



Otimização da produção de bioetanol a partir de palha de milho cultivado para fitorremediação de solos contaminados com metais pesados

FRANCISCO JOSÉ ALVES DE ALMEIDA

novembro de 2021

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE PALHA DE MILHO CULTIVADO PARA FITORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM METAIS PESADOS

Francisco José Alves de Almeida
1161580

2021

Instituto Superior de Engenharia do Porto
Departamento de Engenharia Mecânica



OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE PALHA DE MILHO CULTIVADO PARA FITORREMEDIÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM METAIS PESADOS

Francisco José Alves de Almeida
1161580

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

2021

Instituto Superior de Engenharia do Porto
Departamento de Engenharia Mecânica



JÚRI

Presidente

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

Orientador

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

Coorientador

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

Arguente

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

AGRADECIMENTOS

À orientadora desta dissertação, a Doutora Nídia de Sá Caetano, exprimo a minha gratidão pela orientação prestada, a disponibilidade e o apoio que sempre demonstrou.

Ao meu coorientador, o Doutor Wilson de Galvão Morais Júnior, agradeço pela sua disponibilidade e ajuda na elaboração deste trabalho.

Por último, não poderia acabar sem agradecer à minha família e amigos por todo o apoio, força e carinho prestado ao longo deste meu percurso académico e à elaboração desta dissertação, a qual sem o seu apoio não teria sido possível realizar.

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

O Doutor Wilson Galvão de Moraes Júnior, coorientador desta dissertação, agradece a Bolsa *Marie Skłodowska-Curie* com o número 867473, financiada pelo Programa de investigação e inovação *Horizon 2020* da União Europeia.

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



PALAVRAS CHAVE

Bioetanol; biomassa lignocelulósica; contaminantes metais pesados; fitorremediação; otimização; palha de milho

RESUMO

A procura global por energia e produtos materiais têm vindo a crescer imenso. As principais fontes de energia e produtos químicos são os combustíveis fósseis, recursos altamente poluidores do ambiente, que levantam questões importantes não só a nível ambiental, mas como também económico e social.

Esta dependência dos combustíveis fósseis pode levar a uma potencial crise energética no futuro quando estes começarem a esgotar. Para combater isto é necessário encontrar e utilizar recursos mais sustentáveis. A biomassa lignocelulósica é uma alternativa bastante promissora.

A biomassa lignocelulósica está presente em grandes quantidades e oferece diversas opções para a produção de bioenergia. A produção de biocombustíveis renováveis e sustentáveis, como é o caso do bioetanol ou do biodiesel, a partir de biomassa está a ganhar interesse global. Os biocombustíveis trazem benefícios do ponto de vista ambiental e económico. O bioetanol produzido a partir de biomassa renovável, surge como um combustível sustentável, mais limpo, ambientalmente seguro, neutro em carbono e uma alternativa verde para o combustível fóssil.

Este trabalho teve como objetivo principal valorizar a biomassa lignocelulósica (palha de milho) resultante da fitorremediação de um solo contaminado com metais pesados como o zinco (Zn) e o cádmio (Cd), através da otimização do processo de obtenção de açúcares usados na produção de bioetanol.

O processo de produção de bioetanol inclui três etapas fundamentais: o pré-tratamento da biomassa de forma a aumentar a eficiência dos processos seguintes; a hidrólise, que converte a celulose e a hemicelulose da biomassa lignocelulósica em açúcares; e a fermentação, que utiliza microrganismos para converter esses açúcares em etanol.

Este estudo focou-se na otimização das etapas de pré-tratamento com ácido diluído e de hidrólise enzimática, sendo a palha de milho a biomassa lignocelulósica, algumas provenientes de solos contaminados com metais pesados e outra palha servindo de controlo. De forma a otimizar estas etapas foi usada a metodologia de Delineamento

Composto Central Rotacional (DCCR). Neste método foram usados três pontos centrais e estudadas 3 variáveis independentes, a saber: para o pré-tratamento ácido, a temperatura do banho (T), o tempo de reação (t) e a concentração do ácido (CA); e para a hidrólise enzimática, a temperatura do banho (T), o tempo de reação (t) e a quantidade de enzima (E). A resposta analisada em ambos os casos foi a soma dos açúcares (SA) obtidos, após leitura com cromatografia líquida de alta eficiência. Na otimização do pré-tratamento foram realizados 51 ensaios no total. Para a otimização da hidrólise foram executados 34 ensaios.

As condições ótimas para o pré-tratamento com ácido clorídrico diluído foram determinadas para as biomassas utilizadas neste estudo, que se passam a enumerar: para a biomassa do solo de Controlo uma temperatura de 86,8 °C, tempo de reação de 6,6 horas e uma concentração do ácido de 3,2% v/v, foi considerado ótimo e previu-se um resultado de 16,4 g/L de açúcares (resultado experimental de validação de 15,2 g/L); para a biomassa do solo de Estarreja foi considerado ótimo uma temperatura de 86,7 °C, tempo de reação de 6,9 horas e uma concentração do ácido de 3,6% v/v e previu-se um resultado de 11,4 g/L de açúcares (resultado experimental de validação 12,0 g/L); por último para a biomassa do solo da Panasqueira foram determinados uma temperatura de 86,6 °C, tempo de reação de 7,3 horas e uma concentração do ácido de 3,6% v/v, como sendo as condições ótimas e previu-se um resultado de 13,5 g/L de açúcares (resultado experimental de validação 12,5 g/L).

Para a hidrólise enzimática com *Accellerase 1000*, só se procedeu à análise das palhas dos solos de controlo e Panasqueira. A biomassa do solo de controlo apresentou as condições ótimas como sendo temperatura igual a 54 °C, tempo de reação de 30,3 horas e volume de enzima de 2,5 mL, com um resultado previsto de 17,2 g/L de açúcares (resultado experimental de validação 16,8 g/L) e a biomassa do solo da Panasqueira apresentou temperatura igual a 43 °C, tempo de reação de 38,5 horas e volume de enzima usado de 3 mL como condições ideais, com um resultado previsto de 17,6 g/L de açúcares (resultado experimental de validação 17,5 g/L).

KEYWORDS

Bioethanol; corn stover; heavy metal contaminants; lignocellulosic biomass; optimization; phytoremediation

ABSTRACT

The global demand for energy and material products has been growing immensely. The main sources of energy and chemicals are fossil fuels, highly polluting resources for the environment that raise important issues not only at an environmental level, but also economically and socially.

This dependence on fossil fuels could lead to a potential energy crisis in the future when fossil fuels start to run out. To combat this, it is necessary to find and use more sustainable resources. Lignocellulosic biomass is a very promising alternative.

Lignocellulosic biomass is present in large quantities and offers several options for the production of bioenergy. The production of renewable and sustainable biofuels from biomass, such as bioethanol or biodiesel, is gaining global interest. Biofuels bring benefits from an environmental and economic point of view. Bioethanol produced from renewable biomass offers opportunities for a sustainable, cleaner, environmentally safer, carbon neutral fuel and a green alternative to fossil fuel.

The main objective of this work is to value the lignocellulosic biomass (corn stover) resulting from the phytoremediation of a soil contaminated with heavy metals such as zinc (Zn) and cadmium (Cd), by optimizing the process of obtaining sugars used in production of bioethanol.

The bioethanol production process includes three fundamental steps: pre-treatment of biomass in order to increase the efficiency of the following processes; hydrolysis, which converts cellulose and hemicellulose from lignocellulosic biomass into sugars; and fermentation, which uses microorganisms to convert these sugars into ethanol.

This study focused on optimizing the steps of pre-treatment with dilute acid and enzymatic hydrolysis, using corn stover as lignocellulosic biomass, produced using soils contaminated with heavy metals (Panasqueira and Estarreja) and from non-contaminated soil, that served as a control. In order to optimize these steps, the Central Composite Rotational Design (DCCR) methodology was used. In this method, three central points were used and 3 independent variables were studied, namely: for the acid

pretreatment, the bath temperature (T), the reaction time (t) and the acid concentration (CA); and for enzymatic hydrolysis, the bath temperature (T), the reaction time (t) and the amount of enzyme (E). The response analyzed in both cases was the sum of sugars (SA) obtained, after analyzing with high performance liquid chromatography. In optimizing the pre-treatment, 51 experiments were performed in total. To optimize the hydrolysis, 34 experiments were performed.

The optimal conditions for pre-treatment with dilute hydrochloric acid were determined for the biomasses used in this study, which will now be listed: for the biomass from Control soil, a temperature of 86,8 °C, reaction time of 6.6 hours and an acid concentration of 3.2% v/v was considered optimal and a result of 16.4 g/L of sugars was predicted (experimental validation result of 15.2 g/L); for the Estarreja biomass, a temperature of 86.7 °C was considered optimal, a reaction time of 6.9 hours and an acid concentration of 3.6% v/v and a result of 11,4 g/L was predicted of sugars (experimental validation result 12.0 g/L); finally, for the Panasqueira biomass, a temperature of 86.6 °C, a reaction time of 7.3 hours and an acid concentration of 3.6% v/v were determined as the optimal conditions and a result of 13.5 g/L of sugars (12.5 g/L experimental validation result).

For enzymatic hydrolysis with *Accellerase* 1000, only control and Panasqueira straws were analyzed. The control biomass presented the optimal conditions as being a temperature equal to 54 °C, a reaction time of 30.3 hours and an enzyme volume of 2.5 mL, with a predicted result of 17.2 g/L of sugars (result experimental validation 16.8 g/L) and the Panasqueira biomass had a temperature of 43 °C, a reaction time of 38.5 hours and a volume of enzyme used of 3 mL as ideal conditions, with a predicted result of 17.6 g/L of sugars (experimental validation result 17.5 g/L).

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Lista de Siglas

AFEX	Ammonia Fiber Explosion
Cd	Cádmio
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
EUA	Estados Unidos da América
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
NIRS	<i>Near-infrared spectroscopy</i>
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
SHF	Hidrólise e fermentação separadas
SSF	Sacarificação e fermentação simultâneas
Pb	Chumbo
UE	União europeia
Zn	Zinco

Lista de Unidades

% (m/m)	percentagem em massa
% (v/v)	percentagem em volume
°C	grau Celsius
cm	centímetro
g	grama
g/kg	grama por quilograma
g/L	grama por litro
h	hora
kg	quilograma
L	litro
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mol/L	mol por litro
µL	microlitro

Lista de Abreviaturas

a	Absortividade
A	Absorbância
A _d	Teor de Cinzas
b	Comprimento de caminho da célula
C	Teor de celulose
df	Fator de diluição
E	Quantidade de enzima
LI	Massa de lignina insolúvel
LT	Massa de lignina total
m ₁	Massa recipiente vazio, após 105 °C
m ₂	Massa recipiente com amostra húmida
m ₃	Massa recipiente com amostra seca, após 105 °C
m ₄	Massa recipiente vazio, após 550 °C
m ₅	Massa recipiente com amostra, após 105 °C
m ₆	Massa recipiente com amostra incinerada, após 550 °C
M _{ad}	Teor de Humidade
m _e	massa do cadinho com a amostra após 105 °C, em g;
mm	massa do cadinho com a amostra após 500 °C, em g;
ms	massa seca da amostra inicial, em g
SA	Soma das concentrações de açúcares
V _f	volume do filtrado
t	Tempo
T	Temperatura

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1-CONSUMO GLOBAL DE ENERGIA PRIMÁRIA POR FONTE ENERGÉTICA NOS ANOS 1995 A 2020 (FONTE: [6]).....	3
FIGURA 2-PRODUÇÃO DE ENERGIA EM PORTUGAL ENTRE OS ANOS 1998 E 2018 (FONTE: DGEG [7])	3
FIGURA 3-COMPARAÇÃO ENTRE A QUOTA ENERGÉTICA ENTRE FONTES DE ENERGIA PARA OS ANOS 2008 E 2018 (FONTE: DGEG [7])	4
FIGURA 4-ESQUEMA DO PROCESSO DE FITOEXTRAÇÃO (ADAPTADO DE [17])	10
FIGURA 5-ESTRUTURA DA LIGNOCELULOSE, COM AS RESPECTIVAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS PRINCIPAIS COMPONENTES (RETIRADO DE [23])	11
FIGURA 6-EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO MUNDIAL DE ETANOL ENTRE OS ANOS DE 2007 E 2020 (FONTE: AFDC [35])	14
FIGURA 7-METAS ENERGÉTICAS PROPOSTAS PARA OS ESTADOS-MEMBROS DA EU PARA O ANO DE 2021 (FONTE: APPB [37])	16
FIGURA 8-EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO NA ESTRUTURA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA (FONTE: [20])	18
FIGURA 9-HIDRÓLISE DA CELULOSE POR UMA ENDOGLUCANASE, RESULTANDO NUMA CADEIA MAIS CURTA DE CELULOSE (CELODEXTRINA).....	23
FIGURA 10-REAÇÃO DA CELODEXTRINA HIDROLISADA POR EXOGLUCANASE, PRODUZINDO CELOBIOSE 23	
FIGURA 11-REAÇÃO DA CELOBIOSE COM UMA MOLÉCULA DE ÁGUA RESULTANDO EM 2 UNIDADES DE GLICOSE, SENDO A REAÇÃO CATALISADA PELA B-GLUCOSIDASE	23
FIGURA 12-VARIAÇÃO DA RESPOSTA CONSOANTE A VARIÁVEL INDEPENDENTE (CONTROLO)	43
FIGURA 13-VARIAÇÃO DA RESPOSTA CONSOANTE A VARIÁVEL INDEPENDENTE (ESTARREJA)	43
FIGURA 14-VARIAÇÃO DA RESPOSTA CONSOANTE A VARIÁVEL INDEPENDENTE (PANASQUEIRA).....	44
FIGURA 15-SURFACE PLOTS PREVISTOS (CONTROLO).....	45
FIGURA 16-SURFACE PLOTS PREVISTOS (ESTARREJA)	46
FIGURA 17- SURFACE PLOTS PREVISTOS (PANASQUEIRA)	47
FIGURA 18-VARIAÇÃO DA RESPOSTA CONSOANTE A VARIÁVEL INDEPENDENTE (CONTROLO)	51
FIGURA 19-VARIAÇÃO DA RESPOSTA CONSOANTE A VARIÁVEL INDEPENDENTE (PANASQUEIRA).....	51
FIGURA 20-SURFACE PLOTS PREVISTOS (CONTROLO).....	53
FIGURA 21-SURFACE PLOTS PREVISTOS (PANASQUEIRA)	54
FIGURA 22-CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DO PRÉ-TRATAMENTO	74

FIGURA 23-CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DA HIDRÓLISE 79

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1-CARACTERÍSTICAS DA GASOLINA E DO ETANOL (FONTE:EUBIA [28])	13
TABELA 2-PRODUÇÃO ANUAL DE ETANOL NO MUNDO ENTRE OS ANOS 2015 E 2020, EM MILHÕES DE LITROS (ADAPTADO DE: RFA [36])	15
TABELA 3-RESUMO DAS VANTAGENS/DESVANTAGENS DOS MÉTODOS DE PRÉ-TRATAMENTO (ADAPTADO DE:[33])	19
TABELA 4-CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS APLICADAS NO PRÉ-TRATAMENTO DE DIFERENTES BIOMASSAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL.....	21
TABELA 5-CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS APLICADAS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE DIFERENTES BIOMASSAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL	24
TABELA 6-VALORES ATRIBUÍDOS ÀS VARIÁVEIS PARA O ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO	34
TABELA 7-VALORES ATRIBUÍDOS ÀS VARIÁVEIS PARA O ESTUDO DA HIDRÓLISE.....	34
TABELA 8-CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA CADA ENSAIO	35
TABELA 9-TEMPOS DE RETENÇÃO PARA OS COMPOSTOS ENCONTRADOS NO PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	36
TABELA 10-RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA E COMPARAÇÃO COM A LITERATURA....	39
TABELA 11-SOMA DAS CONCENTRAÇÕES DOS AÇÚCARES PRESENTES NOS ENSAIOS PARA AS TRÊS BIOMASSAS ESTUDADAS.....	41
TABELA 12-VALIDAÇÃO DAS PREVISÕES DOS VALORES DE SA (P É A PALHA DE PANASQUEIRA, E É DE ESTARREJA E C É A DE CONTROLO)	48
TABELA 13-SOMA DAS CONCENTRAÇÕES DOS AÇÚCARES PRESENTES NOS ENSAIOS PARA AS DUAS BIOMASSAS ESTUDADAS.....	49
TABELA 14-VALIDAÇÃO DAS PREVISÕES DOS VALORES DE SA (P É A PALHA DE PANASQUEIRA E C É A DE CONTROLO).....	55
TABELA 15-CONCENTRAÇÃO (EM G/L) DE TODOS OS COMPOSTOS NAS AMOSTRAS DE PRÉ-TRATAMENTO (ONDE C CORRESPONDE ÀS AMOSTRAS DA BIOMASSA DE CONTROLO, E ÀS DE ESTARREJA E P ÀS DE PANASQUEIRA)	73
TABELA 16-ANOVA FOR QUADRATIC MODEL (PRÉ-TRATAMENTO CONTROLO).....	75
TABELA 17-FIT STATISTICS (PRÉ-TRATAMENTO CONTROLO)	75
TABELA 18-ANOVA FOR QUADRATIC MODEL (PRÉ-TRATAMENTO ESTARREJA)	76
TABELA 19-FIT STATISTICS (PRÉ-TRATAMENTO ESTARREJA).....	76
TABELA 20-ANOVA FOR QUADRATIC MODEL (PRÉ-TRATAMENTO PANASQUEIRA)	77

TABELA 21-FIT STATISTICS (PRÉ-TRATAMENTO PANASQUEIRA).....	77
TABELA 22-CONCENTRAÇÃO (EM G/L) DE TODOS OS COMPOSTOS NAS AMOSTRAS DE HIDRÓLISE (ONDE C CORRESPONDE ÀS AMOSTRAS DA BIOMASSA DE CONTROLO E P ÀS DE PANASQUEIRA)	78
TABELA 23-ANOVA FOR QUADRATIC MODEL (HIDRÓLISE CONTROLO).....	80
TABELA 24-FIT STATISTICS (HIDRÓLISE CONTROLO)	80
TABELA 25-ANOVA FOR QUADRATIC MODEL (HIDRÓLISE PANASQUEIRA)	81
TABELA 26-FIT STATISTICS (HIDRÓLISE PANASQUEIRA)	81

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Enquadramento geral	2
1.2	Objetivos da Dissertação.....	5
1.3	Conteúdo da Dissertação	5
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1	Fitorremediação.....	9
2.2	Biomassa Lignocelulósica	11
2.2.1	Palha de milho	12
2.3	Bioetanol	12
2.3.1	Mercado de bioetanol – produção e consumo	14
2.3.2	Processo de produção de bioetanol.....	17
2.4	Contributo da dissertação.....	27
3	DESCRIÇÃO TÉCNICA	31
3.1	Caraterização da Biomassa	31
3.1.1	Teor de humidade	31
3.1.2	Teor de cinzas.....	31
3.1.3	Teor de celulose	32
3.1.4	Teor de lignina.....	32
3.2	Pré-tratamento	33
3.3	Hidrólise enzimática.....	33
3.4	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	33
3.5	Quantificação de açúcares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Caraterização da biomassa	39

4.2	Pré-tratamento ácido.....	40
4.2.1	Otimização do pré-tratamento	42
4.3	Hidrólise enzimática.....	48
4.3.1	Otimização da hidrólise.....	50
4.4	Comparação dos resultados com a literatura.....	55
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	59
5.1	Conclusões	59
5.2	Sugestões de trabalhos futuros	60
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
6.1	Normas.....	69
6.2	Legislação	70
7	ANEXOS.....	73
7.1	Anexo 1 – Concentrações dos compostos nas amostras do pré-tratamento.....	73
7.2	Anexo 2 – Cromatograma de uma amostra do pré-tratamento.....	74
7.3	Anexo 3 – ANOVA for quadratic model e Fit statistics (pré-tratamento Controlo).....	75
7.4	Anexo 4 – ANOVA for quadratic model e Fit statistics (pré-tratamento Estarreja).....	76
7.5	Anexo 5 – ANOVA for quadratic model e Fit statistics (pré-tratamento Panasqueira) .	77
7.6	Anexo 6 – Concentração dos compostos nas amostras de hidrólise.....	78
7.7	Anexo 7 - Cromatograma de uma amostra da hidrólise	79
7.8	Anexo 8 - ANOVA for quadratic model e Fit statistics (hidrólise Controlo)	80
7.9	Anexo 9 - ANOVA for quadratic model e Fit statistics (hidrólise Panasqueira)	81

INTRODUÇÃO

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

1 INTRODUÇÃO

Devido ao aumento da industrialização e também da população mundial, a procura global por energia e produtos materiais têm vindo a crescer imenso. Uma vez que as principais fontes de energia e produtos químicos são os combustíveis fósseis, este crescimento levanta muitas questões importantes a nível ambiental, económico e social.

O petróleo por exemplo, é explorado a uma taxa muito elevada pelo que a regeneração natural do planeta, que é um processo muito lento, não consegue acompanhar as necessidades desta crescente população mundial, levando a uma potencial crise energética no futuro. Outro problema da dependência excessiva em combustíveis fósseis é que a maior parte das reservas de petróleo e gás natural estão localizadas num pequeno grupo de países, o que torna uns países dependentes de outros em termos energéticos. Devido a estas situações, este padrão de consumo é considerado insustentável pelo que existe um crescente interesse global no desenvolvimento de fontes alternativas de energia[1].

Estes problemas podem vir a ser mitigados através da mudança gradual dos recursos fósseis para recursos de energia renovável, estando estes mais uniformemente distribuídos e acessíveis a mais países do que os recursos fósseis, causam menos preocupações ambientais e sociais, e como o nome indica são recursos que se regeneram se for aplicado um consumo responsável. Entre as fontes de energia renovável, os recursos derivados de biomassa são uma fonte de energia bastante promissora, com capacidade de substituir/complementar o uso dos combustíveis fósseis [2].

Para a produção de eletricidade ou calor podem ser utilizados uma variedade de alternativas renováveis (eólica, solar, hídrica, biomassa, etc.), enquanto para a produção de combustíveis e outros produtos químicos a biomassa é a única alternativa viável aos recursos fósseis, uma vez que é a única fonte rica em carbono disponível, para além dos fósseis. Como consequência, a produção sustentável de biomassa é uma questão crucial, especialmente no que diz respeito a uma possível competição de terras férteis com a indústria alimentar [3].

Atualmente, os combustíveis baseados em biomassa, denominados de biocombustíveis, podem ser classificados como de primeira ou segunda geração. Os biocombustíveis de primeira geração referem-se aos biocombustíveis produzidos a partir de matérias-primas em competição com fins alimentares. Por causa desta competição, estes biocombustíveis geram preocupações éticas, políticas e ambientais. De modo a superar estes problemas, procede-se à produção de biocombustíveis de segunda geração, que são aqueles produzidos através de matérias-primas com base em resíduos (como os

resíduos alimentares), restos não comestíveis de culturas alimentares e culturas sem fins alimentares, como é o caso da biomassa lignocelulósica produzida através de culturas de fitorremediação. Esta prática tem vindo a ganhar mais interesse a nível global nos últimos anos como uma possível alternativa "mais verde" aos combustíveis fósseis e biocombustíveis de primeira geração [3].

1.1 Enquadramento geral

Com as crescentes necessidades energéticas em todo o mundo e o esgotamento das reservas de combustível fóssil convencional, tem havido um crescente interesse global no desenvolvimento de fontes alternativas de energia. Além disso, existem preocupações em muitos países com a segurança e independência energética.

As fontes de energia renováveis são vistas como a solução para esta crescente necessidade energética. Governos, agências intergovernamentais e outras partes interessadas esperam alcançar um futuro sustentável, substituindo os materiais e energias derivadas de petróleo por fontes alternativas renováveis [4]. A introdução do conjunto de Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) globais, para combater as mudanças climáticas e os seus impactos e tentar alcançar um futuro mais sustentável, apela ao uso de energias renováveis, sustentáveis e mais limpas, diretamente no objetivo 7 dessa lista, Energias renováveis e acessíveis [5].

As energias renováveis são definidas na Diretiva (UE) 2018/2001 da seguinte maneira: “energia de fontes renováveis não fósseis, como eólica, solar (térmica e fotovoltaica), aerotérmica, geotérmica, hidrotérmica, energia ambiente, das marés, ondas e outras energias oceânicas, energia hidroelétrica, de biomassa, de gases de aterro, de gases de estação de tratamento de águas residuais e biogás”.

Atualmente, a produção de energia ainda está muito dependente dos combustíveis fósseis, como se pode ver na Figura 1 onde está expresso o consumo da energia mundial até 2020 e as respetivas fontes dessa energia. No entanto, a tendência nos últimos anos tem sido numa diminuição gradual da quota energética dos combustíveis fósseis e um aumento da quota das energias renováveis, o que mostra uma tendência de investimento nestas fontes de energia e uma atitude de mudança a nível global [6]. A tendência para o consumo de energia tem sido sempre crescente, exceto no ano 2020 onde houve um decréscimo no consumo de energia, muito provavelmente associado à pandemia provocada pelo COVID-19.

Em Portugal a produção de energia também é dominada pela utilização de combustíveis fósseis, como se pode verificar pelo gráfico da Figura 2. Analisando o consumo das diferentes formas de energia em 2018, verifica-se que o petróleo continua a ser a principal fonte de energia primária (38,8%), seguido das renováveis (26,8%), gás natural (22,4%) e do carvão (12%) [7].

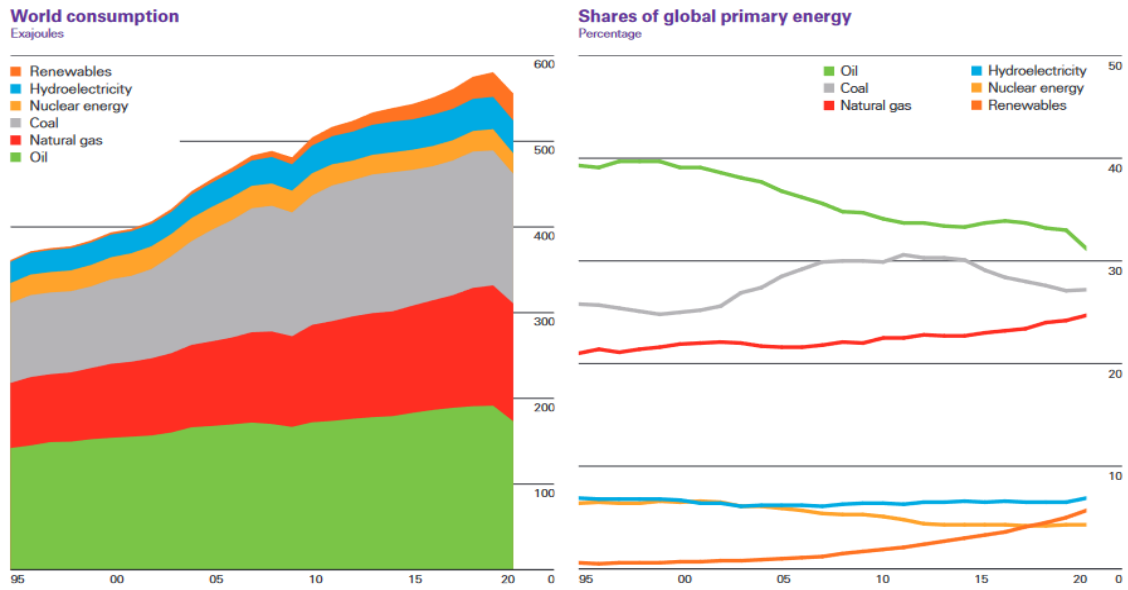


Figura 1-Consumo global de energia primária por fonte energética nos anos 1995 a 2020 (fonte: [6])

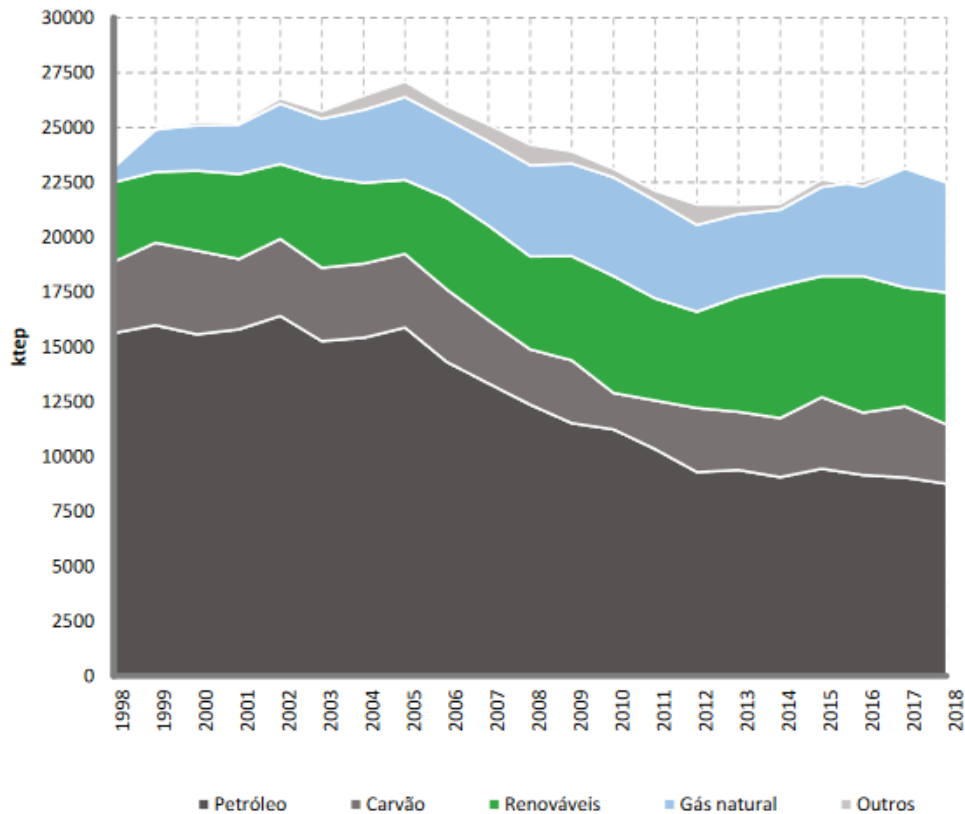


Figura 2-Produção de energia em Portugal entre os anos 1998 e 2018 (Fonte: DGEG [7])

No entanto, como se pode verificar nos gráficos da Figura 3, o peso do petróleo na produção de energia tem vindo a decrescer nos últimos anos (50,9% em 2008 vs 38,9% em 2018), enquanto o peso das renováveis (17,8% em 2008 vs. 26,7% em 2018) e do gás natural (17,1% em 2008 vs. 22,4% em 2018) aumentaram consideravelmente.

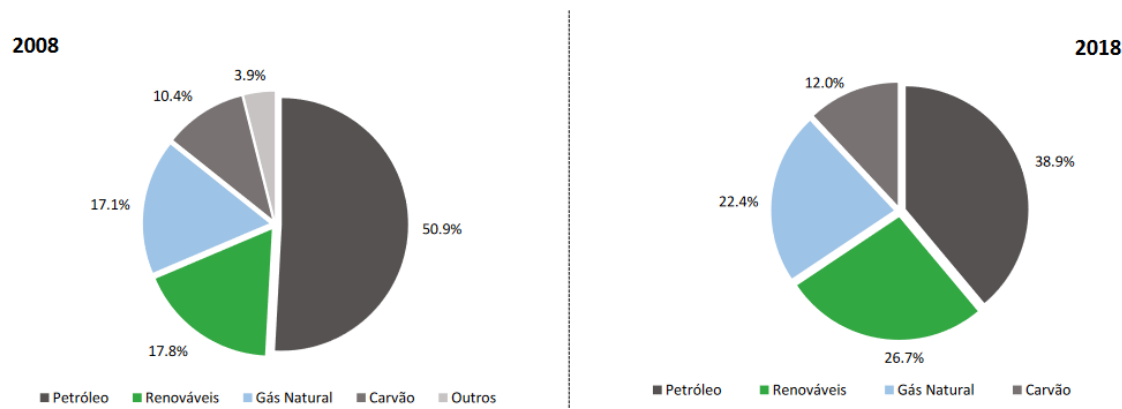


Figura 3-Comparação entre a quota energética entre fontes de energia para os anos 2008 e 2018 (Fonte: DGEG [7])

Devido às preocupações da sociedade moderna relativamente às alterações climáticas que se têm vindo a observar nos últimos anos, provocadas em parte pelas emissões de poluentes associadas ao uso de combustíveis fósseis, existe uma maior procura de novas soluções que não comprometam o futuro das próximas gerações. Os biocombustíveis derivados de biomassa lignocelulósica são muito promissores como alternativa aos combustíveis fósseis [2].

A biomassa lignocelulósica está presente em grandes quantidades e oferece diversas opções para a produção de bioenergia. A produção de biocombustíveis renováveis e sustentáveis, como é o caso do bioetanol ou do biodiesel, a partir de biomassa está a ganhar interesse global. Os biocombustíveis trazem benefícios do ponto de vista ambiental e económico. A utilização de gasolina misturada com bioetanol no setor de transportes reduz significativamente as emissões de gases de efeito estufa, bem como o consumo de combustíveis fósseis. O bioetanol produzido a partir de biomassa renovável, oferece oportunidades para um combustível sustentável, mais limpo, ambientalmente seguro, neutro em carbono e uma alternativa verde para o combustível fóssil [8].

Na tentativa de reduzir o componente fóssil nos combustíveis de transporte, a mistura de bioetanol com gasolina (normalmente entre os 5–15%) já está a ser aplicada em muitos países, como por exemplo, nos Estados Unidos da América (EUA), Brasil, Índia e União Europeia (UE). A bioconversão de açúcares dos resíduos lignocelulósicos tem-se mostrado um método de produção de bioetanol viável e é considerada uma das abordagens mais atrativas do ponto de vista ambiental. No entanto, o conteúdo desejado da matéria-prima lignocelulósica, os açúcares, não é facilmente convertido em etanol por causa da estrutura dos materiais lignocelulósicos o que dificulta o acesso aos mesmos. Nos últimos anos, muitas pesquisas e artigos têm sido desenvolvidos para melhorar a eficiência da produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos. Em particular, a bioconversão da palha de milho tem sido um ponto de destaque, pois esse resíduo está disponível em grandes quantidades e a baixo custo [2].

Porém, a produção de biocombustíveis requer grandes quantidades de terras aráveis que também são necessárias para fins mais tradicionais, como a produção de alimentos,

o que levanta questões ao nível ético e económico sobre a capacidade de usar estas terras para a produção de biomassa destinada exclusivamente para a produção de biocombustíveis. Uma solução para estas questões é a fitorremediação de terrenos poluídos, onde os resíduos das culturas usadas na limpeza do solo são depois usados para a produção de bioetanol [9].

A fitorremediação, que envolve a extração de metais pesados por meio dos processos metabólicos das plantas, mantém e melhora as propriedades agrícolas do solo sem prejudicar as propriedades físicas e químicas. Por causa do custo relativamente baixo, a fitorremediação pode ser empregue para tratar efetivamente grandes áreas de terras agrícolas contaminadas, e é considerada a tecnologia de remediação mais ecologicamente correta e economicamente viável, quando às colheitas é dado um uso posterior que gere riqueza. Muitos estudos indicaram que os solos contaminados podem ser usados para cultivar plantações de bioenergia, como milho, trigo ou árvores, para substituir fontes de energia fóssil [9]–[11].

1.2 Objetivos da Dissertação

Na procura de alternativas para os combustíveis fósseis, que sejam mais amigas do ambiente, e também de opções de valorização para a biomassa gerada na fitorremediação dos solos contaminados, foi proposta a realização desta dissertação.

O principal objetivo desta dissertação é a otimização da produção de bioetanol a partir de biomassa proveniente de fitorremediação de solos contaminados com metais pesados (Zn e Cd). Durante as diferentes etapas da produção do biocombustível, também é pretendido comparar a obtenção de açúcares da biomassa contaminada com metais pesados com uma amostra de biomassa produzida em solo não contaminado.

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

1.3 Conteúdo da Dissertação

Este documento encontra-se dividido em cinco capítulos.

No primeiro capítulo apresenta-se uma breve introdução e contextualização à temática em estudo e são mencionados os objetivos da presente dissertação.

No segundo capítulo realizou-se uma revisão bibliográfica, sobre os processos de fitorremediação e produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica, incluindo a caracterização desta mesma biomassa.

No terceiro capítulo descreve-se o trabalho experimental realizado, referindo quais as metodologias aplicadas.

No quarto capítulo apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos, interpretando-os e comparando-os com outros estudos semelhantes.

No quinto capítulo apresentam-se as conclusões recolhidas deste estudo e os aspetos a ter em conta para os futuros estudos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é feita uma breve descrição dos processos e benefícios da fitorremediação e a caracterização da biomassa lignocelulósica, com especial atenção à biomassa da espécie *Zea mays* (milho). É feita também uma análise quanto à aplicabilidade e características do bioetanol, a regulação em volta deste produto, e ainda são referidas as várias etapas envolvidas na sua produção.

2.1 Fitorremediação

A contaminação dos solos é um enorme problema ambiental por todo o mundo, provocada principalmente pela exploração mineira, indústria e atividades urbanas. Estima-se que aproximadamente 2,5 milhões de locais na UE tem solos contaminados, dos quais 300 mil locais estão confirmados como estando contaminados e necessitam de descontaminação [12].

A limpeza de solos contaminados é geralmente um processo caro e complexo. Vários processos físicos, químicos e biológicos podem ser empregues na remediação de um solo, como por exemplo: vitrificação, remediação eletrocinética, oxidação ou redução química, remoção do solo e tratamento externo ou armazenamento em um local mais apropriado e incineração [11], [13].

Para além destas abordagens de remediação anteriormente referidas, existe uma opção de remediação alternativa, menos invasiva, chamada de fitorremediação. A fitorremediação é vista como uma alternativa mais sustentável, comparativamente aos outros métodos de remediação atualmente praticados, uma vez que se baseia no uso de plantas para extrair, remover e/ou desintoxicar os poluentes retidos no solo, sem comprometer a integridade desses mesmos [9].

No entanto, o processo de fitorremediação é um processo geralmente lento. Em locais muito contaminados pode demorar centenas de anos a diminuir a quantidade de metais e contaminantes para níveis aceitáveis. Outra situação que necessita de atenção em relação à fitorremediação é o que fazer às culturas produzidas após o processo de fitorremediação estar concluído, visto que estas culturas podem não ser seguras para a alimentação [9], [14].

A biomassa produzida durante este processo pode ser utilizada para produzir energia e, assim, desempenhar um papel fundamental na produção e aplicação de energias renováveis e ao mesmo tempo estar a dar rentabilidade ao processo [11]. Alguns estudos indicam que os solos contaminados podem ser usados para cultivar plantações

de bioenergia, como a *Zea mays* (milho) ou *Brassica napus L.* (colza), para substituir fontes de energia fóssil [9], [10], [15].

O uso de culturas energéticas e silvicultura de curta rotação na fitorremediação de solos contaminados é um campo em rápido desenvolvimento. A fitorremediação pode ser aplicada para extrair metais pesados do solo, por esta ser um processo realizado *in situ*, de baixo custo e eficaz por um longo período de tempo [16].

Existem diversas formas de fitorremediação dependendo da espécie utilizada, como a rizofiltração, a rizodegradação, a fitoestabilização, a fitovolatilização, a fitodegradação e a fitoextração [11]. No caso das culturas de milho, estas utilizam a fitoextração, também conhecida como fitoacumulação, para a remoção dos contaminantes no solo. Este processo consiste na remoção dos poluentes do solo pelas raízes da planta, que depois são enviados para as restantes partes da planta, como as folhas e o caule [17]–[19]. Na Figura 4, está representado um esquema deste processo.

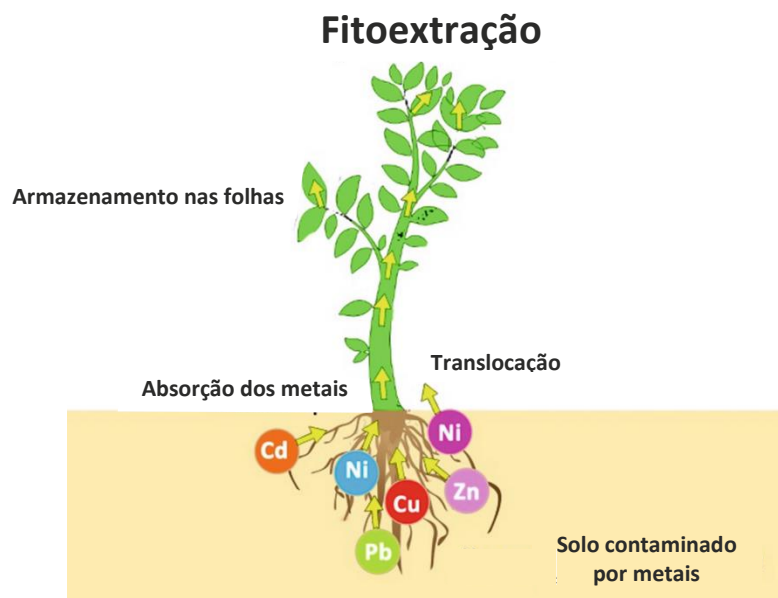


Figura 4-Esquema do processo de fitoextração (adaptado de [17])

A fitorremediação usando a espécie *Zea mays* foi o caso de estudo deste trabalho. Esta planta pode crescer numa grande variedade de ambientes, é altamente tolerante a diversos metais pesados, como o chumbo (Pb), cádmio (Cd) e zinco (Zn), e tem uma produtividade consideravelmente alta, relativamente à biomassa produzida por unidade de área de solo utilizado [9], [10].

2.2 Biomassa Lignocelulósica

A lignocelulose é uma estrutura complexa encontrada nas plantas, e a biomassa lignocelulósica representa a fonte mais abundante de matéria orgânica renovável no planeta. As principais fontes de recursos lignocelulósicos são resíduos florestais, como serrim, madeira, folhas e ramos, resíduos agrícolas e agroindustriais, como palha, cascas, resíduos de culturas agrícolas e resíduos da produção de cerveja, e culturas energéticas. Para além da motivação de utilizar estes materiais para produzir energia ou produtos com valor acrescentado, os resíduos de materiais lignocelulósicos acumulam-se todos os anos em grandes quantidades se não forem recolhidos, possibilitando mais facilmente incêndios [20], [21].

A lignocelulose é composta principalmente pelos polímeros celulose e hemicelulose e um polímero aromático, a lignina. A lignocelulose é uma estrutura complexa onde as fibras de celulose estão rodeadas por hemicelulose e lignina, como demonstrado na Figura 5. A lignina protege os polissacarídeos da hidrólise por enzimas e produtos químicos, dificultando a conversão da lignocelulose em outros produtos, como por exemplo, o etanol [22].

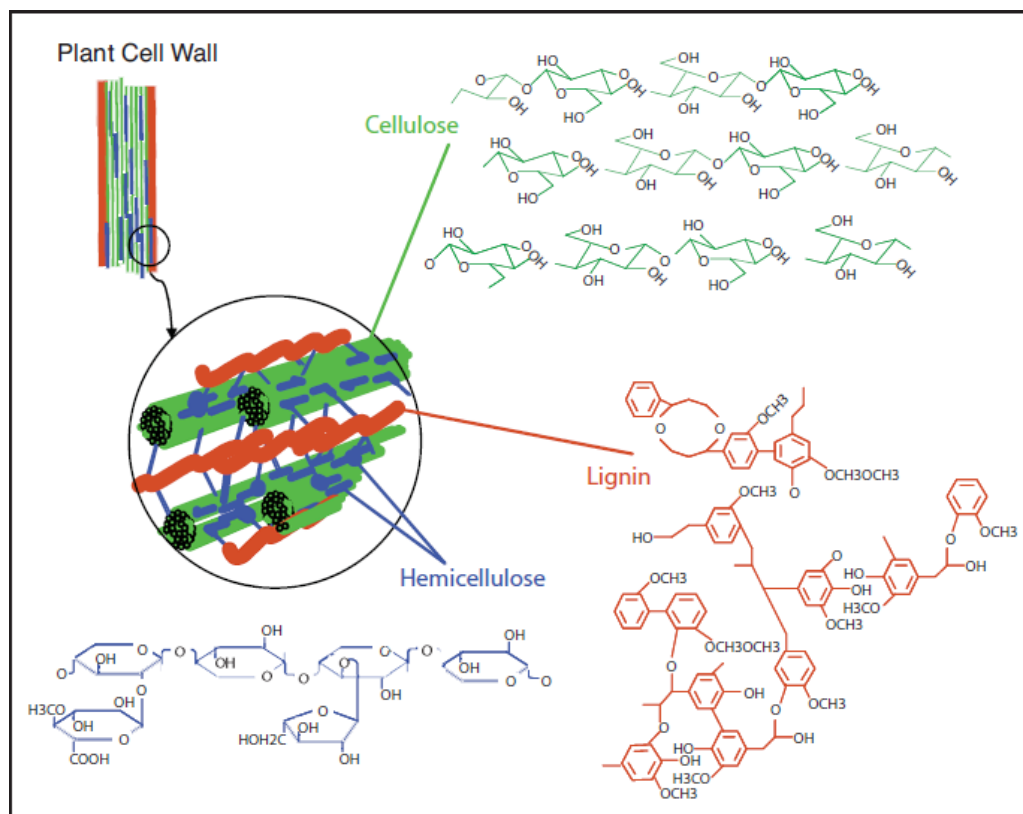


Figura 5-Estrutura da lignocelulose, com as respetivas estruturas químicas dos principais componentes (retirado de [23])

A celulose é composta por unidades de glicose ligadas entre si por meio de ligações β-1,4-glicosídicas, criando longas cadeias que se combinam para formar fibrilas e, eventualmente, fibras. Esta macromolécula está geralmente presente em duas formas: cristalina e amorfa. Uma fibrila típica terá zonas cristalinas separadas por zonas amorfas.

Enquanto a forma cristalina é difícil de decompor através de hidrólise, a fase amorfa tem um certo nível de desordem, que permite mais facilmente a penetração e ação dos agentes hidrolisantes, como as enzimas [23].

A lignina é uma macromolécula composta por fenilpropanóides que se ligam, predominantemente, por ligações éter, embora ligações de carbono-carbono também são significativas. A lignina possui um baixo teor de oxigênio e, portanto, alto valor energético. A hemicelulose é um heteropolímero composta por pentoses como a xilose e a arabinose e também por hexoses como a glucose e a galactose. A celulose e a lignina geralmente ligam-se através de ligações covalentes e a celulose e a hemicelulose encontra-se ligadas por pontes de hidrogênio [23], [24].

2.2.1 Palha de milho

A palha de milho pode ser uma matéria-prima estratégica para a produção de bioenergia e produtos industriais de base biológica, devido à abundância deste recurso, alto teor em hidratos de carbono e por se tratar de um resíduo que normalmente não tem grande valor, mas com muito potencial [25], [26].

No estudo de Templeton et al. [25], foi feita uma análise usando *Near-infrared spectroscopy* (NIRS) (em português, espectroscopia de infravermelho próximo) para avaliar a variação da composição de 508 amostras de palha de milho comercial, de 47 locais em oito estados dos Estados Unidos da América (EUA). Os resultados obtidos nesse estudo indicam que os principais componentes da palha de milho, expressos como média (desvio padrão) % em massa seca, são glucano 31,9 (2,0) %, xilano 18,9 (1,3) %, compostos solúveis 17,9 (4,1) % e lignina 13,3 (1,1) %. O glucano e o xilano são polissacarídeos maioritariamente presentes na celulose e na hemicelulose, respetivamente.

Noutro estudo, Philip Ye et al. [27], caracterizaram amostras de palha de milho do Tennessee Agricultural Experiment Station, usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os valores obtidos nesse estudo, expressos em % (m/m) (desvio padrão) de massa seca, foram glucano 33,18 (1,71) %, xilano 18,94 (1,72) % e lignina 22,10 (2,25) %.

Ambos os estudos apontam para uma grande percentagem de glucano (celulose) e xilano (principal hemicelulose), polissacarídeos cujos monómeros são glicose e xilose, respetivamente, que são açúcares com interesse para a produção de etanol. O teor de glucano e xilano obtido nestes estudos é semelhante. Já o teor de lignina apresenta maior disparidade, possivelmente devido a diferentes condições ambientais no cultivo.

2.3 Bioetanol

O etanol ou álcool etílico (C₂H₆O), é um líquido límpido e incolor, biodegradável, com uma baixa toxicidade, e provoca pouca poluição ambiental. O bioetanol é produzido a partir da fração biodegradável de resíduos que contenham quantidades apreciáveis de

açúcares ou outros materiais que possam ser convertidos em açúcares, como o amido, a inulina ou a celulose [28], [29].

As crescentes preocupações quanto aos problemas ambientais e energéticos resultantes do uso extensivo de combustíveis fósseis levam à procura de soluções renováveis invés das atualmente utilizadas. Biocombustíveis como o bioetanol e o biodiesel são exemplos de tais soluções e proporcionam ainda a vantagem, comparativamente às outras energias renováveis, de serem combustíveis líquidos com uma certa compatibilidade com os motores de combustão atuais [30], [31].

Para um mesmo volume de etanol e de gasolina, o equivalente energético do etanol é 68% inferior ao da gasolina, pois este último tem um poder calorífico maior, como se pode ver na Tabela 1 [32]. No entanto a combustão do etanol é mais limpa, por este ter um elevado teor de oxigênio, cerca de 35% da massa molecular. Isto promove uma menor utilização de oxigênio, comparativamente às alternativas diesel e gasolina, para uma combustão completa, o que leva a menos poluentes [32], [33].

Tabela 1- Características da gasolina e do etanol (fonte: EUBIA [28])

<i>Características</i>	<i>Unidade</i>	<i>Gasolina</i>	<i>Etanol</i>
<i>Massa molecular</i>	kg/kmol	111	46
<i>Densidade a 15 °C</i>	kg/L	0,75	0,80 - 0,82
<i>Índice de octanas, RON (Research Octane Number)</i>	-	97	109
<i>Índice de octanas, MON (Motor Octane Number)</i>	-	86	92
<i>Poder calorífico inferior a 15 °C</i>	MJ/L	31	21,2

O índice de octanas do etanol é maior do que o da gasolina, como consta na Tabela 1. Isto demonstra que o etanol tem melhores características antidetonantes do que a gasolina. Esta qualidade do biocombustível pode ser explorada para melhorar a taxa de compressão do motor de modo a aumentar a eficiência do combustível no motor. O etanol é um combustível de alta octanagem e tem vindo a substituir o chumbo como um intensificador de octanas na gasolina [34].

Todas estas características do bioetanol têm vindo a promover a utilização deste biocombustível como aditivo na gasolina, sendo a mistura mais comum de 10% de etanol e 90% de gasolina, abreviada como E10 [28].

2.3.1 Mercado de bioetanol – produção e consumo

2.3.1.1 Produção a nível mundial

De maneira geral, a produção global de etanol tem vindo a aumentar, embora a produção mundial tenha caído em 2020, muito provavelmente devido à pandemia COVID-19. No gráfico da Figura 6 está representada a produção global de etanol por país ou região, de 2007 a 2020 [35].

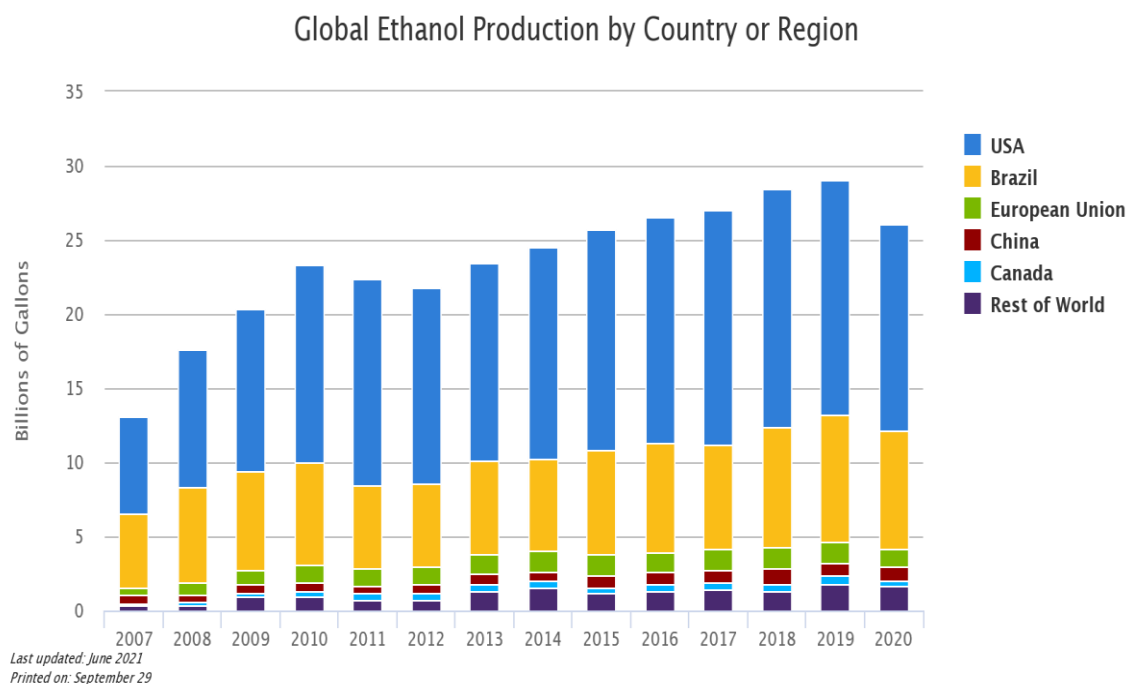


Figura 6-Evolução da produção mundial de etanol entre os anos de 2007 e 2020 (fonte: AFDC [35])

Os dados da Tabela 2 indicam que no mundo foram produzidos quase 100 mil milhões de litros de bioetanol em 2020, um decréscimo comparativamente aos anos anteriores. Os EUA são o maior produtor mundial de bioetanol, tendo produzido quase 53 mil milhões de litros em 2020, equivalente a 53% da produção mundial para esse ano. O segundo maior produtor é o Brasil, com 30 % da produção mundial e 30 mil milhões de litros produzidos no ano 2020. A grande maioria do etanol americano é produzida a partir do milho, enquanto no Brasil é principalmente através cana-de-açúcar [35], [36].

De acordo com os dados da Tabela 2, a produção na UE representa cerca de 5% da produção mundial, tendo sempre os valores de produção estado acima dos 5 mil milhões de litros anuais, exceto neste último ano (2020). Na Europa, as principais culturas usadas na produção de bioetanol são as culturas de amido (como o trigo comum) e a beterraba sacarina. As plantações de beterraba sacarina são cultivadas na maioria dos países da UE-25 e produzem substancialmente mais etanol por hectare do que o trigo [28], [36].

Tabela 2-Produção anual de etanol no mundo entre os anos 2015 e 2020, em milhões de litros (adaptado de: RFA [36])

Região	2015	2016	2017	2018	2019	2020	% da produção mundial (2020)
EUA	56 051	58 345	60 324	60 911	59 726	52 716	53%
Brasil	27 255	25 552	25 173	30 245	32 517	30 018	30%
UE	5 148	5 148	5 375	5 489	5 186	4 732	5%
China	2 915	2 536	3 028	2 915	3 785	3 331	3%
Índia	719	1 060	757	1 628	1 931	1 949	2%
Canadá	1 703	1 741	1 741	1 741	1 968	1 620	2%
Tailândia	1 173	1 287	1 476	1 476	1 628	1 514	2%
Argentina	833	908	1 098	1 098	1 060	871	1%
Resto do mundo	1 488	1 843	1 719	2 002	1 976	1 893	2%
Total	97 285	98 421	100 692	107 506	109 777	98 644	

2.3.1.2 Diretivas europeias e nacionais

Em 2016, a comissão europeia propôs uma sucessora para a Diretiva de Energia Renovável (RED) para o período de 2021-2030: a RED II. Após quase dois anos de debates, a RED II foi publicada no diário oficial da UE como Diretiva (UE) 2018/2001. A RED II estabelece uma nova meta geral para a energia renovável de 32% até 2030, e uma meta de 14% para o setor de transporte, onde os biocombustíveis avançados contam o dobro para o cumprimento desta meta.

Os critérios de sustentabilidade obrigatórios da UE para biocombustíveis e biolíquidos não permitem que a matéria-prima para a produção de biocombustíveis seja obtida de terras com alto *stock* de carbono ou alta biodiversidade.

Para biocombustíveis avançados à base de materiais não alimentícios, a UE estabeleceu uma meta crescente de 0,2% em 2022, com expectativas de atingir 3,5% em 2030. A UE estabeleceu um limite de 1,7 por cento até 2030 para biocombustíveis avançados

produzidos com gorduras e óleos residuais. Na Figura 7 está ilustrado um mapa da UE com as diferentes metas propostas relativas ao uso de biocombustíveis para cada estado-membro para o ano de 2021 [37].

Em Portugal, o Decreto-Lei n.º 8/2021, de 20 de janeiro, alterou o regime que estabelece os critérios de sustentabilidade para a produção e utilização de biocombustíveis e biolíquidos e mudou a meta de incorporação de biocombustíveis nos combustíveis rodoviários para o ano de 2021 para 11%. A contribuição dos biocombustíveis avançados para o cumprimento da meta de incorporação deve ser, pelo menos, de 0,5% em 2021.

A alínea c) do n.º 1 do artigo 2.º do Decreto-Lei n.º 117/2010, de 25 de outubro, na redação dada pelo Decreto-Lei n.º 8/2021, de 20 de janeiro, define biocombustíveis avançados do seguinte modo:

«Biocombustíveis avançados», os biocombustíveis produzidos a partir das matérias-primas enumeradas na parte A do anexo IV ao presente decreto-lei, do qual faz parte integrante, em geral, com recurso a processos e tecnologias de conversão mais avançados, tais como a conversão termoquímica ou bioquímica de materiais lenho-celulósicos e materiais celulósicos não alimentares, nomeadamente, por fermentação, gaseificação, pirólise, hidroprocessamento, entre outros, e que possuem um maior nível de sustentabilidade e de redução das emissões de gases com efeito de estufa, tendo associado um baixo (ou nulo) risco de alteração indireta do uso do solo e sem competir com as culturas alimentares pela utilização de terrenos agrícolas.»

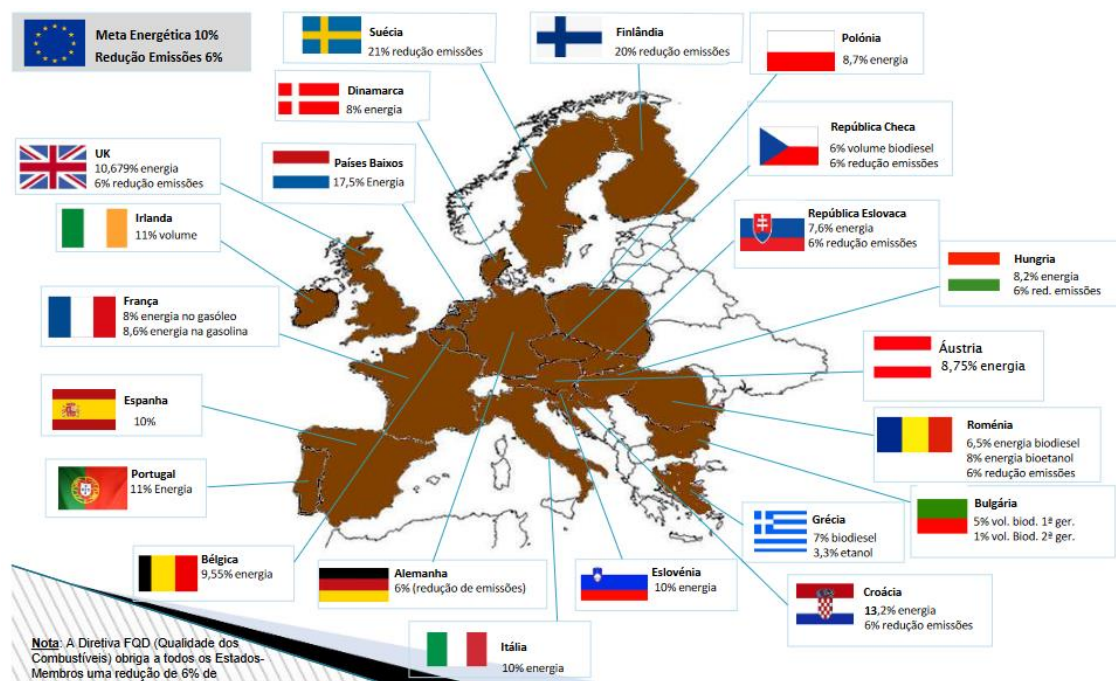


Figura 7-Metas energéticas propostas para os estados-membros da EU para o ano de 2021 (Fonte: APPB [37])

2.3.2 Processo de produção de bioetanol

O processo de produção de bioetanol resulta da fermentação dos açúcares extraídos da biomassa, esta fermentação sendo dirigida pela atividade metabólica de microrganismos que fermentam os açúcares, convertendo-os em álcool etílico. A produção de bioetanol, em geral, consiste em vários procedimentos sequenciais, nomeadamente o pré-tratamento da biomassa, seguido da hidrólise para a formação açúcares, a fermentação desses açúcares e por fim a destilação para obtenção do etanol. Para cada uma destas etapas existem diversas possibilidades viáveis e cada uma destas possibilidades trará resultados diferentes para a qualidade do etanol e para o custo global de produção [33], [38].

As opções de processamento são amplamente diferenciadas pelo método escolhido para hidrolisar a celulose e hemicelulose nos seus açúcares componentes (ou seja, glicose, xilose, arabinose, galactose e manose). Em particular, a hidrólise pode preceder a fermentação ou ser realizada simultaneamente com a fermentação [39].

2.3.2.1 Pré-tratamento

O pré-tratamento é o primeiro passo na produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica, sendo este crucial para uma hidrólise mais eficaz. O objetivo principal é separar em frações independentes as fibras de celulose, hemicelulose e lignina, tornando-as assim mais acessíveis para a conversão da celulose e da hemicelulose em açúcares [34]. Este processo ajuda também a reduzir o grau de cristalinidade da celulose e assim a aumentar a fração de celulose amorfa, permitindo às enzimas um melhor acesso [40], [41].

Este processo é altamente recomendado, pois aumenta o rendimento subsequente dos açúcares fermentáveis, previne a degradação prematura dos açúcares produzidos, evita a formação de inibidores antes da hidrólise e fermentação, reduz o custo de processamento e diminui a necessidade energética para as etapas seguintes [40].

Na Figura 8 estão ilustrados os efeitos que o pré-tratamento tem na biomassa lignocelulósica, nomeadamente na quebra das ligações entre a hemicelulose, lignina e celulose.

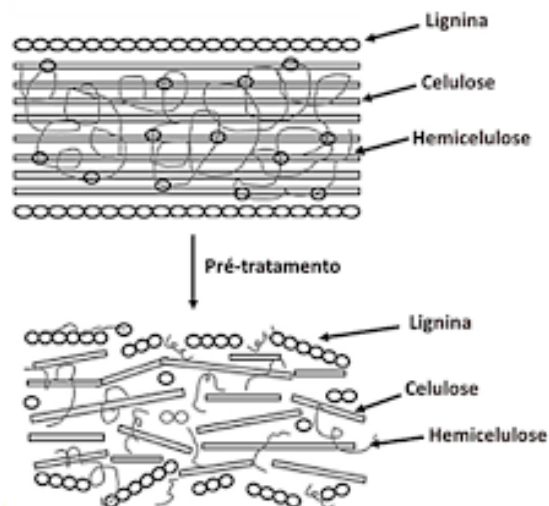


Figura 8-Efeitos do pré-tratamento na estrutura da biomassa lignocelulósica (Fonte: [20])

Nas últimas décadas, têm sido desenvolvidos muitos métodos de pré-tratamento, que podem ser divididos em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos.

O pré-tratamento físico efetivamente reduz o tamanho e destrói a estrutura cristalina da biomassa lignocelulósica enquanto aumenta a área de superfície específica através de métodos físicos como a moagem.

O pré-tratamento químico destrói a rede de lignina através da aplicação de líquidos iônicos/solventes verdes, tratamento ácido (forte ou diluído), tratamento alcalino e tratamento Organosolv.

O pré-tratamento físico-químico combina os efeitos dos métodos físicos e químicos para quebrar a composição e estrutura da biomassa lignocelulósica, libertando assim a celulose do interior da biomassa; E por fim o pré-tratamento biológico remove a lignina da biomassa lignocelulósica usando microrganismos [36], [40].

Na Tabela 3 apresenta-se uma breve comparação entre as vantagens e as desvantagens apresentadas pelos diversos métodos de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica.

Tabela 3-Resumo das vantagens/desvantagens dos métodos de pré-tratamento (adaptado de:[33])

Método de Pré-tratamento	Efeitos principais	Vantagens	Desvantagens
Ammonia Fiber Explosion (AFEX)	Aumenta a área de superfície acessível Remove uma parte da lignina e hemiceluloses	Baixa formação de inibidores	Não é eficiente para biomassa com alto teor de lignina Custos elevados para grandes quantidades de amoníaco
Percolação com amónia	Remove lignina	Deslignificação altamente seletiva	Alto consumo de energia
Alcalina	Remove lignina e hemicelulose Aumenta a área de superfície acessível	Alta digestibilidade Alta remoção de lignina	Longos tempos de residência Formação de sais irre recuperáveis
Biológico	Degrada a lignina e a hemicelulose	Baixo consumo de energia	Baixa taxa de hidrólise
Ácido concentrado	Hidrolisa tanto as hemiceluloses como a celulose	Alto rendimento em glicose Redução nos custos operacionais devido à temperatura moderada de operação Baixa formação de produtos de degradação Nenhuma enzima é necessária	A recuperação do ácido é obrigatória Corrosão de equipamentos Gera compostos inibidores
Ácido diluído	Hidrolisa a hemicelulose Torna a celulose mais suscetível a um tratamento enzimático posterior Altera a estrutura da lignina	Menos problemas de corrosão do que o ácido concentrado Baixa formação de inibidores	Geração de produtos de degradação devido à alta temperatura
Líquidos iónicos	Reduz a cristalinidade da celulose Remove lignina	Alta digestibilidade São solventes verdes	Aplicação em grande escala ainda sob investigação
Mecânico	Reduz a cristalinidade da celulose	Sem formação de inibidores	Alto consumo de energia
Organosolv	Hidrolisa a lignina e a hemicelulose	Alta digestibilidade Recuperação de lignina pura	Custo elevado Os solventes precisam ser drenados e reciclados
Ozono	Reduz o conteúdo de lignina	Sem formação de inibidores Condições operacionais moderadas	Alto custo devido à grande quantidade de ozono necessária

Método de Pré-tratamento	Efeitos principais	Vantagens	Desvantagens
Explosão com vapor	Causa transformação de lignina Causa solubilização de hemiceluloses	Maior rendimento de glicose e hemiceluloses	Degradação parcial da hemicelulose Geração de compostos inibidores
Fluído supercrítico	Aumenta a área de superfície acessível	Sem formação de inibidores	Não afeta a lignina e a hemicelulose Necessita de pressão muito elevada
Oxidação húmida	Remove lignina	Baixa formação de inibidores	Alto custo devido ao oxigénio e catalisadores alcalinos necessários

2.3.2.2 Condições experimentais aplicadas no pré-tratamento descritas na literatura

Na Tabela 4 estão compilados diversos estudos feitos alusivos à temática do pré-tratamento da biomassa com ácido diluído para a produção de bioetanol. Na Tabela 4 encontram-se as condições aplicadas nesses estudos durante o pré-tratamento, incluindo o tipo de biomassa utilizada, a temperatura, o tempo de reação, o ácido utilizado e a sua concentração e a razão sólido/líquido.

O ácido mais comumente utilizado no pré-tratamento é o ácido sulfúrico diluído, aplicado normalmente a altas temperaturas (120-160 °C) durante períodos de tempo na ordem dos 20 a 60 minutos. Para condições de temperatura mais baixas, é necessário aumentar significativamente o tempo de reação.

Tabela 4-Condições experimentais aplicadas no pré-tratamento de diferentes biomassas para a produção de bioetanol

Referência	Biomassa utilizada	Condições aplicadas					Eficiência
		T (°C)	Tempo de reação (minutos)	Ácido utilizado	Concentração do ácido	Proporção sólido: líquido	
[42]	Palha de milho	121	60	H ₂ SO ₄	2% (w/v)	10% (w/v) carga de sólidos	24 g/L de etanol (após fermentação com leveduras)
[43]	Palha de milho	160	20	H ₂ SO ₄	0,5% (w/v)	-	58 g/L de etanol (após sacarificação e fermentação simultâneas)
[44]	Palha de milho	160	20	H ₂ SO ₄	0,5% (w/v)	1:9	Maiores rendimentos de glicose comparado a pré-tratamentos com líquidos iônicos e <i>ammonia fiber expansion</i>
[45]	Palha de milho	135	160	H ₂ SO ₄	1,75% (w/v)	1:10	Conversão glicose de 72.86% a 76.69%
[14]	Palha de milho	40	60	H ₃ PO ₄	85% (w/v)	1:12,5	41.41 mg/g após hidrólise enzimática
[46]	Cana-de-açúcar	60	60	H ₂ SO ₄	1% (w/w)	1:10	309,75 mg/g de açúcares depois da hidrólise enzimática
[47]	Bambu	85	120	CH ₃ COOH/H ₂ O ₂ 1:1	30% v/v	10% (w/v) carga de sólidos	Rendimento de etanol de 83,1%
[48]	Dreche cervejeira (Brewers' Spent Grain)	90	240	H ₂ SO ₄	1 % (v/v)	1:8	Aumentou a quantidade de açúcares comparativamente a uma hidrólise sem pré-tratamento prévio
[49]	Palha de milho	100	40	H ₂ SO ₄	10 % (v/v)	10% (w/v) carga de sólidos	Removeu 15 % da lignina
[50]	Caule de mandioca	177	10	HCl	0,14 M	10% (w/v) carga de sólido	7,55 g / L de etanol e um rendimento de fermentação (com leveduras) teórico de 89,6%
[51]	Caule de mandioca	121	27	C ₂ H ₂ O ₄ Ácido oxálico	2,97 % (w/v)	1:10	1.889 g/L de glicose após pré-tratamento
[30]	Palha de milho	151,9	2,5	HNO ₃	0,68 %	1:10	Rendimento de 77,8% xilose e de 57,1% glicose após hidrólise

2.3.2.3 Hidrólise

A próxima etapa é a hidrólise, na qual os hidratos de carbono poliméricos são convertidos em monómeros de açúcar. O processo de hidrólise é necessário, uma vez que os microrganismos (que são empregues no processo seguinte de fermentação) só são capazes de digerir a forma de açúcar mais simples derivada dos hidratos de carbono complexos da biomassa. Geralmente, um de dois métodos é empregue para o processo de hidrólise. Um método é a aplicação de ácido como catalisador e outro utiliza enzimas [8], [33], [38].

Na hidrólise catalisada por ácido, este podendo ser diluído ou concentrado; ocorre principalmente a altas temperaturas (entre 100 e 240 °C) e com alta probabilidade de formação de inibidores devido a esta elevada temperatura e às condições ácidas. O benefício de utilizar ácidos como catalisadores é que eles conseguem perfurar a lignina sem qualquer pré-tratamento prévio da biomassa, convertendo a celulose e a hemicelulose em açúcares fermentáveis [8], [38].

A hidrólise enzimática pode operar em condições mais moderadas que a ácida, a temperaturas de 40 a 60 °C e com pH a rondar os valores 4,8–6,0. Esta apresenta uma alta recuperação de açúcar sem formação de inibidor. Existem vários fatores como temperatura, pH, carga enzimática e tempo que afetam a produtividade das enzimas. A hidrólise enzimática é considerada mais vantajosa pois exige menos energia operacional por ser processada em condições mais amenas. Os dois métodos também podem ser aplicados em sequência, desde que o pH seja ajustado para as condições preferidas das enzimas depois da hidrólise ácida [39], [52].

A celulose, o componente da biomassa lignocelulósica mais importante para a produção do bioetanol, é formada por cadeias de glicose que são conectadas por ligações β -1,4. Na natureza, a celulose possui um certo grau de cristalinidade devido às ligações de hidrogénio ao longo das cadeias. A zona amorfa na celulose é mais fácil de ser degradada do que a área cristalina rígida. Portanto, é necessário um método de pré-tratamento, a fim de reduzir a cristalinidade da biomassa. As celulasas são o grupo de enzimas usadas para degradar a celulose [33], [38], [52].

Existem três classes de celulasas que atuam sinergicamente na hidrólise da celulose: endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases. As endoglucanases atacam as regiões amorfas da celulose clivando as ligações β -1,4-glucosídicas internas e fornecendo extremidades na cadeia para as exoglucanases poderem atuar (Figura 9). As exoglucanases atuam nas extremidades reductoras e não reductoras das cadeias de celulose, libertando celobiose solúvel (Figura 10). Finalmente, as β -glucosidases hidrolisam a celobiose solúvel em glicose (Figura 11) [52].

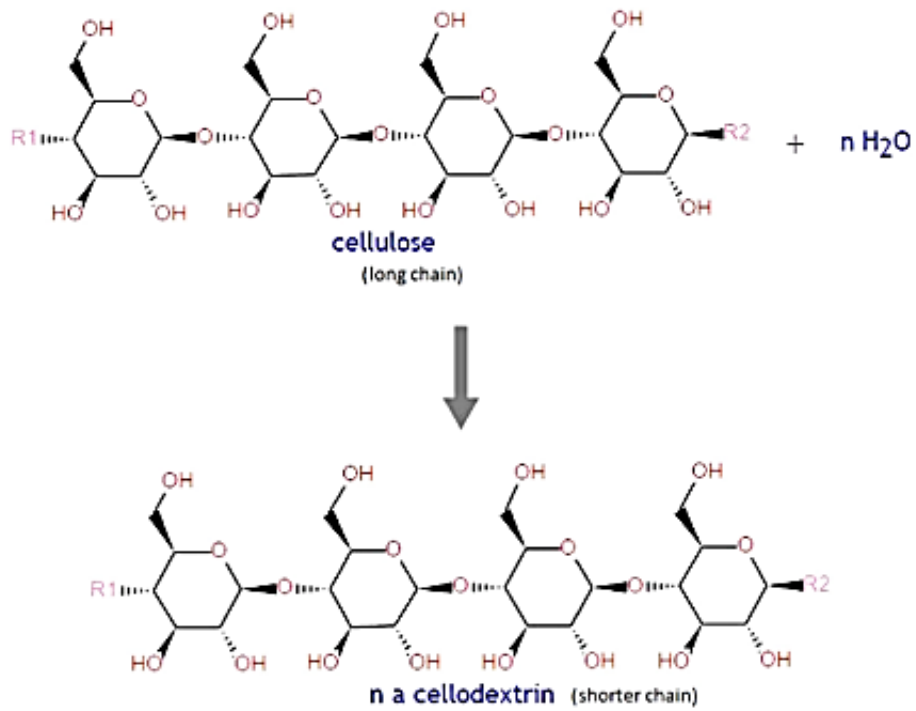


Figura 9-Hidrólise da celulose por uma endoglucanase, resultando numa cadeia mais curta de celulose (celodextrina)

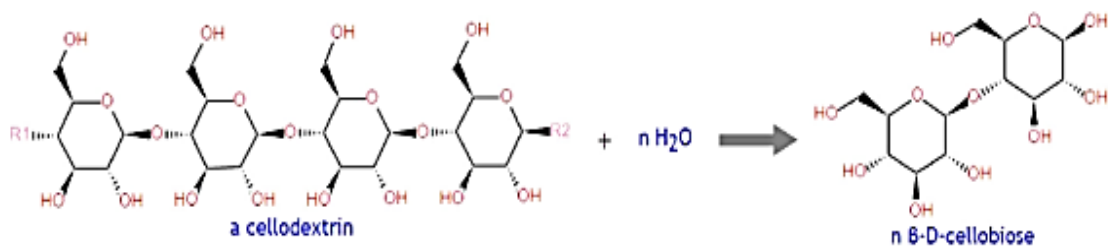


Figura 10-Reação da celodextrina hidrolisada por exoglucanase, produzindo celobiose

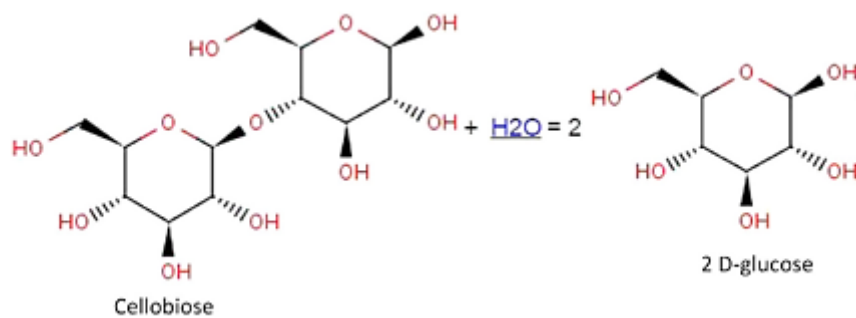


Figura 11-Reação da celobiose com uma molécula de água resultando em 2 unidades de glicose, sendo a reação catalisada pela β -glucosidase

Ao contrário da celulose, a hemicelulose é normalmente mais fácil de hidrolisar devido à sua estrutura mais amorfa. O xilano, sendo um dos principais componentes da hemicelulose, é um polissacarídeo onde a xilose é a unidade singular. Para degradar a cadeia principal do xilano, são utilizadas endo- β -1,4-xilanase e β -xilosidase [33].

2.3.2.4 Condições experimentais aplicadas na hidrólise descritas na literatura

Na

Tabela 5 estão compilados diversos estudos relacionados com a hidrólise enzimática. Nesta

Tabela 5 encontram-se as condições aplicadas nesses estudos na realização de uma hidrólise enzimática para produção de açúcares, incluindo o tipo de biomassa utilizada, a temperatura, o tempo de reação, a agitação, o pH da mistura, a enzima utilizada e a sua quantidade/concentração e a proporção sólido/líquido.

Tabela 5-Condições experimentais aplicadas na hidrólise enzimática de diferentes biomassas para a produção de bioetanol

Referência	Condições aplicadas								Eficiência
	Biomassa utilizada	T (°C)	Tempo de reação (horas)	Agitação (rpm)	pH	Enzima utilizada	Quantidade/concentração de enzima	Proporção sólido/líquido	
[53]	Pétalas de rosa	30	120	120	5,5 (adição de ácido sulfúrico)	Accellerase 1500	1,75 g/L	1:5	40,8 g/L de glicose
[54]	Palha de milho	50	24	150	4,8 (solução tampão de acetato de sódio)	Hemicelulase e celulase	15 FPU/g matéria seca	1:50	Glicose - 45 g/L Xilose - 40 g/L (em 24 h de hidrólise e com pré-tratamento prévio)
[55]	Palha de milho	50	72	150	4,8 (solução tampão de acetato de sódio)	Celulase	20 FPU/g glucano	1:20	Etanol após fermentação - 10 g/L (hidrólise de 72 horas e pré-tratamento de Ureia/KOH e adição de Tween-80)
[56]	Palha de milho	50	72	140	4,8 (solução tampão de acetato de sódio ou acetato de magnésio)	Accellerase 1500	6 mL	1:16,6	Etanol após fermentação - 7,2 g/L (72 h de hidrólise e pré-tratamento de óxido de magnésio e hidrólise)
[57]	Bagaço de cana-de-açúcar	50	120	150	4,8 (solução tampão de acetato de sódio)	Celulase, hemicelulase e celobiase	Celulase - 10 FPU/g matéria seca Hemicelulase - 150 U/g matéria seca Celobiase - 60 mg/g matéria seca	2%, 5%, 10%, 15% e 20%	-
[58]	Palha de milho	50	96	150	4,8 (solução tampão de acetato de sódio)	Celulase (Cellic® CTec3)	15 FPU/g celulose	5%	41,2 g/L de glicose (após 96 h de hidrólise e um pré-tratamento com Ácido p-toluenossulfônico)
[59]	Bagaço de	50	72	-	4,8	Celulase	120 FPU/g substrato	20%	155 g/L de açúcares

maçã

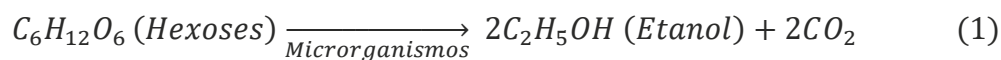
(tampão)

(CellicCTec2)

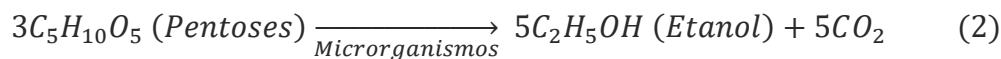
2.3.2.5 Fermentação

A fermentação é o processo biológico no qual microrganismos, particularmente leveduras e bactérias, convertem açúcares monoméricos em etanol ou ácidos. O hidrolisado dos processos anteriores é misturado com um agente de fermentação específico de acordo com a adequação para digerir os respectivos compostos de açúcar formados [33], [38].

A conversão de açúcares tipo hexoses simples, como a glicose e a manose, por fermentação alcoólica ocorre anaerobiamente segundo a seguinte equação (1) [60]:



Uma equação semelhante ocorre para a conversão anaeróbia de pentoses, como a xilose, em etanol, como se pode observar na equação (2) [60]:



Se todo o açúcar for convertido em etanol, de acordo com as equações (1) e (2), o rendimento teórico máximo de etanol será de 0,51 g por 1 g de açúcares consumidos, significando que por cada 1,0 g de hexose ou pentose podem ser produzidos 0,51 g de etanol. No entanto, o rendimento do etanol obtido na fermentação geralmente não excede os 90-95% do rendimento teórico, uma vez que parte dos açúcares é convertida em biomassa para os microrganismos e outros subprodutos, como glicerol e ácido acético [60].

A bactéria de fermentação mais conhecida, *Zymomonas mobilis*, converte glicose, sacarose e frutose em etanol. De forma semelhante, a *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais utilizada, sendo esta capaz de consumir açúcares hexose naturalmente. Embora estes sejam os microrganismos mais comumente empregados, tanto *Z. mobilis* como *S. cerevisiae* são incapazes de fermentar os açúcares pentose. *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* e *Pachysolen tannophilus* são reconhecidas pela sua capacidade de converter açúcares pentose em etanol, podendo ser aplicados em conjunto com os outros microrganismos já referidos. No entanto, estes microrganismos (leveduras) resultam numa baixa eficiência, necessitam de um manuseio cuidadoso e são vulneráveis a ambientes ácidos e com etanol em altas concentrações [33], [61], [62].

Estas limitações das bactérias e leveduras são alvo de pesquisa de muitos investigadores, que tentam modificar o comportamento e a função genética dos mesmos. Por meio da bioengenharia genética dos microrganismos assegura-se uma melhor qualidade do produto final, pois é possível modificar uma estirpe de um dos

microrganismos para esta fermentar mais que um tipo de açúcar e até mesmo ser mais eficiente na fermentação [33]. Estudos nesta área apontam resultados positivos e promissores, como é o caso dos estudos de Kuyper *et al.* [63], que utilizaram estirpes de *S. cerevisiae* modificadas capazes de fermentar hexoses e pentoses, Davis *et al.* [64], que usaram uma estirpe de *Z. mobilis* capaz de fermentar hexoses e pentoses, e Nichols *et al.* [65], que comparam uma estirpe normal de *S. cerevisiae* com uma modificada e obtiveram melhor produção de etanol na estirpe modificada.

Existem alternativas na produção de etanol que incluem hidrólise e fermentação separadas (SHF) e sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). O método SHF separa os processos de hidrólise e fermentação com o objetivo de aproveitar ao máximo cada um dos processos. A principal desvantagem desse processo é a inibição provocada pela alta concentração de açúcares durante a hidrólise, o que reduz a taxa de hidrólise e proporciona uma produção de etanol menor e mais lenta [66].

Ao contrário do SHF, o método SSF permite que as enzimas realizem a hidrólise para libertar os açúcares e estes serem fermentados imediatamente em etanol sem qualquer processo de separação entre eles. Este processo apresenta a vantagem de que as inibições da hidrólise são resolvidas pelo processo de fermentação, uma vez que os açúcares formados serão convertidos logo em etanol, portanto não existirá grande concentração de açúcares para inibir a hidrólise. Outros benefícios do método SSF são a menor quantidade de enzimas necessárias e o período de produção é mais rápido, uma vez que os processos de hidrólise e fermentação dos açúcares são iniciados simultaneamente. No entanto neste processo é por vezes complicado encontrar as condições experimentais adequadas tanto para as enzimas como para os microrganismos [33], [67].

2.3.2.6 Destilação

A solução de etanol resultante do processo de fermentação precisa de ser posteriormente processada para remover o conteúdo de água, para se obter um etanol de alta pureza, também chamado de etanol anidro. Isto porque o álcool só pode ser misturado com a gasolina se o teor de água for inferior a 1% (v/v). O etanol anidro contém um mínimo de 99,5% (v/v) de etanol, com o teor de água não podendo ser superior a 0,5% (v/v) [33], [68].

Antes de se proceder à remoção da água da mistura é necessário separar os resíduos sólidos dos processos anteriores da fase líquida. Isto pode ser alcançado com uma decantação e/ou centrifugação da mistura. Em geral, a remoção do teor de água é feita pelo princípio da destilação, que é a diferença dos pontos de ebulição das misturas numa solução. Quando a mistura é aquecida ao ponto de ebulição do etanol (78,2 ° C), o etanol da mistura será vaporizado e separado do outro componente (água). No entanto a destilação só permite obter um etanol com cerca de 92-95% (v/v) sendo necessário outros processos para se obter uma mistura mais pura. Alguns exemplos destes

processos são a separação por membranas, desidratação química, destilação azeotrópica, destilação extrativa, adsorção e destilação por difusão [33], [68].

2.4 Contributo da dissertação

Neste trabalho pretende-se valorizar a biomassa resultante da fitorremediação de um solo contaminado com metais pesados através da produção de bioetanol, avaliando as etapas decorrentes desta produção, em particular o pré-tratamento da biomassa e a hidrólise enzimática.

Para a etapa do pré-tratamento, foi estudada e otimizada a aplicação de um ácido diluído para o tratamento da biomassa lignocelulósica previamente triturada. O ácido utilizado neste trabalho foi o ácido clorídrico, um dos quatro ácidos mais estudados na literatura juntamente com o ácido nítrico, fosfórico e sulfúrico, sendo este último o mais utilizado [8], [33]. Em comparação com o ácido sulfúrico diluído, alguns estudos indicam que é necessário uma temperatura menos elevada quando se utiliza ácido clorídrico diluído, o que leva a custos de energia menores e também menor erosão dos equipamentos [69], [70]. Foi utilizada uma gama de temperatura mais baixa do que a habitualmente apresentada na literatura, na tentativa de diminuir a formação de subprodutos que podem inibir a hidrólise, como furfural e 5-(hidroximetil)furfural [71].

Para a hidrólise da biomassa já tratada foram usadas enzimas *Accelerase*, enzimas desenvolvidas especificamente para reduzir a biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis. Quando comparado com a hidrólise ácida, a hidrólise enzimática opera em condições mais moderadas de temperatura e pH, o que permite baixar os custos, e gerar menor formação de inibidores para a fermentação [39], [52].

Duas dissertações de mestrado anteriormente realizadas, por Santos [72] e Reis [73], também estudaram a produção de bioetanol a partir da palha de milho contaminada por metais pesados, provenientes dos mesmo solos. Nesses dois estudos foi produzido bioetanol com resultados positivos, tendo no segundo estudo também sido feita uma otimização da etapa de hidrólise enzimática. No estudo de Santos [72], o pré-tratamento foi realizado usando ácido clorídrico ou ácido nítrico diluídos e na hidrólise enzimática foi usada um cocktail enzimático *Accellerase* ou *Ultraflo*. No estudo de Reis [73], foram usados no pré-tratamento dois ácidos diluídos, ácido clorídrico e nítrico, e para a hidrólise enzimática o cocktail de enzimas *Ultraflo* da Novozymes.

No presente estudo procurou-se as melhores condições experimentais para se realizar o pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática, de forma a maximizar a produção de açúcares, de modo a maximizar uma futura produção de bioetanol. Os resultados obtidos neste estudo são comparados com os resultados de estudos anteriormente realizados.

DESCRIÇÃO TÉCNICA

- 3.1 Caraterização da Biomassa
- 3.2 Pré-tratamento
- 3.3 Hidrólise Enzimática
- 3.4 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)
- 3.5 Quantificação de açúcares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

3 DESCRIÇÃO TÉCNICA

Neste capítulo são apresentados as metodologias e os procedimentos utilizados na caracterização da biomassa e nas etapas realizadas da produção de bioetanol, mais concretamente o pré-tratamento e a hidrólise.

3.1 Caracterização da Biomassa

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

3.1.1 Teor de humidade

Este procedimento é baseado na norma ISO 18134-3:2015. Uma amostra da biomassa foi seca a uma temperatura de 105 °C numa estufa (Binder ED-53). até que uma massa constante foi alcançada. O teor de humidade (M_{ad}) em percentagem foi calculado a partir da diferença de massa provocada por esta secagem, conforme a equação (3):

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

m_1 - massa do cadinho vazio, em g;

m_2 - massa do cadinho com a amostra antes de secar, em g;

m_3 - massa do cadinho com a amostra depois de secar, em g.

3.1.2 Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado usando o método descrito na norma EN 14775:2009. Uma amostra de biomassa previamente pesada foi submetida a uma temperatura controlada de 550 °C numa mufla (Nabertherm B150) até a massa permanecer constante. A equação (4) foi usada para calcular o teor de cinzas (A_d) em percentagem:

$$A_d(\%) = \frac{(m_6 - m_4)}{(m_5 - m_4)} \times 100 \times \frac{100}{100 - M_{ad}} \quad (4)$$

m_4 - massa do cadinho vazio, em g;

m_5 - massa do cadinho com a amostra antes de ir à mufla, em g;

m_6 - massa do cadinho com a amostra depois de ir à mufla, em g.

3.1.3 Teor de celulose

O teor de celulose foi determinado segundo a norma NP ISO 6865:2009. O procedimento consistiu em tratar uma amostra da biomassa, previamente seca numa estufa a 105 °C e pesada, com ácido clorídrico, filtrando-se a vácuo posteriormente. Seguidamente foi aplicado ácido sulfúrico à amostra já filtrada e levou-se a solução à ebulição durante 30 minutos. Voltou-se novamente a filtrar a vácuo a amostra e, de seguida, sujeitou-se a mais uma solução, desta vez de hidróxido de potássio, levando à ebulição durante 30 minutos. Finalmente lavou-se o resíduo com acetona e voltou-se a filtrar a vácuo. O resíduo obtido foi seco numa estufa (Binder ED-53) a 105 °C e incinerado numa mufla (Nabertherm B150) a 500 °C, registando a massa do resíduo após cada uma destas temperaturas. O teor de celulose (C) foi calculado a partir da equação (5):

$$C (\%) = \frac{m_e - m_m}{m_s} \times 100 \quad (5)$$

m_e - massa do cadinho com a amostra após 105 °C, em g;

m_m - massa do cadinho com a amostra após 500 °C, em g;

m_s - massa seca da amostra inicial, em g.

3.1.4 Teor de lignina

Para determinar o teor de lignina insolúvel, uma amostra da biomassa, previamente seca numa estufa (Binder ED-53) a 105 °C e pesada, foi dissolvida usando ácido sulfúrico concentrado durante várias horas. Depois disso a lignina insolúvel em ácido é filtrada, seca numa estufa a 105 °C e pesada, conforme indicado na norma TAPPI T 222 om-02.

A lignina solúvel em ácido foi determinada usando a amostra solubilizada no ácido do processo anterior após se filtrar a lignina insolúvel, com base no método exposto na norma NREL LAP-004CS. Através de um método espectrofotométrico, usando o espectrofotómetro Shimadzu UV-160A, usando um comprimento de onda de 205 nm, calculou-se a massa da lignina solúvel (LS), em g, com a equação (6):

$$LS = \frac{A}{b \times a} \times df \times V_f \times \frac{1}{1000} \quad (6)$$

A - absorvância a 205 nm

b - comprimento da célula (= 1 cm)

a - absorvidade (= 55 L/g.cm, para a palha de milho neste comprimento de onda)

df - fator de diluição

V_f - volume do filtrado, em mL

Para determinar o teor de lignina total (LT), em percentagem, em base seca da biomassa usou-se a equação (7):

$$LT(\%) = \frac{LI + LS}{m_s} \times 100 \quad (7)$$

LI - massa de lignina insolúvel, em g;

m_s – massa seca da amostra inicial, em g.

3.2 Pré-tratamento

Como foi referido anteriormente, o pré-tratamento tem como principal vantagem quebrar as ligações entre a lignina e a celulose e hemicelulose, aumentando deste modo a acessibilidade das enzimas no processo da hidrólise enzimática. Para tal efeito, no tratamento da biomassa foi aplicado ácido clorídrico diluído.

Nesta etapa pesou-se 3,3 g da palha de milho e adicionou-se 50 mL do ácido diluído, (correspondendo a uma proporção de 1:15 de sólido:líquido), num frasco de 100 mL. Após a mistura do ácido com a palha, a solução foi colocada num banho termostático (Selecta P unitronic-or c) à temperatura pretendida e agitação de 80 rpm, durante um tempo predeterminado. Esta solução foi depois filtrada a vácuo e o líquido armazenado, para posterior análise em HPLC (Shimadzu LC-40 XR).

De forma a otimizar este processo, a gama de valores a usar para as condições experimentais da temperatura do banho, concentração do ácido e tempo estão definidos no planeamento presente no subcapítulo 3.4 deste trabalho.

3.3 Hidrólise enzimática

Na hidrólise enzimática utilizou-se uma mistura de enzimas, a *Accellerase 1000* (Danisco), que contém celulase de fungos e beta-glucosidase. De maneira a proporcionar um ambiente propício à atuação destas enzimas, o pH tem que ser ajustado após o pré-tratamento para o intervalo de 4,8 a 5,2.

Antes da hidrólise enzimática, realizou-se o pré-tratamento nas condições operacionais consideradas otimizadas pelo plano efetuado. Após o pré-tratamento, o pH da cada amostra pré tratada foi ajustado para 5 com a adição de hidróxido de sódio. Um volume específico de enzima foi adicionado a cada frasco com uma micropipeta e as amostras foram colocadas num banho termostático (Selecta P unitronic-or c) durante um determinado período de tempo, com agitação de 80 rpm, conforme as condições definidas no planeamento descrito no subcapítulo 3.4 deste trabalho. As soluções hidrolisadas foram filtradas a vácuo e armazenadas para posterior análise em HPLC (Shimadzu LC-40 XR).

3.4 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

De forma a otimizar as condições de operação das etapas de pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática, foi usada a metodologia de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) usando o software Design-Expert (Versão V13.0.1.0, Stat-Ease, Inc., EUA). Neste método foram usados três pontos centrais e estudadas 3 variáveis independentes, a saber: para o pré-tratamento ácido, a temperatura do banho (T), o

tempo de reação (t) e a concentração do ácido (CA); e para a hidrólise enzimática, a temperatura do banho (T), o tempo de reação (t) e a quantidade de enzima (E). A resposta analisada em ambos os casos foi a soma dos açúcares (SA) obtidos, após leitura no HPLC.

Nas Tabela 6 e Tabela 7 estão representados os valores atribuídos a cada um dos níveis codificados do DCCR, para cada uma das variáveis do pré-tratamento e da hidrólise, respetivamente. Os níveis α e $-\alpha$, que representam os pontos axiais, são iguais a 1,68 e a -1,68, respetivamente.

Tabela 6-Valores atribuídos às variáveis para o estudo do pré-tratamento

Variável	$-\alpha$	-1	0	1	α
<i>T (°C)</i>	53,2	60	70	80	86,8
<i>Tempo de reação (horas)</i>	0,6	2	4	6	7,4
<i>Concentração do ácido (% v/v)</i>	0,8	1,5	2,5	3,5	4,2

Tabela 7-Valores atribuídos às variáveis para o estudo da hidrólise

Variável	$-\alpha$	-1	0	1	α
<i>T (°C)</i>	23,2	30	40	50	56,8
<i>Tempo de reação (horas)</i>	15,8	24	36	48	56,2
<i>Quantidade de enzima (mL)</i>	0,32	1	2	3	3,68

Na Tabela 8 está representado o planeamento, criado no software *Design-Expert*, com as condições experimentais para cada ensaio, tanto para o pré-tratamento, como para a hidrólise.

Tabela 8-Condições experimentais para cada ensaio

ENSAIO	NÍVEL			PRÉ-TRATAMENTO			HIDRÓLISE		
	T	t	CA/E	T (°C)	t (horas)	CA (% v/v)	T (°C)	t (horas)	E (mL)
1	-1	-1	-1	60,0	2,0	1,5	30	24	1
2	-1	-1	1	60,0	2,0	3,5	30	24	3
3	-1	1	-1	60,0	6,0	1,5	30	48	1
4	-1	1	1	60,0	6,0	3,5	30	48	3
5	1	-1	-1	80,0	2,0	1,5	50	24	1
6	1	-1	1	80,0	2,0	3,5	50	24	3
7	1	1	-1	80,0	6,0	1,5	50	48	1
8	1	1	1	80,0	6,0	3,5	50	48	3
9	-1,68	0	0	53,2	4,0	2,5	23,2	48	2
10	1,68	0	0	86,8	4,0	2,5	56,8	48	2
11	0	-1,68	0	70,0	0,6	2,5	40	15,8	2
12	0	1,68	0	70,0	7,4	2,5	40	56,2	2
13	0	0	-1,68	70,0	4,0	0,8	40	36	0,32
14	0	0	1,68	70,0	4,0	4,2	40	36	3,68
15	0	0	0	70,0	4,0	2,5	40	36	2
16	0	0	0	70,0	4,0	2,5	40	36	2
17	0	0	0	70,0	4,0	2,5	40	36	2

Foram realizados ensaios para as três biomassas (Estarreja, Panasqueira e controlo) de igual forma durante a otimização do pré-tratamento, perfazendo no total 51 ensaios. Para a hidrólise só se efetuaram os ensaios para as biomassas de Panasqueira e de controlo, devido a restrições de tempo. Ao todo foram executados 34 ensaios para a otimização da hidrólise.

Foi efetuada uma análise de variância (ANOVA), para um modelo quadrático. Um intervalo de confiança de 95% foi definido para a otimização dos dois processos.

3.5 Quantificação de açúcares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

De forma a avaliar o desempenho das etapas de pré-tratamento e hidrólise, foram retiradas e armazenadas amostras para análise dos açúcares presentes no final destas etapas. Para esta análise recorreu-se à quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando o cromatógrafo Shimadzu LC-40 XR, equipado com detetor de índice de refração, Shimadzu RID-20A. Todas as amostras foram centrifugadas

previamente à leitura no cromatógrafo, de modo a prevenir a entrada de componentes sólidos para a coluna deste aparelho.

Para este método injetou-se 20 µL de amostra no injetor do aparelho e utilizou-se ácido sulfúrico a 5 mmol/L, com caudal de 0,6 mL/min, como solvente líquido, utilizado para transportar os constituintes da amostra pela coluna do cromatógrafo (Shimadzu TO-40S), aquecida até aos 45 °C. Os compostos presentes nas amostras foram identificados através do seu tempo de retenção, tempos determinados previamente pelo Doutor Wilson Júnior e listados na Tabela 9. As correspondentes concentrações foram determinadas por um método também desenvolvido pelo Doutor Wilson Júnior no programa LabSolutions, que através da área do pico correspondente a cada composto determinou automaticamente a concentração. Cada leitura durava 25 minutos.

Tabela 9-Tempos de retenção para os compostos encontrados no pré-tratamento e hidrólise enzimática

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)
Celobiose	7,6
Glicose	9,2 - 9,3
Xilose	10
Arabinose	10,8 - 11
Ácido acético	15
Etanol	22

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da biomassa

Na Tabela 10 estão expostos os resultados da caracterização, com o respetivo desvio padrão, das biomassas dos solos de controlo, Panasqueira e Estarreja. Estão também os resultados do estudo de Reis [73], que também fez uma caracterização das mesmas biomassas usadas no presente estudo, e dos estudos de Templeton [25] e Philip Ye [27], referidos anteriormente no subcapítulo 2.2.1, que analisaram outras amostras de palha de milho. Os resultados do teor de humidade e teor de cinzas deste estudo foram obtidos pela média de três réplicas enquanto os resultados da celulose e da lignina total foram obtidos pela média de duas réplicas. Todos os parâmetros foram calculados em base seca, exceto o teor de humidade.

Tabela 10-Resultados da caracterização da biomassa e comparação com a literatura

Parâmetro (%m/m)	Este estudo			Estudo de Reis [73]			Estudo de Templeton et al. [25]	Estudo de Philip Ye et al. [27]
	Controlo	Panasqueira	Estarreja	Controlo	Panasqueira	Estarreja		
Humidade	10,6 (0,2)	11,5 (0,1)	8,8 (0,1)	10,7	8,8	5,5	-	-
Cinzas	12,9 (0,4)	8,2 (0,2)	23,7 (0,5)	13,9	9,0	21,8	3,9	4,5
Celulose	26,2 (2,0)	31,8 (1,3)	25,0 (1,7)	27,1	32,5	24,0	31,9 (2,0)	33,2 (1,7)
Lignina total	20,6 (1,7)	20,3 (1,5)	21,9 (2,1)	20,9	18,6	23,6	13,3 (1,1)	22,1 (2,3)

Comparando os resultados obtidos nestes trabalhos, o teor de humidade, é maior na palha proveniente dos solos de Panasqueira (11,5%) e menor na palha de Estarreja (8,8%). Comparativamente à análise feita no estudo de Reis [73], a biomassa apresenta atualmente um maior teor de humidade nas biomassas de Estarreja (5,5% para 8,8%, um aumento relativo de 60%) e Panasqueira (8,8% para 11,5%, um aumento relativo de 30,7%) do que quando foi feito esse estudo, possivelmente provocado por diferentes condições de humidade no ar. Este aumento não altera os restantes resultados dos outros parâmetros visto que os outros parâmetros foram determinados em base seca, ou seja, sem humidade, pelo que se pode constatar que os valores para os restantes parâmetros são bastante similares entre os dois estudos e que as diferenças encontradas podem ser devidas a pequenos erros experimentais ou ao uso de diferentes

metodologias de caracterização, ou mesmo a pequenas diferenças intrínsecas às amostras analisadas.

O teor de cinzas apresentado pelas três biomassas analisadas foi superior ao encontrado na literatura, algo que seria esperado pelo menos para as biomassas de Panasqueira e Estarreja visto que estas são provenientes de culturas de milho usadas em fitorremediação de solos contaminados com metais pesados, onde o milho extrai os contaminantes do solo pelas raízes e acumula-os nas restantes partes da planta como as folhas e o caule, como já foi mencionado no capítulo 2.1 deste trabalho [17]. Acresce ainda que em estudos anteriores foi demonstrado que a composição pode ser afetada pela tipologia de solo usado no cultivo ou até por pequenas alterações na estirpe de planta usada [25].

A palha de Estarreja apresenta um conteúdo de cinzas (23,7%) superior ao de Panasqueira (8,2%). Isto releva que existe uma maior acumulação de material inorgânico nas culturas de Estarreja, o que pode indicar que existe maior contaminação nestes solos ou que embora a contaminação nos dois solos seja similar, as culturas aplicadas em Estarreja estão a desempenhar melhor o papel na fitorremediação dos solos. Seria necessário efetuar-se uma análise exaustiva à composição dos dois solos para identificar a causa desta diferença.

Os valores do teor de celulose nas biomassas de controlo (26,2%) e Estarreja (25,0%) são inferiores ao descrito na literatura. A palha de Panasqueira (31,8%), embora também apresente valores inferiores aos da literatura, apresenta valores superiores às outras palhas e mais próximos dos valores descritos nos artigos mencionados [25], [27]. Conhecidos estes dados, pode-se supor que a palha de Panasqueira apresenta uma composição mais promissora para a obtenção de açúcares, visto que é a que apresenta a maior quantidade de celulose, convertível em glicose.

O teor de lignina total encontra-se próximo da gama esperada para a palha de milho, embora seja mais elevado do que descrito na literatura. A biomassa com valores mais elevados é a de Estarreja (21,9%), o que pode indicar uma maior dificuldade no acesso à celulose e hemicelulose por parte das enzimas. De maneira oposta, os valores de lignina para a palha de Panasqueira (20,3%) são os mais baixos, o que pode vir a favorecer a hidrólise. Feita toda esta análise, a palha de Panasqueira apresenta as características mais favoráveis para a hidrólise e, assim, produzir mais açúcares.

4.2 Pré-tratamento ácido

Conforme referido anteriormente, o pré-tratamento com ácido diluído tem como principais funções tornar a celulose mais suscetível a um tratamento enzimático posterior e hidrolisar as hemiceluloses.

De forma a otimizar as condições aplicadas no pré-tratamento ácido, procedeu-se à avaliação da concentração de açúcares redutores por leitura em HPLC, conforme

descrito no capítulo anterior. As somas das concentrações dos açúcares das três biomassas analisadas encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11–Soma das concentrações dos açúcares presentes nos ensaios para as três biomassas estudadas

Ensaio	Condições experimentais			Soma das concentrações dos açúcares		
	T (°C)	t (horas)	CA (% v/v)	Controlo (g/L)	Estarreja (g/L)	Panasqueira (g/L)
1	60,0	2,0	1,5	5,325	4,759	3,763
2	60,0	2,0	3,5	5,910	4,449	4,437
3	60,0	6,0	1,5	5,976	4,651	4,544
4	60,0	6,0	3,5	6,452	4,574	4,471
5	80,0	2,0	1,5	9,190	5,182	4,539
6	80,0	2,0	3,5	9,690	5,335	5,517
7	80,0	6,0	1,5	13,295	5,638	5,771
8	80,0	6,0	3,5	14,472	8,568	9,865
9	53,2	4,0	2,5	4,834	4,626	5,069
10	86,8	4,0	2,5	9,851	7,251	9,522
11	70,0	0,6	2,5	3,826	4,276	5,232
12	70,0	7,4	2,5	7,778	4,892	5,532
13	70,0	4,0	0,8	5,522	4,594	4,148
14	70,0	4,0	4,2	8,803	4,958	6,125
15	70,0	4,0	2,5	8,329	3,105	5,220
16	70,0	4,0	2,5	8,250	4,784	4,129
17	70,0	4,0	2,5	8,188	4,273	5,394

Procedendo à análise dos valores da Tabela 11, é possível averiguar que nas três biomassas o ensaio que levou à maior concentração de açúcares foi o ensaio 8, tendo a

biomassa do solo de controlo gerado a maior quantidade de açúcares, com 14,472 g/L, e a palha de Estarreja a menor quantidade, sendo 8,568 g/L. Estes dados apontam para uma maior quantidade de hemicelulose na palha do solo de controlo do que nas restantes, visto que no pré-tratamento com ácido diluído dá-se predominantemente a hidrólise das hemiceluloses. Como não foi feita a caracterização às hemiceluloses não é possível comprovar esta assunção.

As concentrações de todos os compostos analisados encontram-se no Anexo 1, na Tabela 15. De notar que estas tabelas não contam com a concentração da celobiose pois existiu uma interferência na leitura do cromatograma. Um composto com tempo de retenção muito próximo da celobiose impossibilitou a leitura da área deste composto no cromatograma, como se pode ver na figura Figura 22 do Anexo 2. Esse composto foi posteriormente identificado como sendo o ácido clorídrico, o ácido usado no pré-tratamento. Visto que a área deste composto no cromatograma aparenta ser reduzida, comparativamente à dos outros açúcares como a glicose e xilose, a concentração deste açúcar não foi determinada.

Na Tabela 15 **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** do Anexo 1, pode-se observar que existe a formação de ácido acético, conhecido inibidor da fermentação. O estudo de Larsson *et al.* [74] conclui que para o ácido acético ter propriedades inibidoras na fermentação, este precisa de ter uma concentração superior a cerca de 6 g/L de ácido acético. Nos valores da Tabela 15, nenhuma concentração aparenta ser superior a 1,428 g/L, o que não se encontra perto deste limite para provocar inibição, pelo que não foi considerada a formação de ácido acético para a otimização do pré-tratamento. Existe também uma pequena formação de etanol em algumas das amostras, mas como esta se encontra em quantidades muitíssimo reduzidas este não foi um fator determinante na otimização deste processo. Não foi detetada a presença de mais nenhum outro composto em quantidades significativas para além dos mencionados anteriormente.

4.2.1 Otimização do pré-tratamento

Usando o software Design-Expert, determinou-se as condições ótimas para maximizar a soma das concentrações dos açúcares gerados, para cada uma das biomassas analisadas. As condições ótimas determinadas para a biomassa de Controlo foram T=86,8 °C, t=6,6 h e CA=3,2% v/v, com um resultado previsto de 16,4 g/L de açúcares, para a biomassa de Estarreja foram T=86,7 °C, t=6,9 h e CA=3,6% v/v, com um resultado previsto de 11,4 g/L de açúcares, e para a biomassa de Panasqueira foram T=86,6 °C, t=7,3 h e CA=3,6% v/v, com um resultado previsto de 13,5 g/L de açúcares.

As equações (8), (9) e (10) dos modelos de previsão, para as biomassas de controlo (C), Estarreja (E) e Panasqueira (P), respetivamente, são as seguintes:

$$SA(C) = 9,2685 - 0,1853T - 2,0443t - 0,4861CA + 0,0481T * t + 0,0077T * CA + 0,0355t * CA + 0,0015T^2 - 0,0998t^2 + 0,0819CA^2 \quad (8)$$

$$SA(E) = 51,1885 - 1,1266T - 2,3808t - 5,0799CA + 0,0230T * t + 0,0434T * CA + 0,1881t * CA + 0,0072T^2 + 0,0597t^2 + 0,3067CA^2 \quad (9)$$

$$SA(P) = 47,7425 - 1,1227T - 2,2502t - 3,5315CA + 0,0298T * t + 0,0559T * CA + 0,1481t * CA + 0,007T^2 + 0,006t^2 - 0,0628CA^2 \quad (10)$$

As Figura 12, Figura 13 e Figura 14 demonstram como a resposta varia em função de cada uma das variáveis independentes. De modo geral, o valor de SA aumenta significativamente quando as variáveis tendem para os extremos positivos. Só no caso da CA na biomassa do solo de controlo é que se nota um aumento pouco acentuado.

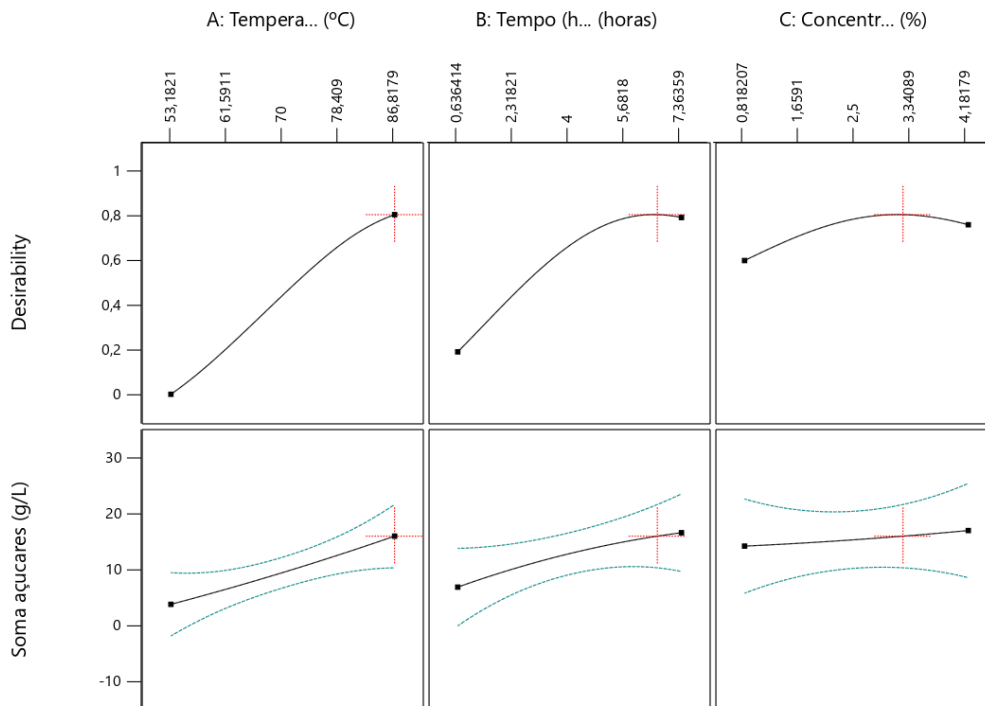


Figura 12-Varição da resposta consoante a variável independente (Controlo)

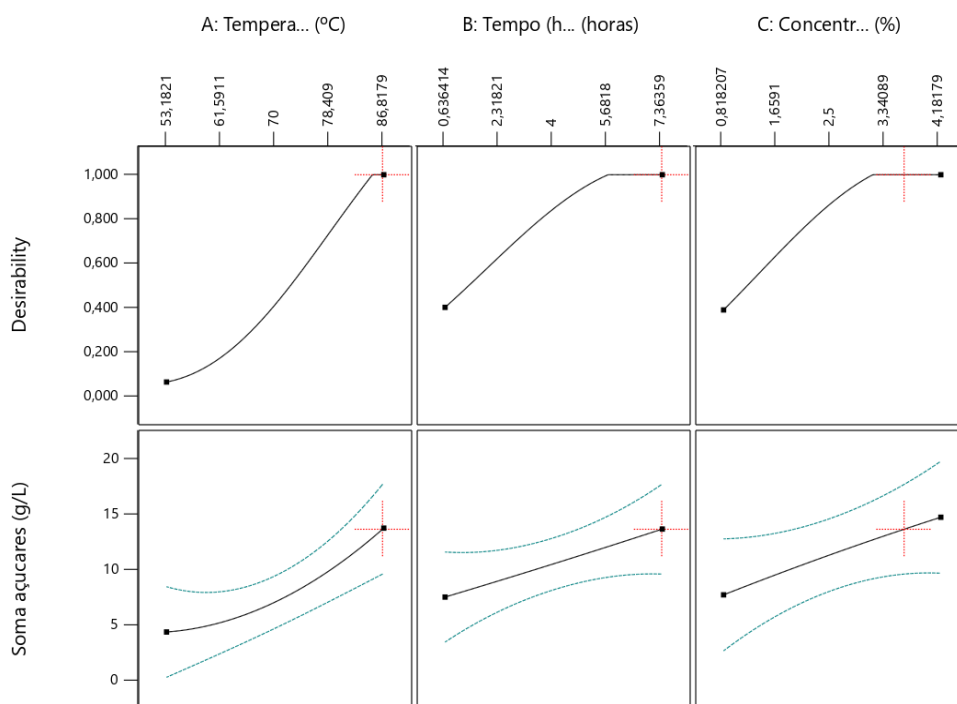


Figura 13-Varição da resposta consoante a variável independente (Estarreja)

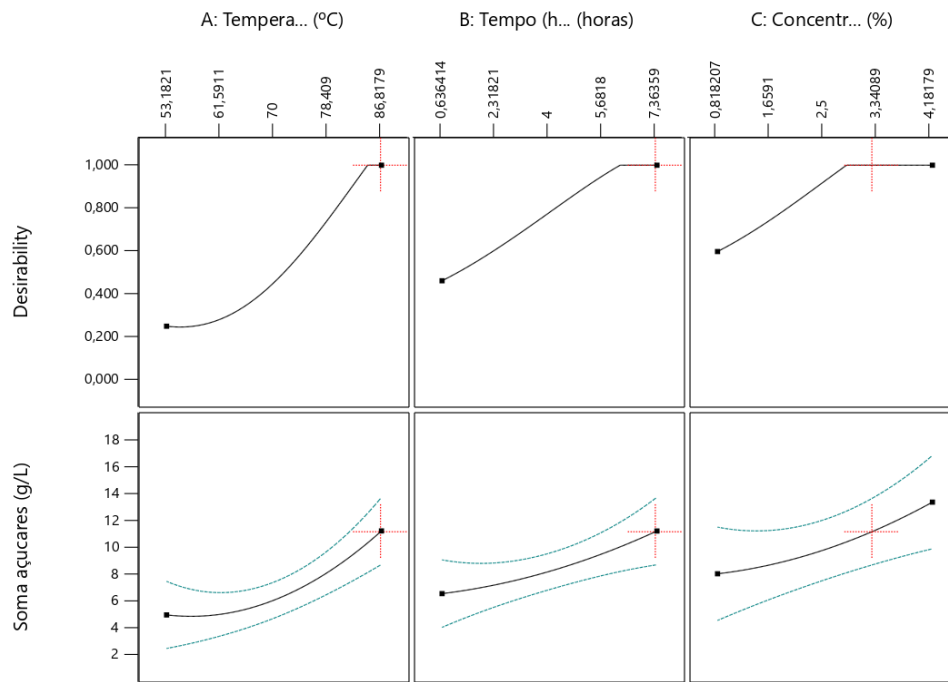


Figura 14-Variação da resposta consoante a variável independente (Panasqueira)

Os *surface plots* previstos para os três casos de estudo encontram-se representados nas Figura 15, Figura 16 e Figura 17.

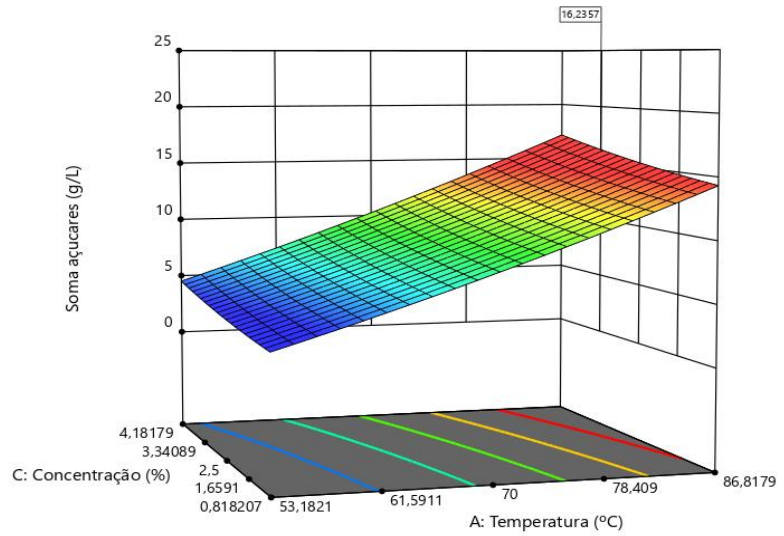
Os *surface plots* obtidos apontam para uma melhor resposta da concentração de açúcares para valores das variáveis próximos do extremo positivo. Isto é mais evidente nos *surface plots* das biomassas de Estarreja e Panasqueira, onde se nota um acréscimo mais acentuado próximo dessa zona. No *plot* da interação entre T e CA e no *plot* da interação entre t e CA, da biomassa de controlo, a SA varia muito pouco com o valor da variável CA, algo que já tinha sido constatado com a análise da Figura 12.

Com base na análise dos gráficos da variação da resposta consoante as variáveis independentes e dos *surface plots*, constata-se que as maiores concentrações de açúcar são obtidas quando as variáveis escolhidas se encontravam nos valores próximos dos limites positivos de cada variável. É por isso que os valores máximos previstos de SA indicam umas condições ótimas próximas dos valores máximos utilizados neste estudo (os pontos axiais), com a exceção dos valores de CA, 3,2% v/v para o controlo e 3,6% v/v para Estarreja e Panasqueira, que se encontram mais próximos dos valores de nível 1, correspondente a 3,5% v/v.

Soma açúcares (g/L)
 3,826  14,472

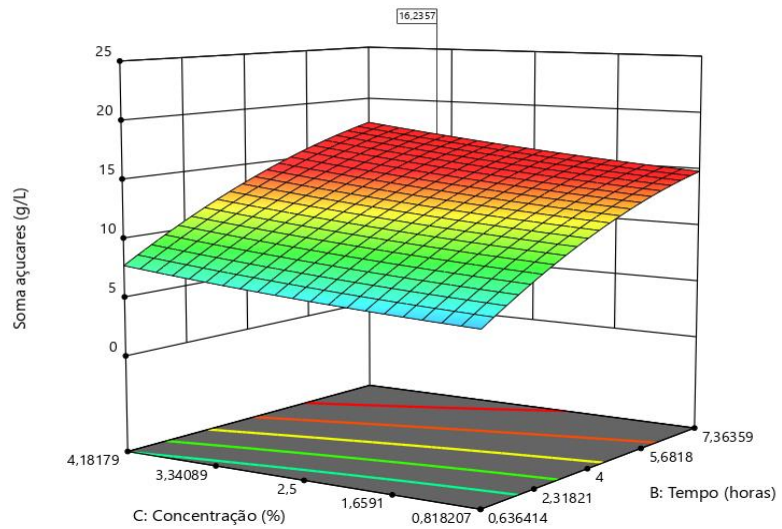
X1 = A
 X2 = C

Actual Factor
 B = 6,77446



X1 = B
 X2 = C

Actual Factor
 A = 86,8179



X1 = A
 X2 = B

Actual Factor
 C = 3,23908

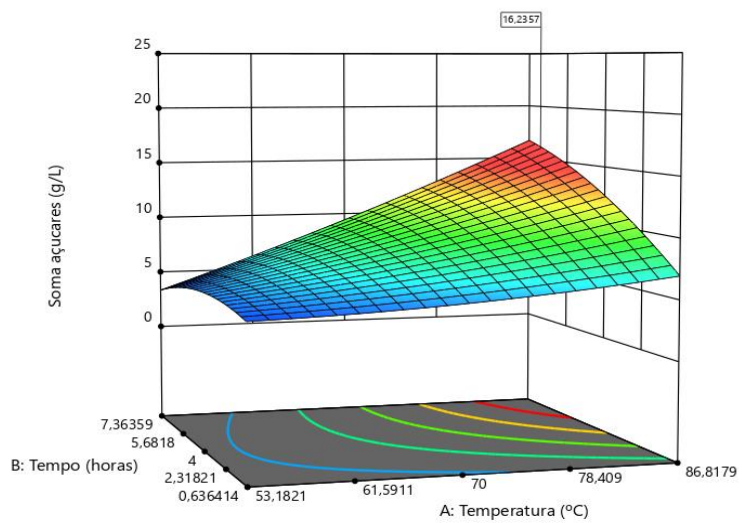
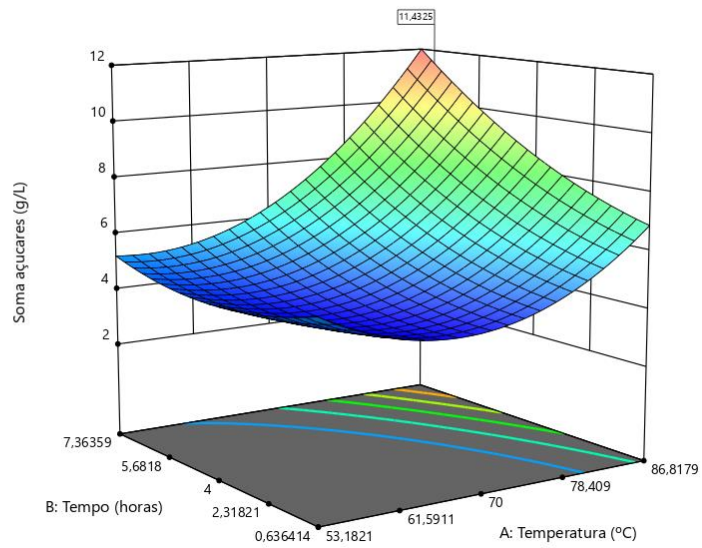


Figura 15-Surface plots previstos (Controlo)

Soma açúcares (g/L)
 4  12

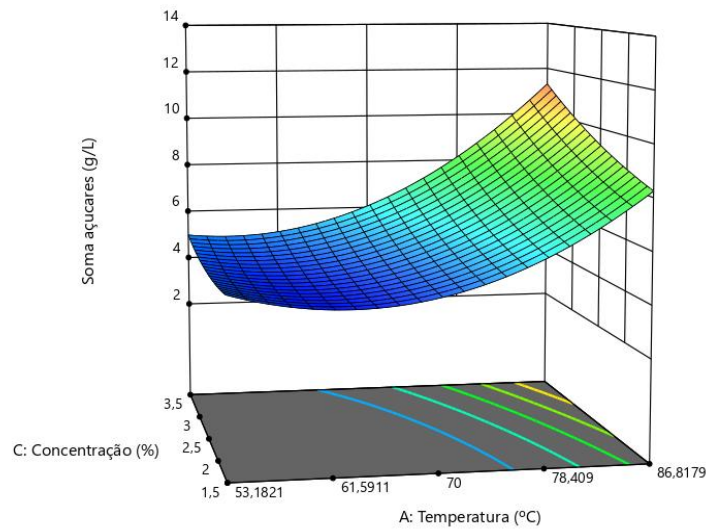
X1 = A: Temperatura
 X2 = B: Tempo

Actual Factor
 C: Concentração = 3,56229



X1 = A: Temperatura
 X2 = C: Concentração

Actual Factor
 B: Tempo = 6,90235



X1 = B: Tempo
 X2 = C: Concentração

Actual Factor
 A: Temperatura = 84,7863

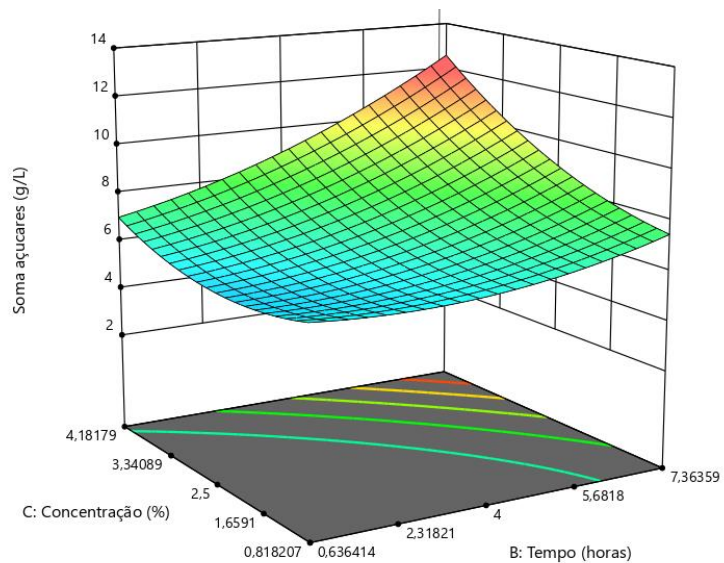
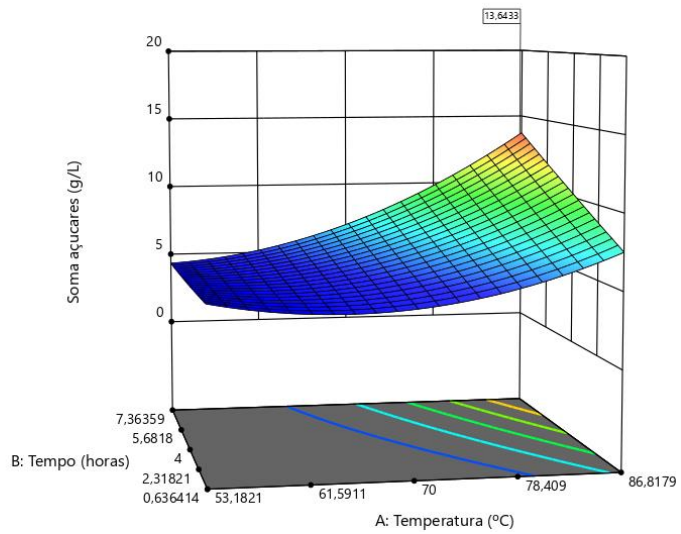


Figura 16-Surface plots previstos (Estarreja)

Soma açúcares (g/L)
 5  14

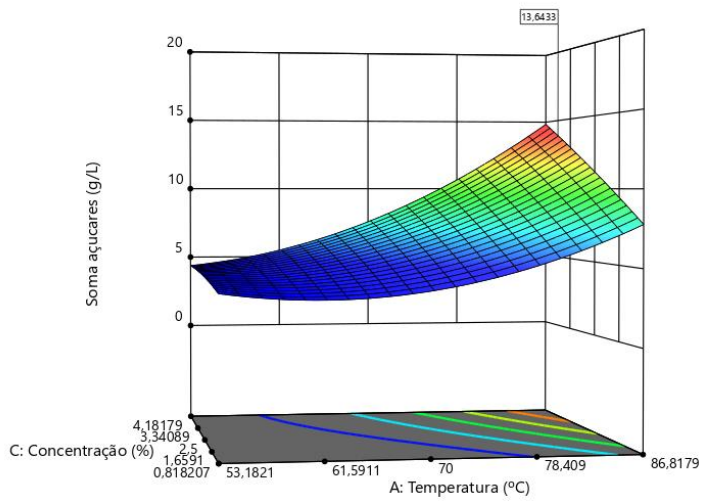
X1 = A
 X2 = B

Actual Factor
 C = 3,61328



X1 = A
 X2 = C

Actual Factor
 B = 7,34512



X1 = B
 X2 = C

Actual Factor
 A = 86,6219

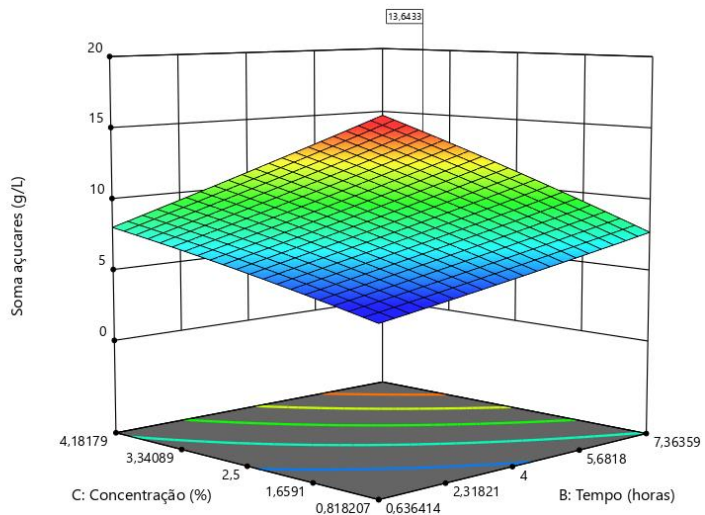


Figura 17-Surface plots previstos (Panasqueira)

Na análise ANOVA realizada para o modelo quadrático das três otimizações, estando esta análise presente na Tabela 16, Tabela 18 e Tabela 20 dos Anexos 3, 4 e 5, pudesse constar que o modelo aplicado é significativo, evidenciado a partir do teste F de Fisher, com um valor de probabilidade muito baixo. Os *P-values* inferiores a 0,05 indicam que esses termos são significativos para o modelo, o que acontece nos termos [T] e [t] para a biomassa de controlo, nos termos [T] e [T²] para a biomassa de Estarreja e nos termos [T], [CA] e [T²] para a biomassa de Panasqueira. Para o R², presente nas *Fit statistics* da Tabela 17, Tabela 19 e Tabela 21 desses mesmos anexos, demonstra um nível satisfatório de correlação entre os valores observados e os valores previstos pelo modelo. Nenhuma anormalidade foi observada na análise dos diagnósticos de *residuals*.

De forma a validar os resultados das previsões, foram feitos 3 ensaios para cada uma das palhas, com as condições consideradas ótimas. Procedeu-se à análise destes ensaios para determinar as concentrações de açúcares e comparar com os valores previstos. Na Tabela 12 estão expressos os resultados destes ensaios. Para as palhas de Panasqueira e controlo, os SA obtidos estão um pouco aquém do valor previsto, embora não seja por muito, enquanto os resultados da palha de Estarreja estão um pouco acima do previsto, mas dentro do espectável.

Tabela 12-Validação das previsões dos valores de SA (P é a palha de Panasqueira, E é de Estarreja e C é a de controlo)

Ensaio	T (°C)	T (h)	CA (% v/v)	SA (g/L)	Média SA	Desvio padrão	SA Previsto (g/L)
P1				12,686			
P2	86,6	7,3	3,6	12,764	12,477	0,483	13,5
P3				11,891			
E1				10,811			
E2	86,7	6,9	3,6	13,563	11,973	1,425	11,4
E3				11,545			
C1				15,109			
C2	86,8	6,6	3,2	15,084	15,216	0,206	16,4
C3				15,453			

4.3 Hidrólise enzimática

Nesta etapa utilizou-se uma mistura de enzimas, a *Accellerase 1000* (Danisco), para hidrolisar os hidratos de carbono e assim promover a formação de açúcares.

De forma idêntica ao pré-tratamento, procurou-se otimizar as condições da hidrólise enzimática. Para tal procedeu-se à avaliação da concentração de açúcares redutores por leitura em HPLC, em amostras provenientes das biomassas de controlo e de Panasqueira. A biomassa de Estarreja não foi avaliada nesta etapa. As somas das concentrações dos açúcares das três biomassas analisadas encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13-Soma das concentrações dos açúcares presentes nos ensaios para as duas biomassas estudadas

Ensaio	Condições experimentais			Soma das concentrações dos açúcares	
	T (°C)	t (horas)	E (mL)	Controlo (g/L)	Panasqueira (g/L)
1	30	24	1	13,115	13,422
2	30	48	1	14,464	14,422
3	30	24	3	13,615	12,523
4	30	48	3	14,564	14,294
5	50	24	1	15,972	14,12
6	50	48	1	16,411	12,12
7	50	24	3	17,331	15,978
8	50	48	3	15,431	15,656
9	40	15,8	2	13,844	12,059
10	40	56,2	2	15,66	15,566
11	40	36	0,32	15,035	15,221
12	40	36	3,68	15,948	17,398
13	23,2	36	2	12,441	14,133
14	56,8	36	2	17,268	13,538
15	40	36	2	16,05	17,037
16	40	36	2	14,754	16,945
17	40	36	2	16,694	17,623

De acordo com os valores da Tabela 13, onde houve maior libertação de açúcares pós hidrólise, para a biomassa de controlo, foi no ensaio 7 com 17,331 g/L de açúcares libertados, enquanto na biomassa de Panasqueira gerou-se maior concentração de açúcares no ensaio 17, com 17,623 g/L.

Após o pré-tratamento, a biomassa de controlo tinha, no geral, valores mais elevados de açúcares hidrolisados do que a biomassa de Panasqueira, o que, como comentado anteriormente, aponta para uma maior quantidade de hemiceluloses. No entanto, após está hidrólise, a biomassa de Panasqueira produziu uma maior quantidade de açúcares, comparativamente à de controlo. Isto sugere que embora a biomassa de Panasqueira tenha uma menor quantidade de hemiceluloses para hidrolisar, esta tem uma maior quantidade de celulose, facto comprovado pela caracterização prévia da celulose das duas biomassas, estando estes dados presentes na Tabela 10.

As concentrações de todos os compostos analisados encontram-se no Anexo 6, na Tabela 22. Do mesmo modo que o pré-tratamento, não se procedeu à leitura da celobiose, pelas razões ditas anteriormente. Também não houve a leitura de etanol, pois este encontrava-se em quantidades muito baixas, sem interesse para quantificar. Como se pode constatar na Tabela 22 do Anexo 6, a concentração de ácido acético continua a ser inferior em todos os ensaios à concentração necessária para inibir a fermentação.

Na Figura 23 do Anexo 7, encontra-se um cromatograma de uma amostra pós-hidrólise. Não foi detetada a presença de mais nenhum outro composto ou inibidor em quantidades significativas para além dos mencionados anteriormente.

4.3.1 Otimização da hidrólise

Tal como no pré-tratamento, usou-se o software *Design-Expert* para determinar as condições ótimas para maximizar a soma das concentrações dos açúcares gerados, para cada uma das biomassas analisadas. As condições ótimas determinadas para a biomassa de Controlo foram $T=54$ °C, $t=30,3$ h e $E=2,5$ mL, com um resultado previsto de 17,2 g/L de açúcares e para a biomassa de Panasqueira foram $T=43$ °C, $t=38,5$ h e $E=3$ mL, com um resultado previsto de 17,6 g/L de açúcares.

As equações (11) e (12) dos modelos de previsão, para as biomassas de controlo (C) e Panasqueira (P), respetivamente, são as seguintes:

$$SA(C) = -7,0652 + 0,4142t + 1,6899E + 0,5285T - 0,0285t * E - 0,0039t * T - 0,0028E * T - 0,0025t^2 - 0,0920E^2 - 0,0032T^2 \quad (11)$$

$$SA(P) = -19,2329 + 0,8469t - 1,8969E + 1,0753T + 0,0255t * E - 0,0053t * T + 0,0803E * T - 0,009t^2 - 0,4111E^2 - 0,0129T^2 \quad (12)$$

A Figura 18 e a Figura 19 demonstram como a resposta varia em função de cada uma das variáveis independentes. Estes dados indicam que no caso da palha de controlo a SA aumenta com T e também aumenta com E até próximos dos 2,5 mL, a partir deste ponto não aparenta ter efeito na SA. Quanto à variável t, esta parece afetar positivamente a SA até às 30 horas de reação, mas a partir desse ponto tem efeitos adversos à quantidade de açúcares. No caso da palha de Panasqueira, a variável E afeta a SA da mesma maneira que na palha de controlo, ou seja, não tem efeito na concentração a partir de um certo ponto próximos dos 3 mL. Quanto às variáveis T e t, estas têm maior efeito nos pontos próximos de 43 °C e 38 h, respetivamente.

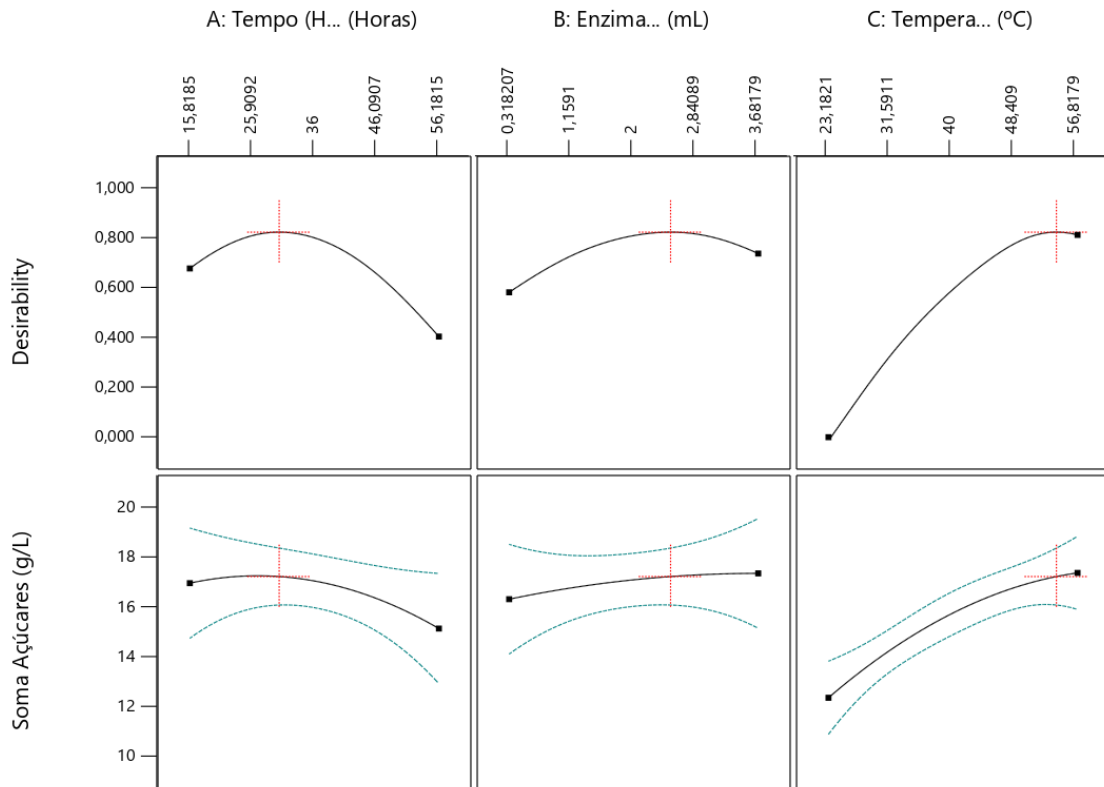


Figura 18-Variação da resposta consoante a variável independente (Controlo)

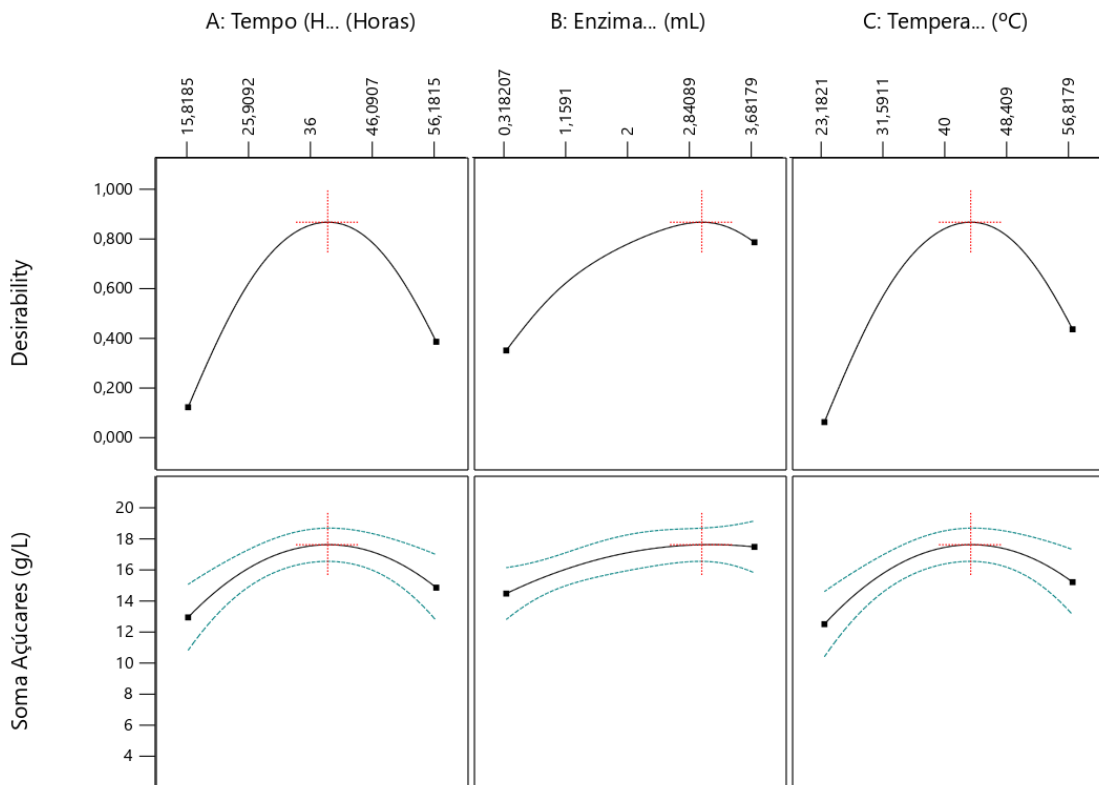


Figura 19-Variação da resposta consoante a variável independente (Panasqueira)

Os *surface plots* previstos para os dois casos de estudo encontram-se representados nas Figura 20 e Figura 21.

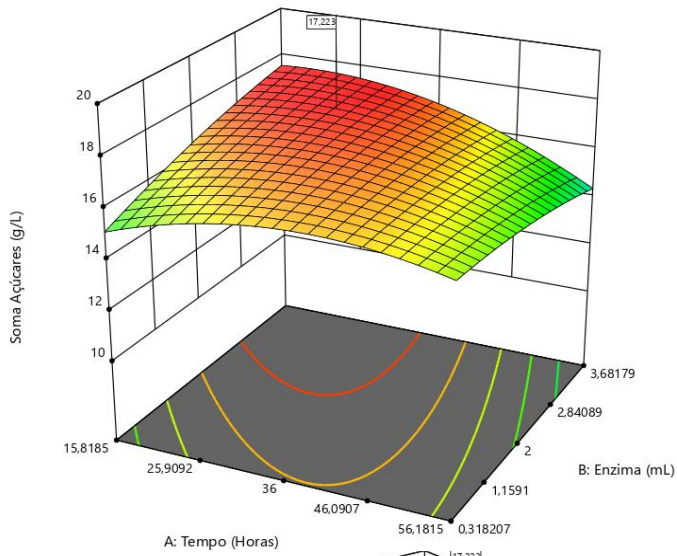
De acordo com os *surface plots* do controlo, a resposta SA é maior junto dos valores mais elevados da temperatura, perto dos limites experimentais dessa variável, como se pode ver nos *surface plots* [t, T] e [T, E]. Quanto à variação da resposta em função de t, esta é mais elevada um pouco antes de atingir o ponto médio deste fator, tanto na sua interação com T ou E. Quanto à variável E, esta pouco parece influenciar a resposta SA, sendo as outras duas variáveis as principais influenciadoras da resposta.

Os *surface plots* da palha do solo de Panasqueira dispõe dos pontos ideais mais centrados no plano experimental, comparativamente à biomassa do solo de controlo, sendo isto mais visível na interação entre T e t. Nas interações que envolvem a variável E, o ponto ideal tende a estar mais próximo do limite superior dessa variável, pelo menos quando comparado com as outras duas variáveis.

Soma Açúcares (g/L)
13  17,331

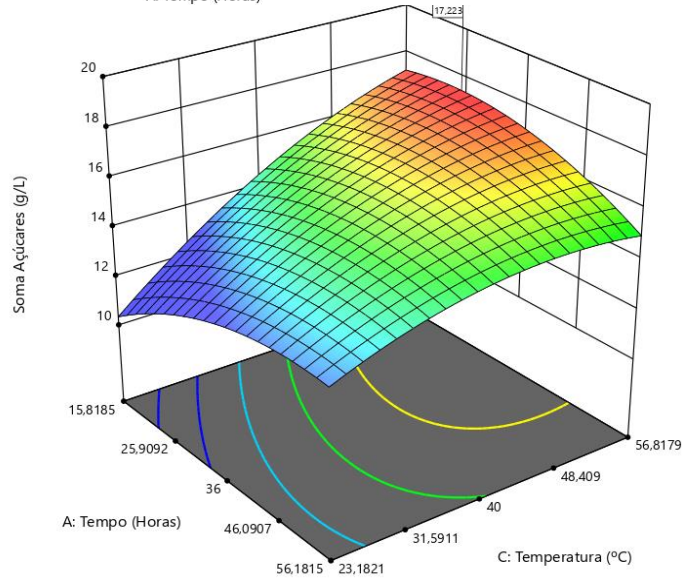
X1 = A
X2 = B

Actual Factor
C = 53,965



X1 = A
X2 = C

Actual Factor
B = 2,49846



X1 = B
X2 = C

Actual Factor
A = 30,2968

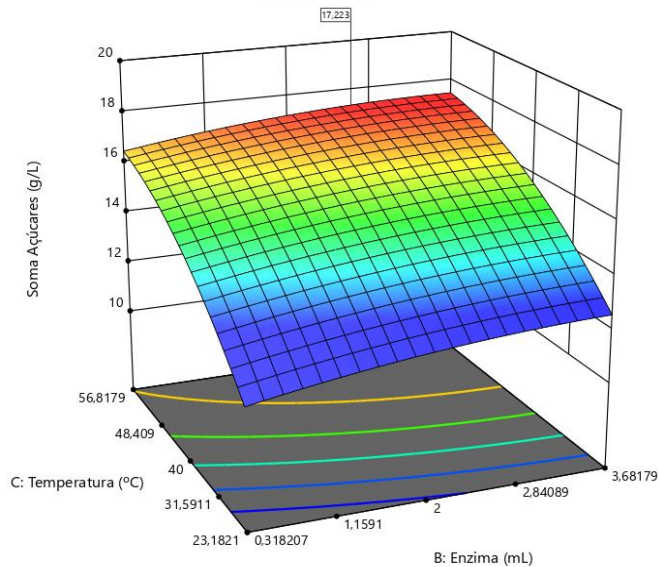
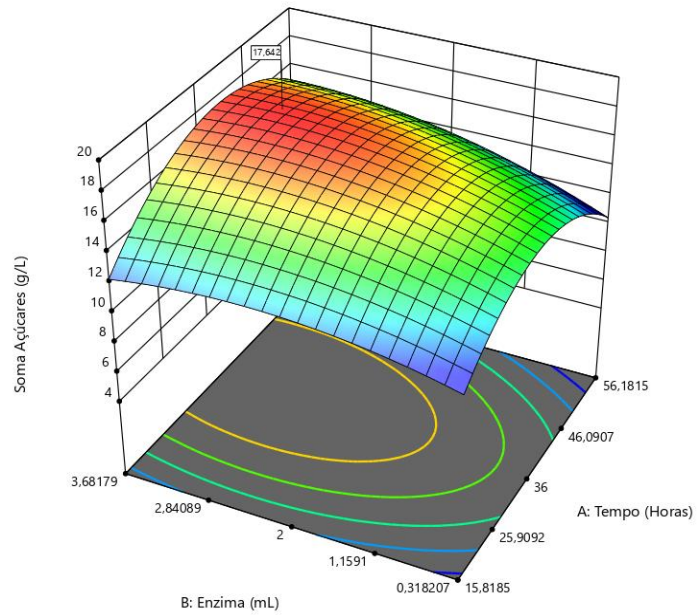


Figura 20-Surface plots previstos (Controlo)

Soma Açúcares (g/L)
 12,059  17,623

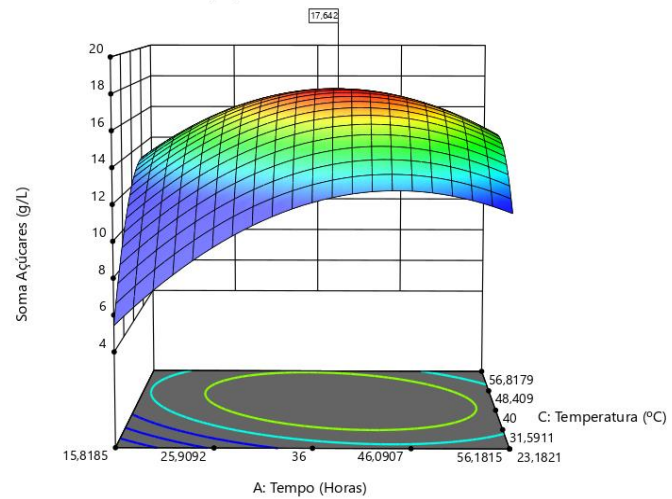
X1 = A
 X2 = B

Actual Factor
 C = 43,0112



X1 = A
 X2 = C

Actual Factor
 B = 2,96838



X1 = B
 X2 = C

Actual Factor
 A = 38,5352

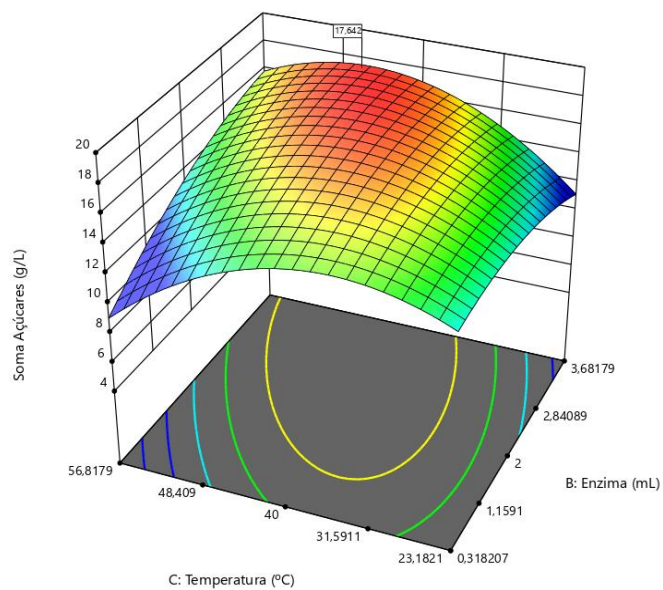


Figura 21-Surface plots previstos (Panasqueira)

Na análise ANOVA realizada para o modelo quadrático das duas otimizações, estando esta análise presente na Tabela 23 e Tabela 25 dos Anexos 8 e 9, pudesse constar que o modelo aplicado é significativo, evidenciado a partir do teste F de Fisher, com um valor de probabilidade muito baixo. Os *P-values* inferiores a 0,05 indicam que esses termos são significativos para o modelo, o que acontece no termo [T] para a biomassa de controlo e nos termos [E], [E*T], [t²] e [T²] para a biomassa de Panasqueira. O R², presente nas *Fit statistics* na Tabela 24 e Tabela 26 desses mesmos anexos, demonstra um nível satisfatório de correlação entre os valores observados e os valores previstos pelo modelo. Nenhuma anormalidade foi observada na análise dos diagnósticos de *residuals*.

De forma a validar os resultados das previsões, foram feitos 3 ensaios para cada uma das palhas, com as condições consideradas ótimas. Procedeu-se à análise destes ensaios para determinar as concentrações de açúcares e comparar com os valores previstos. Na Tabela 14 estão expressos os resultados destes ensaios. Para as duas palhas analisadas, Panasqueira e controlo, os SA obtidos experimentalmente encontram-se muito próximos do valor previsto.

Tabela 14-Validação das previsões dos valores de SA (P é a palha de Panasqueira e C é a de controlo)

Ensaio	T (°C)	t (h)	E (mL)	SA (g/L)	Média SA	Desvio padrão	SA Previsto (g/L)
P1				17,534			
P2	43	38,5	3	17,936	17,491	0,469	17,6
P3				17,002			
C1				16,782			
C2	54	30,3	2,5	16,396	16,750	0,339	17,2
C3				17,072			

Os valores das variáveis otimizados encontram-se todos dentro dos limites usados neste planeamento experimental.

4.4 Comparação dos resultados com a literatura

Comparando os resultados obtidos do pré-tratamento com os dados da Tabela 4, é de notar que muito comumente são utilizadas temperaturas de reação mais altas do que as empregues neste estudo (entre 100 a 177°C) quando se utiliza ácidos diluídos para o pré-tratamento, o que por sua vez vai levar a que não sejam necessários tempos de reação tão elevados, o que acaba por acelerar o processo. No entanto neste estudo decidiu-se utilizar gamas mais baixas de temperatura, na tentativa de reduzir a formação de substâncias inibidoras, tentativa que foi bem-sucedida, visto que foram detetadas baixas concentrações de inibidores, como o ácido acético, pelo estudo dos cromatogramas.

A escolha do ácido clorídrico mostrou-se uma escolha capaz de atender ao pretendido. Embora os estudos do pré-tratamento de matéria lignocelulósica com ácidos diluídos empreguem mais comumente o ácido sulfúrico, este estudo e os estudos Han et al. [50], Santos [72] e Reis [73] apresentaram resultados positivos para a utilização deste ácido no pré-tratamento de matéria lignocelulósica.

Quanto aos resultados da hidrólise enzimática, comparativamente aos valores expressos na

Tabela 5, as temperaturas ideais obtidas neste estudo, 43 °C para a biomassa de Panasqueira e 54 °C para a de controlo, são próximas do que é comumente empregue noutros estudos, como é o caso de Wang et al. [54], Zahoor et al. [55] e Li et al. [56], que utilizaram uma temperatura de 50 °C na hidrólise enzimática. O tempo considerado ótimo, para a biomassa do solo de controlo 30,3 h e para a biomassa do solo de Panasqueira 38,5 h, encontra-se dentro do que normalmente é esperado para uma hidrólise, tendo os estudos mencionados anteriormente utilizado tempos entre as 24 h e as 72 h.

CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- 5.1 Conclusões
- 5.2 Sugestões de trabalhos futuros

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

5.1 Conclusões

Devido às crescentes preocupações da sociedade moderna relativamente às questões ambientais que se têm agravado nestes últimos anos, existe uma maior procura de novas soluções que não comprometam o futuro das próximas gerações. Os biocombustíveis produzidos a partir de biomassa lignocelulósica são promissores, pois servem de alternativa aos combustíveis fósseis.

A biomassa lignocelulósica está presente em grandes quantidades e oferece diversas opções para a produção de bioenergia. A produção de biocombustíveis renováveis e sustentáveis, como é o caso do bioetanol, a partir de biomassa está a ganhar interesse global. Os biocombustíveis podem trazer benefícios do ponto de vista ambiental e económico. O bioetanol produzido a partir de biomassa renovável, surge como um combustível sustentável, mais limpo, neutro em carbono e uma alternativa verde para o combustível fóssil.

No entanto esta produção de biocombustíveis requer enormes quantidades de terras aráveis que também são necessárias para fins mais tradicionais, como a produção de alimentos, o que levanta questões ao nível ético e económico sobre a capacidade de usar estas terras para a produção de biomassa destinada exclusivamente para a produção de biocombustíveis. Uma solução para estas questões é a fitorremediação de terrenos poluídos, onde os resíduos das culturas usadas na limpeza do solo são depois usados para a produção de bioetanol. A combinação deste recurso proveniente da fitorremediação com os métodos cada vez mais desenvolvidos de conversão da biomassa em bioetanol, tem vindo cada vez mais a ser um tema de interesse.

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

A caracterização das biomassas utilizadas, palhas de milho provenientes de diferentes solos contaminados e de um solo não contaminado usado como controlo, apresentou alguma variação entre as biomassas estudadas. A palha que apresentou maior potencial, a nível composicional, foi a palha dos solos de Panasqueira, que apresentava um conteúdo de celulose superior às restantes (31,8 % da sua massa) e uma quantidade de lignina inferior (20,3 % da sua massa), ambos fatores importantes na produção de bioetanol.

As condições ótimas para o pré-tratamento com ácido clorídrico diluído foram determinadas para as biomassas utilizadas neste estudo, que passa-se a enumerar: para

o Controlo uma temperatura de 86,8 °C, tempo de reação de 6,6 horas e uma concentração do ácido de 3,2% v/v, foi considerado ótimo e previu-se um resultado de 16,4 g/L de açúcares (resultado experimental de validação de 15,2 g/L); para a biomassa de Estarreja foi considerado ótimo uma temperatura de 86,7 °C, tempo de reação de 6,9 horas e uma concentração do ácido de 3,6% v/v e previu-se um resultado de 11,4 g/L de açúcares (resultado experimental de validação 12,0 g/L); por último para a biomassa de Panasqueira foram determinados uma temperatura de 86,6 °C, tempo de reação de 7,3 horas e uma concentração do ácido de 3,6% v/v, como sendo as condições ótimas e previu-se um resultado de 13,5 g/L de açúcares (resultado experimental de validação 12,5 g/L). Constatou-se pela análise do planeamento experimental feito que as maiores concentrações de açúcar foram obtidas quando as variáveis escolhidas se encontravam nos valores próximos dos limites máximos de cada variável. É de notar também que nesta etapa houve pouca formação de compostos potencialmente inibidores da fermentação, potencialmente devido à baixa gama de temperaturas usadas e baixas concentrações do ácido.

Para a hidrólise enzimática, só se procedeu à análise das palhas de controlo e Panasqueira. A biomassa de controlo apresentou as condições ótimas como sendo temperatura igual a 54 °C, tempo de reação de 30,3 horas e volume de enzima de 2,5 mL, com um resultado previsto de 17,2 g/L de açúcares (resultado experimental de validação 16,8 g/L) e a biomassa de Panasqueira apresentou temperatura igual a 43 °C, tempo de reação de 38,5 horas e volume de enzima usado de 3 mL como condições ideais, com um resultado previsto de 17,6 g/L de açúcares (resultado experimental de validação 17,5 g/L).

A palha proveniente de Panasqueira, usada em fitorremediação de solos contaminados com metais pesados, apresentou a maior produção de açúcares pós hidrólise, ultrapassando mesmo a palha de milho de controlo. A fitorremediação não parece ter influência negativa na capacidade de produção de açúcares desta biomassa, algo que já se suspeitava devido à sua caracterização composicional (maior quantidade de celulose e menor quantidade de lignina).

5.2 Sugestões de trabalhos futuros

De forma a dar seguimento a este estudo, propõe-se que otimizar a próxima etapa da produção do bioetanol, a fermentação, ou que se continue a tentar otimizar as etapas de pré-tratamento e hidrólise pois ainda existem diversas possibilidades e fatores a serem otimizados no processo de produção de bioetanol, como a escolha do ácido a aplicar no pré-tratamento, a escolha das enzimas, a escolha do microrganismo para a fermentação, a escolha entre SSF e SHF, etc.

De maneira a melhor conseguir-se perceber qual o efeito que os metais pesados têm na produção de bioetanol, recomenda-se que se proceda à análise dos metais pesados após cada etapa de produção.

Outra sugestão para trabalhos futuros é utilizar um ácido diferente do ácido clorídrico se se pretende analisar a celobiose por HPLC, pois pode haver interferência entre os picos destes dois compostos como existiu neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.1 NORMAS

6.2 LEGISLAÇÃO

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. Kumar and S. Sarkar, "Biofuels - Alternative Feedstocks and Conversion Processes," in *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, Oxford: Academic Press; 1st edition, 2011, pp. 485–486.
- [2] A. Pandey, C. Larroche, S. Ricke, C.-G. Dussap, and E. Gnansounou, "Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes," 2011.
- [3] F. Cherubini, "The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals," *Energy Convers. Manag.*, vol. 51, no. 7, pp. 1412–1421, Jul. 2010, doi: 10.1016/J.ENCONMAN.2010.01.015.
- [4] P. A. Owusu and S. Asumadu-Sarkodie, "A review of renewable energy sources, sustainability issues and climate change mitigation," <http://www.editorialmanager.com/cogenteng>, vol. 3, no. 1, 2016, doi: 10.1080/23311916.2016.1167990.
- [5] "THE 17 GOALS | Sustainable Development." <https://sdgs.un.org/goals> (accessed Oct. 18, 2021).
- [6] bp, "Primary energy – Statistical Review of World Energy 2021."
- [7] DGEG, ADENE, and Observatório de Energia, "Energia em Números - Edição 2020," Lisboa, 2020.
- [8] A. Devi, A. Singh, S. Bajar, D. Pant, and Z. U. Din, "Ethanol from lignocellulosic biomass: An in-depth analysis of pre-treatment methods, fermentation approaches and detoxification processes," *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 9, no. 5, p. 105798, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.JECE.2021.105798.
- [9] S. F. Cheng, C. Y. Huang, Y. C. Lin, S. C. Lin, and K. L. Chen, "Phytoremediation of lead using corn in contaminated agricultural land-An in situ study and benefit assessment," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 111, pp. 72–77, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.024.
- [10] E. Meers *et al.*, "The use of bio-energy crops (*Zea mays*) for 'phytoattenuation' of heavy metals on moderately contaminated soils: A field experiment," *Chemosphere*, vol. 78, no. 1, pp. 35–41, Jan. 2010, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2009.08.015.
- [11] H. I. Gomes, "Phytoremediation for bioenergy: challenges and opportunities," *Environ. Technol. Rev.*, vol. 1, no. 1, pp. 59–66, 2012, doi: 10.1080/09593330.2012.696715.
- [12] "Progress in management of contaminated sites — European Environment Agency." <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites-3/assessment> (accessed Sep. 07, 2021).
- [13] J. Barceló and C. Poschenrieder, "Phytoremediation: principles and perspectives," *Contrib. to Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 333–344, 2003, doi: 10.2436/cs.v0i0.310.
- [14] H. Yu, W. Xiao, L. Han, and G. Huang, "Characterization of mechanical pulverization/phosphoric acid pretreatment of corn stover for enzymatic hydrolysis," *Bioresour. Technol.*, vol. 282, pp. 69–74, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2019.02.104.
- [15] D. Houben, L. Evrard, and P. Sonnet, "Beneficial effects of biochar application to

- contaminated soils on the bioavailability of Cd, Pb and Zn and the biomass production of rapeseed (*Brassica napus* L.),” *Biomass and Bioenergy*, vol. 57, pp. 196–204, Oct. 2013, doi: 10.1016/J.BIOMBIOE.2013.07.019.
- [16] X. Zhu *et al.*, “Inherent Metals of a Phytoremediation Plant Influence Its Recyclability by Hydrothermal Liquefaction,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 53, no. 11, pp. 6580–6586, 2019, doi: 10.1021/acs.est.9b00262.
- [17] A. N. Anoopkumar *et al.*, “Phytoextraction of Heavy Metals,” pp. 267–276, 2020, doi: 10.1007/978-3-030-48985-4_12.
- [18] B. Baştalık, E. Gödekmerdan, and G. Koçar, “A holistic approach to soil contamination and sustainable phytoremediation with energy crops in the Aegean Region of Turkey,” *Chemosphere*, vol. 276, p. 130192, Aug. 2021, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.130192.
- [19] S. Van Slycken *et al.*, “Safe use of metal-contaminated agricultural land by cultivation of energy maize (*Zea mays*),” *Environ. Pollut.*, vol. 178, pp. 375–380, Jul. 2013, doi: 10.1016/J.ENVPOL.2013.03.032.
- [20] P. Dong, “Ethanol production from lignocellulosic biomass,” *Xiandai Huagong/Modern Chem. Ind.*, vol. 31, no. SUPPL. 2, pp. 40–44, Jun. 2011, doi: 10.5772/intechopen.86437.
- [21] J. Sheehan, “The road to bioethanol: A strategic perspective of the U.S. Department of Energy’s National Ethanol Program,” *ACS Symp. Ser.*, vol. 769, pp. 2–25, 2001, doi: 10.1021/BK-2001-0769.CH001.
- [22] T. T. A. Tran, T. K. P. Le, T. P. Mai, and D. Q. Nguyen, “Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass,” *Xiandai Huagong/Modern Chem. Ind.*, vol. 31, no. SUPPL. 2, pp. 40–44, Jun. 2019, doi: 10.5772/INTECHOPEN.86437.
- [23] J.-M. Lavoie, R. Beauchet, V. Berberic, and M. Chornet, “Biorefining Lignocellulosic Biomass via the Feedstock Impregnation Rapid and Sequential Steam Treatment,” *Biofuel’s Eng. Process Technol.*, Aug. 2011, doi: 10.5772/18186.
- [24] B. Wang, Y.-C. Sun, and R.-C. Sun, “Fractional and structural characterization of lignin and its modification as biosorbents for efficient removal of chromium from wastewater: a review,” *J. Leather Sci. Eng.*, vol. 1, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1186/S42825-019-0003-Y.
- [25] D. W. Templeton, A. D. Sluiter, T. K. Hayward, B. R. Hames, and S. R. Thomas, “Assessing corn stover composition and sources of variability via NIRS,” *Cellulose*, vol. 16, no. 4, pp. 621–639, 2009, doi: 10.1007/s10570-009-9325-x.
- [26] L. O. Pordesimo, B. R. Hames, S. Sokhansanj, and W. C. Edens, “Variation in corn stover composition and energy content with crop maturity,” *Biomass and Bioenergy*, vol. 28, no. 4, pp. 366–374, Apr. 2005, doi: 10.1016/J.BIOMBIOE.2004.09.003.
- [27] X. Philip Ye, L. Liu, D. Hayes, A. Womac, K. Hong, and S. Sokhansanj, “Fast classification and compositional analysis of cornstover fractions using Fourier transform near-infrared techniques,” *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 15, pp. 7323–7332, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.biortech.2007.12.063.
- [28] “Bioethanol – European Biomass Industry Association.” <https://www.eubia.org/cms/wiki-biomass/biofuels/bioethanol/> (accessed Aug. 09, 2021).
- [29] S. Krishnan *et al.*, “Bioethanol production from lignocellulosic biomass (water hyacinth): a biofuel alternative,” *Bioreactors*, pp. 123–143, Jan. 2020, doi: 10.1016/B978-0-12-821264-6.00009-7.
- [30] I. Kim, Y. H. Seo, G. Y. Kim, and J. I. Han, “Co-production of bioethanol and biodiesel from corn stover pretreated with nitric acid,” *Fuel*, vol. 143, pp. 285–

- 289, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.fuel.2014.11.031.
- [31] M. M. Roy, W. Wang, and J. Bujold, "Biodiesel production and comparison of emissions of a DI diesel engine fueled by biodiesel-diesel and canola oil-diesel blends at high idling operations," *Appl. Energy*, vol. 106, pp. 198–208, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.apenergy.2013.01.057.
- [32] A. Y. Krylova, E. A. Kozyukov, and A. L. Lapidus, "Ethanol and diesel fuel from plant raw materials: A review," *Solid Fuel Chem.*, vol. 42, no. 6, pp. 358–364, Dec. 2008, doi: 10.3103/S0361521908060062.
- [33] H. B. Aditiya, T. M. I. Mahlia, W. T. Chong, H. Nur, and A. H. Sebayang, "Second generation bioethanol production: A critical review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 66, pp. 631–653, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.RSER.2016.07.015.
- [34] C. S. Wibowo, B. Sugiarto, A. Zikra, A. Budi, T. Mulya, and Maymuchar, "The Effect of Gasoline-Bioethanol Blends to The Value of Fuel's Octane Number," *E3S Web Conf.*, vol. 67, p. 02033, Nov. 2018, doi: 10.1051/E3SCONF/20186702033.
- [35] "Alternative Fuels Data Center: Maps and Data - Global Ethanol Production by Country or Region." <https://afdc.energy.gov/data/10331> (accessed Oct. 08, 2021).
- [36] "Annual Ethanol Production." <https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production> (accessed Oct. 08, 2021).
- [37] "Associação Portuguesa de Produtores de Biocombustíveis." <https://appb.pt/> (accessed Sep. 19, 2021).
- [38] B. Sharma, C. Larroche, and C. G. Dussap, "Comprehensive assessment of 2G bioethanol production," *Bioresour. Technol.*, vol. 313, p. 123630, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2020.123630.
- [39] J. D. McMillan, "Bioethanol production: Status and prospects," *Renew. Energy*, vol. 10, no. 2–3, pp. 295–302, Feb. 1997, doi: 10.1016/0960-1481(96)00081-X.
- [40] J. Li, H. Zhang, M. Lu, and L. Han, "Comparison and intrinsic correlation analysis based on composition, microstructure and enzymatic hydrolysis of corn stover after different types of pretreatments," *Bioresour. Technol.*, vol. 293, p. 122016, Dec. 2019, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2019.122016.
- [41] N. Sarkar, S. K. Ghosh, S. Bannerjee, and K. Aikat, "Bioethanol production from agricultural wastes: An overview," *Renew. Energy*, vol. 37, no. 1, pp. 19–27, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.RENENE.2011.06.045.
- [42] P. Li *et al.*, "Effect of acid pretreatment on different parts of corn stalk for second generation ethanol production," *Bioresour. Technol.*, vol. 206, pp. 86–92, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2016.01.077.
- [43] T. Y. Nguyen, C. M. Cai, O. Osman, R. Kumar, and C. E. Wyman, "CELf pretreatment of corn stover boosts ethanol titers and yields from high solids SSF with low enzyme loadings," *Green Chem.*, vol. 18, no. 6, pp. 1581–1589, Mar. 2016, doi: 10.1039/c5gc01977j.
- [44] X. Gao *et al.*, "Comparison of enzymatic reactivity of corn stover solids prepared by dilute acid, AFEXTM, and ionic liquid pretreatments," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, May 2014, doi: 10.1186/1754-6834-7-71.
- [45] C. Tai and D. Keshwani, "Impact of pretreatment with dilute sulfuric acid under moderate temperature on hydrolysis of corn stover with two enzyme systems," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 172, no. 5, pp. 2628–2639, Jan. 2014, doi: 10.1007/s12010-013-0721-1.
- [46] S. Paramasivan, S. Sankar, R. Senthil Velavan, T. Krishnakumar, R. S. I. Batcha, and K. S. Muthuvelu, "Assessing the potential of lignocellulosic energy crops as an

- alternative resource for bioethanol production using ultrasound assisted dilute acid pretreatment,” *Mater. Today Proc.*, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.matpr.2020.12.470.
- [47] Y. Song, Y. Gyo Lee, E. Jin Cho, and H. J. Bae, “Production of xylose, xylulose, xylitol, and bioethanol from waste bamboo using hydrogen peroxide-acetic acid pretreatment,” *Fuel*, vol. 278, p. 118247, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.fuel.2020.118247.
- [48] G. Beldman, J. Hennekam, and A. G. J. Voragen, “Enzymatic Hydrolysis of Beer Brewers’ Spent Grain and the Influence of Pretreatments,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 30, pp. 668–671, 1987, doi: 10.1021/ja01348a044.
- [49] R. G. Candido, G. G. Godoy, and A. R. Gonçalves, “Study of sugarcane bagasse pretreatment with sulfuric acid as a step of cellulose obtaining,” *Eng. Technol.*, vol. 61, pp. 101–105, 2012.
- [50] M. Han, Y. Kim, Y. Kim, B. Chung, and G.-W. Choi, “Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem,” *Korean J. Chem. Eng.*, vol. 28, no. 1, pp. 119–125, 2011, doi: 10.1007/s11814-010-0330-4.
- [51] S. Sivamani and R. Baskar, “Bioconversion of cassava stem to ethanol: oxalic acid pretreatment and co-culture fermentation,” *Biofuels*, vol. 9, no. 5, pp. 559–566, Sep. 2018, doi: 10.1080/17597269.2018.1432271.
- [52] S. Ferreira, A. P. Duarte, M. H. L. Ribeiro, J. A. Queiroz, and F. C. Domingues, “Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 45, no. 3, pp. 192–200, Aug. 2009, doi: 10.1016/J.BEJ.2009.03.012.
- [53] O. Sahu, “Appropriateness of rose (*Rosa hybrida*) for bioethanol conversion with enzymatic hydrolysis: Sustainable development on green fuel production,” *Energy*, vol. 232, p. 120922, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.energy.2021.120922.
- [54] Z. Wang *et al.*, “Enhancing enzymatic hydrolysis of corn stover by twin-screw extrusion pretreatment,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 143, p. 111960, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111960.
- [55] Zahoor *et al.*, “Mild Urea/KOH pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of corn stover with liquid waste recovery for plant growth,” *J. Clean. Prod.*, vol. 284, p. 125392, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.jclepro.2020.125392.
- [56] J. Li, D. Liu, M. Zhang, H. Huang, and D. Wang, “Enzymatic hydrolysis and fermentation of corn stover liquor from magnesium oxide pretreatment without detoxification,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 140, p. 111728, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111728.
- [57] C. Xu *et al.*, “Mechanisms of bio-additives on boosting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass,” *Bioresour. Technol.*, vol. 337, p. 125341, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2021.125341.
- [58] H. Yu *et al.*, “Fractionation of corn stover for efficient enzymatic hydrolysis and producing platform chemical using p-toluenesulfonic acid/water pretreatment,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 145, p. 111961, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111961.
- [59] E. Demiray, A. Kut, S. Ertuğrul Karatay, and G. Dönmez, “Usage of soluble soy protein on enzymatically hydrolysis of apple pomace for cost-efficient bioethanol production,” *Fuel*, vol. 289, p. 119785, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.fuel.2020.119785.
- [60] A. Nag, *Biofuels refining and performance*. 2008.
- [61] H. Chen and X. Fu, “Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 57, pp. 468–478, May

- 2016, doi: 10.1016/J.RSER.2015.12.069.
- [62] A. Nag, *Biofuels Refining and Performance*, no. 1. 2014.
- [63] M. Kuyper, M. J. Toirkens, J. A. Diderich, A. A. Winkler, J. P. Van Dijken, and J. T. Pronk, "Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain," *FEMS Yeast Res.*, vol. 5, no. 10, pp. 925–934, Jul. 2005, doi: 10.1016/J.FEMSYR.2005.04.004.
- [64] L. Davis, Y. J. Jeon, C. Svenson, P. Rogers, J. Pearce, and P. Peiris, "Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zymomonas mobilis*," *Biomass and Bioenergy*, vol. 29, no. 1, pp. 49–59, Jul. 2005, doi: 10.1016/J.BIOMBIOE.2005.02.006.
- [65] N. N. Nichols, R. E. Hector, B. C. Saha, S. E. Frazer, and G. J. Kennedy, "Biological abatement of inhibitors in rice hull hydrolyzate and fermentation to ethanol using conventional and engineered microbes," *Biomass and Bioenergy*, vol. 67, pp. 79–88, Aug. 2014, doi: 10.1016/J.BIOMBIOE.2014.04.026.
- [66] M. Balat, H. Balat, and C. Öz, "Progress in bioethanol processing," *Prog. Energy Combust. Sci.*, vol. 34, no. 5, pp. 551–573, Oct. 2008, doi: 10.1016/J.PECS.2007.11.001.
- [67] Y. Sun and J. Cheng, "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review," *Bioresour. Technol.*, vol. 83, no. 1, pp. 1–11, May 2002, doi: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7.
- [68] S. Kumar, N. Singh, and R. Prasad, "Anhydrous ethanol: A renewable source of energy," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 7, pp. 1830–1844, Sep. 2010, doi: 10.1016/J.RSER.2010.03.015.
- [69] G. Bustos, J. A. Ramírez, G. Garrote, and M. Vázquez, "Modeling of the Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse with Hydrochloric Acid," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 104, 2003.
- [70] W. Z. Li *et al.*, "Studies of monosaccharide production through lignocellulosic waste hydrolysis using double acids," *Energy and Fuels*, vol. 22, no. 3, pp. 2015–2021, 2008, doi: 10.1021/ef700762h.
- [71] J. Y. Lee, H. J. Ryu, and K. K. Oh, "Acid-catalyzed hydrothermal severity on the fractionation of agricultural residues for xylose-rich hydrolyzates," *Bioresour. Technol.*, vol. 132, pp. 84–90, Mar. 2013, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2013.01.019.
- [72] M. H. Santos, "Produção de bioetanol a partir de resíduos de plantas usadas em fitorremediação de solos contaminados com metais pesados," 2019.
- [73] P. Reis, "Produção de Açúcares para Bioetanol a partir da Palha de Milho de Fitorremediação de Solos," 2020.
- [74] S. Larsson *et al.*, "The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 24, no. 3–4, pp. 151–159, Feb. 1999, doi: 10.1016/S0141-0229(98)00101-X.

6.1 Normas

ISO 18134-3:2015, *Solid biofuels - Determination of moisture content - Oven dry method- Part 3: Moisture in general analysis sample*

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

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

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

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

6.2 Legislação

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

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

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

Decreto-Lei n.º 8/2021 de 20 de janeiro. *Diário da República n.º 13/2021, Série I de 2021-01-20*
Presidência do Conselho de Ministros

ANEXOS

7.1 ANEXO 1

7.2 ANEXO 2

7 ANEXOS

7.1 Anexo 1 – Concentrações dos compostos nas amostras do pré-tratamento

Tabela 15-Concentração (em g/L) de todos os compostos nas amostras de pré-tratamento (onde C corresponde às amostras da biomassa de controlo, E às de Estarreja e P às de Panasqueira)

Ensaio	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido acético	Etanol	Soma açúcar
C1	1,933	3,327	0,065	0,210	0,017	5,325
E1	1,912	2,784	0,063	0,056	0,000	4,759
P1	1,597	2,123	0,043	0,137	0,000	3,763
C2	2,005	3,560	0,345	0,281	0,002	5,910
E2	1,722	2,466	0,261	0,196	0,000	4,449
P2	1,658	2,505	0,274	0,212	0,009	4,437
C3	1,968	3,669	0,339	0,341	0,001	5,976
E3	1,777	2,571	0,303	0,206	0,000	4,651
P3	1,697	2,613	0,234	0,261	0,000	4,544
C4	1,921	3,842	0,689	0,753	0,007	6,452
E4	1,675	2,388	0,511	0,415	0,000	4,574
P4	1,453	2,400	0,618	0,383	0,000	4,471
C5	2,483	5,111	1,596	0,464	0,014	9,190
E5	1,847	2,734	0,601	0,310	0,023	5,182
P5	1,467	2,473	0,599	0,300	0,018	4,539
C6	2,002	5,901	1,787	0,946	0,000	9,690
E6	1,757	2,926	0,652	0,696	0,000	5,335
P6	1,476	3,293	0,748	0,559	0,000	5,517
C7	3,388	7,647	2,260	1,024	0,010	13,295
E7	1,824	3,125	0,689	0,842	0,000	5,638
P7	1,564	3,528	0,679	0,576	0,000	5,771
C8	3,168	9,278	2,026	1,155	0,000	14,472
E8	1,875	5,775	0,918	1,428	0,000	8,568
P8	1,758	7,263	0,844	0,895	0,000	9,865
C9	1,601	3,079	0,154	0,257	0,016	4,834
E9	1,724	2,740	0,162	0,199	0,000	4,626
P9	1,653	3,206	0,210	0,197	0,000	5,069
C10	1,854	6,997	1,000	1,241	0,000	9,851
E10	1,658	4,833	0,760	0,698	0,000	7,251
P10	1,858	6,709	0,955	1,101	0,000	9,522
C11	1,261	2,431	0,134	0,117	0,000	3,826
E11	1,670	2,492	0,114	0,123	0,000	4,276
P11	1,825	3,326	0,081	0,118	0,000	5,232
C12	2,223	4,567	0,988	1,004	0,009	7,778
E12	1,603	2,704	0,585	0,702	0,000	4,892
P12	1,582	3,330	0,620	0,728	0,000	5,532
C13	1,787	3,559	0,176	0,109	0,000	5,522
E13	1,825	2,663	0,106	0,085	0,000	4,594
P13	1,380	2,727	0,041	0,123	0,000	4,148
C14	3,379	4,557	0,867	0,492	0,000	8,803
E14	1,603	2,745	0,610	0,662	0,000	4,958
P14	1,672	3,772	0,681	0,851	0,013	6,125
C15	2,918	4,562	0,849	0,593	0,000	8,329
E15	1,124	1,653	0,328	0,329	0,000	3,105
P15	1,606	3,137	0,477	0,565	0,000	5,220
C16	2,887	4,484	0,879	0,593	0,000	8,250
E16	1,648	2,607	0,529	0,414	0,000	4,784
P16	1,456	2,140	0,533	0,480	0,000	4,129
C17	2,887	4,495	0,806	0,641	0,000	8,188
E17	1,533	2,313	0,427	0,372	0,000	4,273
P17	1,594	3,244	0,556	0,579	0,023	5,394

7.2 Anexo 2 – Cromatograma de uma amostra do pré-tratamento

<Chromatogram>

mV

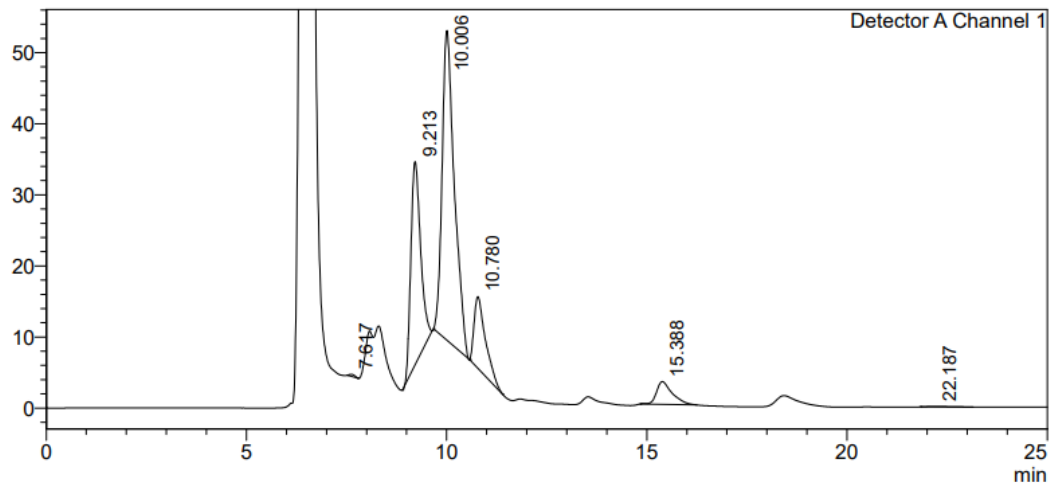


Figura 22-Cromatograma de uma amostra do pré-tratamento

7.3 Anexo 3 – ANOVA for quadratic model e Fit statistics (pré-tratamento Controlo)

Response 1: SA

Tabela 16-ANOVA for quadratic model (pré-tratamento Controlo)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	108,17	9	12,02	3,83	0,0452	significant
A-T	72,29	1	72,29	23,05	0,0020	
B-t	20,49	1	20,49	6,53	0,0378	
C-CA	4,99	1	4,99	1,59	0,2475	
AB	7,40	1	7,40	2,36	0,1684	
AC	0,0474	1	0,0474	0,0151	0,9056	
BC	0,0403	1	0,0403	0,0129	0,9129	
A ²	0,2389	1	0,2389	0,0762	0,7905	
B ²	1,80	1	1,80	0,5725	0,4740	
C ²	0,0757	1	0,0757	0,0241	0,8810	
Residual	21,95	7	3,14			
Lack of Fit	21,94	5	4,39	878,74	0,0011	significant
Pure Error	0,0100	2	0,0050			
Cor Total	130,12	16				

Tabela 17-Fit statistics (pré-tratamento Controlo)

Std. Dev.	1,77	R²	0,8313
Mean	7,98	Adjusted R²	0,6144
C.V. %	22,19	Predicted R²	-0,2768
		Adeq Precision	6,2772

7.4 Anexo 4 – ANOVA for quadratic model e Fit statistics (pré-tratamento Estarreja)

Response 1: Soma açucares

Tabela 18-ANOVA for quadratic model (pré-tratamento Estarreja)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	21,08	9	2,34	5,66	0,0162	significant
A-Temperatura	8,39	1	8,39	20,29	0,0028	
B-Tempo	1,65	1	1,65	3,98	0,0862	
C-Concentração	0,8014	1	0,8014	1,94	0,2065	
AB	1,69	1	1,69	4,08	0,0833	
AC	1,51	1	1,51	3,64	0,0981	
BC	1,13	1	1,13	2,74	0,1419	
A ²	5,81	1	5,81	14,04	0,0072	
B ²	0,6428	1	0,6428	1,55	0,2526	
C ²	1,06	1	1,06	2,56	0,1534	
Residual	2,89	7	0,4136			
Lack of Fit	1,41	5	0,2827	0,3816	0,8334	not significant
Pure Error	1,48	2	0,7407			
Cor Total	23,97	16				

Tabela 19-Fit statistics (pré-tratamento Estarreja)

Std. Dev.	0,6431	R²	0,8792
Mean	5,05	Adjusted R²	0,7240
C.V. %	12,72	Predicted R²	0,3606
		Adeq Precision	7,9181

7.5 Anexo 5 – ANOVA for quadratic model e Fit statistics (pré-tratamento Panasqueira)

Response 1: Soma açucares

Tabela 20-ANOVA for quadratic model (pré-tratamento Panasqueira)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	40,74	9	4,53	5,24	0,0200	significant
A-Temperatura	18,67	1	18,67	21,60	0,0023	
B-Tempo	3,49	1	3,49	4,03	0,0846	
C-Concentração	5,93	1	5,93	6,86	0,0345	
AB	2,84	1	2,84	3,28	0,1128	
AC	2,50	1	2,50	2,89	0,1328	
BC	0,7015	1	0,7015	0,8118	0,3975	
A ²	5,53	1	5,53	6,40	0,0392	
B ²	0,0065	1	0,0065	0,0075	0,9334	
C ²	0,0445	1	0,0445	0,0515	0,8270	
Residual	6,05	7	0,8642			
Lack of Fit	5,11	5	1,02	2,17	0,3445	not significant
Pure Error	0,9403	2	0,4701			
Cor Total	46,79	16				

Tabela 21-Fit statistics (pré-tratamento Panasqueira)

Std. Dev.	0,9296	R²	0,8707
Mean	5,49	Adjusted R²	0,7045
C.V. %	16,94	Predicted R²	0,0637
		Adeq Precision	8,0383

7.6 Anexo 6 – Concentração dos compostos nas amostras de hidrólise

Tabela 22-Concentração (em g/L) de todos os compostos nas amostras de hidrólise (onde C corresponde às amostras da biomassa de controlo e P às de Panasqueira)

Ensaio	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido acético	Soma açucares
C1	4,854	7,136	1,125	1,292	13,115
P1	5,215	7,153	1,054	1,164	13,422
C2	6,794	6,645	1,025	1,231	14,464
P2	6,275	7,104	1,043	1,133	14,422
C3	6,350	6,280	0,985	1,193	13,615
P3	5,549	6,115	0,859	1,088	12,523
C4	6,978	6,605	0,981	1,183	14,564
P4	6,482	6,846	0,966	1,217	14,294
C5	7,368	7,436	1,168	1,277	15,972
P5	6,223	6,905	0,992	1,289	14,120
C6	7,723	7,534	1,154	1,137	16,411
P6	5,692	5,582	0,846	1,045	12,120
C7	8,170	7,975	1,186	1,515	17,331
P7	7,341	7,569	1,068	1,527	15,978
C8	7,522	6,884	1,025	1,030	15,431
P8	6,959	7,997	0,700	0,922	15,656
C9	4,732	8,044	1,068	1,276	13,844
P9	4,200	6,983	0,876	1,047	12,059
C10	7,398	7,214	1,048	1,166	15,660
P10	7,438	7,008	1,120	1,230	15,566
C11	5,782	8,101	1,152	1,217	15,035
P11	6,045	8,104	1,072	1,222	15,221
C12	7,395	7,568	0,985	1,289	15,948
P12	7,914	8,414	1,070	1,497	17,398
C13	4,471	7,017	0,953	1,186	12,441
P13	5,343	7,832	0,958	1,262	14,133
C14	6,990	9,015	1,263	1,595	17,268
P14	5,398	7,194	0,946	1,214	13,538
C15	7,404	7,644	1,002	1,191	16,050
P15	7,727	8,249	1,061	1,317	17,037
C16	7,125	6,737	0,892	1,168	14,754
P16	7,643	8,217	1,085	1,364	16,945
C17	7,658	7,995	1,041	1,396	16,694
P17	7,973	8,564	1,086	1,395	17,623

7.7 Anexo 7 - Cromatograma de uma amostra da hidrólise

<Chromatogram>

mV

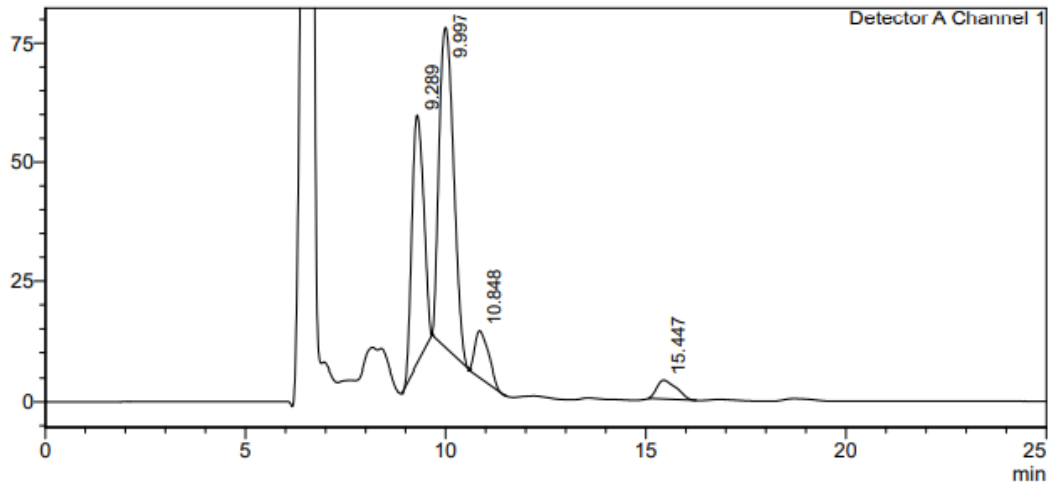


Figura 23-Cromatograma de uma amostra da hidrólise

7.8 Anexo 8 - ANOVA for quadratic model e Fit statistics (hidrólise Controlo)

Response 1: Soma Açúcares

Tabela 23-ANOVA for quadratic model (hidrólise Controlo)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	28,74	9	3,19	6,57	0,0107	significant
A-Tempo	1,11	1	1,11	2,28	0,1748	
B-Enzima	0,4630	1	0,4630	0,9521	0,3617	
C-Temperatura	22,44	1	22,44	46,14	0,0003	
AB	0,9378	1	0,9378	1,93	0,2075	
AC	1,77	1	1,77	3,63	0,0984	
BC	0,0061	1	0,0061	0,0126	0,9139	
A ²	1,41	1	1,41	2,90	0,1325	
B ²	0,0955	1	0,0955	0,1964	0,6710	
C ²	1,13	1	1,13	2,33	0,1705	
Residual	3,40	7	0,4863			
Lack of Fit	1,45	5	0,2902	0,2973	0,8813	not significant
Pure Error	1,95	2	0,9763			
Cor Total	32,14	16				

Tabela 24-Fit statistics (hidrólise Controlo)

Std. Dev.	0,6973	R²	0,8941
Mean	15,21	Adjusted R²	0,7579
C.V. %	4,58	Predicted R²	0,4976
		Adeq Precision	8,6231

7.9 Anexo 9 - ANOVA for quadratic model e Fit statistics (hidrólise Panasqueira)

Response 1: Soma Açúcares

Tabela 25-ANOVA for quadratic model (hidrólise Panasqueira)

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	46,54	9	5,17	6,79	0,0097	significant
A-Tempo	2,95	1	2,95	3,87	0,0898	
B-Enzima	4,72	1	4,72	6,19	0,0417	
C-Temperatura	0,3584	1	0,3584	0,4704	0,5149	
AB	0,7497	1	0,7497	0,9840	0,3543	
AC	3,24	1	3,24	4,26	0,0780	
BC	5,15	1	5,15	6,76	0,0354	
A ²	18,87	1	18,87	24,77	0,0016	
B ²	1,91	1	1,91	2,50	0,1578	
C ²	18,64	1	18,64	24,46	0,0017	
Residual	5,33	7	0,7619			
Lack of Fit	5,06	5	1,01	7,49	0,1220	not significant
Pure Error	0,2705	2	0,1353			
Cor Total	51,87	16				

Tabela 26-Fit statistics (hidrólise Panasqueira)

Std. Dev.	0,8729	R²	0,8972
Mean	14,83	Adjusted R²	0,7650
C.V. %	5,89	Predicted R²	0,2438
		Adeq Precision	7,1327