



## **Caraterização e valorização do licor negro da indústria da pasta de papel ao sulfito**

**ANA MARTA DA FONSECA PEREIRA**

Novembro de 2016

# **Caraterização e valorização do licor negro da indústria da pasta de papel ao sulfito**

Departamento de Engenharia Química

Dissertação

**Professor Supervisor:** Elisa Ramalho

**Professor Co- supervisor:** Eduardo Soares

Ana Marta Pereira, nº 1101544

Novembro de 2016



## Agradecimentos

Durante este longo percurso, diversas pessoas estiveram presentes e que me apoiaram na realização da presente dissertação, a quem gostaria de expressar o meu agradecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores, à Doutora Elisa Ramalho e ao Doutor Eduardo Soares pela orientação, pela atenção que me dedicaram, pelos conhecimentos que me transmitiram e pelo apoio prestado, sem o qual seria impraticável a conclusão deste trabalho.

Agradeço também ao CIETI pela realização desta dissertação nas suas instalações. À Vânia Silva e aos restantes voluntários do CIETI pelo apoio e amizade.

Agradeço à Filipa Silva, que me acompanhou num determinado período na realização desta dissertação, pela ajuda prestada.

Agradeço à Eng<sup>a</sup> Aurora pela boa disposição, pela forma como me recebeu e por toda a ajuda e disponibilidade que me deu no decorrer do trabalho.

À Cátia Sousa, por me ter recebido tão pronta e atenciosamente, esclarecendo todas as minhas questões e que esteve sempre disponível para me ajudar.

Agradeço às gatas 012, minhas companheiras de casa, Patrícia e Ana Sofia, pela paciência por me aturarem estes anos todos e que, mesmo assim, sempre me apoiaram e motivaram com alegria e carinho.

Ao Júnio, que sempre me apoiou e que, neste momento, está a olhar por mim e a acompanhar o meu longo percurso, esteja onde ele estiver.

Aos grandes manos de Paiva, que eu sei que posso contar com eles para tudo, que nunca me deixaram desanimar, que me apoiaram e incentivaram em qualquer decisão tomada e que tive a sorte de estarem sempre ao meu lado.

Aos Gordos do ISEP e à Equipa, o melhor que o ISEP me poderia dar, a motivação dada, por terem estado sempre presentes nos bons e maus momentos e que os levarei para sempre comigo.

À minha irmã pelo apoio incansável, pela paciência, pelo carinho e pela palavra amiga que tantas vezes foi necessária. Ao meu afilhado Martim, que sempre me alegrou com a sua ingenuidade. Ao José António pela amizade, pela motivação e pelos conselhos dados.

E porque os últimos são sempre os primeiros, aos meus pais, que foram, são e serão o meu suporte e principal apoio, agradeço tudo o que fizeram por mim ao longo deste tempo, o afeto e a paciência, porque sem eles não seria possível a conclusão desta etapa tão importante na minha vida.

Muito Obrigada!



## Sumário

Atualmente existe uma enorme necessidade em reduzir a dependência em combustíveis fósseis, de modo a reduzir as emissões gasosas responsáveis pelas alterações climáticas, havendo investimento em novas tecnologias na recuperação de subprodutos em diversos sectores, tais como no sector da celulose.

Licor negro do processo ao sulfito é um subproduto do processo de tratamento químico ao sulfito na indústria de papel e celulose. Este subproduto apresenta características adequadas para a produção de biocombustíveis devido ao seu poder calorífico e ao seu alto teor de açúcares.

O presente trabalho teve como objetivo a valorização do licor negro do processo ao sulfito, através da produção de bioetanol. Esta valorização foi realizada através da fermentação dos açúcares presentes no licor negro do processo ao sulfito utilizando a levedura *Scheffersomyces stipitis*, que é mais adequada para fermentar pentoses, sendo que a concentração máxima de ácido acético que esta levedura consegue tolerar é de 9g/L.

O estudo da evolução da fermentação dos açúcares foi realizado através da comparação de 3 situações distintas: a fermentação do licor negro do processo ao sulfito pré-tratado com resinas de permuta iónica, do licor negro diluído isento de pré-tratamento e a fermentação com a levedura adaptada ao licor negro do processo ao sulfito aumentando gradualmente a sua concentração de açúcares até 50 g/L.

O pré-tratamento consistiu na passagem do licor em duas resinas de permuta iónica fortes, catiónica e aniónica. A resina catiónica teve como objetivo a eliminação dos catiões de magnésio, enquanto a resina aniónica, a redução da concentração dos lenhossulfonatos e do ácido acético.

Comparando os valores obtidos para o consumo de açúcar na fermentação do licor negro do processo ao sulfito, num tempo de fermentação equivalente nos três tipos de fermentação realizados, verifica-se que há um maior consumo no ensaio de fermentação do licor negro sem pré-tratamento, cerca de 11 g/L, em relação aos ensaios de fermentação do licor pré-tratado e de fermentação com a levedura adaptada, 9 g/L e 3 g/L, respetivamente. Estes resultados não eram os esperados, podendo estar relacionado com o facto destes ensaios não terem sido realizados em condições estéreis, ao contrário do que aconteceu nos ensaios com a levedura adaptada, havendo a possibilidade de crescimento de microrganismos contaminantes.

Relativamente ao teor de etanol produzido, na fermentação com a levedura adaptada, conclui-se que o teor obtido é baixo, cerca de 0,85% e 0,67% nos ensaios realizados. Estes valores estão em concordância com o baixo consumo de açúcar que houve nos dois ensaios.

Na caraterização da fermentação com a levedura adaptada, obteve-se uma velocidade média de consumo do substrato igual a 0,08 g/(L.h), um fator médio de conversão do substrato a etanol de 0,54 e a produtividade média em etanol igual a 0,45 g/(L.h).

Palavras chaves: Licor negro, processo ao sulfito, fermentação, bioetanol, levedura, *Scheffersomyces stipitis*.

## Abstract

Currently there is a huge need to reduce the dependence on fossil fuels to reduce gaseous emissions responsible for climate change and there is investment in new technologies for the recovery of byproducts in various sectors, such as in the cellulose sector.

Sulphite spent liquor is a byproduct of the sulphite chemical treatment process in the pulp and cellulose industry and has several properties to produce biofuels due to its calorific value and high sugar content.

This work aimed at the enhancement of the sulphite spent liquor, through the production of bioethanol. This enhancement was made through the fermentation of the sulphite spent liquor's using the yeast *Scheffersomyces Stipitis*, which is more suitable for fermenting pentoses, and the maximum concentration of acetic acid that this yeast can tolerate is 9 g/L.

The study of the evolution of the sugar's fermentation was made through the comparison of three different situations: sulphite spent liquor pretreated with ion exchanging resins, liquor diluted without pretreatment and fermentation with a yeast adapted to the sulphite spent liquor gradually increasing sugar concentration to 50 g/L.

The pretreatment consisted of percolating the liquor through two strong ion exchange resin beds, cationic and anionic. The objective of cationic resin was the elimination of the magnesium cations, while the anionic resin was the reduction of the concentration of lignosulphonates and acetic acid.

Comparing the values obtained for the sugar consumption in the fermentation of the sulphite spent liquor, in equivalent time for the different fermentations, there is a higher sugar consumption in the fermentation of the liquor without pretreatment, about 11g/L and for the fermentations tests with pretreated liquor and the adapted yeast, 9 g/L and 3g/L, respectively. These results were not expected, and this may be related with the fact that the tests which were not carried out under sterile conditions, unlike the tests with the adapted yeast, have the possibility of growth of contaminating microorganisms.

As for the ethanol production, in fermentation with the adapted yeast, it is concluded that the obtained content is low, about 0,85% and 0,67% in the tests carried out. These values are in agreement with the low sugar consumption that occurred in both tests.

In the characterization of the fermentation with the adapted yeast, it was obtained an average substrate consumption rate of 0,08 g/(L.h), an average substrate conversion factor to ethanol of 0,54 and an average ethanol productivity of 0,45 g/(L.h).

Keywords: Sulphite spent liquor, fermentation, bioethanol, yeast, *Scheffersomyces Stipitis*.

## Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Indústria do papel.....	1
1.2	Processos de produção do papel.....	2
1.2.1	Processos de produção da pasta de celulose.....	2
1.2.2	Fabrico do papel.....	7
1.3	Indústria do Papel em Portugal.....	7
1.4	Indústria do Papel Mundial.....	8
2	Contexto e estado de arte.....	11
2.1	Madeiras Coníferas e Folhosas.....	11
2.2	<i>Eucalyptus globulus</i> .....	11
2.3	Licor negro.....	12
2.4	Valorização do licor negro.....	14
2.4.1	Bioetanol.....	15
3	Procedimentos.....	21
3.1	Caracterização do Licor negro.....	21
3.2	Fermentação, pré e pós- tratamentos.....	24
4	Resultados e Discussão.....	31
5	Conclusões finais e sugestões de trabalhos futuros.....	39
6	Bibliografia.....	41
	Anexos.....	45
	Anexo A- Caracterização do licor.....	45
	Anexo A.1- Teor de humidade.....	45
	Anexo A.2- Teor de cinzas.....	46
	Anexo A.3. Massa específica.....	47
	Anexo A.4- Teor de lenhossulfonatos.....	48
	Anexo A.5. Determinação de açúcares totais pelo método de DNS.....	50
	Anexo B. Valorização do licor negro.....	53

Anexo B.1. Determinação da concentração de açúcares nas fracções de volume iniciais do licor negro do processo ao sulfito com as resinas dos ensaios de permuta iónica. ....	53
Anexo B.2. Fermentação com pré-tratamento .....	54
Anexo B.3. Fermentação sem pré-tratamento .....	58
Anexo B.4. Determinação do teor de etanol do licor negro sem pré-tratamento...	63
Anexo B.5- Adaptação da levedura, utilizando o licor negro como fonte de açúcar no inóculo em meio líquido .....	69
Anexo B.6- Contagem das células presentes no inóculo .....	70
Anexo B.7- Evolução da fermentação de açúcares do licor negro do processo ao sulfito com a levedura adaptada .....	72
Anexo B.8- Destilação do licor negro fermentado com a levedura adaptada .....	75
Anexo B.9- Parâmetros para a caraterização da produção de etanol na fermentação com a levedura adaptada [37].....	80

## Índice de Figuras

Figura 1.1- - Estrutura química da celulose [3].....	2
Figura 1.2-Esquema representativo do processo de obtenção da pasta de celulose [6]. .....	3
Figura 1.3- Esquema representativo do processo químico ao sulfito [3].....	5
Figura 1.4- Produção de pasta [15].....	8
Figura 2.1-Representação da molécula do bioetanol [25] .....	15
Figura 3. 1- Determinação dos açúcares presentes no licor negro pelo método DNS. 24	
Figura 3. 2- Esquema da montagem experimental da permuta iónica.....	26
Figura 3. 3- Montagem da instalação efetuada no procedimento da destilação. ....	29
Figura 4. 1- Curva de rutura do leito de resina aniónica, concentração de lenhossulfonatos (mg/L) em função do volume recolhido (*). ....	32
Figura 4. 2- Representação gráfica do progresso da fermentação dos açúcares presentes no licor negro tratado, ao longo do tempo. ....	34
Figura 4. 3- Representação gráfica do progresso da fermentação dos açúcares presentes no licor negro sem pré-tratamento, ao longo do tempo.....	34
Figura 4. 4- Crescimento da levedura sem (A) e com adaptação (B) ao licor negro do processo ao sulfito. ....	36
Figura 4. 5- Representação gráfica do progresso da fermentação dos açúcares com a levedura adaptada ao no licor negro do processo ao sulfito.....	36
Figura A. 1- Representação gráfica da curva de calibração [lenhossulfonatos] (mg/L) vs Absorvância.....	49
Figura A. 2- Representação gráfica da curva de calibração [Glucose] (g/L) vs Absorvância.....	50
Figura B. 1- Representação gráfica dos valores tabelados da massa específica da água (g/L) em função da temperatura (°C). ....	64



## Índice de Tabelas

Tabela 2.1-Composição química de <i>E.globulus</i> , em % de matéria seca [3] [18] .....	12
Tabela 2.2- Composição em monossacarídeos de <i>E. globulus</i> , em % de matéria seca [18]. .....	12
Tabela 2.3- Valores das características e das diferentes propriedades do licor negro do processo ao sulfito fornecidos pela empresa [21] [22].....	14
Tabela 4. 1- Resultados obtidos na caraterização do licor negro e os respetivos valores facultados pela empresa. ....	31
Tabela 4. 2- Concentração de açúcar nas frações iniciais dos volumes recolhidos antes da rutura da curva das resinas iónicas.....	33
Tabela 4. 3- Resultados obtidos na determinação do teor de álcool (%).....	35
Tabela 4. 4- Valores obtidos na determinação do teor de etanol (%).....	37
Tabela 4. 5- - Valores obtidos na caraterização da produção de etanol na fermentação com a levedura adaptada. ....	38
Tabela A. 1- Determinação do teor de humidade (%).....	45
Tabela A. 2- Determinação do teor de cinzas (%).....	46
Tabela A. 3- Resultados obtidos na determinação da massa específica do licor negro. ....	47
Tabela A. 4- Curva de calibração dos padrões de lenhossulfonatos (mg/L).....	48
Tabela A. 5- Valores obtidos para a curva de calibração [Glucose] (g/L) vs Absorvância. ....	50
Tabela A. 6- Resultados obtidos da determinação de açúcares totais no licor negro. .	51
Tabela B. 1- Valores obtidos para concentração de açúcares nas frações de volume iniciais presente no licor negro do processo ao sulfito com as resinas dos ensaios de permuta iónica. ....	53
Tabela B. 2- Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro após o pré-tratamento ao longo do tempo de fermentação do ensaio 1. ....	55
Tabela B. 3- Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro após o pré-tratamento ao longo do tempo de fermentação do ensaio 2. ....	56
Tabela B. 4- Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro após o pré-tratamento ao longo do tempo de fermentação do ensaio 3. ....	57
Tabela B. 5- Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro sem pré-tratamento ao longo do tempo de fermentação do ensaio 1. ....	59
Tabela B. 6- Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro sem pré-tratamento ao longo do tempo de fermentação do ensaio 2. ....	60

Tabela B. 7- Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro sem pré-tratamento ao longo do tempo de fermentação do ensaio 3. ....	61
Tabela B. 8- Resultados obtidos para a determinação da massa específica do ar à temperatura da água.....	63
Tabela B. 9- Valores obtidos de teor alcoólico presente no licor negro após a fermentação.....	63
Tabela B. 10- Valores tabelados da massa específica da água em função da temperatura [36]. ....	64
Tabela B. 11- Valores de referência (OIV) do teor de álcool (%) tendo em conta a massa específica (g/L) (OIV-MA-AS312-01A).....	67
Tabela B. 12- Tempos e concentrações utilizadas na adaptação da levedura em meio líquido.....	69
Tabela B. 13- Contagem das células presente no inóculo do matraz 1.....	70
Tabela B. 14- Contagem das células presente no inóculo do matraz 2.....	71
Tabela B. 15 - Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro com a levedura adaptada ao longo do tempo de fermentação do ensaio 1. ....	72
Tabela B. 16 - Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro com a levedura adaptada ao longo do tempo de fermentação do ensaio 1 (continuação)..	73
Tabela B. 17 - Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro com a levedura adaptada ao longo do tempo de fermentação do ensaio 2. ....	74
Tabela B. 18- Contagem das células presente no inóculo do matraz 1.....	75
Tabela B. 19- Contagem das células presente no inóculo do matraz 2.....	75
Tabela B. 20- Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro do processo ao sulfito com a levedura adaptada para a determinação de bioetanol.....	76
Tabela B. 21- Resultados obtidos para a determinação da massa específica do ar à temperatura da água.....	76
Tabela B. 22- Valores obtidos de teor alcoólico presente no licor negro após a fermentação.....	77

## Nomenclatura

Siglas	Descrição	Unidade
%açúcar	Teor em percentagem de açúcar	
%álcool	Teor em percentagem de etanol	
%v/v	Percentagem volume por volume	
[Glucose]	Concentração de Glucose	g/L
[lenhossulfonatos]	Concentração de lenhossulfonatos	mg/L
Abs	Absorvância	
$C_f$	Concentração final	g/L
$C_i$	Concentração inicial	g/L
DNS	Ácido dinitrosalicílico	
$E_0$	Concentração produto inicial	g/L
$E_f$	Concentração produto final	g/L
H	Teor em percentagem de Humidade	%
m	Massa pesada de licor	g
Mar	Massa molecular do ar	g/mol
Mpentose	Massa molecular pentose	g/mol
MTBE	Éter metil-t-butílico	
n	número de moles	mol
P	Pressão	atm
$P_e$	Produtividade em etanol	g/L.h
R	Constante gases perfeitos	atm.L.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>
$S_f$	Concentração substrato final	g/L
$S_i$	Concentração substrato total	g/L
t	Tempo	min
T	Temperatura	°C
$t_f$	Tempo total de fermentação	horas
TMP	Processo Termomecânico	
UV/Vis	Ultravioleta-Visível	
V	Volume	mL
vs	Velocidade média consumo de substrato	g/L.h
Y e/s	Fator de conversão substrato a produto	
$\rho$	massa específica	g/L
$\Delta C$	Diferença da concentração inicial e final de açúcar	g/L



## 1 Introdução

Neste capítulo pretende-se fazer um enquadramento da indústria do papel em Portugal e na União Europeia, tendo em conta os diversos processos existentes para a sua produção.

### 1.1 Indústria do papel

O papel é definido como um material resultante de fibras individualizadas reunidas pela remoção da água. Este é produzido a partir de fibras com alto conteúdo de celulose, na grande maioria proveniente da polpa de madeira de eucalipto e pinheiro, e é um material que faz parte do dia-a-dia da grande maioria das pessoas, sendo utilizado para inúmeras funções [1] [2].

A invenção do papel é atribuída ao oficial chinês Ts'aiLun no ano 105 a.C, por meios de polpação de redes de pesca e trapo. Após as técnicas terem sido aperfeiçoadas pelos chineses, o conhecimento da maneira de fazer papel espalhou-se pela Ásia Central e Índia. O progresso técnico da produção do papel continuou na Europa, registando-se um aumento do fabrico do papel durante o século XVI [1] [2].

No início do séc. XIX, os resíduos da indústria têxtil já não podiam satisfazer as necessidades de produção devido à invenção da imprensa escrita, o que conduziu ao desenvolvimento de processos alternativos. A partir desta necessidade, as fibras de madeira surgiram como principal matéria-prima para a produção de papel [2]

Os principais constituintes das células vegetais da madeira são a celulose, a lignina e a hemicelulose [2].

A celulose é o maior constituinte da madeira que compõe cerca de 40 a 50% do peso seco da madeira. Este componente é frequentemente designado por “fibra” por ter a forma alongada e de pequeno diâmetro. A sua estrutura e composição são independentes do tipo de madeira (coníferas ou folhosas) [3].

A celulose trata-se de um polissacarídeo linear, constituído por um único tipo de unidade de açúcar, e é formada por unidades de monossacarídeos  $\beta$  - D glucose, que se ligam entre si através dos carbonos 1 e 4, originando um polímero linear. Por isso,

as macromoléculas da celulose têm uma estrutura altamente ordenada e são unidas por ligações de hidrogénio intermoleculares (Figura 1.1) [2] [4] [5].

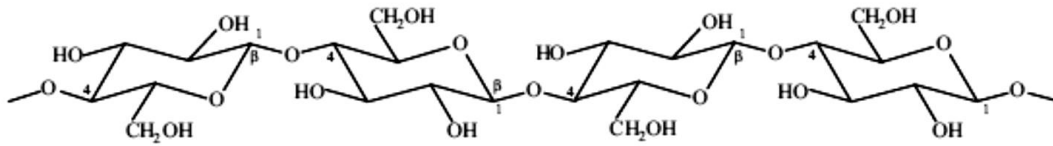


Figura 1.1- - Estrutura química da celulose [3].

A hemicelulose é um polissacarídeo ramificado com um peso molecular mais baixo que a celulose, que consiste em diferentes combinações de monómeros de pentoses e hexoses (xilose, galactose, arabinose, manose, glucose). A estrutura e composição da hemicelulose variam com o tipo de madeira, mas em média representa cerca 25 a 35% do peso da madeira [2].

Ao contrário da celulose, a hemicelulose não é cristalina, numa resistência química baixa a ácidos e a bases e é parcialmente solúvel a certos solventes [2].

Outro constituinte da madeira é a lenhina. A lenhina é um polímero amorfo de composição química complexa e que confere rigidez ao conjunto de fibras de celulose [2] [4].

A estrutura e composição da lenhina variam com o tipo de madeira. A lenhina constitui 25 a 35% nas coníferas e 18 a 25% nas folhosas. A lenhina pode ser degradada na presença de bases fortes, soluções ácidas de sulfito e outros agentes oxidantes [2].

Por último, a madeira também composta por extrativos, onde estão incluídos taninos, gorduras, ceras, fenóis e sais inorgânicos. Estes contribuem para algumas propriedades da madeira, tais como a cor, o odor, a densidade, a biodegradabilidade e a inflamabilidade [2].

## 1.2 Processos de produção do papel

### 1.2.1 Processos de produção da pasta de celulose

A preparação da pasta de celulose consiste na separação das fibras dos componentes constituintes do organismo vegetal, em particular a lenhina [4] [3].

Existem diversos processos de preparação de pasta produzindo, conseqüentemente, pastas com características diferentes. Na Figura 1.2 está

representado um processo genérico de produção da pasta de celulose independentemente dos diferentes processos possíveis de adotar.

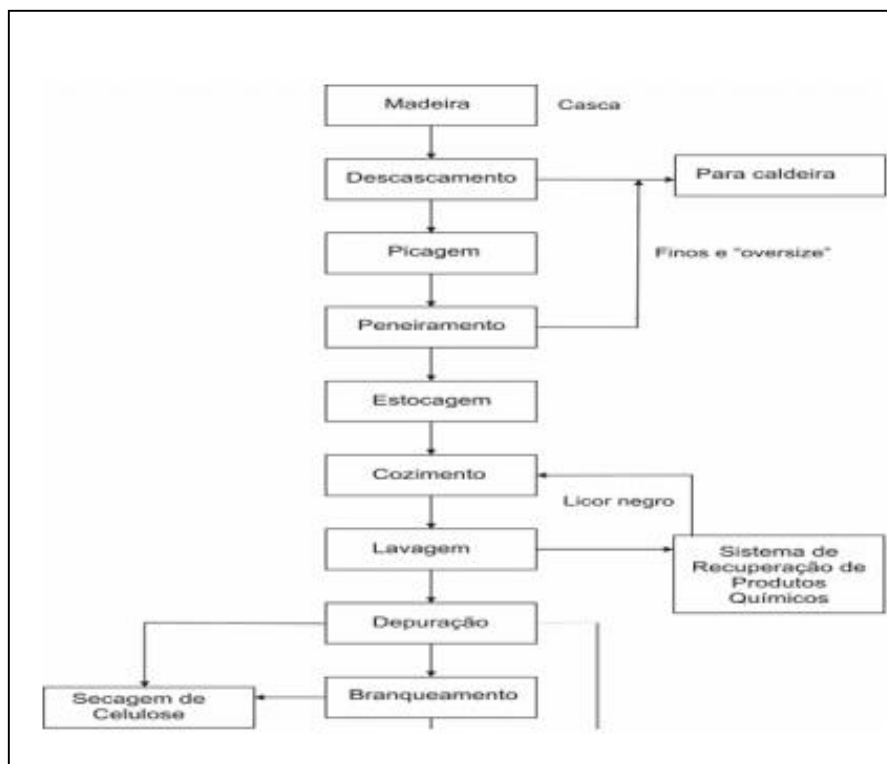


Figura 1.2-Esquema representativo do processo de obtenção da pasta de celulose [6].

Os processos são:

- Processo mecânico
- Processo Termomecânico – TMP
- Processo Semiquímico
- Processo Químico – *Kraft*
- Processo Químico – Sulfito

No processo mecânico, a madeira é prensada a húmido contra um rolo giratório cuja superfície é coberta por um material abrasivo, formando uma pasta fibrosa denominada “pasta mecânica” (*groundwood*). Este processo tem um rendimento que varia de 93 a 98 %, pois não é possível uma separação completa das fibras, obtendo-se uma pasta barata [4] [6].

O processo mecânico pode ser realizado a partir de diferentes métodos. Contudo, os métodos utilizam aproximadamente 98% do volume de madeira para produzir uma celulose com uma elevada opacidade, tendo como consequência a sua aplicação limitada, em que o papel produzido tende a escurecer (envelhecer) com rapidez, mesmo

depois de passar pela etapa de branqueamento. A pasta mecânica pura, ou em composição com outra, é muito usada para a fabricação de papel para jornal, revistas, embrulhos, por exemplo [4] [7].

No processo termomecânico, a madeira é submetida a um aquecimento com vapor (cerca de 140°C), provocando, na madeira e na lenhina, uma transição do estado rígido para o estado plástico. De seguida, a madeira passa pelo processo de desfibramento utilizando um refinador a disco. Com este tipo de processo, é possível obter um rendimento um pouco menor do que no processo mecânico, em torno dos 92 a 95 %, mas a celulose produzida tem uma maior resistência mecânica, consequentemente o papel terá uma melhor qualidade em relação ao processo mecânico [4] [8].

O processo semiquímico consiste na adição em baixas percentagens de produtos químicos para facilitar a separação das fibras, tendo um rendimento de 60 a 90 %. O mais comum desses processos é conhecido na Europa com a sigla NSSC (*neutral sulfite semi chemical*) [4] [8].

1A produção química da pasta de celulose é realizada através da remoção de lenhina da madeira. Como a lenhina é o material que atua como agente de ligação das fibras na árvore em crescimento, assim com a sua remoção, o volume de madeira utilizado diminui para 50%, produzindo fibra com uma boa resistência mas com menor opacidade [3] [6].

Atualmente o processo o processo *kraft* (sulfato) é um processo responsável por mais de 90% na produção de celulose [3].

No processo químico *kraft*, a madeira é tratada e aquecida a uma temperatura que ronda os 160-180°C num reator *batch* ou contínuo, com hidróxido de sódio e sulfureto de sódio (pH= 13-14), durante 1 a 3h. Este processo químico visa dissolver a lenhina, preservando a resistência das fibras, e obtendo-se dessa maneira uma pasta forte, com rendimento entre 50 a 60 % [3] [6] [9].

No processo químico ao sulfito, a madeira é cozida, em digestores, com soluções aquosas de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), bissulfitos (Ca(HSO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) e um excesso de ácido sulfuroso (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>). Mais recentemente usam-se também os bissulfitos de magnésio e de amónio, com a finalidade de amenizar as condições agressivas. Nesta etapa a lenhina torna-se solúvel [3] [10].

O pH é um parâmetro bastante flexível neste processo e pode ser ajustado, desde ácido até fortemente alcalino. Em ambientes ácidos ocorre também a hidrólise das hemiceluloses e o produto sólido é uma celulose bastante pura [10].

O tempo de digestão é, aproximadamente, o dobro do tempo do processo *kraft*. A vantagem do processo sulfito é a baixa carga odorante, ou seja, baixa taxa de produção de compostos voláteis de enxofre. O produto acoplado, em analogia ao processo Kraft, é um licor, conhecido como "lixívia de sulfito" ou licor negro. O destino geral deste é a incineração, após a concentração e secagem, e geração de energia para os demais processos da fábrica de celulose. Pequena parte é usada para isolar os lenhossulfonatos, os fenóis ou produzir vanilina [10].

A pasta obtida tem um rendimento entre 40 e 60 % e é muito fácil branquear, apresentando uma coloração clara que permite o seu uso mesmo sem ser branqueada. Este processo, que era muito utilizado para a confeção de papéis para imprimir e escrever, está a ser substituído pelo processo sulfato (principalmente após a introdução do dióxido de cloro no branqueamento), devido à dificuldade de regeneração dos produtos químicos e às conseqüentes contaminações das águas [4] [10].

Atualmente têm-se desenvolvido técnicas que visam o aproveitamento do alto teor em açúcares no licor negro do processo ao sulfito, transformando em etanol via processos fermentativos. Na Figura 1.3 está representado um esquema do processo químico ao sulfito [10].

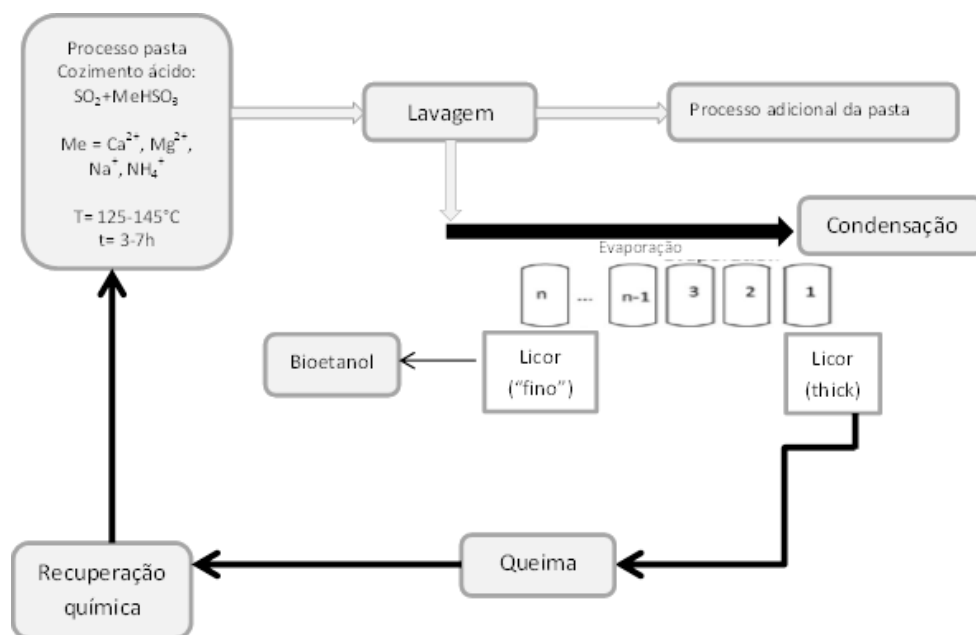


Figura 1.3- Esquema representativo do processo químico ao sulfito [3].

Inicialmente é realizado um pré-aquecimento dos fragmentos de madeira, com vapor, para expulsar o ar do seu interior, o que garante uma penetração uniforme durante o estágio de impregnação. Assim, evita-se que ocorra a condensação da lenhina e o cozimento incompleto [3] [11].

O cozimento incompleto acontece quando o ácido presente no cozimento, a temperaturas superiores a 120°C e sob pressões de vapor elevadas, penetra mais facilmente nas estilhas do que na base. Este ácido, proveniente do acumulador de alta pressão, é adicionado ao digestor a cerca de 80°C [3] [11].

De seguida, os fragmentos de madeira vão para os reatores e são aquecidos até uma determinada temperatura, devido à circulação forçada do ácido de cozimento através de um permutador de calor [3] [11].

No topo do digestor, a pressão do gás é controlada por uma válvula automática, para garantir a pressão de vapor correspondente durante o cozimento e manter o nível de SO<sub>2</sub> livre em excesso. O aumento da temperatura é feito de forma lenta, durante 2 horas, atingindo no máximo um valor entre 135-140°C, com um tempo total de cozimento entre 3-7 horas [3] [11].

No final do cozimento, o pH do licor negro fino varia entre 1.2 e 1.5 e este licor possui SO<sub>2</sub> livre em excesso. Assim, a diminuição da temperatura e da pressão é feita gradualmente, de modo a recuperar o SO<sub>2</sub> em excesso, que não foi consumido durante o cozimento [3] [11].

O branqueamento é um requisito absoluto para uma elevada qualidade. A celulose, produzida a partir de qualquer método de produção de celulose, apresenta de alguma forma uma certa aparência acastanhada e esta poderá ser branqueada até atingir um brilho mais elevado [5] [11].

O cloro no estado gasoso e o dióxido de cloro são extremamente eficazes no branqueamento de fibras de madeira. No entanto, as preocupações ambientais corresponderam a uma remoção gradual destes químicos a partir do processo de branqueamento. Os compostos de cloro não poderão ser totalmente neutralizados por meio de uma unidade de tratamento de efluentes. Sendo assim, a água tratada descarregada nos rios ou no mar, contem ainda resíduos de compostos de cloro [5].

Os químicos tipicamente utilizados no branqueamento são: Oxigénio (O<sub>2</sub>), Ozono (O<sub>3</sub>), Peróxido de Hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Para a produção mecânica de celulose, o branqueamento por peróxido é o mais comum para níveis de brilho mais elevados. Todos os resíduos destes compostos poderão ser mais facilmente tratados na unidade de efluentes e a água da descarga final não tem efeitos nefastos na vida aquática [5].

### 1.2.2 Fabrico do papel

As fibras separadas pelos processos não estão, geralmente na forma mais adequada para o fabrico do papel, sendo necessária a sua preparação. Esta preparação inclui a refinação, a adição de material não fibroso e a eventual mistura de diferentes tipos de fibras [3] [5].

A refinação consiste num tratamento mecânico que expõe as fibras, em solução aquosa, a uma ação intensiva de tensões de corte que rompe parcialmente a estrutura da fibra individual, levando à fibrilação externa e interna. Esta fibrilação facilita a entrada da água na parede da fibra, o que aumenta a superfície de exposição dos grupos hidroxilo responsáveis pelas ligações fibra-fibra e diminui a rigidez da fibra, ou seja, melhorando a flexibilidade [5].

A adição do material não-fibroso (cargas minerais, agentes de retenção e de colagem, amido, branquadores ópticos e corantes) tem como objectivo melhorar o posterior processamento das fibras e conferir as propriedades específicas desejadas ao produto final. Estes compostos são dispendiosos e, muitas das vezes, contribuem para a diminuição da resistência da folha [5].

A pasta preparada é enviada, na forma de suspensão, para a máquina de papel que varia consoante o tipo de papel a produzir. De seguida, a pasta é diluída (0,5 a 1% de consistência), é distribuída, o mais uniforme possível, na mesa de formação, onde a maior parte da água é drenada e os materiais sólidos retidos formam a folha de papel. Esta depois é sujeita a um processo de prensagem, secagem e, por último, de calandragem, para a uniformização da superfície e controlo da espessura, sendo, finalmente, enrolada em bobinas [5].

Cada processo apresenta a sua especificidade própria que está relacionada com o tipo de matéria-prima que se utiliza e com as características finais pretendidas.

### 1.3 Indústria do Papel em Portugal

O sector da Celulose, Papel e Cortiça é um dos sectores mais dinâmicos da economia portuguesa respondendo por cerca de 7% das vendas de bens ao exterior e são os principais embaixadores dos produtos portugueses nos Mercados Externos [12]

O papel e a pasta de papel representam cerca de 5% das exportações nacionais, sobretudo, devido à venda de pastas químicas, papel e cartão para escrita e usos gráficos, sendo Portugal o 4º maior produtor europeu das pastas, com uma fatia de 6,3% do total [13] [14].

Em particular, a pasta é pouco diferenciada e a concorrência é baseada no preço praticado. Desde o ano de 1997, a produção aumentou 15% e a Alemanha e a Espanha são os destinos mais habituais. Quanto ao papel, o mercado é mais diferenciável e a qualidade dos produtos desempenha um papel discriminatório na compra dos mesmos, não sendo estes escolhidos unicamente pelo preço praticado. Em 2010, Portugal atingiu um máximo na produção de pastas registando-se um crescimento na produção de papel na ordem dos 55% (Figura 1.4) [15].

As principais empresas nacionais, neste ramo, são o Grupo Portucel Soporcel e a Altri, sendo que a última se dedica apenas à produção e venda de pasta [13].

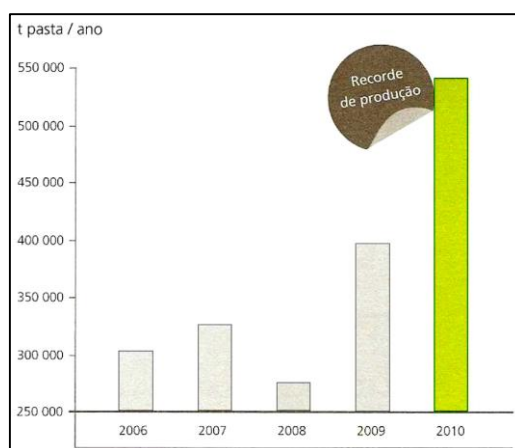


Figura 1.4- Produção de pasta [15].

## 1.4 Indústria do Papel Mundial

O mercado da pasta foi, em 2007, fortemente afetado pela conjuntura económica adversa que condiciona o consumo. Os papéis finos não ficaram naturalmente imunes a este quadro, apresentando uma quebra tanto na Europa como nos EUA, não compensada pelos ganhos nos mercados emergentes [13].

As restrições na disponibilidade de fibra na Europa, Indonésia e América do Norte tiveram um forte impacto no custo e a oferta de pasta sofreu perturbações. De positivo, regista-se o crescimento da capacidade de produção na América Latina, na ordem de 1.8 milhões de toneladas anuais [13].

Quanto ao consumo (tanto de pasta como de papel), os Estados Unidos lideram (27%), seguindo-se China (13%), Japão (9%), Alemanha (6%) e Reino Unido (4%). Canadá, Finlândia e Suécia distinguiram-se pela quantidade que exportaram, enquanto

Estados Unidos, China, Alemanha, Inglaterra, França e Espanha o fizeram pela quantidade que importaram [13].



## 2 Contexto e estado de arte

Atualmente, o mundo está a enfrentar uma redução global nos recursos fósseis, enquanto há um crescimento progressivo de exigências energéticas. Com o objetivo em responder às necessidades e à minimização dos impactos ambientais, existe um interesse considerável em alternativas para a produção de combustíveis e químicos de matérias-primas de origem renovável [16].

Do tratamento da madeira resulta a pasta crua e uma solução escura que se designa por licor negro. Este apresenta diversas propriedades, como a composição química, densidade, calor específico e viscosidade, essenciais para a recuperação de químicos e de energia [16].

### 2.1 Madeiras Coníferas e Folhosas

A madeira usada para a produção de pasta de papel pode ser proveniente de coníferas ou de folhosas. As coníferas (softwoods) são plantas gimnospéricas, como o pinheiro, enquanto as folhosas (*hardwoods*) são angiospermas e o seu tecido lenhoso é mais complexo que o das coníferas. Exemplo deste tipo de madeira é o *Eucalyptus globulus* [3] [17].

As diferenças destes dois tipos de madeiras estão presentes na morfologia fibrosa e na composição química. Apesar das fibras serem compostas pelos mesmos compostos (celulose, hemicelulose, lenhina e menores quantidades de extratos e inorgânicos), as suas proporções e características estruturais são notavelmente diferentes. As coníferas contêm um pouco menos celulose que as folhosas [3].

A maioria das hemiceluloses provenientes das folhosas são pentoses e nas coníferas são, essencialmente, hexoses [3].

### 2.2 *Eucalyptus globulus*

O *Eucalyptus globulus* é uma *hardwood* e é uma espécie de Eucalipto muito procurada para a produção de pastas de celuloses, devido ao seu curto período de crescimento (que varia entre 10 a 15 anos) e ao seu baixo teor de celulose e de lenhina, o que o torna ideal para a produção de pastas com elevados rendimentos sem adição de elevadas quantidades de agentes de cozimento [11].

O *E. globulus* é constituído essencialmente por celulose, extrativos, lenhina, açúcares e ácidos urónicos. Na Tabela 2.1 encontra-se descrita a composição do *E. globulus* [3] [18].

Tabela 2.1-Composição química de *E.globulus*, em % de matéria seca [3] [18]

	<b>Celulose (%)</b>	<b>Extrativos (%)</b>	<b>Lenhina (%)</b>	<b>Açúcares (%)</b>	<b>Ácidos Urónicos (%)</b>
<b><i>Eucalyptus Globulus</i></b>	50,0-53,0	1,0-2,7	19,0-22,0	16,5-24,2	5,8

Na Tabela 2.2 está apresentada a composição em monossacarídeos do *E. globulus* [18].

Tabela 2.2- Composição em monossacarídeos de *E. globulus*, em % de matéria seca [18].

	<b>Arabinose (%)</b>	<b>Xilose (%)</b>	<b>Manose (%)</b>	<b>Galactose (%)</b>	<b>Glucose (%)</b>
<b><i>Eucalyptus Globulus</i></b>	0,4	14,2	1,1	1,5	53,4

## 2.3 Licor negro

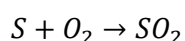
Licor negro é um subproduto do processo de tratamento químico da indústria de papel e celulose. Este licor é constituído por 60% de matéria orgânica (açúcares), madeira separada durante o cozimento e resíduos de madeira dissolvida (lenhina), e 40% de matéria inorgânica, mistura de compostos químicos inorgânicos de digestão. Os açúcares são um substrato importante para a fermentação, apesar da necessidade de purificar para a eliminação dos inibidores microbianos [16] [19].

Nem todos os licores produzidos no processo da celulose são sustentáveis como substratos para a fermentação. Por exemplo, o licor negro proveniente do processo

Kraft, responsável por 90% da produção da celulose em todo mundo, no entanto a sua composição química não adequada para a produção de bioetanol [3].

O licor negro do processo ao sulfito provém da reação de bissulfito de cálcio e um excesso de ácido sulfuroso ( $H_2SO_3$ ) com a lenhina. Atualmente tem-se substituído o cálcio por sódio, amónia ou magnésio, por causa da difícil procura e recuperação dos produtos químicos envolvidos [3].

O processo ao sulfito inicia-se com a queima de enxofre em queimadores adequados para se obter dióxido de enxofre ( $SO_2$ ) [20].



Equação 1

De seguida, é necessário arrefecer rapidamente o  $SO_2$  produzido até aos  $40^\circ C$ . Este arrefecimento tem que ser controlado para não se formar  $SO_3$ , o que provocaria uma maior corrosão do equipamento e uma má qualidade do licor. Depois de arrefecido, o  $SO_2$  reage em contracorrente com soluções ou suspensões de  $NaOH$ ,  $Ca(OH)_2$ ,  $Mg(OH)_2$  ou  $NH_4OH$  num digestor [20].

A quantidade de  $SO_2$  existente na solução final estabelece o pH, pois um excesso de  $SO_2$  conduz a um licor neutro ou ácido, com formação de bissulfito (ex.  $NaHSO_3$  ou  $Ca(HSO_3)_2$ ) [20].

O licor negro do processo ao sulfito possui variações na sua constituição, pois depende da matéria- prima usada, ou seja, da espécie e idade da madeira, e das condições e rendimento da etapa da polpação na produção das pastas de celulose. Este é considerado um resíduo problemático devido à severidade química da etapa de produção da polpa, pois causa adversos impactos ambientais no controlo biológico nas estações de tratamento de efluentes, derrames e emissões atmosféricas [21]

As propriedades que têm maior importância, no processo de recuperação de substâncias químicas e no processo de geração de energia, são composição química, densidade, ponto de ebulição, calor específico, viscosidade, condutividade térmica e tensão superficial. Na Tabela 2.3 estão apresentadas algumas propriedades do licor negro do processo ao sulfito [19].

Tabela 2.3- Valores das características e das diferentes propriedades do licor negro do processo ao sulfito fornecidos pela empresa [21] [22].

Parâmetros	
Matéria seca (%)	57±2
pH	4±1
Viscosidade (22,5°C) (mPa.s)	2800
Densidade T <sub>amb</sub> (g/cm <sup>3</sup> )	1,33
Poder calorífico (kcal/kg)	2860
Teor Açúcares redutores (%)	11 (valor típico)
	13 (valor máximo)
Teor Cloretos (%)	0,16 (valor típico)
	0,22 (valor máximo)
Teor de Alcalis (%)	0,17
Solubilidade em água	Em todas as proporções
Solubilidade em solventes orgânicos	Insolúvel em não polares

O poder calorífico deste licor está relacionado com o aumento do teor de lenhina, uma vez que a lenhina contém menos oxigénio que os polissacarídeos da celulose e hemicelulose, o que aumenta as percentagens de carbono e, conseqüentemente, o poder calorífico [21].

## 2.4 Valorização do licor negro

Atualmente existe uma enorme necessidade em reduzir a dependência em combustíveis fósseis, de modo a reduzir as emissões gasosas responsáveis pelas alterações climáticas. Para tal tem havido um enorme investimento no setor da celulose em novas tecnologias, pois o licor negro é indispensável e eficiente na produção de bioenergia, sendo utilizado como uma fonte de energia térmica das indústrias de celulose [23]

A produção de proteína microbiana, de biopolímeros como polihidroxicanoatos ou celulose bacteriana e de ácidos orgânicos voláteis poderão ser outras maneiras de valorização do licor negro [23].

Como o licor negro é rico em açúcares e em ácido acético, este pode ser usado para a produção de biopolímeros, tais como os polihidroxicanoatos (PHAs) e para

melhorar a sustentabilidade da indústria de celulose, será possível integrar a produção de bioetanol após a produção da proteína microbiana [23].

O licor também pode ser utilizado como substrato no processo de acidificação. Este processo é um dos passos intermédios que constituem a digestão anaeróbia que permite converter material orgânico em metano e dióxido de carbono na ausência de oxigénio [23].

A acidificação produz ácidos orgânicos voláteis como o acético, o propiónico, o láctico e o fórmico, em que estes ácidos podem ser utilizados na produção de PHAs [23].

### 2.4.1 Bioetanol

O bioetanol, também designado por etanol ou álcool etílico, é um álcool formado a partir da fermentação de açúcares. O aumento na sua produção está diretamente relacionado com a constante preocupação ambiental e com a escassez dos combustíveis fósseis, pois trata-se de um biocombustível produzido a partir de biomassa renovável. Na Figura 2.1 está representado a molécula do bioetanol [24]

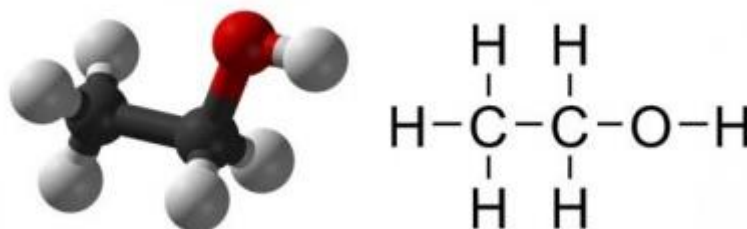


Figura 2.1-Representação da molécula do bioetanol [25]

O bioetanol tem inúmeras vantagens, tais como, baixa toxicidade e baixas percentagens de emissões de gases de estufa, o que contribui para uma redução da poluição local do ar. O bioetanol é considerado biodegradável, protegendo, assim, o solo e a água e não é dependente dos combustíveis fósseis [24].

O bioetanol puro (álcool anidro) é muito utilizado na indústria, sendo matéria-prima de tintas, solventes e aerossóis. Pode ser usado como componente da gasolina, uma realidade já existente nos EUA, em que a gasolina contém 10 % de bioetanol. A UE apresentou, em 2007, uma medida idêntica, estabelecendo que a gasolina e o gasóleo devem conter 10 % de biocombustíveis, não havendo uma especificação do tipo de biocombustível usado [24] [26].

Outra aplicação do bioetanol é a substituição do MTBE, por este ser bastante tóxico. O MTBE é a sigla de metil terc-butil éter, um aditivo bastante comum na gasolina, até há alguns anos [24].

Já o bioetanol hidratado (etanol com cerca de 5% de água) é utilizado na produção de bebidas, alimentos, cosméticos, aromatizantes, produtos de limpeza, remédios, vacinas e como combustível de veículos [26].

As principais desvantagens do uso de bioetanol, como combustível, são o uso de matéria-prima considerada alimentar, o que aumenta o preço desses mesmos alimentos, conduz a um desgaste considerável dos solos e, conseqüentemente, num distúrbio social. Por estas razões, os esforços de investigação estão focados no uso de resíduos provenientes da silvicultura, da agricultura e da indústria, ricos em biomassa [3] [24].

A produção de bioetanol pode designar-se de 1ª e 2ª geração, dependendo do tipo de matéria-prima. Na 1ª geração há a conversão direta (ex: cana-de-açúcar e milho) e indireta e consiste na conversão dos açúcares ou amido de várias culturas alimentares. Enquanto na 2ª geração, o bioetanol é obtido por conversão indireta de material lenho-celulósico, contido na biomassa vegetal ou de subprodutos industriais [3] [24].

Neste trabalho a produção de bioetanol é classificada de 2ª geração, pois o etanol será obtido a partir do licor negro do processo ao sulfito, um subproduto industrial, o que torna o processo mais económico.

### ➤ **Processo de obtenção de bioetanol**

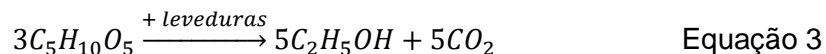
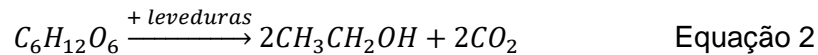
As primeiras etapas do processo de obtenção de bioetanol são, normalmente, o pré-tratamento físico, químico e/ou biológico da matéria-prima e a hidrólise enzimática, seguindo-se a fermentação e, por último, a destilação. Neste estudo não será necessário realizar o pré-tratamento nem a hidrólise enzimática visto que os açúcares presentes no licor negro já se encontram reduzidos.

#### ✓ **Fermentação**

A fermentação consiste num processo químico de alto valor energético, cujas moléculas, como a glucose, são quebradas sem a intervenção do oxigénio [27] [28].

Para que o processo de fermentação seja adequado é necessário a utilização de microrganismos sustentáveis e de condições específicas, tais como o ajuste da concentração de nutriente fornecido à levedura.

A fermentação realizada neste trabalho denomina-se por fermentação alcoólica consiste na conversão dos açúcares extraídos (glucose, xilose e arabinose) em etanol utilizando leveduras (Equação2) [24].



A molécula de glucose ou outra hexose é convertida pelas leveduras em duas moléculas de etanol e duas moléculas de dióxido de carbono, tal como está representado na Equação 2. Enquanto na Equação 3, estão as três moléculas de xilose ou arabinose (pentoses), visto que apresentam a mesma fórmula química, a serem convertidas pelas leveduras em moléculas de etanol e de dióxido de carbono [24].

Tal como referido anteriormente, o processo de fermentação deve ser realizado nas condições adequadas, pois existem diversos fatores que influenciam o crescimento dos microrganismos, tais como o pH, a temperatura, a tolerância ao etanol, o ajuste da concentração de nutriente e a percentagem de oxigénio no meio.

Relativamente à tolerância de etanol, para certas leveduras, concentrações superiores a 6% (m/v) impedem que haja crescimento dos microrganismos [30]

Normalmente, a resistência da levedura diminui com o aumento da temperatura, pois esta afeta a tolerância ao etanol do meio [30].

Em algumas leveduras, a presença de oxigénio inibe o desenvolvimento do processo de fermentação porque conduz à produção de inibidores do consumo do substrato e, conseqüentemente, da fermentação [28].

A utilização de um pH ácido (4,5-5,5) tem como objetivo a redução da possibilidade de contaminação por outros microrganismos [28].

A adição de nutrientes ao meio, como o azoto e o fósforo, torna-se indispensável, uma vez que são macronutrientes [28].

Por último, a concentração de açúcar é um fator importante que influencia o desenvolvimento adequado da fermentação. O aumento da produção da percentagem de etanol é conseqüência do aumento da concentração de açúcar. No entanto, se este aumento for demasiado elevado pode causar *stress* osmótico [30].

A levedura mais utilizada na produção de bioetanol é a *Saccharomyces cerevisiae*, mais conhecido como fermento de padeiro. No entanto, esta não é capaz de utilizar a xilose como única fonte de carbono e fermentar as pentoses por si só, pois apresentam uma taxa de produção de etanol, a partir de xilose, 10 vezes inferior à verificada para a glucose. Como tal, neste presente trabalho, a levedura utilizada é a *Scheffersomyces stipitis* [3] [23] [24].

✓ *Scheffersomyces stipitis*

A *Scheffersomyces stipitis*, habitualmente conhecida como *Pichia stipitis*, é uma levedura homotática, normalmente, conhecida pela sua capacidade para fermentar açúcares, mais especificamente pentoses. Esta levedura possui uma melhor capacidade respiratória em relação à *Saccharomyces cerevisiae* devido à presença de um sistema respiratório alternativo [31].

O habitat adequado para o crescimento da levedura *S. stipitis* tem que ser húmido e rico em biomassa orgânica, sendo as florestas de madeira ou áreas ricas em resíduos agrícolas os ambientes mais comuns. A sua temperatura de crescimento está compreendida entre 25°C e 37°C. A levedura *S. stipitis* apresenta uma melhor capacidade de fermentação em concentrações de ácido acético menores que 9 g/L [32] [33].

Diversos estudos foram realizados para analisarem a capacidade e a evolução da *S. stipitis* na produção de bioetanol usando o licor negro do processo ao sulfito. Nesses estudos, a *S. stipitis* apresentou uma boa capacidade para fermentar os açúcares redutores para a produção de bioetanol, após o licor negro do processo ao sulfito sofrer um pré-tratamento através de resinas de permuta iónica. Este pré-tratamento tem como objectivo a remoção dos diversos inibidores no processo de fermentação permitindo melhores rendimentos. No entanto, o uso da levedura *S. stipitis* para a produção de bioetanol apresenta valores baixos em termos de rendimento e eficiência na conversão dos açúcares redutores, sendo a sua otimização o principal objetivo em trabalhos futuros [33].

A otimização da tolerância da *S. stipitis* ao licor negro proveniente do *Eucalyptus globulus* também foi o objeto de estudo noutra trabalho. Para isso, a fermentação foi realizada num reator perfeitamente agitado (CSTR) com condições controladas e concentrações crescentes de licor negro do processo ao sulfito. A levedura *S. stipitis* apresenta melhorias significativas nas taxas de absorção de substrato e a eficiência de conversão a etanol quando adaptada ao licor, apresentando, assim, uma vantagem

importante na fermentação dos açúcares do licor negro do processo ao sulfito, que pode conduzir à aplicação industrial de *S. stipitis* em biorefinarias [31].

A levedura *S. stipitis* é importante para indústria de combustíveis e de bioenergias alternativas, pois esta levedura produz etanol através da fermentação da xilose, um monossacarídeo bastante abundante na composição da madeira, com rendimentos elevados em relação a outros microrganismos [32].

#### ✓ Destilação

A última etapa do processo de produção de bioetanol é a destilação e consiste na separação do etanol dos restantes produtos da fermentação de modo a purificá-lo o máximo possível ( $\approx 95\%$ ). Para aumentar a concentração de etanol até  $99,5\%$  basta adicionar uma pequena quantidade de benzeno ou ciclohexano quebrando a ligação do azeótropo etanol-água [24].

Os métodos mais usuais para esta separação são a destilação azeotrópica, a destilação extrativa, a fermentação extrativa, a separação por adsorção e a separação por membranas [24].



### 3 Procedimentos

Neste capítulo serão descritos os procedimentos e os equipamentos utilizados para a caraterização do licor negro, assim como a fermentação e destilação do mesmo para a produção de bioetanol.

#### 3.1 Caracterização do Licor negro

Para a caracterização do licor negro foi necessário analisar alguns dos seus principais parâmetros, tais como o pH, teor de humidade, teor de cinzas, teor de lenhossulfonatos, teor em açúcares e a sua respetiva massa específica.

##### ✓ pH

O pH foi medido através de um potenciómetro.

Procedimento.

- Calibrar o potenciómetro com soluções tampão pH 4 e pH 7;
- Emergir o eléctrodo no licor negro e fazer a leitura depois do valor estabilizar.

##### ✓ Teor de humidade

O teor de humidade foi determinado por método direto.

Procedimento

- Medir e pesar 5mL de licor num cadinho;
- Colocar numa estufa a  $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , durante 2h;
- De seguida, colocar num exsiccador durante 1h para estabilizar a temperatura;
- Pesar a amostra seca;
- Repetir os ciclos de secagem na estufa e arrefecimento em exsiccador até peso constante.

### ✓ **Teor de cinzas**

O teor de cinzas foi analisado através do procedimento descrito no Standard Methods numa Mufla (Vulcan A-550) [34].

#### Procedimento

- Pesar o cadinho previamente seco na Mufla a 550°C;
- Medir e pesar 5mL de licor num cadinho;
- Colocar a amostra numa estufa a 105°C até à secagem da amostra e arrefecimento no exsiccador, ou seja, até a estabilização da temperatura e pesagem;
- Colocar a amostra seca na Mufla de modo a esta ser queimada, durante 1 h a 550 °C;
- De seguida, colocar no exsiccador durante 1h e pesar as cinzas;
- Repetir os ciclos de queima na Mufla durante 1 h, arrefecimento no exsiccador até a temperatura estabilizar e pesagem, até peso constante.

### ✓ **Teor de lenhossulfonatos**

O equipamento empregado para a determinação do teor de lenhossulfonatos foi o espectrofotómetro UV/Vis (Shimadzu UV-160<sup>a</sup>). Neste ensaio específico, o comprimento de onda utilizado foi 273 nm.

#### Procedimento

- Preparar os padrões com diferentes concentrações de lenhossulfonatos de sódio numa gama de 5 a 100 mg/L;
- Diluir 10000x a solução amostra de licor negro;
- Traçar a curva de calibração (absorvância versus concentração) no espectrofotómetro (Shimadzu UV-160<sup>a</sup>);
- Ler a absorvância da amostra.

✓ **Massa específica**

Esta propriedade do licor negro foi determinada através do método picnometria.

Procedimento

- Pesar o picnómetro vazio (com a tampa);
- Manter água destilada em banho termostático a uma temperatura de 20°C;
- Pesar o picnómetro cheio com a água destilada à 20°C;
- Por último, pesar o picnómetro cheio com o licor negro a 20°C.

✓ **Determinação de açúcares totais pelo método de DNS**

O método de DNS, ácido dinitrosalicílico, consiste na reação do açúcar redutor com o ácido 3,5- dinitrosalicílico. Este apresenta uma cor amarelada e é reduzido para ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (cor avermelhada), oxidando o monossacarídeo redutor.

Procedimentos

→ Curva de calibração utilizando a glucose como padrão

- Preparar os padrões com diferentes concentrações de glucose numa gama de 0,1 a 2,0 g/L;
- Adicionar 1mL de DNS a 1mL do padrão de glucose no tubo.
- Aquecer, em banho-maria a 100°C, durante 5min;
- Arrefecer, adicionando 10mL de água destilada;
- Ler a absorvância ( $\lambda=540\text{nm}$ ) no espectrofotómetro (Shimadzu UV-160<sup>a</sup>).

→ Determinação do teor de açúcar do licor negro

- Diluir o licor 200x e 250x;
- Num tubo, adicionar 1mL de licor diluído e 1mL de DNS. Prepara-se uma outra amostra em que se substitui o DNS por água destilada, tendo como objetivo a execução do branco com o licor negro diluído.
- Aquecer, em banho-maria a 100°C, durante 5min;
- Arrefecer, adicionando 10mL de água destilada;

- Ler a absorvância ( $\lambda=540\text{nm}$ ), do branco e da amostra, no espectrofotómetro (Shimadzu UV-160<sup>a</sup>).

Na Figura 3.1 estão representados os tubos utilizados com diferentes diluições do licor para a determinação dos açúcares pelo método DNS.



Figura 3. 1- Determinação dos açúcares presentes no licor negro pelo método DNS.

### 3.2 Fermentação, pré e pós- tratamentos

As etapas do processo de valorização do licor são normalmente, o pré-tratamento físico, químico e/ou biológico da matéria-prima, seguindo-se a fermentação e, por último, a destilação para a produção de bioetanol.

#### ✓ **Microrganismo e condições de armazenamento**

Microrganismo: neste trabalho foi utilizada a levedura *Scheffersomyces stipitis* (estirpe 1541). A estirpe foi originalmente obtida da *National Collection of Yeast Cultures* (NCYC), Reino Unido. A levedura foi mantida a 4°C, em caixas contendo YEPD-agar: 1% (m/v) de extrato de levedura, 2% (m/v) de peptona, 2% (m/v) de glucose e 2% (m/v) de agar-agar.

✓ **Preparação do inóculo**

Procedimento

- Preparar YEPD como acima descrito (exceto glucose a 4% (m/v));
- Transferir 10mL do meio de cultura para tubos de ensaio;
- Esterilizar na autoclave durante 20min a 121°C.
- Num tubo com 10mL da solução anteriormente preparada, transferir a levedura com auxílio de uma ansa e colocar na estufa a 30°C durante 24h.

✓ **Preparação da solução “fortificante”**

Procedimento

- Em 100mL de água destilada, adicionar 8g peptona e 4g extracto de levedura;
- Esterilizar na autoclave durante 20min a 121°C.

✓ **Pré-tratamento**

Como pré-tratamento, o licor negro passou por duas resinas, catiónica e aniónica, respetivamente. A resina catiónica teve como função eliminar os catiões, como o  $Mg^{2+}$ , enquanto a resina aniónica reduziu a concentração dos aniões, como os lenhossulfonatos, o ácido acético e compostos fenólicos. As resinas utilizadas neste procedimento experimental foram Dowex 50W-X8 (catiónica) e Purolite A111S (aniónica).

Procedeu-se a montagem do equipamento de acordo com o esquema da Figura 3.2.

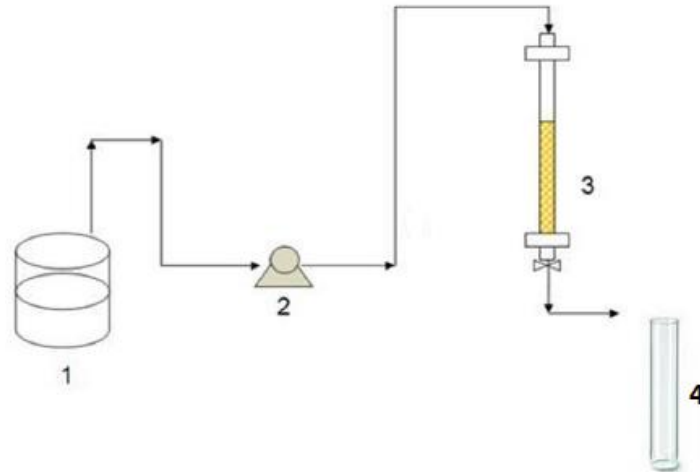


Figura 3. 2- Esquema da montagem experimental da permuta iónica.

#### Legenda

1. Recipiente de alimentação com o licor negro do processo ao sulfito diluído;
2. Bomba peristáltica;
3. Coluna de leito fixo com resina;
4. Recipiente de recolha (tubo de ensaio).

#### Procedimento

- Passar pelo interior da coluna, que contém a resina permutadora, o licor negro do processo ao sulfito diluído, através de uma bomba peristáltica.
- Após a passagem pela coluna, a solução é recolhida num tubo de ensaio.

O licor negro é diluído 5x antes de passar na resina catiónica. Na resina aniónica, a solução de licor de alimentação é a fração inicial de volume recolhido no ensaio da resina catiónica, pois é esta fração de volume que contém quantidades reduzidas de  $Mg^{2+}$ . Após esta consideração, realiza-se o procedimento descrito anteriormente. Usando agora um leito de resina aniónica. No final segue para a fermentação as frações com concentrações de lenhossulfonatos inferiores a 5 g/L, garantindo assim que a concentração em ácido acético é muito reduzida.

✓ **Fermentação com leveduras não adaptadas**

Procedimento

- Num matraz, adicionar 10mL de inóculo, 10mL de “fortificante” e 20mL de licor diluído. Para a diluição do licor sem pré-tratamento, mediu-se e pesou-se 80mL de licor e adicionou-se 100mL de água destilada;
- Colocar na estufa a 30°C. No caso do licor negro pré-tratado permaneceu na estufa durante 2 dias, enquanto foram necessários 5 dias para o licor sem pré-tratamento.
- Tirar amostras ao longo do tempo;
- Determinar os açúcares através do método de DNS.

✓ **Esterilização do licor negro**

Como o licor negro degrada com temperaturas elevadas, a sua esterilização foi efetuada por filtração (filtro de 0.45 µm de porosidade).

Procedimento

- Através de um sistema de filtração previamente esterilizado na autoclave durante 20min a 121°C, filtrar o licor negro diluído;

✓ **Adaptação da levedura, utilizando o licor negro como fonte de carbono**

Procedimento

- Preparar 10mL de inóculo com a levedura e colocar na estufa a 30°C durante 5 dias;
- Transferir 2mL desse inóculo para um matraz com 20mL de licor negro diluído estéril e 10mL de “fortificante”;
- Colocar na estufa a 30°C durante 2 dias;
- Ao fim de 2 dias, transferir 2mL de solução do último matraz para outro com 20mL de licor estéril com a mesma concentração de açúcar e 10mL de “fortificante”;

- Aumentar a concentração de açúcar presente no licor, se ao fim do tempo se verificar crescimento da levedura. Dada a cor escura do meio de cultura, o crescimento foi avaliado, qualitativamente, por microscopia.

No anexo B.5 estão apresentados os tempos e as concentrações utilizados neste procedimento.

#### ✓ **Fermentação com leveduras adaptadas**

##### Procedimento

- Determinar, em câmara contagem, a concentração de células presente no inóculo para definir o volume necessário a usar de inóculo na fermentação. No anexo B.6 encontram-se apresentados os cálculos efetuados para a determinação do volume necessário.
- Num matraz, adicionar o volume necessário de inóculo, 20mL de “fortificante” e 40mL de licor negro diluído estéril, em que a concentração de açúcares do mesmo seja 50 g/L;
- Colocar na estufa a 30°C durante 7 dias;
- Tirar amostras ao longo do tempo;
- Determinar os açúcares através do método de DNS.

#### ✓ **Preparação do meio sólido de licor negro para a adaptação da levedura**

##### Procedimento

- Num frasco, pesar 1,2g de agár-agár e adicionar 20mL de solução de “fortificante”;
- Fundir o agár por aquecimento e esterilizar na autoclave a 121°C durante 20minutos;
- Arrefecer em banho-maria a 60°C;
- De seguida, juntar 40mL de licor negro esterilizado com a última concentração utilizada na adaptação da levedura em meio líquido, cerca de 50g/L;
- Misturar e distribuir nas diferentes caixas de Petri;
- Arrefecer e colocar, durante 30min, no U.V;

- Por último, isolar a levedura, pelo método do riscado, na caixa de Petri.

### ✓ Destilação

#### Procedimento

- Colocar o licor negro previamente fermentado num balão de destilação usado na instalação;
- Ligar a manta de aquecimento;
- Num balão volumétrico de 100,00 mL, recolher o destilado e finalizar a destilação quando este for igual a  $\frac{2}{3}$  do volume do balão volumétrico;
- Acrescentar água destilada até perfazer o volume do balão volumétrico usado na recolha do destilado;
- Por último, medir a densidade do destilado por picnometria.

Na Figura 3.3 encontra-se representada a montagem da instalação efetuada no procedimento da destilação para a determinação do teor de álcool.



Figura 3. 3- Montagem da instalação efetuada no procedimento da destilação.



## 4 Resultados e Discussão

As propriedades físicas do licor negro são função da sua composição química e são estas propriedades que determinam o comportamento do licor. Como já referido, para a caraterização do licor negro foi necessário determinar o pH, o teor de humidade, de cinzas, de lenhossulfonatos e, por último, de açúcar. Na Tabela 4.1 estão apresentados os resultados obtidos dos diferentes parâmetros analisados e os respetivos valores fornecidos presentes na Tabela 2.3.

Tabela 4. 1- Resultados obtidos na caraterização do licor negro e os respetivos valores facultados pela empresa.

	Valores obtidos	Valores fornecidos
pH	2,73	4±1
Teor Humidade (%)	40,3	43±2
Teor Cinzas (%)	10,2	-
Massa específica (g/L)	1,29	1,33
Teor lenhossulfonatos (g/L)	335	-
Teor açúcares (%)	29	11

Através da análise da Tabela 4.1 pode-se verificar que o licor negro analisado apresenta um pH mais ácido e um teor de açúcar muito mais elevado em relação ao valor típico indicado e o valor da massa específica obtida é ligeiramente inferior ao valor facultado pela empresa. Em relação aos outros parâmetros determinados, estes estão em concordância com os valores facultados pela empresa.

Em relação ao valor do teor de açúcares obtido, este é bastante mais elevado comparativamente ao valor facultado pela empresa, o que deveria ter dado uma massa específica mais elevada em relação à massa específica facultada. No entanto, não dá para fazer uma comparação mais pormenorizada, pois não se conhece o teor de lenhossulfonatos deste licor negro do processo ao sulfito.

Para que o processo de processo de fermentação fosse realizado nas devidas condições, foi necessário o licor negro do processo ao sulfito sofrer um pré-tratamento para a redução da concentração do ácido acético existente no licor.

Como já referido anteriormente, o pré-tratamento utilizado foi a passagem do licor em duas resinas de permuta iónica fortes, catiónica e aniónica. Este pré-tratamento teve

como objetivo a eliminação dos catiões de magnésio na resina catiónica e a redução da concentração dos lenhossulfonatos e do ácido acético.

Neste ensaio as resinas utilizadas foram Dowex 50W-X8 (catiónica) e Purolite A111S (aniónica). Na resina catiónica regenerada em  $H^+$  usou-se um caudal de 4,5 mL/min para uma altura da resina de 36 cm. Para a resina aniónica regenerada em  $OH^-$ , o caudal utilizado foi 2,3 mL/min para uma altura de resina 29,6 cm.

Na Figura 4.1 encontra-se a curva de rutura do leito de resina aniónica obtida. A concentração inicial de lenhossulfonatos do licor negro do processo ao sulfito no ensaio da permuta aniónica era 72 g/L.

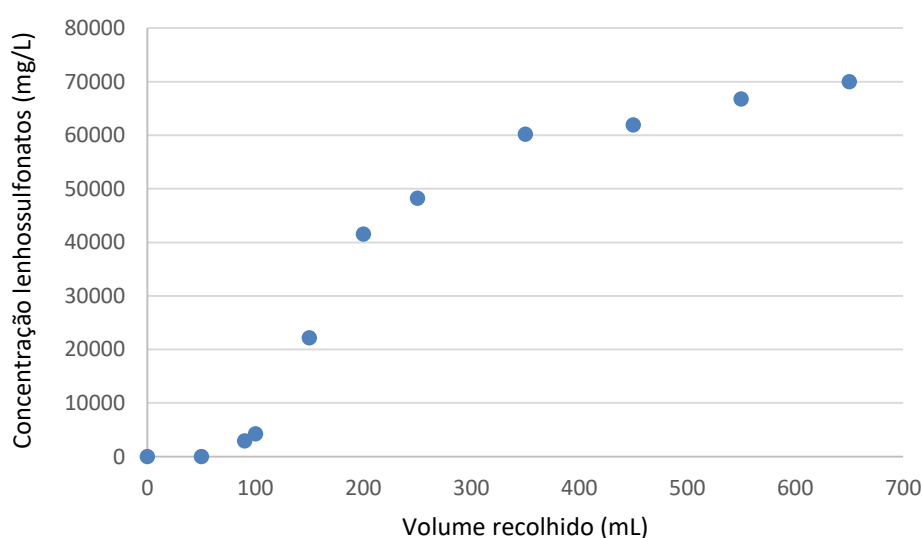


Figura 4. 1- Curva de rutura do leito de resina aniónica, concentração de lenhossulfonatos (mg/L) em função do volume recolhido (\*).

Para os ensaios de fermentação foi utilizada a fracção inicial de volume recolhido, cerca de 150 mL, que corresponde uma concentração média 5g/L de lenhossulfonatos. Embora não se tenha medido a concentração de ácido acético, esta deverá ser baixa, pois o ião acetato é retido preferencialmente, em relação ao lenhossulfonato, pela resina e, portanto na fracção de licor usada nos ensaios de fermentação deverá uma concentração baixa de ácido acético. Não se conseguiu determinar a concentração de ácido acético presente no licor por não se dispor do equipamento adequado.

Após o ensaio de pré-tratamento com as resinas de permuta iónicas, procedeu-se à determinação da concentração dos açúcares nas fracções iniciais dos volumes

recolhidos da curva de rutura de cada resina. Os valores obtidos encontram-se apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4. 2- Concentração de açúcar nas frações iniciais dos volumes recolhidos antes da rutura da curva das resinas iónicas.

<i>Descrição</i>	<i>Concentração média licor (g/L)</i>
Alimentação da coluna catiónica	65,22
Saída da coluna catiónica (zona inicial do ensaio)	55,40
Alimentação da coluna aniónica	52,58
Saída da coluna aniónica (zona inicial do ensaio)	51,60

Tal como se pode verificar pelos valores obtidos apresentados na Tabela 4.2, há uma redução do teor de açúcares com a passagem do licor negro do processo ao sulfito nas resinas de permuta iónica, cerca de 21%, sendo uma desvantagem deste pré-tratamento, tal como já foi demonstrado em estudos anteriores [16].

Para a valorização do licor negro foram realizados diversos ensaios tendo como objetivo analisar o comportamento do licor na fermentação dos açúcares para a conversão em bioetanol.

Na Figura 4.2 está a representação gráfica dos valores obtidos dos 3 ensaios de fermentação do licor negro pré-tratado com a passagem pelas 2 resinas, catiónica e aniónica, respetivamente. Estes ensaios tiveram a duração de 2 dias.

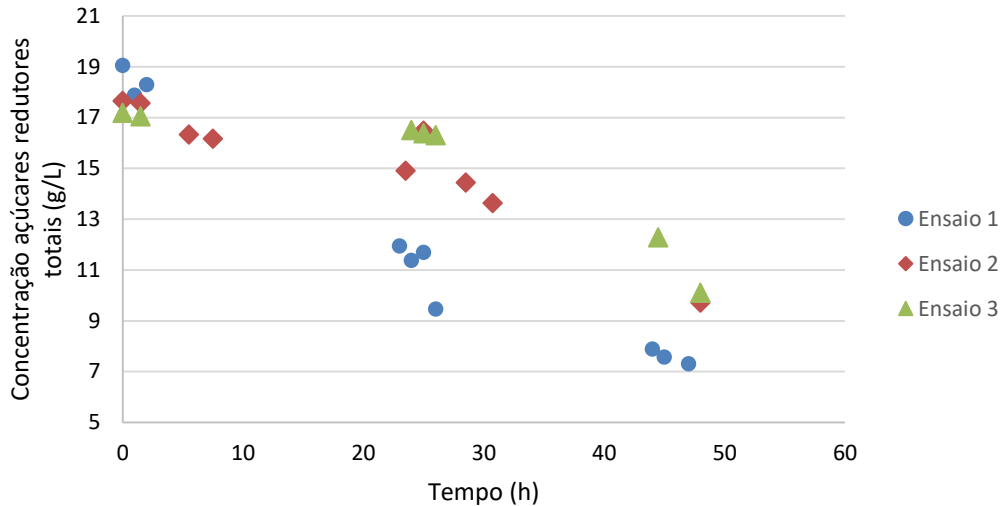


Figura 4. 2- Representação gráfica do progresso da fermentação dos açúcares presentes no licor negro tratado, ao longo do tempo.

Pela análise do gráfico da Figura 4.2, verifica-se que há uma diminuição da concentração de açúcar, presente no licor, ao longo do tempo. Tal era esperado, pois houve a eliminação do ácido acético e de outros possíveis inibidores na passagem do licor nas resinas. Na fermentação do licor pré-tratado com as resinas de permuta iónica, a diferença entre a concentração inicial e a final de açúcar dos ensaios ronda os 9 g/L.

Para a análise da fermentação do licor negro sem pré-tratamento realizaram-se ensaios e construiu-se o gráfico da Figura 4.3. Estes ensaios tiveram a duração de 6 dias.

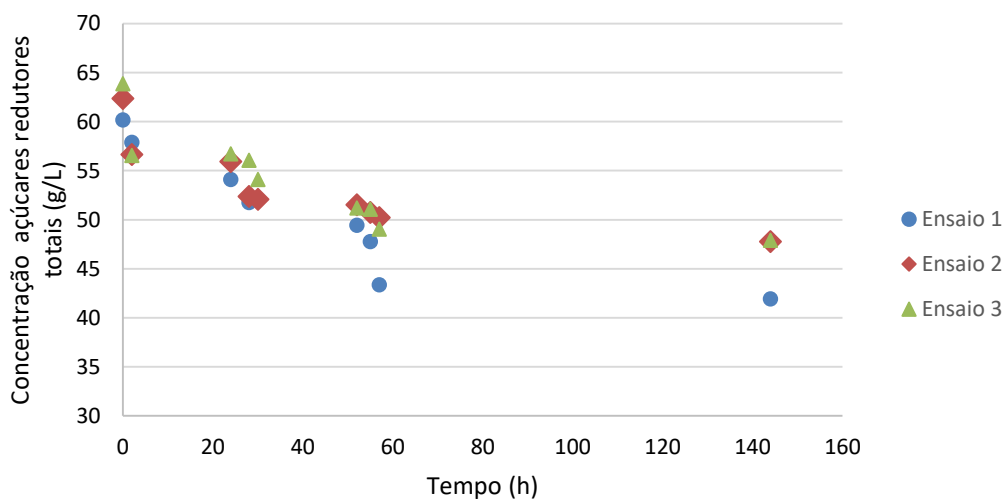


Figura 4. 3- Representação gráfica do progresso da fermentação dos açúcares presentes no licor negro sem pré-tratamento, ao longo do tempo.

Como se pode comprovar através da Figura 4.3, a concentração de açúcar diminui ao longo do tempo, mesmo com concentrações iniciais de açúcar elevadas e sem a remoção do ácido acético.

Para a determinação do etanol produzido, foram utilizados os ensaios 2 e 3 do licor sem pré-tratamento (Tabela 4.3).

Tabela 4. 3- Resultados obtidos na determinação do teor de álcool (%)

Ensaio	Concentração açúcar inicial (g/L)	Concentração açúcar final (g/L)	Teor de etanol (%)
2	62,4	47,8	0,58
3	63,8	47,9	0,63

Pela análise da Tabela 4.3 verifica-se que o teor de álcool determinado é baixo. Contudo, corresponde, sensivelmente, ao que seria de esperar tendo em conta o consumo de açúcar que houve nos dois ensaios efectuados.

No Anexo B.3 encontram-se apresentados os cálculos para o número de moles de etanol gerado considerando que os açúcares consumidos eram pentoses. No ensaio 2, o valor teórico do número de moles máximo de etanol gerado foi de 0,17 moles e o número de moles de etanol gerado obtido foi de 0,13 moles. No ensaio 3, o número de moles de etanol obtido e o número de moles máximo de etanol gerado foi 0,14 e 0,18 moles, respetivamente. Estes valores são bastantes concordantes, pois o licor negro não possui só pentoses, mas também é constituído por hexoses, e, na fermentação, o açúcar não é convertido na sua totalidade em etanol, havendo a produção de biomassa e a dissipação de energia sob a forma de calor.

Com objetivo de obter melhores resultados na fermentação, foi necessário adaptar a levedura utilizando o licor negro como fonte de carbono, sendo a concentração de açúcares máxima tolerável para a levedura igual a 50g/L. Ao longo deste procedimento, a levedura foi analisada ao microscópio com o intuito de se verificar que a levedura estava isenta de contaminação e se havia crescimento da mesma. Caso a levedura se encontrasse bastante alongada, esta estava já na fase estacionária. Na Figura 4.4 encontra-se apresentado o crescimento da levedura com e sem adaptação ao licor negro [32].

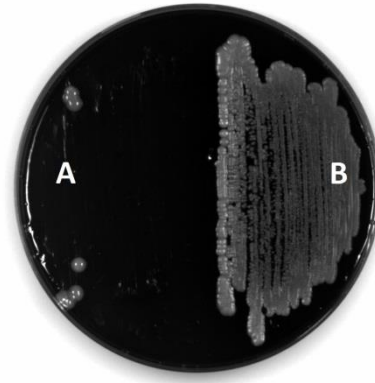


Figura 4. 4- Crescimento da levedura sem (A) e com adaptação (B) ao licor negro do processo ao sulfito.

Como se pode verificar pela Figura 4.4, a levedura apresenta um crescimento adequado quando há adaptação ao licor negro (B), ao contrário quando esta não é adaptada ao meio (A).

Para a análise da fermentação do licor negro do processo ao sulfito com a levedura adaptada ao longo do tempo construiu-se o gráfico da Figura 4.5. Estes ensaios tiveram a duração de 7 dias.

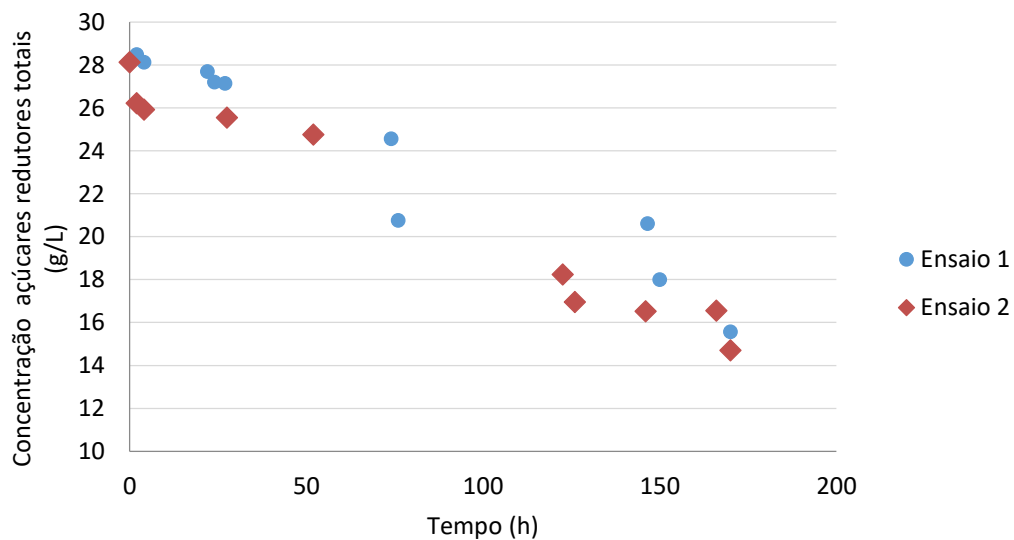


Figura 4. 5- Representação gráfica do progresso da fermentação dos açúcares com a levedura adaptada ao no licor negro do processo ao sulfito.

Pela análise do gráfico da Figura 4.5, verifica-se que os valores dos dois ensaios encontram-se em concordância, em que a diferença entre a concentração inicial e a final de açúcar dos dois matrizes ronda 14 g/L.

Com o intuito de comparar a fermentação do licor negro pré-tratado, a fermentação sem pré-tratamento e a fermentação do licor negro com a levedura adaptada efetuou-se a análise dos gráficos das Figuras 4.2, 4.3 e 4.5, respetivamente considerando um tempo de fermentação equivalente.

Para um tempo igual a 48 horas, verifica-se que houve uma maior diminuição na concentração de açúcares na fermentação do licor negro sem pré-tratamento, o que não era de esperar. Estes resultados poderão estar relacionados pelo facto destes ensaios não terem sido realizados em condições completamente controladas, sob o ponto de vista de esterilidade (ao contrário do que aconteceu nos ensaios com a levedura adaptada), pelo que se admite que parte do consumo dos açúcares tenha ocorrido devido ao crescimento de microrganismos contaminantes.

O crescimento de outros microrganismos pode ter originado outros álcoois, para além do etanol. A análise efetuada não é específica para o etanol, pelo que outros compostos com ponto de ebulição inferior ao da água são separados na destilação e, no fim, são contabilizados como etanol.

Para a determinação do teor de bioetanol realizou-se a fermentação do licor negro do processo ao sulfito sem recolher amostras ao longo para que não houvesse evaporação do etanol presente. Na Tabela 4.4 encontram-se apresentados os valores obtidos dos ensaios da fermentação com a levedura adaptada para a determinação do teor de etanol.

Tabela 4. 4- Valores obtidos na determinação do teor de etanol (%).

Ensaio	Concentração açúcar inicial (g/L)	Concentração açúcar final (g/L)	Teor de álcool (%)
1	31,5	13,3	0,85
2	27,9	14,0	0,67

Como se pode verificar pelos valores apresentados na Tabela 4.4, o teor de etanol é bastante baixo, o que era de se esperar pelo baixo consumo de açúcar que houve nos dois ensaios realizados. Para o ensaio 1, o número de moles de etanol obtido foi de 0,18 moles, enquanto o número de moles de etanol máximo teórico, tendo em conta a variação da concentração de açúcar, foi de 0,20 moles. No ensaio 2, o número de moles de etanol obtido e número de moles de etanol máximo teórico foi 0,15 e 0,16 moles, respetivamente. Os cálculos realizados encontram-se no Anexo B.8.

De modo em caracterizar melhor a fermentação com a levedura adaptada calculou-se a velocidade média de consumo do substrato ( $\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ), o fator de conversão

do substrato a etanol e a produtividade em etanol (g/(L.h)) (Anexo B.9). Na Tabela 4.5 encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 4. 5- - Valores obtidos na caraterização da produção de etanol na fermentação com a levedura adaptada.

Parâmetros	Ensaio 1	Ensaio 2
Velocidade média de consumo do substrato g/(L.h)	0,086	0,079
Fator de conversão substrato a etanol	0,58	0,50
Produtividade em etanol g/(L.h)	0,05	0,04

Pela análise da Tabela 4.5 verifica-se que os dois ensaios apresentam valores concordantes entre si, sendo que o ensaio 1 apresenta valores ligeiramente superiores ao ensaio 2.

Não se pode comparar os resultados obtidos na determinação de etanol dos ensaios com o licor negro do processo ao sulfito sem pré-tratamento e os ensaios com a levedura adaptada ao meio, pois os tempos de fermentação são diferentes. No entanto, admite-se a possibilidade que, na fermentação do licor sem pré-tratamento, parte do álcool pode ter sido obtido por microrganismos contaminantes. Acresce ainda que alguns dos açúcares poderão ter sido metabolizados por outro tipo de fermentação, que não a alcoólica, pelo que, parte deste álcool poderá não ser etanol, como já referido anteriormente.

## 5 Conclusões finais e sugestões de trabalhos futuros

O presente trabalho teve como objetivo a valorização do licor negro do processo ao sulfito através da fermentação dos açúcares para a produção de bioetanol. Como o licor negro do processo ao sulfito apresenta uma elevada percentagem em pentoses, a levedura utilizada neste processo foi a *Scheffersomyces stipitis* pela sua capacidade para fermentar mais especificamente este tipo de açúcares.

Todas as etapas devem ser controladas rigorosamente principalmente a etapa de inoculação e fermentação, pela facilidade de contaminação do meio e dos microrganismos envolventes que afeta o processo.

Inicialmente, o licor negro do processo ao sulfito sofreu um pré-tratamento com o intuito a eliminação de inibidores no processo de fermentação. Este pré-tratamento consistiu na passagem do licor em duas resinas de permuta iónica fortes, catiónica e aniónica. A resina catiónica teve como objetivo a eliminação dos catiões de magnésio, enquanto a resina aniónica, a redução da concentração dos lenhossulfonatos e do ácido acético. Após a fermentação, verificou-se que a diferença entre a concentração inicial e a final de açúcar dos ensaios, ao fim de 48 horas, ronda os 9 g/L. Tal era esperado devido à eliminação do ácido acético e de outros possíveis inibidores na passagem do licor nas resinas.

Com o intuito de comparar e melhorar os resultados obtidos, num ensaio, mediu-se 80mL de licor e adicionou-se 100mL de água destilada supondo que, assim, a concentração de ácido acético seria inferior a 9 g/L, sendo esta a concentração máxima que a levedura *Scheffersomyces stipitis* consegue tolerar sem adaptação, e, posteriormente, noutra ensaio, houve a adaptação da levedura utilizando o licor como fonte de carbono, aumentando gradualmente a sua concentração até 50 g/L.

Em relação ao consumo de açúcar na fermentação do licor negro do processo ao sulfito, considerando um tempo de fermentação equivalente nos três tipos de ensaios e fermentação realizados, verifica-se que há um maior consumo no ensaio de fermentação do licor negro sem pré-tratamento, cerca de 11 g/L, comparativamente aos ensaios de fermentação do licor pré-tratado e de fermentação com a levedura adaptada, 9 g/L e 3 g/L, respetivamente. Tal não era de esperar, o que pode estar relacionado com o facto destes ensaios não terem sido realizados em condições completamente controladas, sob o ponto de vista de esterilidade (ao contrário do que aconteceu nos ensaios com a levedura adaptada), pelo que se admite que parte do consumo dos açúcares tenha ocorrido devido ao crescimento de microrganismos contaminantes.

No que diz respeito ao teor de etanol produzido, após a fermentação com a levedura adaptada, conclui-se que o teor obtido é baixo cerca de 0,85% e 0,67% nos dois ensaios realizados. No entanto, estes valores estão em concordância com o baixo consumo de açúcar que houve nos dois ensaios. São necessários estudos adicionais por forma a explorar o elevado potencial do licor negro do processo do sulfito na produção de bioetanol.

Com o intuito de fazer uma caraterização mais pormenorizada da fermentação com a levedura adaptada ao meio, foi necessário determinar diferentes parâmetros. Nos ensaios realizados nesta fermentação, a velocidade média de consumo do substrato ronda os 0,08 g/(L.h), a média do fator de conversão do substrato a etanol é 0,54 e a produtividade em etanol média é 0,45 g/(L.h).

Pelo facto dos ensaios terem tempos de fermentação diferentes, não se pode comparar os resultados obtidos na determinação de etanol dos ensaios com o licor negro do processo ao sulfito sem pré-tratamento com o dos ensaios com a levedura adaptada ao meio.

### **Sugestões para trabalhos futuros:**

A fim de dar continuidade a este estudo, foram elaboradas algumas propostas para trabalhos futuros. Estas propostas são:

- Prosseguir o estudo da fermentação com a levedura adaptada ao licor negro do processo ao sulfito até à estabilização da concentração de açúcares;
- Prosseguir o estudo da fermentação do licor negro do processo ao sulfito com pré-tratamento, sem pré-tratamento e com a levedura adaptada ao meio, utilizando a mesma concentração para o mesmo tempo de fermentação, analisando ao microscópio os microrganismos existentes e contabilizando os álcoois produzidos;
- Estudar a fermentação com a levedura adaptada num reator contínuo;
- Estudar outros tipos de valorização do licor negro do processo ao sulfito, tais como a produção de proteína microbiana, de biopolímeros como polihidroxialcanoatos ou celulose bacteriana e de ácidos orgânicos voláteis;
- Realizar um estudo para o aproveitamento dos lenhossulfonatos após a remoção dos açúcares por fermentação.

## 6 Bibliografia

- [1] N. Duarte, “Síntese e caracterização de amostras de ASA,” Tese de mestrado em Química, Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa, 2008.
- [2] J. Araújo, “Production of vanillin from lignin present in the Kraft,” Tese de mestrado em Engenharia química e biológica, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2008.
- [3] Susana R. Pereira, Diogo J. Portugal-Nunes, Dmitry V. Evtugin, Luísa S. Serafim, Ana M.R.B. Xavier, “Advances in ethanol production from hardwood spent sulphite liquors,” *Process Biochemistry*, vol. 48, p. 272–282, 2013.
- [4] R. M. S. Navarro, F. M. S. Navarro e E. B. Tambourgi, “Estudo de diferentes processos de obtenção da pasta celulósica para fabricação de papel,” *Revista Ciências & Tecnologias*, 2007.
- [5] M. G. Carvalho, “Efeito das variáveis de cozimento nas características químicas de pastas de kraft de *Eucalyptus globulus*,” Tese de doutoramento em Engenharia Química especialidade de Processos Químicos, Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, 1999.
- [6] Svenska Cellulosa Aktiebolaget, “Produção de papel- Apoio Técnico para Papel de Publicação da SCA”.
- [7] H. F. Castro, “Apostilla 4- Papel e Celulose,” Processos Químicos Industriais II, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2009.
- [8] Z. Piotto, “Eco-eficiência na Indústria de Celulose e Papel - Estudo de Caso,” Tese de doutoramento em Engenharia, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2003.
- [9] H. Tran e E. K. Vakkilainen, The Kraft chemical recovery process, Centro polpa e papel da Universidade Toronto (Canadá) e Pöyry Forest Industry Oy, Vantaa (Finlândia).

- [10] A. Isenmann, “Química a partir de recursos renováveis,” Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, 2012.
- [11] S. Oliveira, Controlo de Viscosidade num estágio de branqueamento de pasta celulósica com peróxido de hidrogénio, Escola Superior de Tecnologia de Tomar do Instituto Politécnico de Tomar: Relatório de estágio de Mestrado em Tecnologia Química, 2013.
- [12] <http://www.portugalglobal.pt/PT/Paginas/Index.aspx>, Consultado em 10/3/2016.
- [13] P. Mariano, Optimização do Escalonamento da Produção das Máquinas de Papel de uma Indústria Papeleira, Portugal: Tese de mestrado em Engenharia e Gestão Industrial., 2008.
- [14] “Pasta e Papel,” *Jornal de Negócios*, n.º Suplemento Comercia, 15 de Maio de 2013.
- [15] D. Matias, Análise do potencial de valorização dos resíduos de LicorVerde da Indústria de Pasta de Papel, Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra: Tese de mestrado em Engenharia do Ambiente, 2012.
- [16] D.L.A. Fernandes, C.M. Silva, A.M.R.B. Xavier, D.V. Evtuguin, “Fractionation of sulphite spent liquor for biochemical processing using ion,” *Journal of Biotechnology*, vol. 162, p. 415– 421, 2012.
- [17] C. Monteiro, “Secagem de madeiras arqueológicas: Análise dos comportamentos físicos e aplicação do modelo de secagem binário,” Tese de Doutoramento em Quaternário, Materiais e Culturas, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2015.
- [18] C. P. Neto, D. Evtuguin, P. Pinto, A. Silvestre e C. Freire, “Química da madeira *Eucalyptus Globulus*: Especificidades e impacto nos processos de cozimento e de branqueamento,” CICECO e Departamento de Química, Universidade de Aveiro.
- [19] “<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fbl23vn002wx5eo0s>,” Consultado em 7/3/2015.

- [20] "<http://www.sabernarede.com.br/producao-de-celulose-pelo-processo-sulfito/>," Consultado em 7/3/2015.
- [21] A. Fortunatto, "Alternativas para o aproveitamento do licor negro da indústria de papel e celulose," Monografia para conclusão do Curso de Especialização em Gestão ambiental e Negócios no Sector Energéticos, Instituto de Energia e Ambiente da Universidade de São Paulo, 2014.
- [22] Chemilink, "Licor negro," Consultado em 2/4/2015.
- [23] "Biorrefinarias e Biotecnologia Industrial," Boletim Quadrimestral Biotecnologia da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia. Série 2 nº 3., Abril de 2013.
- [24] R. Moura, "Optimização das etapas de pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática da drêche cervejeira a açúcares com vista à produção de bioetanol," Tese de mestrado integrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2012.
- [25] "[www.wikienergia.com/~edp/index.php?title=Etanol](http://www.wikienergia.com/~edp/index.php?title=Etanol)," Consultado em 1/4/2015.
- [26] "[www.novacana.com/etanol/aplicacoes/](http://www.novacana.com/etanol/aplicacoes/)," Consultado em 13/3/2015.
- [27] "<http://www.britannica.com/science/fermentation>," Consultado em 18/10/2016.
- [28] V. Silva, "Valorização de Cápsulas de Café e Produção de Biocombustíveis," Tese de mestrado integrado em Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2011.
- [29] C. Caranton, "Produccion de Etanol a partir de resíduos provenientes del cultivo de café," Tese de mestrado, Universidade Nacional de Columbia, Manizales, 2010.
- [30] E. Viégas, "Propriedade antibacteriana da propólis verde sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica," Tese de mestrado em Ciências e Tecnologia dos alimentos, Universidade São Paulo, 2011.
- [31] Pereira, Susana R.; Nogué, Violeta Sánchez i; Frazão, Cláudio J.R; Serafim, Luísa S.; Gorwa-Grauslund, Marie F.; Xavier, Ana M. R. B., "Adaptation of

- Scheffersomyces stipitis to hardwood spent sulfite liquor by evolutionary engineering,” *Biotechnology for Biofuels*, 2015.
- [32] “[www.microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pichia\\_stipitis](http://www.microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pichia_stipitis),” Consultado em 11/10/2016.
- [33] Pereira, Susana R., Ivanuša, Špela, Evtuguin, Dmitry V., Serafim, Luísa S., Xavier, Ana M.R.B., “Biological treatment of eucalypt spent sulphite liquors: A way to boost the production of second generation bioethanol,” *Bioresource Technology*, vol. 103, pp. 131-135, 2012.
- [34] “[www.standardmethods.org/](http://www.standardmethods.org/),” Consultado 3/11/2016.
- [35] R. H. Perry, *Chemical Engineers' Handbook*, The McGraw-Hill Companies, Inc, 1999.
- [36] D. Moraes, *Seleção de micro-organismos fermentadores de xilose em etanol a partir de diferentes variedades da casca de uvas (Vitis SPP)*, São Paulo: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2012.

## Anexos

### Anexo A- Caracterização do licor

#### Anexo A.1- Teor de humidade

Na Tabela A.1 estão apresentados os valores obtidos para a determinação do teor de humidade do licor negro.

$$m_{cadinho\ 1} = 37,6624\ g$$

$$m_{cadinho\ 2} = 38,5122\ g$$

$$m_{cadinho\ 3} = 39,8166\ g$$

Tabela A. 1- Determinação do teor de humidade (%).

	$m_{cadinho\ 1+ licor}\ (g)$	$m_{cadinho\ 2+ licor}\ (g)$	$m_{cadinho\ 3+ licor}\ (g)$
Inicial	43,2731	44,2038	45,4595
1ª leitura	41,7888	42,6671	43,9175
2ª leitura	41,4238	42,3276	43,6335
3ª leitura	41,3503	42,2547	43,5519
4ª leitura	41,2711	42,1527	43,4611
5ª leitura	41,0285	41,9300	43,2248
6ª leitura	41,0009	41,9039	43,1964
Humidade (%)	40,50	40,41	40,11
Humidade média (%)		40,34	

$$H\ (\%) = \frac{m_{licor\ inicial} - m_{licor\ seco}}{m_{licor\ inicial}} \times 100$$

$$m_{licor\ inicial1} = m_{cadinho+ licor\ inicial} - m_{cadinho}$$

$$m_{licor\ seco} = m_{cadinho+licor\ seco} - m_{cadinho}$$

#### Exemplo de cálculo

$$m_{cadinho\ 1} = 37,6624\ g$$

$$m_{\text{cadinho+ licor inicial } 1} = 43,2731g$$

$$m_{\text{cadinho+ licor seco } 1} = 41,0009g$$

$$H (\%) = \frac{m_{\text{licor inicial}} - m_{\text{licor seco}}}{m_{\text{licor inicial}}} \times 100 = \frac{5,6107 - 3,3385}{5,6107} \times 100 = 40,5\%$$

$$m_{\text{licor inicial } 1} = m_{\text{cadinho+licor inicial } 1} - m_{\text{cadinho}} = 43,2731 - 37,6624 = 5,6107g$$

$$m_{\text{licor seco } 1} = m_{\text{cadinho+licor seco } 1} - m_{\text{cadinho}} = 41,0009 - 37,6624 = 3,3385g$$

### Anexo A.2- Teor de cinzas

Os valores obtidos para a determinação do teor de cinzas encontram-se apresentados na Tabela A.2.

$$m_{\text{cadinho } 1} = 37,6624 g$$

$$m_{\text{cadinho } 2} = 38,5122 g$$

$$m_{\text{cadinho } 3} = 39,8166 g$$

Tabela A. 2- Determinação do teor de cinzas (%).

	<i>Cadinho</i> <sub>1</sub>	<i>Cadinho</i> <sub>2</sub>	<i>Cadinho</i> <sub>3</sub>
$m_{\text{cadinho + licor seco}}(g)$	41,0009	41,9039	43,1964
$m_{\text{cadinho + cinzas}}(g)$	37,9842	38,8806	40,1542
<i>Cinzas (%)</i>	9,64	10,84	9,99
<i>Cinzas média (%)</i>	10,16		

$$\text{cinzas } (\%) = \frac{m_{\text{cinzas}}}{m_{\text{licor seco}}} \times 100$$

$$m_{\text{cinzas}} = m_{\text{cadinho+cinzas}} - m_{\text{cadinho}}$$

#### Exemplo de cálculo

$$m_{\text{cadinho } 1} = 37,6624 g$$

$$m_{\text{licor seco } 1} = 3,3385g$$

$$m_{\text{cadinho+cinzas } 1} = 37,9842 \text{ g}$$

$$\text{cinzas (\%)} = \frac{m_{\text{cinzas}}}{m_{\text{licor seco}}} \times 100 = \frac{0,3218}{3,3385} \times 100 = 9,64\%$$

$$\begin{aligned} m_{\text{cinzas}} &= m_{\text{cadinho+cinzas } 1} - m_{\text{cadinho } 1} = 37,9842 - 37,6624 \\ &= 0,3218 \text{ g} \end{aligned}$$

### Anexo A.3. Massa específica

Os resultados obtidos na determinação da massa específica do licor negro estão apresentados na Tabela A.3.

$$m_{\text{específica água, } 20^{\circ}\text{C}} = 0,9981 \text{ g/mL}$$

Tabela A. 3- Resultados obtidos na determinação da massa específica do licor negro.

	<i>Picnómetro</i> <sub>1</sub>	<i>Picnómetro</i> <sub>2</sub>	<i>Picnómetro</i> <sub>3</sub>
$m_{\text{picnómetro}} (\text{g})$	14,1950	14,1371	13,9664
$m_{\text{picnómetro} + \text{água}} (\text{g})$	40,4843	41,7054	40,6296
<i>Volume (mL)</i>	26,3393	27,6208	26,7135
$m_{\text{picnómetro} + \text{licor}} (\text{g})$	48,0453	49,6319	48,4282
$m_{\text{específica}} (\text{g/mL})$	1,29	1,29	1,29
$m_{\text{específica}} \text{ média (g/mL)}$	1,29		

$$\text{Volume picnómetro (mL)} = \frac{m_{\text{água, } 20^{\circ}\text{C}}}{m_{\text{específica água, } 20^{\circ}\text{C}}}$$

$$\rho (\text{g/mL}) = \frac{m_{\text{licor, } 20^{\circ}\text{C}}}{\text{volume picnómetro}}$$

$$m_{\text{água}, 20^{\circ}\text{C}} = m_{\text{picnómetro} + \text{água}, 20^{\circ}\text{C}} - m_{\text{picnómetro}, 20^{\circ}\text{C}}$$

$$m_{\text{licor}, 20^{\circ}\text{C}} = m_{\text{picnómetro} + \text{licor } 1, 20^{\circ}\text{C}} - m_{\text{picnómetro } 1, 20^{\circ}\text{C}}$$

### Exemplo de cálculo

$$\text{Volume picnómetro (mL)} = \frac{m_{\text{água}, 20^{\circ}\text{C}}}{m_{\text{específica água}, 20^{\circ}\text{C}}} = \frac{26,2893}{0,9981} = 26,3393 \text{ mL}$$

$$\rho \text{ (g/mL)} = \frac{m_{\text{licor}, 20^{\circ}\text{C}}}{\text{volume picnómetro}} = \frac{33,8503}{26,2893} = 1,29 \text{ (g/mL)}$$

$$m_{\text{água}, 20^{\circ}\text{C}} = m_{\text{picnómetro} + \text{água } 1, 20^{\circ}\text{C}} - m_{\text{picnómetro } 1, 20^{\circ}\text{C}} = 40,4843 - 14,1950 \\ = 26,2893$$

$$m_{\text{licor}, 20^{\circ}\text{C}} = m_{\text{picnómetro} + \text{licor } 1, 20^{\circ}\text{C}} - m_{\text{picnómetro } 1, 20^{\circ}\text{C}} = 48,0453 - 14,1950 \\ = 33,8503 \text{ g}$$

### **Anexo A.4- Teor de lenhossulfonatos**

Para o cálculo do teor de lenhossulfonatos foi necessário traçar uma curva de calibração (Tabela A.4). Na Figura A.1 estão representados, graficamente, os valores obtidos da curva de calibração.

Tabela A. 4- Curva de calibração dos padrões de lenhossulfonatos (mg/L).

<i>Concentração lenhossulfonatos (mg/L)</i>	<i>Absorvância</i>
0	0
5	0,029
10	0,083
20	0,182
25	0,255
40	0,403
50	0,481
80	0,781
100	0,982

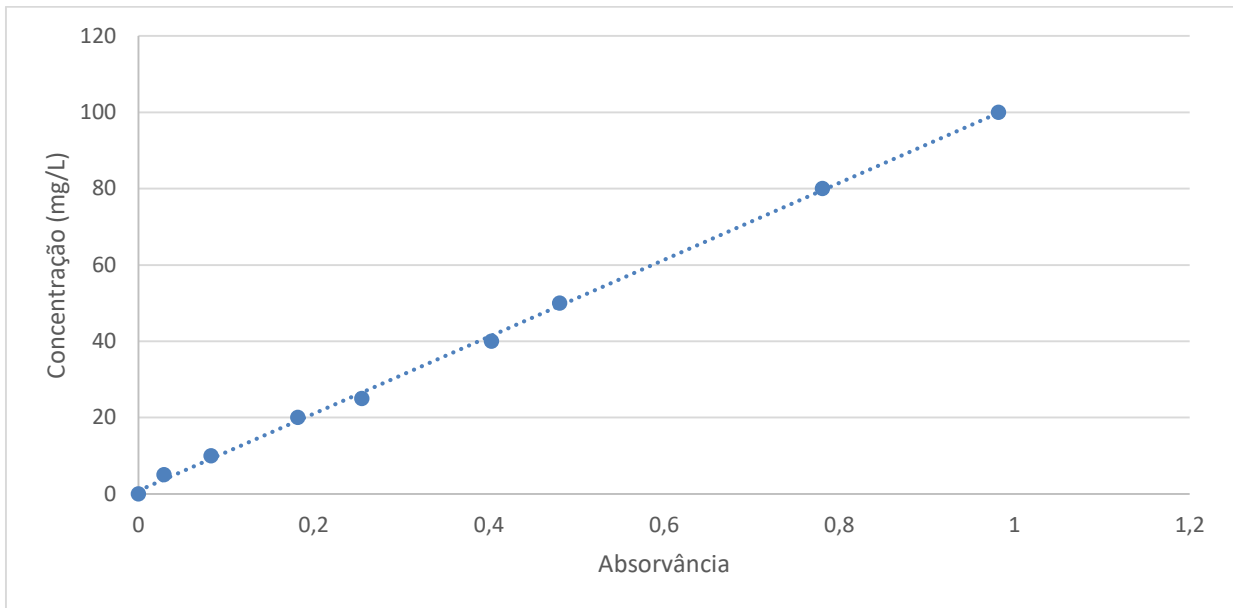


Figura A. 1- Representação gráfica da curva de calibração [lenhossulfonatos] (mg/L) vs Absorvância.

$$[\text{lenhossulfonatos}](\text{mg/L}) = 100,8 \text{ Abs} + 0,8706$$

Exemplo de cálculo

$$\text{fator de diluição} = 10000$$

$$\text{Absorvância licor} = 0,324$$

$$\begin{aligned} [\text{lenhossulfonatos licor}] (\text{mg/L}) &= (100,8 \text{ Abs} + 0,8706) \times \text{fator diluição} \\ &= (100,8 \times 0,324 + 0,8706) \times 10000 = 335298 \text{ mg/L} = 335,3 \text{ g/L} \end{aligned}$$

### Anexo A.5. Determinação de açúcares totais pelo método de DNS

Nas Tabelas A.5 e A.6 encontram-se os valores obtidos para a curva de calibração da glucose e para a determinação de açúcares totais pelo método de DNS, respetivamente.

Tabela A. 5- Valores obtidos para a curva de calibração [Glucose] (g/L) vs Absorvância.

Absorvância média	Concentração glucose (g/L)
0,001	0
0,010	0,10
0,032	0,20
0,061	0,30
0,081	0,40
0,106	0,50
0,131	0,60
0,157	0,70
0,203	0,90
0,216	1,00
0,245	1,25
0,324	1,50
0,359	1,75
0,400	2,00
0,499	2,50

Na Figura A.2 encontra-se a representação gráfica da curva de calibração.

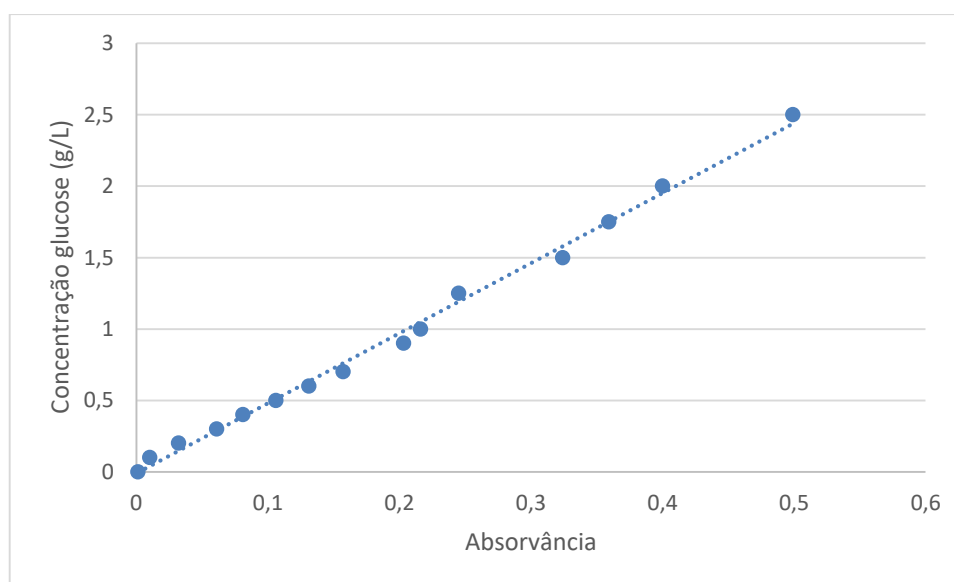


Figura A. 2- Representação gráfica da curva de calibração [Glucose] (g/L) vs Absorvância.

$$[Glucose](g/L) = 4,9082 Abs - 0,011$$

Tabela A. 6- Resultados obtidos da determinação de açúcares totais no licor negro.

<i>Tubos</i>	<i>Descrição</i>	<i>Fator diluição</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Absorvância média água</i>	<i>Absorvância corrigida</i>	<i>Absorvância corrigida média</i>	<i>Concentração média açúcar licor (g/L)</i>
1 <sup>a</sup>			0,007		-		
1 <sup>a</sup> réplica	Com água	250	0,006	0,007	-	0,315	383,157
1	Com DNS		0,310		0,304		
1 réplica			0,332		0,326		
2 <sup>a</sup>			0,008		-		
2 <sup>a</sup> réplica	Com água	200	0,009	0,009	-	0,385	375,241
2	Com DNS		0,392		0,384		
2 réplica			0,394		0,386		
<i>Concentração média açúcar licor total (g/L)</i>						379,20	
<i>Concentração média açúcar licor total (%)</i>						29	

Exemplo de cálculo

$$fator\ diluição = 250$$

$$Absorvância\ corrigida\ média = 0,315$$

$$[Glucose](g/L) = (4,9082\ Abs - 0,011) \times 250 = (4,9802 \times 0,315 - 0,011) \times 250 = 383,157\ g/L$$

Com a massa específica do licor negro calculada, calcula-se o teor de açúcares totais em percentagem.

$$\%açúcar = \frac{[glucose]}{(\rho_{licor} \times 1000)} \times 100 = \frac{379,2}{(1,29 \times 1000)} \times 100 = 29\%$$



## Anexo B. Valorização do licor negro

### Anexo B.1. Determinação da concentração de açúcares nas fracções de volume iniciais do licor negro do processo ao sulfito com as resinas dos ensaios de permuta iónica.

Tabela B. 1- Valores obtidos para concentração de açúcares nas fracções de volume iniciais presente no licor negro do processo ao sulfito com as resinas dos ensaios de permuta iónica.

<i>Tubos</i>	<i>Descrição</i>	<i>Fator diluição</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Absorvância corrigida</i>	<i>Absorvância corrigida média</i>	<i>Concentração açúcar licor (g/L)</i>
Alimentação da coluna catiónica	Com água	50	0,023	-	0,268	65,22
	Com DNS		0,292	0,269		
			0,290	0,267		
Saída da coluna catiónica (zona inicial do ensaio)	Com água		0,019	-	0,228	55,40
	Com DNS		0,25	0,231		
			0,244	0,225		
Alimentação da coluna aniónica	Com água	0,013	-	0,217	52,58	
	Com DNS	0,229	0,216			
		0,23	0,217			
Saída da coluna aniónica (zona inicial do ensaio)	Com água	0,005	-	0,213	51,60	
	Com DNS	0,216	0,211			
		0,219	0,214			

## **Anexo B.2. Fermentação com pré-tratamento**

Os valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro tratado, nos três ensaios realizados, estão apresentados nas tabelas B.1, B.2 e B.3. No exemplo de cálculo realizado, os valores utilizados são referentes ao ensaio 1.

Tabela B. 2- Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro após o pré-tratamento ao longo do tempo de fermentação do ensaio 1.

<i>Tubos</i>	<i>Descrição</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Fator diluição</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Absorvância média água</i>	<i>Absorvância corrigida</i>	<i>Absorvância corrigida média</i>	<i>Concentração açúcar licor (g/L)</i>	
1 <sup>a</sup>	Com água	0	10	0,004	0,005	-	-	19,057	
1a réplica	Com água			0,005		-	-		
1	Com água			0,395		-	0,391		
1 réplica	DNS			0,395		-	0,391		0,391
2 <sup>a</sup>	Com água	60	10	0,005	0,005	-	-	17,879	
2a réplica	Com água			0,005		-	-		
2	Com água			0,367		-	0,362		0,367
2 réplica	DNS			0,376		-	0,371		0,367
3 <sup>a</sup>	Com água	120	10	0,005	0,005	-	-	18,296	
3a réplica	Com água			0,005		-	-		
3	Com água			0,375		-	0,370		0,375
3 réplica	DNS			0,385		-	0,380		0,375
4 <sup>a</sup>	Com água	1380	10	0,005	0,005	-	-	11,940	
4a réplica	Com água			0,004		-	-		
4	Com água			0,25		-	0,246		0,246
4 réplica	DNS			0,25		-	0,246		0,246
5 <sup>a</sup>	Com água	1440	10	0,005	0,005	-	-	11,375	
5a réplica	Com água			0,005		-	-		
5	Com água			0,242		-	0,237		0,234
5 réplica	DNS			0,236		-	0,231		0,234
6 <sup>a</sup>	Com água	1500	10	0,005	0,005	-	-	11,694	
6a réplica	Com água			0,005		-	-		
6	Com água			0,235		-	0,230		0,241
6 réplica	DNS			0,256		-	0,251		0,241
7 <sup>a</sup>	Com água	1560	10	0,005	0,005	-	-	9,461	
7a réplica	Com água			0,005		-	-		
7	Com água			0,199		-	0,194		0,195
7 réplica	DNS			0,201		-	0,196		0,195
8 <sup>a</sup>	Com água	2640	10	0,005	0,005	-	-	7,890	
8a réplica	Com água			0,005		-	-		
8	Com água			0,17		-	0,165		0,163
8 réplica	DNS			0,166		-	0,165		0,163
9 <sup>a</sup>	Com água	2700	10	0,004	0,004	-	-	7,571	
9a réplica	Com água			0,003		-	-		
9	Com água			0,15		-	0,147		0,157
9 réplica	DNS			0,17		-	0,167		0,157
10 <sup>a</sup>	Com água	2820	10	0,003	0,003	-	-	7,301	
10a réplica	Com água			0,003		-	-		
10	Com água			0,152		-	0,149		0,151
10 réplica	DNS			0,156		-	6		0,151

Tabela B. 3- Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro após o pré-tratamento ao longo do tempo de fermentação do ensaio 2.

<i>Tubos</i>	<i>Descrição</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Fator diluição</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Absorvância média água</i>	<i>Absorvância corrigida</i>	<i>Absorvância corrigida média</i>	<i>Concentração açúcar licor (g/L)</i>
1 <sup>a</sup>	Com água	0	10	0,002	0,004	-	-	17,658
1a réplica				0,005		-	-	
1	Com DNS	0	10	0,375	-	0,353	0,362	
1 réplica				0,356	-	0,372		
2 <sup>a</sup>	Com água	90	10	0,003	0,004	-	-	17,560
2a réplica				0,004		-	-	
2	Com DNS	90	10	0,352	-	0,372	0,360	
2 réplica				0,375	-	0,349		
3 <sup>a</sup>	Com água	330	10	0,001	0,002	-	-	16,332
3a réplica				0,003		-	-	
3	Com DNS	330	10	0,342	-	0,330	0,335	
3 réplica				0,332	-	0,340		
4 <sup>a</sup>	Com água	450	10	0,002	0,003	-	-	16,161
4a réplica				0,003		-	-	
4	Com DNS	450	10	0,325	-	0,341	0,332	
4 réplica				0,343	-	0,323		
5 <sup>a</sup>	Com água	1410	10	0,005	0,005	-	-	14,909
5a réplica				0,005		-	-	
5	Com DNS	1410	10	0,296	-	0,321	0,306	
5 réplica				0,326	-	0,291		
6 <sup>a</sup>	Com água	1500	10	0,005	0,006	-	-	16,480
6a réplica				0,007		-	-	
6	Com DNS	1500	10	0,342	-	0,340	0,338	
6 réplica				0,346	-	0,336		
7 <sup>a</sup>	Com água	1710	10	0,006	0,006	-	-	14,443
7a réplica				0,005		-	-	
7	Com DNS	1710	10	0,302	-	0,297	0,297	
7 réplica				-	-	-		
8 <sup>a</sup>	Com água	1845	10	0,006	0,007	-	-	13,633
8a réplica				0,007		-	-	
8	Com DNS	1845	10	0,286	-	0,281	0,280	
8 réplica				0,287	-	0,280		
9 <sup>a</sup>	Com água	2880	10	0,008	0,008	-	-	9,706
9a réplica				0,008		-	-	
9	Com DNS	2880	10	0,206	-	0,202	0,200	
9 réplica				0,21	-	0,198		

Tabela B. 4- Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro após o pré-tratamento ao longo do tempo de fermentação do ensaio 3.

<i>Tubos</i>	<i>Descrição</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Fator diluição</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Absorvância média água</i>	<i>Absorvância corrigida</i>	<i>Absorvância corrigida média</i>	<i>Concentração açúcar licor (g/L)</i>
1 <sup>a</sup>	Com água	0	10	0,004	0,004	-	-	17,191
1a réplica				0,004		-	-	
1	Com DNS	0	10	0,354	-	0,355	0,353	17,191
1 réplica				0,359		0,350		
2 <sup>a</sup>	Com água	90	10	0,004	0,005	-	-	17,044
2a réplica				0,005		-	-	
2	Com DNS	90	10	0,35	-	0,354	0,350	17,044
2 réplica				0,358		0,346		
3 <sup>a</sup>	Com água	1440	10	0,005	0,005	-	-	16,504
3a réplica				0,005		-	-	
3	Com DNS	1440	10	0,342	-	0,340	0,339	16,504
3 réplica				0,345		0,337		
4 <sup>a</sup>	Com água	1500	10	0,005	0,006	-	-	16,382
4a réplica				0,006		-	-	
4	Com DNS	1500	10	0,343	-	0,335	0,336	16,382
4 réplica				0,34		0,338		
5 <sup>a</sup>	Com água	1560	10	0,006	0,006	-	-	16,308
5a réplica				0,006		-	-	
5	Com DNS	1560	10	0,342	-	0,333	0,335	16,308
5 réplica				0,339		0,336		
6 <sup>a</sup>	Com água	2670	10	0,009	0,009	-	-	12,283
6a réplica				0,009		-	-	
6	Com DNS	2670	10	0,256	-	0,258	0,253	12,283
6 réplica				0,267		0,247		
7 <sup>a</sup>	Com água	2880	10	0,003	0,004	-	-	10,099
7a réplica				0,004		-	-	
7	Com DNS	2880	10	0,21	-	0,210	0,208	10,099
7 réplica				0,213		0,207		

Exemplo de cálculo

Ensaio 1

$$t = 0 \text{ min}$$

$$\text{fator diluição} = 10$$

$$\text{Absorvância corrigida média} = 0,391$$

$$\begin{aligned} [Glucose](g/L) &= (4,9082 \text{ Abs} - 0,011) \times 10 = (4,9802 \times 0,391 - 0,011) \times 10 \\ &= 19,057 \text{ g/L} \end{aligned}$$

### **Anexo B.3. Fermentação sem pré-tratamento**

Nas tabelas B.4, B.5 e B.6 estão apresentados os resultados obtidos ao longo do 1º, 2º e 3º ensaio, respetivamente. O exemplo de cálculo é referente ao ensaio 1.

Tabela B. 5- Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro sem pré-tratamento ao longo do tempo de fermentação do ensaio 1.

<i>Tubos</i>	<i>Descrição</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Fator diluição</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Absorvância média água</i>	<i>Absorvância corrigida</i>	<i>Absorvância corrigida média</i>	<i>Concentração açúcar licor (g/L)</i>
1 <sup>a</sup>	Com água	0	25	0,019	0,019	-	-	60,157
1a réplica				0,018		-	-	
1	Com DNS	0	25	0,504	-	0,486	0,493	60,157
1 réplica				0,518	-	0,500		
2 <sup>a</sup>	Com água	120	25	0,020	0,019	-	-	57,887
2a réplica				0,018		-	-	
2	Com DNS	120	25	0,491	-	0,472	0,474	57,887
2 réplica				0,495	-	0,476		
3 <sup>a</sup>	Com água	1440	25	0,013	0,013	-	-	54,083
3a réplica				0,013		-	-	
3	Com DNS	1440	25	0,455	-	0,442	0,443	54,083
3 réplica				0,457	-	0,444		
4 <sup>a</sup>	Com água	1680	25	0,015	0,016	-	-	51,752
4a réplica				0,016		-	-	
4	Com DNS	1680	25	0,438	-	0,423	0,424	51,752
4 réplica				0,441	-	0,426		
5 <sup>a</sup>	Com água	1800	25	0,018	0,018	-	-	52,059
5a réplica				0,018		-	-	
5	Com DNS	1800	25	0,443	-	0,425	0,427	52,059
5 réplica				0,446	-	0,428		
6 <sup>a</sup>	Com água	3120	25	0,014	0,014	-	-	49,421
6a réplica				0,013		-	-	
6	Com DNS	3120	25	0,411	-	0,398	0,405	49,421
6 réplica				0,426	-	0,413		
7 <sup>a</sup>	Com água	3300	25	0,009	0,009	-	-	47,764
7a réplica				0,009		-	-	
7	Com DNS	3300	25	0,398	-	0,389	0,392	47,764
7 réplica				0,403	-	0,394		
8 <sup>a</sup>	Com água	3420	25	0,014	0,014	-	-	43,347
8a réplica				0,014		-	-	
8	Com DNS	3420	25	0,377	-	0,363	0,356	43,347
8 réplica				0,362	-	0,348		
9 <sup>a</sup>	Com água	8640	25	0,023	0,024	-	-	41,936
9a réplica				0,024		-	-	
9	Com DNS	8640	25	0,36	-	0,337	0,344	41,936
9 réplica				0,375	-	0,352		

Tabela B. 6- Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro sem pré-tratamento ao longo do tempo de fermentação do ensaio 2.

<i>Tubos</i>	<i>Descrição</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Fator diluição</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Absorvância média água</i>	<i>Absorvância corrigida</i>	<i>Absorvância corrigida média</i>	<i>Concentração açúcar licor (g/L)</i>
1 <sup>a</sup>	Com água	0	25	0,017	0,018	-	-	62,366
1a réplica				0,019		-	-	
1	Com DNS	0	25	0,508	-	0,490	0,511	62,366
1 réplica				0,531	-	0,531		
2 <sup>a</sup>	Com água	120	25	0,019	0,020	-	-	56,629
2a réplica				0,02		-	-	
2	Com DNS	120	25	0,462	-	0,443	0,464	56,629
2 réplica				0,485	-	0,485		
3 <sup>a</sup>	Com água	1440	25	0,013	0,013	-	-	55,924
3a réplica				0,013		-	-	
3	Com DNS	1440	25	0,464	-	0,451	0,458	55,924
3 réplica				0,465	-	0,465		
4 <sup>a</sup>	Com água	1680	25	0,016	0,016	-	-	52,365
4a réplica				0,016		-	-	
4	Com DNS	1680	25	0,431	-	0,415	0,429	52,365
4 réplica				0,443	-	0,443		
5 <sup>a</sup>	Com água	1800	25	0,013	0,013	-	-	52,059
5a réplica				0,013		-	-	
5	Com DNS	1800	25	0,424	-	0,411	0,427	52,059
5 réplica				0,442	-	0,442		
6 <sup>a</sup>	Com água	3120	25	0,015	0,015	-	-	51,507
6a réplica				0,015		-	-	
6	Com DNS	3120	25	0,42	-	0,405	0,422	51,507
6 réplica				0,439	-	0,439		
7 <sup>a</sup>	Com água	3300	25	0,014	0,015	-	-	50,740
7a réplica				0,015		-	-	
7	Com DNS	3300	25	0,411	-	0,397	0,416	50,740
7 réplica				0,435	-	0,435		
8 <sup>a</sup>	Com água	3420	25	0,009	0,009	-	-	50,218
8a réplica				0,009		-	-	
8	Com DNS	3420	25	0,412	-	0,403	0,412	50,218
8 réplica				0,42	-	0,420		
9 <sup>a</sup>	Com água	8640	25	0,020	0,029	-	-	47,764
9a réplica				0,038		-	-	
9	Com DNS	8640	25	0,399	-	0,370	0,392	47,764
9 réplica				0,413	-	0,413		

Tabela B. 7- Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro sem pré-tratamento ao longo do tempo de fermentação do ensaio 3.

<i>Tubos</i>	<i>Descrição</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Fator diluição</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Absorvância média água</i>	<i>Absorvância corrigida</i>	<i>Absorvância corrigida média</i>	<i>Concentração açúcar licor (g/L)</i>
1 <sup>a</sup>	Com água	0	25	0,024	0,024	-	-	63,838
1a réplica				0,024		-	-	
1	Com DNS	0	25	0,532	-	0,508	0,523	63,838
1 réplica				0,537		0,537		
2 <sup>a</sup>	Com água	120	25	0,013	0,013	-	-	56,528
2a réplica				0,013		-	-	
2	Com DNS	120	25	0,466	-	0,453	0,463	56,528
2 réplica				0,473		0,473		
3 <sup>a</sup>	Com água	1440	25	0,018	0,018	-	-	56,721
3a réplica				0,018		-	-	
3	Com DNS	1440	25	0,467	-	0,449	0,465	56,721
3 réplica				0,48		0,480		
4 <sup>a</sup>	Com água	1680	25	0,015	0,018	-	-	56,047
4a réplica				0,021		-	-	
4	Com DNS	1680	25	0,459	-	0,441	0,459	56,047
4 réplica				0,477		0,477		
5 <sup>a</sup>	Com água	1800	25	0,017	0,017	-	-	54,083
5a réplica				0,017		-	-	
5	Com DNS	1800	25	0,451	-	0,434	0,443	54,083
5 réplica				0,452		0,452		
6 <sup>a</sup>	Com água	3120	25	0,015	0,015	-	-	51,200
6a réplica				0,015		-	-	
6	Com DNS	3120	25	0,426	-	0,411	0,420	51,200
6 réplica				0,428		0,428		
7 <sup>a</sup>	Com água	3300	25	0,015	0,016	-	-	51,046
7a réplica				0,016		-	-	
7	Com DNS	3300	25	0,416	-	0,401	0,418	51,046
7 réplica				0,436		0,436		
8 <sup>a</sup>	Com água	3420	25	0,013	0,013	-	-	49,022
8a réplica				0,012		-	-	
8	Com DNS	3420	25	0,406	-	0,394	0,402	49,022
8 réplica				0,41		0,410		
9 <sup>a</sup>	Com água	8640	25	0,009	0,009	-	-	47,887
9a réplica				0,009		-	-	
9	Com DNS	8640	25	0,393	-	0,384	0,393	47,887
9 réplica				0,401		0,401		

Exemplo de cálculo

Ensaio 1

$$t = 0 \text{ min}$$

$$\text{fator diluição} = 25$$

$$\text{Absorvância corrigida média} = 0,493$$

$$\begin{aligned} [\text{Glucose}](g/L) &= (4,9082 \text{ Abs} - 0,011) \times 25 = (4,9802 \times 0,493 - 0,011) \times 25 \\ &= 60,157 \text{ g/L} \end{aligned}$$

### Anexo B.4. Determinação do teor de etanol do licor negro sem pré-tratamento

Para o cálculo do teor baseou-se no método OIV-MA-AS312-01A utilizado em soluções etanol-água. Os resultados obtidos referentes à determinação do teor de etanol do licor sem pré-tratamento encontram-se exibidos nas Tabelas B.7 e B.8.

Tabela B. 8- Resultados obtidos para a determinação da massa específica do ar à temperatura da água.

Ensaio	$m$ picnómetro seco (g)	$T_{\text{atual}}$ água (°C)	$T_{\text{média}}$ atual água (°C)	$m$ picnómetro +água (g)	$T_{\text{média}}$ atual amostra (°C)	$m$ Picnómetro +amostra (g)	$m$ água- ar (g)	$\rho$ água a $T_{\text{água}}$ (g/L)	$\rho$ ar a $T_{\text{água}}$ (g/L)
2	13,8927	23,8	24,2	40,5372	21,8	40,4065	26,6445	997,2887	1,1857
		24,0		40,5369			26,6269		
		24,9		40,5196			26,6442		
3	14,1979	24,8	25,2	40,4615	21,8	40,3390	26,2636	997,0348	1,1818
		25,2		40,4823			26,2641		
		25,7		40,4620			26,2844		

Tabela B. 9- Valores obtidos de teor alcoólico presente no licor negro após a fermentação.

Ensaio	$V_{\text{picnómetro}}$ a $T_{\text{água}}$ ( $dm^3$ )	$V$ picnómetro a $T_{\text{água}}$ (g/L)	Fator F	$V_{\text{picnómetro}}$ a 20°C ( $dm^3$ )	$V_{\text{picnómetro}}$ a 20°C ( $dm^3$ )	$\rho_{\text{ar}}$ a $T_{\text{amostra}}$ (g/L)	$m$ amostra- ar (g)	$\rho_{\text{água}}$ a $T_{\text{amostra}}$ (g/L)	F correcção	Teor alcoólico (%v/v)
2	0,02675	0,02674	1,002625	0,02664	0,02663	1,1955	26,514	996,73	-0,4180	0,58
	0,02675		1,002672	0,02664						
	0,02673		1,002891	0,02662						
3	0,02637	0,02637	1,002866	0,02656	0,02657	1,1955	26,446	996,67	-0,3745	0,63
	0,02639		1,002966	0,02658						
	0,02637		1,003092	0,02656						

#### Exemplo de cálculo

$$P = 1 \text{ atm}$$

$$M_{ar} = 28,9 \text{ g/mol}$$

$$R = 0,082 \text{ atm.L.mol}^{-1}.K^{-1}$$

$$m_{\text{água-ar}} = m_{\text{picnómetro+água}} - m_{\text{picnómetro seco}} = 40,5372 - 13,8927 = 26,6445 \text{ g}$$

A massa específica da água foi determinada através da equação da reta dos valores da Tabela B.9. Na Figura B.1 encontra-se a representação gráfica dos valores tabelados.

Tabela B. 10- Valores tabelados da massa específica da água em função da temperatura [36].

<i>Valores Tabelados</i>	
<i>Temperatura água (°C)</i>	<i>Massa específica água (g/L)</i>
10,00	999,699
15,00	999,099
20,00	998,204
22,00	997,770
25,00	997,045
30,00	995,647

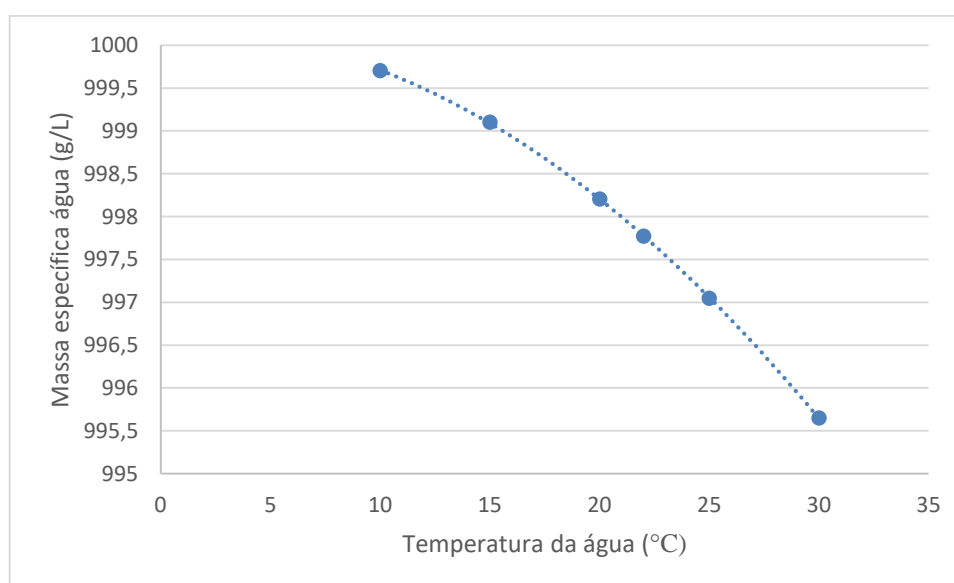


Figura B. 1- Representação gráfica dos valores tabelados da massa específica da água (g/L) em função da temperatura (°C).

$$\begin{aligned}\rho_{\text{água}, T_{\text{média atual água}}} &= -0,0053T_{\text{água}}^2 + 0,0083T_{\text{água}} + 1000,2 \\ &= -0,0053 \times 24,2^2 + 0,0083 \times 24,2 + 1000,2 = 997,2887 \text{ g/L}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\rho_{\text{ar}, T_{\text{média atual água}}} \rightarrow PV = nRT \leftrightarrow PV &= \frac{m}{M_{\text{ar}}} RT \leftrightarrow \frac{m}{V} = \rho_{\text{ar}, T_{\text{média atual água}}} \\ &= \frac{P_{\text{Mar}}}{RT_{\text{média atual água}}} = \frac{1 \times 28,96}{0,0082 \times (24,2 + 273)} = 1,1857 \text{ g/L}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}V_{\text{picnómetro}} &= \frac{m_{\text{água-ar}}}{(\rho_{\text{água}, T_{\text{média atual água}}} - \rho_{\text{ar}, T_{\text{média atual água}}})} = \frac{26,6445}{(997,287 - 1,1857)} \\ &= 0,02675 \text{ dm}^3\end{aligned}$$

O valor f encontra-se na Tabela I do Anexo II do Method OIV-MA-AS2-01A-Density and Specific Gravity.

$$\begin{aligned}V_{\text{picnómetro}, 20^\circ\text{C}} &= \frac{[m_{\text{picnómetro+água}} - (m_{\text{picnómetro seco}} - j \times (m_{\text{picnómetro+água}} - m_{\text{picnómetro seco}}))] \times \text{fator } f}{1000} \\ &= \frac{[40,5372 - (13,8927 - 0,0012 \times (40,5372 - 13,8927))] \times 1,002625}{1000} = 0,02664 \text{ dm}^3\end{aligned}$$

O fator j (0,0012) é uma constante presente no método utilizado.

$$\begin{aligned}\rho_{\text{ar}, T_{\text{amostra}}} \rightarrow PV = nRT \leftrightarrow PV &= \frac{m}{M} RT \leftrightarrow \frac{m}{V} = \rho_{\text{ar}, \text{amostra}} = \frac{P_{\text{Mar}}}{RT_{\text{amostra}}} \\ &= \frac{1 \times 28,96}{0,0082 \times (21,8 + 273)} = 1,1955 \text{ g/L}\end{aligned}$$

$$m_{\text{amostra-ar}} = m_{\text{picnómetro+amostra}} - m_{\text{picnómetro seco}} = 40,5372 - 13,8927 = 26,6445 \text{ g}$$

$$\rho = \frac{m_{amostra-ar}}{V_{picnómetro,20^{\circ}C}} + \rho_{ar,T_{amostra}} = \frac{26,6445}{0,02663} + 1,1955 = 996,73 \text{ g/L}$$

$$f_{correção} = \frac{\left[ \frac{\rho^*}{1000} - \left( \frac{\rho}{1000} + (21,8 - 20) \times w \right) \times 1000 \right]}{f^*}$$

$$= \frac{\left[ \frac{996,5}{1000} - \left( \frac{996,73}{1000} + 1,8 \times 0,00021 \right) \times 1000 \right]}{1,46} = -0,4180$$

Os valores do  $\rho^*$  e do fator  $f^*$  estão apresentados na Tabela das densidades aparentes de misturas etanol-água do método utilizado para a determinação do álcool. Por último, o fator  $w$  é um fator de repetibilidade e encontra-se na Tabela I- Hydrostatic balance (HB) presente no método.

Como a massa específica é próxima de 996,7 g/L, o teor de álcool tabelado é 1 (Tabela B.10).

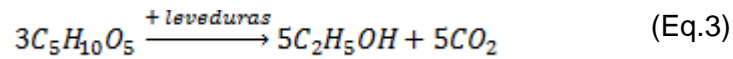
Tabela B. 11- Valores de referência (OIV) do teor de álcool (%) tendo em conta a massa específica (g/L) (OIV-MA-AS312-01A).

Massa específica (g/L)	Teor álcool (%)
998,20	0,00
996,70	1,00
995,24	2,00
993,81	3,00
992,42	4,00
991,06	5,00
989,73	6,00
988,44	7,00
987,17	8,00
985,93	9,00
984,71	10,00
983,52	11,00
982,36	12,00
981,21	13,00
980,08	14,00
978,97	15,00
977,87	16,00
976,79	17,00
975,71	18,00
974,63	19,00
973,56	20,00
972,48	21,00
971,40	22,00
970,31	23,00
969,21	24,00
968,10	25,00
966,96	26,00
965,81	27,00
964,64	28,00
963,44	29,00
962,21	30,00
960,95	31,00

$$\text{Teor alcoólico (\%)} = \text{Teor alcoól tabelado} + f_{\text{correção}} = 1 - 0,418 = 0,58 \%$$

### Exemplo de cálculo do teor etanol teórico

- Considerar que só fermentaram pentoses
- Dados do matraz 2



$$M_{\text{etanol}} = 46,07 \text{ g/mol}$$

$$\Delta C_{\text{açúcar}} = C_i - C_f = 62,4 - 47,8 = 14,6 \text{ g/L}$$

$$M_{\text{pentose}} = 5 \times 12,01 + 10 \times 1,01 + 5 \times 16 = 150 \text{ g/mol}$$

$$n^{\circ} \text{moles etanol gerados teórico} = \frac{\Delta C_{\text{açúcar}} \times 5}{M_{\text{pentose}} \times 3} = \frac{14,6 \times 5}{150 \times 3} = 0,16 \text{ moles}$$

$$n^{\circ} \text{ etanol gerados} = \frac{\text{Teor etanol} \times \text{petanol}}{M_{\text{etanol}}} = \frac{\frac{0,58}{100} \times 1000}{46,07} = 0,126 \text{ moles}$$

### Anexo B.5- Adaptação da levedura, utilizando o licor negro como fonte de açúcar no inóculo em meio líquido

Na Tabela B.12 estão apresentados os tempos e as concentrações utilizados neste procedimento.

Tabela B. 12- Tempos e concentrações utilizadas na adaptação da levedura em meio líquido.

Data	Matraz	Concentração (g/L)	Massa pesada (g)	Volume (mL)	Volume total (mL)
19/9/2016	A	60	102,82	80	500
	B	30	10,14	8	100
21/9/2016	A	60	102,85	80	500
	B	30	10,57	8	100
23/9/2016	A	60 (não se adicionou)	102,85	80	500
	B	40	13,85	10,5	100
26/9/2016	A	68	115,62	90	500
	B	40	13,85	10,5	100
28/9/2016	A	68	115,62	90	500
	B	50	17,27	13	100
30/9/16	A	68 (não se adicionou)	115,62	90	500
	B	50	17,27	13	100
3/10/2016	A	68 (não se adicionou)	115,62	90	500
	B	50 (não se adicionou)	17,27	13	100
7/10/2016	A	68 (não se adicionou)	102,82	90	500
	B	50	41,52	33	250

O matraz B do dia 28/9/2016 permaneceu na estufa até ao 3/10/2016 como precaução, caso a levedura presente no matraz B do dia 30/9/2016 não crescesse.

No dia 7/10/2016 fez-se a inoculação a partir do meio sólido, pois a levedura já apresentava bastante envelhecido e podia-se correr o risco de esta não crescer mais no meio existente.

## Anexo B.6- Contagem das células presentes no inóculo

Tabela B. 13- Contagem das células presente no inóculo do matraz 1.

	1ª Leitura
Células contadas 1	113
Células contadas 2	112
Células contadas 3	116
Soma Total (células/mL)	341

Considerações:

*Concentração final* →  $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  células/mL

*não ultrapassar 10% do volume final*

$40\text{mL licor} + 20\text{mL frutificante} = 60\text{mL}$

*341 células em 15 quadrados pequenos num total de 25.*

$$\left(\frac{341}{15} \times 25\right) \times 10^4 \text{ células/mL} = 5,68 \times 10^6 \text{ células/mL}$$

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \leftrightarrow 10^6 \times 80 = 5 \times 10^6 \times V_i \leftrightarrow V_i = 16\text{mL}$$

Tabela B. 14- Contagem das células presente no inóculo do matraz 2.

	1ª Leitura	2ª Leitura
Contagem células 1	126	135
Contagem células 2	148	147
Contagem células 3	117	129
Soma Total (células/mL)	381	411

Considerações:

*Concentração final*  $\rightarrow 1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  células/mL

*não ultrapassar 10% do volume final*

*40mL licor + 20mL frutificante = 60mL*

*1ª leitura: 381 células em 15 quadrados pequenos num total de 25.*

$$\left(\frac{381}{15} \times 25\right) \times 10^4 \text{ células/mL} = 6,35 \times 10^6 \text{ células/mL}$$

*2ª leitura: 411 células em 15 quadrados pequenos num total de 25.*

$$\left(\frac{411}{15} \times 25\right) \times 10^4 \text{ células/mL} = 6,85 \times 10^6 \text{ células/mL}$$

$$\text{Média das 2 leituras} = \frac{(6,35 + 6,85) \times 10^6}{2} = 6,6 \times 10^6 \text{ células/mL}$$

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \leftrightarrow 10^6 \times 80 = 6,6 \times 10^6 \times V_i \leftrightarrow V_i = 12 \text{ mL}$$

### Anexo B.7- Evolução da fermentação de açúcares do licor negro do processo ao sulfito com a levedura adaptada

Tabela B. 15 - Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro com a levedura adaptada ao longo do tempo de fermentação do ensaio 1.

<i>Tubos</i>	<i>Descrição</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Fator diluição</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Absorvância média água</i>	<i>Absorvância corrigida</i>	<i>Absorvância corrigida média</i>	<i>Concentração açúcar licor (g/L)</i>
1 a	Com água	0	25	0,012	0,011	-	-	30,217
1a réplica				0,01		-	-	
1	Com	0	25	0,256	-	0,245	0,2485	30,217
1 réplica	DNS			0,252	-	0,252		
2 a	Com água	120	25	0,004	0,004	-	-	28,499
2a réplica				0,003		-	-	
2	Com	120	25	0,24	-	0,237	0,235	28,499
2 réplica	DNS			0,236	-	0,233		
3 a	Com água	240	25	0,003	0,003	-	-	28,131
3a réplica				0,003		-	-	
3	Com	240	25	0,238	-	0,235	0,232	28,131
3 réplica	DNS			0,231	-	0,228		
4 a	Com água	1440	25	0,001	0,001	-	-	27,702
4a réplica				0,001		-	-	
4	Com	1440	25	0,228	-	0,227	0,228	27,702
4 réplica	DNS			0,23	-	0,229		
5 a	Com água	1440	25	0,009	0,009	-	-	27,211
5a réplica				0,009		-	-	
5	Com	1440	25	0,231	-	0,222	0,224	27,211
5 réplica	DNS			0,235	-	0,226		
6 a	Com água	1620	25	0,009	0,009	-	-	27,150
6a réplica				0,008		-	-	
6	Com	1620	25	0,23	-	0,222	0,224	27,150
6 réplica	DNS			0,234	-	0,226		
7 a	Com água	1740	25	0,007	0,007	-	-	25,861
7a réplica				0,007		-	-	
7	Com	1740	25	0,221	-	0,214	0,213	25,861
7 réplica	DNS			0,219	-	0,212		
8 a	Com água	4440	25	0,010	0,010	-	-	24,573
8a réplica				0,01		-	-	
8	Com	4440	25	0,215	-	0,205	0,203	24,573
8 réplica	DNS			0,21	-	0,200		

Tabela B. 16 - Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro com a levedura adaptada ao longo do tempo de fermentação do ensaio 1 (continuação).

<i>Tubos</i>	<i>Descrição</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Fator diluição</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Absorvância média água</i>	<i>Absorvância corrigida</i>	<i>Absorvância corrigida média</i>	<i>Concentração açúcar licor (g/L)</i>
9 a	Com água	4560	25	0,012	0,012	-	-	20,769
9a réplica				0,012		-	-	
9	Com DNS			0,182	-	0,170	0,172	
9 réplica				0,185	-	0,173		
10 a	Com água	8790	10	0,031	0,031	-	-	20,615
10a réplica				0,03		-	-	
10	Com DNS			0,435	-	0,405	0,422	
10 réplica				0,44	-	0,440		
11 a	Com água	9000	10	0,033	0,033	-	-	18,001
11a réplica				0,033		-	-	
11	Com DNS			0,397	-	0,364	0,369	
11 réplica				0,407	-	0,374		
12	Com água	10200	10	0,032	0,032	-	-	15,572
12a réplica				0,032		-	-	
12	Com DNS			0,357	-	0,325	0,320	
12 réplica				0,346	-	0,314		

Tabela B. 17 - Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro com a levedura adaptada ao longo do tempo de fermentação do ensaio 2.

<i>Tubos</i>	<i>Descrição</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Fator diluição</i>	<i>Absorvância</i>	<i>Absorvância média água</i>	<i>Absorvância corrigida</i>	<i>Absorvância corrigida média</i>	<i>Concentração açúcar licor (g/L)</i>
1 a	Com água	0	25	0,005	0,005	-	-	28,131
1a réplica				0,005		-	-	
1	Com DNS	0	25	0,238	-	0,233	0,232	
1 réplica				0,235	-	0,230		
2 a	Com água	120	25	0,010	0,010	-	-	26,229
2a réplica				0,01		-	-	
2	Com DNS	120	25	0,221	-	0,211	0,216	
2 réplica				0,231	-	0,221		
3 a	Com água	240	25	0,010	0,011	-	-	25,923
3a réplica				0,011		-	-	
3	Com DNS	240	25	0,224	-	0,214	0,214	
3 réplica				0,224	-	0,214		
4 a	Com água	1650	25	0,008	0,008	-	-	25,554
4a réplica				0,008		-	-	
4	Com DNS	1650	25	0,217	-	0,209	0,211	
4 réplica				0,22	-	0,212		
5 a	Com água	3120	25	0,009	0,008	-	-	24,757
5a réplica				0,007		-	-	
5	Com DNS	3120	25	0,209	-	0,201	0,204	
5 réplica				0,215	-	0,207		
6 a	Com água	7350	10	0,024	0,024	-	-	18,247
6a réplica				0,023		-	-	
6	Com DNS	7350	10	0,4	-	0,377	0,374	
6 réplica				0,395	-	0,372		
7 a	Com água	7560	25	0,007	0,007	-	-	16,965
7a réplica				0,007		-	-	
7	Com DNS	7560	25	0,145	-	0,138	0,141	
7 réplica				0,15	-	0,143		
8 a	Com água	8760	10	0,026	0,026	-	-	16,529
8a réplica				0,025		-	-	
8	Com DNS	8760	10	0,342	-	0,317	0,339	
8 réplica				0,387	-	0,362		
9 a	Com água	4560	10	0,025	0,025	-	-	16,553
9a réplica				0,025		-	-	
9	Com DNS	4560	10	0,333	-	0,308	0,340	
9 réplica				0,396	-	0,371		
10 a	Com água	8790	10	0,026	0,026	-	-	14,713
10a réplica				0,025		-	-	
10	Com DNS	8790	10	0,332	-	0,307	0,302	
10 réplica				0,323	-	0,298		

### Anexo B.8- Destilação do licor negro fermentado com a levedura adaptada

Tabela B. 18- Contagem das células presente no inóculo do matraz 1.

Matraz			1ª Leitura	2ª Leitura	Volume inóculo (mL)
1	1ª Leitura	Contagem células 1	82	129	13
		Contagem células 2	112	138	
		Contagem células 3	124	141	
		Soma Total (células/mL)	318	408	

Tabela B. 19- Contagem das células presente no inóculo do matraz 2.

Matraz			1ª Leitura	2ª Leitura	Volume inóculo (mL)
2	1ª Leitura	Contagem células 1	122	160	12
		Contagem células 2	115	146	
		Contagem células 3	139	126	
		Soma Total (células/mL)	376	432	

Tabela B. 20- Valores obtidos da concentração de açúcar presente no licor negro do processo ao sulfito com a levedura adaptada para a determinação de bioetanol.

Matraz	Tubos	Descrição	Tempo (min)	Fator diluição	Absorvância	Absorvância média água	Absorvância corrigida	Absorvância corrigida média	Concentração açúcar licor (g/L)
1	1 a	Com água	0	25	0,013	0,0135	-	-	31,536
	1a réplica				0,014		-	-	
	1	Com			0,266	0,2525	0,25925		
	1 réplica	DNS			0,266	0,266			
	2 a	Com água	7200	10	0,033	0,033	-	-	
	2a réplica				0,033		-	-	
	2	Com			0,303	-	0,270	0,274	
	2 réplica	DNS			0,31	-	0,277		
2	1 a	Com água	0	25	0,013	0,012	-	-	27,886
	1a réplica				0,011		-	-	
	1	Com			0,231	0,219	0,2295		
	1 réplica	DNS			0,24	0,24			
	2 a	Com água	7200	10	0,032	0,032	-	-	
	2a réplica				0,032		-	-	
	2	Com			0,315	-	0,283	0,287	
	2 réplica	DNS			0,323	-	0,291		

Tabela B. 21- Resultados obtidos para a determinação da massa específica do ar à temperatura da água.

Ensaio	$m$ picnómetro seco (g)	$T$ atual água (°C)	$T$ média atual água (°C)	$m$ picnómetro +água (g)	$T$ média atual amostra (°C)	$m$ Picnómetro +amostra (g)	$m$ água-ar (g)	$\rho$ água a $T$ água (g/L)	$\rho$ ar a $T$ água (g/L)
1	14,198	24,8	25,2	40,4615	19,8	40,3685	26,2636	997,035	1,1818
		25,2		40,4823			26,2844		
		25,7		40,4620			26,2641		
2	13,893	23,8	24,2	40,5372	19,8	40,4312	26,6445	997,289	1,1857
		24,0		40,5369			26,6442		
		24,9		40,5196			26,6269		

Tabela B. 22- Valores obtidos de teor alcoólico presente no licor negro após a fermentação.

Ensaio	$V_{\text{picnómetro a } T_{\text{água}}}$ ( $dm^3$ )	$V_{\text{picnómetro a } T_{\text{água}}}$ (g/L)	Fator F	$V_{\text{picnómetro a } 20^\circ\text{C}}$ ( $dm^3$ )	$V_{\text{picnómetro a } 20^\circ\text{C}}$ ( $dm^3$ )	$\rho_{\text{água a } T_{\text{amostra}}}$ (g/L)	$m_{\text{amostra-ar}}$ (g)	$\rho_{\text{água a } T_{\text{amostra}}}$ (g/L)	F correção	Teor alcoólico (%v/v)
1	0,02637	0,02638	1,00263	0,02626	0,02626	1,2037	26,1706	997,66	0,5185	0,85
	0,02639		1,00267	0,02628						
	0,02637		1,00289	0,02625						
2	0,02676	0,02675	1,00287	0,02664	0,02663	1,2037	26,5385	997,79	0,4318	0,67
	0,02676		1,00297	0,02664						
	0,02674		1,00309	0,02662						

### Exemplo de cálculo

$$P = 1 \text{ atm}$$

$$M_{\text{ar}} = 28,9 \text{ g/mol}$$

$$R = 0,082 \text{ atm. L. mol}^{-1}. \text{K}^{-1}$$

$$m_{\text{água-ar}} = m_{\text{picnómetro+água}} - m_{\text{picnómetro seco}} = 40,4615 - 14,1979 = 26,26 \text{ g}$$

A massa específica da água foi determinada através da equação da curva dos valores da Tabela B.9.

$$\begin{aligned} \rho_{\text{água}, T_{\text{média atual água}}} &= -0,0053T_{\text{água}}^2 + 0,0083T_{\text{água}} + 1000,2 \\ &= -0,0053 \times 25,2^2 + 0,0083 \times 25,2 + 1000,2 = 997,03 \text{ g/L} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \rho_{ar,T_{\text{média atual água}}} \rightarrow PV = nRT \leftrightarrow PV &= \frac{m}{M_{ar}} RT \leftrightarrow \frac{m}{V} = \rho_{ar,T_{\text{média atual água}}} \\ &= \frac{P_{Mar}}{RT_{\text{média atual água}}} = \frac{1 \times 28,96}{0,0082 \times (25,2 + 273)} = 1,18 \text{ g/L} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_{\text{picnómetro}} &= \frac{m_{\text{água-ar}}}{(\rho_{\text{água},T_{\text{média atual água}}} - \rho_{ar,T_{\text{média atual água}}})} = \frac{26,26}{(997,03 - 1,18)} \\ &= 0,02637 \text{ dm}^3 \end{aligned}$$

O valor f encontra-se na Tabela I do Anexo II da norma densidade OIV.

$$\begin{aligned} V_{\text{picnómetro},20^{\circ}\text{C}} &= \frac{[m_{\text{picnómetro+água}} - (m_{\text{picnómetro seco}} - j \times (m_{\text{picnómetro+água}} - m_{\text{picnómetro seco}}))] \times \text{fator } f}{1000} \\ &= \frac{[40,4615 - (14,1979 - 0,0012 \times (40,4615 - 14,1979))] \times 1,002625}{1000} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \rho_{ar,T_{\text{amostra}}} \rightarrow PV = nRT \leftrightarrow PV &= \frac{m}{M} RT \leftrightarrow \frac{m}{V} = \rho_{ar,amostra} = \frac{P_{Mar}}{RT_{\text{amostra}}} \\ &= \frac{1 \times 28,96}{0,0082 \times (19,8 + 273)} = 1,20 \text{ g/L} \end{aligned}$$

$$m_{\text{amostra-ar}} = m_{\text{picnómetro+amostra}} - m_{\text{picnómetro seco}} = 40,3685 - 14,1979 = 26,2 \text{ g}$$

$$\rho = \frac{m_{\text{amostra-ar}}}{V_{\text{picnómetro},20^{\circ}\text{C}}} + \rho_{ar,T_{\text{amostra}}} = \frac{26,2}{0,02626} + 1,20 = 997,7 \text{ g/L}$$

$$\begin{aligned} f_{\text{correção}} &= \frac{\left[ \frac{\rho^*}{1000} - \left( \frac{\rho}{1000} + (19,8 - 20) \times w \right) \times 1000 \right]}{f^*} \\ &= \frac{\left[ \frac{998,4}{1000} - \left( \frac{997,7}{1000} - 0,2 \times 0,00021 \right) \times 1000 \right]}{1,5} = 0,5185 \end{aligned}$$

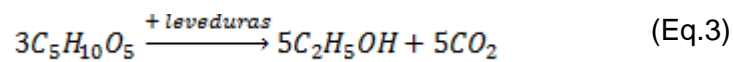
Como a massa específica é próxima de 997,7 g/L, o teor de álcool tabelado é 1 (Tabela B.10).

$$\text{Teor alcoólico (\%)} = \text{Teor alcohól tabelado} + f_{\text{correção}} = 0,33 + 0,5185 = 0,85 \%$$

### Exemplo de cálculo do teor etanol teórico

- Considerar que só fermentaram pentoses

→ Matraz 1



$$M_{\text{etanol}} = 46,07 \text{ g/mol}$$

$$\Delta C_{\text{açúcar}} = C_i - C_f = 31,5 - 13,3 = 18,2 \text{ g/L}$$

$$M_{\text{pentose}} = 5 \times 12,01 + 10 \times 1,01 + 5 \times 16 = 150 \text{ g/mol}$$

$$n^{\circ} \text{moles etanol gerados teórico} = \frac{\Delta C_{\text{açúcar}} \times 5}{M_{\text{pentose}} \times 3} = \frac{18,2 \times 5}{150 \times 3} = 0,20 \text{ moles}$$

$$n^{\circ} \text{ etanol gerados} = \frac{\text{Teor etanol} \times \rho_{\text{etanol}}}{M_{\text{etanol}}} = \frac{0,85}{100} \times 1000}{46,07} = 0,18 \text{ moles}$$

**Anexo B.9- Parâmetros para a caraterização da produção de etanol na fermentação com a levedura adaptada [37].**

Exemplo de cálculo

- Os valores utilizados para o cálculo foram do ensaio 1

Velocidade média de consumo do substrato (g/(L.h))

$$v_s = \frac{S_t - S_f}{t_f} = \frac{30,2 - 15,6}{170} = 0,086 \text{ g/L.h}$$

Sf – concentração substrato final (g/L)

St – concentração substrato total (g/L)

tf – tempo total de fermentação (horas)

vs – velocidade média consumo de substrato (g/(L.h))

4.6.1.1 Fator de conversão substrato a etanol

$$Y_{E/S} = \frac{E_f - E_o}{S_t - S_f} = \frac{\frac{0,85}{100} \times 1000}{30,2 - 15,6} = 0,58$$

Ef – concentração produto final (etanol) (g/L)

E0 – concentração produto inicial (etanol) (g/L)

St – concentração de substrato total (g/L)

Sf – concentração de substrato final (g/L)

Y e/s – fator de conversão substrato a produto (g/g)

Produtividade em etanol (g/(L.h))

$$P_E = \frac{E_f - E_o}{t_f} = \frac{\frac{0,85}{100} \times 1000}{170} = 0,05 \text{ g/L.h}$$

$E_f$  – concentração produto final (etanol) (g/L)

$E_o$  – concentração produto inicial (etanol) (g/L)

$t_f$  – tempo total de fermentação (horas)

$P_e$  – produtividade em etanol (g/L.h)