamente com os compostos referidos anteriormente, não só diminuem a quantidade de açúcar obtido, como também são inibidores da fermentação para etanol [66] citando [69]. Para suprimir esta dificuldade, a hidrólise com ácido diluído é geralmente realizada num processo em duas etapas, ou mais. A primeira etapa é realizada a condições moderadas (T:170-190 °C, C<1%), recuperando as pentoses, de forma semelhante como acontece no pré-tratamento ácido. Na segunda parte, são usadas condições mais agressivas para degradar a celulose (T:200-230 °C, C>9%), o que permite recuperar hexoses [63,64]. É possível obter uma recuperação de 50% de glucose, com este método [70].

Hidrólise Enzimática

No processo de hidrólise enzimática são utilizadas glicosil hidrolases (celulases e hemicelulases), enzimas muito específicas que quebram os polímeros celulósicos e hemicelulósicos [32,63]. As enzimas que têm a capacidade de degradar a celulose são as denominadas celulases, que são organizadas em três tipos, consoante o papel que desempenham: as endoglucanases, as exoglucanases e as β -D-glucosidases [40]. As endoglucanases ou β -(1,4)-glucano-4-glucohidrolases (EC 3.2.1.4) hidrolisam os substratos solúveis e insolúveis de β -1,4-glucano. As exoglucanases são compostas por β -(1,4)-D-glucano glucohidrolases (EC 3.2.1.74) e por β -(1,4)-D-glucano cellobiohidrolases (EC 3.2.1.91) que permitem, respetivamente, libertar as D-glicoses e D-celobioses do polímero [31]. Já o papel das β -D-glucosidases (EC 3.2.1.21) é extrair as unidades de D-glicoses das celobioses [31] citando [71]. A hidrólise enzimática das celuloses pode ser dividida em três passos: 1) adsorção das enzimas de celulase na superfície celulósica; 2) degradação biológica das celulose em monómeros de açúcar e 3) dessorção das celulases [55].

As enzimas que conseguem hidrolisar as hemiceluloses são as hemicelulases e são constituídas por uma mistura complexa de xilanases, manases, xilosidases, arabinofuranosidases [31]. Relativamente às hemicelulases, estas são complexas, mas mais específicas na sua ação. Para degradar o xilano, um dos componentes principais da hemicelulose, são empregues endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) e β -xilosidases (EC 3.2.1.37). As endoxilanases quebram a cadeia principal do xilano, originando cadeias mais curtas de oligossacarídeos. Posteriormente, as β -xilosidases irão reduzir o oligossacarídeo do xilano a xilopiranose, que é um forma de piranose do monómero de xilose [40]. Para degradar as cadeias heterogéneas secundárias, as enzimas responsáveis são designadas enzimas xilanóticas acessórias e são a feruloil esterase (EC 3.1.1.73), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), acetilxilano esterase (EC 3.1.1.72) [40] citando [72], endo-1,4- β -D-mananases (EC 3.2.1.78), β -manosidases (EC 3.2.1.25), α -glucuronidases (EC 3.2.1.139) e α -galactosidades (EC 3.2.1.22) [73].

Diferentes microrganismos conseguem produzir as celulases e as hemicelulases. Estes são espécies de bactérias como *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Ruminococcus*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, e *Streptomyces* e de fungos como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Humicola* e *Schizophillum* spp. [55,74].

Os fatores essenciais na eficácia da hidrólise são a concentração do substrato utilizado, a atividade da celulase e condições experimentais como a temperatura e o pH [55,75]. As melhores condições para a atividade das celulases dão-se geralmente na gama de temperatura de 40-50 °C e de pH de 4-5 [76]. No entanto, as condições ótimas para as enzimas dependem sempre do tipo de biomassa, da duração da hidrólise e da origem da enzima [75].

As principais vantagens da hidrólise enzimática são a taxa elevada de sacarificação (quase 100%), após pré-tratamento, e as condições de operação moderadas de temperatura e pH. A formação de produtos inibidores não é tão grave como na hidrólise ácida. A atividade das celulases pode ser inibida pela celobiose e pela glicose (em menor grau), mas, esta problemática pode ser resolvida por processos como a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) [32,55,63] processo que será descrito posteriormente. Esta metodologia também apresenta desvantagens como o elevado custo das enzimas e o tempo de hidrólise, que pode demorar vários dias [32,63] citando [77]. Neste tipo de hidrólise, o pré-tratamento é necessário para obter a eficácia pretendida [64]. É de extrema importância para a eficácia da hidrólise, que a lenhina seja removida. As ligações intrínsecas que a lenhina forma com as fibras da celulose diminuem a acessibilidade das celulases e por isso diminuem a qualidade da hidrólise enzimática [40,78].

Comparando estes dois tipos de hidrólise reportados na bibliografia, a enzimática e a ácida, é possível verificar que as enzimas conseguem ser eficazes em ambientes menos extremos, ao contrário do que acontece com a hidrólise ácida, que requer maior manutenção do equipamento, levando ao aumento do custo de operação. Outra grande desvantagem da hidrólise ácida é a degradação dos monómeros que pode eventualmente ocorrer, quando estes são formados num ambiente ácido severo, a altas temperaturas [79,80]. No entanto, a hidrólise enzimática também é conhecida pelo alto custo de aquisição das enzimas, o que leva a ser considerada inutilizável para fins comerciais [40]. Com base nas características indicadas anteriormente, é possível elaborar a Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação entre a hidrólise com ácido diluído e hidrólise enzimática

Parâmetros comparativos	Hidrólise Ácida	Hidrólise Enzimática
Condições de Operação	Severas	Moderadas
Eficácia da Hidrólise	Média	Elevada*
Custo do catalisador	Baixo	Elevado
Duração de hidrólise	Baixa (minutos)	Longa (vários dias)
Etapas afetadas pelos inibidores formados	Fermentação	Hidrólise

*mas dependente do pré-tratamento

2.3.3.3 Fermentação

A hidrólise das celulosas e hemicelulosas origina dois tipos simples de açúcares, as hexoses e as pentoses. As hexoses obtidas são a glicose, a galactose e manose e dentro das pentoses obtidas podem-se encontrar, principalmente, xiloses, mas também arabinoses [32]. A fermentação consiste na conversão dos açúcares obtidos em etanol, por ação de microrganismos.

Na equação (1) uma hexose, por exemplo a glicose, é convertida em etanol, e, caso a molécula inteira seja fermentada, obtém-se uma produção de 0,51 gramas de etanol por cada grama de açúcar. Ou seja, teoricamente, por cada grama de hexose é possível produzir 0,51 gramas de etanol [32]. No entanto, na prática, apenas se verifica uma taxa de conversão de açúcares para álcool de 90-95%, devido aos microrganismos incorporarem parte do carbono da molécula na sua própria matéria biológica e à formação de subprodutos como o glicerol e o ácido acético [81,82].



No caso da fermentação de pentoses, acontece uma reação semelhante, como demonstrado na equação (2). Também anaerobiamente, a partir da xilose, se pode esperar uma conversão de 0,51 g de etanol para cada grama de pentose [32]. No entanto, o desequilíbrio *redox* e a lenta formação de ATP, levam a que a produção de etanol a partir de xiloses seja bastante complicada [83,84]. Muitas bactérias convertem primeiro a xilose em xilulose, e no caso de fungos e leveduras, a xilose é convertida em álcool numa reação de dois passos, através de xilitol. Depois destas reações, é possível converter anaerobiamente os compostos obtidos em etanol [32].



Processos de fermentação

Tal como a maior parte dos processos biológicos, a fermentação pode ser realizada de três formas diferentes: fermentação em *batch* (descontínua), fermentação em *fed-batch* (semicontínua) e fermentação em contínuo.

Os processos de hidrólise enzimática e fermentação, realizados após o pré-tratamento, podem ser conduzidos de duas (ou mais) maneiras diferentes. As duas principais estratégias possíveis para realizar a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos são a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) e a hidrólise e fermentação separadas (SHF) [40,64]. Começando pela SHF, este processo caracteriza-se por realizar a hidrólise enzimática da celulose antes da etapa da fermentação, na perspectiva de se obter o máximo em cada etapa. Desta forma, é possível utilizar as condições ótimas para as celulasas, como a temperatura ideal, que geralmente se encontra entre 45 e 50 °C, dependendo do microrganismo produtor da enzima [75] citando [85,86,87,88]. Já a temperatura ideal para os organismos fermentativos situa-se entre os 30 e 37 °C [75]. No entanto, este processo apresenta como desvantagem primária o efeito inibidor que os açúcares libertados têm na atividade das celulasas. A celobiose a 6 g/L consegue diminuir a atividade da celulase em 60%. A glicose também tem um efeito restritivo na ação das celulasas, podendo reduzir a atividade das β -glucosidases até 75%, quando presente numa concentração de 3 g/L [32,89,90]. Outra desvantagem que a SHF apresenta é o risco de contaminação, devido ao facto de a hidrólise enzimática ser um processo moroso, podendo demorar vários dias. A resultante solução de açúcares diluída possui sempre um alto risco de contaminação por microrganismos [32,75].

Como o nome indica, a SSF combina a fase da recuperação dos açúcares com a da fermentação, resultando num só processo. À medida que a celulose vai sendo degradada em glicose, os microrganismos presentes no meio, prontamente a consomem, diminuindo assim o seu efeito inibidor no meio [32,75]. Esta estratégia leva a uma maior produtividade de etanol e menor utilização de enzimas, devido ao efeito inibidor da celobiose e glicose ser aliviado pela atividade dos organismos fermentativos [55]. Esta estratégia mostrou, não só maior eficácia da sacarificação e fermentação em relação à SHF, como também elimina a necessidade de serem usados dois reatores diferentes para estas etapas [1,91]. A principal dificuldade desta metodologia é adequar as condições de temperatura e pH para que as enzimas e os organismos fermentativos consigam realizar a sua função em conjunto. Como já foi referido anteriormente, as celulasas preferem temperaturas mais altas (45-50 °C) e aguentam ambientes moderadamente ácidos (pH<5), mas os organismos fermentativos como a *S. cerevisiae* não têm essa capacidade [92]. A solução pode passar por empregar condições, que embora não sejam otimizadas para nenhum deles, possibilitam que funcionem ao mesmo tempo. Por exemplo, ao usar celulasas produzidas por *T. reesei* e fermentação por *S. cerevisiae*, foi reportado que 38 °C é a temperatura intermédia ótima para ambos os organismos [32,75]. Também é proposto o uso de leveduras e bactérias termotolerantes, como a *Candida acidothermophilum* e *Kluyveromyces marxianus*, para possibilitar a utilização de temperaturas mais próximas do ideal para a hidrólise. O etanol formado por este processo também pode limitar a atividade das celulasas (em 25%, com concentração de etanol de 30 g/L) [93]. No entanto, este fator limitante, tal como os outros referidos anteriormente, não impedem que a SSF seja a metodologia mais utilizada para estudos laboratoriais e testes em maior escala [75].

Organismos usados para a fermentação

Hoje em dia, são reconhecidos três grandes grupos de microrganismos com capacidade fermentativa: as leveduras, as bactérias e os fungos [32].

Tipicamente, são usadas leveduras e entre as mais usadas estão as espécies de *S. cerevisiae*, *S. ellypsoidese*, *S. fragilis*, *S. carlsbergensis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torula cremoris*, e *Candida pseudotropicalis*. De todas as referidas anteriormente, a mais usada uniformemente na indústria tem sido a *S. cerevisiae*. Esta levedura apresenta boa eficácia fermentativa em hexoses como a glicose, mas não consegue fermentar pentoses, como a xilose ou a arabinose [94]. Somente algumas espécies de *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces* e *Phachysolen* têm a capacidade de fermentar xiloses, o açúcar mais abundante nas hemiceluloses. *Pichia stipitis* e *C. shehatae* são o caso de leveduras promissoras capazes de fermentar pentoses, com uma elevada taxa de conversão a etanol e uma utilização mais completa dos açúcares [32,63]. A problemática da fermentação das pentoses pode ser resolvida ao usar uma estirpe geneticamente modificada de *S. cerevisiae* ou usando culturas de duas estirpes diferentes, para promover o consumo de hexoses e pentoses [95]. O uso de espécies diferentes de leveduras, como *S. cerevisiae* e *Pichia stipitis*, na produção de etanol origina uma alta eficiência do uso dos dois tipos de açúcares [96].

Também dentro do grupo das bactérias se podem encontrar microrganismos com características interessantes para a produção de álcool. A *Z. mobilis* é uma bactéria que apresenta uma taxa de conversão para etanol ainda maior que a da *S. cerevisiae*, que também não consegue fermentar pentoses. No entanto, também pode ser difícil a sua utilização em termos industriais, devido à dificuldade e complexidade de trabalhar com bactérias. Também a *Escherichia coli* modificada geneticamente foi usada em vários estudos para perceber a viabilidade neste tipo de processos, demonstrando certas vantagens para a produção de bioetanol. Como desvantagens apresenta a gama de pH necessária para o seu crescimento ser muito estreita [32].

Como fungos podem ser usados os designados fungos filamentosos, entre eles *Fusarium*, *Mucor*, *Monilia*, *Rhizopus*, *Ryzypose*, e *Paecilomyces* conseguem produzir etanol como um dos seus metabolitos, a partir de pentoses [32]. O fungo *Mucor indicus* apresenta algumas características industrialmente interessantes e o seu uso reportadamente permitiu uma produção relativamente alta de etanol. No entanto, a levedura *Pichia stipitis* demonstra maior produtividade e eficiência de conversão que este fungo [97][98]. A espécie *Fusarium oxysporum* apresenta uma alta taxa de eficiência de conversão, semelhante à das espécies de *Pichia* e *Candida* referidas [63]. A utilização de fungos na fermentação também implica outras dificuldades associadas à engenharia de processos, devido ao seu crescimento filamentosos [32].

2.3.3.4 Destilação

Esta é a etapa que permite recuperar o etanol do líquido resultante da fermentação. A destilação é a técnica mais usada para separar misturas homogêneas de fluídos,

aproveitando as diferenças dos pontos de ebulição e da volatilidade dos compostos na mistura [99]. No caso da produção de bioetanol, separa-se o álcool, que tem um menor ponto de ebulição que o resto da mistura, por vaporização e é recuperado por consequente condensação do mesmo. Este método tem como principal desvantagem o elevado consumo de energia, devido à vaporização neste processo [99].

O “caldo” fermentado obtido da etapa anterior não contém apenas álcool etílico, mas também um número de outros materiais como matéria biológica microbiana, compostos voláteis, *fusel oil* (álcool amílico) e restos de palha. O álcool amílico é composto maioritariamente por uma mistura de metilpropanóis e metilbutanóis, formados a partir de α -cetoácidos resultantes de aminoácidos da biomassa. Tipicamente, após a fermentação, o bioetanol constitui somente 2% a 12% de todo o material resultante da fermentação [32].

A mistura fermentada pode ser previamente centrifugada ou decantada, permitindo a separação da parte líquida dos resíduos mais densos. Seguidamente o composto obtido é destilado para ser separado dos outros constituintes da mistura. O álcool etílico é facilmente destilado do resto dos materiais, visto que apresenta uma volatilidade superior à da água, numa solução diluída. No entanto, o etanol e a água formam um azeótropo a 95,6% de concentração de etanol, provocando que se comportem como um composto único. Este fenómeno não permite obter uma pureza maior que 95,6% de etanol, usando a destilação simples. Existem vários tipos de destilação industrial, tais como: sistemas simples de dupla coluna; sistemas *barbet* de três/quatro colunas; sistemas Othmer de três colunas; sistemas de retificação de vácuo; sistemas de recompressão de vapor; sistemas de destilação multi-efeito e sistemas de álcool reagente de seis colunas [32].

A maior parte do etanol disponível no mercado encontra-se a uma concentração de cerca de 95% de concentração. No entanto, para o álcool poder ser misturado com gasolina e ser usado como combustível de transporte, o teor de água tem de ser menor do que 1% (v/v), o que não é alcançável por destilação convencional [32]. O etanol com estas concentrações de humidade tão baixas é denominado etanol anidro, e, para ser obtido, é necessário o uso de um solvente (hexano ou benzeno) ou a passagem por filtros moleculares de zeólito [4].

2.4 Contributo da Dissertação

Neste trabalho propôs-se produzir açúcares simples a partir de palha proveniente do caule da planta do milho usada para fitorremediação de metais pesados. Para o efeito, aplicou-se um pré-tratamento com ácido diluído à palha triturada, seguindo-se a hidrólise enzimática.

O pré-tratamento foi aplicado na biomassa, que já estava triturada. O processo de trituração, que é frequentemente usado neste tipo de biomassa, diminui o tamanho das partículas e o grau de cristalinidade da celulose. Apesar de ser um método energeticamente dispendioso, torna a celulose mais suscetível à ação das enzimas. O pré-

tratamento foi realizado por ácido diluído, que promove a melhoria de eficácia da hidrólise enzimática e consegue uma elevada taxa de conversão de xilano a xilose, mesmo a condições menos severas. O ácido mais estudado para este método é o sulfúrico, no entanto, outros ácidos têm sido usados e proporcionado bons resultados no pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, como demonstrado para o ácido clorídrico [100] e para o ácido nítrico [101]. Neste trabalho pretendeu-se testar o efeito de pré-tratamento de ácidos diluídos (HCl e HNO₃) em gamas de temperaturas baixas (<100 °C), procurando minimizar a formação de substâncias potencialmente inibidoras, como o furfural e o 5-(hidroximetil)furfural, corrosão de equipamentos e outros riscos. O pré-tratamento com recurso a trituração e ácido diluído tem-se mostrado eficaz e sido usado frequentemente na sacarificação de biomassa lenho-celulósica [100].

Para a obtenção de açúcares simples, foi realizada uma hidrólise enzimática, técnica bastante utilizada para a produção de bioetanol, que permite a utilização de condições de temperatura e pH moderadas e proporciona uma elevada taxa de sacarificação. Apresenta um custo superior ao da hidrólise ácida, mas origina menos inibidores da fermentação. Neste trabalho foi aplicado o *cocktail* de enzimas *Ultraflo* da *Novozymes*.

A conjugação do pré-tratamento ácido de palha moída com a hidrólise enzimática é uma técnica viável para obter açúcares simples, porque são dois processos que se complementam. O pré-tratamento referido diminui a cristalinidade da celulose, aumenta a porosidade do material e remove parte das hemiceluloses. Por sua vez, a hidrólise enzimática será mais eficaz na ação de sacarificar a biomassa pré-tratada, que se apresenta mais acessível para a ação das enzimas e com menor organização estrutural.

A dissertação de mestrado realizada por Santos [102], também teve como objetivo a produção de bioetanol a partir de palha de milho contaminada por metais pesados, provenientes dos mesmos solos. Nesse estudo foram obtidas concentrações promissoras de bioetanol a partir da biomassa contaminada, tendo sido testado o pré-tratamento por ácido diluído com HCl ou com HNO₃ e a hidrólise enzimática com o *cocktail* de enzimas *Accelerase/Ultraflo*.

O presente estudo procurou otimizar as etapas de pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática, no intuito de verificar as melhores condições de operação em ambas as etapas, isoladamente, de modo a comparar os resultados com os estudos anteriormente referidos.

DESCRIÇÃO TÉCNICA

- 3.1 Caraterização da Biomassa
- 3.2 Pré-tratamento
- 3.3 Hidrólise Enzimática
- 3.4 Quantificação de açúcares pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

3 DESCRIÇÃO TÉCNICA

O objetivo deste trabalho é a valorização da palha do caule de milho produzido na fitorremediação de solos contaminados com metais pesados (Zn e Cd), através da obtenção de hidrolisado lignocelulósico rico em açúcares fermentáveis para produção de bioetanol. Assim, neste capítulo descrevem-se os procedimentos e metodologia usados na caracterização da biomassa e na sua conversão a açúcares.

3.1 Caracterização da Biomassa

Como a composição da biomassa influencia diretamente a sua conversão em açúcares, foram realizados um conjunto de análises para caracterizar a palha de milho produzida em três tipos de solo, respetivamente solo de controlo, solo contaminado das minas da Panasqueira e solo contaminado das minas de Estarreja.

3.1.1 Teor de humidade

O teor de humidade representa a percentagem de água presente na biomassa.

A análise foi realizada com base na norma europeia EN 14774-3. Resumidamente, pesou-se 1 g ($\pm 0,1$ mg) de amostra e colocou-se na estufa a 105 °C, até massa constante. O valor do teor de humidade (M_{ad}) foi calculado com base no quociente entre a diferença de massa da palha antes e depois de seca na estufa, e a massa da biomassa antes de secar, através da equação (3):

$$M_{ad}(\%) = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \quad (3)$$

m_1 - massa recipiente vazio, após 105 °C (g)

m_2 - massa recipiente com amostra húmida (g)

m_3 - massa recipiente com amostra seca, após 105 °C (g)

$$\%T = 100 - M_{ad} \quad (4)$$

$\%T$ - Teor de sólidos totais

3.1.2 Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado segundo a norma europeia EN 14775, na sequência da análise ao teor de humidade.

A amostra proveniente da estufa, da anterior análise, foi colocada na mufla a 550 °C, até a massa permanecer constante. O valor do teor de cinzas (A_d) foi obtido pelo quociente

entre a massa de resíduo da palha após a incineração na mufla, e, a massa da palha seca na estufa (a 105 °C), através da equação (5):

$$A_d(\%) = \frac{m_c - m_a}{(m_b - m_a) \times \%T} \times 100 \quad (5)$$

m_a – massa recipiente vazio, após queima em mufla a 550 °C (g)

m_b - massa recipiente com amostra, após secagem em estufa a 105 °C (g)

m_c – massa recipiente com amostra incinerada, após queima em mufla a 550 °C (g)

3.1.3 Teor de lenhina

A percentagem de lenhina total presente na palha foi calculada com base na norma TAPPI T222 om-02 (lenhina insolúvel ou Klason) e na norma NREL LAP-004 (lenhina solúvel). Começou-se pelo procedimento da lenhina insolúvel, aplicando ácido sulfúrico (72%) em 1 g ($\pm 0,1$ mg) de palha e deixando a solução em banho termostático de 20 °C, durante 2 horas. Após as 2 horas, a solução foi transferida para um gobelé com volume conhecido de água desionizada e colocada em cima de uma placa de aquecimento para ferver durante 4 horas (a volume constante). Deixou-se a lenhina repousar até o dia seguinte, e o conteúdo do gobelé foi filtrado em vácuo por um filtro de fibra de vidro. O líquido filtrado nesta etapa foi guardado para a análise da lenhina solúvel. O filtro com o resíduo foi seco na estufa a 105 °C e pesado. O teor em lenhina insolúvel (AIL) foi calculado a partir da equação (6):

$$AIL(\%) = \frac{K}{W_1 \times \%T} \times 100 \quad (6)$$

K - massa de resíduo de filtração, após secagem em estufa a 105 °C (g)

W_1 - massa de amostra de palha (g)

Para determinar o teor em lenhina solúvel, registou-se o volume obtido do líquido previamente filtrado e mediu-se a sua absorbância no espectrofotómetro *Shimadzu UV-1700*, a um comprimento de onda de 205 nm. As amostras de filtrado foram diluídas 25 vezes para a leitura da absorbância se situar na gama 0,2-0,7, como consta no procedimento. Usou-se ácido sulfúrico a 4% como branco. O teor de lenhina solúvel (ASL) foi calculado a partir da equação (7):

$$ASL(\%) = \frac{\frac{A}{b} \times df \times V_{filt} \times \frac{1}{1000}}{W_1 \times \%T} \times 100 \quad (7)$$

A - absorbância a 205 nm

df - fator de diluição

b - comprimento de caminho da célula (1 cm)

a - absorvidade (110 L/g.cm)

V_{filt} - volume de filtrado na análise de lenhina insolúvel (mL)

$\%T$ - Teor de sólidos totais

3.1.4 Teor de celulose

A concentração de celulose foi determinada segundo a norma portuguesa NP EN ISO 6865:2009. O procedimento consistiu em tratar 1 g ($\pm 0,1$ mg) de amostra com ácido clorídrico (0,5 mol/L), agitando continuamente a mistura e seguidamente filtrar em vácuo, com um filtro de fibra de vidro. O passo seguinte foi adicionar ácido sulfúrico (0,13 mol/L) ao resíduo da filtração anterior e levar a solução à ebulição durante 30 minutos, a volume constante. Depois deste tempo, voltou-se a filtrar com um filtro de fibra de vidro e o resíduo da filtração foi submetido, por último, a hidróxido de potássio (0,23 mol/L). Levou-se novamente à ebulição durante 30 minutos, a volume constante e lavou-se o resíduo três vezes com 30 mL de acetona. O resíduo obtido, por filtração em vácuo, foi transferido para um cadinho, seco a 130 °C e incinerado a 500 °C, registando a massa do resíduo após cada uma das temperaturas. O teor de celulose (wc) foi calculado a partir da equação (8):

$$wc \text{ (g/kg)} = \frac{m_{\alpha} - m_{\beta}}{W_1 \times \%T} \times 100 \quad (8)$$

W_1 – massa da amostra de palha (g)

m_{α} – massa do cadinho com o filtro de vidro e resíduo obtido, após 130 °C (g)

m_{β} – massa do cadinho com o filtro de vidro e resíduo obtido, após 550 °C (g)

wc (g/kg) foi convertido em %(m/m) multiplicando o resultado de wc por 0,1

3.1.5 Teor de carbono orgânico

O teor de Carbono Orgânico Total (COT) foi determinado por diferença entre o teor de Carbono Total (CT) e o teor de Carbono Inorgânico (CI), de acordo com o procedimento descrito no manual do aparelho Analisador de COT, *Shimadzu, TOC-VCSN*, usando o módulo para amostras sólidas *TOC-V Series SSM-5000*. Resumidamente, a quantificação do carbono total foi realizada por injeção de amostra numa câmara a alta temperatura (900 °C), provocando a decomposição completa dos carbonatos presentes na amostra em dióxido de carbono. O dióxido de carbono resultante da oxidação da matéria orgânica e do carbono inorgânico foi depois transportado por um gás de arraste (oxigénio) e quantificado. Para determinar o CI, a amostra injetada na câmara de reação foi acidificada com ácido fosfórico. Nestas condições, todo o carbono inorgânico é convertido em dióxido de carbono, o qual foi transferido para o detetor e medido, sendo quantificado automaticamente através de uma curva de calibração preparada com os padrões adequados.

3.1.6 Teor de proteínas

Para determinar o teor de proteínas foi necessário determinar, previamente, o teor de azoto total. Para tal, pesou-se rigorosamente 0,250 g de biomassa para cada tubo do digestor de amostras. Adicionou-se 12 mL de ácido sulfúrico concentrado a cada tubo, e duas pastilhas de catalisador. Ligou-se o digestor e as amostras foram submetidas a uma sequência de temperaturas gradualmente mais elevadas – 180 °C durante 30

minutos, 250 °C durante 15 minutos, e 420 °C durante 90 minutos. No final da digestão, adicionou-se 75 mL de água desionizada a cada tubo. Colocou-se um matraz com 25 mL de ácido bórico (2%) no destilador *Tecator Kjeltex System 1002*, tal como o tubo com a amostra. Com a bomba doseadora do destilador, acrescentou-se aproximadamente 50 mL de hidróxido de sódio. Procedeu-se à destilação, deixando o aparelho a realizar o processo durante 4 minutos. No final deste período, titulou-se o conteúdo do matraz com ácido clorídrico (0,08365 mol/L), usando vermelho de metilo e verde de bromocresol como indicadores do ponto de equivalência. Realizaram-se dois ensaios sem biomassa, mas seguindo o mesmo procedimento, para servirem de branco. Registou-se o volume de titulante gasto e calculou-se o teor de azoto total (Az) e o teor de proteínas (p_t) a partir das equações (9) e (10):

$$Az (\%) = \frac{(V_{Ta} - V_b) \times C_{HCl} \times 14,007}{W_1 \times \%T} \times 100 \quad (9)$$

V_{Ta} – volume de titulante gasto (L)

V_b – volume de titulante gasto no branco (L)

C_{HCl} – concentração de HCl (0,08365 mol/L)

W_1 – massa de amostra de palha (g)

$$p_t (\%) = Az \times f \quad (10)$$

f – fator de conversão de azoto para proteínas, (6,25 para este tipo de biomassa [103])

3.2 Pré-tratamento

Na primeira fase de tratamento da biomassa foi empregue um pré-tratamento com ácido diluído, com auxílio de temperaturas moderadas, onde foi testada a eficácia do pré-tratamento com dois ácidos diferentes, o ácido clorídrico (HCl) e o ácido nítrico (HNO₃).

No intuito de se otimizar a eficácia das condições do pré-tratamento, foi realizado um planeamento experimental do tipo *Central Composite Design* (CCD) ortogonal, com três pontos centrais, com três variáveis a serem estudadas, a concentração do ácido (Conc. Ácido), a temperatura de pré-tratamento em banho termostático (T) e o tempo de reação (t). Para análise dos resultados do pré-tratamento, foi proposto como forma de avaliação a quantificação dos açúcares obtidos por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

Os valores considerados para cada variável estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores das variáveis usados no pré-tratamento

Variável codificada	-1,6820	-1	0	1	1,6820
T (°C)	63,2	70,0	80,0	90,0	96,8
t (min)	5,0	80,0	190,0	300,0	375,0
Conc. Ácido (%)	1,0	2,0	3,5	5,0	6,0

Para elaborar o planejamento experimental foi usado o software *Statistica 7* que construiu a tabela com o plano de trabalho e as respectivas condições a usar em cada ensaio, como se observa na Tabela 4.

Tabela 4 - Planejamento do pré-Tratamento ácido

Ensaio	Temperatura	Tempo	Conc. Ácido	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Conc. Ácido (% v/v)
1	-1	-1	-1	70,0	80,0	2,0
2	-1	-1	1	70,0	80,0	5,0
3	-1	1	-1	70,0	300,0	2,0
4	-1	1	1	70,0	300,0	5,0
5	1	-1	-1	90,0	80,0	2,0
6	1	-1	1	90,0	80,0	5,0
7	1	1	-1	90,0	300,0	2,0
8	1	1	1	90,0	300,0	5,0
9	-1,6820	0	0	63,2	190,0	3,5
10	1,6820	0	0	96,8	190,0	3,5
11	0	-1,6820	0	80,0	5,0	3,5
12	0	1,6820	0	80,0	375,0	3,5
13	0	0	-1,6820	80,0	190,0	1,0
14	0	0	1,6820	80,0	190,0	6,0
15	0	0	0	80,0	190,0	3,5
16	0	0	0	80,0	190,0	3,5
17	0	0	0	80,0	190,0	3,5

Nesta etapa a palha de milho foi submetida à ação de cada um de dois ácidos diferentes, ácido clorídrico e ácido nítrico, na proporção de 3,3 g de palha para 50 mL de ácido diluído à concentração pretendida.

Após a mistura do ácido com a palha em frascos com tampa de rosca de 100 mL, a solução foi colocada em banho termostático à temperatura pretendida, durante o tempo planejado. As amostras pré-tratadas foram então filtradas a vácuo e o líquido armazenado no congelador, para análise subsequente.

A concentração do ácido, a temperatura do banho e o tempo de permanência no banho foram empregues conforme os valores definidos pela tabela de planejamento (Tabela 4), acima representada. Cada uma das combinações de ensaio foi realizada para cada um dos dois ácidos (HCl e HNO₃) e de igual forma para cada uma das três biomassas, perfazendo um total de 102 amostras.

3.3 Hidrólise Enzimática

Nesta etapa, apenas foram submetidas à hidrólise enzimática duas das diferentes palhas, a de Controlo e a de Estarreja, por ação da enzima *Ultraflo*, da *Novozymes*. De maneira semelhante à fase anterior, realizou-se um planeamento experimental para averiguar quais as melhores condições para a hidrólise enzimática, fazendo-se variar a temperatura de hidrólise, o tempo de hidrólise e a dose de enzima utilizada (E_L). O planeamento experimental foi realizado no software *JMP* e o tipo escolhido foi CCD ortogonal, com três pontos centrais.

Como não se conseguiu obter resultados da otimização do pré-tratamento, a hidrólise enzimática foi realizada sobre amostras pré-tratadas em condições consideradas ótimas: $T=80\text{ °C}$, $\text{Conc. Ácido}=3,5\%$ e $t=360\text{ min}$. Decidiu-se também realizar o pré-tratamento com um ácido apenas, o ácido clorídrico, previamente à realização do planeamento da hidrólise enzimática. As condições de operação do planeamento da hidrólise enzimática foram definidas com base no estudo de Pérez-Boada et al. [104].

A Tabela 5 representa os valores atribuídos a cada variável para o planeamento da hidrólise enzimática.

Tabela 5 - Valores das variáveis usados na hidrólise enzimática

Variável Codificada	-1,66803	-1	0	1	1,66803
T (°C)	32,2	29	37,0	41,8	45,0
t (h)	2,0	10,8	24,0	37,2	46,0
Dose Enzima (µL)	50	140	275	410	500

Na Tabela 6 observa-se o planeamento criado, pelo software *JMP*, com as condições para cada ensaio, para a hidrólise enzimática.

Para se realizar a hidrólise enzimática, pesou-se 6,6 g de palha e adicionou-se 100 mL de ácido clorídrico a 3,5%, em frascos com tampa de roscar de 250 mL, nas condições operacionais consideradas ótimas ($T=80\text{ °C}$ e $t=360\text{ min}$).

Após este pré-tratamento, o pH da cada amostra pré-tratada foi estabilizado para 6, com adição de solução saturada de NaOH. O respetivo volume de enzima foi adicionado a cada frasco com uma micropipeta e as amostras foram colocadas em banho termostático conforme as condições estabelecidas no planeamento.

As soluções hidrolisadas foram filtradas em vácuo e congeladas para posterior análise.

Tabela 6 - Planeamento da hidrólise enzimática

Ensaio	Temperatura	Tempo	Dose Enzima	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Dose Enzima (µL)
1	-1	-1	-1	32,2	10,8	140
2	-1	-1	1	32,2	10,8	410
3	-1	1	-1	32,2	37,2	140
4	-1	1	1	32,2	37,2	410
5	1	-1	-1	41,8	10,8	140
6	1	-1	1	41,8	10,8	410
7	1	1	-1	41,8	37,2	140
8	1	1	1	41,8	37,2	410
9	-1,66803	0	0	29,0	24,0	275
10	1,66803	0	0	45,0	24,0	275
11	0	-1,66803	0	37,0	2,0	275
12	0	1,66803	0	37,0	46,0	275
13	0	0	-1,66803	37,0	24,0	50
14	0	0	1,66803	37,0	24,0	500
15	0	0	0	37,0	24,0	275
16	0	0	0	37,0	24,0	275
17	0	0	0	37,0	24,0	275

3.4 Quantificação de açúcares pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Para se obter o teor em açúcares na mistura hidrolisada, recorreu-se ao método de determinação de açúcares redutores a partir de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), como descrito por Hu et al. [105]. O procedimento consistiu em medir a absorvância das amostras, a um comprimento de onda de 540 nm, no espectrofotómetro *Hach Lange DR 2800*. O respetivo valor de concentração de açúcares foi calculado a partir da curva de calibração feita previamente, a partir de concentrações crescentes de soluções-padrão de glicose.

Preparou-se primeiro uma solução de glicose de concentração 1 g/L. Para tal, adicionou-se 0,05 g de glicose a um balão volumétrico de 50 mL e perpez-se o volume com água desionizada. De seguida, as soluções-padrão foram preparadas com concentrações de 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 e 0,8 g/L, e, colocadas em tubos de ensaio com tampa de roscar. Em cada um dos tubos adicionou-se 0,5 mL de solução DNS, e homogeneizou-se a mistura no vortex. De seguida, os tubos foram colocados em água a ferver, durante 5 minutos, e arrefecidos de imediato em água fria. Foram adicionados 8,5 mL de água desionizada a cada tubo, agitando mais uma vez no vortex. Por fim, registaram-se os

valores de absorvância de cada solução, no espectrofotômetro, e foi traçada a curva de calibração.

Para medir a concentração de açúcares redutores nas amostras, colocou-se 1 mL de solução hidrolisada diluída quantitativamente em tubos de ensaio de vidro com tampa de rosca. De seguida acrescentou-se 0,5 mL da solução de DNS e agitou-se os tubos no vortex. Tal como na etapa anterior, os tubos foram colocados em água a ferver, durante 5 minutos, e arrefecidos em água fria. Adicionou-se 8,5 mL de água desionizada a cada tubo e agitou-se novamente no vortex. Foi então lida a absorvância para cada ensaio no espectrofotômetro, a 540 nm. A partir dos resultados obtidos, foi feita uma curva padrão de calibração para calcular a concentração de açúcares redutores. O fator de diluição foi considerado para este cálculo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- 4.1 Caraterização da biomassa
- 4.2 Pré-tratamento ácido
- 4.3 Hidrólise enzimática

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da biomassa

Na Tabela 7 estão resumidos os resultados da composição %(m/m) de cada uma das diferentes biomassas (palha de milho), assim como os valores obtidos por Li et al. [106], que realizou uma análise composicional a duas partes do caule do milho, a casca e a medula. Foram realizadas três réplicas para cada análise das biomassas, à exceção do teor em celulose e em carbono orgânico, análises em que foram realizadas 2 réplicas. Todos os parâmetros foram calculados em base seca, exceto o teor de humidade.

Tabela 7 - Resultados da Caracterização da Biomassa

Parâmetro %(m/m)	Controlo	Estarreja	Panasqueira	Li et al. [106]	
				Casca	Medula
Humidade (%)	10,7±0,07	5,5±0,11	8,8±0,28	---	---
Cinzas (%)	13,9±0,61	21,8±0,67	9,0±0,07	9,9±0,1	10,0±0,1
Lenhina (%)	Insolúvel	17,5±0,23	20,9±0,38	15,1±0,28	18,1±0,3
	Solúvel	3,4±0,07	2,7±0,17	3,5±0,35	2,0±0,1
	Total	20,9±0,29	23,6±0,55	18,6±0,62	20,1±0,4
Celulose (%)	27,1±0,93	24,0±0,38	32,5±0,69	39,4±0,1	31,6±0,1
Carbono Orgânico Total (%)	38,0±0,07	30,2±0,37	38,2±0,03	---	---
Azoto (%)	Total	0,98±0,02	1,14±0,02	1,4±0,02	0,95±0,02
	Proteínas	6,14±0,14	7,13±0,15	8,6±0,10	5,9±0,1

De acordo com a literatura, a palha de milho contém cerca de 35,1-39,5% de celulose, 20,7-24,6% de hemicelulose e 11,0-19,1% de lenhina. No entanto, diferentes partes de palha de milho apresentam diferentes composições, como é o caso do caule do milho relativamente às restantes frações da palha [38,106].

Analisando os resultados da caracterização da biomassa, é possível observar que a composição das palhas usadas neste trabalho variou consoante o solo de origem. Para o teor de humidade, obteve-se o maior valor para a palha do solo de Controlo (10,7%) e menor para a palha do solo de Estarreja (5,5%), o que significa que a biomassa de Estarreja apresenta o teor de sólidos mais elevado. Esta diferença pode dever-se a distintas extensões da secagem daquelas biomassas.

O valor de cinzas obtido foi um pouco superior ao que se normalmente se verifica, especialmente para a palha de Estarreja (21,6%), que apresenta um valor estranhamente elevado. Esta discrepância pode ter sido causada pela acumulação de metais nesta parte da planta, ou pela alteração da composição da planta em resposta ao *stress* causado pela contaminação de metais pesados existentes no solo.

Os valores do teor de lenhina insolúvel (Klason) e solúvel estão dentro da gama esperada para o caule de milho, tendo sido obtidos valores semelhantes aos dos estudos de Li et al. [106] e Wojcieszak et al. [107]. Mais uma vez, os resultados apresentam um valor ligeiramente mais alto para a palha do solo de Estarreja (23,6%), possivelmente em resultado do *stress* a que as plantas de milho foram sujeitas naquele solo.

A percentagem de celulose também variou entre as amostras, apresentando o maior valor para a palha de Panasqueira (32,5%) e o menor para Estarreja (24,0%). O teor de celulose obtido foi significativamente inferior ao estudo de referência.

O teor em carbono orgânico foi semelhante para as palhas dos solos de Controlo (38,0%) e da Panasqueira (38,2%) e mais reduzido para a do solo de Estarreja (30,2%), o que é compatível com os resultados anteriores.

Quanto ao teor de proteínas estimado a partir do azoto total, verifica-se que a biomassa do solo da Panasqueira apresenta o valor mais elevado (8,6%), e os valores de 6,1% e 7,1% de proteínas para as palhas dos solos de Controlo e de Estarreja, respetivamente. Os resultados do conteúdo de proteínas foram semelhantes aos valores obtidos por Li et al. [106], com apenas a palha do solo da Panasqueira apresentando um valor ligeiramente mais elevado.

Com base nesta análise, pode-se supor que a palha de Panasqueira é a que apresenta a composição mais promissora para a obtenção de açúcares, visto que apresenta o maior teor de celulose e de carbono orgânico das palhas em estudo. Esta palha teoricamente deve originar maiores concentrações de glicose do que as restantes. O teor de lenhina é mais reduzido também para esta palha, o que pode significar menor resistência química e enzimática. Pelas mesmas razões, a palha de Controlo apresenta a segunda composição mais promissora para a hidrólise, e a palha de Estarreja aparenta ser a menos promissora para a mesma finalidade.

4.2 Pré-tratamento ácido

A finalidade do pré-tratamento ácido é a de hidrolisar as hemiceluloses e quebrar a lenhina de modo a facilitar a hidrólise enzimática da celulose. A análise do líquido resultante do pré-tratamento visa identificar a presença de inibidores potencialmente gerados no processo e avaliar o grau de hidrólise das hemiceluloses, através da quantificação dos açúcares daí resultantes, nomeadamente xilose e arabinose.

As amostras do sobrenadante do pré-tratamento com ácido não puderam ser analisadas, devido ao facto do HLPC que era planeado utilizar se encontrar avariado, e, apesar dos esforços para conseguir utilizar outro HPLC, tal não foi possível. Devido ao

elevado número de amostras geradas e à paragem forçada das instalações de março até junho, também não foi possível analisar as amostras do pré-tratamento por outro método.

Como não foi possível obter as condições de otimização desta etapa, a sequente fase de hidrólise enzimática foi realizada sobre palha de milho pré-tratada nas condições consideradas como ótimas: $T=80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{Conc. Ácido}=3,5\%$ e $t=360\text{ min}$. As condições de temperatura e de concentração de ácido foram as estabelecidas como ponto central do planeamento experimental acima, e, foram definidas com base em estudos anteriores, nomeadamente o de Santos [102].

O tempo de reação empregue nesse estudo foi mais longo, mas devido à dificuldade logística do uso de equipamentos no laboratório, com acesso fortemente condicionado devido à pandemia, o pré-tratamento realizado no presente estudo foi aplicado durante apenas 6 horas (360 min).

4.3 Hidrólise enzimática

Para avaliar o resultado das condições aplicadas na hidrólise enzimática, foi necessário avaliar a concentração de açúcares redutores, conforme descrito no capítulo anterior.

4.3.1 Concentração de açúcares redutores

Os resultados obtidos para a curva de calibração da absorbância em função da concentração de glicose encontram-se representados na Figura 7.

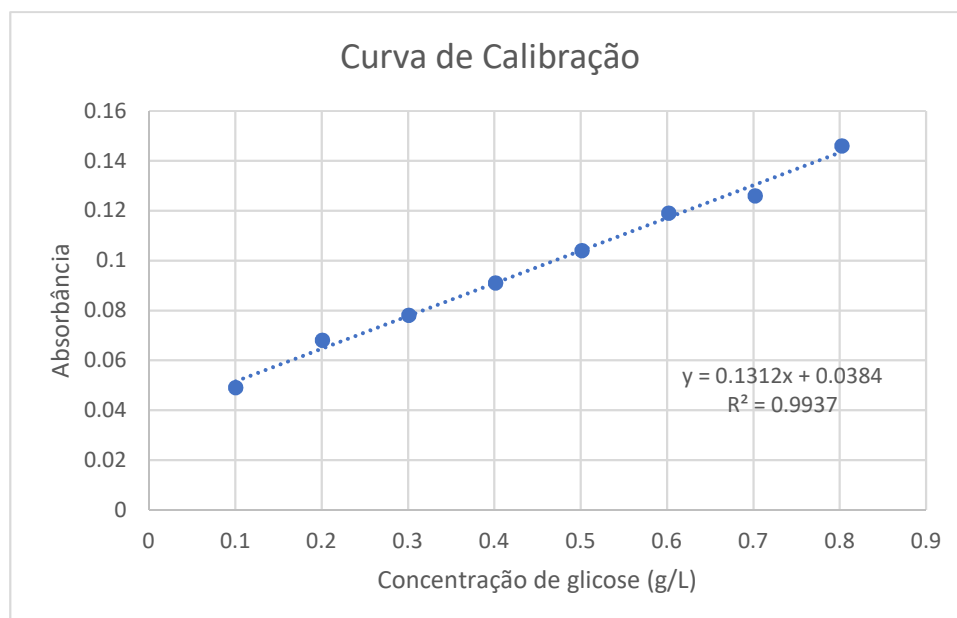


Figura 7 - Curva de calibração para a glicose usando o método DNS

Os resultados da concentração de açúcares redutores (C_{rs}), em g/L, obtidos pelo método do DNS, no líquido da hidrólise enzimática (hidrolisado) das palhas dos solos de Controlo e de Estarreja, estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da hidrólise enzimática para a palha dos solos de Controlo e Estarreja

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Dose Enzima (μ L)	Conc. açúcares redutores (g/L)	
				Controlo	Estarreja
1	32,2	10,8	140	60,3	27,9
2	32,2	10,8	410	49,2	32,5
3	32,2	37,2	140	47,3	30,2
4	32,2	37,2	410	50,4	31,3
5	41,8	10,8	140	52,3	32,9
6	41,8	10,8	410	51,1	34,4
7	41,8	37,2	140	34,8	33,6
8	41,8	37,2	410	51,5	29,8
9	29,0	24,0	275	54,6	26,0
10	45,0	24,0	275	51,1	29,4
11	37,0	2,0	275	57,6	27,9
12	37,0	46,0	275	41,2	19,1
13	37,0	24,0	50	37,4	12,3
14	37,0	24,0	500	45,4	28,7
15	37,0	24,0	275	44,7	24,5
16	37,0	24,0	275	43,9	24,1
17	37,0	24,0	275	43,9	24,8

Analisando os resultados da concentração de açúcares obtidos, é evidente que a biomassa do solo de Controlo gerou muito maior concentração de açúcar do que a do solo de Estarreja, exceto no ensaio 7. Esta variação era, de certa forma, expectável devido à variação composicional em carboidratos entre as duas biomassas. Como a hemicelulose não foi quantificada, não é possível estimar o máximo de açúcares totais expectáveis.

Esta diferença de resultados aponta provavelmente para outras causas, tais como a presença de metais na palha de Estarreja, ou então erros na etapa de hidrólise para a mesma palha. O estudo de Santos também indicou uma menor concentração de açúcares, após hidrólise, na palha do solo de Estarreja, em relação à do solo de Controlo [102]. No entanto, como os metais pesados na palha não foram quantificados, não existe maneira de confirmar se a presença de metais realmente influenciou a eficiência da hidrólise enzimática.

O valor de C_{rs} máximo para a biomassa do solo de Controlo foi 60,3 g/L, representando um rendimento em açúcares de 760,1 $g_{açúcar}/kg_{biomassa}$. O rendimento de sacarificação obtido para a palha do solo de Controlo excede o limite mínimo para produção económica viável de biocombustíveis, de 400 $g_{açúcar}/kg_{biomassa}$, proposto por Marks et al [108]. Analisando os resultados para a palha de Estarreja, é possível verificar que o valor máximo de C_{rs} foi 34.4 g/L, o que equivale a um rendimento de 388,3 $g_{açúcar}/kg_{biomassa}$. O valor de eficácia de sacarificação está abaixo do limite de rendimento de açúcares para biomassa lignocelulósica, referido acima [108]. No entanto, desconhecendo-se qual a composição nos diversos açúcares (glicose, xilose e arabinose) é difícil avaliar a real adequação de cada um dos hidrolisados para a produção de etanol, uma vez que as pentoses não são tão facilmente fermentáveis como a glicose.

4.3.2 Parâmetros e interações significativos na hidrólise enzimática

Através do software *JMP*, foi possível analisar os resultados do planeamento experimental com maior detalhe.

As condições ótimas obtidas para a palha do solo de Controlo foram $T=32,2$ °C, $t=10,8$ h e $E_L=140$ μ L (os parâmetros foram representados com as seguintes letras no software *JMP*: Temperatura [T]; tempo de reação [P]; dose de enzima [E]).

Segundo a mesma nomenclatura, a análise mostrou que os parâmetros e as interações com maior significância na resposta, C_{rs} , foram, por ordem decrescente: [P], $[T^2]$, [P·E], [T·E], $[P^2]$, [T], [E] (Anexo 1).

A equação do modelo de previsão (11), obtida para estimar a concentração de açúcares encontra-se de seguida:

$$C_{rs} = 335,5 - 0,211E - 1,5P - 12,7T + 0,013P^2 + 0,150T^2 + 0,002P \cdot E + 0,005T \cdot E \quad (11)$$

Na Figura 8 é possível observar como varia a resposta, concentração de açúcares redutores (C_{rs}), em função de cada um dos parâmetros.

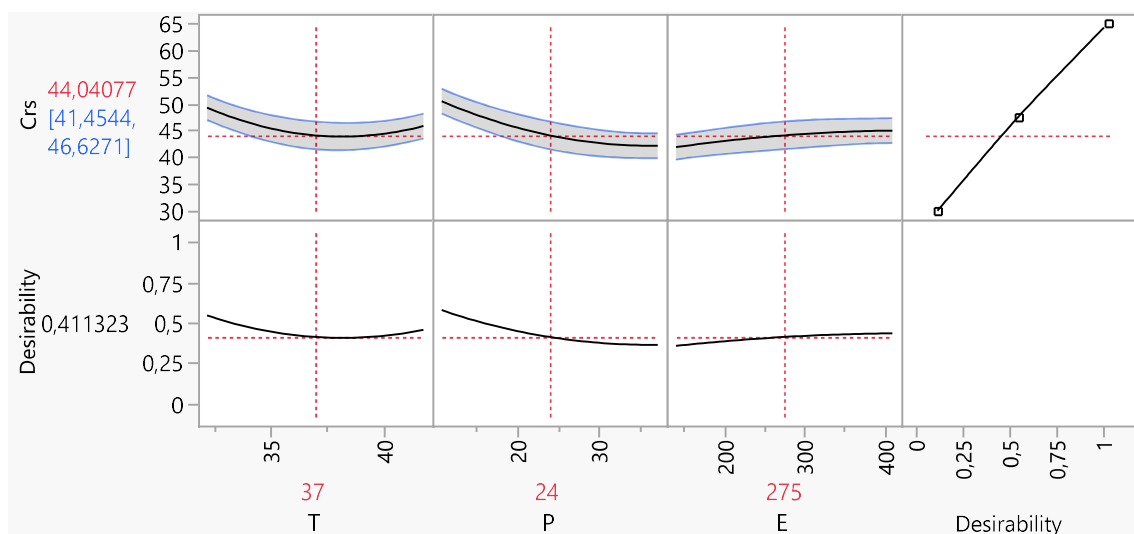


Figura 8 - Prediction profiler (Controlo)

Individualmente, a temperatura gerou maior C_{rs} quando as amostras atingiram valores perto dos extremos definidos (-1;1), sendo os valores mais próximos do extremo negativo os que relevaram uma C_{rs} mais elevada. O tempo de hidrólise influenciou a concentração de açúcares de forma semelhante à temperatura, mas com maior relevância no extremo negativo e com valores mais baixos de C_{rs} perto do extremo positivo. O volume de enzima usado foi o que teve menos significância dos três parâmetros analisados, registando apenas uma ligeira variação dentro dos limites estabelecidos, com o maior valor de C_{rs} a ser atingido próximo do limite positivo.

Foram construídos gráficos de superfície de resposta (*surface plots*), através das ferramentas do *JMP*, para melhor avaliar a interação da conjugação de dois parâmetros e a sua relação com a resposta final. Os gráficos estão representados na Figura 9, Figura 10 e Figura 11.

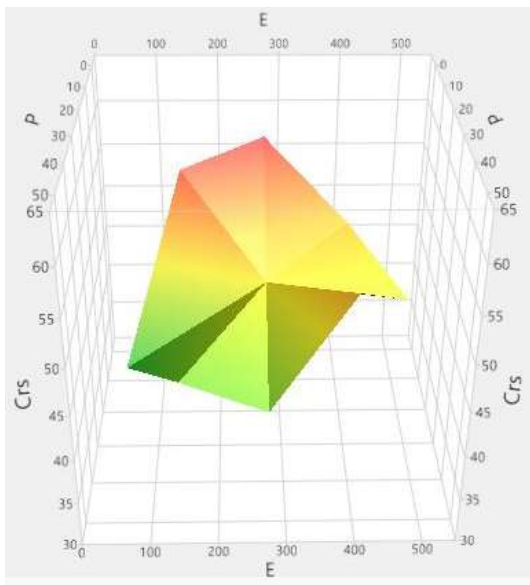


Figura 9 - [P·E] *surface plot* (Controlo)

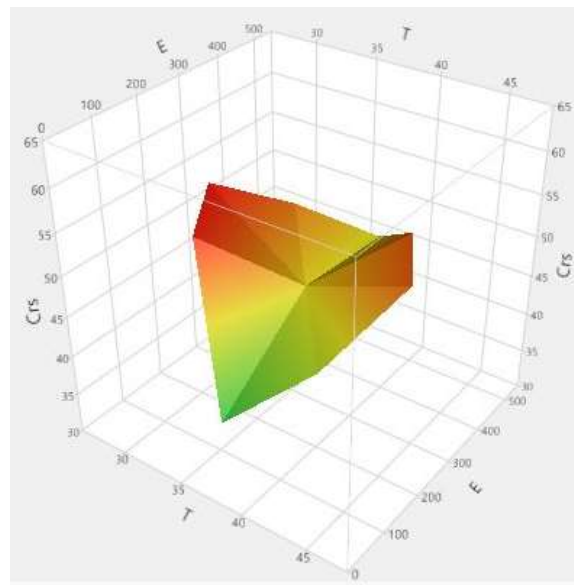


Figura 10 - [T·E] *surface plot* (Controlo)

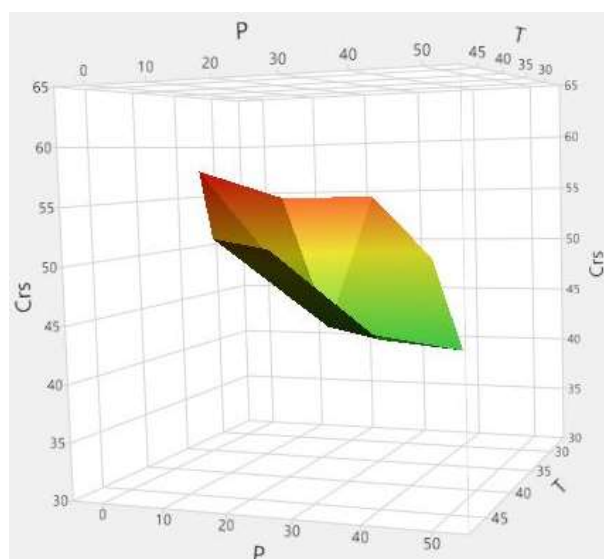


Figura 11 - [T·P] *surface plot* (Controlo)

O *surface plot* [P·E] demonstra uma tendência de maior concentração de açúcares (a vermelho) em torno dos limites negativos de tempo e dose de enzima. Apesar da superfície apresentar algumas irregularidades, é evidente a zona mais desejável dos limites destas duas variáveis. No *surface plot* [T·E] é observável uma relação em quase em forma de parábola, com os valores superiores de C_{rs} a situarem-se próximos dos dois extremos. No entanto, mais uma vez se verifica que a concentrações de açúcar é mais acentuada perto dos limites negativos dos dois parâmetros em questão. O *surface plot* [T·P] não apresenta tanta relevância na resposta final como os dois previamente mencionados, pois a interação destas duas variáveis não se demonstrou significativa na análise pelo *JMP*.

O modelo de análise realizado no *JMP* revelou que, com os resultados obtidos para a palha de Estarreja, nenhum dos parâmetros demonstrou significância para a resposta final, C_{rs} . O relatório do *software* mostrou uma elevada discrepância de valor entre a tendência esperada para a concentração de açúcares e os seus resultados verdadeiros (Anexo 2). Como tal, não foi possível apontar para um ponto com condições ideais.

Esta discrepância entre valores pode ter sido causada por diversas falhas durante o procedimento experimental. Podem ter, primeiramente, ocorrido erros no pré-tratamento das amostras, mas, como esta etapa foi realizada com as duas biomassas em paralelo, é pouco provável que essa seja a causa. É mais provável que as diferenças de resultados tenham surgido durante a hidrólise enzimática, derivado de variações indesejadas na temperatura, tempo de contacto ou volume de enzima para as amostras do hidrolisado da palha do solo de Estarreja, em comparação ao que foi aplicado na palha do solo de Controlo. Algumas amostras do hidrolisado do solo de Estarreja ficaram mais tempo à espera para serem filtradas devido ao número de amostras, do que as do hidrolisado da palha do solo de Controlo. Este foi o caso para os ensaios 10, 13, 14, 16 e 17, da palha de Estarreja. Esta diferença de tempo entre os hidrolisados das palhas, já após o período de hidrólise completo, pode ter tido influência na concentração de açúcares e provocado a resposta inconclusiva do planeamento.

Apesar dos resultados obtidos para a palha do solo de Estarreja não poderem ter sido otimizados, foram representados o *prediction plot* (Figura 12), e os *surface plots* (Figura 13, Figura 14, Figura 15), respetivos.

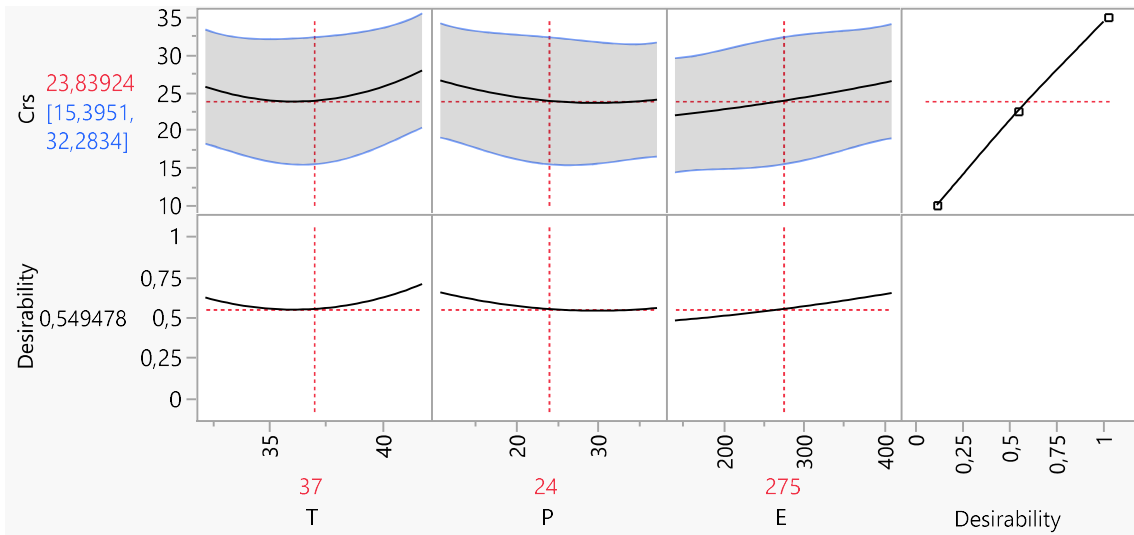


Figura 12 - Prediction profiler (Estarreja)

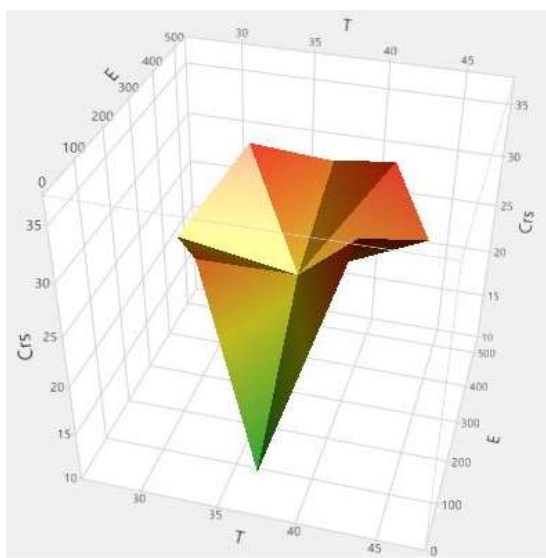


Figura 13 - [T·E] surface plot (Estarreja)

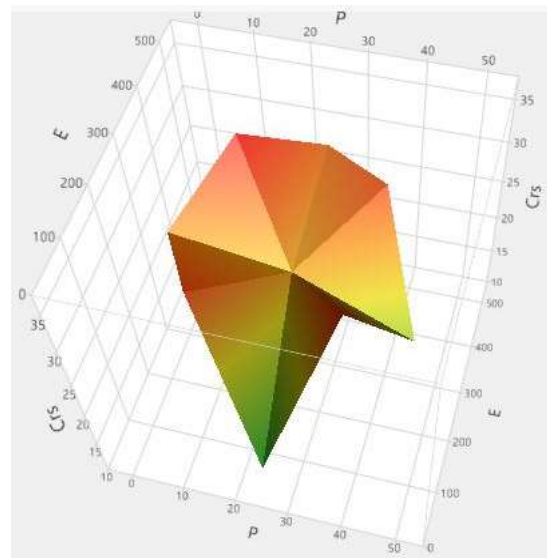


Figura 14 - [P·E] surface plot (Estarreja)

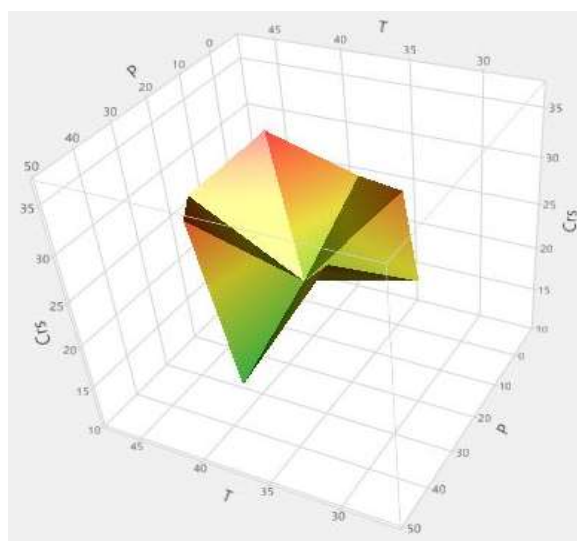


Figura 15 - [T·P] surface plot (Estarreja)

4.3.3 Estimativa dos resultados da hidrólise enzimática

A partir da equação de previsão que modela a hidrólise enzimática (11) foi possível estimar os valores esperados de C_{rs} para cada um dos resultados dos ensaios realizados, para a biomassa de Controlo. Na Tabela 9 estão representados os valores de C_{rs} estimados.

Tabela 9 - Resultados estimados da hidrólise enzimática para a biomassa de Controlo

Ensaio	Conc. açúcares redutores - Controlo (g/L)	
	Obtida	Estimada
1	60,3	61,0
2	49,2	50,2
3	47,3	44,7
4	50,4	49,9
5	52,3	51,7
6	51,1	52,7
7	34,8	35,4
8	51,5	52,4
9	54,6	56,5
10	51,1	50,8
11	57,6	57,1
12	41,2	43,3
13	37,4	41,5
14	45,4	46,6
15	44,7	44,0
16	43,9	44,0
17	43,9	44,0

A otimização realizada permite, em teoria, uma concentração de açúcares máxima de 61,0 g/L, segundo o modelo representado pelo JMP. Comparando os resultados obtidos com os resultados estimados pelo modelo, é visível que os valores são muito próximos, exceto para os ensaios 3, 9, 12 e 13, que variaram um pouco mais entre os resultados obtidos e os previstos.

Os gráficos *surface plot* para os resultados estimados de concentração de açúcares de Controlo (C_{rs} Ot.) estão representados na Figura 16, Figura 17 e Figura 18.

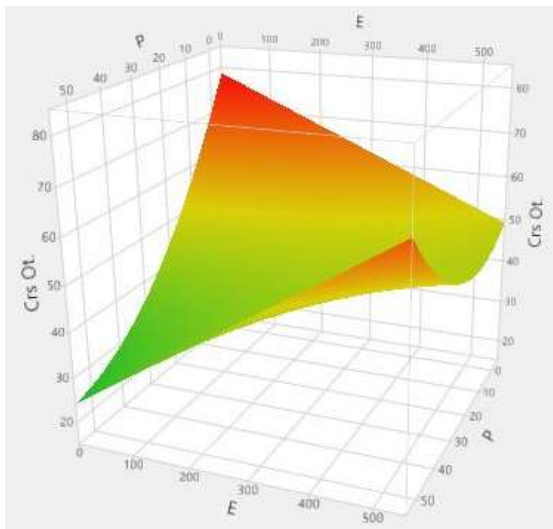


Figura 16 - [P.E] *surface plot* previsto

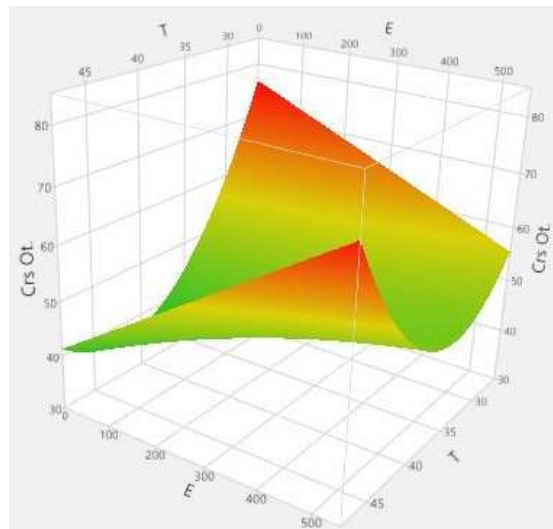


Figura 17 - [T.E] *surface plot* previsto

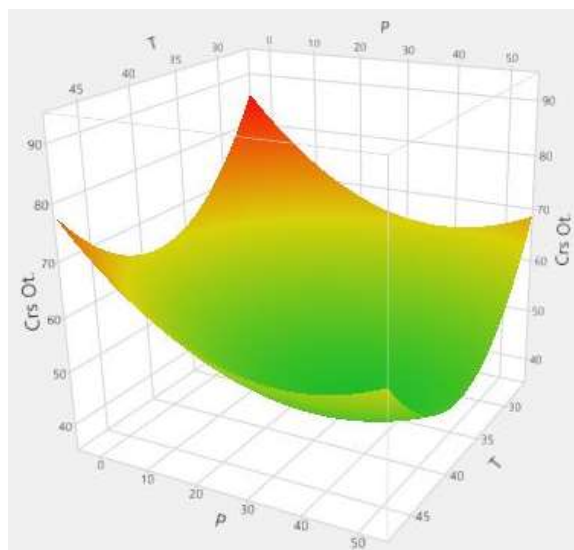


Figura 18 - [T.P] *surface plot* previsto

Analisando o *surface plot* de [P·E] e de [T·E], verifica-se que o modelo indica valores mais elevados de açúcar em pontos semelhantes nos dois gráficos. Para [P·E], observam-se as maiores concentrações de açúcares próximo dos dois extremos (negativo e positivo) de tempo e dose de enzima, com maior concentração a verificar-se no extremo negativo de ambas as variáveis. No *surface plot* [T·E] verifica-se uma tendência idêntica à anterior, mas para valores no limite do planeamento de temperatura e dose de enzima. Relativamente ao *surface plot* de [T·P], os valores mais elevados de C_{rs} situam-se nos dois extremos dos limites da temperatura, mas apenas no extremo negativo de tempo.

Os *surface plots* obtidos neste estudo indicam uma melhor resposta em concentração de açúcar para valores das variáveis em ambos os extremos opostos estabelecidos. Esta

variação é particularmente significativa para as interações da temperatura com a dose de enzima, e do tempo de reação com a dose de enzima, que apresentam melhor rendimento quando os seus valores são próximos dos limites negativos e positivos definidos. O modelo de previsão demonstra C_{rs} mais elevada quando o tempo se aproxima muito de 0 h, o que provavelmente não corresponde à realidade. O mesmo modelo apresenta uma tendência crescente de concentração de açúcar para os limites de valor superior, que aparentemente continuaria a subir se os limites fossem aumentados. Isto verifica-se principalmente para [P-E], fator de interação com maior significância na resposta.

Para se confirmar esta tendência de resultados, ter-se-ia de realizar ensaios experimentais em condições fora dos limites testados neste estudo. A realização de dois planeamentos experimentais em torno dos limites simétricos (-1,-1,-1) e (1,1,1) talvez se revelasse mais conclusiva quanto às condições ótimas para esta biomassa. Uma opção potencialmente viável para outro planeamento, seria também alargar um pouco os limites superiores das variáveis, principalmente para o tempo de hidrólise, visto que a duração de 72 h é empregue frequentemente em estudos, resultando em alta eficiência de sacarificação [100][101].

Possivelmente, em diferentes condições de hidrólise, seria otimizada a conversão a diferentes açúcares redutores, tais como a glicose, xilose e arabinose. Como foram apenas quantificados os açúcares redutores totais, poder-se-ia fazer uma análise específica ao tipo de açúcares obtidos nos hidrolisados, para verificar a influência das condições de operação na libertação de cada tipo de açúcar. Esta análise adicional serviria para melhor entender como otimizar a obtenção de cada monómero de açúcar, que possivelmente não seria igual para as pentoses e para as hexoses.

CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- 5.1 Conclusões
- 5.2 Sugestões de trabalhos futuros

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

5.1 Conclusões

A dependência energética e económica de hidrocarbonetos fósseis, a nível global, originou problemas ambientais, sociais e económicos. A possibilidade de utilizar recursos alternativos mais sustentáveis, como a biomassa, tem sido estudada para cobrir a procura de energia e de outros produtos energéticos. A biomassa é uma matéria-prima que pode ser convertida em biocombustíveis, como o bioetanol que pode ser equiparado à gasolina, reduzindo o consumo de combustíveis de origem fóssil e diminuindo a emissão de gases de efeito de estufa.

O bioetanol tem sido produzido mundialmente a partir de culturas alimentares (cana-de-açúcar, milho, trigo), mas também pode ser sintetizado a partir de biomassa lignocelulósica, reduzindo a competição por solo fértil.

O rápido crescimento económico e industrial também causou outros problemas correntes, como o incremento de poluentes orgânicos e metais pesados no solo. Alguns locais contaminados necessitam de tratamento ambiental, como a fitorremediação, para recuperar o solo.

A planta do milho apresenta, não só, capacidades fitorremediativas, como também elevado potencial para transformação em biocombustíveis. A palha de milho proveniente da fitorremediação constitui uma fonte lignocelulósica viável para a síntese de bioetanol, dando um destino adequado a um resíduo que, de outra forma, seria descartado e não valorizado.

Por estes motivos, o presente estudo pretendeu avaliar a produção de bioetanol a partir de biomassa usada para tratar solos contaminados com metais pesados (Zn e Cd).

A análise composicional dos caules de milho demonstrou alguma variação entre as biomassas produzidas em solos diferentes. Os resultados obtidos foram semelhantes a outros estudos composicionais para este tipo de matéria, exceto para os valores de celulose (cerca de 5-10% de diferença) e de cinzas de Estarreja (21,8%), que divergiram um pouco em relação aos valores comparados. Os valores de carboidratos foram mais elevados nas palhas de Panasqueira (38,2% de carbono orgânico e 32,5% de celulose) e de Controlo (38,0% de carbono orgânico e 27,1% de celulose). Estas palhas apresentaram também, respetivamente, menor teor de lenhina, 18,6 e 20,9%.

Os resultados da hidrólise enzimática demonstraram maiores concentrações de açúcar no hidrolisado obtido a partir da palha de solo não contaminado (Controlo) em relação ao hidrolisado obtido a partir do solo de Estarreja. Esta diferença pode ser devido à

presença de metais na palha do solo de Estarreja, e ao seu efeito durante a hidrólise. No entanto, como os metais não foram quantificados, não é possível concluir sobre a sua interação na obtenção de açúcares. Acresce ainda que, a quantidade de carbono orgânico total e de celulose determinadas na palha do solo de Estarreja também eram menores do que na palha do solo de Controlo, o que pode ajudar a justificar o menor rendimento em açúcares obtido no hidrolisado da palha do solo de Estarreja.

Analisando o planeamento experimental realizado, o valor máximo de açúcares obtido para o hidrolisado do solo de Controlo foi 60,3 g/L, o que corresponde a um rendimento de 760,1 g_{açúcar}/kg_{biomassa}. As condições ótimas obtidas para esta palha foram à temperatura de 32,2 °C, com tempo de contacto de 10,8 h e dose de enzima de 140 µL. A análise dos resultados do planeamento experimental realizada no *JMP* revelou que as maiores concentrações de açúcar foram obtidas quando as variáveis escolhidas se encontravam nos valores próximos dos limites negativos e também dos positivos. O modelo de previsão realizado no *JMP* indicou a concentração máxima teórica de açúcares de 61,0 g/L.

Para a biomassa do solo de Estarreja, a concentração máxima de açúcares obtida foi 34,4 g/L, correspondendo a um rendimento de 388,3 g_{açúcar}/kg_{biomassa}. Os resultados do planeamento experimental no *JMP* foram inconclusivos, com elevada discrepância entre a resposta obtida e a esperada. Não foi possível definir as condições ótimas para esta biomassa. Erros durante a etapa de hidrólise enzimática podem ter provocado esta divergência de resultados.

A palha de milho é um resíduo lignocelulósico promissor para a produção de bioetanol, pela sua abundância global e teor em polímeros de carbono. A palha de milho proveniente de fitorremediação de solos com metais pesados poderá constituir uma fonte sustentável para etanol lignocelulósico, mas é necessária mais informação sobre o efeito dos metais em cada fase do processo. De referir também que a produtividade de palha de milho nos diferentes solos é distinta, tendo sido obtida cerca de 50% de produtividade no solo de Estarreja, comparativamente ao solo de Controlo, o que reduz ainda mais a produtividade específica em açúcares obtidos a partir de biomassa produzida neste tipo de solos.

5.2 Sugestões de trabalhos futuros

Para trabalhos futuros, é sugerida a análise a metais pesados em cada fase do processo de produção de bioetanol, para melhor avaliar o efeito dos metais em cada uma das etapas de produção: na biomassa inicial, após pré-tratamento, após hidrólise e após fermentação. Também a análise a compostos presentes no hidrolisado após o pré-tratamento seria pertinente, uma vez que podem ser potenciais inibidores da etapa de fermentação e interferir na produtividade das leveduras.

Para confirmar a tendência da concentração de açúcares obtida em função das variáveis, um planeamento experimental localizado próximo dos limites negativos e positivos definidos poderia demonstrar maior certeza quanto às condições ótimas para a

biomassa analisada. Outra opção seria aumentar um pouco os limites superiores das variáveis, principalmente para o tempo de hidrólise, visto que a duração de 72 h é empregue frequentemente, com elevadas taxas de eficácia de hidrólise.

Também seria interessante fazer um estudo económico da globalidade do processo desde a recolha da biomassa contaminada, durante a sequência de produção, até ao produto final e ao seu valor de mercado. Porque, apesar do uso de resíduos de fitorremediação ser uma prática mais sustentável do uso de recursos, o processo geral de conversão em bioetanol pode não se revelar viável. Os custos das condições de pré-tratamento, hidrólise, fermentação e recuperação do bioetanol podem ser elevados e uma avaliação mais detalhada seria precisa para entender se o produto final seria economicamente interessante, quando comparada à restante metodologia necessária na sua síntese e respetivos custos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.1 NORMAS

6.2 LEGISLAÇÃO

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. Pandey, C. Larroche, S. Ricke, C.-G. Dussap, e E. Gnansounou, «Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes», 2011.
- [2] «Mais de 100 estudos confirmam que políticas de biocombustíveis aumentam preços dos alimentos – ZERO», 2017. [Em linha]. Disponível em: <https://zero.org/mais-de-100-estudos-confirmam-que-politicas-de-biocombustiveis-aumentam-precos-dos-alimentos/>. [Acedido: 27-Jan-2020].
- [3] S. Sharma, A. Kundu, S. Basu, N. P. Shetti, e T. M. Aminabhavi, «Sustainable environmental management and related biofuel technologies», *J. Environ. Manage.*, vol. 273, p. 111096, 2020.
- [4] F. Cherubini, «The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals», *Energy Convers. Manag.*, vol. 51, n. 7, pp. 1412–1421, Jul. 2010.
- [5] S. K. Khare e C. Larroche, «Current perspectives in enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass», *Biochem. Eng. J.*, vol. 102, pp. 38–44, Out. 2015.
- [6] «Bioethanol – European Biomass Industry Association». [Em linha]. Disponível em: <https://www.eubia.org/cms/wiki-biomass/biofuels/bioethanol/>. [Acedido: 17-Out-2020].
- [7] M. Morales, J. Quintero, R. Conejeros, e G. Aroca, «Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance», *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 42, pp. 1349–1361, 2015.
- [8] A. Ullah, H. Mushtaq, H. Ali, M. F. H. Munis, M. T. Javed, e H. J. Chaudhary, «Diazotrophs-assisted phytoremediation of heavy metals: a novel approach», *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 22, n. 4, pp. 2505–2514, 2015.
- [9] S. Eskander e H. E.-D. Saleh, «Phytoremediation: An Overview», 2017, pp. 124–161.
- [10] IEA, «IEA Bioenergy Task 42», *Biorefineries: co-production of fuels, chemicals, power and materials from biomass*, 2007. [Em linha]. Disponível em: <https://www.iea-bioenergy.task42-biorefineries.com/en/ieabiorefinery.htm>. [Acedido: 29-Jan-2020].
- [11] D. Yaqoob, H. Nasim, A. Sumreen, N. Munawar, M. Zia, e M. Choudhary, «Current scenario of phytoremediation: progresses and limitations», 2019.
- [12] N. AHALYA e T. V Ramachandra, «PHYTOREMEDIATION: PROCESSES AND MECHANISMS», vol. 18, 2004.
- [13] I. Alkorta, J. Becerril, e C. Garbisu, «Phytostabilization of Metal Contaminated Soils», *Rev. Environ. Health*, vol. 25, pp. 135–146, 2010.
- [14] S. C. McCutcheon e S. E. Jørgensen, «Phytoremediation», *Encycl. Ecol.*, pp. 2751–2766, Jan. 2008.
- [15] «UNEP in 2002: Annual Report», 2002.
- [16] H. Morikawa e Ö. C. Erkin, «Basic processes in phytoremediation and some applications to air pollution control», *Chemosphere*, vol. 52, n. 9, pp. 1553–1558, Set. 2003.

- [17] R. Dixit *et al.*, «Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes», *Sustainability*, vol. 2015, pp. 2189–2212, 2015.
- [18] BAKER e A. J. M., «Metal hyperaccumulator plants : A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils», *Phytoremediation Contam. Soil Water*, 2000.
- [19] K. R. Hakeem *et al.*, «Phytoremediation: A Promising Strategy on the Crossroads of Remediation», *Soil Remediat. Plants*, pp. 63–84, Jan. 2015.
- [20] T. Chaudhry, W. J. Hayes, A. G. Khan, e C. Khoo, «Phytoremediation - Focusing on accumulator plants that remediate metal contaminated soils», *Australas. J. Ecotoxicol.*, vol. 4, pp. 37–51, 1998.
- [21] S. H. Bokhari, I. Ahmad, M. Mahmood-Ul-Hassan, e A. Mohammad, «Phytoremediation potential of *Lemna minor* L. for heavy metals.», *Int. J. Phytoremediation*, vol. 18, n. 1, pp. 25–32, 2016.
- [22] D. E. Salt, R. D. Smith, e I. Raskin, «PHYTOREMEDIATION.», *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 49, pp. 643–668, Jun. 1998.
- [23] S. Dushenkov, «Trends in phytoremediation of radionuclides», *Plant Soil*, vol. 249, n. 1, pp. 167–175, 2003.
- [24] A. G. L. Assunção, H. Schat, e M. G. M. Aarts, «*Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants», *New Phytol.*, vol. 159, n. 2, pp. 351–360, 2003.
- [25] J. HERNÁNDEZ-ALLICA *et al.*, «Synthesis of low molecular weight thiols in response to Cd exposure in *Thlaspi caerulescens*», *Plant. Cell Environ.*, vol. 29, n. 7, pp. 1422–1429, 2006.
- [26] U. Schmidt, «Enhancing phytoextraction: the effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals.», *J. Environ. Qual.*, vol. 32, n. 6, pp. 1939–1954, 2003.
- [27] E. Meers *et al.*, «The use of bio-energy crops (*Zea mays*) for ‘phytoattenuation’ of heavy metals on moderately contaminated soils: A field experiment», *Chemosphere*, vol. 78, n. 1, pp. 35–41, Jan. 2010.
- [28] E. Meers, A. Ruttens, M. Hopgood, E. Lesage, e F. M. G. Tack, «Potential of *Brassica rapa*, *Cannabis sativa*, *Helianthus annuus* and *Zea mays* for phytoextraction of heavy metals from calcareous dredged sediment derived soils», *Chemosphere*, vol. 61, n. 4, pp. 561–572, Out. 2005.
- [29] R. Ruan *et al.*, «Biofuels: Introduction», *Biofuels Altern. Feed. Convers. Process. Prod. Liq. Gaseous Biofuels*, pp. 3–43, Jan. 2019.
- [30] C. R. Soccol, V. Faraco, S. G. Karp, L. P. S. Vandenberghe, V. Thomaz-Soccol, e A. L. Woiciechowski, «Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Future Perspectives», *Biofuels Altern. Feed. Convers. Process. Prod. Liq. Gaseous Biofuels*, pp. 331–354, Jan. 2019.
- [31] M. S. Singhvi e D. V Gokhale, «Lignocellulosic biomass: Hurdles and challenges in its valorization», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 103, n. 23, pp. 9305–9320, 2019.
- [32] P. D. Ahindra Nag, *Biofuels Refining and Performance*. New York: McGraw-Hill Education, 2008.
- [33] C. Jensen, J. Rodriguez Guerrero, S. Karatzos, G. Olofsson, e S. Iversen, «Fundamentals of Hydrofaction™: Renewable crude oil from woody biomass», *Biomass Convers. Biorefinery*, 2017.

- [34] P. Kumar, D. Barrett, M. Delwiche, e P. Stroeve, «Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production», *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 48, pp. 3713–3729, 2009.
- [35] J. Scherer e D. Mestrado, «CARACTERIZAÇÃO MECÂNICA DE COMPÓSITOS COM FIBRAS DE TAQUARA-LIXA (*Merostachys* sp.) E RESINA EPÓXI», 2014.
- [36] M. Smuga-Kogut, K. Zgórska, e D. Szymanowska-Powafowska, «Influence of the crystalline structure of cellulose on the production of ethanol from lignocellulose biomass», *Int. Agrophysics*, vol. 30, n. 1, pp. 83–88, 2016.
- [37] R.-C. Sun e F. Xu, «Structure, Ultrastructure, and Chemical Composition», *Cereal Straw as a Resour. Sustain. Biomater. Biofuels*, pp. 9–47, Jan. 2010.
- [38] N. Mosier *et al.*, «Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass», *Bioresour. Technol.*, vol. 96, n. 6, pp. 673–686, 2005.
- [39] Z. Ruan, X. Wang, Y. Liu, e W. Liao, «Chapter 3 - Corn», Z. Pan, R. Zhang, e S. B. T.-I. P. T. for F. and A. B.-P. Zicari, Eds. Academic Press, 2019, pp. 59–72.
- [40] H. B. Aditiya, T. M. I. Mahlia, W. T. Chong, H. Nur, e A. H. Sebayang, «Second generation bioethanol production: A critical review», *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 66, pp. 631–653, Dez. 2016.
- [41] «Annual Ethanol Production | Renewable Fuels Association». [Em linha]. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>. [Acedido: 04-Mar-2020].
- [42] S. B. Bob Flach, Sabine Lieberz, «Biofuels Annual», 2019.
- [43] J. Tomei e R. Helliwell, «Food versus fuel? Going beyond biofuels», *Land use policy*, vol. 56, pp. 320–326, Nov. 2016.
- [44] G. Monbiot, «Feeding Cars, Not People», *The Guardian*, 23-Nov-2004.
- [45] G. Monbiot, «An Agricultural Crime against Humanity», *The Guardian*, 06-Nov-2007.
- [46] G. Monbiot, «Hunger Games», *The Guardian*, 14-Ago-2012.
- [47] L. R. Brown, *Plan B 4.0: Mobilising to Save Civilisation*. W. W. Norton & Company, 2009.
- [48] C. Gamborg, K. Millar, O. Shortall, e P. Sandøe, «Bioenergy and Land Use: Framing the Ethical Debate», *J. Agric. Environ. Ethics*, vol. 25, n. 6, pp. 909–925, 2012.
- [49] J. H. Spangenberg, «Biomass or Biomess? The promises and Limits of Bioenergy», em *Sustainable Energy Production and Consumption*, 2008, pp. 55–65.
- [50] T. Searchinger *et al.*, «Use of U.S. Croplands for Biofuels Increases Greenhouse Gases Through Emissions from Land-Use Change», *Science (80-.)*, vol. 319, n. 5867, pp. 1238–1240, 2008.
- [51] B. A. Kretschmer B., Bowyer C., «EU Biofuel Use and Agricultural Commodity Prices: A Review of the Evidence Base». Institute for European Environmental Policy (IEEP), London, 2012.
- [52] W. Zhang, E. A. Yu, S. Rozelle, J. Yang, e S. Msangi, «The impact of biofuel growth on agriculture: Why is the range of estimates so wide?», *Food Policy*, vol. 38, pp. 227–239, Fev. 2013.
- [53] H. De Gorter, D. Drabik, e D. R. Just, *The economics of biofuel policies : impacts on price volatility in grain and oilseed markets. Palgrave Studies in Agricultural Economics and Food Policy*. New York: Palgrave Macmillan, 2015.
- [54] J. D. McMillan, «Pretreatment of Lignocellulosic Biomass», em *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, vol. 566, American Chemical Society, 1994, pp. 15–292.

- [55] Y. Sun e J. Cheng, «Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review», *Bioresour. Technol.*, vol. 83, n. 1, pp. 1–11, Mai. 2002.
- [56] K. L. Mackie, H. H. Brownell, K. L. West, e J. N. Saddler, «Effect of Sulphur Dioxide and Sulphuric Acid on Steam Explosion of Aspenwood», *J. Wood Chem. Technol.*, vol. 5, n. 3, pp. 405–425, 1985.
- [57] J. Singh, M. Suhag, e A. Dhaka, «Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review», *Carbohydr. Polym.*, vol. 117, pp. 624–631, 2015.
- [58] X. B. Lu, Y. M. Zhang, J. Yang, e Y. Liang, «Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover after Pretreatment with Dilute Sulfuric Acid», *Chem. Eng. Technol.*, vol. 30, pp. 938–944, 2007.
- [59] A. M. Azzam, «Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation», *J. Environ. Sci. Heal. Part B*, vol. 24, n. 4, pp. 421–433, 1989.
- [60] H. L. Chum *et al.*, «Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars: I. Enzyme hydrolysis of cellulosic residues.», *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 31, n. 7, pp. 643–649, Mai. 1988.
- [61] M. Taherzadeh e K. Karimi, «Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review», *BioResources*, vol. 2, 2007.
- [62] J. D. Broder, J. W. Barrier, K. P. Lee, e M. M. Bulls, «Biofuels system economics», *World Resour. Rev.*, vol. 7, n. 4, pp. 560–569, 1995.
- [63] M. J. Taherzadeh e C. Niklasson, «Ethanol from Lignocellulosic Materials: Pretreatment, Acid and Enzymatic Hydrolyses, and Fermentation», em *Lignocellulose Biodegradation*, vol. 889, American Chemical Society, 2004, pp. 49–68.
- [64] A. Verardi, I. De Bari, E. Ricca, e V. Calabrò, «Hydrolysis of lignocellulosic biomass: Current status of processes and technologies and future perspectives», *Bioethanol*, pp. 95–122, 2012.
- [65] M. Galbe e G. Zacchi, «A review of the production of ethanol from softwood», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 59, pp. 618–628, 2002.
- [66] P. Lenihan, A. Orozco, E. O'Neill, M. Ahmad, D. Rooney, e G. Walker, «Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass», *Chem. Eng. J.*, vol. 156, pp. 395–403, 2010.
- [67] J. Iranmahboob, F. Nadim, e S. Monemi, «Optimizing acid-hydrolysis: A critical step for production of ethanol from mixed wood chips», *Biomass and Bioenergy*, vol. 22, pp. 401–404, 2002.
- [68] N. D. Hinman, D. J. Schell, J. Riley, P. W. Bergeron, e P. J. Walter, «Preliminary estimate of the cost of ethanol production for ssf technology», *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 34, n. 1, p. 639, 1992.
- [69] I. Romero, M. Moya, S. Sánchez, E. Ruiz, E. Castro, e V. Bravo, «Ethanol fermentation of phosphoric acid hydrolysates from olive tree pruning», *Ind. Crops Prod.*, vol. 25, n. 2, pp. 160–168, Fev. 2007.
- [70] C. N. Hamelinck, G. van Hooijdonk, e A. P. Faaij, «Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term», *Biomass and Bioenergy*, vol. 28, n. 4, pp. 384–410, Abr. 2005.
- [71] M. E. Himmel, Q. Xu, Y. Luo, S.-Y. Ding, R. Lamed, e E. A. Bayer, «Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms», *Biofuels*, vol. 1, n. 2, pp. 323–341, 2010.

- [72] P. Biely, «Xylanolytic enzymes», em *Handbook of Food Enzymology*, J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen, e D. W. S. Wong, Eds. Nova Iorque: Marcel Dekker Inc., 2003, pp. 879–916.
- [73] H. Jørgensen, J. P. Kutter, e L. Olsson, «Separation and quantification of cellulases and hemicellulases by capillary electrophoresis», *Anal. Biochem.*, vol. 317, n. 1, pp. 85–93, Jun. 2003.
- [74] M. Rabinovich, M. Melnik, e A. Bolobova, «Dedicated to the memory of I.V. Berezin and R.V. Feniksova Microbial Cellulases (Review)», *Appl. Biochem. Microbiol.*, vol. 38, pp. 305–322, 2002.
- [75] M. Taherzadeh e K. Karimi, «Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. BioResources», *BioResources*, vol. 2, 2007.
- [76] L. Olsson e B. Hahn-Hägerdal, «Fermentation of lignocellulosic hydrolyates for ethanol production», *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 18, pp. 312–331, 1996.
- [77] C. Tengborg, M. Galbe, e G. Zacchi, «Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood.», *Biotechnol. Prog.*, vol. 17, n. 1, pp. 110–117, 2001.
- [78] C. E. Wyman, B. E. Dale, R. T. Elander, M. Holtzapple, M. R. Ladisch, e Y. Y. Lee, «Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies», *Bioresour. Technol.*, vol. 96, n. 18, pp. 1959–1966, Dez. 2005.
- [79] N. S. Mosier, C. M. Ladisch, e M. R. Ladisch, «Characterization of acid catalytic domains for cellulose hydrolysis and glucose degradation.», *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 79, n. 6, pp. 610–618, Set. 2002.
- [80] S. Ferreira, A. P. Duarte, M. H. L. Ribeiro, J. A. Queiroz, e F. C. Domingues, «Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production», *Biochem. Eng. J.*, vol. 45, n. 3, pp. 192–200, Ago. 2009.
- [81] N. Kosaric, A. Wleczorek, G. P. Cosentino, R. J. Magee, e J. E. Prenosil, «Ethanol fermentation», *Biotechnology*, vol. 3, pp. 257–386, 1983.
- [82] T. Brandberg, «Fermentation of undetoxified dilute acid lignocellulose hydrolysate for fuel ethanol production», *Doktorsavhandlingar vid Chalmers Tek. Högsk.*, 2005.
- [83] M. Sonderegger *et al.*, «Fermentation performance of engineered and evolved xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains.», *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 87, n. 1, pp. 90–98, Jul. 2004.
- [84] T. W. Jeffries, «Engineering yeasts for xylose metabolism.», *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 17, n. 3, pp. 320–326, Jun. 2006.
- [85] L. Olsson, H. R. Soerensen, B. P. Dam, H. Christensen, K. M. Krogh, e A. S. Meyer, «Separate and Simultaneous Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Wheat Hemicellulose With Recombinant Xylose Utilizing *Saccharomyces cerevisiae*», em *Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, J. D. McMillan, W. S. Adney, J. R. Mielenz, e K. T. Klasson, Eds. Totowa, NJ: Humana Press, 2006, pp. 117–129.
- [86] B. C. Saha, L. B. Iten, M. A. Cotta, e Y. V. Wu, «Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol», *Biotechnol. Prog.*, vol. 21, n. 3, pp. 816–822, 2005.
- [87] J. Soderstrom, L. Pilcher, M. Galbe, e G. Zacchi, «Combined use of H₂SO₄ and SO₂ impregnation for steam pretreatment of spruce in ethanol production.», *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 105–108, pp. 127–140, 2003.

- [88] A. Wingren, M. Galbe, e G. Zacchi, «Techno-Economic Evaluation of Producing Ethanol from Softwood: Comparison of SSF and SHF and Identification of Bottlenecks», *Biotechnol. Prog.*, vol. 19, n. 4, pp. 1109–1117, 2003.
- [89] G. P. (National R. E. L. Philippidis Golden, CO.) e T. K. Smith, «Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol», *Applied biochemistry and biotechnology (USA)*, vol. v. 51/52. .
- [90] G. P. Philippidis, T. K. Smith, e C. E. Wyman, «Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process.», *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 41, n. 9, pp. 846–853, Abr. 1993.
- [91] S. Hari Krishna, T. Janardhan Reddy, e G. V. Chowdary, «Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast», *Bioresour. Technol.*, vol. 77, n. 2, pp. 193–196, Abr. 2001.
- [92] L. P. Huang, B. Jin, P. Lant, e J. Zhou, «Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*», *Biochem. Eng. J.*, vol. 23, n. 3, pp. 265–276, Mai. 2005.
- [93] C. E. Wyman, *Handbook on bioethanol : production and utilization*. Washington, DC: Taylor & Francis, 1996.
- [94] S. Mussatto e J. Teixeira, «Lignocellulose as raw material in fermentation processes», em *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, vol. 2, 2010, pp. 897–907.
- [95] S. H. Mohd Azhar *et al.*, «Yeasts in sustainable bioethanol production: A review», *Biochem. Biophys. Reports*, vol. 10, pp. 52–61, Jul. 2017.
- [96] A. Singh, S. Bajar, e N. R. Bishnoi, «Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture», *Fuel*, vol. 116, pp. 699–702, 2014.
- [97] A. Sues, R. Millati, L. Edebo, e M. J. Taherzadeh, «Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*.», *FEMS Yeast Res.*, vol. 5, n. 6–7, pp. 669–676, Abr. 2005.
- [98] K. Karimi, T. Brandberg, L. Edebo, e M. J. Taherzadeh, «Fed-batch Cultivation of *Mucor indicus* in Dilute-acid Lignocellulosic Hydrolyzate for Ethanol Production», *Biotechnol. Lett.*, vol. 27, n. 18, pp. 1395–1400, 2005.
- [99] R. Smith e M. Jobson, «DISTILLATION», *Encycl. Sep. Sci.*, pp. 84–103, Jan. 2000.
- [100] Q. Liu *et al.*, «Pretreatment of corn stover for sugar production using a two-stage dilute acid followed by wet-milling pretreatment process», *Bioresour. Technol.*, vol. 211, pp. 435–442, Jul. 2016.
- [101] I. Kim, B. Lee, J.-Y. Park, S.-A. Choi, e J.-I. Han, «Effect of nitric acid on pretreatment and fermentation for enhancing ethanol production of rice straw», *Carbohydr. Polym.*, vol. 99, pp. 563–567, 2014.
- [102] M. H. Santos, «Produção de bioetanol a partir de resíduos de plantas usadas em fitorremediação de solos contaminados com metais pesados», Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2019.
- [103] A. L. Merrill e B. K. Watt, *Energy Value of Foods: Basis and Derivation. Agriculture Handbook No. 74*. Washington, DC: ARS United States Department of Agriculture.
- [104] M. Pérez-Boada *et al.*, «Enzymatic degradation of Elephant grass (*Pennisetum purpureum*) stems: Influence of the pith and bark in the total hydrolysis», *Bioresour. Technol.*, vol. 167, pp. 469–475, 2014.

- [105] R. Hu, L. Lin, T. Liu, P. Ouyang, B. He, e S. Liu, «Reducing Sugar Content in Hemicellulose Hydrolysate by DNS Method: A Revisit», *J. Biobased Mater. Bioenergy*, vol. 2, pp. 156–161, Jun. 2008.
- [106] Z. Li, H. Zhai, Y. Zhang, e L. Yu, «Cell morphology and chemical characteristics of corn stover fractions», *Ind. Crops Prod.*, vol. 37, n. 1, pp. 130–136, 2012.
- [107] D. Wojcieszak *et al.*, «Chemical composition of maize stover fraction versus methane yield and energy value in fermentation process», *Energy*, vol. 198, p. 117258, 2020.
- [108] C. Marks, A. König, A. Mitsos, e J. Viell, «Minimal viable sugar yield of biomass pretreatment», *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, vol. 14, n. 2, pp. 301–314, Mar. 2020.

6.1 Normas

EN 14774-3, *Solid biofuels - Determination of moisture content - Oven dry method - Part 3: Moisture in general analysis sample*

EN 14775:2009, *Solid biofuels - Determination of ash content*

NP EN ISO 6865:2009 - *Alimentos para animais - Determinação do teor de celulose bruta - Método com filtração intermédia*

TAPPI T222 om-02 - *Acid Insoluble Lignin in wood and pulp*

NREL LAP-004 - *Determination of Acid-Soluble Lignin in Biomass*

6.2 Legislação

Diretiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia, de 23 de abril de 2009. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 140, 05/06/2009

Diretiva UE 2019/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia, de 11 de dezembro de 2018. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 328, 21/12/2018

Decreto-Lei n.º 162/2019 de 25 de outubro. *Diário da República n.º 206/2019 - I Série*
Presidência do Conselho de Ministros

ANEXOS

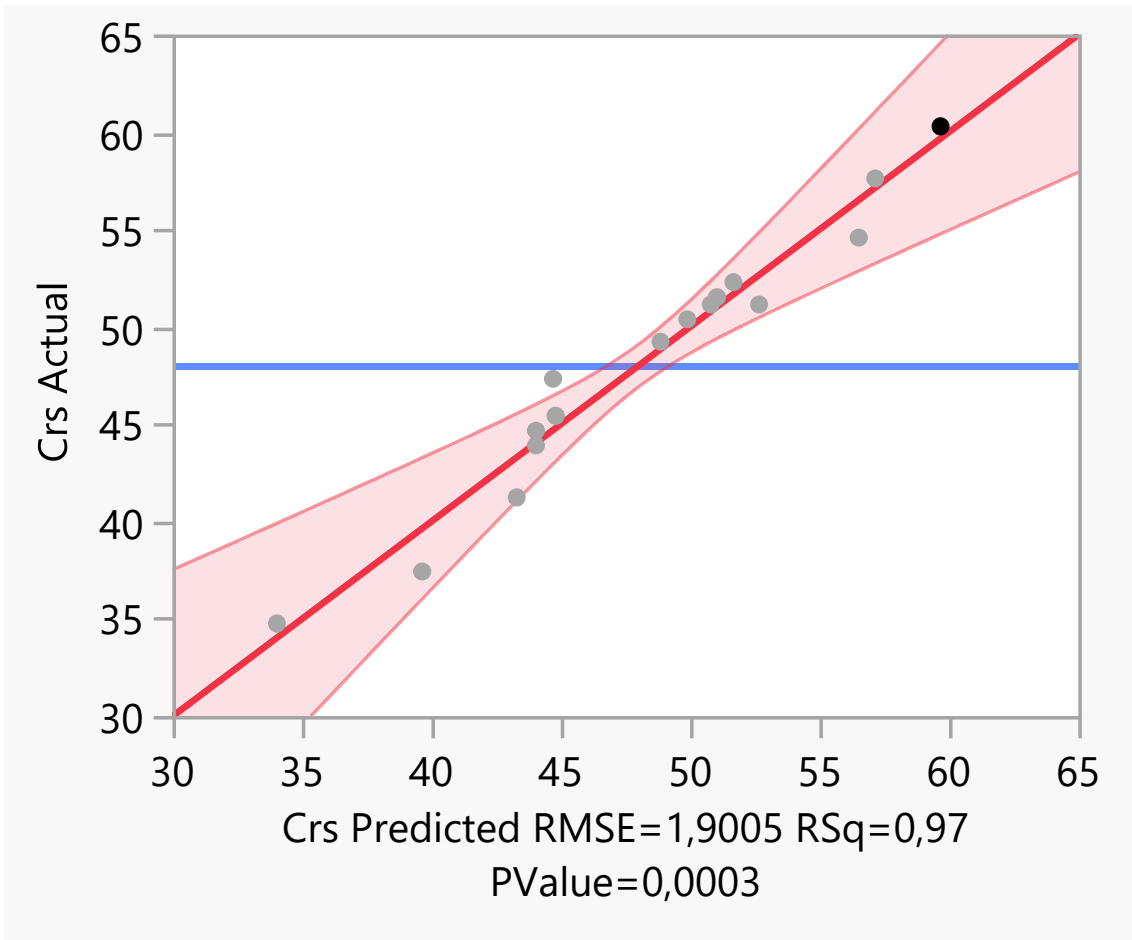
7.1 ANEXO 1

7.2 ANEXO 2

7 ANEXOS

7.1 Anexo 1 – Fit Model (Controlo)

Actual by Predicted Plot



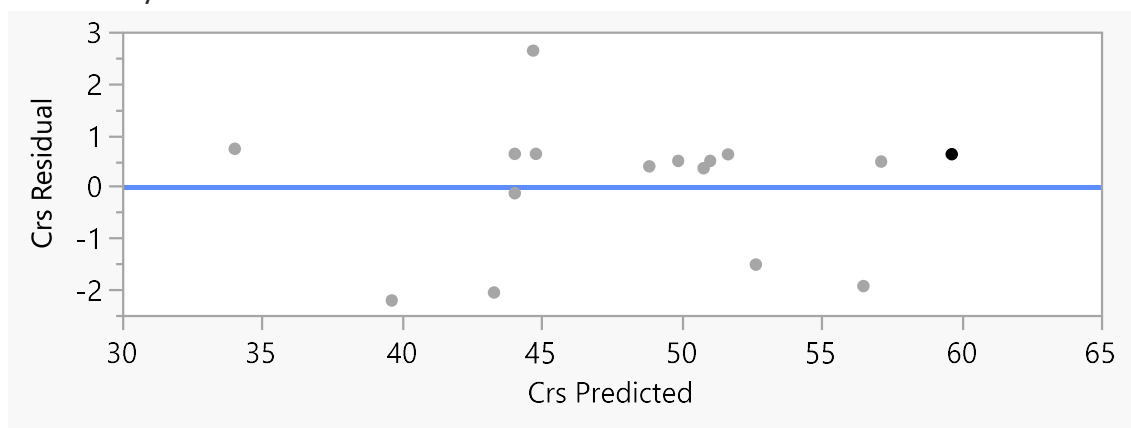
Effect Summary

Source	LogWorth		PValue
P(10,8,37,2)	4,055	[Bar chart]	0,00009
T*T	3,283	[Bar chart]	0,00052
P*E	3,246	[Bar chart]	0,00057
T*E	2,498	[Bar chart]	0,00317
P*P	2,221	[Bar chart]	0,00601
T(32,2,41,8)	1,895	[Bar chart]	0,01273 ^
E(140,410)	1,698	[Bar chart]	0,02006 ^
E*E	0,537	[Bar chart]	0,29069
T*P	0,451	[Bar chart]	0,35402

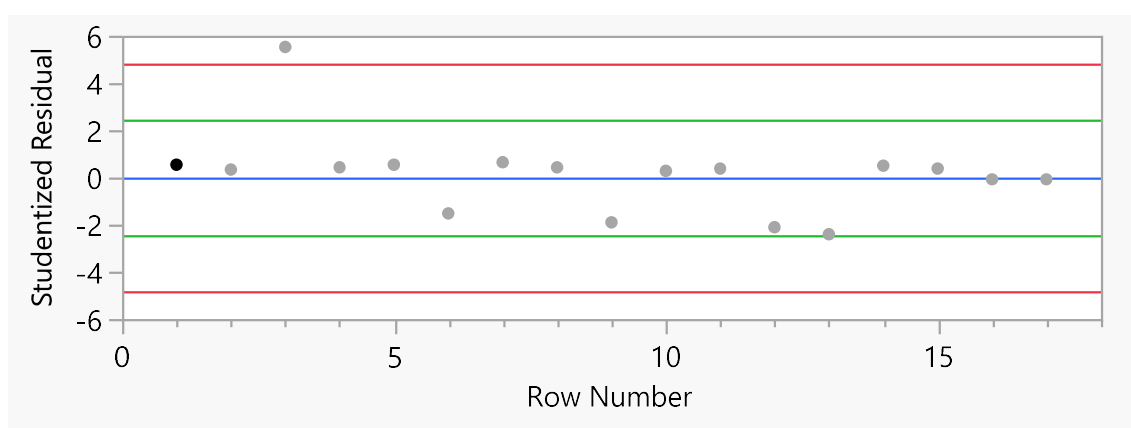
Lack of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	5	24,895093	4,97902	25,6576
Pure Error	2	0,388113	0,19406	Prob > F
Total Error	7	25,283206		0,0379*
				Max RSq
				0,9995

Residual by Predicted Plot



Studentized Residuals



Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	44,040767	1,093758	40,27	<,0001*
T(32,2,41,8)	-1,714186	0,516015	-3,32	0,0127*
P(10,8,37,2)	-4,15042	0,516015	-8,04	<,0001*
E(140,410)	1,5459479	0,516015	3,00	0,0201*
T*P	-0,666875	0,671927	-0,99	0,3540
T*E	2,953375	0,671927	4,40	0,0032*
P*E	4,001625	0,671927	5,96	0,0006*
T*T	3,4552406	0,572032	6,04	0,0005*
P*P	2,2226406	0,572032	3,89	0,0060*
E*E	-0,653726	0,572032	-1,14	0,2907

Effect Tests

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	44,040767	1,093758	40,27	<,0001*
T(32,2,41,8)	-1,714186	0,516015	-3,32	0,0127*
P(10,8,37,2)	-4,15042	0,516015	-8,04	<,0001*
E(140,410)	1,5459479	0,516015	3,00	0,0201*
T*P	-0,666875	0,671927	-0,99	0,3540
T*E	2,953375	0,671927	4,40	0,0032*
P*E	4,001625	0,671927	5,96	0,0006*
T*T	3,4552406	0,572032	6,04	0,0005*
P*P	2,2226406	0,572032	3,89	0,0060*
E*E	-0,653726	0,572032	-1,14	0,2907

Response Surface

	T(32,2,41,8)	P(10,8,37,2)	E(140,410)	Crs
T(32,2,41,8)	3,4552406	-0,666875	2,953375	-1,714186
P(10,8,37,2)	.	2,2226406	4,001625	-4,15042
E(140,410)	.	.	-0,653726	1,5459479

Solution

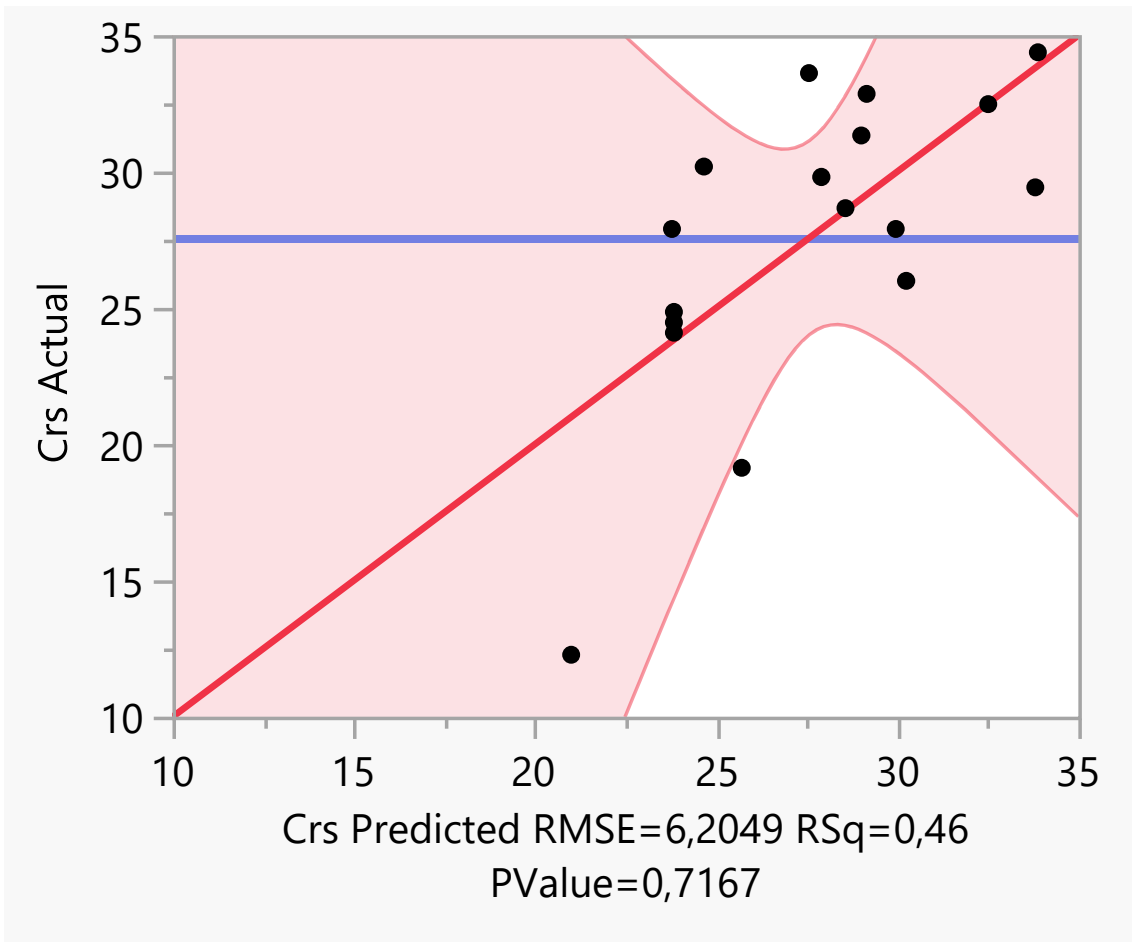
Variable	Critical Value
T(32,2,41,8)	36,23956
P(10,8,37,2)	24,589298
E(140,410)	404,76046

Canonical Curvature

Eigenvalue	4,0174	3,0772	-2,0705
T(32,2,41,8)	0,87482	-0,41030	-0,25758
P(10,8,37,2)	0,27899	0,86136	-0,42453
E(140,410)	0,39606	0,29953	0,86800

7.2 Anexo 2 – Fit Model (Estarreja)

Actual by Predicted Plot



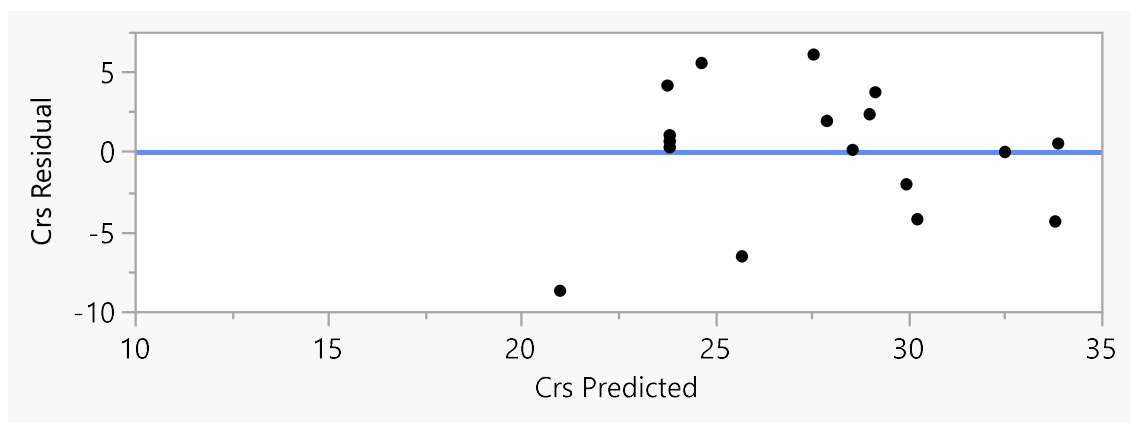
Effect Summary

Source	LogWorth		PValue	
T*T	0,798		0,15909	
E(140,410)	0,657		0,22019	
P*P	0,331		0,46708	
P(10,8,37,2)	0,324		0,47403	^
T(32,2,41,8)	0,263		0,54627	^
P*E	0,199		0,63276	
T*E	0,179		0,66216	
T*P	0,105		0,78590	
E*E	0,065		0,86054	

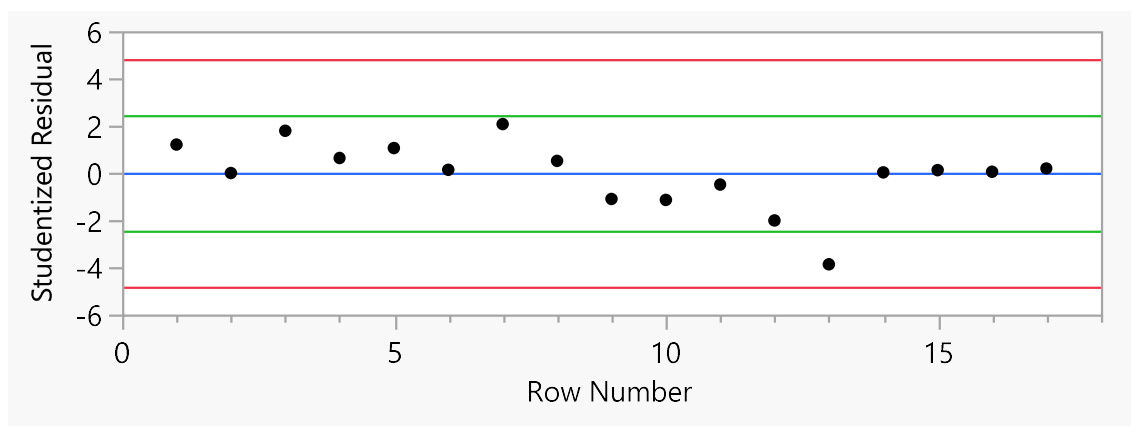
Lack of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	5	269,21868	53,8437	369,9524
Pure Error	2	0,29108	0,1455	Prob > F
Total Error	7	269,50976		0,0027*
				Max RSq
				0,9994

Residual by Predicted Plot



Studentized Residuals



Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	23,839244	3,57102	6,68	0,0003*
T(32,2,41,8)	1,0680215	1,684743	0,63	0,5463
P(10,8,37,2)	-1,27451	1,684743	-0,76	0,4740
E(140,410)	2,2680778	1,684743	1,35	0,2202
T*P	-0,61925	2,193781	-0,28	0,7859
T*E	-1,0005	2,193781	-0,46	0,6622
P*E	-1,09575	2,193781	-0,50	0,6328
T*T	2,9429033	1,867632	1,58	0,1591
P*P	1,4360727	1,867632	0,77	0,4671
E*E	0,3404083	1,867632	0,18	0,8605

Effect Tests

Source	Nparm	DF	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
T(32,2,41,8)	1	1	15,472801	0,4019	0,5463
P(10,8,37,2)	1	1	22,034114	0,5723	0,4740
E(140,410)	1	1	69,779013	1,8124	0,2202
T*P	1	1	3,067765	0,0797	0,7859
T*E	1	1	8,008002	0,2080	0,6622
P*E	1	1	9,605345	0,2495	0,6328
T*T	1	1	95,597332	2,4830	0,1591
P*P	1	1	22,763899	0,5912	0,4671
E*E	1	1	1,279069	0,0332	0,8605

Response Surface

	T(32,2,41,8)	P(10,8,37,2)	E(140,410)	Crs
T(32,2,41,8)	2,9429033	-0,61925	-1,0005	1,0680215
P(10,8,37,2)	.	1,4360727	-1,09575	-1,27451
E(140,410)	.	.	0,3404083	2,2680778

Solution

Variable	Critical Value
T(32,2,41,8)	681,14738
P(10,8,37,2)	3558,2858
E(140,410)	84624,603

Canonical Curvature

Eigenvalue	3,0636	1,6571	-0,0013
T(32,2,41,8)	0,97903	0,06275	0,19383
P(10,8,37,2)	-0,13484	0,91276	0,38560
E(140,410)	-0,15272	-0,40365	0,90208