



PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE RESÍDUOS DE PLANTAS USADAS EM FITO- REMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM METAIS PESADOS

MARIANA HIPOLITO SANTOS

novembro de 2019

PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE RESÍDUOS DE PLANTAS USADAS EM FITORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM METAIS PESADOS

Mariana Hipólito Santos

Nº 1170066

2019

Instituto Superior de Engenharia do Porto

Departamento de Engenharia Mecânica



POLITÉCNICO
DO PORTO

isep

PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE RESÍDUOS DE PLANTAS USADAS EM FITORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM METAIS PESADOS

Mariana Hipólito Santos

Nº 1170066

Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Engenharia do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Energias Sustentáveis, realizada sob a orientação da Doutora Nídia de Sá Caetano e coorientação da Doutora Ana P. G. Marques.

2019

Instituto Superior de Engenharia do Porto

Departamento de Engenharia Mecânica



POLITÉCNICO
DO PORTO

isep

JÚRI

Presidente

Manuel Carlos Malheiro de Carvalho Felgueiras

Professor Adjunto, Instituto Superior de Engenharia do Porto

Orientador

Nídia de Sá Caetano

Professor Coordenador, Instituto Superior de Engenharia do Porto

Coorientador

Ana P.G. Marques

Investigador, Centro de Biotecnologia e Química Fina, ESBUCP

Arguente

António Augusto Areosa Martins

Investigador, LEPABE – Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não se teria tornado realidade e aos quais estarei eternamente grata.

Deste modo, quero apresentar o meu especial agradecimento à minha orientadora, Nídia de Sá Caetano pela exemplar orientação e apoio prestado ao longo destes meses, pelo interesse contínuo no meu trabalho, pela visão crítica e pelo desempenho saudavelmente exigente, nos quais contribuíram para enriquecer todas as etapas subjacentes ao trabalho realizado.

À investigadora Doutora Ana G. Marques, por partilhar comigo parte do seu trabalho de investigação e pela cedência da biomassa que tornou possível a realização desta dissertação.

Um agradecimento também à minha família pelo apoio prestado ao longo destes meses de escrita e investigação em laboratório, pois sem a motivação e carinho a jornada teria sido muito mais difícil.

Por fim, um último agradecimento a toda as pessoas que não se encontram de alguma forma aqui mencionadas, mas que também contribuíram de algum modo para a realização deste trabalho.

A Prof.^a Nídia de Sá Caetano, orientadora desta dissertação, é membro integrado do LEPABE – Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente Biotecnologia e Energia, financiado pela Unidade de Investigação UID/EQU/00511/2019 - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia – LEPABE - financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC).

Esta dissertação foi realizada no âmbito do Projeto PHYTOENERGY - PTDC/BTA-BTA/28761/2017 - POCI-01-0145-FEDER-028761, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e com o apoio financeiro da FCT/MCTES através de fundos nacionais (PIDDAC).



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

PALAVRAS CHAVE

Bioetanol; Contaminantes; Descontaminação; Fitorremediação; Milho.

RESUMO

A contaminação de solos por parte da indústria extrativa e de outras indústrias que recorrem a produtos químicos poluentes deixa esses terrenos incultos e abandonados, contaminados com metais pesados como Cádmio e Zinco. Isto constitui um grave problema ambiental que importa mitigar.

Uma das potenciais soluções é a fitorremediação do solo contaminado, a qual apresenta a vantagem de ser um tratamento local. No entanto, no processo de descontaminação do solo, a biomassa que resulta do tratamento capta e retém nos seus diversos constituintes (raízes, caules, folhas, sementes) os metais pesados. Deste modo, há uma transferência dos poluentes para a biomassa, potencialmente aumentando aí a concentração em metais pesados.

É importante dar um destino adequado à biomassa proveniente da Fitorremediação. Isto pode ser conseguido através da sua conversão a biocombustíveis líquidos (como o biodiesel ou o bioetanol), sendo que possuem a vantagem adicional de estes serem provenientes de fontes renováveis, não havendo assim competição com outras biomassas cultivadas para fins energéticos, promovendo a melhoria da qualidade do solo no seu crescimento.

Assim, o objetivo deste trabalho é o de avaliar o potencial bioenergético da biomassa resultante da fitorremediação de um solo contaminado com metais pesados através da produção de bioetanol, analisando a qualidade deste biocombustível, nomeadamente no que respeita à presença de metais pesados e ao potencial impacto da presença de metais pesados no rendimento do processo.

Deste modo, foi obtido etanol pela destilação de palha de milho a qual foi submetida a um pré-tratamento ácido, a uma hidrólise enzimática e fermentação. Foram determinadas as melhores combinações entre os ácidos e enzimas utilizado e submeteu-se a palha de milho contaminada a essas mesmas condições.

Para o pré-tratamento adicionou-se 150 ml dos ácidos H_2SO_4 , HCl, HNO_3 e CH_3COOH com uma concentração de 3% (v/v) a 20 g de palha de milho contaminada e não

contaminada, tendo as amostras sido digeridas em frascos num banho termostático a 85 °C por 48 horas. Na etapa de hidrólise enzimática, após neutralização do digerido até ao pH 5 nas amostras, adicionaram-se 2 ml das enzimas *Accellerase* ou *Ultraflo* e a hidrólise das amostras procedeu em banho termostático por 13 horas a 50 °C. Para a fermentação diluiu-se 40 g da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em 200 mL de água desionizada e adicionou-se a cada amostra 25 mL dessa mistura. Deixou-se o hidrolisado de cada uma das amostras a fermentar em banho termostático a uma temperatura de 37 °C por 11 dias. A destilação do etanol deu-se a uma temperatura de banho de 60 °C e a uma pressão de 120 mbar.

Analisaram-se as concentrações dos açúcares simples durante os diferentes estágios de produção de etanol pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico e determinou-se a concentração de etanol pelo método refratométrico. Realizou-se ainda uma análise do álcool recuperado por espectrofotometria de absorção atómica por forma a determinar a concentração de contaminantes (Zn e Cd) presentes no etanol obtido.

Foi obtido um rendimento médio em etanol para a palha de milho contaminada de 0,51 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{palha}}$ e 0,32 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{palha}}$ para a palha tratada com HCl e *Accellerase* e 0,39 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{palha}}$ e 0,27 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{palha}}$ para a palha tratada com HNO₃ e *Ultraflo*. Para a palha não contaminada, o rendimento médio em etanol é de 0,44 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{palha}}$ e de 0,37 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{palha}}$ para tratamento com HCL e *Accellerase* e HNO₃ e *Ultraflo*, respetivamente.

Na análise da concentração de contaminantes verificou-se que a concentração destes era extremamente baixa, tendo sido os valores lidos inferiores aos usados na construção da curva de calibração (< ppm), sendo, portanto, os resultados inconclusivos.

KEYWORDS

Bioethanol; Contaminants; Corn; Decontamination; Phytoremediation.

ABSTRACT

Contamination of soils by the extractive industry and other industries that use polluting chemical products leaves these uncultivated and abandoned lands contaminated with heavy metals such as Cadmium and Zinc. This is a serious environmental problem which needs to be mitigated.

One of the potential solutions is phytoremediation of contaminated soil, which has the advantage of being a local treatment. However, in the process of soil decontamination, the biomass that results from the treatment captures and retains heavy metals in its various constituents (roots, stems, leaves, seeds). Therefore, there is a transfer of the pollutants to the biomass, potentially increasing the concentration in heavy metals.

It is important to give a suitable destination to biomass from phytoremediation. This can be achieved by converting it to liquid biofuels (such as biodiesel or bioethanol), that have the additional advantage of being produced from renewable sources, so there is no competition with other biomasses grown for energy purposes, promoting the improvement of soil quality in its growth.

Therefore, the aim of this work is to evaluate the biomass resulting from the phytoremediation of a soil contaminated with heavy metals through the production of bioethanol, analyzing the quality of this biofuel, namely in what concerns the presence of heavy metals and the potential impact of the presence of heavy metals on the yield of the process.

Thus, we obtained ethanol by submitting the corn stover to an acid pre-treatment, followed by an enzymatic hydrolysis and fermentation. The fermentation broth was then distilled to recover ethanol. The best conditions were determined choosing the combination of the acid and enzyme that promoted the best results, and the corn stover produced in the contaminated soil was submitted to the best conditions.

For the pre-treatment, 150 mL of acid H_2SO_4 , HCl , HNO_3 and CH_3COOH with a concentration of 3% (v/v) were added to 20 g of corn stover produced in the contaminated and non-contaminated soil, in closed cap flasks in a thermostatic bath at 85 °C for 48 hours. In the enzymatic hydrolysis, after neutralizing the digested samples

to a pH of 5, it was added 2 ml of the enzymes Accellerase or Ultraflo and once more the samples in the closed flasks were submitted to a constant temperature of 50 °C in a thermostatic bath for 13 hours. For the fermentation, 40 g of yeast *Saccharomyces cerevisiae* was diluted in 200 ml of deionized water and 25 ml of the mixture was added to each sample flask. The simple sugars in each sample flask were then fermented at 37 °C for 11 days. For the distillation of the ethanol, the bath temperature was 60 °C and the pressure was 120 mbar.

It was analyzed the concentration of simple sugars (as glucose) during the different stages of the ethanol production using the method of 3,5-dinitrosalicilic acid and the concentration of ethanol was determined with refractometer. It was also made analyzed the concentration of heavy metals (Cd and Zn) in the recovered ethanol, using atomic absorption spectrophotometry.

The average yield in ethanol obtained for the corn stover produced in the two contaminated soils was 0.51 g_{ethanol}/g_{stover} and 0.32 g_{ethanol}/g_{stover} for the corn stover treated with HCl and Accellerase and 0.39 g_{ethanol}/g_{stover} and 0.27 g_{ethanol}/g_{stover} for the corn stover treated with HNO₃ and Ultraflo, respectively. For the corn stover produced in the control soil, the yield in ethanol was 0.44 g_{ethanol}/g_{stover} and 0.37 g_{ethanol}/g_{stover} for the treatment with HCl and Accellerase and HNO₃ and Ultraflo, respectively.

The results of the analysis of the concentration of contaminants in the recovered ethanol revealed too low concentration, lower than the values used to build the calibration curve (< ppm), therefore the results are inconclusive.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Lista de Abreviaturas

Termo	Designação
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
Cd	Cádmio
C _{glicose}	Concentração de Glicose
CH ₃ COOH	Ácido Acético
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EU	União Europeia (European Union)
GEE	Gases de Efeito de Estufa
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
HNO ₃	Ácido Nítrico
CH ₃ COOH	Ácido Acético
IR	Índice de Refração
m _{etanol}	Massa de etanol
m _{liq.recup.}	Massa de líquido recuperado
MS	Massa Seca
Q _{etanol}	Quantidade de Etanol
SHF	Hidrólise e Fermentação Separadas
SSF	Sacarificação e Fermentação Simultâneas
V _{liq.recup}	Volume de líquido recuperado

Zn	Zinco
----	-------

Lista de Unidades

Unidade	Designação
% (v/v)	percentagem em volume
μl	microlitro
g	grama
g/l	grama por litro
GJ/t	giga Joule por tonelada
mbar	milibar
ml	mililitro
nm	nanómetro
°C	grau Celsius
pH	Índice de acidez de uma solução
rpm	rotações por minuto

Lista de Símbolos

Símbolo	Designação
ρ	Densidade
λ	Comprimento de onda

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - CONSUMO DE ENERGIA POR TIPO DE COMBUSTÍVEL.[1]	1
FIGURA 1.2 - EMISSÕES DE CO ₂ POR TIPO DE COMBUSTÍVEL FÓSSIL [3].	2
FIGURA 1.3 - EMISSÕES DE CO ₂ PELO USO DE COMBUSTÍVEIS FÓSSEIS POR CONTINENTE [3].	2
FIGURA 1.4 - EVOLUÇÃO DA POTÊNCIA DE RENOVÁVEIS INSTALADA À ESCALA GLOBAL ENTRE 2007 E 2017 [4].	3
FIGURA 1.5 - EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENERGIA ELÉTRICA EM PORTUGAL CONTINENTAL [5]	3
FIGURA 2.1 - MECANISMOS DE FITORREMEDIAÇÃO [10].	12
FIGURA 2.2 - COMPOSIÇÃO DA PLANTA DO MILHO [19].	14
FIGURA 2.3 - ESQUEMA DE MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE BIOETANOL [21].	15
FIGURA 2.4 - ESTRUTURA DE UMA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.[22]	16
FIGURA 2.5 - REPRESENTAÇÃO DA MOLÉCULA DE CELULOSE [24].	17
FIGURA 2.6 - REPRESENTAÇÃO DA HEMICELULOSE [24].	17
FIGURA 2.7 - PROCESSO DE CONVERSÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM ETANOL [27].	18
FIGURA 2.8 - EFEITO DO TRATAMENTO NA ESTRUTURA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA [29].	19
FIGURA 2.9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AÇÃO DAS CELULASES NA ESTRUTURA DA CELULOSE [34].	22
FIGURA 2.10 - FORMAÇÃO DO PIRUVATO E PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO EM ÁLCOOL ETÍLICO (ADAPTADO: [37]).	23
FIGURA 3.1 - ESQUERDA: PESAGEM DA PALHA DE MILHO PARA OS FRASCOS; DIREITA: AMOSTRAS ANTES DO PRÉ-TRATAMENTO. BAIXO: AMOSTRAS APÓS O PRÉ-TRATAMENTO.	30
FIGURA 3.2 - REGULAÇÃO DO PH APÓS O PRÉ-TRATAMENTO.	30
FIGURA 3.3 - ESQUERDA: AMOSTRAS ANTES DO PROCESSO DE HIDRÓLISE; DIREITA: AMOSTRAS APÓS O PROCESSO DE HIDRÓLISE.	31
FIGURA 3.4 - LEVEDURA APLICADA E BANHO DE FERMENTAÇÃO.	31
FIGURA 3.5 - FILTRAÇÃO A VÁCUO E DESTILAÇÃO NO ROTAVAPOR.	32
FIGURA 3.6 - ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS E SOLUÇÕES PADRÃO UTILIZADAS.	32
FIGURA 3.7 - ESQUERDA: CAMPO VISUAL OCULAR E RESPETIVA LEITURA. DIREITA: REFRAATÓMETRO DE ABBE.	33
FIGURA 3.8 - ESPECTROFOTÓMETRO DE ABSORÇÃO ATÓMICA UTILIZADO	33

FIGURA 4.1 - CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE PRESENTE NO LICOR PÓS-FERMENTAÇÃO PARA A BIOMASSA NÃO CONTAMINADA.	38
FIGURA 4.2 - VOLUME DE ETANOL OBTIDO PARA A PALHA DE MILHO NÃO CONTAMINADA.	39
FIGURA 4.3 - QUANTIDADE DE GLICOSE APÓS O PROCESSO DE HIDRÓLISE	40
FIGURA 4.4 - QUANTIDADE DE GLICOSE AO 6º DIA DE FERMENTAÇÃO.	41
FIGURA 4.5 - QUANTIDADE DE GLICOSE APÓS A FERMENTAÇÃO.	41
FIGURA 4.6 - QUANTIDADE DE ETANOL OBTIDO NO PROCESSO DE DESTILAÇÃO A PARTIR DA BIOMASSA CONTAMINADA.	42
FIGURA 4.7 - CONCENTRAÇÃO DE ETANOL ESTIMADO PARA 1 TONELADA DE PALHA DE MILHO.	45
FIGURA 7.1 - SOLUÇÃO PADRÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE PARA TRAÇAR A CURVA DE CALIBRAÇÃO.	63
FIGURA 7.2 - REFRACTÔMETRO DE ABBE LIGADO À TEMPERATURA DE FUNCIONAMENTO PRETENDIDA.	65
FIGURA 7.3 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS PARA ANÁLISE DAS MELHORES CONDIÇÕES OPERATÓRIAS DA BIOMASSA DE CONTROLO APÓS FERMENTAÇÃO.	69
FIGURA 7.4 - CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA AS MELHORES CONDIÇÕES OPERATÓRIAS DA BIOMASSA AO 6º DIA DE FERMENTAÇÃO.	69
FIGURA 7.5 - CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA AS MELHORES CONDIÇÕES OPERATÓRIAS DA BIOMASSA APÓS O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO.	70
FIGURA 7.6 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O ETANOL NÃO CONTAMINADO.	73
FIGURA 7.7 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O ETANOL CONTAMINADO E DE CONTROLO.	74
FIGURA 7.8 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O CÁDMIO.	76
FIGURA 7.9 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O ZINCO	76

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 2.1 - . COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE ETANOL.	19
TABELA 2.2 - TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTOS, CARACTERÍSTICAS E VANTAGENS/DESVANTAGENS [24].	20
TABELA 2.3 - MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL.[37]	24
TABELA 2.4 - COMPARAÇÃO DO RENDIMENTO EM ETANOL ENTRE SSF (APÓS 120 H) E SHF (APÓS 120 H DE HIDRÓLISE E 24 H DE FERMENTAÇÃO) [41].	26
TABELA 3.1 - TABELA RESUMO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.	34
TABELA 4.1 - VALORES DE ABSORVÂNCIA PARA OS CONTAMINANTES PRESENTES NA PALHA DE MILHO.	43
TABELA 7.1 – PROPORÇÃO DE SOLUÇÃO PADRÃO E ÁGUA DESIONIZADA POR TUBO DE ENSAIO.....	62
TABELA 7.2 - QUANTIDADE DE SOLUÇÃO MÃE ADICIONADA NAS SOLUÇÕES PADRÃO.....	65
TABELA 7.3 - VOLUME DE SOLUÇÃO MÃE DOS RESPECTIVOS METAIS A ADICIONAR PARA PREPARAR AS SOLUÇÕES PADRÃO.	67
TABELA 7.4 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES APÓS A FERMENTAÇÃO DA PALHA DE MILHO NÃO CONTAMINADA NO PROCESSO DE DETERMINAÇÃO AS MELHORES CONDIÇÕES OPERATÓRIAS....	71
TABELA 7.5 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES APÓS A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE MILHO CONTAMINADA/CONTROLO NAS MELHORES CONDIÇÕES OPERATÓRIAS.	72
TABELA 7.6 - CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES 6 DIAS APÓS O INÍCIO DA FERMENTAÇÃO DA PALHA DE MILHO CONTAMINADA/CONTROLO NAS MELHORES CONDIÇÕES OPERATÓRIAS.	72
TABELA 7.7 - CONCENTRAÇÃO APÓS O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DA PALHA DE MILHO CONTAMINADA/CONTROLO NAS MELHORES CONDIÇÕES OPERATÓRIAS.	73
TABELA 7.8 - VALORES DE ETANOL PRESENTE NO LICOR OBTIDO DA BIOMASSA NÃO CONTAMINADA NO PROCESSO DE ANÁLISE DAS MELHORES CONDIÇÕES OPERATÓRIAS ATRAVÉS DA LEITURA NO REFRACTÔMETRO.	74
TABELA 7.9 - VALORES DE ETANOL PRESENTE NO LICOR OBTIDO DA BIOMASSA CONTAMINADA PARA AS MELHORES CONDIÇÕES OPERATÓRIAS ATRAVÉS DA LEITURA NO REFRACTÔMETRO.....	75
TABELA 7.10 - VALORES DA MASSA ESPECÍFICA DO ETANOL A 20 °C.[45].....	78
TABELA 7.11 - CARACTERIZAÇÃO DA PALHA DE MILHO DE CONTROLO E PARA O SOLO DE ESTARREJA. .	81
TABELA 7.12 - CONCENTRAÇÃO DE CONTAMINANTES PARA A PALHA DE MILHO CARACTERIZADA.	81

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Biomassa como fonte de energia renovável	4
1.2	Biocombustíveis	5
1.3	Objetivos da Dissertação	6
1.4	Organização da Dissertação	6
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	Fitorremediação de solos	11
2.1.1	Fitoextração	13
2.1.2	Rizofiltração	13
2.1.3	Fitovolatilização	13
2.1.4	Fitoestimulação	13
2.1.5	Fitoestabilização	13
2.1.6	Fitodegradação	14
2.2	Caracterização do milho	14
2.3	Bioetanol	15
2.4	Biomassa Lignocelulósica	16
2.4.1	Celulose	17
2.4.2	Hemicelulose	17
2.4.3	Lenhina	17
2.5	Processo de obtenção de bioetanol	18
2.5.1	Pré-tratamento	18
2.5.1.1	Pré-tratamento ácido	19
2.5.2	Hidrólise	21
2.5.2.1	Hidrólise enzimática	21
2.5.2.1.1	Hidrólise da celulose	22

2.5.2.1.2	Hidrólise da hemicelulose	22
2.5.3	Fermentação	23
2.5.3.1	Recuperação do etanol	26
3	DESCRIÇÃO TÉCNICA	29
3.1	Pré-tratamento.....	29
3.2	Hidrólise Enzimática	30
3.3	Fermentação	31
3.4	Método de Quantificação de Açúcar do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	32
3.5	Quantificação do etanol pelo método refratométrico.....	32
3.6	Método de Espectrofotometria de Absorção Atômica para determinação dos contaminantes.....	33
3.7	Condições experimentais utilizadas para os ensaios	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1	Biomassa não contaminada	37
4.1.1	Quantificação dos açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	37
4.1.2	Quantificação do álcool pelo método refratométrico	39
4.2	Biomassa contaminada	39
4.2.1	Quantificação dos açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	40
4.2.2	Quantificação do álcool pelo método refratométrico	42
4.2.3	Quantificação de contaminantes por Espectrofotometria de Absorção Atômica	42
4.3	Resumo dos resultados obtidos e comparação com outras biomassas.....	43
5	CONCLUSÕES E PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS	49
5.1	CONCLUSÕES.....	49
5.2	PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS	51
6	BIBLIOGRAFIA E OUTRAS FONTES DE INFORMAÇÃO.....	55

7 ANEXOS	61
Anexo A – Procedimento Experimental.....	61
Anexo A.1 - Quantificação dos Açúcares Redutores.....	61
A.1.1 - Método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	61
Anexo A.2 – Quantificação da Concentração do Etanol	64
A.2.1 – Método Refratométrico	64
Anexo A.3 – Análise por Espectrofotometria de Absorção Atômica	66
Anexo B – Resultados Experimentais.....	69
Anexo B.1 – Método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	69
Anexo B.2 – Método Refratométrico.....	73
Anexo B.3 – Espectrofotometria de Absorção Atômica	75
Anexo C – Exposição dos cálculos.....	77
Anexo C.1 – Quantificação dos Açúcares pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	77
Anexo C.2 - Quantificação da Concentração do Etanol pelo método Refratométrico	77
Anexo D – Caracterização da palha de milho	81
Anexo E – Informações Técnicas	83
Anexo E.1 – Ficha de Segurança do Ácido Sulfúrico	83
Anexo E.2 – Ficha de Segurança do Ácido Clorídrico.....	89
Anexo E.3 – Ficha de Segurança do Ácido Acético	95
Anexo E.4 – Ficha de Segurança do Ácido Nítrico	101
Anexo E.5 – Ficha de Segurança da Solução Padrão do Cádmio	106
Anexo E.6 – Ficha de Segurança da Solução Padrão do Zinco	109
Anexo E.7 – Ficha de Informação da Accellerase	111
Anexo E.8 – Ficha de Informação do Ultraflo	114

INTRODUÇÃO

- 1.1 Biomassa como fonte de energia renovável
- 1.2 Biocombustíveis
- 1.3 Objetivos da Dissertação
- 1.4 Organização da Dissertação

1 INTRODUÇÃO

Desde a revolução industrial que a necessidade de conforto no nosso quotidiano a nível físico e tecnológico, é cada vez mais importante, sendo por isso necessário o desenvolvimento tecnológico para a procura de novos métodos de obtenção de energia. A energia elétrica é um dos principais bens que faz mover a sociedade, nos dias de hoje.

Atualmente existe ainda uma grande dependência na utilização de combustíveis fósseis para a produção de energia (Figura 1.1), nos meios de locomoção e até mesmo na indústria farmacêutica ou em indústrias de transformação. Diversos produtos são também obtidos a partir destes combustíveis. Isto deve-se à facilidade de obtenção e versatilidade que os combustíveis fósseis nos oferecem. No entanto, apesar de ser a principal fonte de energia na sociedade atual, trata-se de um recurso finito, e o seu uso contínuo representa uma ameaça para o ambiente, uma vez que se trata do maior contribuidor para a Emissão de Gases de Efeitos de Estufa (GEE) (Figura 1.2 e Figura 1.3).

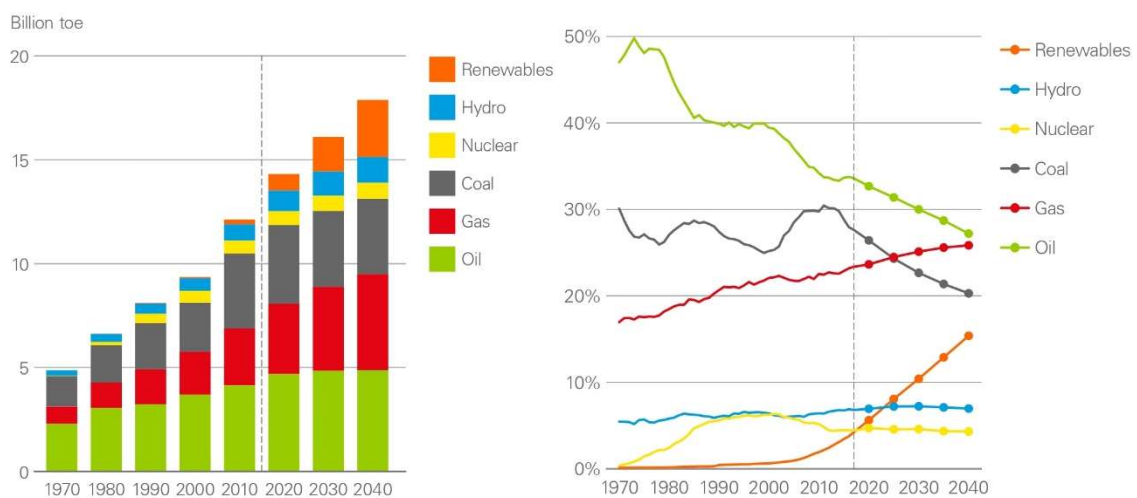


Figura 1.1 - Consumo de Energia por tipo de combustível.[1]

Um recurso renovável é toda “a energia de fontes renováveis não fósseis, a saber, energia eólica, solar (térmica e fotovoltaica) e geotérmica, energia ambiente, das marés, das ondas e outras formas de energia oceânica, hidráulica, de biomassa, de gases dos aterros, de gases das instalações de tratamento de águas residuais, e biogás.”[2].

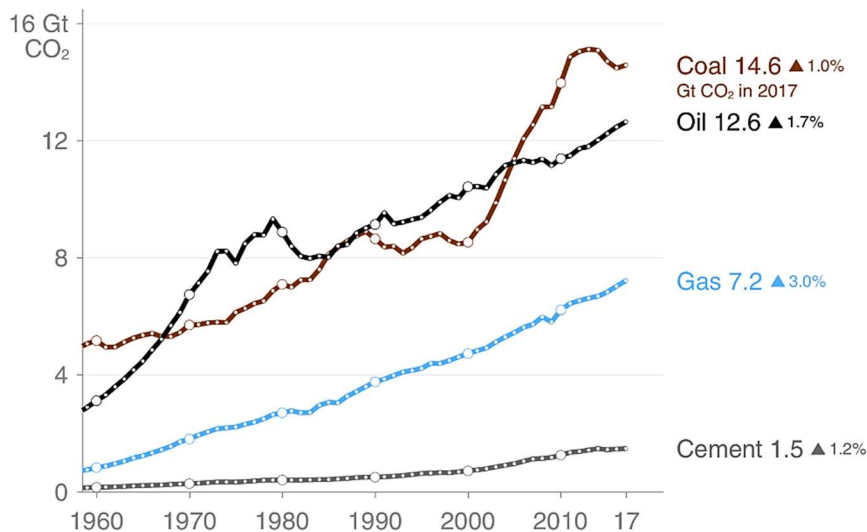


Figura 1.2 - Emissões de CO₂ por tipo de combustível fóssil [3].

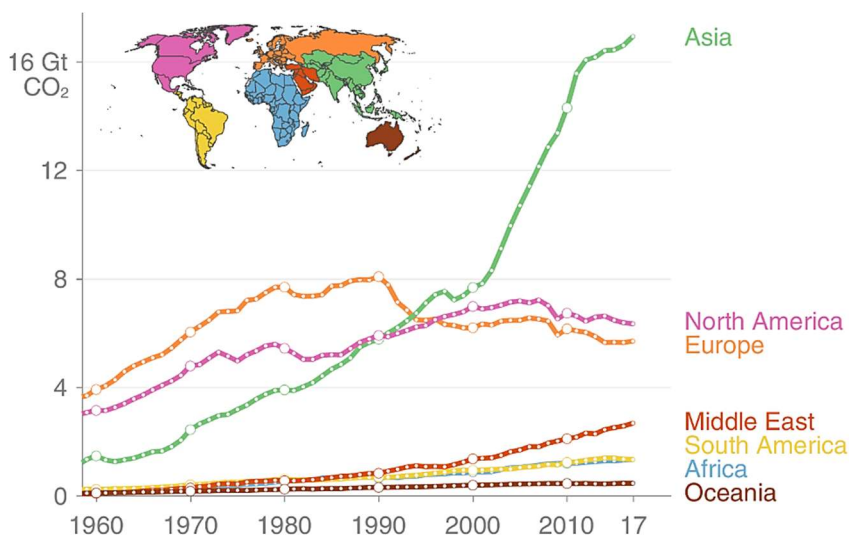


Figura 1.3 - Emissões de CO₂ pelo uso de combustíveis fósseis por Continente [3].

Deste modo, com o aumento da dependência energética e as alterações climáticas que se têm vindo a observar nos últimos anos, tem havido uma maior preocupação por parte da sociedade moderna na busca de novas soluções que não comprometam o futuro das próximas gerações. Assim, estas apoiam-se nos três pilares da sustentabilidade, económico, social e ambiental, por forma a reduzir essa dependência e procurar soluções mais viáveis tanto para o ambiente como para a própria sociedade.

Com esta constante preocupação em mente, têm existido diversos avanços tecnológicos nos últimos anos que visam o desenvolvimento de tecnologias que utilizam recursos renováveis e ambientalmente mais sustentáveis. Na Figura 1.4 é possível observar a evolução do peso dos diversos tipos de tecnologia desenvolvida ao longo dos anos.

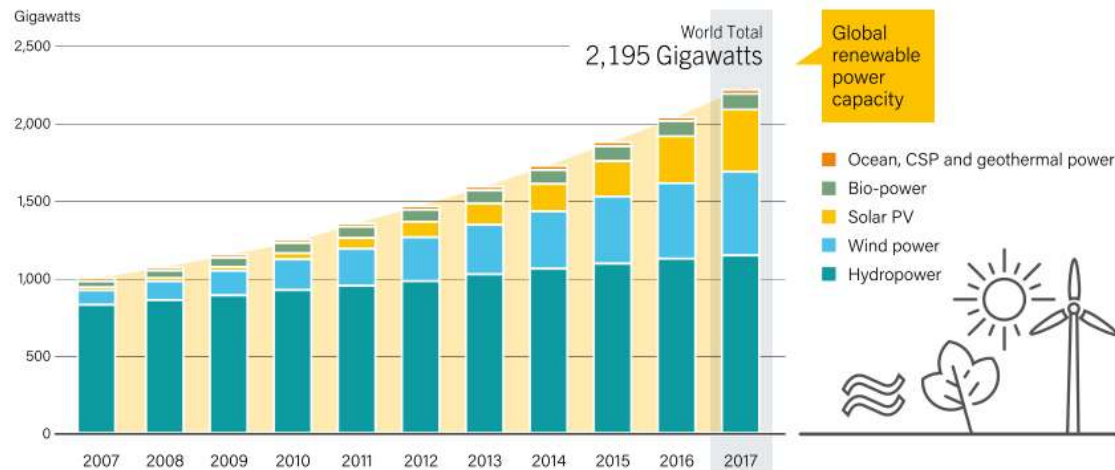


Figura 1.4 - Evolução da Potência de Renováveis instalada à escala Global entre 2007 e 2017 [4].

Em Portugal, nos últimos anos, tem havido cada vez mais um compromisso para aumentar a parcela de energias provenientes de recursos renováveis. Na Figura 1.5 é possível observar que nos dois últimos anos, cerca de metade da energia consumida foi produzida através de fontes renováveis.

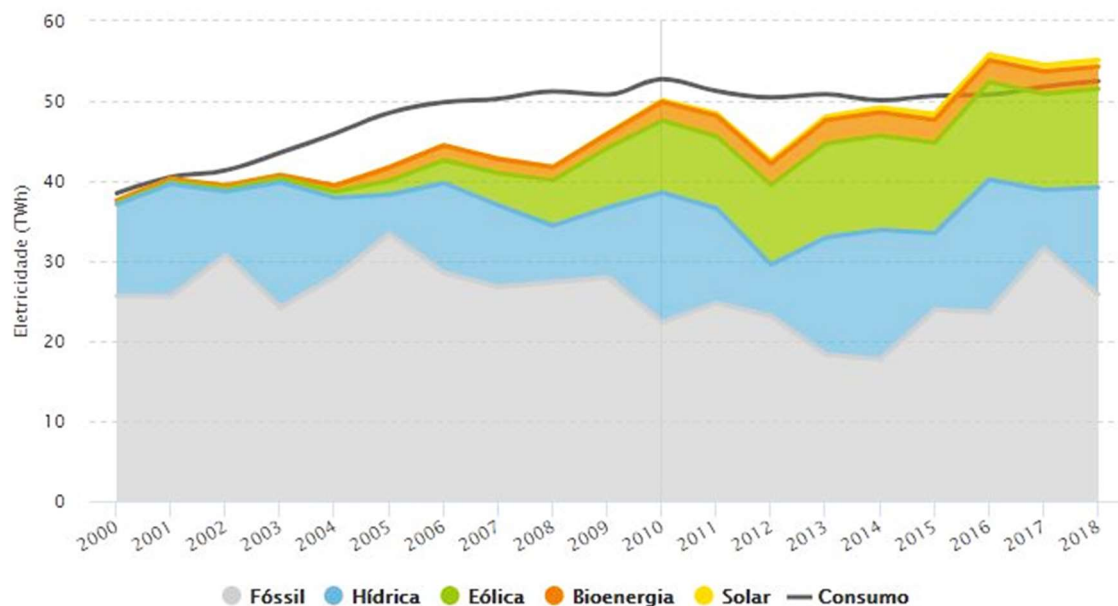


Figura 1.5 - Evolução da Produção de Energia Elétrica em Portugal Continental [5]

De um ponto de vista social e económico, um dos maiores contribuidores para a criação de postos de trabalho e com um investimento inferior aos restantes é a energia obtida a partir da biomassa. Isto deve-se à facilidade de obtenção da matéria-prima e à relativamente simples transformação da mesma para obtenção de energia. Esta possui ainda a vantagem de, tal como os combustíveis fósseis, ser utilizada nos três principais setores: transportes, energia e aquecimento de edifícios [6].

Segundo o relatório publicado pela REN21 em 2018, são criados cerca de 3,05 milhões de postos de trabalho a uma escala mundial, apenas no sector das energias renováveis provenientes da biomassa. Isto corresponde a cerca de um terço dos postos de trabalho criados entre todas as energias renováveis atualmente existentes. Em 2016, estimou-se que cerca de 12,8% da energia consumida proveio de energia produzida através da biomassa [4].

Apesar de haver diversas formas de conversão da biomassa em energia que estão bem estabelecidas, como é o caso da queima de biomassa para aquecimento, existem ainda diversas tecnologias que ainda se encontram atualmente a ser desenvolvidas.

Para o setor dos transportes, a conversão da biomassa em biocombustíveis possui uma perspetiva interessante para os próximos anos, enquanto as restantes alternativas ainda não se encontram totalmente desenvolvidas, por forma a reduzir a dependência atual dos combustíveis fósseis neste setor.

Esta necessidade, leva ao desenvolvimento de biorefinarias capazes de realizar o processo de transformação de biomassa em combustíveis como o Biodiesel, Bioetanol e Biogás.

1.1 Biomassa como fonte de energia renovável

Desde os primórdios da humanidade que a biomassa tem sido uma importante fonte de energia. Esta, engloba toda a matéria viva presente na Terra, derivando do crescimento de plantas, incluindo as algas, árvores e culturas cerealíferas ou oleaginosas.

A Diretiva (UE) 2018/2001 refere que a “biomassa é a fração biodegradável de produtos, resíduos e detritos de origem biológica provenientes da agricultura, incluindo substâncias de origem vegetal e animal, da silvicultura e de indústrias afins, como a pesca e a aquicultura, bem como a fração biodegradável de resíduos, incluindo resíduos industriais e urbanos de origem biológica” [2].

A biomassa pode ser classificada consoante a sua origem, podendo ser dividida em três diferentes categorias [7]:

- Biomassa Primária – são todos os recursos recolhidos diretamente na natureza, tais como resíduos florestais e agrícolas;
- Biomassa Secundária – trata-se de resíduos obtidos através do processamento físico, químico ou biológico provenientes dos recursos primários.
- Biomassa Terciária – são os resíduos biodegradáveis originados pela atividade humana e animal.

Uma vez que a principal utilização da biomassa é para conversão de energia, tendo como principal vantagem a sua conversão direta em calor e consequente produção de

eletricidade, esta pode também ser convertida através de processos físicos, químicos ou biológicos em biocombustíveis [8].

A biomassa é considerada uma das melhores alternativas aos combustíveis fósseis, sendo que se trata do recurso biológico renovável mais abundante do solo, uma vez que é produzida por fotossíntese.

1.2 Biocombustíveis

É afirmado na Diretiva (UE) 2018/2001 que os “biocombustíveis são combustíveis líquidos para transportes, produzidos a partir de biomassa” [2].

Através de diferentes processos de transformação da biomassa, é possível obter diversos tipos de biocombustíveis, sendo estes o biodiesel, o biogás e o bioetanol.

Os biocombustíveis, podem ser divididos em três grupos principais, dependendo do tipo de matéria através da qual são obtidos:

- Primeira geração – são produzidos através de culturas de açúcar e de amido que são convertidas por processos de fermentação a etanol e através de conversão química a partir das culturas que contêm óleo, o qual é aproveitado para a produção de biodiesel. Uma vez que estes são produzidos a partir de matéria-prima proveniente do setor alimentar, a sua produção constitui uma ameaça para o mesmo, podendo ainda pôr-se em causa a real redução na emissão de gases de efeito de estufa [9].
- Segunda geração – não concorrem diretamente com o setor alimentar pois não são produzidos a partir de matérias-primas destinadas à alimentação. Estes, são obtidos a partir de recursos não alimentares sendo que compreendem duas etapas: conversão lignocelulósica a etanol por via biológica, e posterior conversão da biomassa em combustíveis por via termoquímica. Embora não haja uma concorrência direta com o setor alimentar, a produção da biomassa para estes biocombustíveis recorre à utilização de solos e recursos hídricos que poderiam ser utilizados para a produção de alimentos [9].
- Terceira geração – estes são obtidos através da utilização de microrganismos, como é o caso das microalgas [10]. Os biocombustíveis de terceira geração apresentam uma maior vantagem ambiental pois podem ser produzidos em ambiente aquático, o que evita a utilização de solo para a produção de bens alimentares, como é o caso das águas não tratadas, e apresentam um rendimento energético superior aos restantes biocombustíveis [11].
- Quarta geração [12] – consiste na modificação genética de árvores para a obtenção de biomassa de alta qualidade devido ao seu elevado teor de carbono na sua composição. A manipulação genética permite uma maior absorção de dióxido de carbono da atmosfera. O processo de conversão desta biomassa é, no entanto, realizado a partir de uma tecnologia de segunda geração.

1.3 Objetivos da Dissertação

Tendo em consideração a necessidade de desenvolver tecnologias que reduzam a dependência dos combustíveis fósseis e a possibilidade de aproveitamento da biomassa proveniente do processo de fitorremediação, foi proposta a realização desta dissertação. Esta tem como principal objetivo a produção de Biocombustíveis, nomeadamente o Bioetanol, a partir de biomassa proveniente de fitorremediação de solos contaminados com metais pesados (Zn e Cd), e a avaliação da viabilidade de utilização deste como combustível alternativo ao normalmente utilizado (gasolina) nos veículos automóveis.

Este tema surgiu na sequência do trabalho de investigação realizado, pela investigadora Ana G. Marques, no âmbito do projeto PhytoEnergy, o qual visa a avaliação do benefício que a planta de milho possui na remediação de solo contaminado por Cádmiio e Zinco e da sua potencial valorização através da produção de biocombustíveis (bioetanol e biogás).

Deste modo foram recolhidas amostras de solo de zonas contaminadas de Estarreja e de Panasqueira e em condições laboratoriais semelhantes foi plantado o milho em cada uma das amostras de solo contaminado, bem como em solo não contaminado. Posteriormente a biomassa foi colhida, seca e triturada para utilização da mesma em laboratório, tendo ainda sido feitas análises à palha de milho e ao solo para determinar o teor de humidade a concentração de contaminantes, respetivamente.

1.4 Organização da Dissertação

Para atingir os objetivos propostos foi realizado um conjunto de tarefas que se reportam neste texto. Assim, a dissertação encontra-se organizada em 5 capítulos. No primeiro capítulo, faz-se a contextualização do problema apontando os problemas que atualmente a sociedade enfrenta provocado pela elevada dependência dos combustíveis fósseis indicando-se em oposição os benefícios resultantes da sua substituição por biocombustíveis.

No segundo capítulo é apresentada uma revisão bibliográfica, na qual se expõe os benefícios da fitorremediação e os diferentes tipos do referido processo. É também apresentada uma caracterização da biomassa utilizada e de que forma esta pode ser convertida em biocombustível, sendo deste modo explicadas as principais etapas para o seu fabrico.

O terceiro capítulo serve para explicar o trabalho experimental realizado e quais as metodologias aplicadas no processo de produção de etanol. São ainda descritos os métodos de quantificação de açúcares e de quantificação de etanol utilizados nos diferentes estágios de obtenção de etanol.

No quarto capítulo são apresentados os resultados experimentais obtidos no procedimento experimental e é realizada uma discussão dos mesmos no que respeita aos resultados obtidos na determinação de açúcares presentes no licor e na quantidade de etanol obtido no processo de destilação.

No último capítulo, quinto, são apresentadas as principais conclusões obtidas durante a realização do trabalho laboratorial, bem como os aspetos a melhorar em trabalhos futuros e quais as limitações existentes.

O anexo serve para expor de forma detalhada as normas e procedimentos adotados, os resultados experimentais obtidos, os cálculos necessários a realizar, a caracterização da biomassa realizada em estudos prévios, as fichas de segurança e outros documentos complementares.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- 2.1 Fitorremediação de solos
- 2.2 Caracterização do milho
- 2.3 Bioetanol
- 2.4 Biomassa Lignocelulósica
- 2.5 Condições experimentais utilizadas para os ensaios

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Com a industrialização, a contaminação dos solos tem, cada vez mais, sido uma preocupação crescente, pois inutiliza terrenos devido à contaminação dos mesmos através da deposição ou derrame de metais pesados que se tornam prejudiciais para o solo e impedindo deste modo a sua utilização para a agricultura, uma vez que as características naturais do solo são alteradas [13].

Assim, a Fitorremediação assume um papel importante na remediação dos solos, tornando-os novamente aptos a cultivo, através da remoção dos contaminantes prejudiciais para a saúde.

Grande parte das plantas utilizadas em Fitorremediação após a sua colheita são colocadas em aterros ou até mesmo incineradas. No entanto, devido à necessidade energética crescente, procurou-se potenciar o uso dessas plantas para a produção de biocombustíveis ou outros subprodutos que estas possam originar.

Deste modo, a biomassa que resulta da Fitorremediação pode ser utilizada para produção de biocombustíveis de segunda geração, onde se poderá recorrer à biomassa lignocelulósica para produção de bioetanol.

Para o processo de Fitorremediação, é importante a utilização de plantas que possuam um grande sistema radicular e um grande crescimento, por forma a tornar o processo mais eficaz. Temos como exemplo disso o milho, que possui um sistema radicular fasciculado e um grande crescimento [14].

2.1 Fitorremediação de solos

A fitorremediação é a técnica de biorremediação atualmente mais estudada [15].

Segundo Chaney, a fitorremediação é um método sustentável, ecológico e de baixo custo, no qual são utilizadas plantas e microrganismos associados para a remoção ou redução de poluentes orgânicos e inorgânicos no solo, no ar ou na água, recorrendo a plantas vasculares *in situ*. Estas deverão possuir uma elevada capacidade de captação dos poluentes presentes no local no qual se encontram, procedendo à destoxificação do mesmo através de diferentes mecanismos. As plantas deverão possuir um sistema radicular profundo, no caso de descontaminação do solo, uma taxa acelerada de crescimento, ser de fácil colheita e com uma elevada resistência ao poluente presente no local [15].

Este processo possui um baixo custo de instalação e de manutenção, sendo que pode ser aplicado em terrenos de grande dimensão, permitindo o aumento gradual da qualidade do solo. Deste modo, irá possibilitar a plantação futura de culturas com maior valor de mercado.

É ainda de notar que a eficiência do processo de fito-remediação depende da fisiologia das espécies vegetais utilizadas e da sua reação perante um *stress* provocado por uma grande acumulação de contaminantes, sendo que essa dinâmica será o fator determinante para a eficiência de remoção dos mesmos.

Assim, sabe-se que níveis elevados de contaminação podem limitar o crescimento das plantas. A profundidade a que se encontram as raízes pode ser um limitador ao nível da fitorremediação, uma vez que esta está dependente da área por elas abrangida.

Na Figura 1.6, é possível observar de que forma é que atuam esses mecanismos no ambiente no qual se encontra inserida a planta:

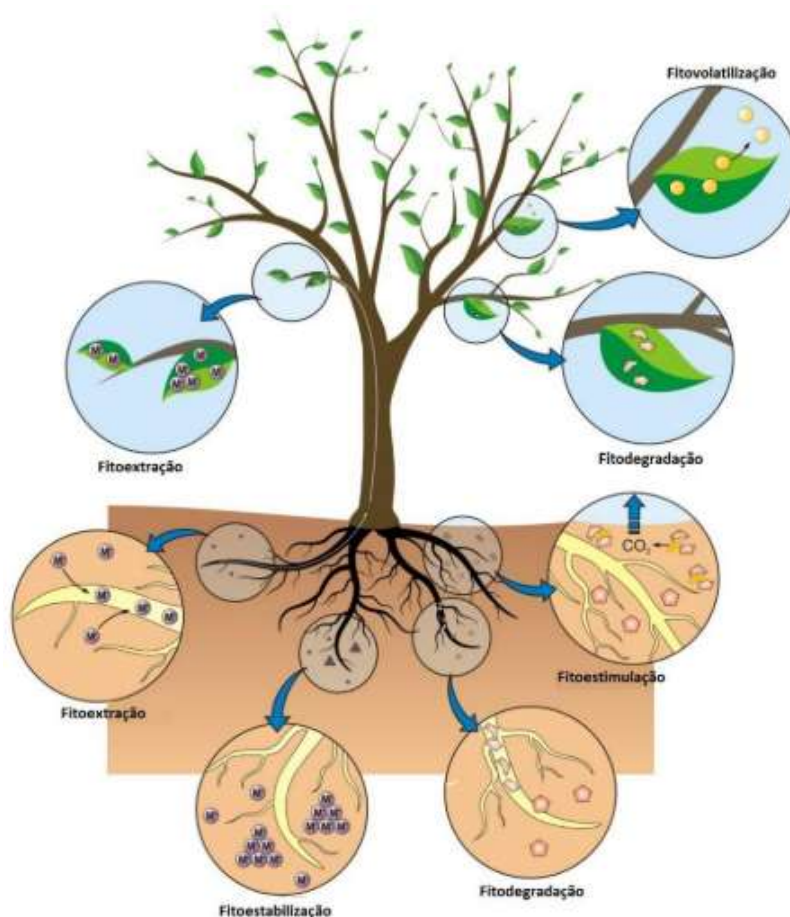


Figura 2.1 - Mecanismos de fitorremediação [10].

2.1.1 Fitoextração

Na fitoextração a remoção dos contaminantes é realizada através das raízes das plantas, movendo-se posteriormente para as restantes partes da planta (caules, folhas, etc.). É sobretudo utilizada para o tratamento dos solos contaminados. As espécies de plantas utilizadas neste processo deverão ser híper-acumuladoras, com uma capacidade de absorção cem vezes superior a uma planta normal [16]. No entanto, trata-se de um processo que pode ser prejudicial para o crescimento da planta na medida em que esta fica afetada devido ao excesso de metais com efeito fitotóxico na planta.

2.1.2 Rizofiltração

Trata-se de um processo similar à fitoextração, no qual as raízes das plantas irão absorver os contaminantes que se encontram na água presente no solo. Estas plantas poderão ser primariamente plantadas num local descontaminado por forma a desenvolver o seu sistemas radicular, sendo posteriormente levada até elas água que é recolhida nos locais contaminados [16].

2.1.3 Fitovolatilização

É realizada uma descontaminação do solo através da absorção dos contaminantes por parte das plantas, sendo posteriormente transformados pela planta nas suas formas voláteis e emitidos para a atmosfera por transpiração [16]. Isto pode apresentar um grande risco, uma vez que a planta poderá libertar concentrações muito elevadas do poluente para a atmosfera.

2.1.4 Fitoestimulação

Pela absorção e adsorção este processo reduz a mobilidade dos contaminantes e previne a migração dos mesmos para a água presente no subsolo através da área onde as raízes se encontram. Permite ainda a recuperação do solo à superfície, restabelecendo a vegetação que não possui capacidade de sobrevivência aos contaminantes [16]. Há, portanto, uma degradação dos poluentes através do aumento da atividade metabólica microbiana, sendo que esta técnica apenas é aplicada a contaminantes orgânicos.

2.1.5 Fitoestabilização

Através da ação das raízes das plantas, é limitada a mobilidade e biodisponibilidade de poluentes do solo [17]. Deste modo, o solo é protegido da erosão e lixiviação, estabilizando o mesmo, evitando assim a migração dos contaminantes para outros locais.

2.1.6 Fitodegradação

Também referido como Fitotransformação, neste processo ocorre a degradação de moléculas orgânicas complexas, podendo também ser incorporadas nos tecidos das plantas [16]. Isto ocorre através da ajuda de enzimas que estimulam a atividade metabólica.

2.2 Caracterização do milho

O milho é das plantas mais cultivadas a nível mundial, devido à sua adaptabilidade e qualidade nutricional, no qual contém quase todos os aminoácidos com exceção da lisina e do triptofano [18].

Trata-se de uma planta C4 que pertence à divisão das Fanerogâmicas da família *Graminae/Poaceae* e da espécie *Zea mays L.*

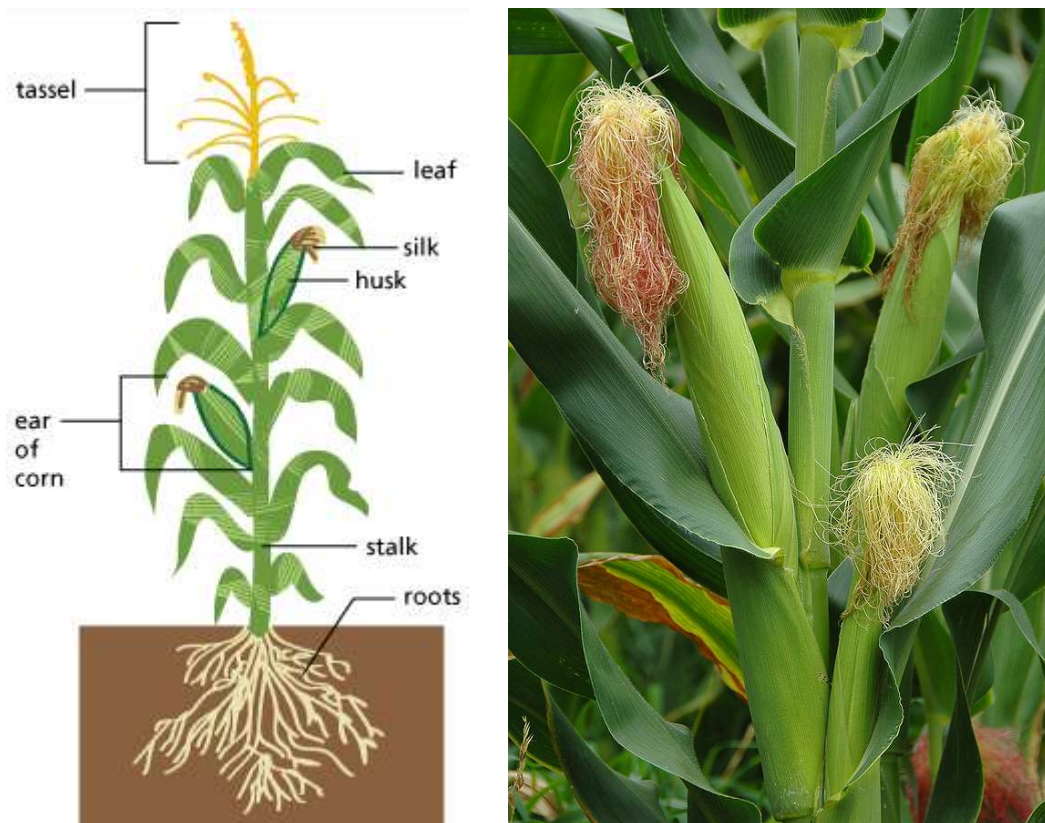


Figura 2.2 - Composição da planta do milho [19].

Conforme mencionado anteriormente, o milho possui um sistema radicular fasciculado, um caule de colmo meduloso ereto e folhas compridas e largas, dispostas alternadamente ao longo do caule e com bordas ásperas [14].

Apesar de o milho ser considerado um dos alimentos mais importantes para os humanos e para os animais, este também pode ser utilizado para produção de bioenergia através do aproveitamento do amido presente nas sementes para produção de etanol e dos resíduos resultantes da plantas – palha, para produção de etanol lignocelulósico [20].

A Diretiva (UE) 2018/2001 promove a produção de biocombustíveis de segunda geração, sendo que a palha do milho representa cerca de 55% do total da biomassa do milho com um valor energético de 16,5 GJ/t de matéria seca (MS) [14].

2.3 Bioetanol

O bioetanol é um biocombustível líquido obtido através de processos nos quais a matéria principal é a biomassa orgânica que contém açúcares, amido ou celulose, a partir da qual se irá obter o etanol.

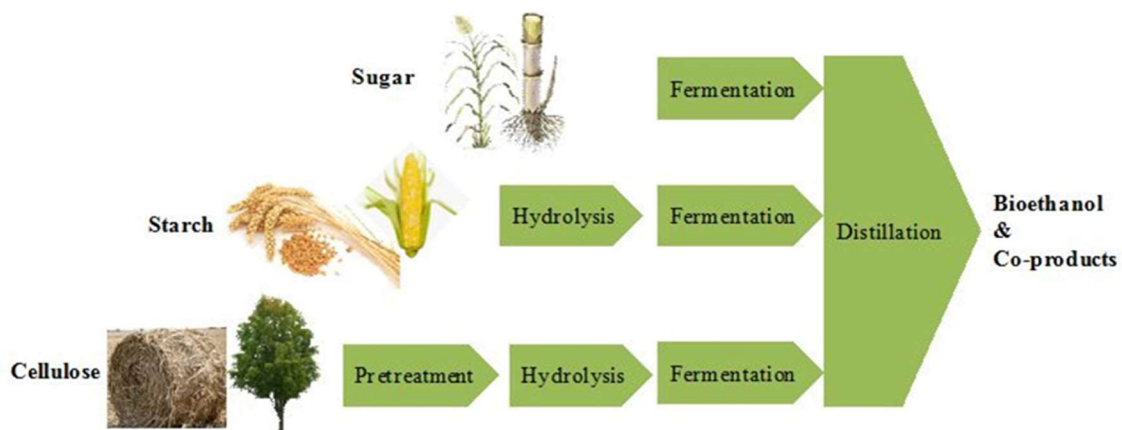


Figura 2.3 - Esquema de métodos de obtenção de bioetanol [21].

Este pode ser diretamente utilizado em motores especificamente concebidos para o efeito ou poderá ser misturado com a gasolina. Quando utilizado em motores de combustão interna, o bioetanol apresenta vantagens, uma vez que apresenta um valor superior de octanas e um calor de vaporização superior. A sua combustão é mais eficiente diminuindo, deste modo, a emissão de partículas para a atmosfera e consequentemente havendo diminuição da emissão de gases de efeito de estufa. No entanto, a sua densidade energética é inferior à da gasolina, dificultando o arranque do motor a frio.

Uma vez que o etanol não pode ser diretamente obtido na natureza, é necessário recorrer a métodos sintéticos ou naturais para obtenção do mesmo.

Na produção de etanol por métodos sintéticos distingue-se especialmente a hidratação direta e indireta do etileno. O primeiro baseia-se numa reação que ocorre entre o

etileno e a água. No segundo, recorre-se à utilização de ácido sulfúrico que, após a absorção do etileno e posterior hidrolisação, origina o etanol.

O processo de obtenção do etanol por processos naturais, consiste na fermentação de produtos compostos por açúcares simples, por amido ou através da utilização de biomassa lignocelulósica.

2.4 Biomassa Lignocelulósica

Para a produção de bioetanol de segunda geração, é necessária a conversão de açúcares provenientes de material lignocelulósico, como é o caso da palha de milho.

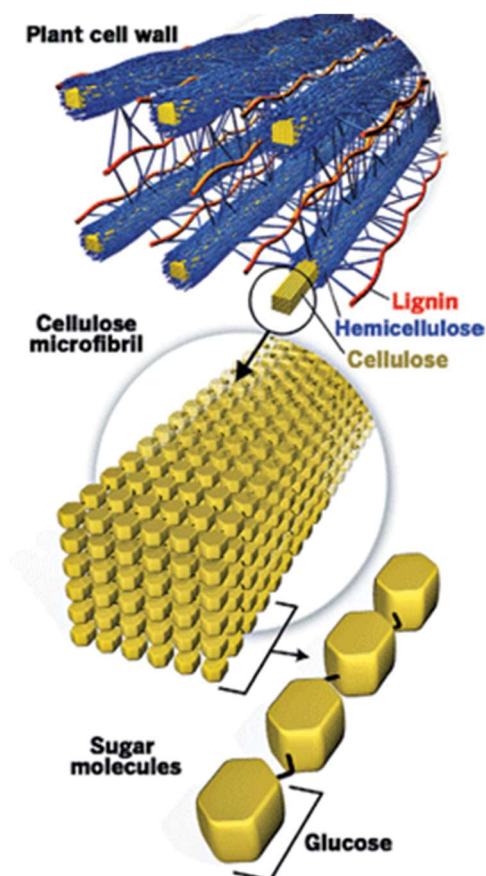


Figura 2.4 - estrutura de uma biomassa lignocelulósica.[22]

A lignocelulose é um material pertencente à constituição da parede das células das plantas e refere-se ao material composto por lenhina, celulose e hemiceluloses. A sua composição varia com o tipo de planta, idade e ambiente onde esta cresce. Geralmente, as plantas possuem na sua constituição 45-25% de lenhina, 40-50% de celulose e 25-30% de hemicelulose [23].

2.4.1 Celulose

Sendo a celulose o polímero com maior ocorrência no mundo, esta é constituída por três níveis organizacionais.

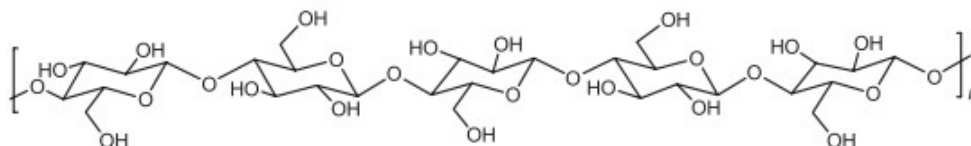


Figura 2.5 - Representação da molécula de celulose [24].

O primeiro trata-se de longas cadeias lineares de moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 [25]. Estas possuem uma elevada probabilidade de formação de ligações de hidrogénio intra e intermoleculares, sendo que são resultantes do segundo nível da celulose. O terceiro nível é definido pela associação das moléculas, o que resulta numa estrutura cristalina, designada microfibrila, com elevada resistência à tensão, tornando esta insolúvel em água e num grande número de solventes [24].

2.4.2 Hemicelulose

Comparativamente à celulose, a hemicelulose possui uma maior facilidade em dissolver-se na água devido à sua estrutura ramificada e amorfa. Esta encontra-se intercalada nas microfibrilas de celulose, o que lhe confere elasticidade [24].

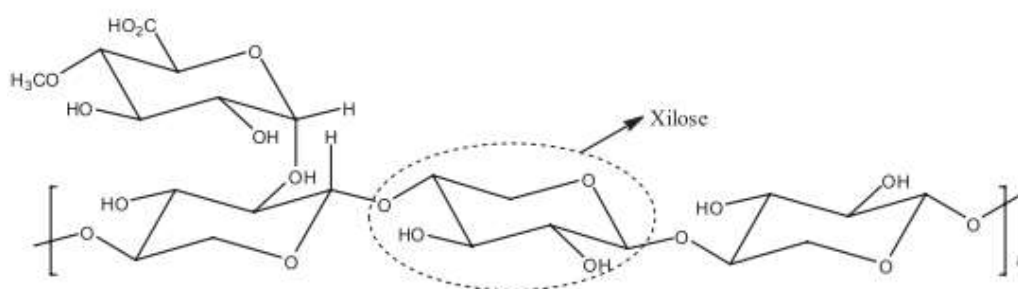


Figura 2.6 - Representação da hemicelulose [24].

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos compostos por pentoses, hexoses e ácidos urónicos [25].

2.4.3 Lenhina

A lenhina é a segunda macromolécula mais abundante entre as biomassas lignocelulósicas e tem como principal função conceder rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos. Trata-se do heteropolímero amorfo mais

abundante na natureza, constituído por uma macromolécula de carácter fenólico composta por álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico.

2.5 Processo de obtenção de bioetanol

Atualmente, o etanol é um dos combustíveis líquidos mais utilizados a nível mundial, podendo ser obtido pela fermentação de açúcares presentes na biomassa lignocelulósica do milho. No entanto, devido aos custos dos pré-tratamentos necessários para quebrar a estrutura cristalina da celulose serem tão elevados, atualmente a utilização desta biomassa ainda é limitada [26].

Para a conversão da biomassa lignocelulósica em etanol é necessário realizar diversos processos, desde o pré-tratamento da matéria orgânica, por forma a libertar a celulose e a hemicelulose quebrando a parede criada pela lenhina, à hidrólise que irá despolimerizar os polissacarídeos para produção de açúcares simples e à fermentação destes (Figura 2.7).

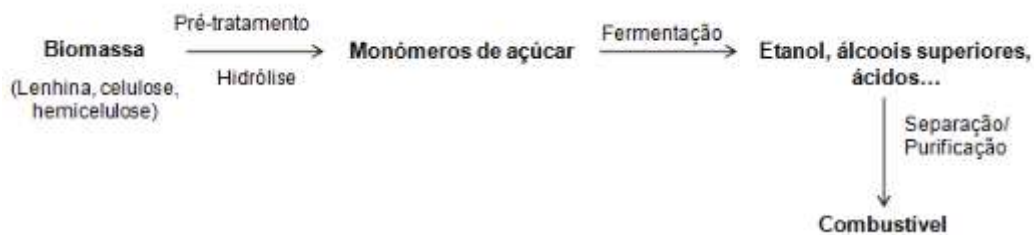


Figura 2.7 - Processo de conversão da biomassa lignocelulósica em etanol [27].

2.5.1 Pré-tratamento

Devido à complexidade da morfologia da biomassa lignocelulósica, para que esta possa ser convertida em bioetanol é necessário realizar um pré-tratamento. Este, deverá promover a formação de açúcares ou auxiliar a formação dos mesmos no processo de hidrólise. Isto permitirá que o custo operacional e energético para a produção de bioetanol seja inferior [28].

O pré-tratamento consiste em quebrar a estrutura da lenhina e reduzir a cristalinidade da celulose, aumentando deste modo a acessibilidade das enzimas no processo de hidrólise e a área superficial. Isto permitirá o aumento da digestibilidade pelo complexo enzimático e conseqüente elevado rendimento em açúcar.

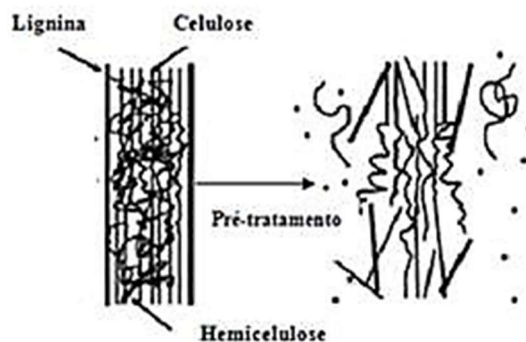


Figura 2.8 - Efeito do tratamento na estrutura da biomassa lignocelulósica [29].

Por forma a realizar-se a conversão da biomassa de uma forma eficiente, é necessário compreender a composição lignocelulósica da biomassa a ser utilizada para produção do bioetanol. Existem variações na sua composição química, sendo estas afetadas pelo tipo e espécie de biomassa, local e estágio de crescimento da biomassa, condições ambientais a que se encontra exposto, etc. [23].

Na Tabela 2.1 podemos observar a composição das materiais lignocelulósicos das culturas mais utilizadas para produção de biocombustíveis.

Tabela 2.1 - . Composição química de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de etanol.

Biomassa Lignocelulósica	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lenhina (%)
Palha de milho ^[30]	37.7	25.3	18.6
Espiga de milho ^[23]	45	35	15
Madeira dura ^[23]	40-55	24-40	18-25
Madeira macia ^[23]	45-50	25-35	25-35
Algodão ^[24]	95	2	0.3
Palha de arroz ^[24]	43.3	26.4	16.3
Palha de cevada ^[24]	31-45	27-38	14-19

O pré-tratamento a ser utilizado depende do tipo de biomassa que foi selecionada, sendo no entanto comuns alguns dos processos, como é o caso da lavagem, da trituração, da pressurização e tratamento físico-químico [30].

2.5.1.1 Pré-tratamento ácido

A complexidade da parede celular da biomassa lignocelulósica torna-a resistente à bioconversão. Devido a esta estrutura complexa, têm sido desenvolvidos muitos

processos de produção de etanol com capacidade de conversão dos carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis, permitindo maximizar o aproveitamento e reduzir os custos de processamento [24].

Na Tabela 2.2 é possível observar os tipos de pré-tratamentos que foram desenvolvidos ao longo dos anos e quais as vantagens e desvantagens que estes podem apresentar, dependendo da composição da biomassa.

Tabela 2.2 - Tipos de pré-tratamentos, características e vantagens/desvantagens [24].

Pré-tratamento	Características composicionais			Vantagens	Desvantagens	
	Celulose	Hemicelulose	Lenhina			
Físico	Moinho de bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Redução de cristalinidade	Alto consumo de energia
	Ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Condições médias, alta produção de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso
	Hidróxido de sódio	Inchação significativa	Considerável solubilidade	Considerável solubilização, >50%	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro, recuperação alcalina
	ARP	Menor que 5% de despolimerização	-50% de solubilidade	-70% de solubilização	Efetiva deslignificação	Recuperação alcalina, relativamente caro
Químico	Hidróxido de cálcio	Pouca despolimerização	Significativa solubilização	Solubilização parcial (-40%)	Efetiva remoção de lenhina e acetil, baixo custo	Menor efetividade devido a pouca solubilidade de cal
	Ozonólise	Não foi observada despolimerização	Pequena solubilização	Solubilização acima de 70%	Efetiva deslignificação em condições suaves	Caro, necessidade de mais ozônio
	Organosolv	Considerável inchação	Significativo, quase completa	Significativo, pode ser quase completa	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação de solvente cara
	Biológico	Biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	-40% de deslignificação	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação
Combinado	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança de estrutura	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da xilana como produto inibitório
	AFEX	Diminuição do grau de cristalinidade	Acima de 60% de solubilidade	10-20% de solubilização	Menor perda de xilanas, não formação de inibidores	Recuperação de amônia, não é efetivo para alta concentração de lenhina.

Devido à elevada percentagem de celulose e hemicelulose presentes nos resíduos de milho, através de investigação, verificou-se que para uma produção mais eficaz de etanol a partir desta matéria lignocelulósica o pré-tratamento ácido é o mais indicado, no qual se utiliza ácido sulfúrico diluído, com uma eficácia de produção de etanol de 27,8 g/L após 72 horas de fermentação [31].

Este pré-tratamento consiste na submersão da matéria numa solução diluída de ácido sulfúrico, com concentrações abaixo dos 4%, e posteriormente aquecida a temperaturas de 140 a 200 °C num período de tempo que pode variar entre alguns minutos e duas horas [32].

2.5.2 Hidrólise

A hidrólise é uma das principais tecnologias utilizadas para a conversão da biomassa lignocelulósica em etanol. Esta tem como principal objetivo quebrar os polissacarídeos presentes na biomassa em moléculas de açúcares livres, os quais serão posteriormente convertidos por fermentação em etanol [33].

Por forma a possuir um máximo de rendimento, esta deverá ser realizada após um pré-tratamento. Isto irá também permitir uma redução nos custos de produção do bioetanol.

2.5.2.1 Hidrólise enzimática

O processo de hidrólise pode consistir em dois tipos: A hidrólise química e a enzimática. Sendo a primeira mais dispendiosa uma vez que exige um maior consumo de energia e condições de operação mais agressivas, a hidrólise enzimática é o processo mais utilizado, com menor impacto ambiental [34].

A hidrólise enzimática recorre ao uso de enzimas para degradar o material lignocelulósico em açúcares mais simples para o processo de fermentação. Esta pode recorrer à utilização das enzimas de forma imobilizada ou solúvel.

A utilização de enzimas sob a forma imobilizada é um processo recentemente desenvolvido que permite reutilizar as enzimas, reduzindo assim os seus custos. No entanto possui diversas limitações: dispersão da enzima, transferência de massa, utilização de produtos químicos tóxicos em alguns processos de imobilização, etc. [32].

A forma solúvel é o processo mais convencional que, comparativamente à hidrólise química, possui custos de operação menos dispendiosos devido às condições moderadas do processo e obtenção de etanol, sendo que este possui uma qualidade superior. Possui ainda as vantagens de ser um processo menos corrosivo e com menor investimento no processo de tratamento da água residual, sendo ainda possível realizar simultaneamente o processo de sacarificação e de fermentação. Esta, no entanto possui custos elevados na enzima e a utilização desta varia com o tipo de biomassa a ser utilizado [32].

2.5.2.1.1 Hidrólise da celulose

A hidrólise da celulose é um processo demorado, sendo diretamente influenciado pela estrutura da biomassa a ser utilizada, nomeadamente pela percentagem existente de lenhina e hemicelulose, pela área de superfície e pela cristalinidade da celulose.

Esta é realizada por um complexo enzimático que coopera entre si denominado celulase e é executada em três etapas: a adsorção, é a mais rápida das três fases na qual é incorporada uma nova espécie com funções adsorventes que se fixa na superfície da celulose; a biodegradação da celulose em açúcares mais simples; desorção da celulose.

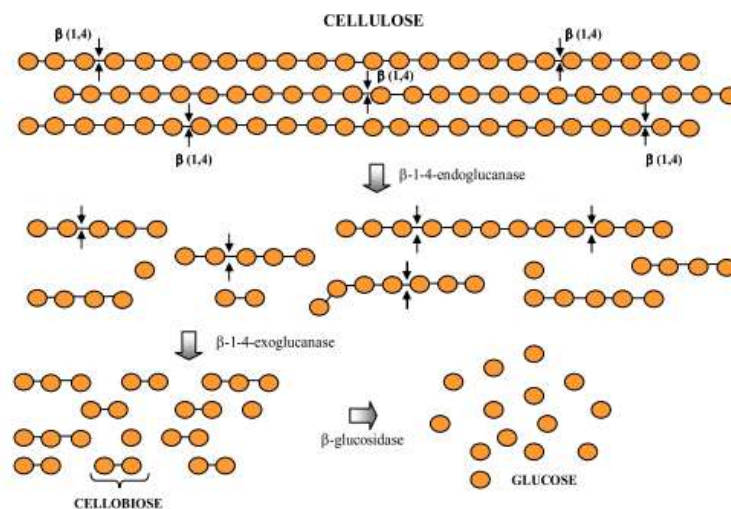


Figura 2.9 - Representação esquemática da ação das celulases na estrutura da celulose [34].

As celulases são constituídas por diversas enzimas e dividem-se em três grandes grupos: β -1-4-endoglucanases, responsáveis por atacar regiões de baixa cristalinidade na fibra da celulose, libertando fragmentos menores; β -1-4-exoglucanases, encarregues de hidrolisar as cadeias celulósicas nas suas extremidades, formando unidades de celobiose; β -glucosidase, permitem a hidrolisação da celobiose em glicose [35].

2.5.2.1.2 Hidrólise da hemicelulose

A hemicelulose possui uma estrutura mais complexa do que a celulose, conforme se pode verificar. Deste modo, é necessário recorrer à utilização de múltiplas enzimas denominadas hemicelulases, as quais podem ser obtidas em diversas espécies de bactérias e fungos.

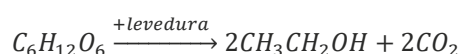
As hemicelulases mais comuns são as xilanas, β -xilosidase, arabinofuranosidase, α -galactosidase e a mananase.

Os tratamentos biológicos, em oposição a outros tipos de tratamento, possuem a vantagem de necessitar de um baixo consumo de energia, não necessitam de requisitos químicos e se expostas a condições ambientais amenas, obtêm-se altos rendimentos de açúcares [34].

2.5.3 Fermentação

A fermentação é um processo metabólico bioquímico, que se dá a partir da reação entre compostos orgânicos e microrganismos. Este, pode realizar-se em condições anaeróbicas ou aeróbicas, podendo recorrer-se à fermentação alcoólica em que a glicose é transformado em álcool etílico e dióxido de carbono (CO₂), ou à fermentação láctea, em que a glicose é convertida em ácido láctico [36].

Para a obtenção de bioetanol, deverá ser necessário recorrer à fermentação alcoólica, a qual irá transformar os açúcares extraídos durante o processo de hidrólise em etanol, recorrendo à utilização de enzimas e leveduras. Na seguinte equação observa-se a conversão da molécula de glicose em moléculas de CO₂ e de etanol através da ação de leveduras [36].



Este processo dá-se com a ativação da glicose, a qual recebe em reações sucessivas, dois grupos de fosfato energético fornecidos por duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato), a qual se transforma em ADP (adenosina difosfato) e a transformação da glicose em gliceraldeído 1,3-difosfato.

Nesta fase, os açúcares são então convertidos em piruvato, o qual sofre uma descarboxilação reduzindo o acetaldeído a etanol. Esta conversão dá origem a subprodutos, como o glicerol, o ácido succínico, álcoois amílicos e isoamílico [25].

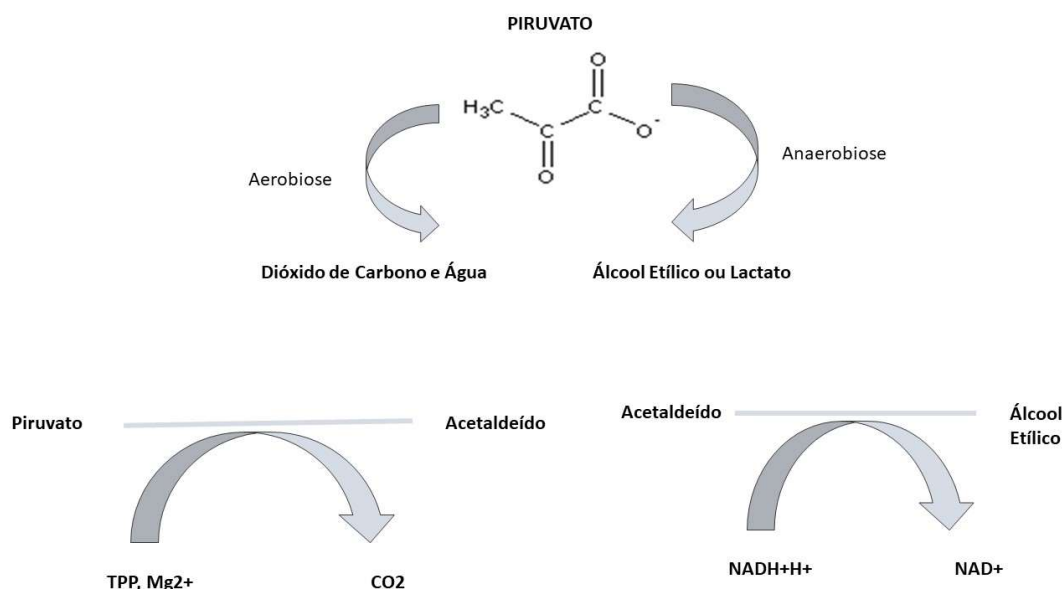


Figura 2.10 - Formação do piruvato e processo de transformação em Álcool Etílico (Adaptado: [37]).

No processo de fermentação alcoólica para produção do etanol, diversos microrganismos poderão intervir, como leveduras e bactérias. A Tabela 2.3 apresenta os tipos de microrganismos que podem ser utilizados neste processo.

Tabela 2.3 - Microrganismos produtores de etanol.[37]

Microrganismo	Tipo	Substratos assimiláveis	Rendimento Teórico (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levedura	Glicose, Galactose, Maltose, Sacarose	43-87
<i>Pichia stipitis</i>	Levedura	Glicose, Xilose, Arabinose, Manose	83 - 92
<i>Candida shehatae</i>	Levedura	Glicose, Xilose, Arabinose, Manose	75 - 90
<i>Candida lusitanae</i>	Levedura	Glicose, Xilose, Sacarose, Celobiose, Sorbitol, Maltose	70 - 85
<i>Candida tropicalis</i>	Levedura	Glicose, Xilose, Sacarose, Celobiose, Sorbitol, Maltose	76 - 85
<i>Escherichia coli</i>	Bactéria	Glicose, Glicerol	70 - 90
<i>Zymomonas mobilis</i>	Bactéria	Glicose, Xilose, Frutose, Sacarose	80 - 92
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Bactéria	Glicose, Frutose, Sacarose, Maltose	80-90
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Levedura	Glicose, Xilose, Glicerol	75-80
<i>Clostridium thermocellum</i>	Bactéria	Glicose, Xilose	60-80
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Levedura	Glicose	70-80

A hidrólise da biomassa lignocelulósica não origina apenas a glicose, mas também outros monossacarídeos como xilose, manose, galactose, arabinose, entre outros. Deste modo, é importante a seleção de um microrganismo que possua elevada capacidade de fermentação por unidade de substrato assimilado, tolerância a elevadas concentrações de etanol e de substrato e estabilidade a baixos valores de pH [38].

O microrganismo mais comum na produção de etanol é a levedura conhecida como fermento de padeiro denominada *Saccharomyces cerevisiae*, devido à sua elevada capacidade de assimilar a glicose presente na matéria lignocelulósica [37]. Esta levedura é um microrganismo unicelular de rápido crescimento e de fácil manipulação genética. É capaz de crescer até temperaturas máximas de 43 °C e um pH que varia entre 4,5-6,5

[38]. No entanto, esta levedura não é capaz de fermentar as pentoses (xilose) uma vez que não possui a capacidade de a metabolizar. Para esse efeito será necessária a adição de outro microrganismo com essa capacidade [39].

Para a fermentação das pentoses, poderão ser utilizados três tipos de microrganismos:

- Fungos filamentosos - têm como principal vantagem, crescerem naturalmente na biomassa. No entanto, o período de fermentação é muito elevado e em condições anaeróbicas a maior parte não fermenta, a obtenção de etanol é muito reduzida e são formadas elevadas quantidades de subprodutos.
- Bactérias - estas conseguem fermentar uma elevada variedade de biomassa lignocelulósica, mesmo quando expostas a condições anaeróbicas. No entanto, estas levam à formação de subprodutos e possuem baixa tolerância ao etanol.
- Leveduras - os microrganismos *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* e *Pachysolen tannophilus* são os mais utilizados para fermentação das pentoses. No entanto, ao contrário da *Saccharomyces cerevisiae* possuem pouca tolerância ao etanol e ao pH, tendo sido, deste modo, estudadas alternativas genéticas. Assim como os fungos, as leveduras conseguem fermentar com pH compreendido entre 3,5-5 e a temperatura ótima para a produção de etanol está compreendida entre 26 e 35 °C. Maiores concentrações de açúcares promovem a velocidade de fermentação e aumenta a produção de etanol, impedindo ainda o crescimento elevado da levedura e formação de glicerol [25].

O processo fermentativo, para ser eficiente, depende sobretudo da temperatura, do pH e da quantidade de oxigénio presente. Estudos realizados têm indicado que, para o processo fermentativo ser mais eficiente, a fermentação e sacarificação deverão ocorrer simultaneamente (SSF) [40]. Embora a realização da hidrólise e da fermentação em processos separados permitam que estes possam estar expostas a condições de pH e temperatura ideais, Magnus, et al., conclui que para matérias-primas como o pinheiro, a palha de trigo e a palha de milho a SSF é mais vantajosa.

É possível observar na Tabela 2.4 o estudo comparativo entre o processo de SSF e hidrólise e fermentação separadas (SHF) realizado com palha de milho no qual foi assumido um rendimento de fermentação de etanol de 90% em 24 horas - 0,46 g de etanol por 1 g de glicose.

Tabela 2.4 - Comparação do rendimento em etanol entre SSF (após 120 h) e SHF (após 120 h de hidrólise e 24 h de fermentação) [41].

Biomassa	Rendimento em etanol SSF/SHF %	Produção total de etanol (%)	Concentração de etanol após 120-144 h (g/l)
Biomassa de palha de milho			
SSF	78,2	72,4	20,5
SHF	64,1	59,3	16,8
Biomassa de palha de milho			
SSF	69,3	64,1	18,2
SHF	76,2	70,6	19,4
Biomassa de palha de milho			
SSF	81,5	75,4	21,4
SHF	68,2	63,2	17,9

2.5.3.1 Recuperação do etanol

Após o processo de fermentação, é necessário aumentar o grau de pureza do etanol obtido, procedendo à separação da água do etanol. Para o efeito, poder-se-á recorrer a dois processos: a destilação fracionada e a separação por membranas.

A destilação fracionada consiste em levar a mistura etanol-água à ebulição, estando deste modo baseada na volatilidade dos compostos. Uma vez que o ponto de ebulição do etanol é inferior ao da água, 78,3 e 100 °C respetivamente, o etanol será primeiro convertido em vapor, podendo assim ser separado e recuperado após condensação, com uma percentagem de pureza de 95% [42].

Para o processo de separação por membranas, a alimentação e o produto retido estão no estado líquido, enquanto que o produto a ser permeado pelas membranas aparece a jusante do mesmo no estado líquido.

DESCRIÇÃO TÉCNICA

- 3.1 Pré-tratamento
- 3.2 Hidrólise Enzimática
- 3.3 Fermentação
- 3.4 Método de Quantificação de Açúcar do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
- 3.5 Quantificação do etanol pelo método refratométrico
- 3.6 Método de Espectrofotometria de Absorção Atômica para determinação dos contaminantes
- 3.7 Condições experimentais utilizadas para os ensaios

3 DESCRIÇÃO TÉCNICA

O presente capítulo tem como principal objetivo o de expor as técnicas e metodologias consideradas para os procedimentos experimentais efetuados para a obtenção do etanol a partir da palha de milho e na análise do mesmo.

Neste procedimento experimental não foram realizadas caracterizações da palha de milho utilizada pois a matéria utilizada para a produção é proveniente de um estudo realizado pela Investigadora Ana P.G.C. Marques, que também realizou a sua caracterização. As caracterizações realizadas encontram-se expostas no Anexo D.

Por forma a maximizar o rendimento em etanol, submeteu-se a palha a diversas condições de pré-tratamento e hidrólise enzimática, identificando qual a combinação de ácido e enzima mais eficaz para converter os polissacarídeos da palha de milho em etanol.

Para a primeira parte experimental, foram realizados 8 ensaios com as respetivas réplicas usando a palha de milho produzida em solo não contaminado, com a conjugação de 4 tipos de ácido e 2 tipos de enzima, perfazendo um total de 16 ensaios. Após verificação das melhores condições operatórias, replicou-se as mesmas usando a palha de milho produzida em solo contaminado, proveniente de Estarreja e da Panasqueira, bem como palha de milho produzida em solo não contaminado. Para esta segunda parte experimental, utilizou-se as duas melhores combinações de ácido e enzima, realizando-se assim 6 ensaios com as respetivas réplicas.

3.1 Pré-tratamento

Foi descrito anteriormente que o pré-tratamento tem como principal função, quebrar os polímeros de celulose e hemicelulose presentes na lenhina, aumentando deste modo a acessibilidade às enzimas no processo de hidrólise enzimática.

Para este procedimento experimental, foi realizado um pré-tratamento ácido. Para cada amostra realizada e respetiva repetição. Assim, foi pesado cerca de 20 g de palha de milho para dentro de frascos com capacidade de 500 ml. Posteriormente, adicionou-se a cada um dos frascos 150 ml de cada um dos ácidos utilizados - H_2SO_4 , HNO_3 , HCl e CH_3COOH , com uma concentração de 3% (v/v) (Figura 3.1).

A reação ocorreu no período de 48 horas, num banho de água com agitação (*Julabo, SW22*) a uma temperatura de 85 °C.



Figura 3.1 - **Esquerda:** Pesagem da palha de milho para os frascos; **Direita:** Amostras antes do pré-tratamento.
Baixo: Amostras após o pré-tratamento.

3.2 Hidrólise Enzimática

De forma a obtermos um máximo de eficiência no processo de hidrólise enzimática, após o término do pré-tratamento, arrefeceram-se os frascos com os ensaios e mediu-se o valor do pH de cada ensaio, tendo este sido ajustado a um valor de pH 5, aproximadamente, através de pequenas adições de Hidróxido de Sódio a 40% (Figura 3.2).



Figura 3.2 - Regulação do pH após o pré-tratamento.

Após a regulação do pH, adicionaram-se 2 ml das enzimas *Accellerase* ou *Ultraflo* a cada um dos respetivos frascos. As características destas enzimas encontram-se descritas no Anexo E.7.

Após homogeneização, levaram-se os frascos (Figura 3.3) ao banho de água com agitação (*Julabo, SW22*) a uma temperatura de 50 °C durante 13 horas.



Figura 3.3 - **Esquerda:** Amostras antes do processo de hidrólise; **Direita:** Amostras após o processo de hidrólise.

3.3 Fermentação

Para o processo de fermentação recorreu-se ao uso da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*, normalmente utilizada no processo de panificação.

Diluiu-se 40 g de levedura em 200 ml de água desionizada e após homogeneização, adicionaram-se 25 ml de inóculo a cada um dos frascos (Nota: as quantidades descritas foram aplicadas para 8 ensaios, incluído as réplicas). Agitou-se a mistura e levou-se ao banho de água com agitação a uma temperatura de 37 °C por 11 dias (Figura 3.4).



Figura 3.4 - Levedura aplicada e banho de fermentação.

Após a fermentação, as amostras foram filtradas sob vácuo, separando-se a fase líquida da sólida (Figura 3.5). Foram guardadas as lamas das filtrações realizadas.

Com o licor obtido, procedeu-se à destilação do mesmo no Rotavapor (*Buchi, R-210*) a uma pressão de 120 mbar e a uma temperatura de banho de 60 °C (Figura 3.5).



Figura 3.5 - Filtração a vácuo e Destilação no Rotavapor.

3.4 Método de Quantificação de Açúcar do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Para a avaliação do teor de açúcares redutores nas amostras recolhidas durante os diferentes estágios de produção do etanol, foi utilizada a metodologia descrita por Miller [43], na qual se procede à redução do DNS a ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico com a simultânea oxidação do grupo carbonilo livre presente nos açúcares redutores.

A concentração dos açúcares redutores foi determinada pela leitura dos valores de absorvância ($\lambda = 500 \text{ nm}$) num espectrofotómetro UV-Vis (*Shimadzu, UV-1700 Pharma Spec; Shimadzu, V260*) (Figura 3.6). Foram realizadas curvas de calibração, recorrendo à utilização de padrões com várias concentrações de glicose (Anexo A.1.1).



Figura 3.6 - Espectrofotómetro UV-Vis e soluções padrão utilizadas.

3.5 Quantificação do etanol pelo método refratométrico

A refração é criada quando a direção do feixe de luz se altera quando este, troca de meios. Assim, o índice de refração é a relação entre a velocidade da luz no vácuo e a velocidade da luz através do meio em questão, estando relacionado com a estrutura física do meio através do qual a luz passa, sendo que varia com a concentração de soluto.

Para esta análise, foi utilizado o refratômetro de Abbe (Figura 3.7), no qual é medido o ângulo limite de reflexão total distinguindo dois métodos de medição: medida por transmissão; medida por luz refletida. Neste caso utilizou-se a medida por transmissão uma vez tratar-se de um líquido incolor, em que a luz passa através da amostra sobre a face medidora do prisma de medição. Parte da luz incidente reflete-se abaixo do ângulo limite da reflexão total observando-se na ocular como uma linha limite entre o campo claro e escuro, indicando diretamente o valor do índice medido.

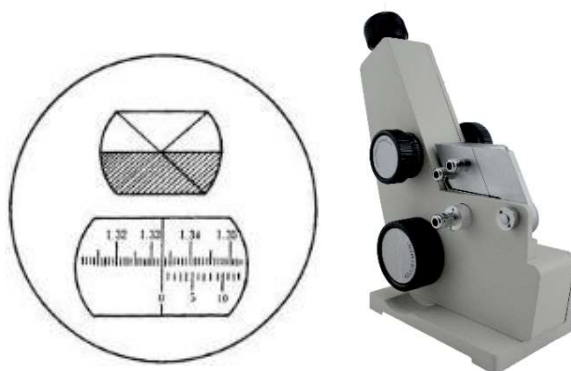


Figura 3.7 - **Esquerda:** Campo Visual Ocular e respectiva Leitura. **Direita:** Refratômetro de Abbe.

Para uma correta leitura dos valores, realizou-se uma curva de calibração utilizando soluções padrão com diversas concentrações de etanol (Anexo A.2). Uma vez que os valores foram lidos a 22 °C, foi necessário realizar o ajuste das concentrações para uma temperatura de 20 °C, correspondente à temperatura de referência.

3.6 Método de Espectrofotometria de Absorção Atômica para determinação dos contaminantes

De forma a verificar-se a presença dos contaminantes absorvidos pela planta durante o processo de fitorremediação do solo, no etanol produzido, realizaram-se as leituras dos valores de concentração dos contaminantes presentes na palha através do método de análise por espectrofotometria de absorção atômica (PG Instruments, PG-990, Figura 3.8). Para esta leitura, foram realizadas duas curvas de calibração, que se encontram expostas no Anexo B.3, para cada um dos contaminantes que se pretendia quantificar, Cd e Zn.



Figura 3.8 - Espectrofotômetro de absorção atômica utilizado

3.7 Condições experimentais utilizadas para os ensaios

A Tabela 3.1 apresenta de forma resumida as condições experimentais utilizadas para obtenção do etanol e leituras dos valores de açúcares e de concentração de etanol das amostras produzidas.

Tabela 3.1 - Tabela resumo das condições experimentais.

Processo	Descrição	Banho		Pressão
		Temperatura	Tempo	
Pré-tratamento ácido	20 g de biomassa contaminada/não contaminada misturada com 150 ml de ácido* com concentração 3% (v/v)	85 °C	48 h	---
Hidrólise enzimática	Adicionados 100 ml de água desionizada para maior diluição, regulação pH 5 e adição de 2 ml de enzima**	50 °C	13 h	---
Fermentação	Adição de 25 ml de levedura diluída em água	37 °C	11 dias	---
Destilação	Separação da fase líquida da sólida	60 °C	---	120 mbar
Espectrofotómetro UV-Vis	Realização das soluções padrão e preparação das amostras pelo método de DNS para leitura dos valores (Anexo B.1)	---	---	---
Refratómetro	Realização das soluções padrão e leituras dos valores (Anexo B.2)	22°C	---	---
Espectrofotómetro de Absorção Atômica	Realização das soluções padrão e leituras dos valores (Anexo B.3)	---	---	---

* H₂SO₄, HCl, HNO₃ e CH₃COOH

** *Accellerase e Ultraflo*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- 4.1 Biomassa não contaminada
- 4.2 Biomassa contaminada
- 4.3 Resumo dos resultados obtidos e comparação com outras biomassas

4 Resultados e Discussão

No presente capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no processo de obtenção de etanol a partir da palha de milho contaminada e não contaminada.

4.1 Biomassa não contaminada

Por forma a determinar qual o ácido e enzima mais eficazes nos processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática para a palha de milho, foram realizados testes preliminares em palha não contaminada. Deste modo, foram utilizados quatro tipos de ácido com a mesma concentração e dois tipos de enzima adicionados na mesma quantidade.

Os ácidos utilizados no pré-tratamento, com concentração de 3% (v/v), foram H_2SO_4 , HCl, HNO_3 e CH_3COOH . A cada amostra e respetiva réplica de palha de milho não contaminada foram adicionados 150 ml de cada um dos ácidos, submetendo-as às condições descritas no Capítulo 3.1.

Para a hidrólise enzimática foram adicionados às amostras 2 ml de cada uma das enzimas *Accellerase* e *Ultraflo*, submetendo as mesmas às condições apresentadas no Capítulo 3.2. Cada uma das enzimas utilizadas foi aplicada aos ensaios iniciados no pré-tratamento, correspondendo aos 4 ácidos, perfazendo um total de 8 ensaios e respetivas réplicas.

Para a fermentação, em todas as amostras foi utilizada a mesma levedura sob as condições descritas no Capítulo 3.3. Após este processo, foram retiradas amostras do líquido obtido para análise dos açúcares redutores e foi realizada destilação do líquido filtrado.

4.1.1 Quantificação dos açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Uma vez que a biomassa lignocelulósica, como a palha de milho, possui uma estrutura complexa, o pré-tratamento realizado à mesma permitiu remover a lenhina e assim estimular a produção de açúcares simples.

Através do método do DNS foi possível quantificar os açúcares presentes no licor obtido após o processo de fermentação para as amostras sem contaminação de metais pesados.

Deste modo, foram obtidas as respetivas curvas de calibração segundo o método descrito no Anexo A.1 e foram preparadas as amostras por forma a realizar as leituras no Espectrofotómetro. Assim, 0,2 ml de cada uma das amostras foram primeiramente diluídas em 0,3 ml de água desionizada e foram adicionados 0,5 ml de DNS. Após agitação, aquecimento e rápido arrefecimento foram novamente diluídas com mais 10 ml de água desionizada e agitadas.

Verificou-se, após algumas leituras que a diluição era insuficiente para correta leitura dos valores no espectrofotómetro, sendo deste modo realizadas mais diluições apropriadas a cada amostra, conforme apresentado nas Tabelas presentes no Anexo B.1.

Assim, para as amostras recolhidas do licor obtido após fermentação da palha de milho não contaminada, foram realizadas as comparações relativamente à quantidade de açúcar presente nas mesmas. A Figura 4.1 apresenta os valores de concentração de glicose presentes no licor das amostras da biomassa não contaminada após a fermentação, podendo-se observar quais as combinações ácido e enzima que são as mais eficazes na conversão dos polissacarídeos.

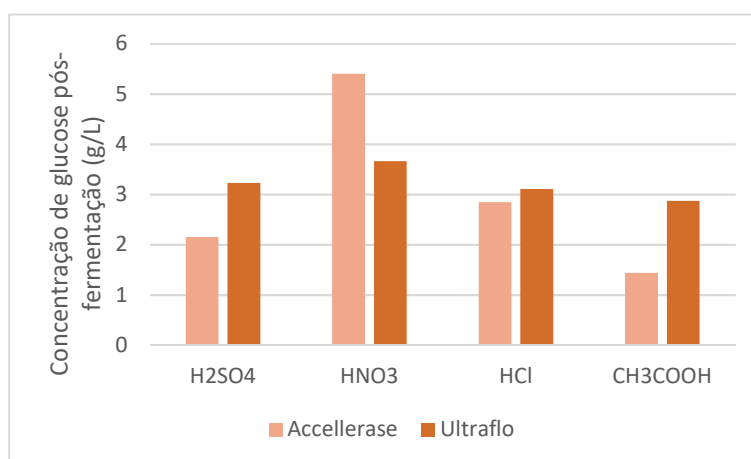


Figura 4.1 - Concentração de glicose presente no licor pós-fermentação para a biomassa não contaminada.

É possível verificar que o licor produzido a partir do pré-tratamento com Ácido Acético é o que possui menor concentração de açúcares para ambas as enzimas, o que poderá indicar que é o menos eficaz no pré-tratamento e, por conseguinte, promove menor conversão dos açúcares. Esta observação é consistente com o facto de este ser o ácido mais fraco.

A quantidade geral de açúcares obtidos para todas as amostras foi superior ao esperado. Estima-se que este esteja relacionado com o facto de a levedura utilizada para esta primeira parte do trabalho experimental ser antiga, havendo deste modo menos inóculos ativos na levedura, prejudicando a fermentação e consequente transformação dos açúcares.

4.1.2 Quantificação do álcool pelo método refratométrico

Para uma escolha apropriada de qual combinação de enzima e ácido, deverão ser analisados os dados provenientes da leitura refratométrica apresentados no presente subcapítulo.

Para uma máxima recuperação do etanol, o mosto resultante da fermentação foi submetido a uma filtração por vácuo por forma a separar as lamas do licor, facilitando assim o processo de destilação.

A destilação do etanol foi realizada no Rotavapor com uma temperatura de banho de 60 °C e uma pressão de 120 mbar. Após a obtenção do etanol, foram feitas as leituras de concentração no Refratómetro de Abbe.

Deste modo, aqueceu-se o banho do refratómetro a 22 °C, realizaram-se as curvas de calibração conforme indicadas no Anexo A.2 e procedeu-se às leituras da concentração do etanol. A Figura 4.2 apresenta a quantidade volumétrica de etanol obtido para cada um dos ácidos e enzimas utilizados. Os valores apresentados foram corrigidos para a temperatura de 20 °C.

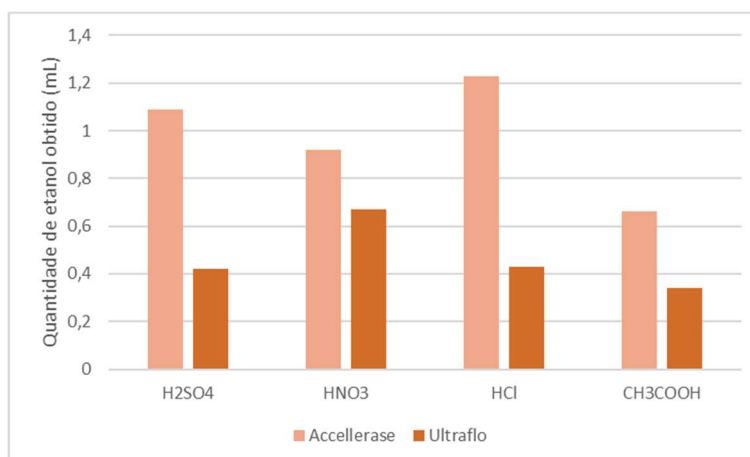


Figura 4.2 - Volume de etanol obtido para a palha de milho não contaminada.

Verifica-se, pela análise da Figura 4.2 que a combinação com melhores resultados foi obtida com o pré-tratamento com Ácido Clorídrico e a hidrólise com a enzima *Accellerase*, contudo, como para a enzima *Ultraflo* também se obtiveram bons resultados na combinação desta com o Ácido Nítrico. Foram realizados os mesmos procedimentos para a palha de milho contaminada utilizando ambas as combinações. Isto irá permitir observar de que forma as enzimas são influenciadas pela presença dos contaminantes.

4.2 Biomassa contaminada

Após análise dos resultados obtidos (Figura 4.1) e verificar-se qual a combinação de ácido e enzima mais eficazes, realizaram-se os mesmos passos descritos anteriormente

com as duas combinações mais eficazes para a biomassa contaminada com os metais pesados. Foi também realizado novamente os testes para as melhores condições operatórias com a biomassa não contaminada, por forma a servir de controlo, estando estas sob as mesmas condições que as restantes amostras de palha de fitorremediação, potencialmente contaminadas.

A biomassa contaminada na qual se aplicaram as melhores condições operatórias provem de duas zonas contaminadas diferentes, Estarreja e Panasqueira. Ao serem analisadas ambas as biomassas sob as mesmas condições, permite-nos averiguar de que forma a presença de diferentes concentrações de contaminantes poderá influenciar a obtenção de etanol e qual a qualidade deste.

Assim, após realizados os mesmos procedimentos experimentais para ambas as palhas de milho contaminadas e novamente para a palha de milho não contaminada sob as melhores condições operatórias determinadas, procedeu-se à análise das amostras recolhidas durante todo o processo.

4.2.1 Quantificação dos açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Para as amostras de solo contaminado e também para as amostras de controlo, recolheram-se amostras ao longo do processo de produção do etanol, por forma a verificar a evolução da concentração dos açúcares até ao final da fermentação.

Após a preparação das amostras recolhidas durante os diferentes estágios: após hidrólise enzimática, 6º dia de fermentação e pós-fermentação – conforme explicado anteriormente, procedeu-se à leitura dos valores no Espectrofotómetro. As Figuras 4.3 a 4.5 apresentam os resultados obtidos da leitura da concentração de glicose durante os diferentes estágios de produção de etanol.

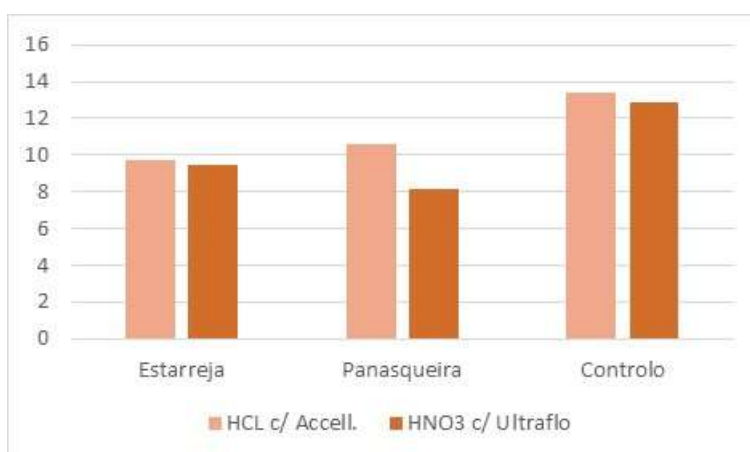


Figura 4.3 - Quantidade de glicose após o processo de hidrólise

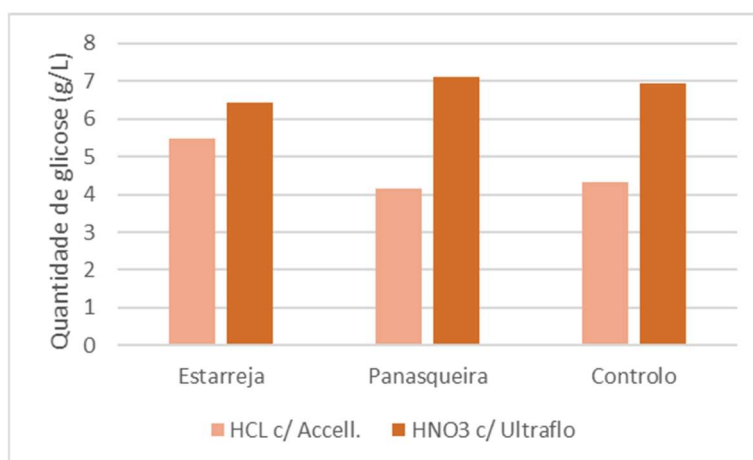


Figura 4.4 - Quantidade de glicose ao 6º dia de fermentação.

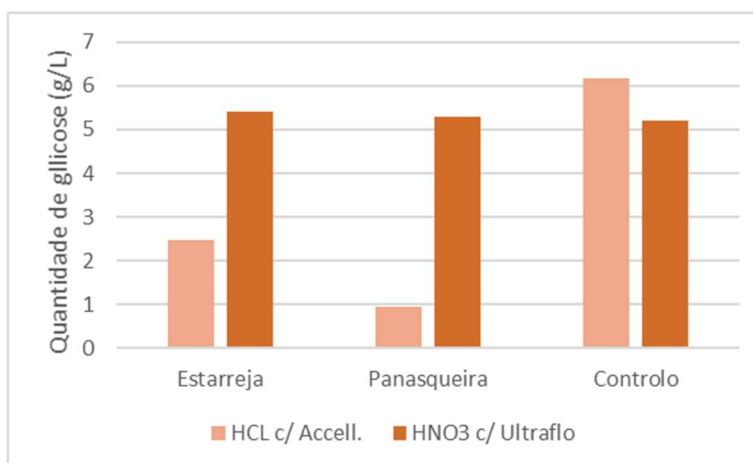


Figura 4.5 - Quantidade de glicose após a fermentação.

Através da análise da evolução do teor de açúcares presentes no licor, verifica-se que em todas as fases, o tratamento com HNO_3 e com a enzima *Ultraflo* originou uma quantidade mais ou menos constante de açúcares. Para o tratamento com HCl e com *Accellerase*, verifica-se que houve um grande consumo dos açúcares presentes no licor, o que poderá indicar que a combinação destes potencia o seu consumo por parte das leveduras no processo de fermentação.

Verifica-se ainda que a concentração de açúcares para a biomassa de controlo é superior. Possivelmente, os contaminantes presentes na biomassa poderão ter um efeito positivo na conversão de açúcares. Para verificar os efeitos que estes possuem sobre a fermentação, foram realizadas leituras da concentração dos contaminantes no etanol obtido, sendo os resultados apresentados no Capítulo 4.2.3.

4.2.2 Quantificação do álcool pelo método refratométrico

Por forma a averiguar qual a combinação com maior rendimento em álcool, procedeu-se às leituras das concentrações no licor resultante das amostras contaminadas/controlo no refratômetro de Abbe, com uma temperatura de banho de 22 °C. Foram realizadas as correções para os 20 °C e obtiveram-se os valores apresentados na Figura 4.6.

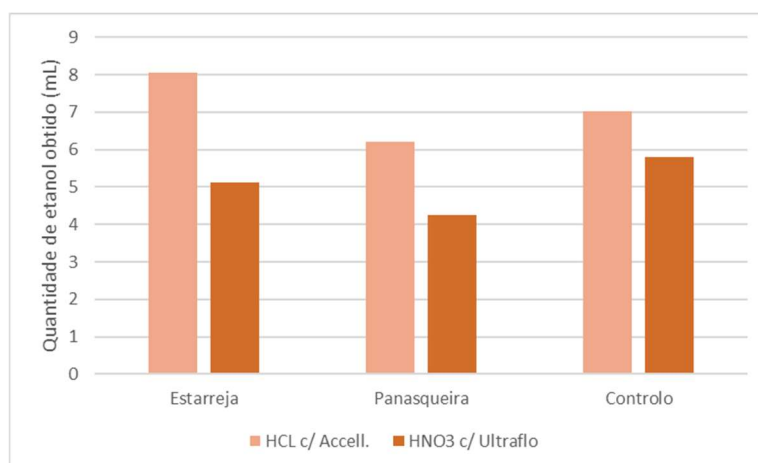


Figura 4.6 - Quantidade de etanol obtido no processo de destilação a partir da biomassa contaminada.

Conforme já esperado, pelas leituras dos valores de glicose presentes no final do processo de fermentação, o pré-tratamento com HCl seguido de hidrólise com *Accellerase* provou ser o mais eficaz na produção de etanol tanto para a palha de milho contaminada como para a não contaminada.

Comparando os valores obtidos com os apresentados na Figura 4.2 verifica-se que a quantidade de etanol produzido para esta segunda parte experimental é superior para a palha do solo contaminado e de controlo.

4.2.3 Quantificação de contaminantes por Espectrofotometria de Absorção Atómica

De forma a compreender se os contaminantes presentes na palha do milho estão presentes no etanol produzido, foi realizada a leitura de concentração dos metais Zn e Cd em cada uma das amostras de etanol produzido a partir da palha contaminada e de controlo, no Espectrómetro de Absorção Atómica.

Assim, foram realizadas as soluções padrão para obtenção das curvas de calibração para cada um dos contaminantes a quantificar e posteriormente foram lidas as amostras. A Tabela 4.1 apresenta os valores de absorvância registados.

Tabela 4.1 - Valores de Absorvância para os contaminantes presentes na palha de milho.

Amostra	Zinco	Cádmio
1	0,016	0,003
2	0,048	0
3	0,028	0
4	0,034	0
5	0,029	0
6	0,023	0,001
7	0,014	0
8	0,022	0
A	0,088	0,002
B	0,023	0,001

Comparando os valores obtidos na leitura do etanol proveniente da palha de milho com os valores dos padrões realizados presentes no Anexo B.3, a concentração de metais presentes no etanol é muito baixa.

4.3 Resumo dos resultados obtidos e comparação com outras biomassas

A Tabela 4.2 permite-nos observar de forma resumida os resultados obtidos para a biomassa contaminada dos valores da concentração de açúcares e de etanol obtido. É apresentado também os valores de etanol obtido para a biomassa não contaminada sob as mesmas condições experimentais.

Tabela 4.2 - Tabela resumo dos valores de concentração de açúcar e de etanol extraído para a biomassa contaminada e de controlo.

Tipo de solo	Amostras	Concentração de Açúcares após Hidrólise (g/l)	Concentração de Açúcares após Fermentação (g/l)	Volume de etanol recuperado (ml)	Concentração de etanol obtido (ml)
Estarreja	HCl c/ <i>Accellerase</i>	9,74	2,47	338,75	8,05
	HNO ₃ c/ <i>Ultraflo</i>	9,47	5,40	288,22	5,13
Panasqueira	HCl c/ <i>Accellerase</i>	10,61	0,94	330,50	6,22
	HNO ₃ c/ <i>Ultraflo</i>	8,15	5,30	253,04	4,25
Controlo	HCl c/ <i>Accellerase</i>	13,38	6,17	355,24	7,02
	HNO ₃ c/ <i>Ultraflo</i>	12,91	5,20	293,00	5,79

Pela observação da Tabela 4.2 é mais simples de notar que a concentração de etanol obtido com o pré-tratamento com ácido clorídrico e hidrólise com a *Accellerase* da biomassa de solo contaminado é bastante significativa, em comparação com a biomassa de solo sem contaminantes.

Comparando os dados da Tabela 4.1 e Tabela 4.2, a concentração de contaminantes lidos é bastante baixa o que nos leva a pensar que estes tiveram pouca influência no processo de produção de etanol.

Por forma a compreendermos o interesse da conversão da palha de milho utilizada em fitorremediação em etanol, é importante comparar os valores obtidos com outros tipos de biomassa. Deste modo, é importante estimar a concentração de etanol para 1 tonelada de biomassa por forma a facilitar esta comparação.

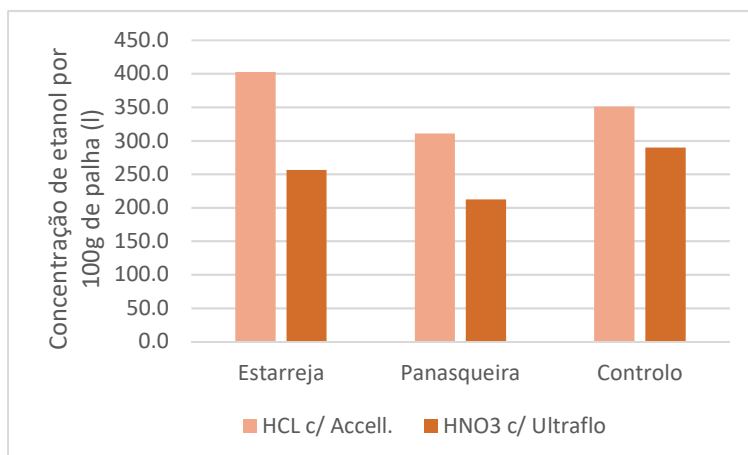


Figura 4.7 - Concentração de etanol estimado para 1 tonelada de palha de milho.

A Tabela 4.3 apresenta as diferentes concentrações de etanol esperada para diversas biomassas.

Tabela 4.3 - Biomassas e o seu potencial rendimento de etanol [44].

Biomassa	Potencial rendimento de etanol (l/tonelada de biomassa)
Grão de milho	470
Palha de milho	428
Palha de arroz	416
Lixo de algodão	215
Resíduos florestais	309
Serrim	382
Bagaço	437
Mistura de papel	440

Pela comparação dos dados da Tabela 4.3 com a média estimada na Figura 4.7, verifica-se que os valores de etanol obtidos são bastantes próximos aos estimados. Constata-se, deste modo, que a conversão de palha de milho contaminada possui interesse para o futuro da produção de Bioetanol.

CONCLUSÕES E PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS

- 5.1 Conclusões
- 5.2 Proposta de Trabalhos Futuros

5 CONCLUSÕES E PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS

5.1 CONCLUSÕES

O crescimento populacional e exigências de qualidade de vida, têm provocado a contaminação dos solos devido à agricultura intensiva e à extração mineira. Este problema tem vindo a ser uma preocupação crescente, uma vez que daí decorre uma crescente inutilização dos terrenos para a agricultura com fins alimentares.

Deste modo, a fitorremediação assume um importante papel na remediação dos solos, tornando-os novamente aptos a cultivo, através da remoção dos contaminantes.

No entanto, a biomassa resultante deste processo é normalmente colocada em aterros, ou até mesmo em alguns casos incinerada, perdendo-se uma quantidade significativa de recursos valiosos.

Nos últimos anos, os desenvolvimentos tecnológicos permitiram a obtenção de energia de uma forma mais sustentável para o ambiente, potenciando deste modo a melhoria da qualidade de vida, e aproveitando outros recursos que de outro modo seriam desperdiçados.

Assim, a combinação da matéria proveniente da fitorremediação dos solos com a tecnologia desenvolvida de conversão de biomassa em combustíveis, tem vindo a ser um tema de pesquisa e de interesse, uma vez que potencia uma matéria que de outro modo seria descartada, e reduz a competição por biomassa entre os setores alimentar e dos transportes.

Por estes motivos, a presente dissertação visou estudar a viabilidade de conversão da biomassa resultante da fitorremediação de solos em Biocombustível (etanol).

Deste modo, foi escolhido como objeto de estudo a palha de milho proveniente de dois solos mineiros, contaminados essencialmente com os metais Cádmio e Zinco.

Uma primeira conclusão retirada do estudo, foi a de que a quantidade de biomassa produzida nos solos contaminados era cerca de metade da que foi produzida no solo de controlo. Acredita-se que a quantidade de matéria contaminada era inferior pois os contaminantes presentes no solo e absorvidos pela planta de milho inibem o crescimento da planta.

Consequentemente, numa primeira fase experimental do trabalho, foi testada qual a combinação de ácido e enzima mais adequada para o pré-tratamento e hidrólise

enzimática, respetivamente, e que potenciavam a produção de etanol. Verificou-se que as combinações mais eficazes eram o ácido clorídrico em combinação com a enzima *Accellerase* e o ácido nítrico com a enzima *Ultraflo*.

Após a obtenção destes resultados, realizou-se o mesmo procedimento experimental usando a palha de milho contaminada. Foram também repetidas as mesmas condições experimentais usando a palha de milho não contaminada por forma a garantir as mesmas exposições de tempo, temperatura e pressão sendo por isso amostras de controlo.

Após as leituras das concentrações de glicose e de etanol presentes no licor obtido, verificou-se que das duas combinações a mais eficaz na obtenção de etanol é o ácido clorídrico com *Accellerase*. Comparando também os valores do etanol obtido da palha de milho contaminada com o etanol obtido da palha de milho não contaminada (amostras de controlo) conclui-se que os valores são bastante próximos, o que indica que a presença dos contaminantes na palha de milho terá tido pouco influência na produção de etanol.

Através da leitura das concentrações dos dois metais contaminantes nas amostras produzidas no solo contaminado e de controlo, usando o Espectrómetro de Absorção Atómica, e tendo os valores de absorvância abaixo de 0,088 para o Zinco e abaixo de 0,003 para o Cádmiio, verifica-se que a concentração era muito baixa. Isto pode indicar que os contaminantes presentes na palha não se transferiram para o etanol. Poderá também indicar que a concentração de contaminantes na palha de milho era muito baixa, provavelmente provocada pela distribuição destes pelas diferentes partes da planta e maior acumulação noutras zonas (nas raízes, provavelmente).

Pela comparação dos valores de quantidade de etanol obtidos entre a primeira fase, com um volume de etanol recuperado de 1,23 ml e 0,67 ml para o ácido clorídrico e nítrico, respetivamente com as correspondentes enzimas, e a segunda fase experimental, com um volume de etanol recuperado de 7,02 ml e 5,79 ml, percebe-se que as quantidades diferem significativamente. Conforme já mencionado anteriormente, acredita-se que isso é consequência da qualidade da levedura utilizada na primeira fase ser inferior à utilizada na segunda fase, limitando assim a extensão do processo de fermentação.

Com os resultados obtidos no trabalho experimental, pensa-se que a produção de etanol a partir de palha de milho contaminada possui um potencial elevado. Com base nos resultados obtidos, o rendimento em álcool para as palhas de milho produzidas nos 2 solos contaminados é de 0,51 gálcool/gpalha, 0,39 gálcool/gpalha, 0,32 gálcool/gpalha e 0,27 gálcool/gpalha e para a palha produzida em solo não contaminado é de 0,44 gálcool/gpalha e de 0,37 gálcool/gpalha para o ácido clorídrico e nítrico, respetivamente, verifica-se o potencial de produção de etanol a partir de biomassa provenientes da fitorremediação.

5.2 PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS

Por forma a compreendermos de que forma a concentração de contaminantes na palha influencia a produção, deverão ser feitas análises mais extensivas nesse sentido. Deverá ser feita também uma análise quanto à concentração de contaminantes na lama recolhida após o processo de filtração para recolha da solução alcoólica produzida.

Para um melhor controlo do processo de fermentação, será também interessante usar uma levedura controlada, com concentração de inóculo (n° células/ml) conhecida, por forma a haver uma concentração constante de inóculos na mesma, eliminando deste modo mais uma variável no processo de obtenção de etanol.

Para um máximo de aproveitamento da planta, há também o interesse de utilizar outras partes da planta para produção de biocombustíveis, por forma a analisar o potencial global desta biomassa.

Por forma a percebermos a viabilidade de aplicação ao quotidiano, numa perspetiva económica e financeira, poderá também ser feita uma análise dos custos de produção de etanol a partir de biomassa proveniente da remediação dos solos e de que forma a aplicação deste influencia positivamente a sociedade.

**BIBLIOGRAFIA E OUTRAS FONTES
DE INFORMAÇÃO**

6 BIBLIOGRAFIA E OUTRAS FONTES DE INFORMAÇÃO

- [1] “BP Energy Outlook,” 2019.
- [2] D. UE, D. O. Parlamento, and E. E. Do, *DIRETIVA (UE) 2018/2001 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 11 de dezembro de 2018 relativa à promoção da utilização de energia de fontes renováveis (reformulação)*. Portugal: Jornal Oficial da União Europeia, 2018, pp. 82–209.
- [3] UN Environment, “Emissions gap report 2018,” 2018.
- [4] REN21, “REN21. Renewables 2018-global status report, Paris, REN21 Secretariate; 2018,” 2018.
- [5] A. C. Fernandes, R. Ribeiro, S. Rodrigues, and A. C. Fernandes, “Relatório do ambiente PORTUGAL 2018,” 2018.
- [6] C. Sze and K. Lin, “Chemistry and Chemical Technologies in Waste Valorization,” pp. 73–121, 2017.
- [7] M. B. K. Niazi *et al.*, “Potential of biomass for bioenergy in Pakistan based on present case and future perspectives,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 81, no. October, pp. 1247–1258, 2017.
- [8] P. McKendry, “Energy production from biomass (part 1): overview of biomass,” *Bioresour. Technol.*, vol. 83, no. June 2002, pp. 37–46, 2002.
- [9] M. A. Nobre, “Biocombustíveis: Uma política europeia ambiental e socialmente comprometida?,” *Debater a Europa*, p. 34, 2014.
- [10] C. Van der Elst, R. ; Buschile, D. ; Hirsbrunner, S. ; Kaddous, *Les défis de la nouvelle directive sur les énergies renouvelables et son impact sur le commerce intra- er extracommunautaire*. Helbing Lichtenhahn, 2011.
- [11] J. Smith, *Biofuels and the Globalization of Risk: the biggest change in North-South relationship since colonialism?* London: New York: Zed Books, 2010.
- [12] A. Demirbas, “Competitive liquid biofuels from biomass,” *Appl. Energy*, vol. 88, no. 1, pp. 17–28, 2011.
- [13] M. Marques, C. R. C. Aguiar, and J. J. L. S. da Silva, “Desafios técnicos e barreiras sociais, econômicas e regulatórias na fitorremediação de solos contaminados,” *Rev. Bras. Cienc. do Solo*, vol. 35, no. 1, pp. 1–11, 2011.
- [14] A. Cláudia Monteiro de Vila Lobos Risques, “Avaliação do aproveitamento da palha do milho para bioenergia, nos sistemas de produção do Vale do Tejo.,” Instituto Politécnico de Santarém, 2015.
- [15] I. M. Abumourad, “Fitorremediação: Considerações Gerais e Características de Utilização,” *Silva Lusit.*, vol. 15, no. 1, pp. 103–117, 2007.
- [16] P. Sharma and S. Pandey, “Status of phytoremediation in world scenario,” *Int. J. Environ. Bioremediation Biodegrad.*, vol. 2, no. 4, pp. 178–191, 2014.
- [17] P. Auxiliar, U. N. De Lisboa, and I. Auxiliar, “Fitorremediação de águas residuais contaminadas com Cd e Ni por três genótipos de *Miscanthus*,” Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2014.

- [18] J. F. C. Barros and J. G. Calado, "A Cultura do Milho," Universidade de Évora, Évora, 2014.
- [19] C. Plant, "Corn," 2019. .
- [20] J. S. Y. K. H. T. H. A.-A. N. R. S. C. N. Stewart., "Plants to power: bioenergy to fuel the future," *Trends Plant Sci.*, vol. 13, no. 8, pp. 421–429, 2008.
- [21] A. Centre for Cassava Research and Development, "http://aseancassava.info/bioethanol.asp." .
- [22] S. K. Ritter, "Lignocellulose: A Complex Biomaterial," *Chemical & Engineering News*, 2008. .
- [23] L. Technology, "Lignocellulose Technology," vol. 1, no. 1, pp. 1–71, 2016.
- [24] F. A. Santos, J. H. De Queiróz, J. L. Colodette, S. A. Fernandes, V. M. Guimaraes, and S. T. Rezende, "Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol," *Quim. Nova*, vol. 35, no. 5, pp. 1004–1010, 2012.
- [25] D. S. de J. Gomes, "Estudo do Pré-Tratamento Ácido e Hidrólise Enzimática da Borra de Café Visando a Produção de Bioetanol," Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2016.
- [26] A. Gupta, Ram B. ; Demirbas, *Gasoline, Diesel and Ethanol Biofuels from Grasses and Plants*, First Edit. New York, USA: Cambridge, 2010.
- [27] P. Kumar, D. M. Barrett, M. J. Delwiche, and P. Stroeve, "Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 48, no. 8, pp. 3713–3729, Apr. 2009.
- [28] J. V. Gupta, Anubhuti; Prakash, "Sustainable bio-ethanol production from agro-residues," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 41, no. C, pp. 550–567, 2015.
- [29] HSU; LADISCH; TSAO, "Esquema do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica," 1980. .
- [30] E. Pandey, A.; Larroche, C.; Ricke S.C; Dussap, C. G.; Gnansounou, *Biofuels - Alternative Feedstocks and Conversation Processes*, 1st Editio. Elsevier Inc., 2011.
- [31] J. Zhao and L. Xia, "Simultaneous saccharification and fermentation of alkaline-pretreated corn stover to ethanol using a recombinant yeast strain," *Fuel Process. Technol.*, vol. 90, no. 10, pp. 1193–1197, 2009.
- [32] S. Vieira, "Produção de bioetanol a partir de um resíduo orgânico proveniente da central de compostagem da LIPOR," Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2009.
- [33] C. Xiros, E. Topakas, and P. Christakopoulos, "Hydrolysis and Fermentation for Cellulosic Ethanol Production," *Adv. Bioenergy Sustain. Chall.*, vol. 00, no. October, pp. 11–31, 2015.
- [34] S. Mussatto and J. Teixeira, "Lignocellulose as raw material in fermentation processes," *Appl. Microbiol.*, no. January 2010, pp. 897–907, 2010.
- [35] M. L. de Carvalho, "Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar," Universidade Federal de São Carlos, 2011.
- [36] A. Nunes, "Valorização da Drêche do Processo Cervejeiro para a Produção de Bioetanol," Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2011.
- [37] V. Silva, "Valorização de Cápsulas de Café e Produção de Biocombustíveis," Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2011.
- [38] C. B. C. Sá, "Caracterização de Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* para Aplicação na Produção de Bioetanol," Universidade

- Federal de Pernambuco, 2012.
- [39] R. Fernandes de Moura, "Otimização das etapas de pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática da drêche cervejeira a açúcares com vista à produção de bioetanol," Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2012.
- [40] L. Ask, Magnus & Olofsson, Kim & Di Felice, Tommaso & Ruohonen, Laura & Penttilä, Merja & Lidén, Gunnar & Olsson, "Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF.," *Process Biochem.*, pp. 1452–1459, 2012.
- [41] G. L. Öhgren, Karin LU ; Bura, Renata; Lesnicki, Gary; Saddler, Jack and Zacchi, "A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover," *Dep. Chem. Eng.*, vol. 42, no. 5, pp. 834–839, 2007.
- [42] T. Tavares, "Valorização da Drêche Cervejeira : Fermentação de Pentoses," Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2014.
- [43] G. L. Miller, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," *Anal. Chem.*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, Mar. 1959.
- [44] M. N. A. M. Yusoff, N. W. M. Zulkifli, B. M. Masum, and H. H. Masjuki, "Feasibility of bioethanol and biobutanol as transportation fuel in spark-ignition engine: A review," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 121, pp. 100184–100211, 2015.
- [45] S. Perry, R. H. Perry, D. W. Green, and J. O. Maloney, *Perry's chemical engineers' handbook*, 6th Editio. .

ANEXOS

Anexo A – Procedimento Experimental

Anexo B - Resultados Experimentais

Anexo C - Exposição dos Cálculos

Anexo D - Caracterização da palha de milho

Anexo E - Informações Técnicas

7 ANEXOS

Anexo A – Procedimento Experimental

No presente subcapítulo é descrito o procedimento experimental realizado para a caracterização da matéria utilizada e quais os métodos utilizados para a quantificação dos açúcares.

Anexo A.1 - Quantificação dos Açúcares Redutores

Durante as fases do pré-tratamento e hidrólise enzimática, submeteu-se a biomassa à ação de diferentes tipos de ácido, na mesma concentração (%v/v), bem como à mesma dosagem de dois tipos de enzima, por forma a verificar quais as melhores condições operatórias para potenciar a conversão os polissacarídeos da palha de milho a açúcares simples.

Ao longo do processo foram recolhidas amostras e analisadas as mesmas quanto à quantidade de açúcares redutores através do método de DNS.

A.1.1 - Método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Para a quantificação dos açúcares redutores foi necessário recorrer ao procedimento experimental desenvolvido por Miller [43] e descrito de seguida. O método exige a construção de uma curva de calibração utilizando soluções padrão de glicose (*Panreac*).

Material:

- Espectrofotómetro UV-Vis (*Shimadzu, UV-1700 Pharma Spec; Shimadzu, V260*), $\lambda = 500 \text{ nm}$;
- Vortex (2 *Genie, Scientific Industries*);
- Cuvetes PMMA;
- Placa de aquecimento;
- Tubos de ensaio de rosca;
- Micropipeta de diversas volumetrias;
- Gobelés;
- Balão volumétrico de 50 ml;
- Balança;

Reagentes/Soluções:

- Solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico e sal de Rochelle (DNS);

- Água desionizada;
- Glicose;
- Amostras da solução de palha de milho após pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação.

Procedimento:

➤ **Preparação da solução padrão:**

- ✓ No balão volumétrico pesar 0,05 g de glicose e adicionar água desionizada até perfazer os 50 ml. Registrar o valor exato de glicose pesado e agitar a solução para homogeneizar;
- ✓ Em 7 tubos de ensaio com rosca, adicionar a dosagem de solução padrão e de água desionizada, conforme a Tabela 7.1;

Tabela 7.1 – Proporção de solução padrão e água desionizada por tubo de ensaio.

Nº Tubo de Ensaio	Solução Padrão (µl)	Água desionizada (µl)
1	0	1000
2	100	900
3	200	800
4	400	600
5	600	400
6	800	200
7	1000	0

- ✓ Adicionar, de seguida, 0,5 ml da solução DNS;
- ✓ Tapar os tubos de ensaio e agitar a solução 10 segundos no vortex a 500 rpm;
- ✓ Colocar os tubos de ensaio num gobelé com água previamente aquecida até ao ponto de ebulição e deixar por 10 minutos;
- ✓ Após os 10 minutos, retirar os tubos e arrefecer os mesmos rapidamente noutro gobelé com água fria;
- ✓ Acrescentar 8 ml de água desionizada e agitar por mais 10 segundos no vortex;

- ✓ Ler a absorvância das amostras padrão (Figura 7.1) no espectrofotómetro a 500 nm e traçar a curva de calibração.

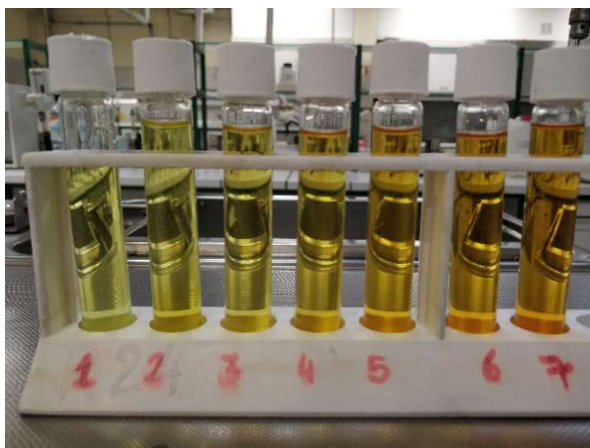


Figura 7.1 - Solução padrão com diferentes concentrações de glicose para traçar a curva de calibração.

Devido ao facto de as leituras das amostras terem sido realizadas em diferentes dias e as concentrações dos açúcares serem diferentes dependendo do estágio em que a amostra do licor foi recolhida, foram traçadas diversas curvas de calibração.

➤ **Preparação das amostras:**

Para as diferentes amostras recolhidas, a concentração dos açúcares variou bastante, pelo que foi necessário recorrer a diferentes diluições das amostras. Abaixo será descrito o método para apenas uma das diluições, como exemplo do procedimento experimental. Para uma diluição da amostra de 1:20 foram tidas em consideração as seguintes quantidades:

- ✓ Descongelar as amostras à temperatura ambiente e homogeneizar as mesmas no vortex (saltar este passo caso já se encontrem no estado líquido);
- ✓ Em tubos de ensaio com tampa de rosca com capacidade de 10 ml ou mais, adicionar 0,025 ml de amostra e acrescentar 0,475 ml de água desionizada;

Nota: O rácio deverá ser sempre de forma a perfazer a totalidade do volume de 0,5 ml.

- ✓ À mistura anterior adicionar 500 μ L de solução DNS e agitar no vortex a 500 rpm por 10 segundos;
- ✓ Colocar a mistura num banho de água em ebulição durante 10 minutos;
- ✓ Após os 10 minutos, arrefecer rapidamente num gobelé com água;
- ✓ Assim que se encontrar à temperatura ambiente, acrescentar 10 ml de água desionizada e agitar novamente no vortex por mais 10 segundos;

- ✓ Ler a absorvância a 500 nm e determinar a concentração dos açúcares redutores recorrendo à curva de calibração previamente obtida.

Anexo A.2 – Quantificação da Concentração do Etanol

Por forma a quantificar a concentração de álcool nas diferentes amostras recorreu-se ao método refratométrico.

A.2.1 – Método Refratométrico

Para a correta leitura dos valores das amostras, deverá ser construída uma curva de calibração através de soluções padrão de álcool.

Material:

- Refratómetro de *Abbe*;
- Álcool etílico @99.8% (v/v);
- Água desionizada;
- Balão Volumétrico 50 ml;
- Balões Volumétricos 10 ml;
- Micropipeta;
- Pipetas de Pasteur;
- Algodão.

Procedimento:

➤ **Preparação da solução padrão:**

- ✓ No balão volumétrico de 50 ml adicionar 5 ml de álcool etílico e acrescentar água desionizada até perfazer a totalidade dos 50 ml do balão. Agitar para homogeneizar;
- ✓ Nos balões de 10 ml, adicionar diferentes quantidades da solução mãe conforme a Tabela 7.2 e perfazer o restante volume com água desionizada. Agitar até homogeneizar;
- ✓ Ligar o refratómetro a 22 °C;
- ✓ Com o auxílio das pipetas de *Pasteur*, colocar uma gota de solução padrão na lente do refratómetro (Figura 7.2);
- ✓ Ler o índice de refração (IR) das soluções padrão e traçar as curvas de calibração.
- ✓ Entre cada leitura deve-se passar um algodão na lente e entre as pipetagens das soluções deverá trocar-se de pipeta, por forma a minimizar a contaminação.

Nota: Uma vez que as concentrações de etanol variavam mediante as amostras, foi necessário traçar duas curvas de calibração, por forma a que os valores estivessem incluídos nas curvas de calibração.

Tabela 7.2 - Quantidade de solução mãe adicionada nas soluções padrão.

Curva de Calibração 1		Curva de Calibração 2	
Nº Balão	Quantidade de Solução mãe (ml)	Nº Balão	Quantidade de Solução mãe (ml)
1.1	5	1.2	10
2.1	2.5	2.2	3.5
3.1	1.25	3.2	2.5
4.1	0.625	4.2	0.31



Figura 7.2 - Refratômetro de Abbe ligado à temperatura de funcionamento pretendida.

➤ **Preparação das amostras:**

- ✓ Com o auxílio das pipetas de *Pasteur*, colocar uma gota da amostra de etanol produzido na lente do refratômetro;
- ✓ Entre cada leitura, limpar a lente com algodão e trocar as pipetas, para minimizar contaminações entre as amostras;
- ✓ Ler e registrar o IR das amostras.

Uma vez que o IR foi registado a uma temperatura do banho de 22 °C, através do auxílio de valores tabelados, deverão ser feitas as correções para temperaturas de 20 °C.

Anexo A.3 – Análise por Espectrofotometria de Absorção Atómica

Para que fosse possível quantificar a concentração de contaminantes (metais Cd e Zn) presente na biomassa e de que forma a sua concentração influencia a produção de etanol, foram realizadas leituras através do Espectrómetro de Absorção Atómica. Deste modo, foram realizadas soluções padrão para calibração do aparelho.

Material:

- Espectrómetro de Absorção Atómica (*PG Instruments, PG-990*);
- Solução Padrão de Zinco;
- Solução Padrão de Cádmiu;
- Ácido Nítrico a 5%;
- Gobelés;
- Balões Volumétricos de 50 ml;
- Micropipetas;
- Pipetas de Pasteur.

Procedimento:

➤ **Preparação da solução padrão:**

- ✓ No balão volumétrico de 50 ml adicionar 0,5 ml de solução de Cádmiu ou Zinco e acrescentar o Ácido Nítrico até perfazer a totalidade dos 50 ml do balão. Agitar para homogeneizar;
- ✓ Nos restantes balões de 50 ml, adicionar diferentes quantidades da solução mãe conforme a Tabela 7.3 e perfazer o restante volume com Ácido Nítrico. Agitar até homogeneizar;
- ✓ Encher um Gobelé de 100 ml com Ácido Nítrico e colocar no tubo do Espectrómetro de Absorção Atómica previamente ligado, por forma a encontrar o zero da curva de calibração;
- ✓ Para cada um dos metais pesados a determinar, criar as respetivas curvas de calibração.

Tabela 7.3 - Volume de solução mãe dos respetivos metais a adicionar para preparar as soluções padrão.

Nº do Padrão	Cádmio	Zinco
1	1 ml	2 ml
2	2,5 ml	3ml
3	4 ml	4 ml
4	6 ml	5 ml
5	7,5 ml	6,5 ml
6	9 ml	7,5 ml

Anexo B – Resultados Experimentais

Neste subcapítulo serão expostos os valores experimentais obtidos relativos à quantificação dos açúcares redutores das amostras bem como do teor de álcool presente no licor extraído no processo de destilação, determinado através do método refratométrico.

Anexo B.1 – Método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Conforme mencionado na descrição do processo experimental referente a este método, para uma correta quantificação do teor de açúcares, traçou-se curvas de calibração (Figura 7.3, Figura 7.4 e Figura 7.5) utilizando soluções padrão de glicose (Panreac).

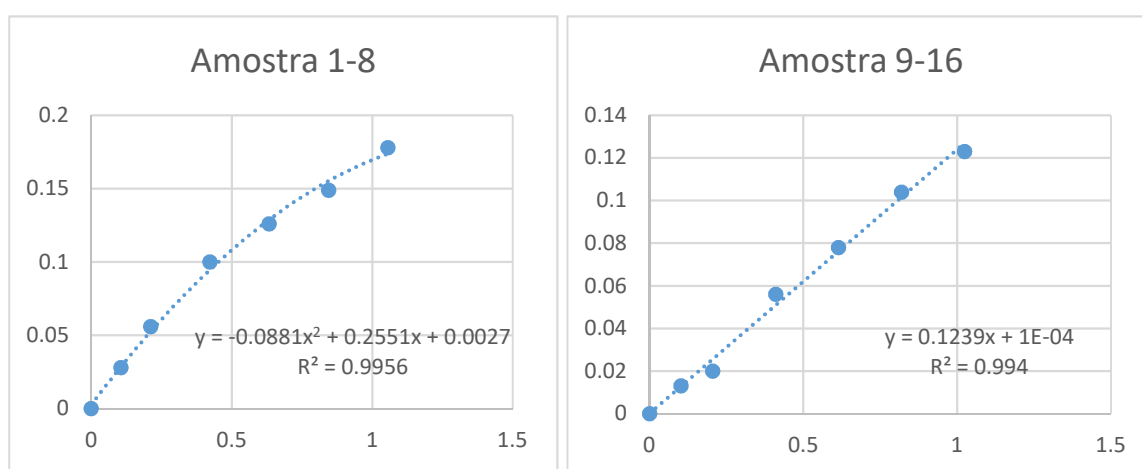


Figura 7.3 - Curvas de calibração obtidas para análise das melhores condições operatórias da biomassa de controle após fermentação.

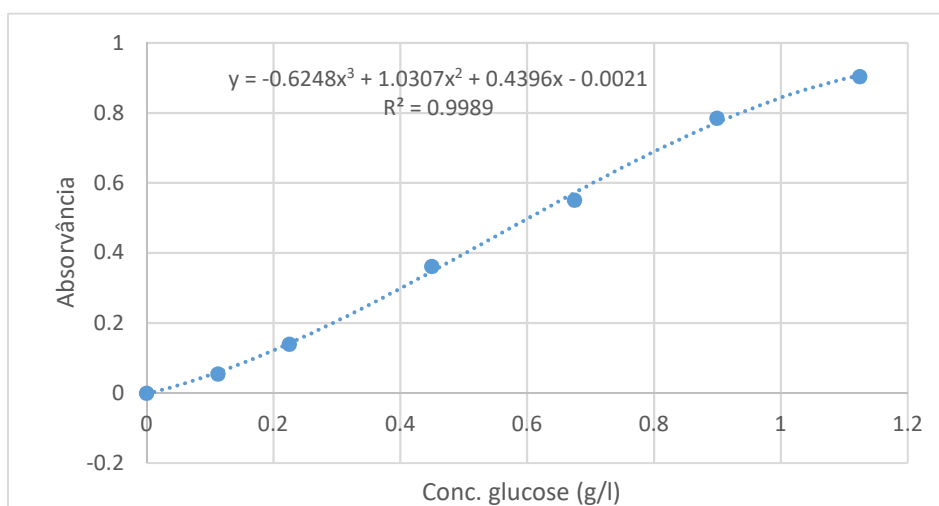


Figura 7.4 - Curva de calibração obtida para as melhores condições operatórias da biomassa ao 6º dia de fermentação.

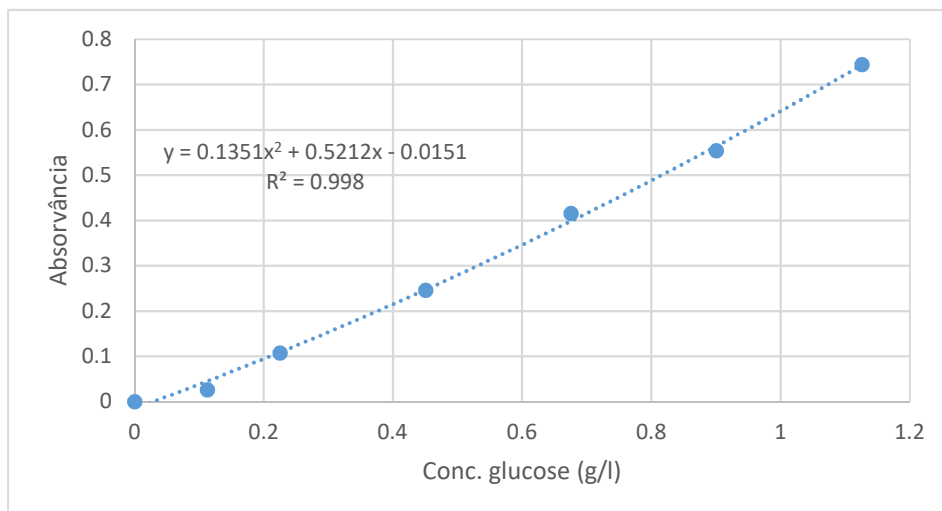


Figura 7.5 - Curva de calibração obtida para as melhores condições operatórias da biomassa após o processo de fermentação.

Para os diferentes tipos de amostras foram necessários traçar diferentes curvas de calibração uma vez que foram utilizados dois modelos de espectrofotômetro e as concentrações de açúcares variavam além de curva já pré-traçadas.

Os resultados obtidos quanto aos valores de açúcares obtidos no processo de determinação das melhores condições operatórias para a palha de milho estão presentes na Tabela 7.4.

Tabela 7.4 - Concentração de açúcares após a fermentação da palha de milho não contaminada no processo de determinação as melhores condições operatórias.

Nº da Amostra	Absorvância	Concentração com base nas curvas de calibração (g/l)	Diluições da Amostra		Concentração final ajustada (g/l)
			D1	D2	
1	0,083	0,359	2,5	2	1,80
2	0,108	0,499	2,5	2	2,49
3	0,175	1,073	2,5	2	5,37
4	0,176	1,089	2,5	2	5,44
5	0,116	0,548	2,5	2	2,74
6	0,123	0,593	2,5	2	2,97
7	0,071	0,299	2,5	2	1,49
8	0,067	0,279	2,5	2	1,39
9	0,11	0,887	4	1	3,55
10	0,09	0,726	4	1	2,90
11	0,112	0,903	4	1	3,61
12	0,115	0,927	4	1	3,71
13	0,094	0,758	4	1	3,03
14	0,099	0,798	4	1	3,19
15	0,081	0,653	4	1	2,61
16	0,097	0,782	4	1	3,13

Na Tabela 7.5, Tabela 7.6 e Tabela 7.7 são apresentados os resultados obtidos, para as melhores condições operatórias, da quantidade de açúcar obtida a partir da palha de milho de solo contaminado ao longo do processo de produção de etanol.

Tabela 7.5 - Concentração de açúcares após a hidrólise enzimática da palha de milho contaminada/controlo nas melhores condições operatórias.

Nº da Amostra	Absorvância	Concentração com base na curva de calibração (g/l)	Diluições da Amostra		Concentração final ajustada (g/l)
			D1	D2	
1.2	0,184	0,275	20	1	5,51
2.2	0,183	0,274	20	1	5,48
3.2	0,229	0,326	20	1	6,52
4.2	0,22	0,316	20	1	6,32
5.2	0,11	0,184	20	1	3,69
6.2	0,148	0,233	20	1	4,65
7.2	0,252	0,351	20	1	7,02
8.2	0,26	0,359	20	1	7,19
A.2	0,135	0,216445	20	1	4,33
B.2	0,249	0,347601	20	1	6,95

Tabela 7.6 - Concentração de açúcares 6 dias após o início da fermentação da palha de milho contaminada/controlo nas melhores condições operatórias.

Nº da Amostra	Absorvância	Concentração com base na curva de calibração (g/l)	Diluições da Amostra		Concentração final ajustada (g/l)
			D1	D2	
1.3	0,152	0,298	10	1	2,98
2.3	0,092	0,196	10	1	1,96
3.3	0,272	0,488	10	1	4,88
4.3	0,341	0,592	10	1	5,92
5.3	0,086	0,185	1	5	0,93
6.3	0,089	0,190	1	5	0,95
7.3	0,281	0,502	10	1	5,02
8.3	0,318	0,557	10	1	5,57
A.3	0,358	0,617	10	1	6,17
B.3	0,293	0,520	10	1	5,20

Tabela 7.7 - Concentração após o processo de fermentação da palha de milho contaminada/controlo nas melhores condições operatórias.

Nº da Amostra	Absorvância	Concentração com base na curva de calibração (g/l)	Diluições da Amostra		Concentração final ajustada (g/l)
			D1	D2	
1.3	0,152	0,298	10	1	2,98
2.3	0,092	0,196	10	1	1,96
3.3	0,272	0,488	10	1	4,88
4.3	0,341	0,592	10	1	5,92
5.3	0,086	0,185	1	5	0,93
6.3	0,089	0,190	1	5	0,95
7.3	0,281	0,502	10	1	5,02
8.3	0,318	0,557	10	1	5,57
A.3	0,358	0,617	10	1	6,17
B.3	0,293	0,520	10	1	5,20

Anexo B.2 – Método Refratométrico

Para a quantificação do etanol obtido no licor extraído no processo de destilação, procedeu-se à calibração do refratómetro através do traçar de uma curva, utilizando as soluções padrão de glicose.

A Figura 7.6 e Figura 7.7 apresentam as curvas de calibração obtidas nos diferentes estágios de produção do etanol.

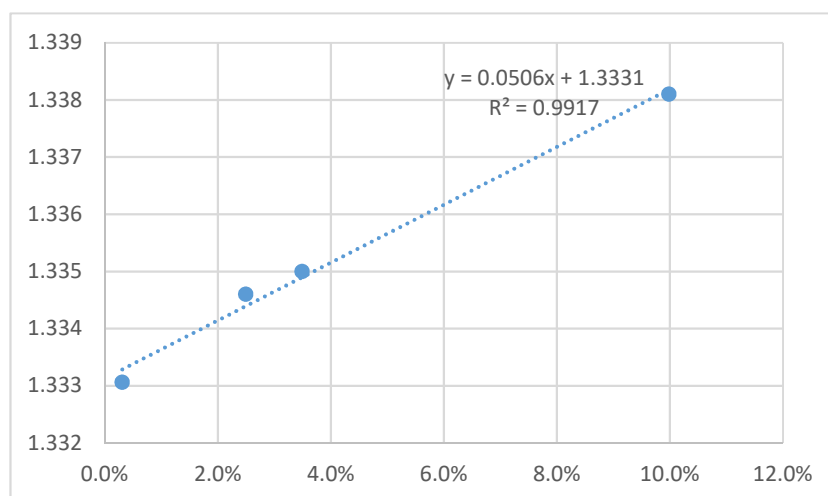


Figura 7.6 - Curva de calibração para o etanol não contaminado.

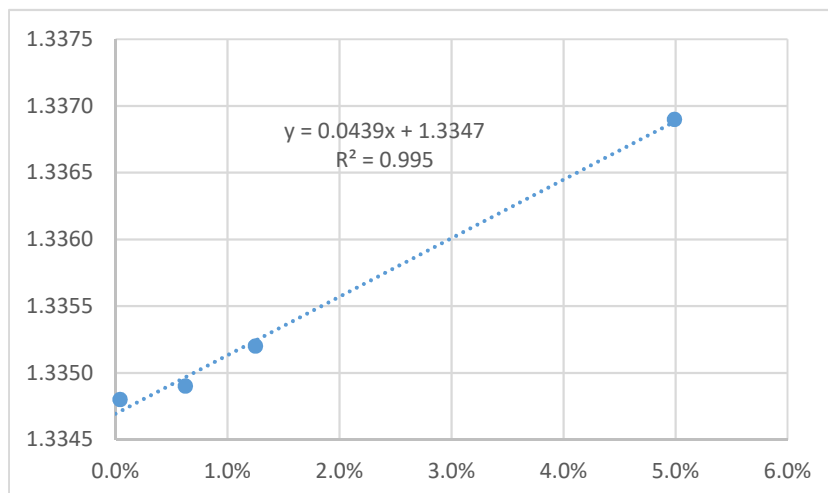


Figura 7.7 - Curva de calibração para o etanol contaminado e de controlo.

Tabela 7.8 e a Tabela 7.9 apresentam os valores obtidos na leitura do refratómetro e o valor final de etanol obtido após os cálculos apresentados na secção X dos anexos.

Tabela 7.8 - Valores de etanol presente no licor obtido da biomassa não contaminada no processo de análise das melhores condições operatórias através da leitura no refratómetro.

Enzima	Nº da Amostra	Ácido do pré-tratamento	Índice de Refração (IR)	Etanol Recuperado na Destilação (%v/v)	Volume médio de etanol recuperado (ml)
<i>Accelerase</i>	1	Sulfúrico	1,3349	0,46%	1,39
	2		1,3349	0,46%	
	3	Clorídrico	1,3350	0,68%	1,16
	4		1,3351	0,80%	
	5	Nítrico	1,3350	0,68%	1,56
	6		1,3350	0,68%	
	7	Acético	1,3351	0,91%	0,84
	8		1,3351	0,91%	
<i>Ultraflo</i>	9	Sulfúrico	1,3349	0,46%	0,53
	10		1,3348	0,23%	
	11	Clorídrico	1,3350	0,68%	0,85
	12		1,3349	0,46%	
	13	Nítrico	1,3348	0,23%	0,54
	14		1,3350	0,68%	
	15	Acético	1,3350	0,68%	0,43
	16		1,3351	0,91%	

Na Tabela 7.9 é possível observar os resultados obtidos no refratómetro para as melhores condições operatórias do solo contaminado.

Tabela 7.9 - Valores de etanol presente no licor obtido da biomassa contaminada para as melhores condições operatórias através da leitura no refratômetro.

Solo	Enzima	Nº da Amostra	Ácido do pré-tratamento	Índice de Refração (IR)	Etanol Recuperado na Destilação (%v/v)	Volume médio de etanol recuperado (ml)
Estarreja	Accelerase	1	Clorídrico	1,3346	2,96%	8,05
		2		1,334	1,78%	
	Ultraflo	3	Nítrico	1,3340	1,78%	5,13
		4		1,3340	1,78%	
Panasqueira	Accelerase	5	Clorídrico	1,3341	1,98%	6,22
		6		1,3340	1,78%	
	Ultraflo	7	Nítrico	1,3339	1,58%	4,25
		8		1,334	1,78%	
Controlo	Accelerase	A	Clorídrico	1,3341	1,98%	8,90
	Ultraflo	B	Nítrico	1,3341	1,98%	7,34

No processo de aplicação das melhores condições operatórias na biomassa de solo contaminado, foi repetido o processo dessas mesmas condições para a biomassa de solo não contaminado. Isto permitiu-nos a comparação das diferentes situações para as mesmas condições experimentais (tempo, temperatura, humidade, etc.).

Anexo B.3 – Espectrofotometria de Absorção Atômica

No presente subcapítulo são apresentadas as curvas de calibração obtidas das leituras das soluções padrão realizadas no subcapítulo Anexo A.3 (Figura 7.8 e Figura 7.9).

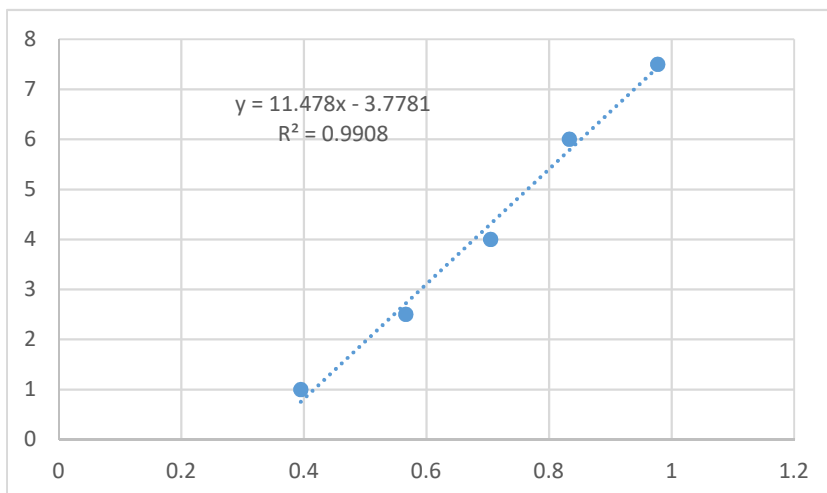


Figura 7.8 - Curva de calibração para o Cádmiio.

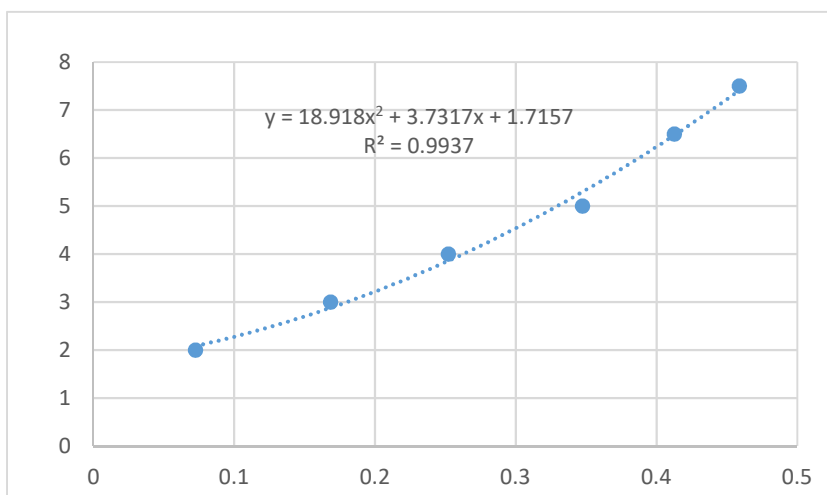


Figura 7.9 - Curva de calibração para o Zinco

Anexo C – Exposição dos cálculos

O presente capítulo serve para expor os cálculos realizados para a quantificação de açúcares e de etanol obtido no processo de destilação.

Anexo C.1 – Quantificação dos Açúcares pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Os exemplos de cálculos que se apresentam a seguir têm como base o ensaio realizado para a biomassa de controlo (descontaminada) na qual utilizou o H₂SO₄ no pré-tratamento e enzima *Accelerase* na Hidrólise Enzimática (Tabela 7.4– Amostra nº 1).

Pela Figura 7.3, retira-se que a curva de calibração para leituras de $\lambda=500$ nm é:

$$Absorbância = -0,0881C_{glucose}^2 + 0,2551C_{glucose} + 0,0027$$

Deste modo, obtém-se a expressão da concentração de glicose considerando a diluição da amostra (Dn):

$$C_{glucose} = \left[\left(0,2551 - \sqrt{-0,3524 * Absorbância + 0,066} \right) / 0,1762 \right] * Dn$$

Para a amostra nº 1 foram necessárias duas diluições D1 e D2. Assim, a concentração de glicose após as diluições é dada por:

$$C_{glucose} = \left[\left(0,2551 - \sqrt{-0,3524 * 0,083 + 0,066} \right) / 0,1762 \right] * D1 * D2$$

$$\Leftrightarrow C_{glucose} = \left[\left(0,2551 - \sqrt{-0,3524 * 0,083 + 0,066} \right) / 0,1762 \right] * 2,5 * 2$$

$$\Leftrightarrow C_{glucose} = 1,79895g/L$$

Anexo C.2 - Quantificação da Concentração do Etanol pelo método Refratométrico

Os cálculos apresentados têm como base a amostra nº1 referente à Tabela 7.8, a qual utiliza o H₂SO₄ e *Accelerase*, conforme no pronto anterior.

Para a quantificação do álcool teve-se em consideração a curva de calibração obtida na Figura 7.6 para leituras realizadas a $\lambda=500$ nm:

$$IR = 0,0439Q_{etanol} + 1,3347$$

Da equação anterior, tira-se a percentagem de etanol obtido no líquido extraído no processo de destilação:

$$Q_{álcool} = (IR - 1,3347)/0,0439$$

Portanto, para a amostra nº 1:

$$Q_{etanol} = (1,3349 - 1,3347)/0,0881$$

$$\Leftrightarrow Q_{etanol} = 0,004556 * 100\%$$

$$\Leftrightarrow Q_{etanol} = 0,456\% \text{ v/v}$$

Posteriormente, foi calculado o volume de etanol obtido na destilação. Para tal, foi necessário fazer a correção do valor para os 20 °C com base na Tabela 7.10.

Tabela 7.10 - Valores da massa específica do Etanol a 20 °C.[45]

Concentração de etanol (% v/v)	Massa específica a 20 °C (ρ)
0,0000	0,99823
0,23%	0,99780
0,45%	0,99739
0,68%	0,99696
0,79%	0,99675
0,91%	0,99653
1%	0,99636

Portanto, para a amostra nº 1, o volume de etanol obtido foi calculado pelas seguintes expressões:

$$V_{liq.recup_n} = m_{liq.recup_n}/Q_{etanol@20^{\circ}C_n} \quad (1)$$

$$V_{etanol_n} = V_{liq.recup_n} * Q_{etanol} \quad (2)$$

Para a equação (1) e para a massa de líquido recuperado expresso na Tabela 7.10 e do valor corrigido da concentração presente na Tabela 7.8, para amostra nº1:

$$V_{liq.recup_1} = 214,8/0,99739$$

$$\Leftrightarrow V_{liq.recup_1} = 215,36 \text{ ml}$$

Substituindo na equação (2):

$$V_{etanol_{-1}} = 215,36 * 0,00456$$

$$\Leftrightarrow V_{etanol_{-1}} = 0,982 \text{ ml}$$

Para se obter a massa de etanol recuperado, recorre-se à seguinte expressão:

$$m_{etanol_{-1}} = V_{etanol_{-1}} / \rho_{álcool}$$

$$\Leftrightarrow m_{etanol_{-1}} = 0,982 / 0,789$$

$$\Leftrightarrow m_{etanol_{-1}} = 1,243 \text{ g}$$

Anexo D – Caracterização da palha de milho

O presente capítulo serve para apresentar os dados da caracterização da palha de milho obtidos pela investigadora Doutora Ana G. Marques, no ano de 2016 (Tabela 7.11 e Tabela 7.12).

Tabela 7.11 - Caracterização da palha de milho de controlo e para o solo de Estarreja.

Planta	Solo	Tecido	Replica	m _{cadinho} (g)	m _{seco} (g)	m _{mufia} (g)	%SV	Média	Desvio Padrão
Milho	Controlo	Caule	1	62,3223	65,4672	62,5637	7,66	7,65	0,04
			2	82,603	86,0193	82,8655	7,68		
			3	96,183	98,9082	96,3914	7,65		
			4	87,838	91,0538	88,0823	7,60		
	Estarreja		1	23,5009	25,7733	23,7337	9,80	10,13	0,26
			2	35,5906	37,806	35,8218	10,44		
			3	37,572	39,8143	37,7999	10,16		
			4	17,5227	19,63036	17,736	10,12		

Tabela 7.12 - Concentração de contaminantes para a palha de milho caracterizada.

	Solo de Controlo	Solo Industrial
Tratamento	Estames	
Cádmio (mg/kg seco)	0,6 (SD 0,2)	5 (SD 0,5)
Zinco (mg/kg seco)	61 (SD 8)	421 (SD 12)

Anexo E – Informações Técnicas

No presente capítulo são apresentadas as fichas de segurança dos reagentes mais utilizados nos procedimentos experimentais realizados.

Anexo E.1 – Ficha de Segurança do Ácido Sulfúrico

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA

de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006

Versão 4.0 Data de revisão 14.03.2010

Data de impressão 19.01.2011

ENERIC EU MSDS - NO COUNTRY SPECIFIC DATA - NO OEL DATA

1. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA/MISTURA E DA SOCIEDADE/EMPRESA

Nome do produto	: Sulfuric acid
Referência do Produto	: 339741
Marca	: Aldrich
Companhia	: Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Av. das Nações Unidas, 23.043 04795-100 SÃO PAULO - SP BRAZIL
Telefone	: +551137323100
Número de Fax	: +551155229895
Número de Telefone de Emergência	:

2. IDENTIFICAÇÃO DOS PERIGOS

Classificação da substância ou da mistura

Nos termos do Regulamento (CE) No 1272/2008
Corrosão cutânea (Categoria 1A)

De acordo com a directiva Europeia 67/548/CEE, e emendas.
Provoca queimaduras graves.

Elementos da etiqueta

Pictograma



Palavra-sinal

Perigo

Declaração de perigo
H314

Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.

declaração de precaução
P280

Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.
Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P305 + P351 + P338

P310

símbolo de perigosidade
C

Corrosivo

Frase(s) - R
R35

Provoca queimaduras graves.

Frase(s) - S
S26

Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista.

S30

Nunca adicionar água a este produto.

S45

Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o

médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

Outros Perigos - nenhum(a)

3. COMPOSIÇÃO/INFORMAÇÃO SOBRE OS COMPONENTES

Formula : H_2O_4S
Peso molecular : 98,08 g/mol

No. CAS	No. CE	No. de Index	Classificação	Concentração
Sulfuric acid				
7664-93-9	231-639-5	016-020-00-8	Skin Corr. 1A; H314 C, R35	-

Para o pleno texto das DECLARAÇÕES H mencionadas nesta Secção, ver a Secção 16.

4. PRIMEIROS SOCORROS

Recomendação geral

Consultar um médico. Mostrar esta ficha de segurança ao médico de serviço.

Se for inalado

Se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não respirar, aplicar a respiração artificial. Consultar um médico.

No caso dum contacto com a pele

Despir imediatamente a roupa e os sapatos contaminados. Lavar com sabão e muita água. Consultar um médico.

No caso dum contacto com os olhos

Lavar cuidadosamente com muita água, durante pelo menos quinze minutos, e consultar o médico.

Se for engolido

NÃO provocar vômitos. Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

5. MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIO

Meios adequados de extinção

Utilizar água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.

Equipamento especial de protecção a utilizar pelo pessoal de combate a incêndio

Usar equipamento de respiração autónomo para combate a incêndios, se necessário.

6. MEDIDAS A TOMAR EM CASO DE FUGAS ACIDENTAIS

Precauções individuais

Usar equipamento de protecção individual. Evitar a respiração do vapor/névoa/gas. Assegurar ventilação adequada. Evacuar o pessoal para áreas de segurança.

Precauções ambientais

Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos.

Métodos e materiais para a contenção e a limpeza

Embeber em material inerte e absorvente e tratar como desperdício especial. Manter em recipientes fechados adequados, para eliminação.

7. MANUSEAMENTO E ARMAZENAGEM

Precauções para um manuseamento seguro

Evitar a inalação do vapor ou da névoa.

Medidas usuais de protecção preventiva contra incêndio.

Condições para uma armazenagem segura

Armazenar em local fresco. Guardar o recipiente herméticamente fechado em lugar seco e bem ventilado. Os contentores abertos devem ser cuidadosamente fechados de novo e têm que ficar direitos para evitar a dispersão.

8. CONTROLO DA EXPOSIÇÃO/PROTECÇÃO PESSOAL**Protecção individual****Protecção respiratória**

Nos casos em que a avaliação de risco mostrar que os respiradores purificadores do ar são apropriados, use um respirador de cobertura facial total com cartuchos de combinação multi-objectivos (E.U.A.) ou do tipo ABEK (EN 14387) como apoio a controlos de engenharia. Se o respirador for o único meio de protecção, usa um respirador de ar de cobertura facial total. Use respiradores e componentes testados e aprovados por normas governamentais apropriadas, tais como as NIOSH (E.U.A.) ou CEN (UE).

Protecção das mãos

As luvas de protecção seleccionadas devem satisfazer as especificações da Directiva da UE 89/689/CEE e a norma EN 374 derivada dela.

Manusear com luvas.

Protecção dos olhos

Óculos de segurança bem ajustados. Protecção da face (mínimo de 8 polegadas (20 cm)).

Protecção do corpo e da pele

Escolher uma protecção para o corpo conforme a quantidade e a concentração das substâncias perigosas no lugar de trabalho.

Medidas de higiene

Manusear de acordo com as boas práticas industriais de higiene e segurança. Lavar as mãos antes de interrupções, e no final do dia de trabalho.

9. PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS**Aspecto**

Estado físico líquido

Dados de segurança

pH	1,2 a 5 g/l
Ponto de fusão	3 °C
Ponto de ebulição	290 °C - lit.
Ponto de inflamação	não aplicável
Temperatura de ignição	dados não disponíveis
Limites de explosão, inferior	dados não disponíveis
Limite de explosão, superior	dados não disponíveis
Pressão de vapor	1,33 hPa a 145,8 °C
Densidade	1,84 g/cm ³ a 25 °C
Hidrossolubilidade	solúvel
Densidade relativa do vapor	3,39 - (Ar = 1.0)

10. ESTABILIDADE E REACTIVIDADE

Estabilidade química

Estável sob as condições recomendadas de armazenamento.

Possibilidade de reacções perigosas

Reage violentamente em contacto com a água.

Condições a evitar

dados não disponíveis

Matérias a evitar

Bases, Haletos, Materiais orgânicos, Carbetos, fulmina, Nitratos, picratos, Cianetos, Cloratos, Halogenetos alcalinos, Sais de zinco, permanganatos, por exemplo, permanganato de potássio, Peróxido de hidrogénio, Azidas, Percloratos, Nitrometano, fosforoso, Reage violentamente com: ciclopentanoma, Oxima de ciclopentanoma, aminas nitrílicas, dissiliceto de hexalíto, óxido fosforoso (III), Metais em pó

Produtos de decomposição perigosos

Produtos perigosos de decomposição formados durante os incêndios. - Óxidos de enxofre

11. INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA**Toxicidade aguda**

DL50 Oral - ratazana - 2.140 mg/kg

CL50 Inalação - ratazana - 2 h - 510 mg/m³

Corrosão/irritação cutânea

Pele - coelho - Extremamente corrosivo e destrutivo para os tecidos.

Lesões oculares graves/irritação ocular

Olhos - coelho - Grave irritação dos olhos

Sensibilização respiratória ou da pele

dados não disponíveis

Mutagenicidade em células germinativas**Carcinogenicidade**

A International Agency for Research on Cancer (IARC) determinou que a exposição ocupacional a névoas de ácidos inorgânicos fortes contendo ácido sulfúrico é carcinogénica para os seres humanos (grupo 1).

IARC: Nenhum componente deste produto presente a níveis maiores ou iguais a 0.1% é identificado como carcinogénio provável, possível ou confirmado pelo IARC.

Toxicidade reprodutiva**Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição única**

dados não disponíveis

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição repetida

dados não disponíveis

Perigo de aspiração

dados não disponíveis

Efeitos potenciais para a saúde

Inalação	Pode ser perigoso se for inalado. O material é extremamente destrutivo para os tecidos das membranas mucosas e do trato respiratório superior.
Ingestão	Pode ser perigoso se for engolido. Provoca queimaduras graves.
Pele	Pode ser perigoso se for absorvido pela pele. Causa queimaduras severas na pele.
Olhos	Causa queimaduras severas nos olhos.

Sinais e sintomas de exposição

O material é extremamente destrutivo para os tecidos das membranas mucosas e para o trato respiratório superior, os olhos e a pele., espasmo, inflamação e edema da laringe, espasmo, inflamação e edema dos brônquios, pneumonite, edema pulmonar, sensação de queimadura, Tosse, respiração ruidosa, laringite, Respiração superficial, Dor de cabeça, Náusea, Vômitos, Edema pulmonar. Os efeitos podem ser tardios., Até onde sabemos, as propriedades químicas, físicas e toxicológicas não foram minuciosamente investigadas.

Informação adicional
RTECS: WS5600000

12. INFORMAÇÃO ECOLÓGICA

Toxicidade

Toxicidade em peixes CL50 - *Gambusia affinis* (peixe-mosquito) - 42 mg/l - 96 h

Persistência e degradabilidade
dados não disponíveis

Potencial de bioacumulação
dados não disponíveis

Mobilidade no solo
dados não disponíveis

Avaliação PBT e mPmB
dados não disponíveis

Outros efeitos adversos
dados não disponíveis

13. CONSIDERAÇÕES RELATIVAS À ELIMINAÇÃO

Produto

Observar todos os regulamentos ambientais federais, estaduais e locais. Entrar em contato com um serviço profissional credenciado de descarte de lixo para descartar esse material. Dissolver ou misturar o material com um solvente combustível e queimar em incinerador químico equipado com pós-combustor e purificador de gases.

Embalagens contaminadas

Eliminar como produto Não utilizado.

14. INFORMAÇÕES RELATIVAS AO TRANSPORTE

ADR/RID

Número ONU: 1830 Classe: 8 Grupo de embalagem: II
Denominação de expedição correcta: ÁCIDO SULFÚRICO

IMDG

Número ONU: 1830 Classe: 8 Grupo de embalagem: II EMS-No:
F-A, S-B
Denominação de expedição correcta: SULPHURIC ACID
Poluente marinho: No

IATA

Número ONU: 1830 Classe: 8 Grupo de embalagem: II
Denominação de expedição correcta: Sulphuric acid

15. INFORMAÇÃO SOBRE REGULAMENTAÇÃO

Esta folha de dados de segurança obedece aos requerimentos da Regulamento (CE) No. 1907/2006

16. OUTRAS INFORMAÇÕES

Texto dos código(s) H e frase(s) R mencionados na secção 3

H314 Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.

Aldrich - 339741

Página 5 de 6

Skin Corr.	Corrosão cutânea
C	Corrosivo
R35	Provoca queimaduras graves.

Outras informações

Direitos exclusivos, 2010, da Sigma-Aldrich. Permissão concedida para fazer número ilimitado de cópias em papel, somente para uso interno.

Acredita-se que as informações acima estejam corretas, embora não pretendam ser totalmente abrangentes, devendo ser usadas apenas como um guia. A Sigma-Aldrich não deverá ter responsabilidade legal por quaisquer danos resultantes do manuseio ou do contato com o produto acima. Consultar o verso da fatura ou nota que acompanha o produto para tomar conhecimento dos termos adicionais e condições de venda.

Anexo E.2 – Ficha de Segurança do Ácido Clorídrico

SIGMA-ALDRICHsigma-aldrich.com**FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA**de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006
Versão 4.0 Data de revisão 01.04.2010
Data de impressão 19.01.2011

ENERIC EU MSDS - NO COUNTRY SPECIFIC DATA - NO OEL DATA

1. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA/MISTURA E DA SOCIEDADE/EMPRESA

Nome do produto : Ácido clorídrico

Referência do Produto : 320331
Marca : Sigma-Aldrich

Companhia : Sigma-Aldrich Brasil Ltda.
Av. das Nações Unidas, 23.043
04795-100 SÃO PAULO - SP
BRAZIL

Telefone : +551137323100
Número de Fax : +551155229895
Número de Telefone de Emergência :

2. IDENTIFICAÇÃO DOS PERIGOS**Classificação da substância ou da mistura**

Nos termos do Regulamento (CE) No1272/2008
Corrosão cutânea (Categoria 1B)
Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição única (Categoria 3)

De acordo com a directiva Europeia 67/548/CEE, e emendas.
Provoca queimaduras. Irritante para as vias respiratórias.

Elementos da etiqueta

Pictograma



Palavra-sinal

Perigo

Declaração de perigo

H314
H335

Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.
Pode provocar irritação das vias respiratórias.

declaração de precaução

P261
P280

Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

P305 + P351 + P338

SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar.
Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

P310

símbolo de perigosidade

C

Corrosivo

Frase(s) - R

R34
R37

Provoca queimaduras.
Irritante para as vias respiratórias.

Frase(s) - S

S26

Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com

Sigma-Aldrich - 320331

Página 1 de 6

S45
 água e consultar um especialista.
 Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

Outros Perigos - nenhum(a)

3. COMPOSIÇÃO/INFORMAÇÃO SOBRE OS COMPONENTES

Formula : HCl

No. CAS	No. CE	No. de Index	Classificação	Concentração
Hydrochloric acid				
7647-01-0	231-595-7	017-002-01-X	Skin Corr. 1B; STOT SE 3; H314, H335 C, R34 - R37	37 %
Water				
7732-18-5	231-791-2	-	-	63 %

Para o pleno texto das DECLARAÇÕES H mencionadas nesta Secção, ver a Secção 16.

4. PRIMEIROS SOCORROS

Recomendação geral

Consultar um médico. Mostrar esta ficha de segurança ao médico de serviço.

Se for inalado

Se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não respirar, aplicar a respiração artificial. Consultar um médico.

No caso dum contacto com a pele

Despir imediatamente a roupa e os sapatos contaminados. Lavar com sabão e muita água. Consultar um médico.

No caso dum contacto com os olhos

Lavar cuidadosamente com muita água, durante pelo menos quinze minutos, e consultar o médico.

Se for engolido

NÃO provocar vômitos. Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

5. MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIO

Meios adequados de extinção

Usar meios de extinção que sejam apropriados às circunstâncias locais e ao ambiente envolvente.

Equipamento especial de protecção a utilizar pelo pessoal de combate a incêndio

Usar equipamento de respiração autónomo para combate a incêndios, se necessário.

Outras informações

O produto não queima.

6. MEDIDAS A TOMAR EM CASO DE FUGAS ACIDENTAIS

Precauções individuais

Usar equipamento de protecção individual. Evitar a respiração do vapor/névoa/gas. Assegurar ventilação adequada. Evacuar o pessoal para áreas de segurança.

Precauções ambientais

Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos.

Métodos e materiais para a contenção e a limpeza

Embeber em material inerte e absorvente e tratar como desperdício especial. Manter em recipientes fechados adequados, para eliminação. Embeber em material inerte e absorvente e tratar como desperdício especial. Manter em recipientes fechados adequados, para eliminação.

7. MANUSEAMENTO E ARMAZENAGEM

Precauções para um manuseamento seguro

Evitar a inalação do vapor ou da névoa.

Condições para uma armazenagem segura

Armazenar em local fresco. Guardar o recipiente herméticamente fechado em lugar seco e bem ventilado. Os contentores abertos devem ser cuidadosamente fechados de novo e têm que ficar direitos para evitar a dispersão.

8. CONTROLO DA EXPOSIÇÃO/PROTECÇÃO PESSOAL

Protecção individual

Protecção respiratória

Nos casos em que a avaliação de risco mostrar que os respiradores purificadores do ar são apropriados, use um respirador de cobertura facial total com cartuchos de combinação multi-objectivos (E.U.A.) ou do tipo ABEK (EN 14387) como apoio a controlos de engenharia. Se o respirador for o único meio de protecção, usa um respirador de ar de cobertura facial total. Use respiradores e componentes testados e aprovados por normas governamentais apropriadas, tais como as NIOSH (E.U.A.) ou CEN (UE).

Protecção das mãos

As luvas de protecção seleccionadas devem satisfazer as especificações da Directiva da UE 89/689/CEE e a norma EN 374 derivada dela.

Manusear com luvas.

Protecção dos olhos

Óculos de segurança bem ajustados. Protecção da face (mínimo de 8 polegadas (20 cm)).

Protecção do corpo e da pele

Escolher uma protecção para o corpo conforme a quantidade e a concentração das substâncias perigosas no lugar de trabalho.

Medidas de higiene

Manusear de acordo com as boas práticas industriais de higiene e segurança. Lavar as mãos antes de interrupções, e no final do dia de trabalho.

9. PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

Aspecto

Estado físico	líquido
Cor	amarelo claro
Odor	acre

Dados de segurança

pH	dados não disponíveis
Ponto de fusão	-30 °C
Ponto de ebulição	> 100 °C
Ponto de inflamação	não aplicável
Temperatura de ignição	dados não disponíveis
Limites de explosão, inferior	dados não disponíveis
Limite de explosão, superior	dados não disponíveis
Pressão de vapor	226,636 hPa a 21,1 °C 546,596 hPa a 37,7 °C

Hidrossolubilidade	solúvel
Viscosidade, dinâmico	2,3 mPa.s a 15 °C

10. ESTABILIDADE E REACTIVIDADE

Estabilidade química

Estável sob as condições recomendadas de armazenamento.

Condições a evitar

dados não disponíveis

Matérias a evitar

Bases, Aminas, Metais alcalinos, Metais, permanganatos, por exemplo, permanganato de potássio, Flúor, acetilídios metálicos, dissiliceto de hexalítio

Produtos de decomposição perigosos

Produtos perigosos de decomposição formados durante os incêndios. - Cloreto de hidrogénio gasoso
Produtos perigosos de decomposição formados durante os incêndios. - Cloreto de hidrogénio gasoso

11. INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA

Toxicidade aguda

DL50 Oral - coelho - 900 mg/kg (Hydrochloric acid)

CL50 Inalação - ratazana - 1 h - 3124 ppm(Hydrochloric acid)

Corrosão/irritação cutânea

dados não disponíveis (Hydrochloric acid)

Lesões oculares graves/irritação ocular

dados não disponíveis (Hydrochloric acid)

Sensibilização respiratória ou da pele

dados não disponíveis (Hydrochloric acid)

Mutagenicidade em células germinativas

(Hydrochloric acid)

dados não disponíveis (Hydrochloric acid)

Carcinogenicidade

Este produto é ou contém um componente que não é classificável quanto à sua carcinogenicidade segundo sua classificação pela IARC, ACGIH, NTP ou EPA. (Hydrochloric acid)

(Hydrochloric acid)

IARC: Nenhum componente deste produto presente a níveis maiores ou iguais a 0.1% é identificado como carcinogénio provável, possível ou confirmado pelo IARC.

Toxicidade reprodutiva

(Hydrochloric acid)

dados não disponíveis (Hydrochloric acid)

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição única

Pode provocar irritação das vias respiratórias. (Hydrochloric acid)

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição repetida

dados não disponíveis

Perigo de aspiração

dados não disponíveis (Hydrochloric acid)

Efeitos potenciais para a saúde

Inalação

Pode ser perigoso se for inalado. O material é extremamente destrutivo para os tecidos das membranas mucosas e do trato respiratório superior.

Ingestão	Pode ser perigoso se for engolido. Provoca queimaduras.
Pele	Pode ser perigoso se for absorvido pela pele. Causa queimaduras na pele.
Olhos	Causa queimaduras nos olhos.

Sinais e sintomas de exposição

sensação de queimadura, Tosse, respiração ruidosa, laringite, Respiração superficial, espasmo, inflamação e edema da laringe, espasmo, inflamação e edema dos brônquios, pneumonite, edema pulmonar, O material é extremamente destrutivo para os tecidos das membranas mucosas e para o trato respiratório superior, os olhos e a pele. (Hydrochloric acid)

Informação adicional

RTECS: MW4025000

12. INFORMAÇÃO ECOLÓGICA**Toxicidade**

Toxicidade em peixes CL50 - Gambusia affinis (peixe-mosquito) - 282 mg/l - 96 h (Hydrochloric acid)

Persistência e degradabilidade

dados não disponíveis

Potencial de bioacumulação

dados não disponíveis

Mobilidade no solo

dados não disponíveis (Hydrochloric acid)

Avaliação PBT e mPmB

dados não disponíveis

Outros efeitos adversos

dados não disponíveis

13. CONSIDERAÇÕES RELATIVAS À ELIMINAÇÃO**Produto**

Observar todos os regulamentos ambientais federais, estaduais e locais. Entrar em contato com um serviço profissional credenciado de descarte de lixo para descartar esse material.

Embalagens contaminadas

Eliminar como produto Não utilizado.

14. INFORMAÇÕES RELATIVAS AO TRANSPORTE**ADR/RID**

Número ONU: 1789 Classe: 8 Grupo de embalagem: II
Denominação de expedição correcta: ÁCIDO CLORÍDRICO

IMDG

Número ONU: 1789 Classe: 8 Grupo de embalagem: II EMS-No: F-A, S-B
Denominação de expedição correcta: HYDROCHLORIC ACID
Poluente marinho: No

IATA

Número ONU: 1789 Classe: 8 Grupo de embalagem: II
Denominação de expedição correcta: Hydrochloric acid

15. INFORMAÇÃO SOBRE REGULAMENTAÇÃO

Esta folha de dados de segurança obedece aos requerimentos da Regulamento (CE) No. 1907/2006

16. OUTRAS INFORMAÇÕES

Texto dos código(s) H e frase(s) R mencionados na secção 3

Sigma-Aldrich - 320331

Página 5 de 6

H314	Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.
H335	Pode provocar irritação das vias respiratórias.
Skin Corr.	Corrosão cutânea
STOT SE	Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição única
C	Corrosivo
R34	Provoca queimaduras.
R37	Irritante para as vias respiratórias.

Outras informações

Direitos exclusivos, 2010, da Sigma-Aldrich. Permissão concedida para fazer número ilimitado de cópias em papel, somente para uso interno.

Acredita-se que as informações acima estejam corretas, embora não pretendam ser totalmente abrangentes, devendo ser usadas apenas como um guia. A Sigma-Aldrich não deverá ter responsabilidade legal por quaisquer danos resultantes do manuseio ou do contato com o produto acima. Consultar o verso da fatura ou nota que acompanha o produto para tomar conhecimento dos termos adicionais e condições de venda.

Anexo E.3 – Ficha de Segurança do Ácido Acético

SIGMA-ALDRICH				
FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA				
de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006 Versão 3.3 Data de revisão 14.07.2009 Data de impressão 09.06.2010 ENERIC EU MSDS - NO COUNTRY SPECIFIC DATA - NO OEL DATA				
1. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA/PREPARAÇÃO E DA SOCIEDADE/EMPRESA				
Nome do produto	:	ÁCIDO ACÉTICO 99.7+%, A.C.S.		
Referência do Produto	:	242853		
Marca	:	Sigma-Aldrich		
Companhia	:	Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Av. das Nações Unidas, 23.043 04795-100 SÃO PAULO - SP BRAZIL		
Telefone	:	+551137323100		
Número de Fax	:	+551155229895		
Número de Telefone de Emergência	:			
2. IDENTIFICAÇÃO DOS PERIGOS				
Precauções para o homem e para o ambiente Inflamável. Provoca queimaduras graves.				
3. COMPOSIÇÃO/INFORMAÇÃO SOBRE OS COMPONENTES				
Sinónimos	:	Glacial acetic acid		
Formula	:	C ₂ H ₄ O ₂		
Peso molecular	:	60,05 g/mol		
Nº CAS	No. CE	No. de Index	Classificação	Concentração
Acetic acid				
64-19-7	200-580-7	607-002-00-6	C, R10 - R35	-
4. PRIMEIROS SOCORROS				
Recomendação geral Consultar um médico. Mostrar esta ficha de segurança ao médico de serviço.				
Se for inalado Se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não respirar, aplicar a respiração artificial. Consultar um médico.				
No caso dum contacto com a pele Despir imediatamente a roupa e os sapatos contaminados. Lavar com sabão e muita água. Consultar um médico.				
No caso dum contacto com os olhos Lavar cuidadosamente com muita água, durante pelo menos quinze minutos, e consultar o médico.				
Se for engolido NÃO provocar vômitos. Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.				
Sigma-Aldrich - 242853		www.sigma-aldrich.com		Página 1 of 6

<p>5. MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIO</p> <p>Meios adequados de extinção Para fogos incipientes ou pequenos usar meios como espuma de álcool, pó seco ou dióxido de carbono. Para grandes fogos aplicar água desde o mais longe possível, usar grandes quantidades de água (inundação) aplicadas como nevoeiro ou spray; córregos sólidos de água podem não ser efectivos. Esfrie todos os depósitos ou vasilhas com grandes e inundantes quantidades de água.</p> <p>Equipamento especial de protecção a utilizar pelo pessoal de combate a incêndio Usar equipamento de respiração autónomo para combate a incêndios, se necessário.</p> <p>Outras informações Os jactos de água podem ser utilizados para arrefecer os contentores fechados.</p>
<p>6. MEDIDAS A TOMAR EM CASO DE FUGAS ACIDENTAIS</p> <p>Precauções individuais Usar equipamento de protecção individual. Evitar a respiração do vapor/névoa/gas. Assegurar ventilação adequada. Retirar todas as fontes de ignição. Evacuar o pessoal para áreas de segurança. Atenção com a acumulação de vapores que pode formar concentrações explosivas. Os vapores podem-se acumular nas áreas baixas.</p> <p>Precauções ambientais Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos.</p> <p>Métodos de limpeza Controlar e recuperar o líquido derramado com um produto absorvente não combustível, (por exemplo areia, terra, terra diatomácea, vermiculite) e por o líquido dentro de contentores para eliminação de acordo com as regulações locais / nacionais (ver secção 13). Manter em recipientes fechados adequados, para eliminação.</p>
<p>7. MANUSEAMENTO E ARMAZENAGEM</p> <p>Manuseamento Evitar a inalação do vapor ou da névoa. Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição - Não fumar. Tome medidas para impedir a formação de electricidade estática.</p> <p>Armazenagem Armazenar em local fresco. Guardar o recipiente herméticamente fechado em lugar seco e bem ventilado. Os contentores abertos devem ser cuidadosamente fechados de novo e têm que ficar direitos para evitar a dispersão. Sensível à humidade.</p>
<p>8. CONTROLO DA EXPOSIÇÃO/PROTECÇÃO PESSOAL</p> <p>Protecção individual</p> <p>Protecção respiratória Nos casos em que a avaliação de risco mostrar que os respiradores purificadores do ar são apropriados, use um respirador de cobertura facial total com cartuchos de combinação multi-objectivos (E.U.A.) ou do tipo ABEK (EN 14387) como apoio a controlos de engenharia. Se o respirador for o único meio de protecção, use um respirador de ar de cobertura facial total. Use respiradores e componentes testados e aprovados por normas governamentais apropriadas, tais como as NIOSH (E.U.A.) ou CEN (UE).</p> <p>Protecção das mãos As luvas de protecção seleccionadas devem satisfazer as especificações da Directiva da UE 89/686/CEE e o estandarte EN 374 derivado dele. Manusear com luvas.</p> <p>Protecção dos olhos Óculos de segurança bem ajustados. Protecção da face (mínimo de 8 polegadas (20 cm)).</p> <p>Protecção do corpo e da pele Escolher uma protecção para o corpo conforme a quantidade e a concentração das substâncias perigosas</p> <p>Sigma-Aldrich - 242853 www.sigma-aldrich.com Página 2 of 6</p>

no lugar de trabalho.

Medidas de higiene

Manusear de acordo com as boas práticas industriais de higiene e segurança. Lavar as mãos antes de interrupções, e no final do dia de trabalho.

9. PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

Aspecto

Estado físico	líquido
Cor	incolor
Odor	acre

Dados de segurança

pH	2,4 a 60,05 g/l
Ponto de fusão	16,2 °C
Ponto de ebulição	117 - 118 °C
Ponto de inflamação	40,0 °C - câmara fechada
Temperatura de ignição	485 °C
Limites de explosão, inferior	4 %(V)
Limite de explosão, superior	19,9 %(V)
Pressão de vapor	73,3 hPa a 50,0 °C 15,2 hPa a 20,0 °C
Hidrossolubilidade	completamente miscível
Coefficiente de partição n-octano/água	log Pow: -0,17

10. ESTABILIDADE E REACTIVIDADE

Estabilidade em armazenamento

Estável sob as condições recomendadas de armazenamento.

Condições a evitar

Calor, chamas e faíscas.

Matérias a evitar

Oxidantes, Carbonatos e fosfatos solúveis, Hidróxidos, Metais, Peróxidos, permanganatos, por exemplo, permanganato de potássio, Aminas, Alcoois

Produtos de decomposição perigosos

Produtos perigosos de decomposição formados durante os incêndios. - Óxidos de carbono

11. INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA

Toxicidade aguda

DL50 Oral - ratazana - 3.310 mg/kg

CL50 Inalação - rato - 1 h - 5620 ppm

<p>Observações: Órgãos Sensoriais e Sentidos Especiais (Nariz, Olhos, Ouvidos e Gosto):Olho: irritação das membranas conjuntivas. Órgãos Sensoriais e Sentidos Especiais (Nariz, Olhos, Ouvidos e Gosto):Olho: outros Sangue: outras alterações</p> <p>CL50 Inalação - ratazana - 4 h - 11,4 mg/l</p> <p>DL50 Dérmico - coelho - 1.112 mg/kg</p> <p>Irritação ou corrosão</p> <p>Pele - coelho - Leve irritação da pele - 24 h</p> <p>Olhos - coelho - Corrosivo para os olhos</p> <p>Sensibilização</p> <p>Pode causar sensibilização em contacto com a pele.</p> <p>Exposição crónica</p> <p>IARC: Nenhum componente deste produto presente a níveis maiores ou iguais a 0.1% é identificado como carcinogénio provável, possível ou confirmado pelo IARC.</p> <p>Sinais e sintomas de exposição</p> <p>O material é extremamente destrutivo para os tecidos das membranas mucosas e para o trato respiratório superior, os olhos e a pele., espasmo, inflamação e edema da laringe, espasmo, inflamação e edema dos brônquios, pneumonite, edema pulmonar, sensação de queimadura, Tosse, respiração ruidosa, laringite, Respiração superficial, Dor de cabeça, Náusea, Vômitos, A ingestão ou inalação de ácido acético concentrado provoca lesões nos tecidos dos tratos respiratório e digestivo. Os sintomas incluem: hematémese, diarreia sanguinolenta, edema e/ou perfuração do esófago e do piloro, pancreatite, hematuria, anúria, uremia, albuminúria, hemólise, convulsões, bronquite, edema pulmonar, pneumonia, colapso cardiovascular, choque e morte. O constato directo ou a exposição a concentrações elevadas do vapor com a pele ou com os olhos pode provocar: eritema, vesiculação, destruição tecidual com cicatrização lenta, escurecimento da pele, hiperqueratose, fissuras, erosão da córnea, opacificação, irite, conjuntivite e possível cegueira., Até onde sabemos, as propriedades químicas, físicas e toxicológicas não foram minuciosamente investigadas.</p> <p>Efeitos potenciais sobre a saúde</p> <table> <tr> <td>Inalação</td> <td>Pode ser perigoso se for inalado. O material é extremamente destrutivo para os tecidos das membranas mucosas e do trato respiratório superior.</td> </tr> <tr> <td>Pele</td> <td>Pode ser perigoso se for absorvido pela pele. Causa queimaduras severas na pele.</td> </tr> <tr> <td>Olhos</td> <td>Causa queimaduras severas nos olhos.</td> </tr> <tr> <td>Ingestão</td> <td>Pode ser perigoso se for engolido. Provoca queimaduras graves.</td> </tr> <tr> <td>Órgãos alvo</td> <td>Dentes, Rim,</td> </tr> </table> <p>Informação adicional RTECS: AF1225000</p>		Inalação	Pode ser perigoso se for inalado. O material é extremamente destrutivo para os tecidos das membranas mucosas e do trato respiratório superior.	Pele	Pode ser perigoso se for absorvido pela pele. Causa queimaduras severas na pele.	Olhos	Causa queimaduras severas nos olhos.	Ingestão	Pode ser perigoso se for engolido. Provoca queimaduras graves.	Órgãos alvo	Dentes, Rim,
Inalação	Pode ser perigoso se for inalado. O material é extremamente destrutivo para os tecidos das membranas mucosas e do trato respiratório superior.										
Pele	Pode ser perigoso se for absorvido pela pele. Causa queimaduras severas na pele.										
Olhos	Causa queimaduras severas nos olhos.										
Ingestão	Pode ser perigoso se for engolido. Provoca queimaduras graves.										
Órgãos alvo	Dentes, Rim,										
<p>12. INFORMAÇÃO ECOLÓGICA</p> <p>Informação sobre eliminação (persistência e degradabilidade)</p> <table> <tr> <td>Biodegradabilidade</td> <td>Observações: Espera-se que seja bio-degradável</td> </tr> </table> <p>Efeitos de ecotoxicidade</p> <table> <tr> <td rowspan="4">Toxicidade em peixes</td> <td>CL50 - Leuciscus idus (Carpa dourada) - 410,00 mg/l - 48 h</td> </tr> <tr> <td>CL50 - Cyprinus carpio (Carpa) - 49,00 mg/l - 48 h</td> </tr> <tr> <td>CL50 - Pimephales promelas (vairão gordo) - 79,00 - 88,00 mg/l - 96 h</td> </tr> <tr> <td>CL50 - Lepomis macrochirus - 75 mg/l - 96 h</td> </tr> <tr> <td>Toxicidade em dáfnias e outros</td> <td>CE50 - Daphnia magna - 65,00 mg/l - 48 h</td> </tr> </table> <p>Sigma-Aldrich - 242853 www.sigma-aldrich.com Página 4 of 6</p>		Biodegradabilidade	Observações: Espera-se que seja bio-degradável	Toxicidade em peixes	CL50 - Leuciscus idus (Carpa dourada) - 410,00 mg/l - 48 h	CL50 - Cyprinus carpio (Carpa) - 49,00 mg/l - 48 h	CL50 - Pimephales promelas (vairão gordo) - 79,00 - 88,00 mg/l - 96 h	CL50 - Lepomis macrochirus - 75 mg/l - 96 h	Toxicidade em dáfnias e outros	CE50 - Daphnia magna - 65,00 mg/l - 48 h	
Biodegradabilidade	Observações: Espera-se que seja bio-degradável										
Toxicidade em peixes	CL50 - Leuciscus idus (Carpa dourada) - 410,00 mg/l - 48 h										
	CL50 - Cyprinus carpio (Carpa) - 49,00 mg/l - 48 h										
	CL50 - Pimephales promelas (vairão gordo) - 79,00 - 88,00 mg/l - 96 h										
	CL50 - Lepomis macrochirus - 75 mg/l - 96 h										
Toxicidade em dáfnias e outros	CE50 - Daphnia magna - 65,00 mg/l - 48 h										

<p>invertebrados aquáticos.</p> <p>Toxicidade em algas CE50 - Não existe informação disponível. - 156,00 mg/l - 24 h</p> <p>Informações suplementares sobre a ecologia</p> <p>Carência biológica de oxigénio (CBO) 880 mg/g</p> <p>Informações ecológicas adicionais dados não disponíveis</p>
<p>13. CONSIDERAÇÕES RELATIVAS À ELIMINAÇÃO</p> <p>Produto Esse material combustível deve ser queimado em um incinerador químico equipado com um pós-combustor e purificador de gases. Observar todos os regulamentos ambientais federais, estaduais e locais. Entrar em contato com um serviço profissional credenciado de descarte de lixo para descartar esse material.</p> <p>Embalagens contaminadas Eliminar como produto Não utilizado.</p>
<p>14. INFORMAÇÕES RELATIVAS AO TRANSPORTE</p> <p>ADR/RID Número ONU: 2789 Classe: 8 (3) Grupo de embalagem: II Denominação de expedição correcta: ACETIC ACID, GLACIAL</p> <p>IMDG Número ONU: 2789 Classe: 8 (3) Grupo de embalagem: II EMS-No: F-E, S-C Denominação de expedição correcta: ACETIC ACID, GLACIAL Poluente marinho: No</p> <p>IATA Número ONU: 2789 Classe: 8 (3) Grupo de embalagem: II Denominação de expedição correcta: Acetic acid, glacial</p>
<p>15. INFORMAÇÃO SOBRE REGULAMENTAÇÃO</p> <p>Rotulado de acordo com as directivas da CE</p> <p>Rotulagem CE</p> <p>Símbolos de perigo C Corrosivo</p> <p>Frase(s) - R R10 Inflamável. R35 Provoca queimaduras graves.</p> <p>Frase(s) - S S23 Não respirar os gases/vapores/fumos/aerossóis. S26 Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista. S45 Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).</p>
<p>16. OUTRAS INFORMAÇÕES</p> <p>Outras informações</p> <p>Sigma-Aldrich - 242853 www.sigma-aldrich.com Página 5 of 6</p>

Direitos exclusivos, 2009, da Sigma-Aldrich. Permissão concedida para fazer número ilimitado de cópias em papel, somente para uso interno.
Acredita-se que as informações acima estejam corretas, embora não pretendam ser totalmente abrangentes, devendo ser usadas apenas como um guia. A Sigma-Aldrich não deverá ter responsabilidade legal por quaisquer danos resultantes do manuseio ou do contato com o produto acima. Consultar o verso da fatura ou nota que acompanha o produto para tomar conhecimento dos termos adicionais e condições de venda.

Anexo E.4 – Ficha de Segurança do Ácido Nítrico

--	--	--	--	--

Para o pleno texto das DECLARAÇÕES H mencionadas nesta Secção, ver a Secção 16.

4. PRIMEIROS SOCORROS

Recomendação geral

Consultar um médico. Mostrar esta ficha de segurança ao médico de serviço.

Se for inalado

Se for respirado, levar a pessoa para o ar fresco. Se não respirar, aplicar a respiração artificial. Consultar um médico.

No caso dum contacto com a pele

Despir imediatamente a roupa e os sapatos contaminados. Lavar com sabão e muita água. Consultar um médico.

No caso dum contacto com os olhos

Lavar cuidadosamente com muita água, durante pelo menos quinze minutos, e consultar o médico.

Se for engolido

NÃO provocar vômitos. Nunca dar nada pela boca a uma pessoa inconsciente. Enxaguar a boca com água. Consultar um médico.

5. MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIO

Meios adequados de extinção

Utilizar água pulverizada, espuma resistente ao álcool, produto químico seco ou dióxido de carbono.

Equipamento especial de protecção a utilizar pelo pessoal de combate a incêndio

Usar equipamento de respiração autónomo para combate a incêndios, se necessário.

Outras informações

Os jactos de água podem ser utilizados para arrefecer os contentores fechados.

6. MEDIDAS A TOMAR EM CASO DE FUGAS ACIDENTAIS

Precauções individuais

Usar equipamento de protecção individual. Evitar a respiração do vapor/névoa/gas. Assegurar ventilação adequada. Evacuar o pessoal para áreas de segurança.

Precauções ambientais

Não permitir a entrada do produto no sistema de esgotos.

Métodos e materiais para a contenção e a limpeza

Controlar e recuperar o líquido derramado com um produto absorvente não combustível, (por exemplo areia, terra, terra diatomácea, vermiculite) e pôr o líquido dentro de contentores para eliminação de acordo com os regulamentos locais / nacionais (ver secção 13).

7. MANUSEAMENTO E ARMAZENAGEM

Precauções para um manuseamento seguro

Evitar a inalação do vapor ou da névoa.

Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição - Não fumar. Manter afastado de matérias combustíveis.

Condições para uma armazenagem segura

Armazenar em local fresco. Guardar o recipiente herméticamente fechado em lugar seco e bem ventilado. Os contentores abertos devem ser cuidadosamente fechados de novo e têm que ficar direitos para evitar a dispersão.

8. CONTROLO DA EXPOSIÇÃO/PROTECÇÃO PESSOAL

Protecção individual

Protecção respiratória

Nos casos em que a avaliação de risco mostrar que os respiradores purificadores do ar são apropriados, use um respirador de cobertura facial total com cartuchos de combinação multi-objectivos (E.U.A.) ou do tipo ABEK (EN 14387) como apoio a controlos de engenharia. Se o respirador for o único meio de protecção, use um respirador de ar de cobertura facial total. Use respiradores e componentes testados e aprovados por normas governamentais apropriadas, tais como as NIOSH (E.U.A.) ou CEN (UE).

Protecção das mãos

As luvas de protecção seleccionadas devem satisfazer as especificações da Directiva da UE 89/689/CEE e a norma EN 374 derivada dela.

Manusear com luvas.

Protecção dos olhos

Óculos de segurança bem ajustados. Protecção da face (mínimo de 8 polegadas (20 cm)).

Protecção do corpo e da pele

Escolher uma protecção para o corpo conforme a quantidade e a concentração das substâncias perigosas no lugar de trabalho.

Medidas de higiene

Manusear de acordo com as boas práticas industriais de higiene e segurança. Lavar as mãos antes de interrupções, e no final do dia de trabalho.

9. PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

Aspecto

Estado físico	líquido
Cor	incolor

Dados de segurança

pH	< 1 a 20 °C
Ponto de fusão	dados não disponíveis
Ponto de ebulição	100 °C a 1.013 hPa
Ponto de inflamação	dados não disponíveis
Temperatura de ignição	dados não disponíveis
Limites de explosão, inferior	dados não disponíveis
Limite de explosão, superior	dados não disponíveis
Pressão de vapor	11 hPa a 20 °C
Densidade	1,48 g/cm ³
Hidrossolubilidade	completamente solúvel

10. ESTABILIDADE E REACTIVIDADE

Estabilidade química

Estável sob as condições recomendadas de armazenamento. Estável sob as condições recomendadas de armazenamento.

Condições a evitar

Pode descorar-se sob exposição ao ar ou à luz.

Matérias a evitar

Metais alcalinos, Materiais orgânicos, Anidrido acético, Acetonitrila, Alcoois, Acrilonitrila

Produtos de decomposição perigosos

Produtos perigosos de decomposição formados durante os incêndios. - A natureza dos produtos de decomposição não é conhecida.

11. INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA**Toxicidade aguda**

dados não disponíveis (Nitric acid)

Corrosão/irritação cutânea

Pele - coelho - Extremamente corrosivo e destrutivo para os tecidos. - Teste de Draize (Nitric acid)

Lesões oculares graves/irritação ocular

dados não disponíveis (Nitric acid)

Sensibilização respiratória ou da pele

dados não disponíveis (Nitric acid)

Mutagenicidade em células germinativas

dados não disponíveis (Nitric acid)

Carcinogenicidade

IARC: Nenhum componente deste produto presente a níveis maiores ou iguais a 0.1% é identificado como carcinogénio provável, possível ou confirmado pelo IARC.

Toxicidade reprodutiva

Toxicidade reprodutiva - ratazana - Oral

Efeitos no recém nascido: bioquímicos e metabólicos (Nitric acid)

Efeitos tóxicos no desenvolvimento - ratazana - Oral

Efeitos no embrião ou no feto: Fetotoxicidade (excepto a morte, por exemplo, atrofia do feto). (Nitric acid)

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição única

dados não disponíveis (Nitric acid)

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição repetida

dados não disponíveis

Perigo de aspiração

dados não disponíveis (Nitric acid)

Efeitos potenciais para a saúde

Inalação	Pode ser perigoso se for inalado. O material é extremamente destrutivo para os tecidos das membranas mucosas e do trato respiratório superior.
Ingestão	Pode ser perigoso se for engolido. Provoca queimaduras graves.
Pele	Pode ser perigoso se for absorto pela pele. Causa queimaduras severas na pele.
Olhos	Causa queimaduras severas nos olhos.

Sinais e sintomas de exposição

O material é extremamente destrutivo para os tecidos das membranas mucosas e para o trato respiratório superior, os olhos e a pele., A inalação pode provocar os sintomas seguintes: espasmo, inflamação e edema dos brônquios, espasmo, inflamação e edema da laringe, pneumonite, Os sintomas e sinais de envenenamento são: sensação de queimadura, Tosse, respiração ruidosa, laringite, Respiração superficial, Dor de cabeça, Náusea, Vômitos, Edema pulmonar. Os efeitos podem ser tardios., Doses grandes podem provocar: conversão da hemoglobina em metemoglobina, produzindo cianose; acentuada queda da pressão sanguínea, levando ao colapso, coma e possivelmente morte.

Informação adicional

RTECS: dados não disponíveis

12. INFORMAÇÃO ECOLÓGICA

Sigma-Aldrich - 258121

Página 4 de 6

Toxicidade

Toxicidade em peixes CL50 - Asterias rubens - 100 - 330 mg/l - 48 h (Nitric acid)

Persistência e degradabilidade
dados não disponíveis**Potencial de bioacumulação**
dados não disponíveis**Mobilidade no solo**
dados não disponíveis (Nitric acid)**Avaliação PBT e mPmB**
dados não disponíveis**Outros efeitos adversos**

Pode ser nocivo para os organismos aquáticos devido à mudança do pH.

13. CONSIDERAÇÕES RELATIVAS À ELIMINAÇÃO**Produto**

Entrar em contato com um serviço profissional credenciado de descarte de lixo para descartar esse material. Dissolver ou misturar o material com um solvente combustível e queimar em incinerador químico equipado com pós-combustor e purificador de gases. Observar todos os regulamentos ambientais federais, estaduais e locais.

Embalagens contaminadas

Eliminar como produto Não utilizado.

14. INFORMAÇÕES RELATIVAS AO TRANSPORTE**ADR/RID**

Número ONU: 2031 Classe: 8 (5.1) Grupo de embalagem: I
Denominação de expedição correcta: ÁCIDO NÍTRICO

IMDG

Número ONU: 2031 Classe: 8 (5.1) Grupo de embalagem: I EMS-No:
F-A, S-Q
Denominação de expedição correcta: NITRIC ACID
Poluente marinho: No

IATA

Número ONU: 2031 Classe: 8 (5.1) Grupo de embalagem: I
Denominação de expedição correcta: Nitric acid
IATA Passenger: Não permitido para o transporte

15. INFORMAÇÃO SOBRE REGULAMENTAÇÃO

Esta folha de dados de segurança obedece aos requerimentos da Regulamento (CE) No. 1907/2006

16. OUTRAS INFORMAÇÕES**Texto dos código(s) H e frase(s) R mencionados na secção 3**

H272	Pode agravar incêndios; comburente.
H314	Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.
Ox. Liq.	Líquidos comburentes
Skin Corr.	Corrosão cutânea
C	Corrosivo
O	Comburente
R 8	Favorece a inflamação de matérias combustíveis.
R35	Provoca queimaduras graves.

Outras informações

Sigma-Aldrich - 258121

Página 5 de 6

Direitos exclusivos, 2010, da Sigma-Aldrich. Permissão concedida para fazer número ilimitado de cópias em papel, somente para uso interno.

Acredita-se que as informações acima estejam corretas, embora não pretendam ser totalmente abrangentes, devendo ser usadas apenas como um guia. A Sigma-Aldrich não deverá ter responsabilidade legal por quaisquer danos resultantes do manuseio ou do contato com o produto acima. Consultar o verso da fatura ou nota que acompanha o produto para tomar conhecimento dos termos adicionais e condições de venda.

Anexo E.5 – Ficha de Segurança da Solução Padrão do Cádmio

**FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA**

de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006

Data de revisão 15.08.2017

Versão 12.1

SECÇÃO 1. Identificação da substância/mistura e da sociedade/empresa**1.1 Identificador do produto**

No. de catálogo	102027
Nome do produto	Sulfato de cádmio hidratado para análise EMSURE® ACS
Número de registo REACH	Um número de registo não está disponível para esta substância ou o seu uso é isento de registo, de acordo com o Artigo 2 do regulamento REACH (CE) 1907/2006, a tonagem anual não exige um registo ou o registo pode ser feito num período posterior.
No. CAS	7790-84-3

1.2 Utilizações identificadas relevantes da substância ou mistura e utilizações desaconselhadas

Utilizações identificadas	Reagente para análise Para informações adicionais, por favor consulte o portal Merck Chemicals (www.merckgroup.com).
---------------------------	---

1.3 Identificação do fornecedor da ficha de dados de segurança

Companhia	Merck KGaA * 64271 Darmstadt * Alemanha * Tel: +49 6151 72-2440
Departamento responsável	LS-QHC * e-mail: prodsafe@merckgroup.com

1.4 Número de telefone de emergência	CIAV, Centro de Informação Antivenenos, Rua Almirante Barroso, 36 1000-013 Lisboa * Tel.Urgencia (Consultas): 808 250 143
--------------------------------------	--

SECÇÃO 2. Identificação dos perigos**2.1 Classificação da substância ou mistura**

Classificação (REGULAMENTO (CE) N.º 1272/2008)

As Fichas de dados de Segurança para itens de catálogo estão igualmente disponíveis em www.merckgroup.com.

Página 1 de 19

FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA

de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006

No. de catálogo 102027
Nome do produto Sulfato de cádmio hidratado para análise EMSURE® ACS

Toxicidade aguda, Categoria 3, Oral, H301
Toxicidade aguda, Categoria 2, Inalação, H330
Mutagenicidade em células germinativas, Categoria 1B, H340
Carcinogenicidade, Categoria 1B, H350
Toxicidade reprodutiva, Categoria 1B, H360F
Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição repetida, Categoria 1, H372
Toxicidade aguda para o ambiente aquático, Categoria 1, H400
Toxicidade crónica para o ambiente aquático, Categoria 1, H410
Para o pleno texto das DECLARAÇÕES H mencionadas nesta Secção, ver a Secção 16.

2.2 Elementos do rótulo

Rótulo (REGULAMENTO (CE) N.o 1272/2008)

Pictogramas de perigo



Palavra-sinal

Perigo

Advertências de perigo

H340 Pode provocar anomalias genéticas.
H350 Pode provocar cancro.
H360F Pode afectar a fertilidade.
H301 Tóxico por ingestão.
H330 Mortal por inalação.
H372 Afecta os órgãos após exposição prolongada ou repetida.
H410 Muito tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

Recomendações de prudência

Prevenção

P201 Pedir instruções específicas antes da utilização.
P273 Evitar a libertação para o ambiente.

Resposta

As Fichas de dados de Segurança para itens de catálogo estão igualmente disponíveis em www.merckgroup.com.

Página 2 de 19

FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA

de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006

No. de catálogo 102027
 Nome do produto Sulfato de cádmio hidratado para análise EMSURE® ACS

P304 + P340 EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.

P308 + P310 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

Reservado aos utilizadores profissionais.

Rótulagem reduzida (≤125 ml)

Pictogramas de perigo



Palavra-sinal

Perigo

Advertências de perigo

H340 Pode provocar anomalias genéticas.

H350 Pode provocar cancro.

H360F Pode afectar a fertilidade.

H301 Tóxico por ingestão.

H330 Mortal por inalação.

H372 Afecta os órgãos após exposição prolongada ou repetida.

Recomendações de prudência

P201 Pedir instruções específicas antes da utilização.

P304 + P340 EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.

P308 + P310 EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

No. de Index 048-009-00-9

2.3 Outros perigos

Não conhecidos.

SECÇÃO 3. Composição/informação sobre os componentes

3.1 Substância

Formula $3 \text{ CdSO}_4 \cdot 8 \text{ H}_2\text{O}$ $\text{Cd}_3\text{O}_{12}\text{S}_3 \cdot 8 \text{ H}_2\text{O}$ $\text{Cd}_3\text{O}_{12}\text{S}_3 \cdot 8 \text{ H}_2\text{O}$ (Hill)

As Fichas de dados de Segurança para itens de catálogo estão igualmente disponíveis em www.merckgroup.com.

Página 3 de 19

Anexo E.6 – Ficha de Segurança da Solução Padrão do Zinco

FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA

de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006

No. de catálogo	170389
Nome do produto	Zinco padrão ICP rastreado ao SRM do NIST Zn(NO ₃) ₂ em HNO ₃ 2-3% 10000 mg/l Zn Certipur®

2.2 Elementos do rótulo

Rótulo (REGULAMENTO (CE) N.º 1272/2008)

Pictogramas de perigo*Palavra-sinal*

Atenção

Advertências de perigo

H290 Pode ser corrosivo para os metais.

H315 Provoca irritação cutânea.

H319 Provoca irritação ocular grave.

H411 Tóxico para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

Recomendações de prudência

Prevenção

P273 Evitar a libertação para o ambiente.

Resposta

P302 + P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabonete e água.

P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível.

Continue a enxaguar.

Rótulagem reduzida (≤125 ml)*Pictogramas de perigo**Palavra-sinal*

Atenção

As Fichas de dados de Segurança para itens de catálogo estão igualmente disponíveis em www.merckgroup.com.

Página 2 de 20

FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA

de acordo com a Regulamento (CE) No. 1907/2006

No. de catálogo	170389
Nome do produto	Zinco padrão ICP rastreado ao SRM do NIST Zn(NO ₃) ₂ em HNO ₃ 2-3% 10000 mg/l Zn Certipur®

2.3 Outros perigos

Não conhecidos.

SECÇÃO 3. Composição/informação sobre os componentes

Natureza química Solução de ácido nítrico.

3.1 Substância

Não aplicável

3.2 Mistura

Componentes perigosos (REGULAMENTO (CE) N.º 1272/2008)

Nome Químico (Concentração)

No. CAS Número de registo Classificação

Nitrato de zinco (>= 2,5 % - < 3 %)

7779-88-6 *)

Sólido comburente, Categoria 2, H272

Toxicidade aguda, Categoria 4, H302

Irritação cutânea, Categoria 2, H315

Irritação ocular, Categoria 2, H319

Toxicidade para órgãos-alvo específicos - exposição única,
Categoria 3, H335

Toxicidade aguda para o ambiente aquático, Categoria 1, H400

Toxicidade crónica para o ambiente aquático, Categoria 1, H410

Ácido nítrico (>= 1 % - < 5 %)

A substância não atende ao critério para PBT ou vPvB de acordo com o regulamento (CE) n.º 1907/2006, anexo XIII.

7697-37-2 01-2119487297-23-

XXXX

Líquido comburente, Categoria 2, H272

Corrosivo para os metais, Categoria 1, H290

Toxicidade aguda, Categoria 1, H330

Corrosão cutânea, Categoria 1A, H314

As Fichas de dados de Segurança para itens de catálogo estão igualmente disponíveis em www.merckgroup.com.

Página 3 de 20

Anexo E.7 – Ficha de Informação da Accellerase


GENENCOR®
 A Danisco Division

ACCELLERASE™ 1000

Cellulase Enzyme Complex for Lignocellulosic Biomass Hydrolysis

Product Information

DESCRIPTION

ACCELLERASE™ 1000 cellulase is an enzyme complex preparation intended specifically for the lignocellulosic biomass processing industries, including renewable fuels and chemicals. **ACCELLERASE™ 1000** will facilitate process development and scale up in this emerging industry. Key features that are expected to be important at commercial scale biorefineries are already built in to this first generation product. Benefits observed with the proprietary enzyme complex and the unique product formulation of **ACCELLERASE™ 1000** compared to conventional cellulases include:

- Enhanced saccharification performance on a variety of feedstocks.
- Ability to operate in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) processes, two step sequential hydrolysis and fermentation (SHF) processes or hybrids of the two.
- High beta-glucosidase activity to minimize residual cellobiose, which may lead to higher rates of saccharification and ultimately to a faster ethanol fermentation. Yields may also be improved.
- Unclassified product. The remaining nutrients from enzyme production are available to the yeast in addition to the fermentable sugars produced by saccharification. This may lead to faster ethanol fermentations, reduce the cost of ethanol fermentation raw materials, and possibly even improve ethanol yields.
- Minimal formulation to reduce interference with saccharification carbohydrate profile analysis or subsequent yeast fermentation from enzyme formulation chemicals.

ACCELLERASE™ 1000 enzyme complex contains a potent combination of enzymes which effectively modify and digest non-starch carbohydrates, the structural material of lignocellulosic biomass. Lignocellulosic material is composed mainly of cellulose, hemicellulose, and beta-glucans which are associated with each other and also with lignin, pectins, proteins, starch, and lipids. This product is capable of efficiently hydrolyzing lignocellulosic biomass into fermentable monosaccharides. **ACCELLERASE™ 1000** contains high levels of beta-glucosidase to ensure almost complete conversion of cellobiose to glucose.

ACCELLERASE™ 1000 is produced with a genetically modified strain derived from *Trichoderma reesei*. The production host is inactivated at the end of the controlled fermentation.

TYPICAL CHARACTERISTICS

ACCELLERASE™ 1000 enzyme complex contains multiple enzyme activities; mainly exoglucanase, endoglucanase, hemicellulase and beta-glucosidase. The endoglucanase activity is standardized on the basis of its activity on carboxymethylcellulose (CMC). Beta-glucosidase activity is standardized on the basis of activity on pNP-glucoside. The

biomass hydrolysis performance of this enzyme preparation is a result of the synergistic effect of all the main and accessory activities and cannot be completely evaluated on the basis of the declared activities alone.

Endoglucanase Activity: 2500 CMC U/g (minimum)

Beta-Glucosidase Activity: 400 pNPG U/g (minimum)

Appearance: Brown liquid

pH: 4.8 - 5.2

The activity of **ACCELLERASE™ 1000** enzyme complex is expressed in carboxymethylcellulose (CMC U) activity units. One CMC U unit of activity liberates 1 µmol of reducing sugars (expressed as glucose equivalents) in one minute under specific assay conditions of 50°C (122°F) and pH 4.8. Beta-glucosidase is reported in pNPG units. One pNPG unit denotes 1 µmol of Nitrophenol liberated from para-nitrophenyl-B-D-glucopyranoside in 10 minutes at 50°C (122°F) and pH 4.8. Detailed assay methods are available upon request.

APPLICATIONS

ACCELLERASE™ 1000 enzyme complex will hydrolyze the non-starch carbohydrates in lignocellulosic biomass into fermentable monosaccharides as well as aid materials handling by liquefaction and viscosity reduction. Feedstocks including paper pulp, corn stover, sugar cane bagasse, wood chips, waste paper and many others can all be hydrolyzed using **ACCELLERASE™ 1000**. **ACCELLERASE™ 1000** can work with a variety of pretreatments including dilute acid, AFEX and steam expansion. This can be done using simultaneous saccharification and fermentation (SSF) or in a two step sequential hydrolysis and fermentation (SHF) configuration. **Please be aware of pH and temperature stability optima and limits of the enzyme depending on your process configuration.** Saccharification performance may be enhanced by the addition of other Genencor® enzymes depending on the composition of the pretreated feedstock.

DOSAGE GUIDELINES

The optimum dosage levels of **ACCELLERASE™ 1000** enzyme complex will vary considerably with different substrates and their associated pretreatment technologies and conditions. Operating conditions such as pH, temperature and reaction time may also affect enzyme performance. An **ACCELLERASE™ 1000** dosage rate of 0.1 - 0.5 g (0.1 - 0.5 mL) per g cellulose or roughly 0.05 to 0.25 mL per g of biomass (depending on biomass composition) is recommended as a starting point for optimization of enzyme dosage. **ACCELLERASE™ 1000** rapidly liquefies and hydrolyzes a variety of substrates within 24 hours, with some additional benefit by extending the time. Small-scale experiments are recommended to determine optimum enzyme dosage in each system. See Figures 1 and 2 for an example of such experiments.



accellerase™

FUELING THE BIOBASED ECONOMY

Genencor® enzymes

**Genencor International Inc.**

200 Meridian Centre Blvd
Rochester, N.Y. 14618- 3916
U.S.A

+1.800.847.5311
+1.716.244.4544 fax

Genencor International B.V.

P.O.Box 218
2300 AE Leiden
The Netherlands

+31.71.5686.168
+31.71.5686.169 fax

Genencor International

Asia Pacific Pte Ltd
61 Science Park Road
The Galen #06- 16 East Wing
Singapore Science Park III
Singapore 117525

+65.6511.5600
+65.6511.5656 fax

Genencor International

Argentina, S.R.L.
1750 Alicia Moreau de Justo Ave.
(C1107AFJ) Capital Federal
Buenos Aires, Argentina

+54.11.5199.9550
+54.11.5199.9559 fax

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name: Accellerase 1000

Lot Number: 1600877126

Assay	Unit	Low Spec	High Spec	Found
ENZYME ACTIVITIES				
Beta- glucosidase	U/g	400		429
Cellulase	CMCU/g	2500		3026
PHYSICAL PROPERTIES				
pH		4.8	5.2	5.0

This product complies with the current recommended purity specifications for food- grade enzymes given by the Joint FAO/WHO expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC).

Released on _____

17- JUN- 2008

Approved by _____

Tracy Krawczyk

This certificate of analysis was electronically generated and therefore has not been signed.

End of Report

Ver 2.40 (10g)

Page 1 of 1

**Genencor International Inc.**

200 Meridian Centre Blvd.
Rochester, N.Y. 14618 - 3916
U.S.A.

+1.800.847.5311
+1.585.244.4544 fax

Genencor International B.V.

P.O.Box 218
2300 AE Leiden
The Netherlands

+31.71.5686.168
+31.71.5686.169 fax

**Genencor International
Asia Pacific Pte Ltd**

61 Science Park road
The Galen #06- 16 East Wing
Singapore Science Park III
Singapore 117525

+65.6511.5600
+65.6511.5666 fax

**Genencor International
Argentina, S.A.**

1750 Alicia Moreau De Justo St
Capital Federal
Buenos Aires, Argentina

+54.11.5199.9550
+54.11.51999559 fax

Product Specification

Date Revised 17- JAN- 2008

Product Name: **Accellerase 1000**

Item Code: A30143

Assay	Unit	Low Spec	High Spec
ENZYME ACTIVITIES			
Cellulase	CMCU/g	2500	
Beta- glucosidase	U/g	400	
MICROBIOLOGICAL ANALYSIS			
Total Viable Count	CFU/ml	0	50000
Production Strain	/ml		NEG
PHYSICAL PROPERTIES			
pH		4.8	5.2

Anexo E.8 – Ficha de Informação do Ultraflo

Product Data Sheet

Valid from 2017-08-24

2 of 2

GM STATUS

This product is not a GMO.

Production organism Aspergillus oryzae
Trichoderma reesei

The enzyme product is manufactured by fermentation of microorganisms that are not present in the final product. The production organisms are improved by means of modern biotechnology.

STORAGE CONDITION

Recommended storage: 0-10 °C (32-50 °F)

Packaging must be kept intact, dry, and away from sunlight. Please follow the recommendations and use the product before the best before date to avoid the need for a higher dosage.

Best before: You will find the best before date in the certificate of analysis or on the product label.

The product gives optimal performance when stored as recommended and used prior to the best-before date.

The product can be transported at ambient temperature. Following delivery, the product should be stored as recommended.

SAFETY AND HANDLING PRECAUTIONS

Enzymes are proteins. Inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes, and mucous membranes upon prolonged contact. See the MSDS or Safety Manual for further information regarding safe handling of the product and spills.

COMPLIANCE

The product complies with the recommended purity specifications for food-grade enzymes given by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemical Codex (FCC).

Kosher and Halal certificates are available from the Customer Center or sales representative.

CERTIFICATIONS

Novozymes is a signatory to United Nations Global Compact, United Nations Convention on Biological Diversity and report on our sustainability performance through Global Reporting Initiative (GRI). See all our commitments under sustainability on www.novozymes.com.



FOOD SAFETY

Novozymes has carried out a hazard analysis and prepared an HACCP plan describing the critical control points (CCPs). The HACCP plan is supported by a comprehensive prerequisite program implemented in Novozymes' GMP practices.

The product is produced according to Novozymes' HACCP plan, GMP practices, and additional requirements controlled by Novozymes' Quality Management System.

The product complies with FAO/WHO JECFA- and FCC-recommended purity requirements regarding mycotoxins.



PACKAGING

The product is available in different types of packaging. Please contact the sales representative for more information.

For more information, or for more office addresses, visit www.novozymes.com

Novozymes A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd
Denmark

Laws, regulations and/or third party rights may prevent customers from importing, using, processing and/or reselling the products described herein in a given manner. Without separate, written agreement between the customer and Novozymes to

novozymes.com