

## **Agradecimentos**

À Doutora Nídia Caetano, que tão generosamente me concedeu a sua maior disponibilidade, orientação e compreensão ao longo de todo o meu trabalho. Nunca esquecerei que altruistamente, dedicou uma grande parte das suas merecidas férias e descanso vindo até ao laboratório aonde tanta ajuda me ofereceu.

Às engenheiras do laboratório Paula Capeto, Magda e à D. Lurdes por toda a paciência, persistência, motivação e força de incentivo que sempre me demonstraram e a quem serei sempre grata.

Sem toda esta ajuda, tudo seria infinitamente mais difícil.

A toda a minha família especialmente à minha mãe que tanto me apoiou, às vezes doente, abdicava da minha ajuda para que tivesse mais tempo para me dedicar aos estudos.

A todos os meus amigos e ao meu namorado que sempre me ajudou e foi sempre um ombro amigo.

A todos o Meu Obrigada.

Sara Soares



## Resumo

Este trabalho teve como objectivo produzir bioetanol a partir de um resíduo orgânico proveniente da central de compostagem da LIPOR. A escolha do referido resíduo surgiu como possibilidade de valorizar este produto, caso fosse uma alternativa mais interessante para o escoamento do mesmo.

O procedimento experimental envolveu distintas etapas, tais como, trituração da matéria-prima, pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação dos açúcares e determinação da conversão dos açúcares a etanol por fermentação.

Para a optimização do pré-tratamento, a amostra foi submetida a quatro tratamentos prévios distintos: hidrólise ácida, hidrólise alcalina, organosolv e hidrotermólise. A hidrotermólise foi estudada sob duas condições operatórias de pressão (16 bar e atmosférica). A partir da análise dos resultados obtidos concluiu-se que a hidrólise alcalina é o processo que resultou numa maior capacidade de produção de glucose (89,2%). As condições utilizadas neste processo foram 200 mL de uma solução hidróxido de sódio a 10% para 20 g de biomassa, à pressão de 2 bar, a uma temperatura de 124 °C e um tempo de contacto de 6 minutos.

Para a optimização da hidrólise, desenvolveu-se um planeamento factorial  $2^2$ , ou seja, com dois níveis e dois factores, realizando-se duas réplicas nos vértices e três réplicas no centro, com vista a optimizar as condições experimentais: temperatura e razão volume de enzima/quantidade de biomassa, que conduziram à maior concentração de açúcares totais, e consequentemente à maior produção de etanol. Para isso realizaram-se no total 11 ensaios, dos quais 8 correspondem a condições nos vértices e 3 no centro. A análise dos açúcares foi efectuada a partir de 3 técnicas analíticas: refractometria, espectrofotometria UV-Vis e HPLC.

Pela análise dos resultados do planeamento, conclui-se que se enquadrou o óptimo. As melhores condições usadas foram respectivamente: temperatura = 65 °C e razão volume de enzima/quantidade de biomassa 5 mL/100 g. Estas condições foram usadas na optimização das etapas posteriores (fermentação e destilação).

Relativamente à eficiência média da hidrólise, o valor obtido foi de 84,5%. Este encontra-se próximo do valor teórico esperado (88%).

A eficiência média da fermentação foi de 59,4%, sendo a massa média de etanol obtida de 1,9 g (obtido a partir de uma massa média de 7,39 g de celulose e hemicelulose), para um máximo teórico de 3,32 g. A justificação para este baixo valor de eficiência, poderá dever-se à inexistência de ar em quantidade suficiente ou à baixa actividade das leveduras.

**Palavras-chave:** Bioetanol, Biomassa, Destilação, Fermentação, Hidrólise enzimática, Pré-tratamento.



## Abstract

This work aimed to produce bioethanol from an organic waste from LIPOR composting central. Such waste was chosen because of the possibility to value this product, if it were a more interesting alternative for the flow of it.

The experimental procedure involved different steps, such as grinding of raw material, pre-treatment, enzymatic hydrolysis, fermentation of sugars and determination of the conversion of sugars to ethanol by fermentation.

For the pre-treatment optimization, samples were submitted to four different prior treatments: acid or alkaline hydrolysis, organosolv and hydrothermolysis. Hydrothermolysis was studied under two operating conditions of pressure (16 bar and atmospheric). Analyzing the results lead to the conclusion that alkaline hydrolysis was the process that resulted in an increased production of glucose (89.2%). The conditions used in this process were 200 mL of a sodium hydroxide solution at 10% to 20 g of biomass, a pressure of 2 bar, a temperature of 124 °C and a contact time of 6 minutes.

To optimize the hydrolysis, a factorial planning  $2^2$  was developed, with two levels and two factors, by performing two replicates at the corners and three replicates in the center, in order to optimize the experimental conditions: temperature and volume ratio of enzyme/ amount of biomass that would lead to higher concentration of total sugars, and consequently higher production of ethanol. For that a total of 11 trials were run, 8 of which correspond to conditions at the corners and 3 in the center. The analysis of sugars was carried out using 3 analytical techniques: refractometry, UV-Vis spectrophotometry and HPLC.

An analysis of the results of this experimental planning concluded that fits the optimal. The best conditions used were respectively: temperature of 65 °C and volume ratio of enzyme/ amount of biomass 5 mL/100 g. These conditions were used in the later stages (fermentation and distillation).

For the average efficiency of hydrolysis, the value obtained was 84.5%. This is close to the expected theoretical value (88%).

The average efficiency of fermentation was 59.4%, and the average mass of ethanol produced was 1.9 g (obtained from an average weight of 7.39 g of cellulose and hemicellulose), for a theoretical maximum of 3.32 g. The justification for this low value of efficiency may be due to absence of air in a sufficient amount or low activity of yeast.

**Keyword:** Bioethanol, Biomass, Distillation, Fermentation, Enzymatic hydrolysis, Pretreatment.



## ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento da biomassa .....	2
1.1.1. Processos de conversão da biomassa em energia .....	2
1.1.2. Composto da Lipor.....	3
1.2. Organização estrutural dos resíduos lenho-celulósicos.....	4
1.2.1. Celulose.....	4
1.2.2. Hemicelulose .....	5
1.2.3. Lenhina .....	6
2. Produção de bioetanol .....	11
2.1. Descrição do processo de produção de bioetanol a partir de biomassa lenho-celulósica .....	12
2.2. Pré-tratamento.....	13
2.2.1. Pré-tratamento físico.....	14
2.2.2. Pré-tratamento físico-químico .....	14
2.2.3. Pré-tratamento químico.....	15
2.2.4. Pré-tratamento biológico .....	20
2.3. Conceito de enzima .....	22
2.3.1. Cinética enzimática.....	22
2.3.2. Hidrólise Enzimática.....	25
2.4. Fermentação.....	27
2.4.1. Factores que afectam a fermentação.....	28
2.5. Destilação.....	30
3. Métodos analíticos .....	31
3.1. FTIR.....	31
3.2. Refractometria .....	31
3.3. Métodos químicos.....	32
3.4. Métodos cromatográficos.....	32
3.4.1. Cromatografia gasosa (GC) .....	32
3.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	32
4. Parte Experimental .....	37
4.1. Materiais e métodos.....	37
4.1.1. Tratamento mecânico .....	37
4.1.2. Optimização do pré-tratamento da amostra .....	38
4.1.3. Optimização da etapa de hidrólise enzimática .....	42

4.2. Fermentação dos açúcares.....	45
4.2.1. Reagentes .....	45
4.2.2.Preparações de soluções.....	45
4.2.3. Equipamento.....	45
4.2.4. Condições experimentais .....	45
4.2.5. Análise quantitativa.....	46
4.3. Destilação .....	46
4.3.1. Equipamento.....	46
4.3.2. Condições experimentais.....	46
4.3.3. Análise quantitativa.....	47
5. Resultados e discussão .....	49
5.1. Características da amostra .....	49
5.2. Etapa de pré-tratamento .....	49
5.3. Etapa de hidrólise enzimática .....	50
5.3.1. Análise refractométrica .....	50
5.3.2. Análise por HPLC-ELSD .....	52
5.3.3. Análise por ultravioleta-vísivel.....	54
5.4. Etapa da fermentação.....	55
6. Custos de produção em cada uma das etapas .....	59
7. Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros .....	61
8. Bibliografia.....	63
Anexos .....	71
A. Determinação do teor de humidade na biomassa.....	71
B. Optimização do pré-tratamento .....	71
C. Optimização da hidrólise enzimática .....	73
C.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) .....	79
C.1.1. Reagentes.....	79
C.1.2. Preparação das soluções padrão .....	79
C.1.3. Equipamento .....	80
C.1.4. Condições experimentais .....	80
C.1.5. Quantificação .....	81
C.2. Índice de Refracção (IR).....	81
C.2.1. Reagentes.....	81
C.2.2 Preparação das soluções padrão .....	81
C.2.3. Equipamento .....	81
C.2.4. Condições experimentais .....	81
C.2.5. Quantificação .....	82

C.3. Ultravioleta Visível (UV-Vis) .....	82
C.3.1. Reagentes.....	82
C.3.2. Preparação das soluções padrão .....	82
C.3.3. Equipamento .....	82
C.3.4. Condições experimentais .....	82
C.3.5. Quantificação .....	83
D. Otimização da fermentação.....	83
E. Custos das etapas.....	88
E.1. Etapa do pré-tratamento.....	88
E.1.1. Cálculo do consumo de água .....	88
E.1.2. Cálculo do consumo de energia .....	90
E.2. Etapa de hidrólise enzimática .....	92
E.2.1. Cálculo do consumo de água .....	92
E.2.2. Cálculo do consumo de energia .....	92
E.3. Análise por refractometria.....	93
E.3.1. Cálculo do consumo de energia .....	93
E.4. Análise por HPLC.....	94
E.4.1. Cálculo do consumo de água .....	94
E.4.2. Cálculo do consumo de energia .....	95
E.5. Análise por UV-Vis .....	97
E.5.1. Cálculo do consumo de água .....	97
E.5.2. Cálculo do consumo de energia .....	97
E.6. Fermentação .....	98
E.6.1. Cálculo do consumo de água .....	98
E.6.2. Cálculo do consumo de energia .....	98
E.7. Destilação.....	99
E.7.1. Cálculo do consumo de água .....	100
E.7.2. Cálculo do consumo de energia .....	100
E.8. Reagentes.....	101



## Índice de figuras

Figura 1.1 – Variação da produção global do bioetanol e biodiesel [1].	1
Figura 1.2 – Representação da cadeia linear da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose [5].	4
Figura 1.3 – Esquema relativo às ligações de hidrogénio que se estabelecem na celulose [5].	5
Figura 1.4 – Representação estrutural dos monossacáridos constituintes das hemiceluloses. $\beta$ -D-glucose (1), $\beta$ -D-galactose (2), $\alpha$ -L-arabinose (3), $\beta$ -D-xilose (4), $\beta$ -D-manose (5), ácido $\alpha$ -D-4-O-metilglucorónico (6), L-ramnose (7) [5].	5
Figura 1.5 – Estrutura dos álcoois precursores da lenhina [5].	6
Figura 1.6 – Principais tipos de ligações químicas presentes nos monómeros de lenhina e estruturas diméricas associadas [11].	8
Figura 2.1 – Processo geral da conversão do material lenho-celulósico a etanol [9].	13
Figura 2.2 – Efeito do pré-tratamento na lenhina e na hemicelulose [9].	13
Figura 2.3 – Processo organosolvação. [29].	19
Figura 2.4 – Composição química de um aminoácido [40].	22
Figura 2.5 – Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reacção, catalisada por via enzimática [41].	23
Figura 2.6 – Efeito do pH na estabilidade de uma enzima: curva A – actividade da enzima e curva B - $V_0$ a pH = 6,8 após incubação a outros valores de pH [41].	24
Figura 3.1– Esquema de um sistema de HPLC [82].	33
Figura 3.2 – Representação esquemática da válvula de injeção e do processo de introdução de amostra na coluna de HPLC [83].	33
Figura 3.3 – Detector ELS [90].	36
Figura 4.1 – Moinho de lâminas.	38
Figura 4.2 – Sistema de vibração de peneiros.	38
Figura 4.3 – Esquema de optimização do pré-tratamento.	39
Figura 4.4 – Montagem do reactor e controlador, usado na optimização do pré-tratamento.	40
Figura 4.5 – Pormenor da cabeça do reactor, usado na optimização do pré-tratamento.	40
Figura 4.6 – Banho termostaticado e com agitação usado no pré-tratamento.	41
Figura 4.7– Esquema da optimização da hidrólise.	43
Figura 4.8 – Representação gráfica do planeamento factorial.	44
Figura 4.9 – Esquema de montagem da etapa do processo fermentativo.	46
Figura 4.10 – Esquema de montagem do processo de destilação.	47
Figura 5.1 – Massa de glucose obtida em cada um dos pré-tratamentos.	49

Figura 5.2 – Variação da massa de glucose para cada uma das amostras e respectivas réplicas.....	51
Figura 5.3 – Massa de glucose obtida em cada um dos ensaios e respectivas réplicas, determinada através da análise cromatográfica HPLC – ELSD.....	54
Figura 5.4 – Eficiência das etapas de hidrólise e fermentação, obtida para as melhores condições (temperatura 65 °C e razão volume de enzima/quantidade de biomassa de 5 mL/100 g), através da análise por refractometria.....	56
Figura 5.5 – Massa de etanol teórico, real e obtida por destilação, para as condições óptimas (temperatura 65°C e razão volume de enzima/quantidade de biomassa = 5 mL/100g).....	56
Figura B.1 – Variação da massa de glucose para cada uma das amostras e respectivas réplicas.....	72
Figura C.1 – Variação das massas médias dos picos em função da concentração dos padrões de glucose.....	77
Figura C.2 – Espectro de absorção do padrão de glucose na concentração de 100 g/L, traçado para o comprimento de onda entre 200 e 250 nm. ....	78
Figura C.3 – Espectro de absorção do padrão de arabinose na concentração de 100 g/L, traçado para o comprimento de onda entre 200 e 364 nm. ....	79
Figura C.4 – Esquema de montagem usada na técnica de análise por HPLC com ELSD. ....	80
Figura D.1 – Curva de calibração % etanol/água em função do índice de refração da mistura. ....	87

## Índice de tabelas

Tabela 2.1 – Diferentes matérias-primas e comparação dos seus potenciais de produção de etanol, adaptado de [1].	11
Tabela 2.2 – Algumas propriedades dos álcoois combustíveis adaptado de [6].	12
Tabela 2.3 – Tabela referente às condições usadas e resultados obtidos para cada pré-tratamento, segundo alguns autores.	21
Tabela 4.1 – Condições experimentais usadas em cada pré-tratamento de uma amostra de 20 g.	42
Tabela 5.1 – Influência do caudal de eluente na separação cromatográfica de uma mistura de xilose (2000 ppm) e glucose (1000 ppm) – o detector operou a uma pressão de 0,5 bar e uma temperatura de operação de 85 °C.	52
Tabela 5.2 – Tempos de retenção correspondentes a cada um dos açúcares-glucose, xilose e arabinose (caudal de eluente 0,4 mL/min, pressão e temperatura do detector, respectivamente, 0,5 bar, e coluna a 80 °C).	53
Tabela 6.1 – Valores do custo de energia e água de cada etapa, bem como o custo global do processo de produção do bioetanol, para cada 390 g de biomassa.	59
Tabela A.1 – Determinação do teor de humidade média presente na amostra de biomassa proveniente da LIPOR.	71
Tabela B.1 – Dados referentes às condições experimentais usadas, para cada pré-tratamento de uma amostra pesando cerca de 20 g.	71
Tabela B.2 – Resultados da massa de glucose obtida, após a aplicação de cada um dos processos de pré-tratamento.	72
Tabela C.1 – Dados relativos aos parâmetros estudados no pré-tratamento das amostras, mas usando agora 10 g de amostra.	74
Tabela C.2 – Condições de temperatura e razão volume de enzima/quantidade de biomassa usadas no processamento por hidrólise enzimática de cada uma das 11 amostras, resultante da aplicação do planeamento factorial (2 <sup>2</sup> ).	75
Tabela C.3 – Valores da concentração de açúcares em °Brix obtidos para uma das 11 amostras, e respectivas massas de glucose, analisadas por refractometria.	76
Tabela C.4 – Valores de cada padrão de glucose entre 500 e 2500 ppm e respectivas massas médias para cada um dos picos de glucose.	77
Tabela C.5 – Valores da massa de glucose (g), obtida após a etapa de hidrólise alcalina seguida de hidrólise enzimática, para cada uma das 11 amostras, determinada por HPLC-ELS.	78
Tabela D.1 – Valores da concentração de açúcares após a etapa de hidrólise enzimática nos ensaios que se revelaram mais eficientes em termos de produção de açúcares.	83

Tabela D.2 – Valores da massa de levedura usada e do pH após ajuste, para a amostra 5 e sua réplica, 7.....	83
Tabela D.3 – Valores da concentração de açúcares à saída da etapa de fermentação. ....	84
Tabela D.4 – Valores da eficiência média da hidrólise enzimática e fermentação.....	84
Tabela D.5 – Quantidade de etanol obtido, para as condições ótimas. ....	86
Tabela D.6 – Valores da quantidade máxima de etanol (teórico, real e obtido na destilação).....	86
Tabela D.7 – Valores do índice de refração em função da % de etanol.....	87
Tabela D.8 – Valores da quantidade máxima de etanol (teórico), real e obtido na destilação. ....	88
Tabela E.1 – Valores de volume e tempo usados para calcular o caudal de água de arrefecimento. ( $m^3/s$ ).....	89
Tabela E.2 – Dimensões (altura, largura e comprimento) usadas para calcular o volume de água.....	98
Tabela E.3 – Valores do volume de água e tempo usados para calcular o caudal em $m^3/s$ . ....	100
Tabela E.4 – Valores comerciais e do custo de hidróxido de sódio, ácido sulfúrico e etanol. ....	101
Tabela E.5 – Valores comerciais e do custo de glucose, xilose e arabinose. ....	101
Tabela E.6 – Valores do custo de energia e água de cada etapa, bem como o custo global do processo de produção do bioetanol, para 390 g de biomassa.....	102

### **Lista de abreviaturas**

ES – Complexo enzima-substrato

ELS – Dispersão de luz por evaporação (Evaporative Light Scattering)

E – Enzima

E10 – 10% de etanol e 90% de gasolina

E85 – 85% de etanol e 15% de gasolina

FTIR – Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier

IR – Índice de refração

$K_1$ ,  $K_{-1}$ ,  $K_2$  – Constantes de equilíbrio

$K_m$  – Constante de Michaelis-Menten

MS – Espectroscopia de massa

NIR – Espectroscopia de infravermelho próximo

NMR – Ressonância magnética nuclear

P – Produto

[S] – Concentração de substrato

S – Substrato

UV – Ultravioleta

V – Velocidade de reação

$V_0$  – Velocidade de reação inicial

$V_{máx}$  – Velocidade máxima de reação

Vis – Visível



## 1. Introdução

A disponibilidade e o impacto ambiental da utilização dos recursos energéticos irão desempenhar um papel crítico na evolução das sociedades e do mundo. A maioria das necessidades energéticas são actualmente satisfeitas usando reservas de combustíveis fósseis, carvão e gás natural mas, estes estão a aproximar-se do esgotamento e a sua utilização continuada tem tido consequências nefastas no ambiente.

A acumulação de dióxido de carbono e outros gases com efeito de estufa na atmosfera é responsável pelas alterações climáticas, prevendo-se que tenha consequências globais desastrosas para a vida no planeta. As fontes de energia renováveis podem contribuir para reduzir a dependência das importações de petróleo e promover a segurança do abastecimento [1].

Na União Europeia, os transportes são responsáveis por quase um quarto das emissões totais de gases com efeito de estufa, pois quase toda a energia utilizada provém do petróleo. Para reduzir a forte dependência das importações de petróleo, a União Europeia tem vindo a apostar na produção de biocombustíveis, substitutos directos dos combustíveis fósseis nos transportes e rapidamente integráveis nos sistemas de abastecimento de combustíveis [2].

Existem três tipos de tecnologias de biocombustíveis – biodiesel, bioetanol e biogás – usando cada um, diferentes tipos de biomassa como matéria-prima na sua produção.

O biodiesel e o bioetanol são biocombustíveis primários e ambos têm sofrido um tremendo desenvolvimento em termos de escala de produção industrial e qualidade. A Figura 1.1 mostra a variação da produção global do bioetanol e biodiesel entre os anos 2000 e 2007.

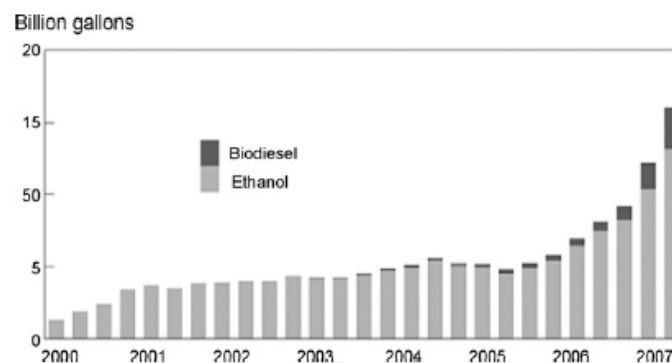


Figura 1.1 – Variação da produção global do bioetanol e biodiesel [1].

Através da análise da Figura 1.1, constata-se que a quantidade de biodiesel produzido tem sido muito inferior à produção de etanol, talvez devido à possibilidade e necessidade de utilização do bioetanol para outros fins que não exclusivamente o de combustível, tendo o biodiesel apenas a aplicação como combustível substituto do gasóleo [1].

## **1.1. Enquadramento da biomassa**

A biomassa engloba toda a matéria viva presente na Terra. Esta deriva do crescimento de plantas, incluindo algas, árvores e culturas.

A biomassa tem sido uma importante fonte de energia para a humanidade desde os tempos mais remotos. Actualmente, ela contribui para cerca de 10-14% do abastecimento de energia do mundo, podendo ser convertida em três principais tipos de produtos:

- Energia térmica/eléctrica;
- Combustível para o sector dos transportes;
- Matéria-prima para produtos químicos.

Tradicionalmente, a biomassa foi utilizada através de combustão directa. A queima da biomassa produz poluentes, incluindo as poeiras e gases precursores de chuvas ácidas, como dióxido de enxofre e óxidos de nitrogénio, mas o dióxido de enxofre produzido é 90% menos do que aquele que é produzido pela queima de carvão. As quantidades de poluição atmosférica produzidas são insignificantes quando comparados com outras fontes de poluição, já que o CO<sub>2</sub> introduzido na atmosfera é absorvido através do crescimento de nova biomassa. O uso da biomassa como fonte de energia é de interesse, devido aos seguintes benefícios previstos [3]:

- A biomassa é renovável, potencialmente sustentável e uma fonte de energia ambientalmente amigável;
- Maior utilização da biomassa implicaria uma diminuição da utilização das reservas de petróleo bruto;
- Os combustíveis provenientes de biomassa têm um teor de enxofre insignificante e, portanto, não contribuem para as emissões de dióxido de enxofre na chuva ácida;
- A combustão da biomassa produz menor quantidade de cinzas que a combustão de carvão, podendo as cinzas obtidas ser utilizadas como aditivo nos solos;
- A combustão de resíduos agrícolas, florestais e sólidos urbanos para produção de energia é um modo de utilização eficaz, reduzindo desta forma o problema significativo de eliminação de resíduos, em especial nas áreas urbanas.
- A biomassa é um recurso interno que não está sujeito a flutuações de preços ou às incertezas de fornecimento dos combustíveis importados.

### **1.1.1. Processos de conversão da biomassa em energia**

Existem diferentes processos térmicos de conversão de biomassa em energia. Das diferentes técnicas destaca-se a gaseificação e a pirólise.

A gaseificação é um processo que envolve a combustão parcial de um resíduo sólido, na

presença de menos ar do que o estequiometricamente necessário, gerando um combustível gasoso rico em CO, CH<sub>4</sub> e hidrocarbonetos saturados. O combustível resultante pode ser queimado com ar em excesso, numa caldeira ou, turbina a gás originando energia térmica/eléctrica. Relativamente ao processo de pirólise, o resíduo carbonáceo é processado na ausência total de oxigénio. Daqui resulta a formação de combustíveis gasosos (CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>), uma fracção líquida (óleo, alcatrão) e um sólido residual.

A biomassa também pode ser convertida em energia por processos químicos, de entre os quais podemos destacar a transformação da biomassa oleaginosa em biodiesel por transesterificação, a produção de metanol ou ainda o tratamento hidrotérmico da biomassa para produção de diesel.

No que diz respeito à conversão da biomassa em energia, há ainda um conjunto de processos biológicos que permitem obter combustíveis importantes. De entre estes processos destacam-se a digestão anaeróbia e a fermentação.

A digestão anaeróbia consiste na conversão de um resíduo sólido em CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> (que são os constituintes principais do biogás), na ausência de oxigénio e na presença de associações simbióticas entre diferentes grupos de bactérias. O biogás é um combustível que pode ser usado para a produção de energia térmica e eléctrica [1].

A fermentação consiste na conversão de um açúcar em álcool (etanol), com libertação de CO<sub>2</sub>. Usualmente estas reacções são realizadas por leveduras e o álcool produzido em solução aquosa necessita de ser purificado e concentrado antes da sua utilização.

### **1.1.2. Composto da Lipor**

A LIPOR é a entidade responsável pela gestão dos resíduos sólidos urbanos (RSU) na zona metropolitana do grande Porto. Esta empresa desenvolveu uma estratégia integrada de valorização, tratamento e eliminação dos RSU, denominada de via múltipla, que inclui:

- O sistema de reciclagem multimaterial – Centro de triagem;
- A central de valorização orgânica – Processo de compostagem para a produção de correctivos orgânicos;
- O sistema de tratamento de resíduos sólidos urbanos (RSU) indiferenciados – Central de valorização energética com produção de energia eléctrica.

A matéria-prima usada neste trabalho é um composto resultante de uma das fases do processo de compostagem desta empresa. A escolha do referido material para a produção de bioetanol surgiu como possibilidade de valorizar este produto, caso fosse uma alternativa mais viável para o escoamento do mesmo [4]. O resíduo que deu origem a este material foi obtido na recolha selectiva de cantinas, restaurantes, jardins, sendo por isso um resíduo em que se encontra um teor elevado de material lenho-celulósico.

## 1.2. Organização estrutural dos resíduos lenho-celulósicos

A dificuldade de converter aparas de madeira e outros materiais lenho-celulósicos em bioetanol deve-se às características morfológicas dos três principais componentes da parede celular de plantas superiores – celulose, hemicelulose e lenhina.

As estruturas microfibrilares da celulose encontram-se envoltas numa matriz composta por hemicelulose e lenhina, cuja função estrutural é a de agir como barreira natural à degradação enzimática ou microbiana [5].

### 1.2.1. Celulose

A celulose é um homopolímero de origem natural, de grau de polimerização e peso molecular muito elevados, formado por unidades de anidroglicopirranose ( $\beta$ -D-glucopirranose) ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 formando uma cadeia linear, conforme representado na Figura 1.2 [6]. Duas unidades adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água, que envolve os grupos hidroxilo dos carbonos 1 e 4. Esta estrutura dissacarídica designa-se de celobiose [7].

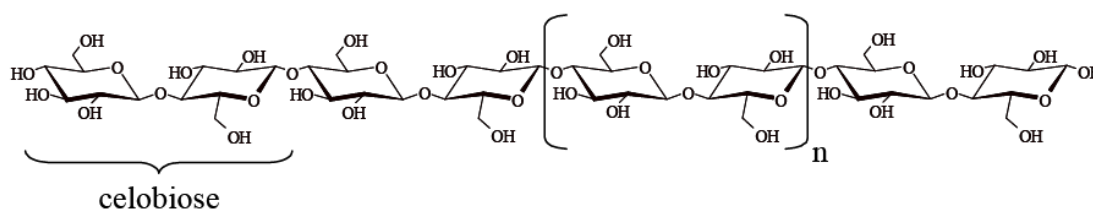


Figura 1.2 – Representação da cadeia linear da celulose, formada por unidades consecutivas de celobiose [5].

Este polímero assume uma disposição linear devido: aos grupos hidroxilo no carbono anomérico possuírem orientação equatorial ( $\beta$ ), a conformação do anel piranosídico assume uma disposição em cadeia  ${}^4C_1$  e as cadeias adjacentes formam uma rede de ligações de pontes de hidrogénio intra e intermoleculares que estabilizam o agregado [7].

A Figura 1.3 ilustra as ligações de pontes de hidrogénio que se estabelecem na celulose. A celulose apresenta regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas), estabilizadas por numerosas ligações de hidrogénio intra e intermoleculares e áreas menos ordenadas ou amorfas onde as cadeias apresentam uma orientação aleatória [8].

Alguns autores têm sugerido que a celulose amorfa, devido à sua maior área superficial, é mais susceptível à acção enzimática do que a forma ordenada ou cristalina [5].

Este polímero é insolúvel na maioria dos solventes e tem uma baixa acessibilidade aos ácidos e à hidrólise enzimática [6].

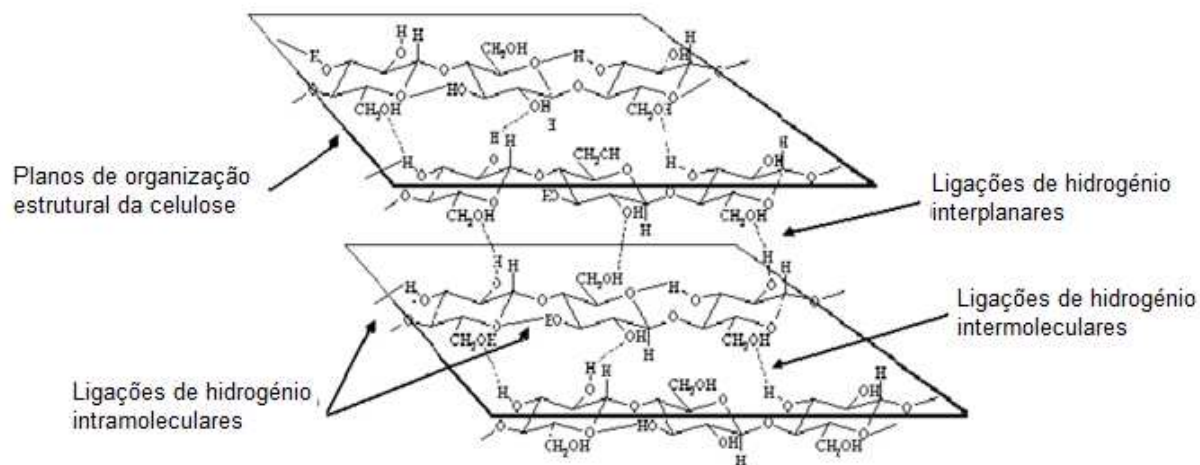


Figura 1.3 – Esquema relativo às ligações de hidrogénio que se estabelecem na celulose [5].

### 1.2.2. Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolímero formado por uma variedade de unidades monossacáridas, tais como pentoses (xilose, arabinose e ramnose), hexoses (glucose, manose e galactose) e ácidos urónicos (ácido 4-O-metilglucorónico, D-glucorónico e ácido D-galacturónico) [9], conforme apresentado na Figura 1.4 [5].

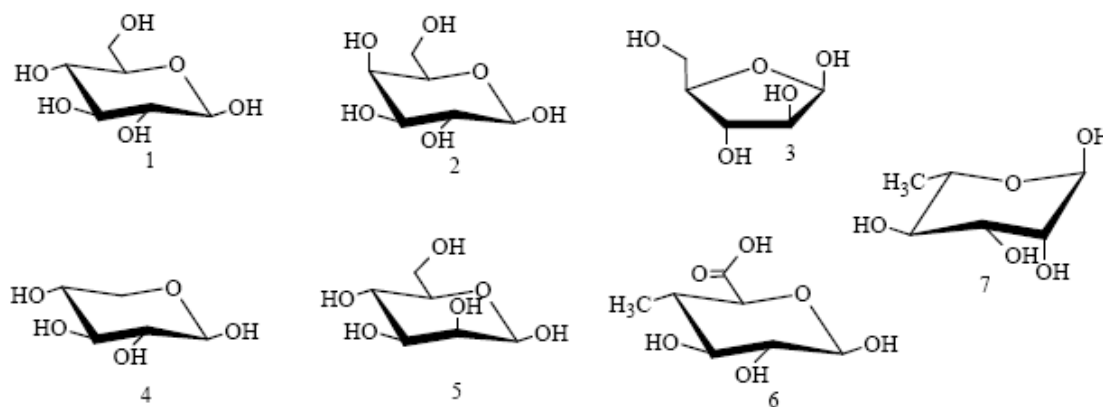


Figura 1.4 – Representação estrutural dos monossacáridos constituintes das hemiceluloses. β-D-glucose (1), β-D-galactose (2), α-L-arabinose (3), β-D-xilose (4), β-D-manose (5), ácido α-D-4-O-metilglucorónico (6), L-ramnose (7) [5].

Na sua estrutura, a hemicelulose apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, conferindo estabilidade e flexibilidade ao agregado [10]. Comparada com a celulose, a hemicelulose apresenta maior susceptibilidade à hidrólise ácida. Esta reactividade é vulgarmente atribuída ao carácter relativamente amorfo deste polissacárideo que apresenta grande polidispersidade e um grau de polimerização (GP) muito inferior ao da celulose, da ordem de 200 unidades [5].

As hemiceluloses encontram-se junto aos feixes de celulose a constituir as microfibrilas e entre os polímeros de celulose amorfa. À semelhança da celulose, as hemiceluloses apresentam um grande número de grupos hidroxilo na sua periferia, com os quais podem estabelecer ligações intermoleculares, do tipo pontes de hidrogénio, com os polímeros vizinhos [11].

### 1.2.3. Lenhina

Depois da celulose, a lenhina é um dos polímeros orgânicos mais abundantes e importantes na natureza [5]. Este polímero está presente na parede celular principal, conferindo um suporte estrutural e agindo como barreira impermeabilizante à degradação enzimática ou microbiana da parede [10].

A lenhina pode ser definida como um material polifenólico amorfo, com estrutura tridimensional baseada em três precursores monoméricos: os álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumárico (Figura 1.5) [12].

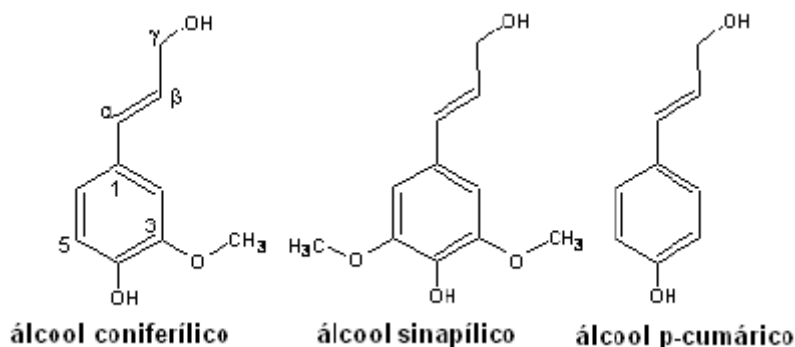


Figura 1.5 – Estrutura dos álcoois precursores da lenhina [5].

Estes monómeros são formados por um anel fenólico ligado a uma cadeia de três átomos de carbono, com um grupo hidroxilo (álcool) no carbono terminal desta última. Estas estruturas são chamadas de unidades fenilpropanólicas. O que os diferencia entre si é a ausência de substituições metoxilo no anel fenólico (álcool cumarílico), ou a presença de um metoxilo (álcool coniferílico) ou dois metoxilos substituídos (álcool sinapílico). Frequentemente, estes monómeros são mencionados fazendo alusão apenas ao anel fenólico que os distingue, pelas designações de hidroxifenilo (sem metoxilo), guaiacilo (um substituinte metoxilo), e siringilo (dois grupos metoxilo). No entanto, estas últimas designações podem ser ainda abreviadas, respectivamente pelas letras H, G e S [11].

Este polímero além da sua estrutura complexa, apresenta vários tipos de ligações químicas estáveis do tipo C-C, aril-éter e diarílicas, sendo as mais abundantes as  $\beta$ -O-4 e  $\alpha$ -O-4,  $\beta$ -5,  $\beta$ -1, 5-5,  $\beta$ - $\beta$  e  $\beta$ -O-5 [13]. A Figura 1.6 mostra algumas das principais ligações químicas que

foram identificadas nos monómeros da lenhina, e estruturas diméricas associadas.

Os monómeros fenilpropanólicos encontram-se ligados entre si por dois tipos de ligações: éter, através do oxigénio do grupo hidroxilo do anel fenólico, e ligações directas carbono-carbono (C-C). Grande parte das ligações identificadas nos monómeros da lenhina é do tipo éter, nomeadamente a  $\beta$ -O-4 e a  $\alpha$ -O-4, que normalmente representam cerca de 50-65% de todas as ligações inter-monoméricas. Este tipo de ligações permite uma estrutura mais “aberta” à lenhina, enquanto as ligações C-C aproximam os monómeros entre si, tornando a lenhina mais condensada.

As unidades monoméricas do tipo H e G permitem um maior grau de condensação, isto é, os monómeros aproximam-se mais facilmente entre si, dado que os volumosos grupos metoxilo estão ausentes, ou presentes apenas em um dos lados do anel fenólico. Nas unidades S, como apresentam dois grupos metoxilo substituídos no anel fenólico, a aproximação entre os monómeros está mais condicionada.

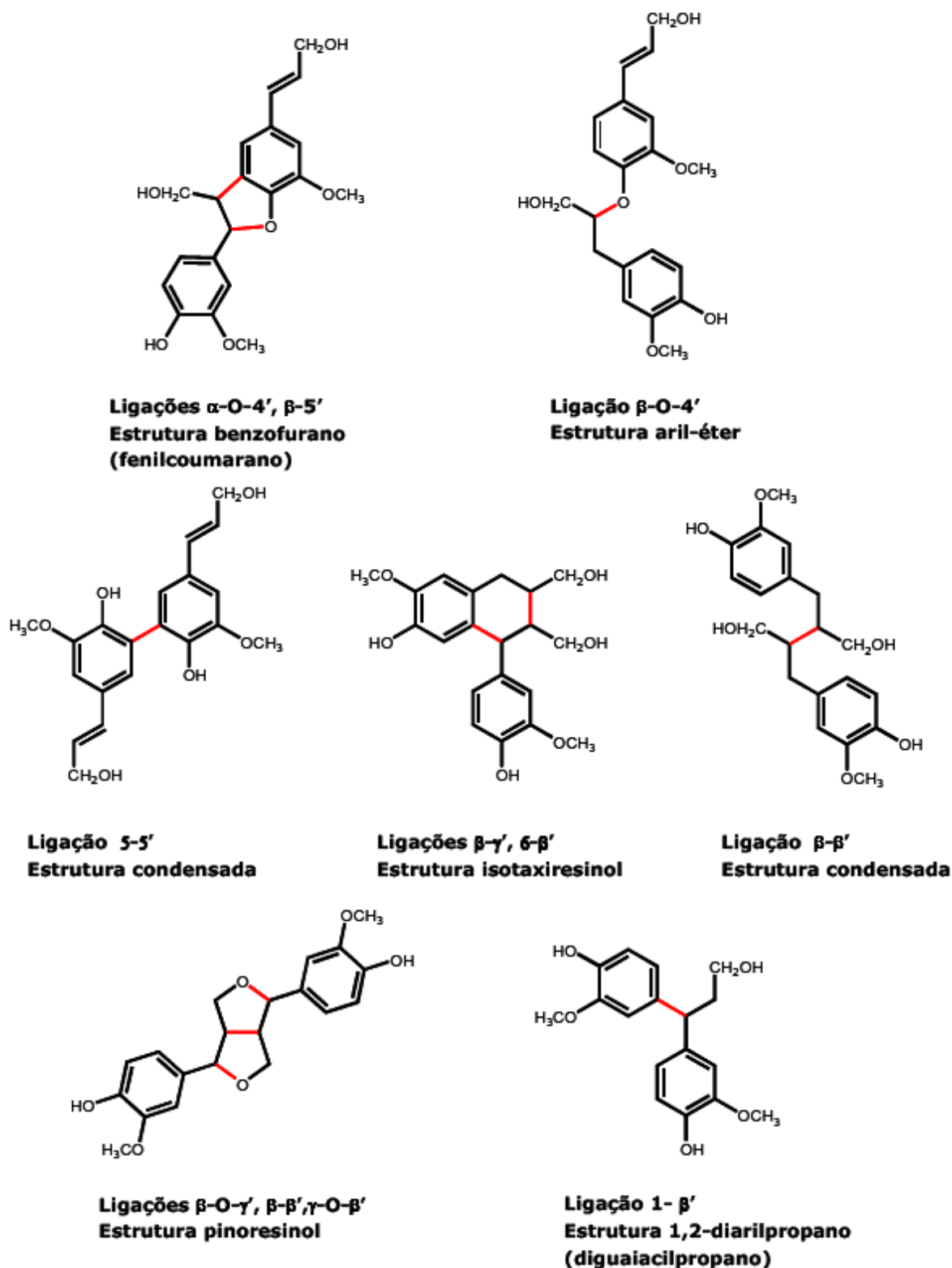


Figura 1.6 – Principais tipos de ligações químicas presentes nos monómeros de lenhina e estruturas diméricas associadas [11].

O grau de condensação da lenhina afecta muito a sua reactividade, nomeadamente quando se deseja a degradação do polímero e a sua solubilização, como é o caso do fabrico da pasta para papel. Lenhinas muito condensadas são mais difíceis de despolimerizar. Em consequência, as relações S/G elevadas são consideradas vantajosas para a produção de pasta para papel [11].



## 2. Produção de bioetanol

O aumento do consumo de energia e a actual dependência do petróleo, com vista a satisfazer as necessidades energéticas, apela ao desenvolvimento de novas fontes de energia alternativas. O bioetanol é uma alternativa promissora para reduzir a dependência do petróleo, podendo ser usado na substituição parcial da gasolina.

O Brasil e os Estados Unidos são os principais produtores e consumidores mundiais de bioetanol estando a Europa, na sequência da Directiva EU 2003/30/CE, a iniciar a instalação de várias unidades industriais, prevendo-se, em 2008, uma capacidade instalada de 4,54 milhares de milhão de litros anuais [14].

Actualmente, a produção de bioetanol é feita a partir de milho, melão e cana-de-açúcar, o que o transforma num biocombustível de 1ª geração. Isto pode não ser uma opção viável a longo prazo, pois uma maior utilização do milho para a produção do etanol traduzir-se-á num aumento excessivo do seu preço, reflectindo-se negativamente nas indústrias alimentares e podendo resultar na redução das exportações de produtos de origem animal [15].

Em virtude de todas estas questões, as matérias-primas lenho-celulósicas permitem produzir biocombustível de 2ª geração, pelo que têm vindo a ser investigadas como opção para a produção de etanol. Esta biomassa inclui os resíduos florestais, tais como a madeira; resíduos agrícolas como bagaço de cana, palha de trigo e arroz; resíduos industriais, como a celulose e os desperdícios de papel processado e resíduos sólidos urbanos; culturas energéticas como as gramíneas constituem o maior potencial de matéria-prima na produção de combustível etanólico [16].

Seguidamente apresenta-se na Tabela 2.1 um resumo com os diferentes tipos de matérias-primas, e os seus correspondentes potenciais de produção de etanol.

Tabela 2.1 – Diferentes matérias-primas e comparação dos seus potenciais de produção de etanol, adaptado de [1].

<b>Matéria-prima</b>	<b>Potencial de produção de bioetanol (L/ton)</b>
Cana-de-açúcar	70
Beterraba	110
Batata-doce	125
Batata	110
Mandioca	180
Milho	360
Arroz	430
Cevada	250
Trigo	340
Bagaço e outras biomassas de celulose	280

Através da análise da tabela 2.1 verifica-se que, de entre as matérias-primas com maior potencial de produção de etanol se encontra o arroz, milho e trigo (todos eles cereais produzidos para fins alimentares), seguido do bagaço e outras biomassas celulósicas.

O bioetanol apresenta como características: um índice de octano maior (108) comparado com o índice de octano da gasolina sem chumbo 98 ou 95 comercialmente produzida em Portugal, elevado limite de inflamabilidade, elevada velocidade de chama e elevado calor de vaporização. Estas propriedades permitem uma maior taxa de compressão e menor tempo de queima, o que conduz a vantagens em termos de eficiência teórica, relativamente à gasolina, num motor de combustão interna. O índice de octano é uma medida da qualidade da gasolina para a prevenção da ignição precoce.

As limitações deste biocombustível incluem a baixa densidade energética em relação à gasolina (o poder calorífico do bioetanol é 66% do da gasolina), a corrosividade, baixa luminosidade da chama, baixa pressão de vapor (tornando o arranque a frio difícil), a miscibilidade com a água, a toxicidade para o ecossistema, o aumento das emissões dos gases de exaustão de acetaldeído e o aumento da pressão de vapor quando misturado com a gasolina [6].

A Tabela 2.2 resume algumas propriedades dos álcoois combustíveis.

Tabela 2.2 – Algumas propriedades dos álcoois combustíveis adaptado de [6].

Propriedades do combustível	Iso-Octano	Metanol	Etanol
Índice de octano	100	112	108
Temperatura de auto-ignição (K)	530	737	606
Calor latente de vaporização (MJ/Kg)	0,26	1,18	0,91
Poder calorífico inferior (MJ/Kg)	44,4	19,9	26,7

Desde os anos 80 que se tem difundido nos EUA e Brasil, o uso de gasolina misturada com etanol, podendo existir misturas pobres em etanol (E10 – 10% etanol e 90% gasolina) e misturas ricas em etanol (E85 – 85% etanol e 15% gasolina). A primeira mistura pode ser usada em qualquer automóvel posterior a 1970 sem qualquer alteração no motor, no entanto a segunda mistura só poderá ser usada em automóveis adaptados [2].

## 2.1. Descrição do processo de produção de bioetanol a partir de biomassa lenho-celulósica

A biomassa lenho-celulósica é composta por celulose (20-50%), hemicelulose (20-35%), compostos polifenólicos de lenhina (10-35%), e outros componentes.

O processo biológico de conversão da matéria lenho-celulósica em etanol envolve as seguintes etapas (Figura 2.1): (1) deslenhificação para libertar a celulose e a hemicelulose; (2) despolimerização dos polímeros de carboidratos para produzir açúcares livres; (3) fermentação da mistura de açúcares, pentoses e hexoses, para produzir etanol [17].

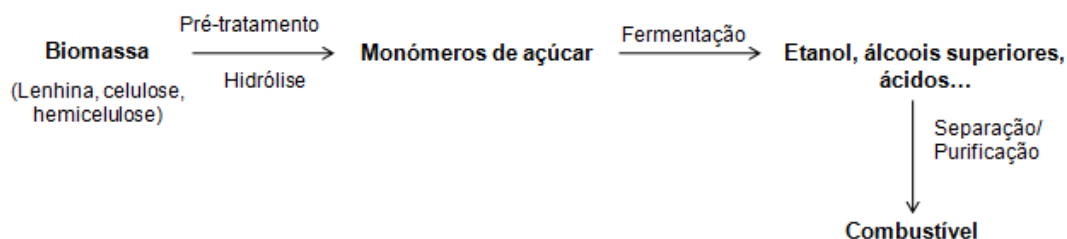


Figura 2.1 – Processo geral da conversão do material lenho-celulósico a etanol [9].

Como a lenhina é indigestível pela acção das enzimas, não pode ser convertida a etanol, representando assim o maior resíduo do processo [18], no entanto, presentemente a lenhina pode também ser valorizada através da produção de pastilhas para queima em caldeiras.

## 2.2. Pré-tratamento

A estrutura complexa e compacta dos materiais lenho-celulósicos torna necessária aplicação de pré-tratamentos, antes da realização das etapas subsequentes para a produção do etanol. O pré-tratamento tem por objectivo promover a remoção da lenhina e da hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose, incrementar a porosidade da biomassa, de modo a tornar a celulose susceptível à hidrólise [19]. A Figura 2.2 mostra como esta etapa actua sobre os componentes da biomassa.

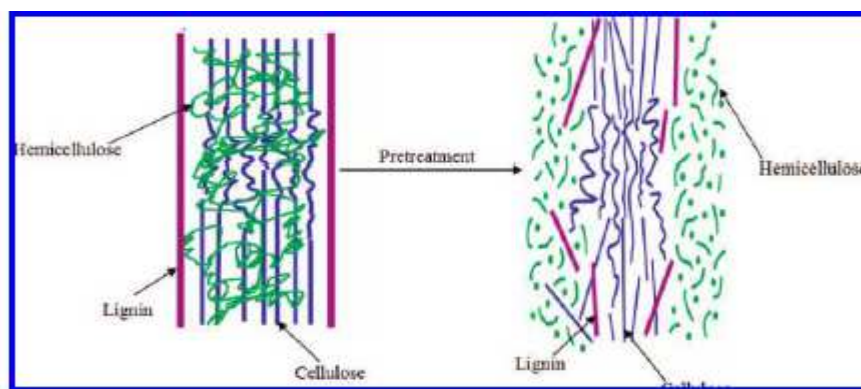


Figura 2.2 – Efeito do pré-tratamento na lenhina e na hemicelulose [9].

Um tratamento prévio deve cumprir os seguintes requisitos: melhorar a hidrólise enzimática, minimizar as perdas de carboidratos e evitar a formação de subprodutos indesejáveis que poderão inibir as etapas da hidrólise e fermentação [16].

Independentemente do processo de hidrólise utilizado (quer seja ácido ou enzimático), uma etapa de pré-tratamento é imprescindível. Existem vários métodos de pré-tratamento: físicos (trituração e moagem), físico-químicos (pré-tratamento com vapor/auto-hidrólise, hidrotermólise e oxidação húmida), químicos (alcalinos, ácidos, por agentes oxidantes e solventes orgânicos), biológicos, eléctricos ou uma combinação destes [9].

O pré-tratamento da biomassa celulósica consiste numa das etapas operacionais mais relevantes em termos de custo directo, além de influenciar consideravelmente os custos das etapas anteriores e subsequentes do processo. O seu desempenho deve ser avaliado em função da sua influência sobre os custos associados às etapas precedentes e subsequentes, bem como sobre os custos operacionais, de matéria-prima e de capital e do próprio pré-tratamento [20].

### **2.2.1. Pré-tratamento físico**

A aplicação de um pré-tratamento físico ao material lenho-celulósico consiste em triturar, moer ou reduzir as dimensões deste. O objectivo é reduzir a cristalinidade das fibras de celulose na biomassa.

A redução do tamanho do material é necessária para eliminar as limitações à transferência de massa e calor durante as reacções de hidrólise [21]. O tamanho dos materiais resultantes é tipicamente 10-30 mm após estilhaçamento e 0,2-2 mm após moagem ou trituração [19].

A maior desvantagem associada a este método relaciona-se com o elevado consumo energético [22].

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

Os quatro tipos de pré-tratamentos físico-químicos discutidos na literatura são a explosão a vapor (*steam explosion*), a explosão da fibra por amónia (AFEX), explosão por CO<sub>2</sub> e a hidrotermólise.

Na explosão a vapor, a dimensão da biomassa é reduzida, quando esta é submetida a vapor saturado de alta pressão durante um curto período de tempo seguida de uma queda súbita na pressão, provocada por uma descompressão [23]. As condições típicas são temperaturas na gama dos 160-260 °C e pressões entre 0,69-4,83 MPa [19].

Os factores que afectam este pré-tratamento são: o tempo de residência, a temperatura, o tamanho da partícula e a humidade da mesma.

Este processo provoca a transformação de lenhina e a degradação da hemicelulose devido às altas temperaturas, melhorando a hidrólise da celulose [16].

As vantagens inerentes a este método incluem o baixo uso de energia em comparação com os processos mecânicos. Os processos mecânicos convencionais requerem 70% mais de energia comparativamente com a explosão a vapor, para alcançar a mesma redução de tamanho das partículas [9]. Contudo, apresenta como limitações a destruição de uma fracção do xilano, incompleta disrupção da matriz lenhina-carbohidrato, e geração de subprodutos inibitórios que poderão ter impacto nas etapas a jusante do processo [24].

A explosão da fibra por amónia e a explosão por CO<sub>2</sub> são processos similares à explosão a vapor. A biomassa é exposta à amónia líquida ou ao dióxido de carbono a alta temperatura e pressão durante um curto período de tempo, seguida de um abaixamento súbito da pressão.

Contrariamente à explosão a vapor, o processo AFEX não promove a solubilização da hemicelulose [25], mas requer a recuperação da amónia por razões de custo e ambientais [19]. A explosão por CO<sub>2</sub> não é tão eficaz como a explosão a vapor e o AFEX [26].

No pré-tratamento por hidrotérmólise (*Hot Water*), também designada como solvólise não-catalítica ou aquasolv, a água comprimida entra em contacto com a biomassa durante 1-15 minutos sob temperaturas entre 170 e 230 °C. Neste processo, 90% das hemiceluloses são recuperadas quando um ácido é empregue como catalisador; cerca de 40-60% da biomassa total é dissolvida, a remoção da celulose varia entre 4-22% e, durante o pré-tratamento, uma grande quantidade de lenhina pode ser removida (35-60%) [5]. Neste processo não existe necessidade de reduzir o tamanho das partículas da biomassa, as quais tendem a romper ao entrarem em contacto com a água durante o processo de “cocção”.

Este processo apresenta desvantagens em comparação com o *Steam Explosion*: devem ser utilizadas reduzidas cargas de sólidos (1-8%), devido à formação de inibidores nos hidrolisados produzidos ao utilizar-se concentrações de sólidos superiores a 10%; exige um consumo de água elevado, que produz hidrolisados muito diluídos, gerando problemas nas etapas subsequentes [19] [27].

### **2.2.3. Pré-tratamento químico**

O pré-tratamento químico da matéria lenho-celulósica inclui o uso de ozono, ácidos, bases, solventes orgânicos e peróxidos [16].

#### **2.2.3.1. Ozonólise**

A utilização de ozono constitui uma forma eficaz de pré-tratamento na remoção de lenhina

presente nos resíduos lenho-celulósicos (palha de trigo, bagaço, amendoim, pinho, palha de algodão), sem formação de subprodutos tóxicos [28]. No entanto este processo limita-se essencialmente à degradação de lenhina. A hemicelulose é ligeiramente afectada, mas a celulose não.

A vantagem deste pré-tratamento é a possibilidade da sua realização à temperatura ambiente e a pressão normal [9]. No entanto, o uso de ozono em grande quantidade torna o processo caro [19].

#### **2.2.3.2. Hidrólise alcalina**

Algumas bases podem ser usadas no pré-tratamento do material lenho-celulósico e o efeito deste pré-tratamento depende do teor de lenhina no material [19]. O principal efeito deste processo consiste na remoção da lenhina da biomassa, promovendo uma maior reactividade da fibra. A base tende a causar um inchamento (*swelling*) da biomassa, de modo que a cristalinidade da celulose decresce, enquanto ocorre um incremento da superfície específica de contacto e da porosidade da mesma [22].

Este processo utiliza condições moderadas de operação, em termos de pressão e temperatura, quando comparado com outras tecnologias. No entanto, é possível realizar o pré-tratamento alcalino nas condições ambientes embora o processo se torne mais lento, da ordem de horas ou mesmo dias [9].

Contrariamente aos sistemas ácidos, uma limitação associada aos processos alcalinos consiste na necessidade de recuperar a base, de modo a tornar o processo mais económico.

Visto que os processos alcalinos promovem uma intensa deslenhificação da biomassa, estes devem ser preferencialmente usados no pré-tratamento de materiais com reduzido teor de lenhina (ex: resíduos agro-industriais), com vista à minimização da quantidade da mesma, presente no hidrolisado.

Hidróxido de sódio, cálcio, potássio e amónio são alguns dos agentes alcalinos usados. Destes quatro agentes, o hidróxido de sódio tem sido o mais usado. Contudo, o hidróxido de cálcio (*lime*) tem mostrado ser um agente eficaz e apresenta vantagens em termos de custo de reagente, segurança do processo e possibilidade de recuperar a base sob a forma de carbonato de cálcio, mediante reacção com dióxido de carbono produzido na etapa da fermentação alcoólica. O carbonato pode posteriormente ser convertido em hidróxido através de técnicas convencionais estabelecidas na indústria. A adição de oxigénio ou ar (*Wet Alkaline Oxidation*) tende a promover uma redução da lenhina da ordem de 80%. Este processo consiste no tratamento da biomassa com água e oxigénio a temperaturas superiores a 120 °C. Uma variação do método consiste no uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante (*Wet*

*Alkaline Peroxide Oxidation*) com tempos de reação de 2-8 horas e temperaturas na gama 30-70 °C. Geralmente, usa-se o carbonato de sódio, hidróxido de cálcio (*lime*) ou de sódio como agente de hidrólise e deslenhificação.

Os pré-tratamentos alcalinos oxidativos produzem polpas com elevada reactividade da fibra, em virtude da acessibilidade da matriz celulósica às enzimas. Contudo, uma grande quantidade de lenhina é oxidada e solubilizada durante estes processos, de modo que a mesma não pode ser utilizada como combustível, comprometendo a eficiência energética do sistema global. Adicionalmente, ocorre formação de alguns compostos inibidores (ex: ácidos orgânicos e fenólicos) nos hidrolisados produzidos, comprometendo as etapas seguintes [20].

### **2.2.3.3. Hidrólise ácida**

Os ácidos concentrados como o clorídrico e o sulfúrico têm sido usados para tratar o material lenho-celulósico [9], pois promovem a disrupção das pontes de hidrogénio entre as cadeias de celulose, convertendo-a para um total estado amorfo. Implicam normalmente o uso de ácido sulfúrico a 60 a 90%, temperaturas e pressões moderadas [17].

A principal vantagem do processo de pré-tratamento com ácido concentrado é a elevada eficiência de recuperação do açúcar, a qual pode ser superior a 90% para ambos os açúcares (xilose e glucose).

Apesar de serem poderosos agentes de hidrólise da celulose, têm como contrapartida serem tóxicos, corrosivos, perigosos e, portanto, exigem reactores que sejam resistentes à corrosão, o que torna o processo de pré-tratamento muito caro. Deste modo, o ácido concentrado deve ser recuperado após a hidrólise de modo a tornar o processo economicamente viável.

Como alternativa, tem sido desenvolvida com sucesso a hidrólise com ácido diluído no pré-tratamento da biomassa. Concentrações de ácido sulfúrico geralmente abaixo de 4% têm sido alvo de estudo, pois tornam o processo barato e eficaz [9].

Os processos que usam ácidos diluídos são conduzidos a pressões e temperaturas elevadas, respectivamente 15 a 75 psi e 120 a 200 °C, apresentando tempos de reação na gama dos 30 minutos a 2 horas, em processos contínuos [17].

Este método pode atingir elevadas taxas de reação e melhorar significativamente a hidrólise da celulose. A hemicelulose é removida quando o ácido é adicionado e isto aumenta a digestibilidade da celulose no resíduo sólido. A alta temperatura no tratamento com ácido diluído é favorável para a hidrólise da celulose [9].

O ácido diluído tem sido usado comercialmente para a produção de furfural a partir de materiais celulósicos. O ácido é misturado com a biomassa, para hidrolisar a hemicelulose a

xilose e outros açúcares, e posteriormente continuar a quebrar a xilose para formar furfural [20]. As desvantagens inerentes a este processo relacionam-se com a formação de compostos tóxicos tais como o furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e ácido fórmico, que inibem a fermentação. A remoção destes componentes implica um aumento adicional dos custos [17].

#### **2.2.3.4. Organosolvação**

Os processos de organosolvação têm atraído muita atenção, como método promissor no pré-tratamento do material lenho-celulósico [9]. São originários da indústria da celulose. Este método baseia-se no cozimento da biomassa com o solvente Organosolv, a pressão e temperatura elevada, com posterior recuperação da celulose e da lenhina. O solvente orgânico utilizado é removido e recuperado por evaporação e destilação, sendo reciclado no processo [29], com vista a reduzir os custos e também para minimizar a possibilidade de inibir o crescimento dos microrganismos na hidrólise enzimática e na fermentação.

Neste processo, um composto orgânico ou uma mistura de solventes orgânicos aquosos com ácidos catalisadores inorgânicos (HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) é usado para quebrar as ligações internas da lenhina e da hemicelulose, expondo a celulose a um ataque mais efectivo pelo ácido. Os solventes vulgarmente usados no processo são: o metanol, etanol, acetona, etilenoglicol, trietilenoglicol, e álcool tetrahidrofurfurílico [9], embora o etanol seja o mais usado devido ao seu baixo custo e à sua disponibilidade [29]. Ácidos orgânicos tais como o oxálico, o acetilsalicílico e salicílico também podem ser usados como catalisadores [9].

As condições utilizadas no processo dependem da natureza da matéria a ser processada, mas, na generalidade, enquadram-se nas seguintes gamas: temperatura de cozimento entre os 180-195 °C, tempo de cozimento entre os 30-90 minutos, concentração em etanol 35-70% em peso, e razão líquido-sólido na proporção 4:1 a 10:1 em peso. O pH do licor poderá variar entre os 2 e os 3,8 [9].

A Figura 2.3 ilustra o fluxograma de um processo de organosolvação.

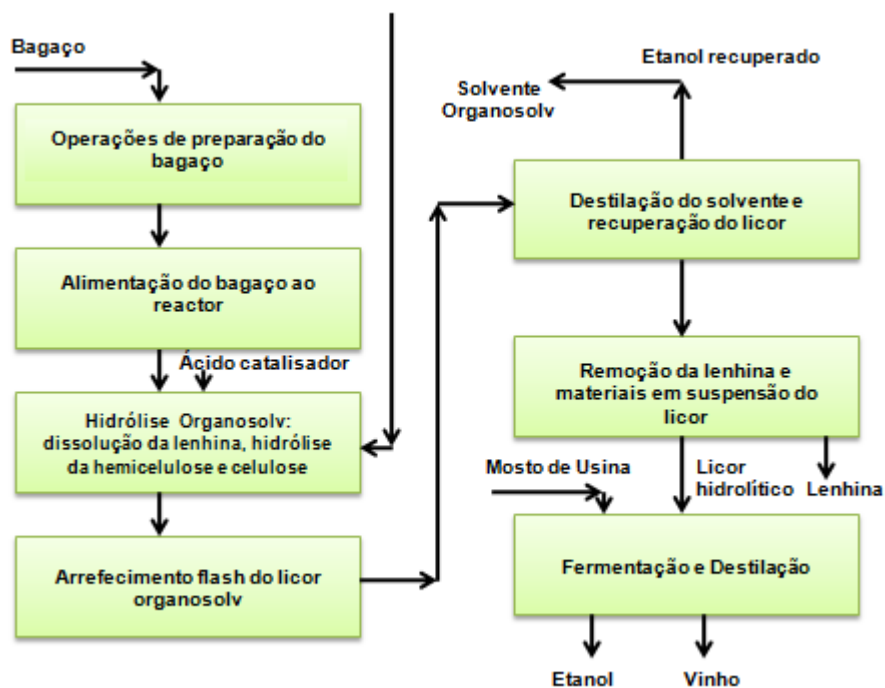


Figura 2.3 – Processo organosolvação. [29]

Através da análise do diagrama, constata-se que a matéria-prima (bagaço) após sofrer um tratamento físico é alimentada a um reator no qual ocorre simultaneamente o pré-tratamento e a hidrólise, por adição de um catalisador ácido e do solvente Organosolv. Daqui resulta a dissolução da lenhina e a hidrólise da celulose e hemicelulose.

Posteriormente, ocorre um resfriamento rápido do licor Organosolv, o que permite controlar as reacções secundárias de decomposição das pentoses em furfural e das hexoses a 5-hidroximetilfurfural. Seguidamente por destilação, o etanol é separado no topo da coluna retornando ao processo. Por sua vez, a lenhina precipita à medida que a fase orgânica vai diminuindo o seu teor em etanol, sendo recolhido no fundo da coluna um licor de hidrólise com os açúcares e a lenhina. A matéria em suspensão (predominantemente lenhina) é removida do licor para não interferir na fermentação.

Os aspectos a serem melhorados são:

- Evitar a decomposição ou reacção química do solvente orgânico;
- Desenvolver um método de recuperação da fase orgânica e dos subprodutos com baixo consumo energético e pequenas perdas de solvente;
- Evitar perdas físicas do solvente, principalmente nos solventes de alta volatilidade, ou perdas por arraste com o licor hidrolítico final.

Considerando que este tratamento é eficiente para a remoção da lenhina, tornando a celulose muito susceptível a ataque posterior, o desenvolvimento deste processo deve ser

direccionado para a procura de novos solventes, que permitam otimizar as condições de pré-tratamento, reduzindo as perdas e o consumo energético [29].

#### **2.2.4. Pré-tratamento biológico**

A maioria das tecnologias de pré-tratamento requer equipamentos caros, e tem um elevado consumo energético em função do processo utilizado. Uma alternativa a estas tecnologias foi o desenvolvimento dos processos biológicos.

O pré-tratamento biológico envolve o uso de microrganismos que selectivamente degradam a lenhina e a hemicelulose [16]. Fungos como “brown-rot”, “white-rot” e “soft-rot” são exemplos de microrganismos usados para degradar a lenhina e a hemicelulose em resíduos. O “brown-rot” ataca principalmente a celulose, o “white-rot” e o “soft-rot” atacam a lenhina e a celulose. A degradação da lenhina pelos fungos “white-rot” ocorre através da acção de enzimas como as peroxidases e lacases. Estas enzimas são reguladas por fontes de carbono e azoto [9].

Estudos realizados mostraram que os fungos “white-rot” são os microrganismos mais eficazes no pré-tratamento de materiais lenho-celulósicos, tais como a madeira [30] ou a palha de trigo [31].

A relação carbono/azoto é um parâmetro importante para o pré-tratamento da biomassa, porque a degradação do material lenho-celulósico depende desta relação. Por cada molécula de carbono degradada, é necessária uma determinada percentagem de azoto pelos microrganismos, e isto varia de acordo com os diferentes tipos de microflora. A relação C/N é de 30:1 para os fungos em comparação com a razão 10:1 para as bactérias, daí que os fungos sejam mais capazes de degradar qualquer material lenho-celulósico, pois a sua dependência do azoto é comparativamente inferior.

O pré-tratamento biológico em combinação com outras tecnologias de pré-tratamento tem vindo a ser alvo de estudo. A vantagem do pré-tratamento biológico é o uso de menor intensidade energética quando comparado com os processos químicos e físico-químicos; para além disso requer condições de reacção moderadas, é seguro e amigo do ambiente. No entanto, o processo é muito mais lento, o que o torna pouco atractivo para uso comercial [16].

De seguida, a Tabela 2.3 mostra o estudo realizado por alguns autores para diferentes pré-tratamentos.

Tabela 2.3 – Tabela referente às condições usadas e resultados obtidos para cada pré-tratamento, segundo alguns autores.

Matéria-prima	Pré-tratamento	Condições ótimas	Resultados	Referência
Folhagens do milho	Explosão da fibra por amónia, "AFEX"	90°C, 5 min. %60 Humidade amostra (base seca) Amónia/massa biomassa=1:1	98% Glucose	[32]
Folhagens de milho	Hidrólise ácido diluído	120 °C 2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 43 min.	77% Xilose 8,4% Glucose	[33]
Rebentos de Oliveira	Hidrólise ácido diluído	180 °C 1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	75% açúcares	[34]
Folhagens de milho	Hidrólise alcalina	0,075g de Ca(OH) <sub>2</sub> /g biomassa seca 5g de H <sub>2</sub> O/g biomassa seca 4h, 120°C	Conversão de polissacarídeos próximo dos 100%.	[35]
<i>Panicum virgatum</i> "Gramíneas"	Hidrólise alcalina	0,1g NaOH/g biomassa Aquecimento por microondas	90% de açúcares	[36]
Colza de palha	Hidrotermólise com adição de catalisador ácido	1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20% Sólidos 10min, 180°C	75,12 % Total xilano convertido em xilose 63,17% Total glucano convertido em glucose	[37]
<i>Panicum virgatum</i> "Gramíneas"	Hidrólise alcalina	0,1g Ca(OH) <sub>2</sub> /g biomassa seca 2h, 100°C	72% Etanol	[38]
<i>Panicum virgatum</i> "Gramíneas"	Hidrólise ácida	1,2% (m/m) Temperatura=180°C	90% Conversão da celulose em açúcares	[39]

A Tabela 2.3 mostra o estudo realizado por alguns autores para diferentes pré-tratamentos. Em cada estudo, analisou-se os resultados obtidos para cada processo resultantes da aplicação de diferentes tipos de matéria-prima e das condições ótimas.

De um modo geral, é perceptível que o processo "AFEX", usando como matéria-prima folhagens de milho resultou num maior rendimento em glucose de 98 %. Contudo, este processo implica, a recuperação da amónia por razões de custos e ambientais.

Para o processo hidrólise ácido diluído, testou-se como recursos folhagens de milho, rebentos de Oliveira e "Gramíneas". De comum, constata-se que as condições usadas foram mais agressivas, e como tal exigem materiais resistentes à corrosão. O rendimento médio deste processo foi de 80 %.

O rendimento médio do processo de hidrólise alcalina foi de 90 %, no entanto as condições usadas apesar de serem menos agressivas, requerem tempos de contacto mais elevados.

### 2.3. Conceito de enzima

As enzimas quimicamente são proteínas, contendo um centro activo, denominado de apoenzima, e algumas vezes um grupo prostético, que pode ser orgânico (coenzima), ou um ião metálico activo. Ao conjunto (apoenzima e coenzima) é dada a designação de haloenzima.

As proteínas são moléculas compostas por aminoácidos, unidos entre si por ligações peptídicas. Os aminoácidos apresentam na sua composição química um grupo carboxílico (-COOH), um grupo amino (-NH<sub>2</sub>) e um grupo radical R, conforme pode visualizar-se na figura 2.4. Os aminoácidos são diferenciados de acordo com o grupo R ligado ao carbono assimétrico [40].

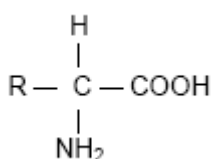


Figura 2.4 – Composição química de um aminoácido [40].

#### 2.3.1. Cinética enzimática

Diferentes factores, tais como: concentração de substrato, pH, temperatura, podem afectar a velocidade de uma reacção a catalisar. A análise quantitativa do efeito destes factores sobre a actividade enzimática é designada por cinética enzimática [40].

##### 2.3.1.1. Influência da concentração de substrato

A concentração de substrato é um dos factores que afecta a velocidade de uma reacção, catalisada por uma enzima. O estudo do efeito da concentração do substrato é difícil, devido à variação da concentração deste factor ao longo da reacção como consequência da sua conversão em produto. A Figura 2.5 mostra o efeito provocado pela concentração de substrato na velocidade inicial de reacção ( $V_0$ ), quando a concentração de enzima é mantida constante.

Através da análise da referida figura constata-se que, para baixas concentrações de substrato, [S], a velocidade inicial da reacção ( $V_0$ ) aumenta quase linearmente com o aumento da concentração de substrato. Por sua vez, para maiores concentrações de substrato,  $V_0$  aumenta por incrementos menores em resposta aos aumentos da concentração de substrato. No entanto, há um ponto acima do qual aumentos da [S] não afectam a variação de  $V_0$ . Este ponto é designado de velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ).

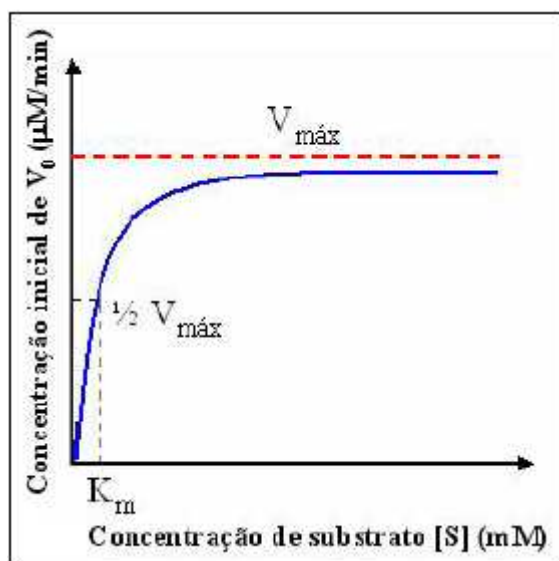


Figura 2.5 – Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reacção, catalisada por via enzimática [41].

A constante de Michaelis-Menten,  $K_m$ , é equivalente à concentração de substrato para a qual  $V_0$  é igual a metade de  $V_{máx}$ , e indica a afinidade de uma enzima para o seu substrato. Quanto menor o valor de  $K_m$ , maior será a afinidade da enzima para o substrato.

A partir do perfil cinético da Figura 2.5, Michaelis e Menten propuseram, em 1913, que a enzima, E, numa fase inicial se combina com o substrato de modo rápido e reversível, formando o complexo enzima-substrato, ES, de acordo com a Equação 2.1.



Posteriormente, num passo mais lento, o complexo ES é separado e origina a enzima na forma livre e o produto de reacção, P, de acordo com a Equação 2.2.



Em qualquer instante, a enzima pode existir sob duas formas: forma livre, E, ou ligada ao substrato, ES. Para baixas concentrações de substrato, a maior parte da enzima encontra-se na forma livre, E. Nestas condições, a velocidade de reacção será proporcional à [S], pois segundo a equação 2.1, à medida que a concentração de substrato aumentar, o equilíbrio será deslocado na direcção de formação de mais ES.

A velocidade inicial máxima de reacção ( $V_{máx}$ ) será atingida quando praticamente todas as moléculas de enzima estiverem na forma do complexo ES, e então a concentração da enzima livre, E, é insignificante. Neste caso, diz-se que a enzima está “saturada” com o substrato e a velocidade da reacção não aumenta mais com os aumentos da [S] [41].

### 2.3.1.2. Influência do pH

Um parâmetro que tem influência na actividade das enzimas é o pH. Toda a enzima como proteína tem um valor de pH para o qual a sua conformação é ideal e a sua actividade catalítica é máxima. Este valor de pH é designado de óptimo.

As variações do pH do meio desencadeiam oscilações no estado de ionização dos componentes do sistema, visto que a enzima como proteína possui grupos químicos ionizáveis (carboxílicos, amino, radical R) nas cadeias laterais. Estes grupos, dependendo do pH do meio, podem conter carga eléctrica positiva, negativa ou neutra [42].

A Figura 2.6 apresenta uma curva experimental da velocidade de reacção inicial ( $V_0$ ), em função da variação do pH (curva A) e a curva de estabilidade para uma enzima (curva B).

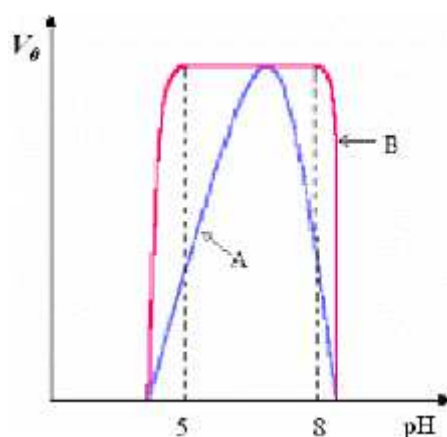


Figura 2.6 – Efeito do pH na estabilidade de uma enzima: curva A – actividade da enzima e curva B -  $V_0$  a pH = 6,8 após incubação a outros valores de pH [41].

Através da análise do diagrama, observa-se que a pré-incubação da enzima a pH 5 ou 8 não produz nenhum efeito na actividade medida a pH 6,8. Entre a gama de pH 6,8 e 8 e entre pH 5 e 6,8, verifica-se um declínio da actividade que pode ser explicado como resultado da constituição de uma forma iónica não adequada da enzima e/ou substrato. Quando a enzima é incubada a pH superior a 8 ou inferior a 5, a actividade total não é obtida a pH 6,8. Então, parte do declínio na actividade acima de pH = 8 e abaixo de pH = 5 resulta de uma inactivação irreversível da enzima [40].

### 2.3.1.3. Influência da temperatura

Tal como o pH, a temperatura é um factor que afecta directamente a actividade catalítica das enzimas.

Um aumento da temperatura promove um aumento da velocidade de reacção química como consequência do aumento da energia cinética das moléculas componentes do sistema. As

reações catalisadas por enzimas comportam-se de modo semelhante [41].

A actividade catalítica das enzimas é devida à estrutura terciária, altamente ordenada, que justapõe os grupos R específicos dos aminoácidos de modo a formar sítios estereoespecíficos de ligação com o substrato e o centro activo. Um aumento excessivo da temperatura reflecte-se na estabilidade da proteína, visto ocorrer uma ruptura das ligações químicas que mantém a estrutura tridimensional da mesma [40], desencadeando assim uma desactivação térmica e a aquisição de uma nova conformação ou de um estado sem estrutura definida.

Assim sendo, todas as enzimas têm uma temperatura óptima de operação, que corresponde a uma actividade constante por um período de tempo mais o menos longo [42].

#### **2.3.1.4. Presença de inibidores**

Os inibidores podem ocupar temporariamente o centro activo da enzima por apresentarem uma semelhança estrutural com o substrato original (inibidor competitivo) ou então alterarem a conformação da enzima, impedindo a sua união ao substrato (inibidor não competitivo) [42].

#### **2.3.2. Hidrólise Enzimática**

A hidrólise enzimática é uma alternativa ambientalmente amigável comparativamente à hidrólise química, que envolve o uso de enzimas (celulases e hemicelulases) para degradar o material lenho-celulósico pré-tratado, em açúcares fermentáveis. A aplicação de um tratamento prévio facilita a penetração das enzimas no centro activo da biomassa, tornando esta mais susceptível à hidrólise.

Normalmente, a hidrólise enzimática sem um tratamento prévio resulta num rendimento em açúcares inferior a 20% da quantidade máxima teórica, enquanto a aplicação de um pré-tratamento resulta num rendimento em açúcares superior a 90% da quantidade máxima teórica. Assim, a aplicação de um pré-tratamento antes da hidrólise enzimática é necessária para a obtenção do máximo rendimento em açúcares [17]. O rendimento da hidrólise enzimática é da ordem de 0,85 g glucose/g celulose [29].

A hidrólise enzimática pode ser realizada usando enzimas em duas formas distintas: sob a forma solúvel ou sob a forma imobilizada. O uso de enzimas sob forma solúvel é o método convencional, mas o recente desenvolvimento, a preços competitivos, das enzimas na forma suportada – em que a enzima pode ser reutilizada, diminuindo assim o seu custo – mostrou resultados promissores em muitas indústrias.

No entanto, as desvantagens inerentes ao uso da enzima imobilizada prendem-se com as

limitações à transferência de massa, à dispersão da enzima, à indisponibilidade da versatilidade comercial das mesmas, e o facto de alguns métodos de imobilização envolverem produtos químicos tóxicos.

É necessária mais investigação sobre as diversas técnicas de imobilização, e a produção de enzimas imobilizadas versáteis é crucial para alcançar elevadas taxas de conversão.

A hidrólise enzimática solúvel apresenta vantagens relativamente à hidrólise química, nomeadamente o facto de necessitar de materiais de construção menos dispendiosos devido às condições moderadas do processo, o etanol produzido apresentar qualidade superior, ser um processo menos corrosivo, e requerer menor investimento no tratamento da água residual. Além disso, é possível a sacarificação e a fermentação simultânea.

Em contrapartida, apresenta um elevado custo da enzima, o seu uso pode variar dependendo do tipo de matéria-prima a usar. Além disso, o processo enzimático leva mais tempo para ser completado e os produtos inibitórios, que podem até ser produzidos no processo, podem diminuir a actividade da enzima. [1]

Diversos factores podem influenciar a hidrólise enzimática de materiais lenho-celulósicos, entre os quais se destacam as características específicas do substrato e o comportamento das enzimas durante a sacarificação.

De entre os factores relacionados com o substrato, podem citar-se as alterações na sua porosidade e área superficial durante a hidrólise [19], [43] e [44], a acumulação de lenhina no meio reaccional [45] a [48], e mudanças no grau de polimerização e na cristalinidade da celulose [8], [49] e [50].

Os factores associados às enzimas correspondem à inibição retroactiva devida à acumulação dos produtos (glucose e celobiose) no meio reaccional [27] e [51] a [53], à desnaturação térmica das enzimas em reacções usualmente muito longas, ao efeito da agitação mecânica sobre a actividade enzimática [54] a [56] e à adsorção irreversível sobre a lenhina e/ou complexos lenhina-carbohidrato [55] e [57] a [59].

### **2.3.2.1. Hidrólise Enzimática da celulose**

A hidrólise enzimática da celulose é normalmente realizada por celulasas. As celulasas podem ser produzidas por diversas espécies bacterianas como o *Clostridium*, *Cellulomonas* e *Bacillus* [60], no entanto as celulasas fúngicas têm melhor potencial para uso em escala comercial [61].

As celulasas são um complexo sistema de três enzimas que actuam sinergicamente na hidrólise da celulose. As três enzimas são: 1,4- $\beta$ -D-glucanohidrolase, 1,4- $\beta$ -D-glucanocelobiohidrolase e  $\beta$ -glucosidase [62] e [63]. São usualmente referidas como endoglucanase, exoglucanase e celobiase, respectivamente [16].

As endoglucanases actuam aleatoriamente ao longo das cadeias de celulose, gerando um decréscimo significativo do seu grau de polimerização. Por sua vez, as celobiohidrolases, cuja acção catalítica é capaz de hidrolisar preparações celulósicas microcristalinas, actuam nas regiões terminais das moléculas de celulose, promovendo a sua despolimerização gradativa através da remoção de unidades de celobiose terminais. Finalmente, as  $\beta$ -glucosidases hidrolisam a celobiose a glucose, reduzindo assim o efeito inibidor da celobiose sobre as endo e exoglucanases [64]. Estas três classes de enzimas, através das suas propriedades complementares, apresentam um alto grau de sinergismo durante a hidrólise da celulose [65]. No entanto, apenas as endo e exoglucanases são capazes de adsorver sobre o substrato, sendo assim consideradas como celulases verdadeiras [66].

### 2.3.2.2. Hidrólise Enzimática da hemicelulose

A hidrólise completa do xilano envolve três enzimas principais: endo- $\beta$ -1,4-xilanase, que visa essencialmente quebrar as ligações internas  $\beta$ -1,4 entre as unidades de xilose, a exoxilanase, que é responsável pela libertação das unidades de xilobiose e a  $\beta$ -xilosidase que liberta a xilose a partir da xilobiose e cadeias curtas de xilooligosacarídeos.

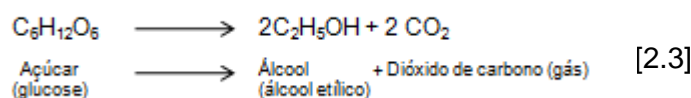
Enquanto estas enzimas estão principalmente envolvidas na despolimerização, há diversas enzimas auxiliares que são responsáveis pela clivagem de grupos secundários [67].

## 2.4. Fermentação

A fermentação alcoólica é um processo microbiológico através do qual, os seres vivos unicelulares, as leveduras, obtém a sua energia.

De entre os metabolitos secretados pelas leveduras, o etanol é produzido em maior quantidade. Apesar disso, é normal que uma pequena percentagem seja convertida em outros produtos. Estes incluem: glicerol, ácidos orgânicos (como succínico, acético, láctico, butírico, etc.), álcoois superiores (amílico, isoamílico, butírico, isobutírico, propílico e isopropílico), aldeídos, ésteres, entre outros compostos voláteis [68].

A equação abaixo representada, mostra a reacção que ocorre durante o processo fermentativo.



Teoricamente, 1 kg de glucose produzirá 0,51 kg de etanol e 0,49 kg de dióxido de carbono

[6].

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Zymomonas mobilis* são capazes de fermentar eficientemente a glucose a etanol, mas incapazes de fermentar a xilose [16]. A primeira é também conhecida por apresentar elevada tolerância ao etanol e aos inibidores [69].

Outras leveduras, tais como *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis* e *Candida shehate*, são conhecidas por fermentarem a xilose a etanol [70] e [71]. No entanto, constatou-se a existência de dificuldades associadas ao uso comercial destas leveduras para fermentar a xilose. Isto devido à sua baixa tolerância ao etanol, às dificuldades na optimização dos parâmetros da fermentação e à morosidade na fermentação. Uma alternativa seria converter a xilose num isómero designado de xilulose usando xilose isomerase [72] a [74]. A xilulose pode ser fermentada pelas leveduras tradicionais. Alguns autores têm afirmado que esta alternativa não é rentável em termos de custos e é necessário apostar no desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados capazes de fermentar hexoses e pentoses a etanol.

A *Saccharomyces cerevisiae* é de particular interesse nesta matéria e os recentes desenvolvimentos vêm no sentido de criar esforços para melhorar a capacidade deste microrganismo fermentar as pentoses [75] e [76].

#### **2.4.1. Factores que afectam a fermentação**

São vários os factores que afectam a fermentação. Destacam-se pelos efeitos potencialmente adversos, a presença de oxigénio, a temperatura e o pH do meio.

##### **2.4.1.1. Oxigénio**

Para preparação de culturas *starter* (ou inoculo) e no controlo da fermentação alcoólica, é importante considerar a função do oxigénio no controlo do metabolismo e crescimento da levedura. Quando o oxigénio está disponível, o metabolismo da levedura direcciona-se para a respiração, rendendo teoricamente 38 moles de ATP para cada mol de glucose, deste modo, permite uma maior velocidade de crescimento, maior produção de biomassa, e a síntese de materiais de reserva, como esteróis e ácidos gordos. Desta forma, o arejamento é usado na preparação de culturas *starter* quando é requerida uma quantidade maior de biomassa.

O objectivo do arejamento e agitação na fermentação é, primeiramente fornecer oxigénio aos microrganismos, e agitar o caldo da fermentação de forma que uma suspensão uniforme de microrganismos esteja dispersa no meio [68].

#### 2.4.1.2. Temperatura

As leveduras operam geralmente a temperaturas próximas da temperatura ambiente 25/30 °C. O uso de temperaturas elevadas pode trazer inconvenientes graves como fermentações secundárias, vulnerabilidade do mosto às infecções acéticas, ou até mesmo a morte dos microrganismos. A temperaturas mais baixas as reacções tornam-se muito lentas [68].

#### 2.4.1.3. pH

Outro factor que afecta a actividade das leveduras é o pH. Dependendo da acidez ou basicidade do meio onde se desenvolve o processo fermentativo, o desenvolvimento de microrganismos é influenciado.

Para multiplicação das leveduras o meio deve ser fracamente ácido:  $4 \leq \text{pH} \leq 6$  [68].

Além da hidrólise e fermentação separadas (SHF), outras abordagens incluem a conversão directa microbiana (DMC) e a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). A DMC envolve o uso de microrganismos que produzem simultaneamente a celulase, para hidrolisar a celulose a açúcares que posteriormente serão fermentados a etanol. *Clostridium thermocellum* e *Clostridium thermosaccharoliticum* têm sido usados no estudo da DMC [77]. No entanto, esta abordagem apresenta limitações em termos de subproduto formado e baixa tolerância ao etanol [16].

Os processos de SHF permitem que cada etapa (hidrólise e fermentação) seja realizada nas suas condições óptimas. Contudo tem como limitações, o facto de durante a hidrólise enzimática, a glucose, xilose, celobiose e outros oligossacarídeos libertados no processo, promoverem uma forte inibição das enzimas envolvidas no mesmo, obtendo-se assim baixos rendimentos.

O processo de SSF combina no mesmo reactor a hidrólise enzimática com a fermentação do açúcar a etanol, para manter a concentração de açúcares baixa, e portanto, superar a inibição enzimática. Assim, este processo é uma boa estratégia para aumentar a taxa global de conversão da celulose a etanol. No entanto a desvantagem deste processo está associada às diferentes condições óptimas de pH e temperatura, empregues em cada uma das etapas. De modo a superar este problema é necessário usar uma condição compatível com as duas etapas. Dado que hidrólise enzimática se realiza próximo dos 50 °C e que as leveduras convencionais produtoras de etanol operam entre os 25 e 34 °C, é recomendável o uso de microrganismos termotolerantes para operarem eficientemente numa só etapa. [78] Devido à redução da inibição da glucose na hidrólise enzimática durante a SSF, ao efeito de desintoxicação da fermentação, e aos efeitos positivos dos inibidores presentes no hidrolisado pré-tratado sobre a fermentação, o processo de SSF revelou-se um processo

melhor que o de SHF [17].

## **2.5. Destilação**

O etanol hidratado, recuperado da fermentação a nível industrial requer ser purificado e concentrado. Convencionalmente, é usada uma destilação.

Numa primeira fase, o caldo da fermentação é destilado, obtendo-se etanol a 95%.

Posteriormente, este azeótropo etanol-água é quebrado pela adição de uma pequena quantidade de benzeno ou ciclohexano, que promove a elevação da concentração de etanol para 99,5%.

Após esta concentração, o etanol está pronto para ser utilizado como combustível e misturado com a gasolina [18].

### 3. Métodos analíticos

As determinações analíticas das concentrações de açúcares, etanol, glicerol, etc., podem ser feitas usando distintos métodos analíticos que se apresentam brevemente de seguida.

#### 3.1. FTIR

Quando é utilizada a espectroscopia de infravermelhos, a glucose e outros açúcares podem ser identificados e medidos usando a espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR). Uma pesquisa pode revelar algumas bandas de absorção de sacarídeos (mais especificamente da glucose) nas proximidades e na gama de infravermelho. Estas estão situadas nos 1040, 1085, 1109, 1160 e 1365  $\text{cm}^{-1}$ . Existe um pico no espectro que é mais específico da glucose, entre os 997 e os 1062  $\text{cm}^{-1}$ . O problema é que as variações espectrais, registadas para os diferentes componentes e monómeros sacarídeos, são extremamente pequenas. Apenas na frequência de 1040  $\text{cm}^{-1}$  não são detectados nenhuns dos outros sacarídeos activos no infravermelho.

No entanto, as outras bandas de absorção, especialmente a de 1109  $\text{cm}^{-1}$  de frequência, também podem ser utilizadas para a identificação e medição da glucose, se as absorções sobrepostas forem compensadas. O FTIR também pode ser utilizado como método para determinar a concentração da glucose, bem como para simultaneamente identificar e quantificar muitos sacarídeos em fluidos biológicos [79].

#### 3.2. Refractometria

A refractometria é uma técnica que permite determinar a composição e pureza, através do índice de refração (IR). O índice de refração de uma substância é fortemente influenciado pela temperatura e pelo comprimento de onda da luz utilizada para a medição, por isso é preciso compensar a diferença de temperatura e de comprimento de onda. As medições do IR são normalmente realizadas a uma temperatura de referência de 20 °C e no comprimento de onda de referência de 589,3 nm.

Os refractómetros são frequentemente utilizados pelos cultivadores de fruta, para os chamados testes de Brix, para ter conhecimento dos níveis de sacarose na fruta. Existem também medidores que determinam directamente os graus Brix, estes medem a razão entre o açúcar dissolvido e a água de um líquido. Uma vez que o Brix está relacionado com a concentração dos sólidos dissolvidos (na maioria sacarose) num líquido, está por isso relacionado com a gravidade específica de um líquido. Logo como a gravidade específica da solução de sacarose é conhecida, os graus Brix também podem ser medidos por

refractômetros [79].

### **3.3. Métodos químicos**

Os métodos químicos são normalmente utilizados no doseamento de açúcares redutores. Estes baseiam-se nas propriedades redutoras dos açúcares sobre os halogéneos e certos iões de metais pesados, normalmente o ião cúprico. A determinação da concentração dos açúcares pode ser feita através dos métodos Somogyi-Nelson e Lane – Eynon [80].

### **3.4. Métodos cromatográficos**

Entre os métodos cromatográficos destacam-se a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Cada técnica apresenta vantagens em diferentes situações, e por isso, a sua utilização deve ser aplicada a cada caso específico [81].

#### **3.4.1. Cromatografia gasosa (GC)**

A cromatografia gasosa é uma técnica precisa para a quantificação da galactose e é um método de referência para a glucose. Os açúcares devem ser derivatizados previamente, dado que a análise quantitativa directa da glucose através de cromatografia gasosa – com detector de espectroscopia de massa não é possível. O método da derivatização consome bastante tempo de operação, mas é uma alternativa ao método de HPLC, que não consegue identificar muitos açúcares na biomassa hidrolisada [79].

#### **3.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

Os sistemas de HPLC são formados por vários componentes com funções definidas, mas que estão inter-relacionadas, e que se encontram representados na Figura 3.1.

Os componentes do sistema de HPLC (bomba, injector, coluna termostaticada e detector) estão conectados através de curtas tubagens de transferência, tradicionalmente construídas em aço inoxidável [82].

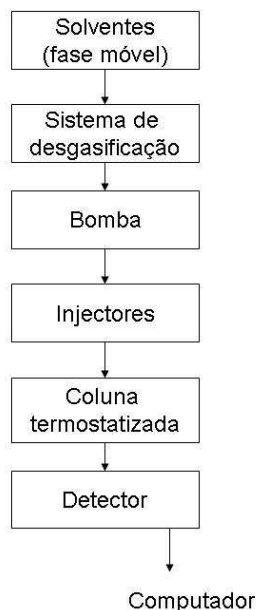


Figura 3.1 – Esquema de um sistema de HPLC [82].

### 3.4.2.1. Injectores para HPLC

A amostra é colocada no *loop* da válvula de injeção por meio de uma seringa (ver Figura 3.2), quando esta está em posição de carga (posição: *load*). Rodando o manípulo da válvula para a posição de injeção (posição: *inject*), dá-se uma alteração no trajecto do eluente no interior desta e a amostra é então arrastada para a coluna. O eluente, que é continuamente bombeado para a coluna, vai arrastar os componentes da amostra (designados vulgarmente por solutos) primeiro para o topo e depois ao longo da coluna [83]. A gama do volume do *loop* está entre os 10  $\mu\text{l}$  e os 500  $\mu\text{l}$ . Nos sistemas modernos de HPLC, a injeção da amostra é automática [84].

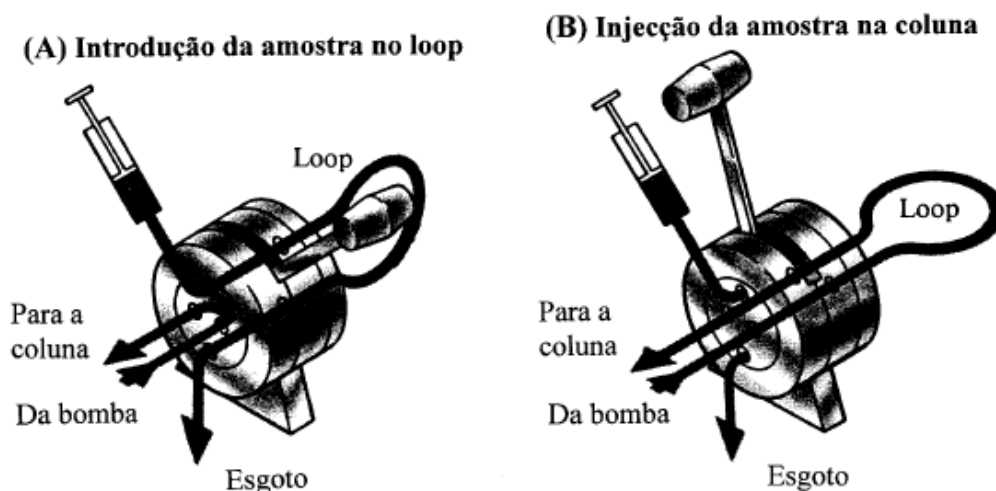


Figura 3.2 – Representação esquemática da válvula de injeção e do processo de introdução de amostra na coluna de HPLC [83].

### 3.4.2.2. Fase móvel

Nesta técnica analítica, a fase móvel refere-se ao solvente que é introduzido continuamente na coluna, ou fase estacionária. A fase móvel transporta a solução de amostra. Quando a solução de amostra flui através da coluna com a fase móvel, os componentes dessa solução migram de acordo com interações não covalentes do componente com a coluna. As interações químicas da amostra e da fase móvel, com a coluna, determinam o grau de separação e migração dos componentes contidos na amostra. Por exemplo, as amostras que têm interações mais fortes com a fase móvel do que com a fase estacionária vão eluir da coluna mais rapidamente, e têm um tempo de retenção mais curto. A fase móvel pode ser alterada, de maneira a manipular as interações da amostra e da fase estacionária [85].

Existem vários tipos de fases móveis:

- Isocráticas;
- Gradiente;
- Politépicas.

Numa eluição isocrática, os compostos são eluídos usando uma composição constante da fase móvel. Neste tipo de fase móvel todos os componentes começam a migração através da coluna no início. No entanto cada componente migra a um ritmo diferente, resultando em razões de eluição mais rápidas ou mais lentas. Este tipo de eluição é ao mesmo tempo simples e barata, mas a resolução de certos compostos é questionável e pode não se conseguir obter a eluição em tempo razoável. [85]

Na eluição de gradiente são eluídos, componentes diferentes com base no aumento da força do solvente orgânico. A amostra é injectada, enquanto que uma fase móvel mais fraca é aplicada ao sistema. A força da fase móvel é aumentada aos poucos mais tarde, através do incremento da fracção de solvente orgânico, que consequentemente resulta na eluição dos compostos retidos. Isto é feito normalmente num *stepwise* ou de forma linear. No início da introdução da amostra, os compostos estão retidos no interior da coluna. À medida que a capacidade do soluto dos compostos decresce, estes começam a migrar através da fase estacionária. Cada um dos outros compostos na amostra migra à medida que o valor da sua capacidade de soluto diminui. Em comparação com a eluição isocrática, a resolução e a separação é neste caso melhor e a largura das bandas é praticamente igual [85].

A fase móvel politépica, que por vezes é chamada de cromatografia de modo de mistura, é um método muito versátil em que vários tipos de técnicas de cromatografia, ou modos, podem ser empregues utilizando a mesma coluna. Estas colunas contêm resinas hidrofóbicas macroporosas rígidas com ligações covalentes à camada orgânica hidrofílica [85].

### **3.4.2.3. Fase estacionária**

A fase estacionária em HPLC refere-se ao suporte sólido contido dentro da coluna, através do qual flui continuamente a fase móvel. As colunas contêm vários tipos de fases estacionárias, algumas das mais comuns são: líquido-líquido, líquido-sólido (adsorção), exclusão por tamanho, fase normal, fase inversa, permuta iónica e por afinidade [86]. Neste trabalho foi usada uma coluna de permuta iónica como fase estacionária.

A fase estacionária de permuta iónica opera com base numa troca selectiva de iões, entre a fase estacionária e a amostra. A permuta iónica é realizada com colunas que contêm grupos funcionais com carga eléctrica, ligados a uma matriz polimérica. Os iões funcionais estão permanentemente ligados à coluna e cada um está ligado a um ião de sinal contrário. A amostra é retida através da reposição dos iões de sinal contrário da fase estacionária pelos seus próprios iões. A amostra é eluída da coluna através da mudança das propriedades da fase móvel, esta irá substituir os iões da amostra da fase estacionária, (isto é mudando o pH) [86].

### **3.4.2.4. Detectores**

Para HPLC o detector é o componente que emite uma resposta à eluição dos componentes da amostra e conseqüentemente transmite o sinal de um pico para o cromatograma. O detector está posicionado imediatamente depois da fase estacionária, de maneira a detectar os componentes, à medida que estes eluem da coluna. A largura das bandas e a altura dos picos podem ser usualmente ajustados e os controlos podem fazer uma sintonização mais fina; os parâmetros de detecção e de sensibilidade também podem ser controlados (na maioria dos casos). Existem muitos tipos de detectores que podem ser utilizados em HPLC. Alguns dos mais comuns são: índice de refração (IR), ultra-violeta (UV), fluorescência, radioquímica, electroquímica, infravermelho próximo (NIR), espectroscopia de massa (MS), ressonância magnética nuclear (NMR) e de dispersão de luz (LS) [87].

Na determinação dos açúcares é vulgarmente usada como detector o IR. No entanto, neste trabalho optou-se por se usar um detector de dispersão de luz por evaporação (ELS) que, para além do detector de IR (que não estava disponível) é um dos detectores indicados para a quantificação de açúcares.

Os detectores de índice de refração têm uma ampla gama linear, são também praticamente universais mas não são muito sensíveis e têm algumas flutuações da sua linha de base, que podem ser provocadas por modificações físicas do eluente (isto é na temperatura, pressão e mudanças na composição do eluente). O gradiente de eluição deve ser levado em consideração, uma vez que este pode causar problemas na análise de misturas de açúcares complexos [88].

O detector ELS, representado esquematicamente na Figura 3.3, oferece vantagens em relação ao também usado detector de índice de refração, tais como sensibilidade e possibilidade de operação em modo de gradiente. É um detector de massa semi-universal, extremamente sensível para solutos não voláteis em correntes líquidas voláteis, tais como lípidos, oligossacarídeos e hidratos de carbono.

A operação deste detector baseia-se na detecção das moléculas do soluto pela dispersão de luz depois de uma nebulização e evaporação da fase móvel [89].

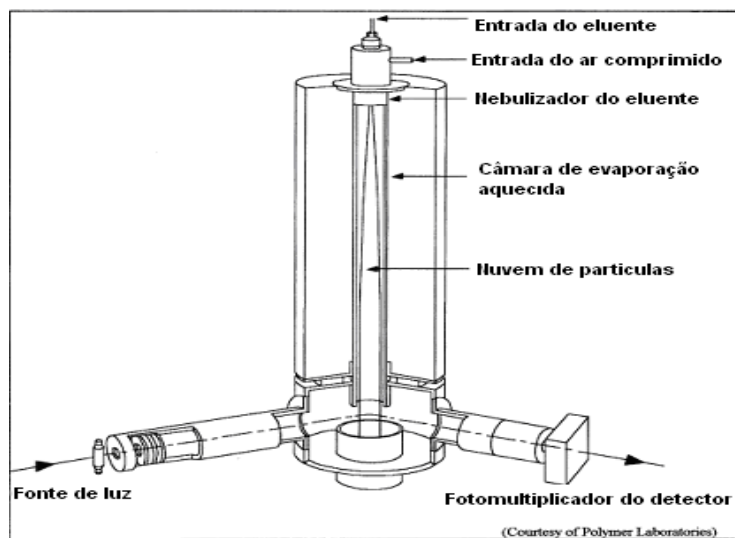


Figura 3.3 – Detector ELS [90].

## **4. Parte Experimental**

Neste capítulo descreve-se o trabalho experimental realizado, incluindo a descrição dos procedimentos e dos materiais utilizados em cada fase do trabalho. Assim, o procedimento completo consistiu na aplicação de um pré-tratamento mecânico da biomassa, seguido de um pré-tratamento testando quatro técnicas distintas (com vista à determinação da técnica mais adequada ao tipo de matéria-prima usada para a produção do bioetanol), a que se seguiu uma etapa de hidrólise enzimática e, finalmente, fermentação e a destilação.

São também apresentados os principais resultados e sua discussão e as conclusões extraídas após a análise dos resultados.

### **4.1. Materiais e métodos**

Nesta secção descrevem-se os materiais e métodos utilizados na execução experimental deste trabalho.

#### **4.1.1. Tratamento mecânico**

As dimensões da amostra são um factor que poderá condicionar as etapas precedentes do processo. A aplicação de um tratamento mecânico, visa promover uma redução da cristalinidade das fibras de celulose na biomassa.

A amostra usada é proveniente de uma das fases do processo de compostagem da empresa de gestão de RSU da associação de municípios do Porto, Lipor. Essencialmente é originária de resíduos de jardinagem e da recolha selectiva de restaurantes, cantinas, pomares, e resultou da saída da etapa de maturação (3º composto).

A amostra foi homogeneizada de modo a que qualquer toma pudesse ser representativa da amostra inicial.

##### **4.1.1.1. Equipamento**

O equipamento usado nesta fase inicial do trabalho inclui: um moinho de lâminas, marca Fritsch (Figura 4.1), e um sistema vibrador com peneiros, marca Retsch AS 2000 (Figura 4.2).

##### **4.1.1.2. Condições experimentais**

A matéria-prima foi moída/triturada usando um moinho de lâminas. A amostra resultante foi peneirada, num sistema de vibração de peneiros, com o objectivo de determinar a

correspondente distribuição granulométrica. Foram usados peneiros entre as gamas de granulometria de 1 mm e 63  $\mu\text{m}$ .



Figura 4.1 – Moinho de lâminas.



Figura 4.2 – Sistema de vibração de peneiros.

#### 4.1.2. Optimização do pré-tratamento da amostra

A estrutura complexa e compacta dos materiais lenho-celulósicos torna necessária a aplicação de pré-tratamentos, antes da realização das etapas subsequentes para a produção do etanol.

Neste trabalho laboratorial, foram usados quatro pré-tratamentos diferentes, respectivamente, hidrotermólise, hidrólise com ácido diluído, hidrólise alcalina e Organosolv. Todos estes processos foram realizados numa unidade formada por um reactor de alta pressão e um controlador (Parr, modelo 5100). Posteriormente, efectuou-se a hidrólise enzimática de cada um dos produtos resultantes de cada pré-tratamento. Todos os produtos foram submetidos às mesmas condições de hidrólise, isto é, uma temperatura de 57,5 °C, uma razão volume de enzima/massa de biomassa de 15 mL/100 g, uma agitação de 30 rpm. Após a aplicação destas duas etapas sequenciais (pré-tratamento e hidrólise), escolheu-se o melhor pré-tratamento, isto é, aquele que promoveu a obtenção de um maior teor de açúcares totais, avaliado a partir do método refractométrico.

O esquema que se segue (Figura 4.3) ilustra o que anteriormente se mencionou.

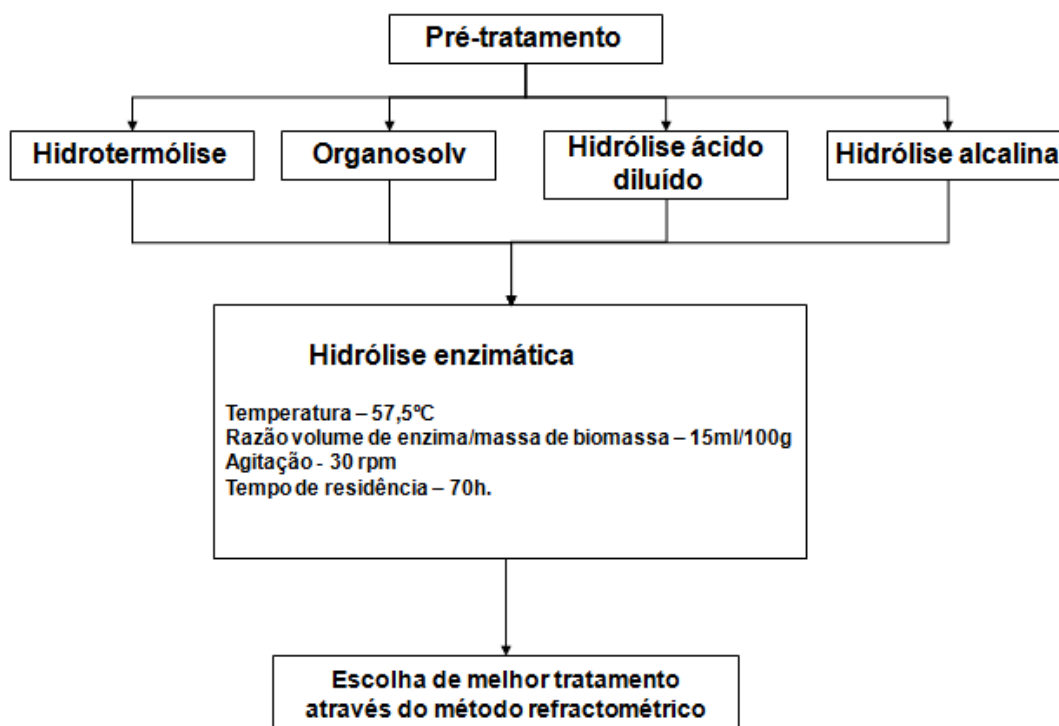


Figura 4.3 – Esquema de otimização do pré-tratamento.

#### 4.1.2.1. Reagentes

Usou-se como reagentes: álcool etílico a 96% (comercializado por AGA), ácido sulfúrico a 1% (v/v), hidróxido de sódio 10% (v/v), água desionizada, e enzima “Accellerase™ 1000”, da Genencor/Danisco.

#### 4.1.2.2. Preparação das soluções

Na hidrólise com ácido diluído preparou-se, num balão de 150 mL, uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1%. Na hidrotermólise apenas se adicionou num balão de 250 mL, água desionizada. No processo de hidrólise alcalina preparou-se, num balão de 200 mL, uma solução de NaOH a 10%. Para o tratamento Organosolv, usou-se um rácio líquido:sólido de 6:1. Como a quantidade de biomassa usada em cada ensaio foi de 20 g, isto resulta num volume de 60 mL de água e de 76 mL de etanol.

#### 4.1.2.3. Equipamento

A etapa do pré-tratamento da matéria-prima foi realizada, num equipamento composto, essencialmente por duas unidades: o sistema reactor propriamente dito, que incorpora o sistema de agitação e aquecimento (por manta eléctrica) e, um sistema de controlo da

agitação e da temperatura. O sistema reactor e o controlador são da marca Parr, modelos, 5100 e 4836, respectivamente.

A hidrólise enzimática foi realizada num banho termostático com agitação, marca Selecta, modelo unitronic. As Figuras 4.4, 4.5 e 4.6 ilustram o equipamento usado no pré-tratamento.

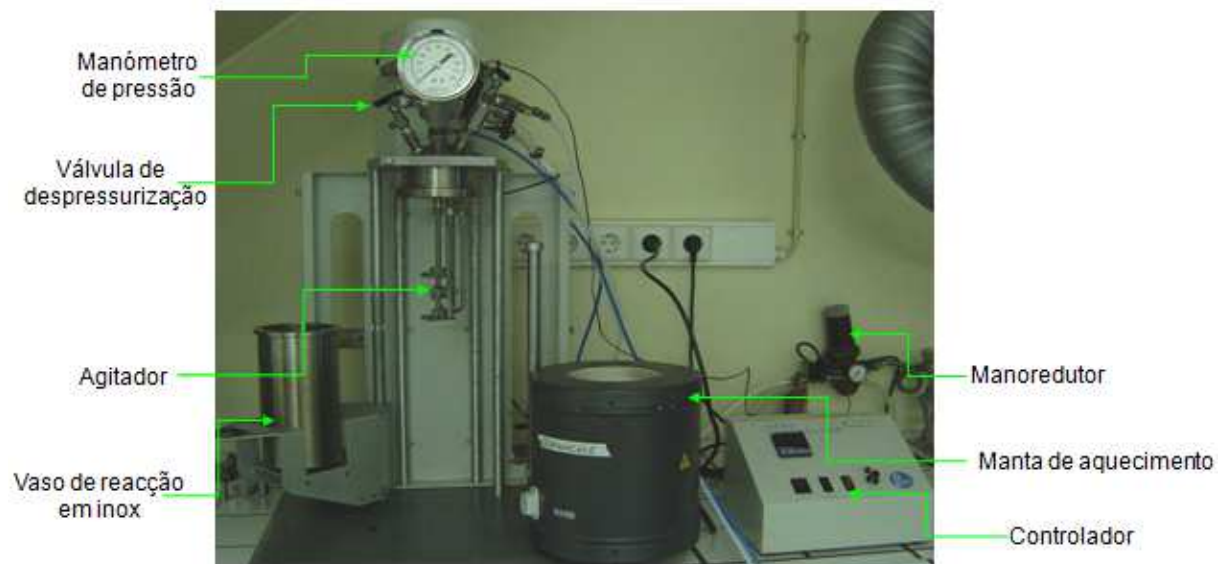


Figura 4.4 – Montagem do reactor e controlador, usado na optimização do pré-tratamento.

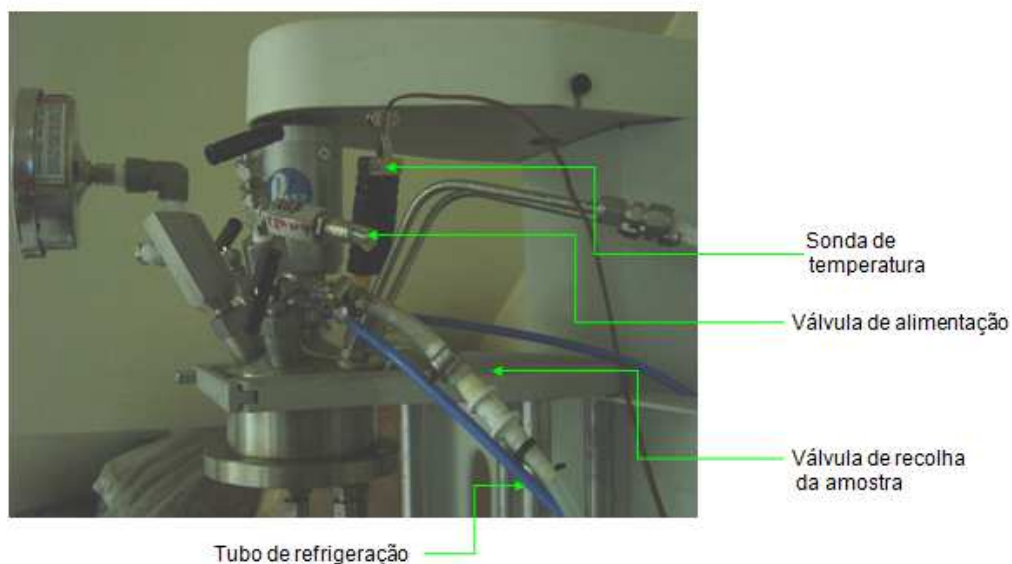


Figura 4.5 – Pormenor da cabeça do reactor, usado na optimização do pré-tratamento.



Figura 4.6 – Banho termostatzado e com agitação usado no pré-tratamento.

#### 4.1.2.4. Condições experimentais

Nesta etapa testaram-se quatro pré-tratamentos: hidrotérmólise, hidrólise com ácido diluído, hidrólise alcalina e Organosolv. A cada um dos pré-tratamentos correspondeu a aplicação de diferentes condições experimentais, usando-se a mesma quantidade de biomassa, 20 g.

##### Hidrólise com ácido diluído

Na hidrólise com ácido diluído, misturou-se 20 g de amostra com 150 mL de uma solução de ácido sulfúrico a 1%, sendo posteriormente o conjunto submetido a uma pressão de 16,5 bar, a uma temperatura de 120 °C e durante um tempo de contacto de 15 minutos.

##### Hidrólise alcalina

Na hidrólise alcalina, 200 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 10% foram misturados com 20 g de amostra. A pressão, temperatura e o tempo de contacto usados foram respectivamente, 2 bar, 124 °C e 6 minutos.

##### Organosolv

No processo Organosolv, usou-se uma razão líquido:sólido na proporção 6:1 (m/m) e uma concentração de etanol 50 % (m/m). A amostra (20 g) foi misturada com 136 mL de uma solução etanol/água. Esta foi sujeita a uma pressão de 21 bar e à temperatura de 190 °C, durante um tempo de contacto de 30 min.

## Hidrotermólise

O processo de hidrotermólise foi executado em duas condições experimentais diferentes. O primeiro usou uma pressão de 16 bar e uma temperatura de 204 °C. O segundo usou uma pressão atmosférica e uma temperatura de 120 °C

Em ambos os processos, a amostra (20 g) foi misturada com 250 mL de água desionizada, e submetida ao pré-tratamento em causa durante um tempo de contacto de 15 min.

Na tabela 4.1 resumem-se as condições aplicadas em cada dos pré-tratamentos testados.

Tabela 4.1 – Condições experimentais usadas em cada pré-tratamento de uma amostra de 20 g.

Pré-tratamento	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Tempo de contacto (min)
Hidrotermólise	16	204	15
Hidrotermólise (Patmosférica)	0,81	120	15
Hidrólise ácida	16,5	201	15
Hidrólise alcalina	2	124	6
Organosolv (6:1)	21	190	30

### 4.1.2.5. Análise qualitativa

Na escolha do melhor pré-tratamento, usou-se o método refractométrico para medição do teor de açúcares totais. Para isso traçou-se uma curva de calibração com soluções padrão de glucose em g/L e converteu-se a sua leitura para ° Brix.

Cada solução padrão e amostra foram analisadas em duplicado.

### 4.1.3. Optimização da etapa de hidrólise enzimática

Como a hidrólise alcalina foi o pré-tratamento que resultou numa maior produção de açúcares, foi a partir deste processo que se prosseguiu para a optimização das restantes etapas subsequentes, mas agora usando 10 g de amostra. O diagrama da figura 4.7 mostra o procedimento adoptado para esta etapa do processo.

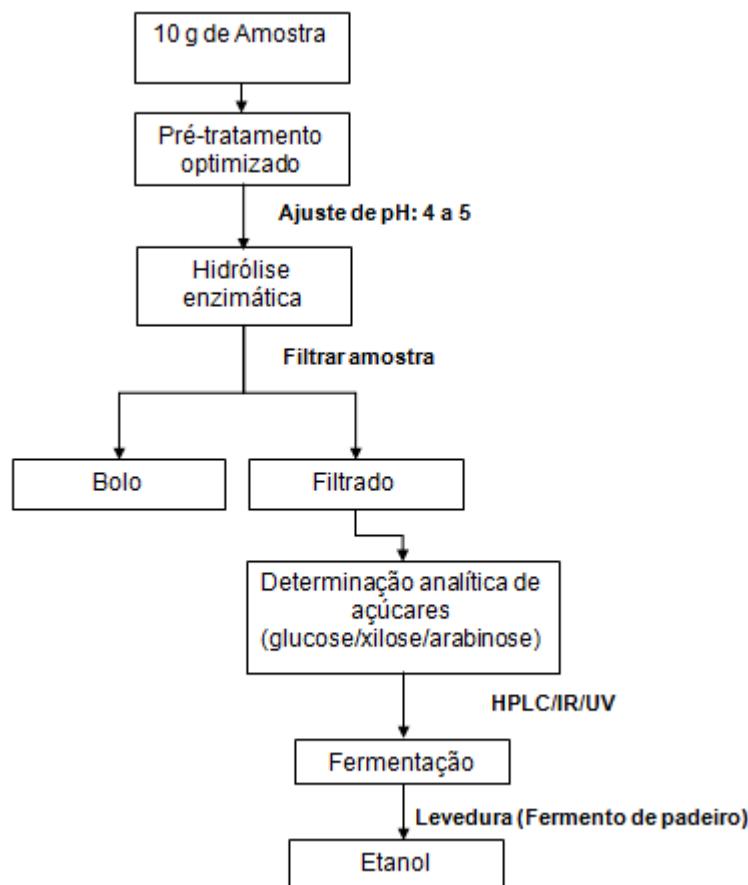


Figura 4.7 – Esquema da otimização da hidrólise.

Na optimização da hidrólise enzimática, manipularam-se dois parâmetros que afectam a actividade da enzima “Accellerase™ 1000”, a temperatura e a razão volume de enzima/quantidade de biomassa, mantendo o pH constante entre a gama óptima 4 e 5, a agitação a 30 rpm e um tempo de residência de 70 h. Todos os hidrolisados resultantes, foram filtrados através de membranas de fibra de vidro, por um sistema de filtração a vácuo, obtendo-se o bolo e o filtrado. No filtrado aplicaram-se três técnicas analíticas distintas para a quantificação dos açúcares resultantes: Índice de Refracção (IR), espectrofotometria UV-Vis e HPLC com detector ELS.

#### 4.1.3.1. Preparação das soluções

A massa de amostra usada nos ensaios subsequentes de optimização da hidrólise enzimática, após a optimização do pré-tratamento da amostra foi de cerca de 10 g.

Utilizou-se 100 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 10 %, a qual foi misturada com a amostra. A pressão, temperatura e o tempo de contacto usados foram respectivamente, 2 bar, 124 °C e 6 minutos.

#### 4.1.3.2. Condições experimentais

Um total de 11 amostras foi sujeito à hidrólise alcalina, aplicando-se as seguintes condições operatórias: pressão 2 bar, temperatura 124 °C e um tempo de contacto de 6 minutos, usando-se 100 mL de solução NaOH a 10% para cada 10 g de biomassa.

Após o pré-tratamento alcalino, começou-se por se desenvolver um planeamento factorial  $2^2$  (realizando-se ensaios nos vértices e no centro), com vista a otimizar as condições experimentais: temperatura e razão volume de enzima/quantidade de biomassa, que conduziram à maior concentração de açúcares, e conseqüentemente à maior produção de etanol. Para isso realizaram-se no total 11 ensaios, dos quais 8 correspondem a condições nos vértices e 3 no centro.

Os ensaios nos vértices foram efectuados para temperaturas entre os 50 e os 65 °C e para uma razão volume de enzima/quantidade de biomassa entre os 5 mL/100 g e 25 mL/100 g. Por sua vez, os ensaios no centro foram todos realizados para uma temperatura de 57,5 °C, e uma razão volume de enzima/quantidade de biomassa 15 mL/100 g.

Os 11 ensaios foram todos submetidos a uma agitação constante de 30 rpm, um tempo de contacto de 70 h e um ajuste de pH entre os 4 e 5.

Seguidamente apresenta-se a representação gráfica do planeamento factorial (Figura 4.8), de modo a permitir uma melhor interpretação da Tabela C.2 em anexo.

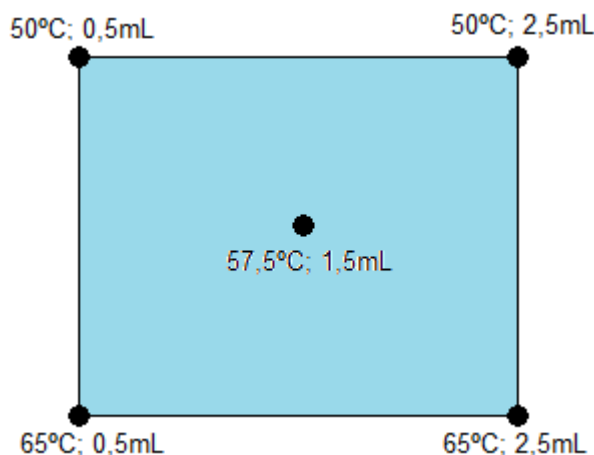


Figura 4.8 – Representação gráfica do planeamento factorial.

Os hidrolisados resultantes da etapa de hidrólise enzimática foram filtrados através de membranas de fibra de vidro, num sistema de filtração a vácuo, resultando daí, o bolo e o filtrado.

A fracção líquida obtida correspondente ao hidrolisado filtrado foi analisada respectivamente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, com detector ELS) e por espectrofotometria de UV-Vis, para determinar as concentrações de glucose, xilose e

arabinose e finalmente foi usado o índice de refração (IR) para determinar o teor de açúcares totais.

#### **4.1.3.3. Análise qualitativa e quantitativa**

Optimizado o pré-tratamento e escolhidas as variáveis a manipular (temperatura e razão volume de enzima/massa de biomassa) no processo enzimático, torna-se necessário saber de que forma estas duas etapas, se reflectem na produção de açúcares. Para isso usaram-se três técnicas analíticas: HPLC com detector ELS, espectrofotómetro UV-Vis e IR, descritas no anexo C.1, C.2 e C.3.

### **4.2. Fermentação dos açúcares**

Após a hidrólise enzimática é necessário fermentar o hidrolisado resultante. Para isso usou-se uma levedura capaz de fermentar o hidrolisado a etanol, a *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **4.2.1. Reagentes**

Usou-se como reagente água desionizada, e um inóculo da levedura de fermento de padeiro – *Saccharomyces cerevisiae*, obtida numa padaria.

#### **4.2.2. Preparações de soluções**

Preparou-se uma solução de 0,2 g de inóculo de fermento de padeiro em 200 mL de água desionizada.

#### **4.2.3. Equipamento**

Nesta etapa experimental, usou-se uma tina de material Perspex, uma placa com agitação magnética multiposições, marca Selecta, modelo multimatic-9N e um sistema de agitação e aquecimento, marca Heidolph com controlo de temperatura.

#### **4.2.4. Condições experimentais**

Inicialmente, ajustou-se o pH do produto resultante da hidrólise entre a gama de pH 5 e 6 (esta é a gama óptima para activação da levedura). Posteriormente, transferiu-se este hidrolisado para frascos de capacidade de 500 mL, cada um, com agitadores magnéticos e com papel de alumínio na boca dos mesmos.

Os frascos foram colocados na tina, e de seguida ligou-se o sistema de agitação e aquecimento a uma temperatura média de 27,5 °C. A fermentação foi realizada durante 48 h, sob condições aeróbias.

A Figura 4.9 ilustra o esquema de montagem da etapa do processo fermentativo.



Figura 4.9 – Esquema de montagem da etapa do processo fermentativo.

#### **4.2.5. Análise quantitativa**

No mosto fermentado determinou-se a concentração dos açúcares totais pelo método refractométrico.

### **4.3. Destilação**

O objectivo desta etapa foi recuperar o álcool (%) resultante do processo fermentativo. Para isso, efectuou-se uma destilação simples.

#### **4.3.1. Equipamento**

Utilizou-se uma coluna de destilação simples, uma manta de aquecimento marca Raypa, um termopar digital, testo 922, equipado com termopar do tipo K.

#### **4.3.2. Condições experimentais**

Começou-se por colocar o produto resultante do processo fermentativo num balão de destilação. Abriu-se a água de refrigeração. Posteriormente, procedeu-se à destilação simples do mesmo.

A Figura 4.10 ilustra o esquema de montagem do processo de destilação.



Figura 4.10 – Esquema de montagem do processo de destilação.

#### **4.3.3. Análise quantitativa**

Como não foi possível realizar a destilação, usaram-se os resultados obtidos no ponto 4.2.5. para calcular o etanol produzido. Também se traçou uma curva de calibração etanol/água em função do índice de refração da mistura, e a partir do índice de refração do mosto fermentado, determinou-se a % de etanol presente no mesmo.



## 5. Resultados e discussão

Após a apresentação da parte experimental, segue-se a discussão dos resultados relativos a cada uma das etapas optimizadas.

### 5.1. Características da amostra

Uma amostra resultante de uma etapa do processo de compostagem da empresa Lipor, foi submetida primeiro a um sistema de peneiração e depois seca numa estufa, com vista a determinar respectivamente a distribuição granulométrica e o teor de humidade.

A dimensão das partículas da amostra usada foi de 1 mm, sendo o teor médio de humidade de 3,24 %. A redução do tamanho do material é necessária para eliminar as limitações de transferência de massa e calor durante as reacções de hidrólise. Por outro lado, o teor de humidade nos RSU fornece uma estimativa do tempo para geração de lixiviado, uma vez que este se forma quando a massa de resíduos atinge a saturação de humidade pela soma da humidade natural e da água percolada oriunda de precipitações e demais infiltrações.

### 5.2. Etapa de pré-tratamento

Seguidamente, encontra-se representado um diagrama relativo aos cinco pré-tratamentos efectuados, e a massa de glucose resultante da aplicação dos mesmos.

Através da análise do gráfico (Figura 5.1), verifica-se que o pré-tratamento por hidrólise alcalina foi o que mais se destacou relativamente aos outros quatro processos, isto porque a massa de glucose obtida foi de 13 g. A hidrotérmólise realizada à pressão atmosférica foi o processo que promoveu uma menor quebra nas ligações da amostra, e portanto a massa de glucose obtida foi de 0,24 g.

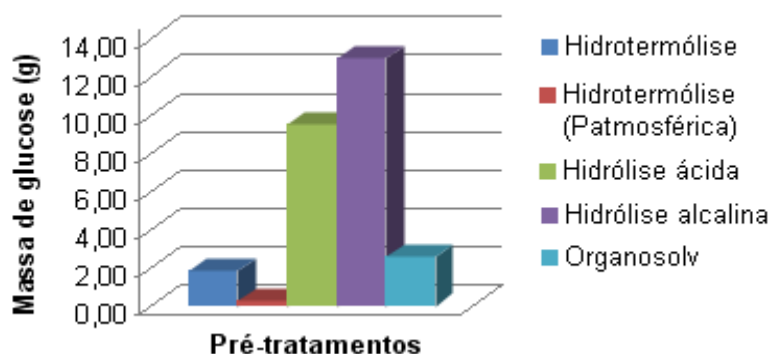


Figura 5.1 – Massa de glucose obtida em cada um dos pré-tratamentos.

Apesar das condições da hidrólise alcalina serem bastante moderadas (pressão de 2 bar, temperatura de 124 °C) comparativamente à hidrólise ácida, ao processo Organosolv e à hidrotermólise, o facto de se ter usado uma concentração de NaOH de 10 %, poderá ter sido crucial em termos de rendimento em glucose obtida (89,2 %).

Por outro lado, ficou evidente que ambos os processos de hidrotermólise foram os que originaram menor massa de glucose, isto poderá ser explicado pela ausência de um catalisador ácido ou alcalino, capaz de induzir a quebra das ligações moleculares resistentes na lenhina e na celulose.

### **5.3. Etapa de hidrólise enzimática**

Na optimização desta etapa, utilizaram-se três métodos analíticos: IR, HPLC-ELSD, e UV-Vis. Os resultados obtidos na aplicação de cada um destes métodos encontram-se descritos de seguida.

#### **5.3.1. Análise refractométrica**

A Figura 5.2, que a seguir se apresenta, mostra os resultados obtidos para a massa de glucose correspondente a cada uma das amostras e respectivas réplicas, quantificados por refractometria.

Através da análise da Figura 5.2, verifica-se de comum que, do conjunto de ensaios e respectivas réplicas realizados nos vértices, os que foram processados a 65 °C (os dois últimos) foram os que originaram maior massa de glucose.

Por outro lado, constata-se que, para uma temperatura de 50 °C e para uma variação na razão volume de enzima/quantidade de biomassa, respectivamente 5 mL/100 g e 25 mL/100 g, a massa de glucose (média) obtida foi de 4,75 g e 4,90 g, respectivamente. Sendo esta variação muito pouco significativa, poderá indicar-nos que a razão enzima/biomassa neste caso poderá não ser o parâmetro que influencie mais os resultados.

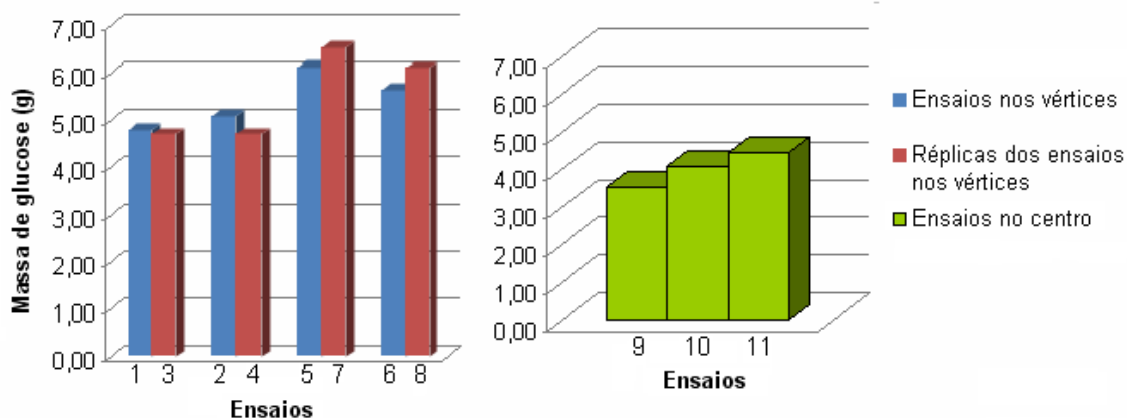


Figura 5.2 – Variação da massa de glucose para cada uma das amostras e respectivas réplicas.

O mesmo não se observa para uma temperatura de 65 °C, isto porque usando-se uma razão volume de enzima/quantidade de biomassa de 5 mL/100 g a massa média de glucose obtida aumentou (6,33 g), em relação ao valor médio da massa de glucose obtida (5,88 g), para uma razão volume de enzima/massa de biomassa de 25 mL/100 g.

Relativamente, aos ensaios realizados no centro resultaram numa menor massa de glucose (4,01 g) comparativamente aos ensaios/réplicas nos vértices.

Pode concluir-se de um modo geral, que para os ensaios realizados nos vértices um aumento da temperatura favorece a actividade da “AcelleraseTM1000”, e portanto, a massa de glucose obtida aumenta.

Por outro lado, constata-se que apenas para uma temperatura de 65 °C, a variação do volume de enzima/quantidade de biomassa tem influência na actividade da enzima em causa. Assim, o uso de baixas razões volume de enzima/ quantidade de biomassa originou maiores massas de glucose.

Isto não se encontra de acordo com o esperado, dado que um aumento da concentração de enzima origina geralmente, um aumento da actividade enzimática e o aumento da velocidade de reacção desde que haja substrato disponível, pelo que se pode admitir que provavelmente já não havia substrato disponível (havia excesso de enzima).

Tal como observado no gráfico apresentado anteriormente, pode-se concluir que as amostras 5 e 7 foram as que resultaram numa maior conversão em glucose, a partir da amostra inicial. Sendo assim, as condições óptimas para prosseguir para as restantes etapas (fermentação e destilação) foram: uma temperatura de 65 °C e razão volume de enzima/quantidade de biomassa de 5 mL/100 g.

A determinação das condições óptimas foi feita somente com base nos resultados experimentais, a partir da análise dos resultados nos gráficos, não se aplicando qualquer software estatístico.

### 5.3.2. Análise por HPLC-ELSD

Antes da análise dos resultados, foi necessário proceder à optimização das condições experimentais. De seguida apresentam-se os resultados relativos ao estudo da influência do caudal de eluente e da atenuação do detector, bem como a massa de glucose obtida.

#### 5.3.2.1. Influência da composição de eluente

É frequente usar-se na fase móvel uma mistura acetonitrilo/água para melhorar a eficiência de separação dos picos. Contudo neste trabalho, a fase móvel apenas consistiu em água ultra pura, pois de acordo com as instruções de trabalho do detector, para a temperatura de operação do mesmo (85 °C) é aconselhável usar apenas água.

#### 5.3.2.2. Influência do caudal de eluente

Experimentalmente, testou-se a influência do caudal de eluente no tempo de retenção das amostras. Para isso, testaram-se diferentes caudais de eluente entre 0,35 e 0,45 mL/min, usando uma mistura de xilose (2000 ppm) e glucose (1000 ppm), operando o detector a uma pressão de 0,5 bar e uma temperatura de 85 °C e a coluna operando a 80 °C (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Influência do caudal de eluente na separação cromatográfica de uma mistura de xilose (2000 ppm) e glucose (1000 ppm) – o detector operou a uma pressão de 0,5 bar e uma temperatura de operação de 85 °C.

Caudal (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Área do pico (cm <sup>2</sup> )
0,35	23,95	9,5
0,4	20,4	9,3
0,45	18,4	9,1

É de ressaltar que o tempo de retenção determinado para cada caudal, corresponde apenas a um pico desta mistura xilose/glucose

A partir dos dados apresentados na Tabela 5.1, verifica-se que um incremento no caudal de eluente origina uma diminuição do tempo de retenção da mistura e também na área do pico. Isto encontra-se de acordo com o que se esperava, pois se o caudal de eluente aumenta, então o tempo de contacto da amostra com a fase estacionária tende a ser menor. A diminuição da área do pico pode ser explicada pelo princípio de funcionamento do detector, uma vez que apenas uma parte da amostra é volatilizada e dirigida para o detector, sendo as grandes gotas atraídas para um sifão. Com maiores taxas de fluxo, a eficiência da volatilização diminui e, conseqüentemente, a resposta do detector também diminui.

Como a resolução dos picos não melhorou usando um caudal mais pequeno (0,35 mL/min), optou-se por se utilizar um caudal de 0,4 mL/min, tornando assim o tempo de análise entre as sucessivas amostras mais curto.

Testadas as condições operacionais (caudal de eluente 0,4 mL/min, pressão e temperatura do detector operando, respectivamente, a 0,5 bar e 85 °C, e a coluna operando a 80 °C), determinou-se o respectivo tempo de retenção para cada solução padrão de açúcar, conforme apresentado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Tempos de retenção correspondentes a cada um dos 3 açúcares - glucose, xilose e arabinose (caudal de eluente 0,4 mL/min, pressão e temperatura do detector, respectivamente, 0,5 bar e 85 °C, e coluna a 80 °C).

Açúcares	Tempo de retenção (min)
Glucose	20
Xilose	21,4
Arabinose	24,2

Através da análise da Tabela 5.2, observa-se que a glucose e a xilose apresentam tempos de retenção muito próximos. No entanto, constata-se que a glucose é o padrão que apresenta menor tempo de retenção e portanto elui mais rapidamente da coluna, pressupondo assim que tem uma maior interacção com a fase móvel do que com a estacionária, comparativamente aos outros dois açúcares (xilose e arabinose).

### 5.3.2.3. Influência da atenuação do detector

A atenuação do detector foi determinada por um acordo entre a área dos picos e o ruído da linha de base. Diferentes valores de atenuação entre 1 e 128 foram testados, usando padrões de glucose entre os 500 ppm e 2500 ppm, para uma pressão e temperatura no detector, respectivamente de 0,5 bar e 85 °C, uma temperatura na coluna de 80 °C, e um caudal de eluente de 0,4 mL/min.

A partir da análise do cromatografo, constatou-se que um incremento na atenuação do detector promove uma diminuição da sensibilidade deste, bem como uma diminuição do ruído da linha de base.

Uma vez optimizadas as condições experimentais a usar na análise por HPLC e determinados os tempos de retenção dos padrões de açúcar, prosseguiu-se para a determinação dos tempos de retenção nas amostras e quantificação dos açúcares.

A partir da análise dos tempos de retenção e dos respectivos picos das amostras, verificou-se: o tempo de retenção das amostras foi de 20 min e os picos das amostras apresentam um comportamento assimétrico, semelhante aos padrões de glucose.

Perante estas circunstâncias, concluiu-se que o único açúcar presente nas amostras é a glucose.

A Figura 5.3 mostra os resultados obtidos inerentes da aplicação do método HPLC.

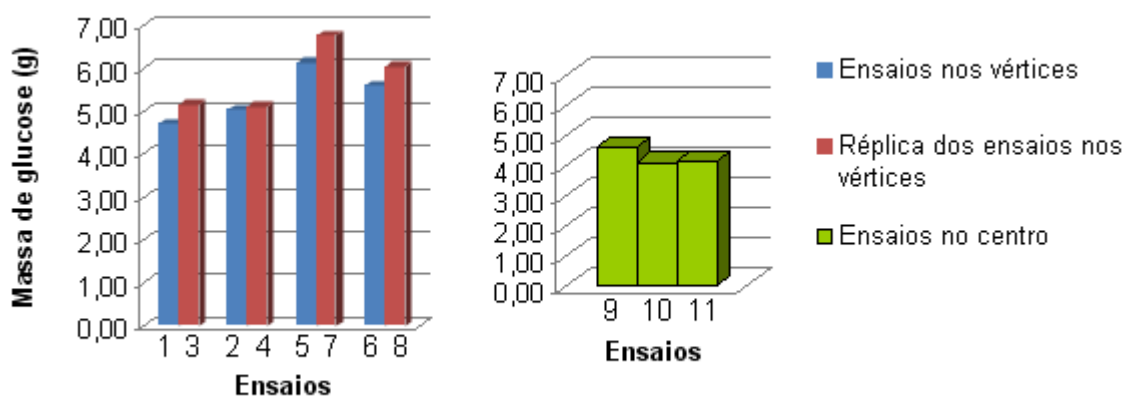


Figura 5.3 – Massa de glucose obtida em cada um dos ensaios e respectivas réplicas, determinada através da análise cromatográfica HPLC – ELSD.

A partir do gráfico obtido (Figura 5.3) constata-se que os ensaios/réplicas nos vértices realizados a 65 °C, independentemente da razão volume de enzima/massa de biomassa utilizada (ensaios 5/7 e 6/8), resultaram numa maior produção média de glucose.

Relativamente aos ensaios realizados a 50 °C (ensaios 1/3 e 2/4), constatou-se que para ambas as razões usadas a produção média de glucose foi de aproximadamente 5 g.

Os ensaios efectuados nos vértices a 65 °C (ensaios 5/7 e 6/8) resultaram numa produção média de glucose de 6,5 g e 5,8 g, respectivamente para uma razão volume de enzima/massa de biomassa de 5 mL/100 g e 25 mL/100 g.

Relativamente aos ensaios no centro (ensaios 9, 10 e 11) mostraram uma produção média de massa de glucose de 4,3 g, comparativamente inferior aos ensaios/réplicas nos vértices.

Através dos resultados pode concluir-se, de um modo geral, que o aumento da temperatura favorece a produção de glucose.

Ficou também evidente, que apenas para 65 °C, e usando uma razão 5 mL/100 g a produção do açúcar aumenta.

### 5.3.3. Análise por ultravioleta-vísivel

Verificou-se experimentalmente, a absorvância da glucose a dois comprimentos de onda, respectivamente 200 nm e 285 nm (escolheu-se 200 nm porque além de ser o comprimento

de onda mais afastado daquele em que se observava a absorvância dos outros dois açúcares, o valor de absorvância foi comparativamente maior). A absorvância da xilose foi observada a 278 nm e a arabinose absorveu em dois comprimentos de onda diferentes, respectivamente 243 e 277 nm. Como 277 nm se encontra muito próximo do comprimento de onda para a absorção da xilose, então a quantificação da arabinose foi realizada a 243 nm, devido à dificuldade de distinção destes dois açúcares.

Através da análise dos valores de concentração obtidos, constata-se que estes não fazem sentido. Pois os valores de concentração de cada açúcar (glucose, xilose e arabinose) são elevadíssimos.

Uma possível explicação poderá estar relacionada, com o facto de o aparelho estar a ler a concentração de açúcares totais e não individuais. Por outro lado, a selecção do comprimento de onda da arabinose a 243 nm, poderá não ter sido o mais adequado, já que ao traçar-se o espectro, se verificou que, para este comprimento de onda a absorvância é menor.

Poderá assim, concluir-se que a técnica de espectroscopia de UV-Vis, não é a aconselhável para a identificação de açúcares individuais, funcionando apenas como técnica qualitativa.

Constata-se que de entre os açúcares presentes nas amostras, a glucose e a xilose são os açúcares que apresentam maior concentração.

Após a aplicação dos três métodos estudados, optou-se por usar o método refractométrico, em detrimento do HPLC-ELSD, na determinação dos açúcares presentes após a etapa de hidrólise e após a etapa de fermentação. Isto porque é um método mais expedito, pois o tempo de análise das amostras é muito mais rápido (no conjunto cerca de 15 minutos) comparativamente com o método por cromatografia líquida de alta eficiência (cerca de 20 minutos para cada amostra). Além disso, os resultados da aplicação de ambas as técnicas foram bastante semelhantes.

Após a optimização da etapa de hidrólise enzimática, utilizaram-se as melhores condições com vista à obtenção de maior produção de etanol.

#### **5.4. Etapa da fermentação**

A Figura 5.4 que se segue mostra o resultado das eficiências de hidrólise e fermentação, relativas à aplicação das melhores condições para o ensaio médio 5/7 (temperatura de 65 °C e razão volume de enzima/quantidade de biomassa de 5 mL/100 g).

Pela observação do gráfico, constata-se que a eficiência média da hidrólise e fermentação foi de 84,5 % e 59,4 %, respectivamente.

Relativamente à eficiência da hidrólise, verifica-se que esta se encontra próximo do valor teórico esperado (88 %). O valor de eficiência da fermentação obtido foi baixo, isto porque de uma massa média de glucose de 6,24 g resultante da etapa de hidrólise, apenas 3,70 g foram convertidas em etanol, restando 2,54 g que ficaram por ser fermentadas.

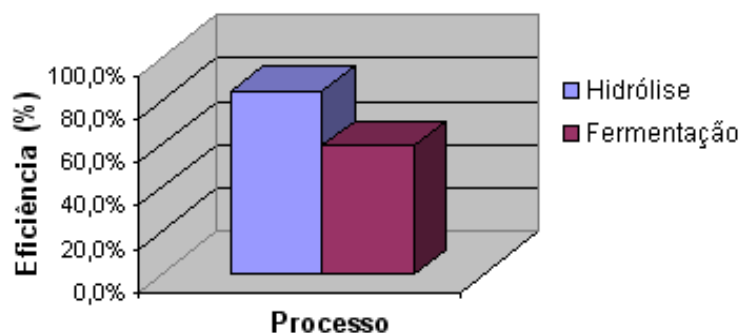


Figura 5.4 – Eficiência das etapas de hidrólise e fermentação, obtida para as melhores condições (temperatura 65 °C e razão volume de enzima/quantidade de biomassa de 5 mL/100 g), através da análise por refractometria.

Apesar da eficiência da etapa de hidrólise nos indicar, que a maior parte dos açúcares presentes na amostra inicial foram libertados, seria de esperar que a eficiência da fermentação fosse maior.

Uma possível explicação poderá relacionar-se com a ausência de arejamento forçado (introdução de ar comprimido) no meio, pois sabe-se que quanto maior a disponibilidade do oxigénio maior a actividade dos microrganismos.

Experimentalmente, o oxigénio usado pelas leveduras constou apenas do que já se encontrava dissolvido no meio, o que poderá não ter sido suficiente.

Na etapa da destilação, não se conseguiu separar o etanol do mosto. Abaixo, encontra-se representado um gráfico, relativo à massa de etanol (teórico, real e obtido na destilação), para os ensaios médios 5/7.

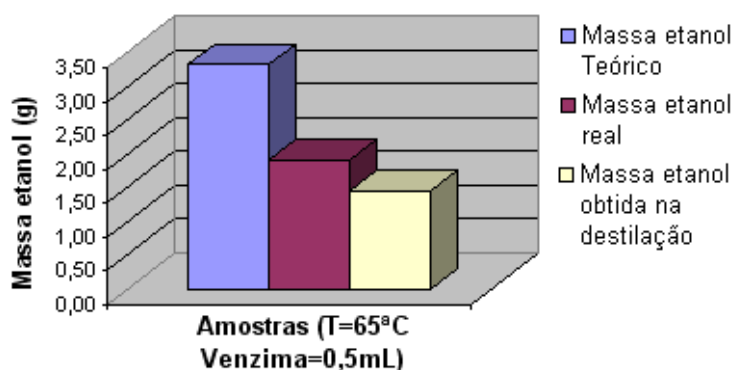


Figura 5.5 – Massa de etanol teórico, real e obtida por destilação, para as condições óptimas (temperatura 65°C e razão volume de enzima/quantidade de biomassa = 5 mL/100g).

A partir da observação do gráfico (Figura 5.5), constata-se que a massa média de etanol real foi de 1,9 g e a média obtida pela curva de calibração (1,44 g) foi inferior à média obtida teoricamente (3,32 g).

A massa de 1,44 g corresponde a uma taxa de álcool de 0,5% no mosto fermentado. Esta % de etanol é muito baixa, o que significa que a pouca quantidade de álcool produzido estava diluído num grande volume de amostra.



## 6. Custos de produção em cada uma das etapas

Após otimização do processo, determinou-se os custos inerentes a cada etapa. A Tabela 6.1 que se segue apresenta os resultados dos custos de energia e água gastos para cada etapa do processo.

Tabela 6.1 – Valores do custo de energia e água de cada etapa, bem como o custo global do processo de produção do bioetanol, para 390 g de biomassa.

	<b>Total (€)</b>	<b>Energia (€)</b>	<b>Água (€)</b>
<b>Pré-tratamento</b>	167,91	157,30	10,61
<b>Fermentação</b>	65,34	65,28	0,06
<b>Destilação</b>	0,98	0,17	0,81
<b>Hidrólise</b>	233,30	232,75	0,55
<b>Reagentes</b>	2,67	-	-
<b>HPLC</b>	2,58	2,57	0,0076
<b>Espectrofotómetro UV</b>	0,02	0,02	0,0018
<b>Refractómetro</b>	0,05	0,05	-
<b>Total (€)</b>	<b>470,19</b>		

Através da análise da Tabela 6.1, constata-se que o custo total do processo foi de 1,21 €/g de biomassa. Observa-se que as etapas que têm um maior consumo de energia são o pré-tratamento e a hidrólise enzimática.

De ressaltar, que os custos da etapa da destilação a nível experimental são pouco significativos, no entanto a nível industrial os custos desta etapa seriam mais significativos comparados com outras unidades do processo.

Por outro lado, a etapa do pré-tratamento é aquela que exigiu um maior consumo de água.



## 7. Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros

Foi otimizada a produção de bioetanol a partir de um resíduo orgânico proveniente da central de compostagem da Lipor, obtido na 3ª etapa de compostagem de resíduos provenientes da recolha selectiva de matéria orgânica biodegradável em restaurantes, cantinas, mercados e jardins.

A biomassa foi previamente triturada de modo a obter uma granulometria de cerca de 1 mm. Foram testados cinco pré-tratamentos desta biomassa: hidrólise ácida, hidrólise alcalina, organosolv e hidrotermólise, respectivamente a uma pressão de 16 bar e atmosférica.

Após a aplicação do pré-tratamento, a biomassa foi submetida a uma etapa de hidrólise enzimática, a fim de libertar a glucose. A glucose foi posteriormente fermentada a bioetanol. Através da análise dos resultados pode-se concluir que:

- O melhor pré-tratamento foi conseguido aplicando a hidrólise alcalina (200 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 10% para 20 g de biomassa, à pressão de 2 bar, a uma temperatura de 124 °C, com um tempo de contacto de 6 minutos), obtendo-se um rendimento em glucose de 89,2 %;
- As condições optimizadas na etapa de hidrólise enzimática foram: temperatura de 65 °C e razão volume de enzima/quantidade de biomassa de 5 mL/100g;
- Relativamente à eficiência da etapa de hidrólise, os melhores valores obtidos foram de 81,7 % e 87,3 %. Ambos se encontram dentro do valor teórico esperado de 88 %.
- A eficiência da etapa de fermentação foi de 59,3 % e 59,5 %, sendo a massa de etanol obtida 1,86 g e 1,93 g, respectivamente para o ensaio 5 e sua réplica. Estes valores encontram-se muito abaixo do que era esperado já que se deveria ter obtido (teoricamente) 3,37 g e 3,26 g, respectivamente para os ensaios em causa. A justificação para este baixo rendimento pode estar relacionada com a inexistência de ar em quantidade suficiente para que a etapa de fermentação ocorresse ou com uma baixa actividade das leveduras utilizadas no processo;
- O rendimento global em bioetanol foi de 0,18 g bioetanol/ g biomassa;
- O custo global do processo foi de 1,21 euros/g biomassa.

Em trabalhos futuros poderão ser tomados em consideração alguns aspectos de entre os quais se salienta:

- Testar um pré-tratamento biológico (seleccionando um fungo apropriado, variar a razão C/N, testar o tempo de contacto com a amostra);
- Caracterização completa da biomassa usada no estudo, compreendendo a determinação do teor de lenhina (e também no bolo e no hidrolisado);

- Estudar o efeito da concentração de oxigénio dissolvido no meio, durante o processo fermentativo;
- Testar outro tipo de leveduras no processo fermentativo;
- Testar a sacarificação e fermentação simultâneas.

## 8. Bibliografia

- [1] Jegannathan, K.R., Eng-Seng, C., Ravindra, P., 2009. Harnessing biofuels: A global Renaissance in energy production?, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(8): 2163-2168.
- [2] Mateus, T., 2006. O potencial energético da floresta portuguesa: análise do potencial energético disponível para as centrais termoelétricas a biomassa florestal lançadas a concurso, Biomassa e Biocombustíveis, Mestrado de Energias Renováveis, FEUP, em [http://www.quercus.pt/xFiles/scContentDeployer\\_pt/docs/articleFile30.pdf](http://www.quercus.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/articleFile30.pdf), consultado em 14/03/09.
- [3] Saxena R.C., Adhikari D.K., Goyal H.B., 2009. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13 (1): 167-178.
- [4] [www.Lipor.pt](http://www.Lipor.pt), consultado em 15/10/09.
- [5] Pitarelo, A.P., 2007. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. Mestrado em Química, Universidade Federal do Paraná, Brasil, p.125.
- [6] Balat, M., Balat, H., 2009. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel, *Applied Energy*, 86 (11): 2273-2282.
- [7] Fengel, D., Wegner, G., 1989. *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter, nº183.
- [8] Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.H., 1987, *Cellulose hydrolysis*. New York: Springer-Verlag, v.3: 198.
- [9] Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, J., Michael; Stroeve, P., 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production, *Ind. Eng. Chem. Res.* DOI: 10.1021/ie801542g
- [10] Ramos, L.P., 2003. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*. 26: 863-871.
- [11] Graça J., *Composição Química da Madeira de Eucalipto (Eucalyptus globulus L.)*, UT L. Instituto Superior de Agronomia: Departamento de Engenharia Florestal, em [http://www.isa.utl.pt/def/files/Files/disciplinas/tpf/PF\\_Mod2\\_QuimicaEucalipto.pdf](http://www.isa.utl.pt/def/files/Files/disciplinas/tpf/PF_Mod2_QuimicaEucalipto.pdf), consultado em 14/06/09.
- [12] Dence, C.W., Lin, S.Y., 1992. *Methods in lignin chemistry*, New York: Springer Verlag, p. 578.

- [13] Higuchi, T., 1985. Degradative pathways of lignin model components. In: *Higuchi, T. Biosynthesis, and biodegradation of wood components*. London: Academic Press Inc., 557-577.
- [14] Teixeira, J. A., Junho 2009. Bioetanol: Desenvolvimento de processos fermentativos para a produção de bioetanol, *Valorização de resíduos*, 13: 17-19.
- [15] Elobeid, A., Tokgoz, S., Hart, C., 2007. The ethanol outlook for Brazil and the United States and implications for livestock. *Int. Sugar J.* 109 (1299): 174-177.
- [16] Cheng, J.J., Keshwani, D. R., 2008. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review, *Bioresource Technology*. 100 (4): 1515-1523.
- [17] Kumar, S., Singh, S.P., Mishra, I.M.; Adhikari, D.K., 2009. Recent Advances in Production of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: a review. *Chem. Eng. Technol.* 32 (4): 517-526.
- [18] Zang, S., Marechal, F., Grassner, M., 2009. Process modeling and integration of fuel ethanol production from lignocellulosic biomass based on double acid hydrolysis, *Energy & Fuels*, 23 (3): 1759-1765.
- [19] Sun, Y., Cheng, J.J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83 (1): 1-11.
- [20] [www.inovacao.unicamp.br](http://www.inovacao.unicamp.br) consultado em 5/03/09.
- [21] Schell, D.J., Harwood, C., 1994. Milling of lignocellulosic biomass-results of pilot scale testing. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45 (6): 159-168.
- [22] [www.apta.sp.gov.br](http://www.apta.sp.gov.br) consultado em 5/03/09.
- [23] McMillan, J.D., 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass, In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P., *Enzymatic conversion of biomass for fuels production*. American Chemical Society, Washington, DC, 292-324.
- [24] Mackie, K.L., Brownell, H.H., West, K.L., Saddler, J.N., 1985. Effect of sulfur-dioxide and sulfuric-acid on steam explosion of aspenwood. *J. Wood Chem. Technol.* 5 (3): 405-425.
- [25] Vlasenko, E.Y., Ding, H., Labavitch, J.M., Shoemaker, S.P., 1997. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Bioresour. Technol.* 59 (2-3): 109-119.
- [26] Dale, B.E., Moreira, M.J., 1982. A freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng. Suppl.* 12: 31-43.
- [27] Laser, M., Schulman, D., Allen, S.G., Lichwa, J., 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*. 81: 33-44.
- [28] Vidal, P.F, Molinier, J., 1988. Ozonolysis of lignin: improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass* 16 (1): 1-17.

- [29] Soares, P. A., Rossell, C. E. V., Conversão da celulose pela tecnologia Organosolv. *NAIPPE/USP*, 3: 5-29.
- [30] Ander, P., Eriksson, K.E., 1977. Selective degradation of wood components by white-rot fungi. *Physiol. Plantarum*. 41 (4): 239–248.
- [31] Hatakka, A.I., 1983. Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymatic saccharification of cellulose. *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.* 18 (6): 350–357.
- [32] Teymouri, F., Perez, L.L., Alizadeh, H., Dale, B.E., 2004. Ammonia fiber explosion treatment of corn stover. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 113-116: 951-963.
- [33] Lu, X.B., Zhang, Y.M., Yang, J., Liang, Y., 2007. Enzymatic hydrolysis of corn stover after pretreatment with dilute sulfuric acid. *Chem. Eng. Technol.* 30 (7): 938-944.
- [34] Cara, C., Ruiz, C., Oliva, J. M., Saez, F., Castro, E., 2008. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Bioresource Technol*, 99: 1869-1876.
- [35] Karr, W.E., Holtzapple, T., 2000. Using lime pretreatment to facilitate the enzymatic hydrolysis of corn stover. *Biomass Bioenergy*, 18: 189-199.
- [36] Hu, Z., Wen, Z., 2008. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochen. Eng. J.*, 38: 369-378.
- [37] Lu, X., Zhang, Y., Angelidaki, I., 2009. Optimization of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-catalyzed hydrothermal pretreatment rapeseed straw for bioconversion to ethanol: Focusing on pretreatment at high solids content, *Bioresource Technology*. 100 (12): 3048-3053.
- [38] Chang, V.S., Kaar, W.E., Burr, B., Holtzapple, M.T., 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lime-treated biomass. *Biotechnol. Letters*, 23 (16): 1327-1333.
- [39] Chung, V.C., Bakalinsky, A., Penner, M.H., 2005. Enzymatic saccharification and fermentation of xilose-optimized dilute acid-treated lignocellulosics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121: 947-961.
- [40] Júnior, A. F., Pereira, E. B., Junho 2001. *Enzimas e suas aplicações enzimáticas*. UFST, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de alimentos. Florianópolis, 2-39.
- [41] Mariotto, J.R., Julho 2006, Estágio de Docência: *Cinética enzimática*, 3-30.
- [42] Kieling, D.D., Júnior, A.F., Julho 2002. *Enzimas: aspectos gerais*. UFST, Florianópolis, 1-13.
- [43] Mansfield, S.H., Mooney, C., Saddler, J.N, 1999. Substrate and enzymatic characteristics that limit enzymatic hydrolysis, *Biotechnology*, 15: 804-816.
- [44] Mamers. H., Yuritta, J.P., Menz, D.J., 1981. The siropulper-an explosive alternative for ninwood pulping. In: *Tappi Pulping Conference*, Atlanta, 261-268.

- [45] Pan, X., Zhang, X., Gregg, D.J., Saddler, J.N., 2004. Enhanced enzymatic hydrolysis of steam-exploded Douglas fir wood by alkali-oxygen post-treatment. *Applied Biochem Biotechnol.* 113-116, 1103-1114.
- [46] Adsul, M.G., Ghule, J.E., Shaikh, H., Singh, K.B., Gokhale, D.V., 2005. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 62: 6-10.
- [47] Shevchenko, S.M., Beatson, R.P., Saddler, J.N., 1999. The nature of lignin from steam explosion/enzymatic hydrolysis of softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77: 867-876.
- [48] Mooney, C.A., Mansfield, S.D., Touhy, M.G., Saddler, J.N., 1999. The effect of initial pore volume and lignin content the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresource Technology*, 64: 113-119.
- [49] Martin, C., Klinke, H.B., Thomsen, A.B., 2007. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 426-432.
- [50] Ramos, L.P., Breuil, C., Saddler, J.N., 1992b. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 34/35: 37-48.
- [51] Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Zacchi, G., 1996. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated spruce wood on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 19: 470-476.
- [52] Kadam, K.L., Rydholm, E.C., McMillan, J.D., 2004. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Biotechnology*, 14: 277-287.
- [53] Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Alfani, F. 2004. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of bioethanol in SHF and SSF. *Process Biochemistry*, 39: 1533-1542.
- [54] Ramos, L.P, Saddler, J.N., 1994b. Enzyme recycling during fed-batch hydrolysis of cellulose derived from steam-exploded *Eucalyptus viminalis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45/46: 193-207.
- [55] Tengborg, C., Galbe, M., Zacchi, G., 2001. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 835-844.
- [56] Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B.E., 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 121/124:1081-1099.
- [57] Lu, Y., Yang, B., Gregg, D., Saddler, J.N., Mansfield, S.D., 2002. Cellulase adsorption and evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 98: 641-654.

- [58] Galbe, M., Zacchi, G., 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 59: 618-628.
- [59] Palonen, H. T., Zacchi, F., Tenkanen, G., 2004. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *Journal of Biotechnology*, 107: 65-72.
- [60] Bisaria, V.S., 1998. Bioprocessing of agro-residues to value added products. In: Martin, A.M. (Ed.), *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*, second ed. Chapman and Hall, UK.
- [61] Duff, S.J.B., Murray, W.D., 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.* 55 (1): 1–33.
- [62] Ladisch, M.R., Lin, K.W., Voloch, M., Tsao, G.T., 1983. Process considerations in the enzymatic-hydrolysis of biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 5 (2): 82–102.
- [63] Wright, J.D., Wyman, C.E., Grohmann, K., 1988. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose – process evaluation. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 18: 75–90.
- [64] Ramos, L.P., Breuil, C., Saddler, J.N., 1993a. The use of enzyme recycle and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 19-25.
- [65] Beldman, G., Voragen, A.G.J., Rombouts, F.M., Pilnik, W., 1988. Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biotechnology Bioenergy*, 31: 173-178.
- [66] Klyosov, A.A., 1990. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. *Biochemistry*, 29: 10577-10585.
- [67] Saha, B.C., Bothast, R.J., 1999. Enzymology of xylan degradation. In: Imam, S.H., Greene, R.V., Zaidi, B.R. (Eds.), *Biopolymers: Utilizing Nature's Advanced Materials*. American Chemical Society, Washington, DC, 167 – 194.
- [68] Malta, H.L., 2006. Estudos dos parâmetros cinéticos de propagação de fermento de padeiro (*Saccharomyces cerevisiae*) para a produção de cachaça de alambique. Faculdade de farmácia da UFMG, Belo Horizonte. 19-61.
- [69] Matsushika, A., Inoue, H., Murakami, K., Takimura, O., Sawayama, S., 2009. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 100 (8): 2392-2398.
- [70] Wang, P.Y., Shopsis, C., Schneider, H., 1980. Fermentation of a pentose by yeasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94 (1): 248–254.
- [71] Schneider, H., Wang, P.Y., Chan, Y.K., Maleszka, R., 1981. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Letters*. 3 (2): 89–92.

- [72] Chiang, L.C., Hsiao, H.Y., Ueng, P.P., Chen, L.F., Tsao, G.T., 1981. Ethanol-production from xylose by enzymic isomerization and yeast fermentation. *Biotechnol. Bioeng. Suppl.* 11: 263–274.
- [73] Gong, C.S., Chen, L.F., Flickinger, M.C., Chiang, L.C., Tsao, G.T., 1981. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. *Appl. Environ. Microbiology.* 41 (2). 430–436.
- [74] Jeffries, T.W., 1981. Fermentation of xylulose to ethanol using xylose isomerase and yeasts. *Biotechnol. Bioeng. Suppl.* 11: 315–324.
- [75] Chu, B.C.H., Lee, H., 2007. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnol. Adv.* 25 (5): 425–441.
- [76] Hahn-Hagerdal, B., Karhumaa, K., Jeppsson, M., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biofuels* 108: 147–177.
- [77] Wyman, C.E., 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass – technology, economics, and opportunities. *Bioresour. Technol.* 50 (1): 3 – 16.
- [78] Baudel, H., 2006. *Pré-tratamento e hidrólise*. III Workshop tecnológico sobre: Hidrólise para a produção de etanol, Recife.
- [79] Bas Vriens, B.P.J.M, 2008. *Production of bio-ethanol from lignocellulosic material using enzymatic hydrolysis*, relatório de estágio ao abrigo do programa de Erasmus, ISEP, 26-27.
- [80] Demiate I., Wosiacki G., Czelusniak C., Nogueira A., 2002. *Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos – Comparação entre método colorimétrico e titulométrico*, Publication UEPG 8 (1): 65-78.
- [81] Alves, M.A.C, 1992. *Caracterização química de 4 castas produtoras de vinho do Porto durante a maturação*, Tese de doutoramento em engenharia química, FEUP, 59-63.
- [82] Rouessac F., Rouessac A., 2000. *Chemical analysis - Modern Instrumentation methods and techniques*, Wiley, 45-61.
- [83] Cromatografia Líquida de alta eficiência – Análise da cafeína em bebidas por HPLC, em [https://dspace.ist.utl/bitstream/2295/49904/1/LQIII-Cromat\\_HPLC\\_Cafeina.pdf](https://dspace.ist.utl/bitstream/2295/49904/1/LQIII-Cromat_HPLC_Cafeina.pdf).
- [84] <http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/injectors> consultado em 17/09/09.
- [85] [http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/mobile\\_phase](http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/mobile_phase) consultado em 17/09/09.
- [86] [http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/stationary\\_phase](http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/stationary_phase) consultado em 17/09/09.
- [87] <http://kerouac.pharm.uky.edu/asrg/hplc/detectors> consultado em 17/09/09.
- [88] Coquet A., Veuthey J.L., Haerdi W., 1992. Comparison of post-column fluorescence derivation and evaporative light-scattering detection to analyse saccharides selectively by LC, *Chromatographia*, 34 (11/12): 651-653.

- [89] Estevinho, B.N., Ferraz, A., Rocha, F., Santos, L., Alves, A., 2009. Uncertainty in the determination of glucose in aqueous solutions by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection, *Journal of Separation Science*, 32: 3116-3125.
- [90] Bento, L.S.M., Sá, S., 1998. Study of high-molecular weight compounds in sugar using gel-permeation chromatography with an evaporative light scattering detector. *Carbohydrate Polymers*, 37: 257-261.



## Anexos

### A. Determinação do teor de humidade na biomassa

A amostra de biomassa proveniente da LIPOR, numa primeira fase foi triturada/moída e peneirada. Posteriormente foi homogenizada de modo a que qualquer toma pudesse ser representativa da amostra inicial. Determinando-se por fim o teor de humidade, que foi de 3,24 %.

Tabela A.1 – Determinação do teor de humidade média presente na amostra de biomassa proveniente da LIPOR.

Amostra	Massa cadinho (g)	Massa amostra (g)	Média massa (cadinho+amostra após estufa) (g)	Humidade (%)
1	51,2808	5,3440	56,4522	3,23

Exemplo de cálculo, para determinar o teor de humidade (%) presente na amostra 1.

$$\% \text{humidade} = \frac{5,3440 - (56,4522 - 51,2808)}{5,3440} \times 100 = 3,23\%$$

### B. Optimização do pré-tratamento

A primeira etapa a otimizar foi o pré-tratamento. De seguida, apresenta-se uma tabela relativa às massas de amostra usadas para cada uma dos respectivos processos, bem como as condições de operação dos mesmos.

Tabela B.1 – Dados referentes às condições experimentais usadas, para cada pré-tratamento de uma amostra pesando cerca de 20 g.

Pré-tratamento	Massa de amostra (g)	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Tempo de contacto (min)
Hidrotermólise	20,9518	16	204	15
Hidrotermólise (Patmosférica)	20,8898	0,81	120	15
Hidrólise ácida	20,0312	16,5	201	15
Hidrólise alcalina	20,0678	2	124	6
Organosolv (6:1)	20,2538	21	190	30

Os resultados obtidos, após a aplicação de cada pré-tratamento, encontram-se resumidos na Tabela B.2.

Tabela B.2 – Resultados da massa de glucose obtida, após a aplicação de cada um dos processos de pré-tratamento.

Pré-tratamento	Concentração de açúcares totais ° Brix	Factor de diluição	Conc. açúcares °Brix (após diluição)	Conc. de glucose lida (g/L)	Conc. de glucose (após diluição) (g/L)	Volume de filtrado (mL)	massa de glucose (g)
Hidrotermólise	1,15	-----	1,15	8,50	8,50	214	1,82
Hidrotermólise (Patmosférica)	1,50	-----	1,50	12,17	12,17	20	0,24
Hidrólise ácida	2,15	-----	2,15	18,96	18,96	500	9,48
Hidrólise alcalina	6,00	10	1,20	9,03	90,27	144	13,00
Organosolv	5,25	10	0,60	2,75	27,51	94	2,59

Para a determinação dos resultados foi necessário traçar uma curva de calibração dos padrões de glucose em g/L e efectuou-se a sua conversão para ° Brix. A Figura B.1 mostra esta curva de calibração.

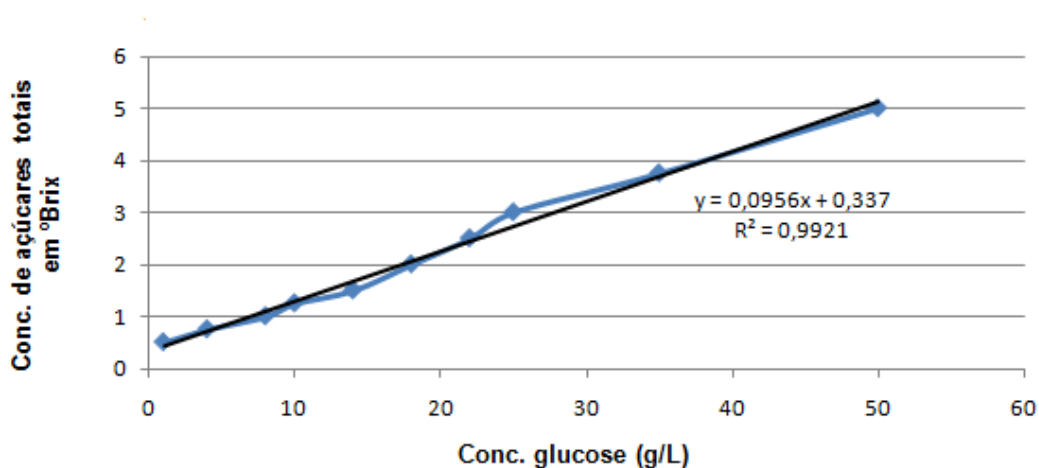


Figura B.1 – Variação da massa de glucose para cada uma das amostras e respectivas réplicas.

Exemplo de cálculo, para determinar a massa de glucose no processo de pré-tratamento por hidrólise alcalina.

Após a amostra ter sido submetida a uma pressão de 2 bar e uma temperatura de 124 °C durante um tempo de contacto de 6 minutos, efectuou-se a leitura da concentração de açúcares no refractómetro (° Brix).

A amostra apresentava 6,00 °Brix, pelo que teve que ser diluída 10 vezes, repetindo-se a leitura da concentração em ° Brix. Pela curva de calibração calculou-se a massa de glucose obtida.

$$C = 6,00^{\circ} \text{ Brix}$$

Após diluição de 10x, amostra apresentava 1,20 °Brix, então vem:

$$X = (1,20 - 0,337) / 0,0956 = 9,03 \text{ g / L}$$

Sendo o factor de diluição de 10x, então vem:

$$X = 9,03 \times 10 = 90,27 \text{ g / L}$$

Uma vez conhecido o volume de filtrado a que corresponde a concentração de açúcares que se determinou, é possível determinar a quantidade total de açúcares na solução resultante do processo de pré-tratamento.

$$\text{massa de glucose} = 90,27 \text{ g / L} \times 0,144 \text{ L} = 13,00 \text{ g}$$

### **C. Optimização da hidrólise enzimática**

Como a hidrólise alcalina foi o pré-tratamento que resultou numa maior produção de açúcares, foi a partir deste processo que se prosseguiu para as restantes etapas subsequentes, mas agora usando apenas 10 g de amostra.

Um total de 11 amostras foi sujeito à hidrólise alcalina, aplicando-se como condições operatórias as seguintes: pressão = 2 bar, temperatura = 124 °C e um tempo de contacto de 6 minutos, usando-se 100 mL de solução de NaOH a 10% para cada 10 g de biomassa.

De seguida, apresenta-se a Tabela C.1 relativa às condições experimentais, resultantes da aplicação do pré-tratamento mencionado.

Tabela C.1 – Dados relativos aos parâmetros estudados no pré-tratamento das amostras, mas usando agora 10 g de amostra.

<b>Amostra</b>	<b>Massa de amostra (g)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Pressão (bar)</b>
1	10,0736	124	2
2	10,2710	124	2
3	10,0926	124	2
4	10,0867	124	2
5	10,0051	124	2
6	10,9250	124	2
7	10,1802	124	2
8	10,5952	124	2
9	10,6924	124	2
10	10,2158	124	2
11	10,0767	124	2

Após a aplicação do pré-tratamento, sobre cada uma das 11 amostras, prosseguiu-se para a optimização da etapa de hidrólise enzimática.

Na optimização da etapa de hidrólise enzimática, manipularam-se dois parâmetros que afectam a actividade da enzima “Accellerase™ 1000”, a temperatura e a razão volume de enzima/quantidade de biomassa, mantendo o pH constante entre a gama óptima indicada para as enzimas entre 4 e 5, a agitação a 30 rpm e um tempo de contacto de 70h.

A Tabela C.2 mostra as condições de temperatura e razão volume de enzima/quantidade de biomassa usadas nas amostras/réplicas, resultante da aplicação de um planeamento factorial ( $2^2$ ).

Tabela C.2 – Condições de temperatura e razão volume de enzima/quantidade de biomassa usadas no processamento por hidrólise enzimática de cada uma das 11 amostras, resultante da aplicação do planeamento factorial ( $2^2$ ).

<b>Amostra</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Volume de enzima (mL) /Quantidade de biomassa</b>
1	50	0,5
2	50	2,5
3	50	0,5
4	50	2,5
5	65	0,5
6	65	2,5
7	65	0,5
8	65	2,5
9	57,5	1,5
10	57,5	1,5
11	57,5	1,5

Todos os hidrolisados resultantes desta etapa, foram filtrados por um sistema de filtração a vácuo, obtendo-se o bolo e o filtrado. No filtrado aplicaram-se três técnicas analíticas distintas para a quantificação dos açúcares resultantes: Índice de Refracção (IR), espectrofotometria UV-Vis e HPLC com detector ELS. A descrição experimental das mesmas será apresentada mais à frente nos pontos C.1, C.2 e C.3.

De seguida, apresenta-se a Tabela C.3 com os resultados da massa de glucose obtida em cada uma das 11 amostras, determinada por refractometria, a partir de uma curva de calibração (°Brix em função da massa de glucose).

Tabela C.3 – Valores da concentração de açúcares em °Brix obtidos para uma das 11 amostras, e respectivas massas de glucose, analisadas por refractometria.

Amostra	Concentração de açúcares totais °Brix	Conc. glucose (g/L)	Volume de filtrado (mL)	Massa de glucose (g)
1	3,5	33,1	145	4,80
2	3,5	33,1	154	5,10
3	2	17,4	270	4,70
4	2	17,4	270	4,70
5	3	27,9	220	6,13
6	2,5	22,6	250	5,66
7	2	17,4	375	6,52
8	2,5	22,6	270	6,11
9	1	6,93	510	3,54
10	1,25	9,55	425	4,06
11	1,5	12,7	365	4,44

Para a determinação dos resultados usou-se a curva de calibração da Figura B.1.

Exemplo de cálculo, para determinar a massa de glucose resultante da aplicação de um pré-tratamento alcalino e da hidrólise enzimática, pelo método refractométrico, na amostra 1:

Amostra 1: 3,5 ° Brix

Curva de calibração:

$$Y = 0,0956x + 0,337$$

$$x = \frac{(3,5 - 0,337)}{0,0956} = 33,1 \text{ g/L}$$

Como o volume de filtrado para esta amostra foi de 145 mL, então a massa de glucose obtida foi de 4,8 g.

$$\text{massa de glucose} = 33,1 \times 0,145 = 4,8 \text{ g}$$

Outro método analítico usado para determinar a concentração de açúcares foi o HPLC-ELS. Depois de optimizadas as condições experimentais a usar e determinados os tempos de retenção dos padrões de açúcar, prosseguiu-se para a determinação dos tempos de retenção das amostras.

A partir da análise dos tempos de retenção e dos respectivos picos das amostras, verificou-se: o tempo de retenção das amostras foi de 20 min e os picos das amostras apresentam um comportamento assimétrico, semelhante aos padrões de glucose.

Perante estas circunstâncias, conclui-se que o açúcar presente nas amostras é a glucose. Na Tabela C.4 e Figura C.1 encontram-se representadas as massas médias dos picos obtidos respectivamente para cada um dos padrões de glucose (concentrações entre 500 e 2500 ppm) e a respectiva curva de calibração – a determinação da área de cada pico foi feita por pesagem.

Tabela C.4 – Valores de cada padrão de glucose entre 500 e 2500 ppm e respectivas massas médias para cada um dos picos de glucose.

Concentração (ppm)	m <sub>1</sub> (g)	m <sub>2</sub> (g)	média das massas (g)
500	0,0059	0,0074	0,0066
750	0,0111	0,0093	0,0102
1000	0,0150	0,0163	0,0156
1500	0,0325	0,0417	0,0371
2000	0,0523	0,0402	0,0462
2500	0,0841	0,0716	0,0778

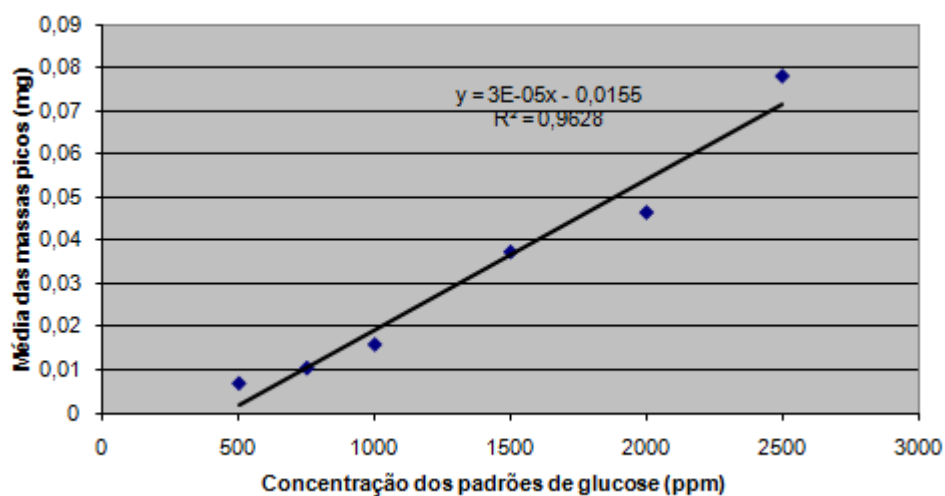


Figura C.1 – Variação das massas médias dos picos em função da concentração dos padrões de glucose.

Na Tabela C.5 apresentam-se os valores da massa de glucose obtida em cada um dos ensaios de hidrólise alcalina seguida de hidrólise enzimática.

Tabela C.5 – Valores da massa de glucose (g), obtida após a etapa de hidrólise alcalina seguida de hidrólise enzimática, para cada uma das 11 amostras, determinada por HPLC-ELS.

Amostra	m <sub>1</sub> (g)	m <sub>2</sub> (g)	média das massas (g)	Concentração final de glucose (ppm)	Volume de filtrado (mL)	Massa de glucose (g)
1	0,0302	0,0290	0,0296	32443	145	4,70
2	0,0298	0,0300	0,0299	32659	154	5,03
3	0,0114	0,0108	0,0111	19120	270	5,16
4	0,0106	0,0111	0,0109	18940	270	5,11
5	0,0233	0,0234	0,0234	27942	220	6,15
6	0,0159	0,0154	0,0157	22397	250	5,60
7	0,0158	0,0160	0,0159	18061	375	6,77
8	0,0152	0,0161	0,0157	22397	270	6,05
9	0,0058	0,0050	0,0054	9009	510	4,59
10	0,0083	0,0055	0,0069	9657	425	4,10
11	0,0106	0,0109	0,0108	11321	365	4,13

Apesar do método de análise por espectrofotometria de UV-Vis não ter dado resultados fiáveis em termos de análise quantitativa, apresentam-se de seguida os gráficos traçados para os padrões de glucose e arabinose.

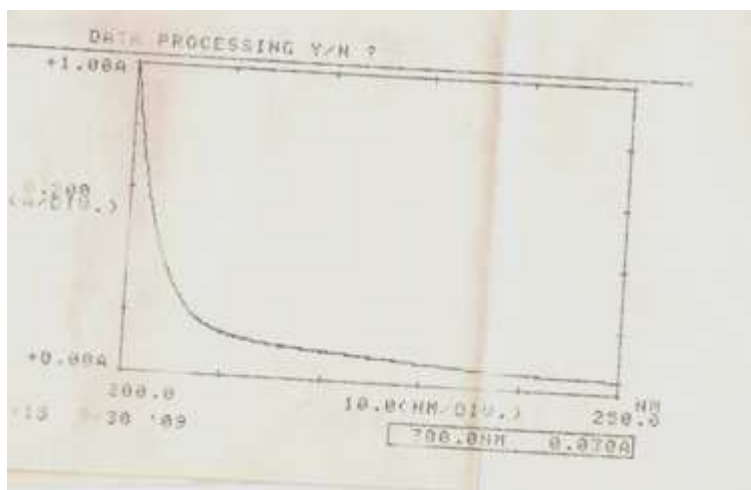


Figura C.2 – Espectro de absorção do padrão de glucose na concentração de 100 g/L, traçado para o comprimento de onda entre 200 e 250 nm.

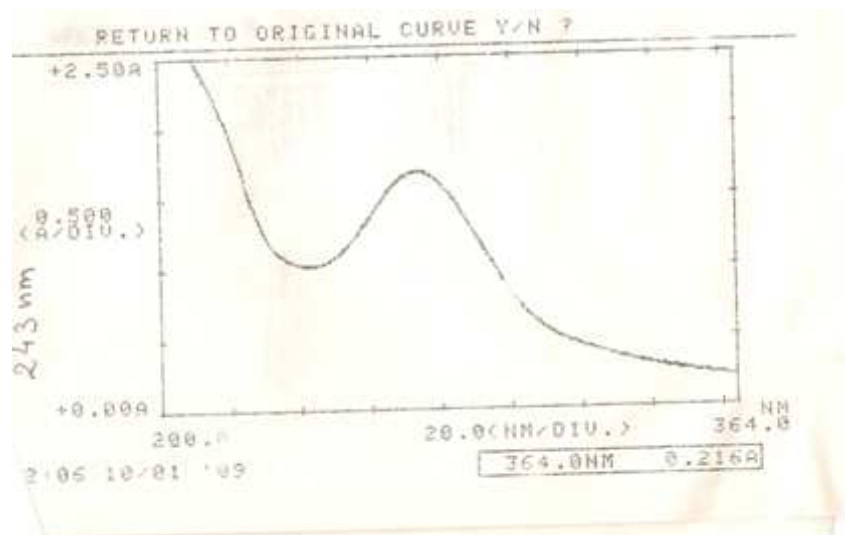


Figura C.3 – Espectro de absorção do padrão de arabinose na concentração de 100 g/L, traçado para o comprimento de onda entre 200 e 364 nm.

Após a aplicação de cada um dos três métodos estudados optou-se por usar o método refractométrico em detrimento do HPLC-ELSD na determinação dos açúcares presentes na hidrólise e na fermentação. Isto porque é um método mais expedito, pois o tempo de análise das amostras é muito mais rápido (no conjunto das amostras analisadas cerca de 15 minutos) comparativamente com o método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (cerca de 20 minutos para cada amostra). Além disso, os resultados da aplicação de ambas as técnicas foram bastante semelhantes.

Após a otimização da etapa de hidrólise enzimática, utilizou-se as melhores condições com vista à obtenção da maior produção de etanol, isto é, uma temperatura de 65 °C e razão volume de enzima/quantidade de biomassa de 5 mL/100 g.

## C.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

### C.1.1. Reagentes

Utilizou-se água ultra pura, filtrada e degaseificada, como eluente. O gás usado para promover a vaporização do eluente foi o ar comprimido, proveniente de um compressor com secador e filtro.

A quantificação dos açúcares nas amostras foi efectuada tomando como base soluções padrão de glucose, xilose e arabinose.

### C.1.2. Preparação das soluções padrão

A calibração da resposta do equipamento foi realizada a partir da análise de soluções

padrão de glucose, xilose e arabinose dissolvidas em água ultra pura. As gamas de concentração usadas nos padrões foram respectivamente 500, 1000, 1500, 2000 e 2500 ppm.

Todas as soluções padrão e amostras foram filtradas por um sistema de vácuo, usando uma membrana de porosidade 0,22  $\mu\text{m}$ . A injeção das amostras na coluna foi efectuada através de uma membrana com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ .

### C.1.3. Equipamento

O equipamento usado nesta técnica cromatográfica foi o HPLC marca Gilson, composto por um injetor de amostras modelo 231 XL equipado com um *loop* de 20  $\mu\text{L}$ , uma bomba modelo 307. O detector usado foi um ELS, modelo PLEMD 960, da *Polymer Laboratories*. O forno de colunas é da marca Eldex CH-150. O integrador é da marca Shimadzu, modelo C-R3A chromatopac. A coluna usada foi a Hi-Plex Pb 8  $\mu\text{m}$ , de dimensões 300x7,7 mm.

A Figura C.4 ilustra o esquema de montagem usado na técnica de espectroscopia HPLC.

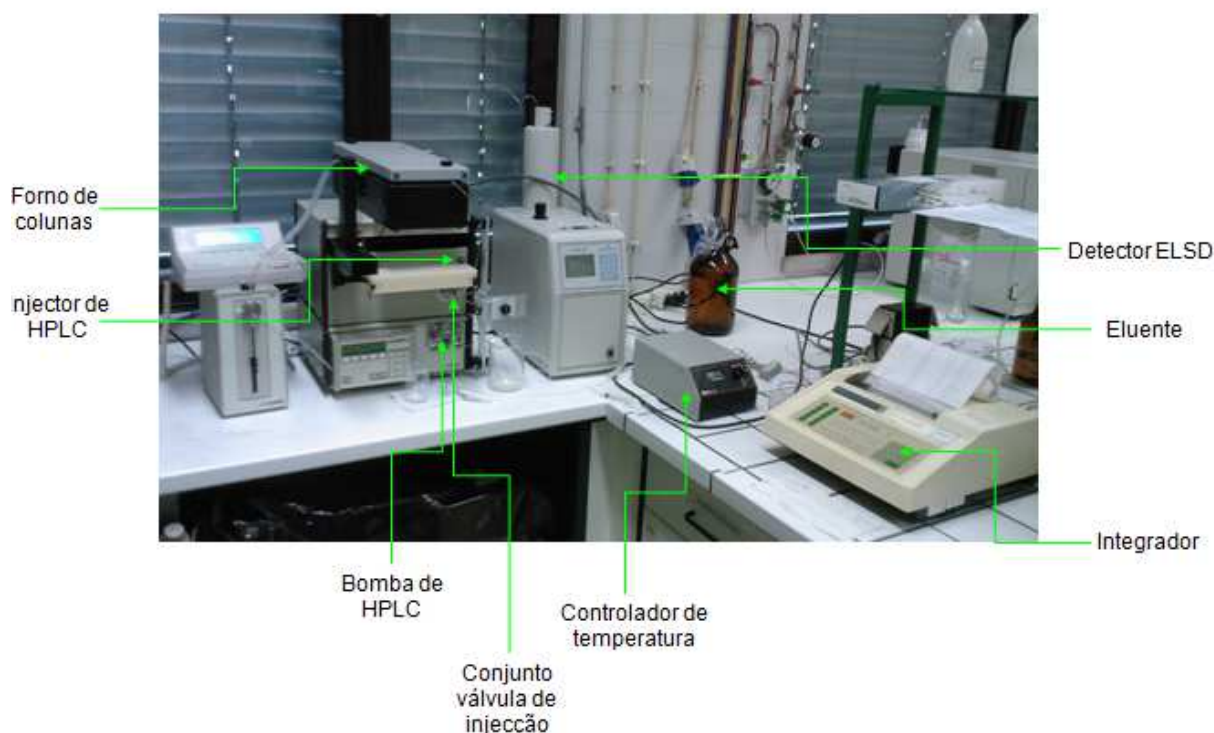


Figura C.4 – Esquema de montagem usado na técnica de análise por HPLC com ELSD.

### C.1.4. Condições experimentais

A optimização do processo de análise por HPLC-ELSD foi baseada no estudo dos parâmetros tais como: caudal de eluente, atenuação do detector.

As condições operacionais usadas nesta técnica foram um caudal de eluente de 0,4 mL/min, correspondente a uma pressão na coluna de 19 bar, e uma temperatura de trabalho na coluna de 80 °C. Por sua vez, o detector operou a uma pressão de 0,5 bar correspondente a um caudal de ar de 4,5 L/min, a uma temperatura de 85 °C, com uma atenuação de 64, uma constante de tempo de 1 s e uma ampliação do sinal de 4. O integrador funcionou com uma atenuação de 0. O tempo entre as sucessivas análises foi de cerca de 20 minutos.

### **C.1.5. Quantificação**

Cada solução padrão foi analisada em duplicado, sendo então construída a curva de calibração com os valores médios das análises.

As amostras foram também analisadas em duplicado e os resultados da análise foram convertidos em concentração, usando as curvas de calibração.

## **C.2. Índice de Refracção (IR)**

### **C.2.1. Reagentes**

Utilizou-se como reagentes água desionizada, soluções padrão de glucose e álcool etílico a 96% para limpeza das células.

### **C.2.2 Preparação das soluções padrão**

Na optimização da hidrólise enzimática, prepararam-se soluções padrão de glucose dissolvidas em água desionizada. As gamas de concentração usadas foram de 1 a 50 g/L, respectivamente.

### **C.2.3. Equipamento**

O equipamento usado nesta técnica foi um refractómetro do tipo ABBE, marca Atago.

### **C.2.4. Condições experimentais**

A determinação dos açúcares totais presentes nas amostras foi realizada à temperatura ambiente (22 °C).

### **C.2.5. Quantificação**

Como o método refractométrico não consegue distinguir os açúcares presentes em cada uma das amostras, determinou-se a concentração dos açúcares totais presentes nas mesmas. Para isso, traçou-se uma curva de calibração com soluções de glucose em concentrações de 1 a 50 g/L e converteu-se a sua leitura para ° Brix.

## **C.3. Ultravioleta Visível (UV-Vis)**

### **C.3.1. Reagentes**

Usou-se água desionizada, e soluções padrão de glucose, xilose e arabinose.

### **C.3.2. Preparação das soluções padrão**

A calibração da resposta dos equipamentos de espectrofotometria UV-Vis foi realizada a partir de soluções padrão de glucose, xilose e arabinose em água desionizada. As gamas de concentrações usadas para os padrões foram 20, 40, 60, 80 e 100 g/L.

### **C.3.3. Equipamento**

Nesta técnica de espectrofotometria na região do ultravioleta visível, usaram-se dois equipamentos para quantificação dos três açúcares (glucose, xilose e arabinose), presentes nas amostras. O espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-160A, e o espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-1700 pharماسpec.

### **C.3.4. Condições experimentais**

Inicialmente, prepararam-se, respectivamente soluções mãe de glucose, xilose e arabinose de concentração 100 g/L. Posteriormente traçou-se o espectro de absorção entre os 200 nm e os 364 nm para cada uma das soluções-mãe de concentração 100 g/L, e seleccionou-se o comprimento de onda de absorção para cada açúcar. Os comprimentos de onda seleccionados para a glucose, xilose e arabinose foram respectivamente: 200 nm, 278 nm e 243 nm.

De seguida, calibrou-se os equipamentos UV-Vis, usando-se padrões de concentração 20, 40, 60, 80 e 100 g/L, respectivamente para cada açúcar.

O tempo entre as sucessivas análises foi de cerca de 5 minutos.

### C.3.5. Quantificação

A quantificação da glucose, xilose e arabinose em cada uma das 11 amostras, foi obtida através da medição da absorvância. A partir da curva de calibração traçada para cada uma das soluções padrão dos açúcares em questão, determinou-se a concentração de cada açúcar em cada amostra.

Cada solução padrão e amostra foram analisadas em triplicado.

### D. Otimização da fermentação

Como as condições ótimas determinadas para a hidrólise enzimática foram para uma temperatura de 65 °C e para uma razão volume de enzima/quantidade de biomassa de 5 mL/100 g, repetiu-se a sequência hidrólise alcalina e hidrólise enzimática numa nova amostra, e efectuou-se a fermentação, usando agora as condições otimizadas para cada etapa.

Os resultados obtidos após a aplicação da hidrólise enzimática encontram-se resumidos na Tabela D.1.

Tabela D.1 – Valores da concentração de açúcares após a etapa de hidrólise enzimática nos ensaios que se revelaram mais eficientes em termos de produção de açúcares.

Amostra	° Brix (ensaio 1)	° Brix (ensaio 2)	° Brix (média)	Concentração à saída da hidrólise (g/L)	Volume de solução (mL)	Massa de açúcares (g)
5	4	4,5	4,25	40,93	150	6,14
7	4	4,5	4,25	40,93	155	6,34

Na execução da fermentação, utilizou-se uma levedura (*Saccharomyces cerevisea*), capaz de fermentar os açúcares resultantes da saída da etapa de hidrólise em etanol. A Tabela D.2 apresenta a massa de levedura usada no ensaio 5 e sua réplica 7, bem como o valor do pH ajustado (esta levedura funciona nas condições ótimas de pH entre 5 e 6).

Tabela D.2 – Valores da massa de levedura usada e do pH após ajuste, para a amostra 5 e sua réplica, 7.

Amostra	m <sub>levedura</sub> (g)	pH
5	0,2013	5,49
7	0,1999	5,33

#### Exemplo de cálculo, para determinar a massa de levedura a usar na fermentação.

Tendo em vista a relação teórica, expressa na bibliografia:

$$1 \times 10^{10} \text{ células} \Leftrightarrow 1 \text{ g levedura}$$

$$3 \times 10^6 - 10^7 \text{ células} \Leftrightarrow 1 \text{ mL}$$

Escolheu-se um volume de 200 mL, e calculou-se a massa de levedura necessária a partir da relação descrita.

$$V = 200 \text{ mL}$$

$$\text{massa de levedura} = \frac{(200 \times 10^7)}{1 \times 10^{10}} = 0,2 \text{ g}$$

Depois de se ter realizado a fermentação em condições aeróbias, durante 48 h, determinou-se no mosto fermentado a concentração de açúcares à saída da fermentação. A Tabela D.3 resume os resultados obtidos.

Tabela D.3 – Valores da concentração de açúcares à saída da etapa de fermentação.

Amostra	° Brix (ensaio 1)	° Brix (ensaio 2)	° Brix (média)	Concentração à saída da fermentação (g/L)	Volume de solução (mL)	Massa de açúcares (g)
5	1	1	1,00	6,94	360	2,50
7	1	1	1,00	6,94	370	2,57

Depois de calculadas as massas de açúcares após a etapa de hidrólise enzimática e após a etapa de fermentação, determinou-se a eficiência média para as respectivas etapas. Na Tabela D.4, encontram-se os valores de eficiência média obtidos nas respectivas etapas indicadas.

Tabela D.4 – Valores da eficiência média da hidrólise enzimática e fermentação.

Amostra	Eficiência hidrólise	Eficiência fermentação
5	81,7%	59,3%
7	87,2%	59,5%
Média	84,5%	59,4%

O cálculo da eficiência da etapa de hidrólise enzimática e da etapa de fermentação encontram-se seguidamente exemplificados, para a amostra 5.

Exemplo de cálculo (amostra 5), para determinar a eficiência da hidrólise enzimática.

Inicialmente, calculou-se a massa seca da amostra em causa. Sabendo que se partiu de 10,3540 g de amostra inicial, determinou-se a massa seca a partir do teor de humidade média, 3,24 %.

$$massa\ seca = 10,3540 - 10,3540 \times \left( \frac{3,24}{100} \right) = 10,0180\text{g}$$

De seguida, calculou-se a massa de celulose e hemicelulose presente na amostra seca. Para isso, considerou-se que a amostra seca tinha 75 % de celulose e hemicelulose, sendo os restantes 25 % de lenhina.

A escolha dos 75 %, foi por estimativa, tendo em consideração valores de referência para outras matérias.

$$massa_{\text{celulose+hemicelulose}} = 10,0180 \times 0,75 = 7,51\text{g}$$

A eficiência da etapa de hidrólise enzimática foi calculada, a partir da massa de celulose e hemicelulose e da massa de açúcares obtida na referida etapa de hidrólise enzimática (Tabela D.1).

$$Eficiência\ da\ hidrólise = \frac{massa\ de\ açúcares}{massa_{\text{celulose+hemicelulose}}} \times 100$$

$$Eficiência\ da\ hidrólise = \frac{6,14}{7,51} \times 100 = 81,7\%$$

Exemplo de cálculo (amostra 5), para determinar a eficiência da fermentação:

$$Eficiência\ da\ fermentação = \frac{(massa\ açúcares_{\text{depois\ hidrólise}} - massa\ açúcares_{\text{depois\ fermentação}})}{massa\ de\ açúcares_{\text{depois\ hidrólise}}} \times 100$$

$$Eficiência\ da\ fermentação = \frac{(6,14 - 2,50)}{6,14} \times 100 = 59,3\%$$

A partir da massa de açúcares obtida em cada uma das etapas anteriormente referidas (hidrólise enzimática e fermentação), determinou-se a quantidade de etanol obtido. A Tabela D.5 mostra a quantidade de etanol obtido, para as condições óptimas, isto é, à temperatura de 65 °C e para uma razão volume de enzima/quantidade de biomassa de 5 mL/100 g.

Tabela D.5 – Quantidade de etanol obtido, para as condições ótimas.

Amostra	Quantidade de açúcares que reagiu/converteu a etanol	Massa molecular da glucose (g/mol)	nº mol de glucose	nº mol de etanol	Massa molecular etanol (g/mol)	Massa de etanol (g)
5	3,64	180	0,0202	0,0405	46,07	1,86
7	3,78		0,0210	0,0420		1,93

Exemplo de cálculo (amostra 5), para determinar a quantidade de etanol obtido, após o processo fermentativo:

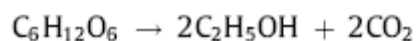
A quantidade de açúcares que reagiu/converteu a etanol foi calculada a partir da massa de açúcares obtida nas Tabelas D.1 e D.3.

$$\text{Quantidade de açúcares que reagiu/converteu em etanol} = 6,14 - 2,50 = 3,64 \text{ g}$$

Com a massa molecular da glucose (180 g/mol), calculou-se o número de moles de glucose.

$$n^{\circ} \text{ moles glucose} = \frac{3,64}{180} = 0,0202 \text{ mol}$$

Como pela estequiometria da reacção 1 mol de glucose origina 2 mol etanol, de acordo com a equação:



Então:

$$n^{\circ} \text{ moles etanol} = 0,0202 \times 2 = 0,0405 \text{ mol}$$

A partir da massa molecular de etanol (46,07 g/mol) calculou-se a massa de etanol para conversão completa da glucose.

$$\text{massa de etanol} = 0,0405 \times 46,07 = 1,86 \text{ g}$$

Seguidamente, na Tabela D.6 apresenta-se o máximo de quantidade de etanol (teórico), o real e o obtido por destilação.

Tabela D.6 – Valores da quantidade máxima de etanol (teórico, real e obtido na destilação).

Amostras	Máximo Obtido	Real	Destilação
5	3,37	1,86	1,42
7	3,26	1,93	1,46
Média	3,32	1,90	1,44

Exemplo de cálculo (amostra 5), para determinar a quantidade máxima de etanol (teórico, real e obtido por destilação).

$$m_{\text{etanol}} = 7,51 \times 0,88 \times 1 \times 0,51 = 3,37 \text{ g}$$

Neste caso, considerou-se a eficiência da hidrólise 88% e considerando que todos os açúcares presentes depois da hidrólise foram convertidos na totalidade a etanol.

$$m_{\text{etanol real}} = 1,86 \text{ g}$$

$$\rho = 0,7894 \text{ g/cm}^3$$

$$m_{\text{massa de etanol obtida por destilação}} = (360 \times 0,005) \times 0,7894 = 1,42 \text{ g}$$

Traçou-se uma curva de calibração da concentração etanol/água em função do índice de refração da mistura, e a partir do índice de refração do mosto fermentado, determinou-se a % de etanol presente no mesmo. A Tabela D.7 e a Figura D.1 ilustram o que se referiu.

Tabela D.7 – Valores do índice de refração em função da % de etanol.

Mistura etanol+água	Índice de refração (IR)	% etanol	Índice de refração (IR)
100% água	1,3341	0	1,3341
10% etanol + 90% água	1,3389	1	1,3343
20% etanol + 80% água	1,3399	2	1,3346
30% etanol + 70% água	1,3487	3	1,3350
40% etanol + 60% água	1,3545	4	1,3355
50% etanol + 50% água	1,3585	5	1,3359

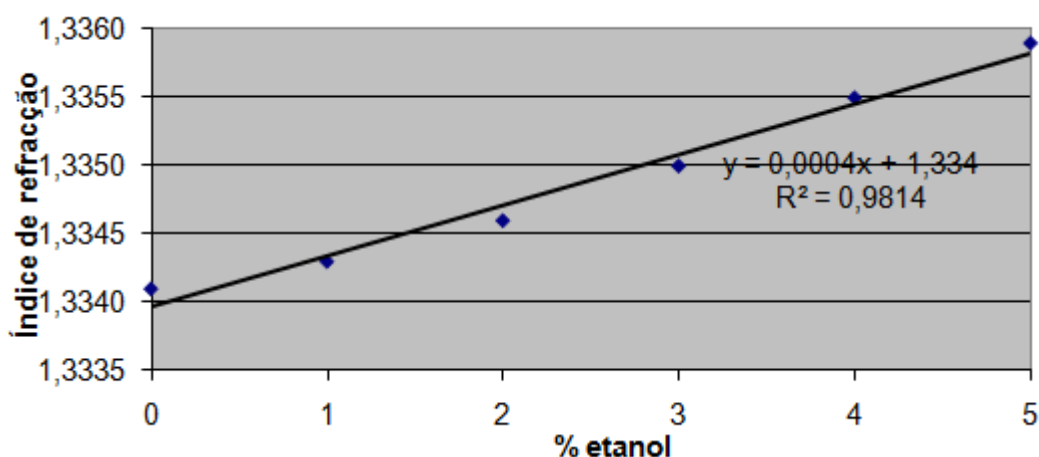


Figura D.1 – Curva de calibração % etanol/água em função do índice de refração da mistura.

A Tabela D.8 apresenta o índice de refração medido na amostra 5 e na sua réplica 7.

Tabela D.8 – Valores da quantidade máxima de etanol (teórico), real e obtido na destilação.

Amostra	Índice de refração
5	1,3342
7	1,3342
Média	1,3342

Com a curva de calibração e com o índice de refração médio da amostra, determinou-se a % etanol médio formado.

$$Y = 0,0004x + 1,334$$

$$\text{Índice de refração} = 1,3342$$

$$X = \frac{(1,3342 - 1,334)}{0,0004} = 0,5\%$$

## E. Custos das etapas

Após a realização do trabalho é importante fazer-se uma estimativa do custo global.

Foi necessário fazer-se algumas considerações, tais como o preço da água 2,2 euros/m<sup>3</sup>, para serviços públicos estatais; o preço da electricidade 0,1 euros/kWh; bem como o preço dos açúcares (glucose, xilose e arabinose) e da potência do forno de colunas que foi arbitrado.

### E.1. Etapa do pré-tratamento

O pré-tratamento envolveu o uso de um reactor de alta pressão e um banho termostatizado. Os custos totais deste processo englobam o custo de energia e água associado a cada equipamento.

#### E.1.1. Cálculo do consumo de água

Começou-se por calcular o consumo total de água no reactor de alta pressão, seguido do banho. Para isso, determinou-se o caudal médio de água (Tabela E.1).

Tabela E.1 – Valores de volume e tempo usados para calcular o caudal de água de arrefecimento. (m<sup>3</sup>/s).

Ensaio	V (mL)	t (s)	Caudal (mL/s)	Caudal (m <sup>3</sup> /s)
1	260	17,44	14,91	1,491E-05
2	365	23,97	15,23	1,523E-05
3	405	27,35	14,81	1,481E-05
Média	343	22,92	14,98	1,498E-05

Exemplo de cálculo, para determinar o caudal de água (exemplo amostra 1).

$$\text{Caudal de água} = \text{volume de água} / \text{tempo}$$

$$\text{Caudal de água} = 260 / 17,44 = 1,491E^{-5} \text{ m}^3 / \text{s}$$

Sabendo que o tempo de operação para cada ensaio foi de 3 horas, correspondente a 10800 segundos, calculou-se o volume médio de água gasto, conforme verificado no exemplo de cálculo.

Exemplo de cálculo, para determinar o volume médio de água gasto, durante 3 horas de operação.

$$\text{volume médio de água gasto} = \text{caudal de água} \times \text{tempo de operação}$$

$$\text{volume médio de água gasto} = 1,498E^{-5} \times 10800 = 0,16 \text{ m}^3$$

Sabendo que o preço da água por m<sup>3</sup>, é de 2,2 euros/ m<sup>3</sup> calculou-se o custo da água por operação:

$$\text{custo da água / operação} = \text{volume de água gasto} \times \text{preço da água}$$

$$\text{custo da água / operação} = 0,16 \times 2,2 = 0,36 \text{ euros}$$

Como o número de ensaios realizados, nesta etapa foi de 29, então o custo do consumo de água para o reactor de alta pressão foi de 10,32 euros.

$$\text{custo do consumo de água} = \text{custo de água por operação} \times n^{\circ} \text{ ensaios}$$

$$\text{custo do consumo de água} = 0,36 \times 29 = 10,32 \text{ euros}$$

O custo de água no banho termostaticado foi calculado a partir do volume de água no interior do banho, e do número de ensaios realizados (10).

Exemplo de cálculo, para determinar o volume médio de água gasto, no banho.

$$\text{volume de água no banho} = 0,0133\text{m}^3$$

$$\text{custo de água / operação} = 0,0133 \times 2,2 = 0,03\text{euros}$$

Sabendo que o número de ensaios fora 10, calculou-se o custo do consumo da água, no banho.

$$\text{custo de água} = 0,03 \times 10 = 0,3\text{euros}$$

O consumo total de água no pré-tratamento é dado:

$$\text{custo do consumo total de água} = \text{custo do reactor} + \text{custo do banho}$$

$$\text{custo do consumo total de água} = 10,32 + 0,03 = 10,62\text{euros}$$

### **E.1.2. Cálculo do consumo de energia**

No reactor de alta pressão, a manta de aquecimento e o controlador são os “responsáveis” pelo consumo de energia e, tal como mencionado anteriormente, o tempo de operação para cada ensaio foi de 3h.

A manta tem potência de 550 W e o controlador tem uma voltagem de 230 volts e uma intensidade de corrente de 15 amperes.

Seguidamente, apresenta-se o exemplo de cálculo do consumo de energia na manta de aquecimento.

Exemplo de cálculo, para determinar o consumo de energia da manta, durante 3 horas de operação.

$$\text{potência da manta} = 550\text{W}$$

$$\text{tempo de operação} = 3\text{h}$$

$$\text{Energia consumida / operação} = \frac{\text{potência do equipamento}}{1000} \times \text{tempo de operação}$$

$$\text{Energia consumida / operação} = \frac{(550)}{1000} \times 3 = 1,65\text{kW.h}$$

Sabendo o preço do kWh, calcula-se o custo de energia/ensaio.

$$\text{preço da energia} = 0,1 \text{ euros} / \text{kWh}$$

$$\text{custo de energia} / \text{ensaio} = \text{energia consumida por operação} \times \text{preço da energia}$$

$$\text{custo de energia} / \text{ensaio} = 1,65 \times 0,1 = 0,165 \text{ euros}$$

Como o número de ensaios foram 29, então o custo total de energia da manta:

$$\text{custo total de energia da manta} = \text{custo de energia por ensaio} \times n^\circ \text{ ensaios}$$

$$\text{custo total de energia da manta} = 0,165 \times 29 = 4,79 \text{ euros}$$

Seguidamente, apresenta-se o exemplo de cálculo do consumo de energia no controlador.

Exemplo de cálculo, para determinar o consumo de energia no controlador, durante 3 horas de operação.

$$\text{potência do controlador} = 230 \times 15 = 3450 \text{ W}$$

$$\text{Energia consumida} / \text{operação} = \frac{(3450)}{1000} \times 3 = 10,35 \text{ kW.h}$$

$$\text{custo de energia} / \text{ensaio} = 10,35 \times 0,1 = 1,035 \text{ euros}$$

Como o número de ensaios foi 29, então o custo total de energia gasta no controlador foi:

$$\text{custo total de energia do controlador} = 1,035 \times 29 = 30,02 \text{ euros}$$

Como a manta de aquecimento está ligada ao controlador, o consumo de energia da primeira é muito inferior ao do controlador.

Sabendo que o banho termostatizado apresenta uma potência de 1750 W, o tempo de operação do banho foi de 70h e o número de ensaios realizados foram 10, calculou-se o custo do consumo de energia deste equipamento.

Exemplo de cálculo, para determinar o consumo de energia no banho termostatizado, durante 70 horas de operação.

$$\text{potência do banho termostatizado} = 1750 \text{ W}$$

$$\text{tempo de operação} = 70 \text{ h}$$

$$\text{Energia consumida / operação} = \frac{(1750)}{1000} \times 70 = 122,5 \text{ kW.h}$$

$$\text{custo de energia / ensaio} = 122,5 \times 0,1 = 12,25 \text{ euros}$$

$$\text{custo total de energia do banho} = 12,25 \times 10 = 122,50 \text{ euros}$$

Então o custo total de energia:

$$\text{custo total de energia} = \text{custo da manta} + \text{custo do controlador} + \text{custo do banho}$$

$$\text{custo total de energia} = 4,79 + 30,02 + 122,50 = 157,30 \text{ euros}$$

Então o custo total deste processo será de 167,91 euros.

$$\text{custo total do consumo do pré - tratamento} = 10,62 + 157,30 = 167,91 \text{ euros}$$

## **E.2. Etapa de hidrólise enzimática**

Na optimização da etapa de hidrólise enzimática, usou-se o mesmo banho, que foi indicado no ponto E.1. No entanto, o número de ensaios realizados foram 19.

### **E.2.1. Cálculo do consumo de água**

Como o volume de água no banho é o mesmo que o indicado no ponto E.1.1. (0,0133 m<sup>3</sup>), então o custo de água por operação também se mantém (0,03 euros).

Sabendo que o número de ensaios fora 19, calculou-se o custo do consumo da água, no banho.

$$\text{custo total de água do banho} = 0,03 \times 19 = 0,55 \text{ euros}$$

### **E.2.2. Cálculo do consumo de energia**

Como a potência deste equipamento e o tempo de operação são os mesmos que o indicado no ponto E.1 (respectivamente, 1750 W e 70 h), então a energia consumida por operação também se mantém (122,5kW.h) bem como o custo de energia por ensaio, 12,25 euros.

Sabendo que o número de amostras fora 19, calculou-se o custo da energia, no banho.

$$\text{custo total de energia do banho} = 12,25 \times 19 = 232,75 \text{ euros}$$

Então o custo total deste processo será de 233,30 euros.

$$\text{custo total do consumo do banho termostaticado} = 0,55 + 232,75 = 233,30 \text{ euros}$$

### **E.3. Análise por refractometria**

O equipamento usado nesta técnica foi o refractómetro do tipo ABBE, marca Atago. Este equipamento tem incorporado o termómetro digital (para medição dos açúcares) e o próprio refractómetro.

A potência deste equipamento foi medida usando um equipamento digital de medição de energia. O valor de potência foi calculado pela média dos valores de potência, durante um dado período de tempo.

O tempo de operação foi de 0,08 h para cada ensaio (corresponde a 5 min. entre as sucessivas amostras) e o número de ensaios realizados foram 29. Os custos totais deste processo englobam apenas o custo de energia.

#### **E.3.1. Cálculo do consumo de energia**

Primeiramente, será exemplificado o cálculo do consumo de energia no termómetro digital, seguido do refractómetro (propriamente dito).

Exemplo de cálculo, relativo ao consumo de energia no termómetro digital, durante 0,08 horas de operação.

$$\text{potência do termómetro digital} = 6W$$

$$\text{tempo de operação} = 0,08h$$

$$\text{Energia consumida / operação} = \frac{6}{1000} \times 0,08 = 0,00048kW.h$$

$$\text{custo de energia / ensaio} = 0,00048 \times 0,1 = 0,000048euros$$

Como o número de ensaios foram 29, então o custo total de energia do termómetro digital:

$$\text{custo total de energia do termómetro digital} = 0,000048 \times 29 = 0,001euros$$

Exemplo de cálculo, relativo ao consumo de energia no refractómetro (propriamente dito), durante 0,08 horas de operação.

$$\text{potência do refractómetro} = 195W$$

$$\text{Energia consumida / operação} = \frac{195}{1000} \times 0,08 = 0,0156kW.h$$

$$\text{custo de energia / ensaio} = 0,0156 \times 0,1 = 0,00156euros$$

Como o número de ensaios foram 29, então o custo total de energia do termómetro digital:

$$\text{custo total de energia do refractómetro} = 0,00156 \times 29 = 0,05 \text{euros}$$

Então, o custo total de energia usando a análise refractométrica:

$$\text{custo total de energia} = \text{custo do termómetro digital} + \text{custo do refractómetro}$$

$$\text{custo total de energia} = 0,001 + 0,05 = 0,05 \text{euros}$$

#### **E.4. Análise por HPLC**

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência envolveu custos associados ao consumo energético e de água. Relativamente aos custos associados à parte energética, considerou-se para tal: o sistema de HPLC propriamente dito (bomba e injecto), o consumo do detector, integrador e do forno para colunas.

Os custos associados ao consumo de água relacionam-se com o caudal de eluente e com o volume de água necessário para a preparação de padrões e amostras.

Por estimativa o número de padrões e amostras, perfaz um número total de 58 ensaios.

##### **E.4.1. Cálculo do consumo de água**

Relativamente ao caudal eluente, sabe-se que este circulou a 0,4 mL/min. Como o tempo de injeção entre as sucessivas amostras foi de 20 min., então o volume de água gasto por cada amostra foi de 8 mL.

Exemplo de cálculo, relativo ao consumo de água no eluente, durante de 0,33 horas de operação.

$$\text{caudal de eluente} = 0,4 \text{mL} / \text{min}$$

$$\text{volume de água gasto / amostra} = 0,4 \times 20 = 8 \text{mL}$$

$$\text{volume de água gasto} = 8 \times 58 = 464 \text{mL}$$

$$\text{custo de água consumida no eluente} = 0,000464 \times 2,2 = 0,001 \text{euros}$$

Na preparação das amostras e padrões (58), o volume total de água usada foi de 3 L (0,003 m<sup>3</sup>).

Exemplo de cálculo, relativo ao consumo de água nos padrões e amostras, durante de 0,33 horas de operação.

$$\text{custo de água na preparação de padrões e amostras} = 0,003 \times 2,2 = 0,0066 \text{ euros}$$

Conclui-se assim que o consumo total de água usada tanto no eluente como na preparação de amostras e padrões foi de euros.

$$\text{custo total de água consumida no HPLC} = 0,001 + 0,0066 = 0,0076 \text{ euros}$$

#### **E.4.2. Cálculo do consumo de energia**

A potência dos equipamentos usados no HPLC foi medida usando um equipamento digital de medição de energia. O valor de potência foi calculado pela média dos valores de potência, durante um dado período de tempo.

O tempo de operação foi de 0,33 h, correspondente a sucessivas injeções entre as amostras de 20 min.

Seguidamente apresenta-se o exemplo de cálculo relativo ao consumo de energia no HPLC (bomba e injector), detector, integrador e forno da coluna.

Exemplo de cálculo, relativo ao consumo de energia no HPLC (bomba e injector), durante 0,33 horas de operação

Bomba:

$$\text{potência do HPLC na bomba} = 37W$$

$$\text{Energia consumida / operação} = \frac{37}{1000} \times 0,33 = 0,0122 \text{ kW.h}$$

$$\text{custo de energia / ensaio} = 0,0122 \times 0,1 = 0,00122 \text{ euros}$$

$$\text{custo de energia} = 0,00122 \times 58 = 0,07 \text{ euros}$$

Injector:

$$\text{potência do HPLC no injector} = 15W$$

$$\text{Energia consumida / operação} = \frac{15}{1000} \times 0,33 = 0,00495 \text{ kW.h}$$

$$\text{custo de energia / ensaio} = 0,00495 \times 0,1 = 0,000495 \text{ euros}$$

$$\text{custo de energia} = 0,000495 \times 58 = 0,03 \text{ euros}$$

$$\text{custo de energia no HPLC} = \text{bomba} + \text{injector}$$

$$\text{custo de energia no HPLC} = 0,07 + 0,03 = 0,1 \text{ euros}$$

Exemplo de cálculo, relativo ao consumo de energia no detector, durante 0,33 horas de operação.

$$\text{potência do detector} = 82W$$

$$\text{Energia consumida / operação} = \frac{82}{1000} \times 0,33 = 0,02706kW.h$$

$$\text{custo de energia / ensaio} = 0,02706 \times 0,1 = 0,002706\text{euros}$$

$$\text{custo de energia} = 0,002706 \times 58 = 0,16\text{euros}$$

Exemplo de cálculo, relativo ao consumo de energia no integrador, durante 0,33 horas de operação.

$$\text{potência do integrador} = 11W$$

$$\text{Energia consumida / operação} = \frac{11}{1000} \times 0,33 = 0,00363kW.h$$

$$\text{custo de energia / ensaio} = 0,00363 \times 0,1 = 0,000363\text{euros}$$

$$\text{custo de energia} = 0,000363 \times 58 = 0,021\text{euros}$$

Exemplo de cálculo, relativo ao consumo de energia no forno, durante 0,33 horas de operação.

Não foi possível saber-se a potência do forno de colunas, por isso admitiu-se que a potência deste equipamento é de 1200 W.

$$\text{potência do forno} = 1200W$$

$$\text{Energia consumida / operação} = \frac{1200}{1000} \times 0,33 = 0,396kW.h$$

$$\text{custo de energia / ensaio} = 0,396 \times 0,1 = 0,0396\text{euros}$$

$$\text{custo de energia} = 0,0396 \times 58 = 2,3\text{euros}$$

$$\text{custo total de energia} = 0,1 + 0,16 + 0,021 + 2,3 = 2,57\text{euros}$$

Então o custo total deste método analítico será de 2,58 euros.

$$\text{custo total do consumo do HPLC} = 0,0076 + 2,57 = 2,58\text{euros}$$

## **E.5. Análise por UV-Vis**

A potência do equipamento de espectrofotometria de ultravioleta-vísivel foi medida usando um equipamento digital de medição de energia. O valor de potência foi calculado pela média dos valores de potência, durante um dado período de tempo.

Seguidamente, são apresentados os custos de consumo de energia e água inerentes à aplicação deste método de análise

O tempo de operação foi de 0,08h para cada ensaio (corresponde a 5min. entre as sucessivas amostras) e o número de ensaios realizados foram 24.

### **E.5.1. Cálculo do consumo de água**

O volume total de água gasto na preparação das amostras e soluções padrão (no conjunto 24) foi de 840 mL.

Exemplo de cálculo, relativo ao consumo de água no equipamento de espectroscopia UV-Vis, durante 0,08 horas de operação.

$$\text{volume de água} = 0,000840\text{m}^3$$

$$\text{custo total de água} = 0,000840 \times 2,2 = 0,0018\text{euros}$$

### **E.5.2. Cálculo do consumo de energia**

Exemplo de cálculo, relativo ao consumo de energia do equipamento de espectroscopia UV-Vis, durante 0,08 horas de operação.

$$\text{potência} = 90\text{W}$$

$$\text{tempo de operação} = 0,08\text{h}$$

$$\text{Energia consumida/operação} = \frac{90}{1000} \times 0,08 = 0,0072\text{kW.h}$$

$$\text{custo de energia/ensaio} = 0,0072 \times 0,1 = 0,00072\text{euros}$$

Como o número de ensaios foram 24, então o custo total de energia do equipamento de ultravioleta-vísivel:

$$\text{custo total de energia} = 0,00072 \times 24 = 0,02\text{euros}$$

Então, o custo total usando a análise UV-Vis, foi de 0,02 euros.

$$\text{custo total} = 0,0018 + 0,02 = 0,02 \text{ euros}$$

## E.6. Fermentação

A fermentação foi realizada numa tina, com um volume de água de 3648 cm<sup>3</sup>. O tempo de operação foi de 48 h para cada conjunto de ensaios, sendo que o número de ensaios realizados fora 8.

### E.6.1. Cálculo do consumo de água

O volume de água usado na tina foi determinado a partir das dimensões comprimento, largura e altura, explícitas na Tabela E.2.

Tabela E.2 – Dimensões (altura, largura e comprimento) usadas para calcular o volume de água.

Dimensões (cm)	
Altura H <sub>2</sub> O	4
Largura	30
Comprimento	30,4

$$\text{volume de água} = \text{altura de água} \times \text{largura} \times \text{comprimento}$$

$$\text{volume de água} = 4 \times 30 \times 30,4 = 3648 \text{ cm}^3$$

$$\text{custo de água / operação} = 0,003648 \times 2,2 = 0,008 \text{ euros}$$

Como o número de ensaios foram 8, então o custo total do consumo de água:

$$\text{custo total de água} = 0,008 \times 8 = 0,064 \text{ euros}$$

### E.6.2. Cálculo do consumo de energia

Na realização da fermentação, usou-se como equipamentos um sistema de agitação e aquecimento do banho e uma placa com agitação magnética para as amostras.

Inicialmente, irá ser exemplificado o cálculo do consumo de energia do sistema de agitação e aquecimento, e posteriormente o da placa com agitação magnética.

Exemplo de cálculo, relativo ao consumo de energia do sistema de aquecimento e agitação, durante 48 horas de operação.

$$potência = 1050W$$

$$tempo de operação = 48h$$

$$Energia consumida / operação = \frac{1050}{1000} \times 48 = 50,4kW.h$$

$$custo da energia consumida / ensaio = 50,4 \times 0,1 = 5,04euros$$

Como o número de ensaios foram 8, então:

$$custo total de energia no sistema de aquecimento = 5,04 \times 8 = 40,32euros$$

Exemplo de cálculo, relativo ao consumo de energia da placa de agitação, durante 48 horas de operação.

$$potência = 650W$$

$$Energia consumida / operação = \frac{650}{1000} \times 48 = 31,2kW.h$$

$$custo da energia consumida / ensaio = 31,2 \times 0,1 = 3,12euros$$

$$custo total de energia da placa de agitação = 3,12 \times 8 = 24,96euros$$

$$custo total de energia = 40,32 + 24,96 = 65,28euros$$

Então, o custo total do processo fermentativo foi de 65,34 euros.

$$custo total = 0,064 + 65,28 = 65,34euros$$

## **E.7. Destilação**

Experimentalmente efectuou-se uma destilação simples. Durante a execução da mesma foi necessário consumir-se água, de modo a refrigerar o sistema. Também se usou uma manta de aquecimento.

O tempo de operação de cada ensaio foi de 0,75h, sendo que o número de ensaios praticados fora 8.

### E.7.1. Cálculo do consumo de água

Começou-se por calcular o consumo total de água nesta etapa. Para isso, determinou-se o caudal médio de água (Tabela E.3).

Tabela E.3 – Valores do volume de água e tempo usados para calcular o caudal em m<sup>3</sup>/s.

Ensaio	V (mL)	t (s)	Caudal (mL/s)	Caudal (m <sup>3</sup> /s)
1	435	25,31	17,19	1,719E-05
2	435	25,47	17,08	1,708E-05
3	420	24,50	17,14	1,714E-05
Média	430	25,09	17,14	1,714E-05

Após determinação do caudal de água usado para refrigerar o sistema, agora é necessário calcular-se o consumo de água, durante um tempo de operação de 0,75h, conforme mostrado no exemplo.

Exemplo de cálculo, para determinar o custo do consumo de água, durante 0,75 horas de operação.

$$\text{volume médio de água gasto} = 1,714E^{-5} \times 2700 = 0,05m^3$$

$$\text{custo da água/operação} = 0,05 \times 2,2 = 0,10\text{euros}$$

Sabendo que o número de ensaios praticados fora 8, então o custo do consumo de água durante 0,75h foi de 0,81 euros.

$$\text{custo do consumo de água} = 0,10 \times 8 = 0,81\text{euros}$$

### E.7.2. Cálculo do consumo de energia

O consumo de energia é dado pelo consumo da manta de aquecimento no decorrer do processo.

Exemplo de cálculo, para determinar o consumo de energia, nas 0,75 horas de operação.

$$\text{potência} = 275W$$

$$\text{Energia consumida/operação} = \frac{275}{1000} \times 0,75 = 0,206kW.h$$

$$\text{custo da energia consumida/ensaio} = 0,206 \times 0,1 = 0,0206 \text{ euros}$$

$$\text{custo total de energia da manta de aquecimento} = 0,0206 \times 8 = 0,17 \text{ euros}$$

Então, o custo total do processo de destilação foi de 0,98 euros.

$$\text{custo total} = 0,17 + 0,81 = 0,98 \text{ euros}$$

## E.8. Reagentes

Este trabalho envolveu o uso de reagentes em diferentes fases do processo. A Tabela E.4 e E.5 que se seguem mostram o preço comercial de cada reagente e o custo inerente das suas aplicações no processo.

Os preços dos padrões de açúcares (glucose, xilose e arabinose) estabelecidos são arbitrados, devido à impossibilidade de confirmação dos mesmos.

Assim considerou-se que o preço da glucose 17 euros/kg; a xilose 7,50 euros/250g e a arabinose 7 euros/250g.

Tabela E.4 – Valores comerciais e do custo de hidróxido de sódio, ácido sulfúrico e etanol.

<b>Hidróxido Sódio</b>		<b>Ácido Sulfúrico</b>		<b>Etanol</b>	
<b>Preço (€/kg)</b>	3,6	<b>Preço (€/L)</b>	4,25	<b>Preço (€/mL)</b>	0,003
<b>Massa gasta (kg)</b>	0,4899	<b>Volume gasto (L)</b>	0,003	<b>Volume gasto (mL)</b>	152
<b>Custo total (€)</b>	1,76	<b>Custo total (€)</b>	0,01	<b>Custo total (€)</b>	0,41

Tabela E.5 – Valores comerciais e do custo de glucose, xilose e arabinose.

<b>Glucose</b>		<b>Xilose</b>		<b>Arabinose</b>	
<b>Preço (€/kg)</b>	17	<b>Preço (€/g)</b>	0,03	<b>Preço (€/g)</b>	0,028
<b>Massa gasta (kg)</b>	0,00728	<b>Volume gasto (g)</b>	6,5	<b>Volume gasto (g)</b>	5,87
<b>Custo total (€)</b>	0,12	<b>Custo total (€)</b>	0,20	<b>Custo total (€)</b>	0,16

Seguidamente, exemplificar-se-á o cálculo relativo ao custo do uso do reagente hidróxido de sódio.

Exemplo de cálculo, para determinar o custo do reagente hidróxido de sódio.

O preço comercial do hidróxido de sódio é de 3 euros/kg, incluído IVA de 20%.

$$\text{preço do hidróxido de sódio} = 3 \times 1,20 = 3,6 \text{ euros / kg}$$

Como a massa de hidróxido de sódio gasta foi de 0,4899 kg, então:

$$\text{custo do hidróxido de sódio} = 3,6 \times 0,4889 = 1,76 \text{ euros}$$

O custo total inerente ao uso de cada reagente é de 2,67 euros.

$$\text{custo total dos reagentes} = 1,76 + 0,01 + 0,41 + 0,12 + 0,20 + 0,16 = 2,67 \text{ euros}$$

Após determinação dos custos de energia e de consumo de água, de cada etapa, calculou-se os custos globais do processo, conforme indicado na Tabela E.6, para uma massa total de biomassa de 390 g.

Tabela E.6 – Valores do custo de energia e água de cada etapa, bem como o custo global do processo de produção do bioetanol, para 390 g de biomassa.

	<b>Total (€)</b>	<b>Energia (€)</b>	<b>Água (€)</b>
<b>Pré-tratamento</b>	167,91	157,30	10,61
<b>Fermentação</b>	65,34	65,28	0,06
<b>Destilação</b>	0,98	0,17	0,81
<b>Hidrólise</b>	233,30	232,75	0,55
<b>Reagentes</b>	2,67	-	-
<b>HPLC</b>	2,58	2,57	0,0076
<b>Espectrofotómetro UV</b>	0,02	0,02	0,0018
<b>Refractómetro</b>	0,05	0,05	-
<b>Total (€)</b>	<b>470,19</b>		