



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

**Libertação de açúcares da *Cytisus striatus*  
através de um complexo enzimático: otimização  
do pré-tratamento ao sulfito**

**Tânia Raquel Pereira Gomes**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Química Industrial**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Rogério Manuel dos Santos Simões  
Co-orientador: Prof. Doutor Álvaro Frederico Campos Vaz

**Covilhã, Outubro de 2014**



# Agradecimentos

A concretização deste trabalho e o longo caminho até aqui conquistado foi conseguido com a ajuda, força, amizade, generosidade, carinho, paciência de familiares e de amigos.

Em primeiro lugar, o meu enorme Obrigado aos meus pais pela força, pelo esforço e luta que tiveram para que nunca me faltasse nada, pois sem eles era impossível chegar até aqui.

Agradeço ao meu irmão e ao meu namorado pela muita paciência e carinho que tiveram comigo durante todo este percurso.

Também um agradecimento a todos os meus amigos, que foram importantes nesta viagem académica, pela ajuda, força, amizade e sempre boa disposição.

Um agradecimento especial à Vera Costa por toda ajuda e paciência para a realização deste trabalho e, também a todas as pessoas e amigos que me acompanharam no laboratório durante este período de tempo.

Agradeço ao orientador deste projeto, Prof. Doutor Rogério Simões, por toda a orientação, pela responsabilidade, boa disposição e por sempre me ter ajudado, aconselhado e transmitido todo o conhecimento acerca do assunto estudado. E, para finalizar um agradecimento ao Prof. Doutor Álvaro Vaz pela orientação e ajuda a nível gráfica no tratamento dos resultados.

A todos, o meu muito Obrigado....



## Resumo

A biomassa da espécie *Cystisus striatus* foi triturada e submetida a diferentes condições de reação, de acordo com um plano experimental do tipo  $2^4$  fatorial + estrela (*central composite Design*  $2^4$  + star), explorando as seguintes variáveis: carga de hidrogenossulfito de sódio 0-4%, carga de ácido sulfúrico 0-3%, (relativamente à massa de madeira), temperatura máxima (150-190 °C) e tempo a temperatura máxima (0-30 minutos). Após o pré-tratamento, o hidrolisado foi recuperado e o resíduo sólido foi mecanicamente desintegrado e posteriormente submetido a hidrólise enzimática com um cocktail enzimática da Novozymes®. Os açúcares e subprodutos libertados no pré-tratamento ao sulfito e os hidrolisados do tratamento enzimáticos foram analisados por HPLC. A percentagem de material libertado no hidrolisado ácido variou entre 7 e 29,1%. De acordo com o plano experimental do tipo  $2^4$  fatorial + estrela (*central composite Design*  $2^4$  + star), todas variáveis testadas afetam a estrutura da biomassa, no entanto é a temperatura e a carga de ácido sulfúrico que apresentam maior efeito. Os produtos inibidores formados representam menos de 0,9% da massa da madeira original, mesmo para as condições de reação mais severas. A hidrólise enzimática dos resíduos sólidos resultou em conversões de polissacarídeos na gama de 5,99 a 68,87%, dependendo das condições de reação aplicadas à biomassa no pré-tratamento com sulfito de sódio e ácido sulfúrico. A velocidade de libertação de açúcar provou ser rápido no início, diminuindo gradualmente com o tempo de contato, até que se anula. A análise dos dados experimentais utilizando Statgraphics® Plus 5 permite-nos concluir que todas as variáveis do estudo influenciam esta fase do processo, principalmente a temperatura e a carga de ácido sulfúrico.

## Palavras-chave

Pré-tratamento ao sulfito, biomassa, libertação de açúcares, cocktail enzimático, *Cytisus striatus*



# Abstract

*Cystisus striatus* wood branches were transformed in chips and submitted to different reaction conditions, according to an experimental design plan with factor  $2^4 + \text{star}$  (central composite design  $2^4 + \text{star}$ ), exploring the following variables: sulfuric acid charge (0-3%, on wood), sodium bisulfite charge (0-4 %, on wood), maximum temperature (150-190°C), and time at maximum temperature (0-30 minutes). After the pretreatment, the acid hydrolysates were recovered and the solid residues were mechanically disintegrated and thereafter subjected to enzymatic hydrolysis with an enzymatic cocktail from Novozymes®. Sugars and by-products released in the sulfite pretreatment and enzymatic treatment hydrolysates were analyzed by HPLC. The percentage of material released in the acid hydrolysates was between 7 and 29.1%. According to the experimental design of the type  $2^4 + \text{star}$  factor (Central Composite Design  $2^4 + \text{star}$ ) all tested variables affect the structure of the biomass, however, the temperature and the load of sulfuric acid are the most important. The formed inhibition products represent less than 0.9% of the mass of the original wood, even for the most severe reaction conditions. Enzymatic hydrolysis of polysaccharides on solid residues resulted in conversions in the range from 5.99 to 68.87%, depending on the reaction conditions used in biomass pretreatment with sulfite and sulfuric acid. The release rate of sugars proved to be fast at the beginning, gradually decreasing with contact time, until it is canceled. The analysis of the experimental data using Statgraphics®Plus5 enables us to conclude that all study variables influence this phase of the process, especially the temperature and the load of sulfuric acid.

## Keywords

Acid sulfite pretreatment, biomass, sugar liberation, enzymatic cocktail, *Cystisus striatus*



# Índice

Capítulo I - Introdução	1
Capítulo II - Revisão Bibliográfica	3
II - 1 Biocombustíveis	3
II - 1.1 Bioetanol	5
II - 1.1.1 Propriedades do bioetanol	5
II - 2 Biomassa	7
II - 2.1 Composição química e principais reações dos componentes da biomassa vegetal	8
II - 2.1.1 Componentes macromoleculares	10
II - 2.1.1.1 Celulose	10
II - 2.1.1.1.1 Degradação da celulose	13
II - 2.1.1.2 Hemiceluloses	14
II - 2.1.1.2.1 Degradação das hemiceluloses	16
II - 2.1.1.3 Lenhina	16
II - 2.1.1.3.1 Reações da Lenhina	18
II - 2.1.2 Componentes de baixo peso molecular	19
II - 2.1.2.1 Extratáveis	19
II - 2.1.2.2 Cinzas	20
II - 2.2 Recalcitrância da biomassa	20
II - 3 Pré-tratamento do material lenhocelulósico	22
II - 3.1 Requisitos de pré-tratamento eficiente	24
II - 3.2 Pré-tratamentos físicos	26
II - 3.2.1 Trituração mecânica	26
II - 3.2.2 Extrusão	26
II - 3.3 Pré-tratamentos químicos	27
II - 3.3.1 Ácido	27
II - 3.3.2 Alcalino	28
II - 3.3.3 <i>Organosolv</i>	29
II - 3.3.4 Ozonólise	29
II - 3.4 Pré-tratamentos físico-químico	30
II - 3.4.1 SPORL	30
II - 3.4.2 Steam explosion	32
II - 3.4.3 Pirólise	33
II - 3.4.4 AFEX	33
II - 3.4.5 <i>Liquid hot water</i>	34
II - 3.5 Pré-tratamento biológico	35

II - 4 Hidrólise do material lenhocelulósico	36
II - 4.1 Hidrólise química	36
II - 4.2 Hidrólise enzimática	37
II - 4.2.1 Mecanismo de hidrólise das celulasas	37
II - 4.2.2 Fatores que afetam a hidrólise enzimática	39
II - 4.2.2.1 Substrato	39
II - 4.2.2.2 Celulasas	40
II - 4.2.2.3 Condições de reação	41
II - 5 Fermentação	42
II - 5.1 Configuração das etapas do processo de produção de bioetanol	42
Capítulo III - Parte Experimental	45
III - 1 Materiais e Reagentes	45
III - 1.1 Matéria-prima	45
III - 1.2 Material de Laboratório	46
III - 1.3 Reagentes	46
III - 1.4 Complexo enzimático	48
III - 2 Procedimentos experimentais	49
III - 2.1 Preparação da matéria-prima	49
III - 2.2 Pré-tratamento ao Sulfito	49
III - 2.3 Hidrólise enzimática	51
III - 3 Métodos Analíticos	52
III - 3.1 Determinação do teor de matéria seca	52
III - 3.2 Quantificação da lenhina solúvel	52
III - 3.3 Determinação do Índice Kappa	53
III - 3.4 HPLC	54
III - 3.4.1 Determinação dos açúcares no HPLC	55
III - 3.5 Microscópio ótico	56
Capítulo IV - Resultados e Discussão	57
IV - 1 Análise do pré-tratamento ao sulfito	58
IV - 2 Efeito da hidrólise enzimática	73
IV - 2.1 Efeito da hidrólise enzimática na morfologia	78
Capítulo V - Conclusão e perspectivas de trabalho futuro	81
Referências Bibliográficas	83
Normas consultadas para este trabalho	88
Anexos	89

# Lista de Figuras

- Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de CO<sub>2</sub> na utilização de biocombustíveis.
- Figura 2 - Diferentes tipos de biomassa.
- Figura 3 - Composição química qualitativa da madeira.
- Figura 4 - Estrutura da celulose e a sua unidade estrutural, a celobiose.
- Figura 5 - Estrutura da biomassa lenhocelulósica.
- Figura 6 - Estrutura dos monossacáridos constituintes das hemiceluloses pentose, hexoses, ácidos hexurónicos e deoxi-hexoses.
- Figura 7 - Representação esquemática das xilanas.
- Figura 8 - Estrutura dos álcoois precursores da lenhina.
- Figura 9 - Fragmento da estrutura da lenhina.
- Figura 10 - Representação esquemática da produção de etanol a partir de material lenhocelulósico.
- Figura 11 - Efeito do pré-tratamento na estrutura do material lenhocelulósico.
- Figura 12 - Diagrama esquemática do processo SPORL completado com a fermentação dos açúcares a etanol.
- Figura 13 - Percurso do tempo típico de hidrólise enzimática da celulose.
- Figura 14 - Mecanismo da hidrólise enzimática de celulose.
- Figura 15 - Esquema geral do processo para a produção de etanol a partir da biomassa lenhocelulósica, incluindo as opções de interação de processos.
- Figura 16 - A) *Cytisus striatus* em floração; B) Flor; C) Fruto.
- Figura 17 - Ramos de giesta amarela cortados (a) e giesta triturada (b).
- Figura 18 - Kit de enzimas etanol celulósico da novozymes®.
- Figura 19 - Crivo com abertura de 10 mm.
- Figura 20 - Banho termostatizado de PEG 400 (a) e reatores de aço inox de 200 mL (b).
- Figura 21 - Ilustração do procedimento da hidrólise enzimática.
- Figura 22 - Representação esquemática do equipamento HPLC.
- Figura 23 - Retas de calibração obtidas para a glucose (a), celobiose (b), xilose (c) e ácido acético (d) com caudal 0,4 mL/min.
- Figura 24 - Efeito da temperatura sobre o resíduo sólido, mantendo as cargas NaHSO<sub>3</sub> = 2%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 1,5 % e tempo T<sub>max</sub> = 0 min.
- Figura 25 - Variação do teor dos açúcares e dos produtos de degradação libertados em função da temperatura, mantendo as cargas NaHSO<sub>3</sub> = 2%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 1,5% e tempo T<sub>max</sub>= 0 minutos.
- Figura 26 - Efeito da temperatura sobre o resíduo sólido, mantendo as cargas NaHSO<sub>3</sub> = 3%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 2,25 % e tempo T<sub>max</sub> = 7.5 min.

- Figura 27 - Variação do teor dos açúcares e dos produtos de degradação libertados em função da temperatura, mantendo as cargas  $\text{NaHSO}_3 = 3\%$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4 = 2,25\%$  e tempo  $T_{\text{max}} = 7.5$  minutos.
- Figura 28 - Resíduo sólido em função das cargas, mantendo a carga de  $\text{H}_2\text{SO}_4 = 1.5\%$ ,  $T_{\text{max}} = 170^\circ\text{C}$  e tempo  $T_{\text{max}} = 15$  min.
- Figura 29 - Variação do teor dos açúcares e dos produtos de degradação libertados em função das cargas, mantendo a carga de  $\text{H}_2\text{SO}_4 = 1.5\%$  e tempo  $T_{\text{max}} = 15$  minutos.
- Figura 30 - Efeito da carga de ácido sulfúrico sobre o resíduo sólido, mantendo a carga de  $\text{NaHSO}_3 = 2\%$ ,  $T_{\text{max}} = 170^\circ\text{C}$  e tempo a  $T_{\text{max}} = 15$  minutos.
- Figura 31 - Variação do teor dos açúcares e dos produtos de degradação libertados em função das cargas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , mantendo a carga de  $\text{NaHSO}_3 = 2\%$ ,  $T_{\text{max}} = 170^\circ\text{C}$  e tempo a  $T_{\text{max}} = 15$  minutos.
- Figura 32 - Efeito padronizado (a) e a superfície de resposta dos fatores (b) para a variável Glucose.
- Figura 33 - Efeito padronizado (a), a superfície de resposta dos fatores (b) e os resíduos (c) para a variável XMG.
- Figura 34 - Efeito padronizado (a) e a superfície de resposta dos fatores (b) para a variável produtos de degradação.
- Figura 35 - Efeito padronizado (a) e a superfície de resposta dos fatores (b) para o variável ácido acético.
- Figura 36 - Efeito padronizado (a) e a superfície de resposta dos fatores (b) para a variável “Subtotal”.
- Figura 37 - Rendimento total de hidratos de carbono na hidrólise enzimática da madeira pré-tratada em condições químicas suaves.
- Figura 38 - Rendimento total de hidratos de carbono na hidrólise enzimática da madeira pré-tratada em condições químicas severas.
- Figura 39 - Rendimento total de hidratos de carbono na hidrólise enzimática da madeira pré-tratada (influência do hidrogenossulfito).
- Figura 40 - Rendimento total de hidratos de carbono na hidrólise enzimática da madeira pré-tratada (influência do ácido).
- Figura 41 - Efeito padronizado (a), a superfície de resposta dos fatores (b) e os resíduos (c) para a variável açúcares libertados.
- Figura 42 - Efeito da hidrólise enzimática na biomassa pré-tratada ao longo do tempo de hidrólise (07, 24, 96 horas).

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Propriedades do bioetanol e da gasolina.

Tabela 2 - Composição de diferentes tipos de biomassa lenhocelulósica.

Tabela 3 - Comparação entre os métodos de hidrólise ácido diluído e a ácido concentrado.

Tabela 4 - Reagentes utilizados neste trabalho.

Tabela 5 - Classificação das enzimas e as condições recomendadas.

Tabela 6 - Condições e composições do pré-tratamento ao sulfito (relação sólido:líquido aproximadamente 1:5).

Tabela 7 - Composição química da matéria-prima, giesta.

Tabela 8 - Balanço de massa do pré-tratamento ao sulfito.

Tabela 9 - Parâmetro dos modelos de ajuste produzidos pela Statgraphic® Plus5, para as diferentes respostas para o pré-tratamento.

Tabela 10 - Parâmetros dos modelos de ajuste pelo Statgraphic® Plus5, para a resposta 96 horas da hidrólise enzimática.



## Lista de Acrónimos

AFEX	Ammonia fiber explosion
CAS	Chemical Abstracts Service
CBP	Consolidated Bioprocessing
DMC	Direct Microbial Conversion
FPU	Filter paper unit
GEE	Gases de Efeito Estufa
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	High Performance/Pressure Liquid Chromatography
IR	Radiação infravermelha
ISO	International Organizations for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
NREL	National Renewable Energy Laboratory
PCI	Poder calorífico inferior
PEG	Polietilenoglicol
SHF	Separate Hydrolysis and Fermentation
SPORL	Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose
SSCF	Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation
SSF	Simultaneous Saccharification and Fermentation
TMS	Teor de matéria seca
TS	Sólidos totais
UV	Radiação ultravioleta



# Capítulo I - Introdução

Atualmente, um dos maiores desafios para a sociedade é responder de forma sustentável à grande procura de energia para transportes, aquecimento e processos industriais [1]. Desde a origem da Humanidade que existe a dependência do uso de energia para a confecção de alimentos, aquecimento, e mais recentemente, com a evolução da tecnologia, para os transportes de mercadorias e pessoas, bem como para a indústria. O Homem foi recorrendo a diferentes tipos de energia de acordo com as suas necessidades, em função das descobertas e dos avanços tecnológicos que ia alcançando. O crescimento da população, por um lado, e a melhoria da qualidade de vida das sociedades modernas, por outro, conduziu a um consumo exponencial de energia [2, 3]. A industrialização e a motorização do mundo conduziram a um aumento acentuado da procura de combustíveis derivados do petróleo [4].

O petróleo é cada vez mais um escasso e a sua exploração cada vez mais dispendiosa. Por outro lado, a sua utilização liberta para a atmosfera enormes quantidades de dióxido de carbono e outros gases que provocam efeito de estufa (GEE), que a natureza não é capaz de assimilar, o que está a provocar aumentos muito significativos da concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e outros GEE na atmosfera terrestre. Estas modificações estão a provocar alterações climáticas notórias, nomeadamente a elevação da temperatura média do planeta, o degelo de alguns glaciares, o aumento do nível médio da água do mar, e perda de biodiversidade, etc. [4, 5]. Por outro lado, o aumento do consumo deste combustível fóssil leva ao aumento do seu preço, o que afeta a economia mundial. Como consequência, foi necessário ir mais além, e unir esforços para investigar e desenvolver alternativas ao petróleo, que provoquem menores emissões de GEE; foi neste contexto que ganharam importância crescente as energias renováveis [2, 4]. A água, o vento, o sol, a biomassa, e o calor proveniente do interior terrestre podem designar-se como as fontes renováveis para a indústria de energia no futuro, sendo que a biomassa pode igualmente vir a representar uma fonte alternativa de produtos químicos para a indústria química [6].

Alguns países, com condições mais propícias, há várias décadas que produzem etanol por fermentação alcoólica de açúcares. O Brasil usa principalmente o açúcar da cana-de-açúcar, enquanto que os Estados Unidos da América têm usado essencialmente o amido do milho. A beterraba sacarina também tem sido utilizada. Todas as matérias-primas dão origem ao que se convencionou chamar etanol de primeira geração. Porém, a utilização destas matérias-primas para a produção de biocombustíveis levanta questões éticas, face à conhecida fome e má nutrição que afeta regiões muito significativas do globo. Outra via para a produção de etanol é a hidrólise de material lenhocelulósico formando a glucose, a qual pode ser fermentada produzindo etanol (etanol de segunda geração) [7]. O etanol de terceira geração é produzido recorrendo às algas [8].

O material lenhocelulósico é constituído por celulose, hemiceluloses, lenhina e uma pequena porção de extratáveis e compostos inorgânicos [9]. A celulose e as hemiceluloses, que geralmente representam dois terços da massa seca do material, são polissacáridos que podem ser hidrolisados em açúcares para depois serem convertidos em etanol. A lenhina não pode ser utilizada para produção de etanol, mas pode ser utilizada para produção de energia térmica por combustão [10] e outras aplicações mais nobres.

O processo de produção de etanol a partir de material lenhocelulósico inclui três grandes etapas [11]: o pré-tratamento da biomassa, que fragmenta a matriz lenhocelulósica para tornar o acesso das enzimas ao substrato mais fácil; a hidrólise, onde os polissacáridos são convertidos em açúcares fermentáveis (por exemplo, glucose e xilose) [12]; e por fim, a fermentação que produz etanol ou outros produtos químicos de base biológica (por exemplo, ácido láctico, ácido succínico) [11].

O presente trabalho tem por objetivo estudar o efeito de algumas variáveis operatórias da etapa de pré-tratamento, nomeadamente das cargas de hidrogenossulfito de sódio e ácido sulfúrico, a temperatura e o tempo, sobre a libertação de açúcares nas etapas de hidrólise enzimática, realizado aplicando um cocktail da Novozymes®, com cargas e condições operatórias fixas. Os ensaios realizados na etapa de pré-tratamento obedeceram a um plano experimental, concebido tendo por objetivo explorar condições de reação relativamente suaves com vista a tornar o processo economicamente viável. Os componentes libertados foram igualmente objetivo de análise.

Esta dissertação é composta por 5 capítulos, começando por esta introdução, o Capítulo II consiste numa revisão bibliográfica sobre os biocombustíveis, a biomassa vegetal, os diferentes tipos de pré-tratamentos, os tipos de hidrólise e a fermentação. No Capítulo III descrevem-se os reagentes, os materiais utilizados e os procedimentos experimentais que foram efetuados a longo deste trabalho. O Capítulo IV mostra os resultados obtidos e a sua discussão e, por fim, o Capítulo V resume algumas conclusões e as considerações finais.

# Capítulo II - Revisão Bibliográfica

## II - 1 Biocombustíveis

Os biocombustíveis são combustíveis líquidos, sólidos ou gasosos de origem biológica não fóssil, ou seja, são produzidos a partir de organismos vivos ou subprodutos metabólicos e que tenham origem em materiais renováveis [8,13].

Hipoteticamente, um biocombustível pode ser formado a partir de qualquer fonte de carbono, no entanto, a mais comum tem sido as plantas, que fixam o carbono na realização da fotossíntese, com o auxílio da energia solar (figura 1). Esta biomassa tem sido reconhecida como a fonte de energia renovável com maior potencial para suprimir o declínio das fontes fósseis. É de facto um recurso atrativo, essencialmente por três razões: primeiro, por ser renovável e, conseqüentemente, capaz de suportar um desenvolvimento sustentável; segundo, porque é neutra do ponto de vista das emissões de  $\text{CO}_2$ , já que apresenta um ciclo de vida de anos ou algumas dezenas de anos, e os seus teores de enxofre são mínimos; terceiro, o seu potencial económico é bastante significativo face ao expectável aumento sucessivo dos preços dos combustíveis fósseis no futuro [13].

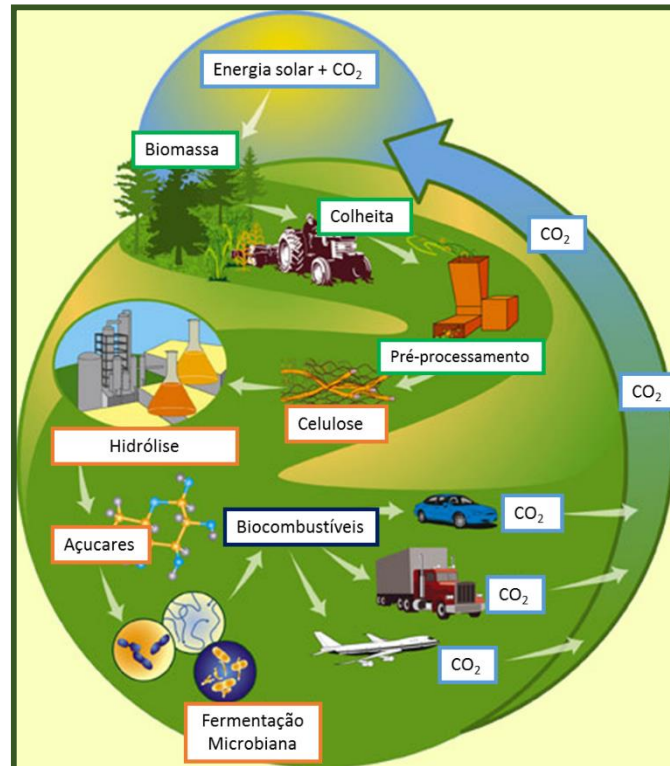


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de  $\text{CO}_2$  na utilização de biocombustíveis [adaptado de 13].

Com o objetivo de diminuir a dependência mundial dos recursos não renováveis têm sido procuradas alternativas aos combustíveis derivados do petróleo [8]. Atualmente, os biocombustíveis são o único substituto direto do petróleo para os transportes, disponível a uma escala significativa [2,14]. Através de uma diretiva, a união europeia impôs a todos os países o dever de introduzir cerca de 10% de biocombustíveis nos combustíveis fósseis até 2020 [8]. O uso de biocombustíveis proporciona diversas vantagens, tais como a diminuição dos gases responsáveis pelo efeito estufa porque são biodegradáveis e menos tóxicos e são obtidos a partir de matérias-primas renováveis (que consomem o CO<sub>2</sub> presente na atmosfera) e permitem ser misturados, em pequenas percentagens, com combustíveis fósseis sem perder as suas características, não sendo necessário a modificação dos motores dos veículos [13].

Apesar das diversas vantagens do uso de biocombustíveis, várias personalidades têm-se insurgido contra os biocombustíveis, afirmando que eles são a principal causa para o aumento dos preços de bens alimentares básicos [8,15]. Há quem contraponha, afirmando que os biocombustíveis pouco ou nada contribuem para este aumento e que este tem por base o aumento da população mundial, levando a uma maior procura deste tipo de bens. A verdade é que temos que aperfeiçoar a oferta energética, pois o recurso fóssil, de que humanidade tanto depende, está a tornar-se escasso e o efeito de estufa aumenta de ano para ano [8].

Os biocombustíveis podem ser considerados de primeira, segunda e terceira geração.

Os biocombustíveis de primeira geração são de origem vegetal (soja, palma, colza, milho, girassol, cana-de-açúcar, etc.), podendo destinar-se também à cadeia alimentar [13]. A utilização intensiva destas matérias-primas contribui para o aumento dos preços dos alimentos, o que pode resultar em perturbações sociais graves [8,15], e, pior ainda, levanta questões éticas muito sérias. Além disso, a produção dos biocombustíveis de primeira geração pode provocar impactos ambientais negativos tais como a erosão dos solos, o consumo de combustíveis nas fases de cultura, a lixiviação de nutrientes, a diminuição da biodiversidade e alterações climáticas. Por todas as razões referidas anteriormente, a União Europeia incentiva a produção de biocombustíveis de segunda geração [8,16].

Os biocombustíveis de segunda geração são produzidos a partir de biomassa lenhocelulósica e, em consequência, não competem com a cadeia alimentar [8]; como exemplos, têm-se os, resíduos agrofloretais e resíduos industriais, bem como, desperdícios de papel [9]. Estes podem ser transformados através de processos tais como a hidrólise/fermentação, a gaseificação e a pirólise [15].

Os biocombustíveis de terceira geração são produzidos utilizando microalgas. A vantagem desta abordagem face à biomassa lenhocelulósica decorre da mais elevada velocidade de produção de biomassa (com a consequente captação de dióxido de carbono), mas apresenta ainda

problemas técnico-económicos, nomeadamente os relativos à recolha e concentração das microalgas [8].

## **II - 1.1 Bioetanol**

Desde o início do século XXI que se tem verificado um crescente interesse no bioetanol. O aumento dos preços do petróleo, as preocupações ambientais e as questões da segurança energética fizeram do bioetanol uma alternativa atraente, particularmente nos países industrializados [16].

O bioetanol é um produto que pode ser obtido a partir de diferentes matérias-primas que contêm açúcares simples, amido ou substratos mais complexos como a biomassa celulósica [8]. O material lenhocelulósico é o recurso renovável mais abundante no planeta [14], sendo por isso uma matéria-prima relativamente barata para a produção de bioetanol [8].

### **II - 1.1.1 Propriedades do Bioetanol**

O etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) é um álcool incolor, volátil, inflamável e solúvel em água [15], que quando produzido a partir de biomassa renovável, é designado por bioetanol [4].

O bioetanol é um biocombustível líquido à temperatura ambiente que pode ser produzido em grande escala e misturado com gasolina ou usado puro. Além disso, o etanol contém um maior índice de octanas, um limite máximo de inflamabilidade e uma velocidade de combustão superiores às da gasolina [8], o que aumenta a eficiência do combustível no motor [13]. Estas propriedades permitem uma maior taxa de compressão, que levam a uma maior potência e menor tempo de combustão, fazendo deste biocombustível uma alternativa viável ao uso da gasolina [8]. Ao contrário da gasolina, o bioetanol conduz à redução nas emissões de gases responsáveis pelo efeito de estufa, o que também se deve ao facto de o bioetanol ser um combustível oxigenado que contém cerca de 35% de oxigénio e, portanto, resultando numa combustão mais limpa mesmo a temperaturas baixas [8,13]. Algumas das propriedades do bioetanol e da gasolina são descritas na tabela 1.

Tabela 1- Propriedades do bioetanol e da gasolina [16].

Propriedades dos Combustíveis	Gasolina	Bioetanol
Peso Molecular (kg/kmol)	111	46
Densidade (kg/L) a 15°C	0,75	0,80 - 0,82
Teor de oxigênio (% em peso)	-	34,8
Poder calorífico inferior (PCI) (MJ/kg a 15°C)	41,3	26,4
Poder calorífico inferior (MJ/L a 15°C)	31	21,2
Índice de Octanas	86 - 97	92 - 109
Índice de Cetano	8	11
Relação Estequiométrica do ar/combustível (kg Ar/kg Combustível)	14,7	9
Temperatura de ebulição (°C)	30 - 190	78
Pressão de vaporização (kPa) a 15°C	75	16,5

As principais desvantagens da utilização do bioetanol incluem a sua corrosividade, a menor pressão de vapor relativamente à gasolina (tornando mais difícil o arranque do veículo a frio), a miscibilidade com a água e a toxicidade para os ecossistemas [16].

## II - 2 Biomassa Vegetal

O final do século XX foi marcado pelo crescimento da consciencialização da sociedade relativamente à degradação do meio ambiente, levando à procura de matérias-primas renováveis e a processos de reciclagem e de reutilização, de que a utilização de resíduos da biomassa é um exemplo. O uso da biomassa tem vindo a crescer mundialmente como fonte renovável para a produção de energia elétrica e de biocombustíveis (etanol, biodiesel, biogás, etc.). No entanto, a biomassa destaca-se ainda como fonte de diversas substâncias orgânicas que servirão como matérias-primas de base para os mais variados processos industriais [17].

O termo biomassa é aplicado para descrever matéria orgânica existente nos organismos [17]. Os seus elementos constituintes são o carbono, o hidrogénio, o oxigénio e o azoto. O enxofre encontram-se apenas em pequenas proporções e alguns tipos de biomassa contêm outros compostos inorgânicos [18]. A biomassa de origem vegetal é produzida via fotossíntese, um processo no qual os vegetais convertem  $\text{CO}_2$  do ar e moléculas de água, na presença de luz solar, em compostos orgânicos complexos [17].

As fontes mais significativas de biomassa são a madeira e os resíduos de madeira, as colheitas agrícolas e os seus resíduos, os resíduos sólidos municipais, os resíduos animais, os resíduos de processamento de alimentos, as plantas aquáticas, incluindo as algas [12,18], como é ilustrado na figura 2.



Figura 2 - Diferentes tipos de biomassa [19].

## II - 2.1 Composição química e principais reações dos componentes da biomassa vegetal

Os materiais lenhocelulósicos são compósitos naturais muito complexos aos quais não se pode atribuir uma composição química muito definida, devido à sua grande heterogeneidade e variabilidade natural, causando uma série de dificuldades na indústria de transformação e processamento. Essa heterogeneidade decorre de vários fatores: espécie, localização geográfica, características do solo e do clima [20].

Relativamente às madeiras, estas podem ser classificadas em dois grupos diferentes: *softwood* (resinosas) e *hardwood* (folhosas) [21]. As resinosas, ou coníferas (pinheiro, abeto, etc.) [20], pertencem ao grupo das gimnospermas, que apresentam como características a folhagem na forma de agulha e a ausência de frutos [21]. As folhosas, ou madeiras duras (eucalipto, sobreiro, carvalho, etc.) [20], pertencem ao grupo das angiospermas dicotiledóneas, que apresentam folhas largas e sementes encerradas em frutos [21]. Os arbustos pertencem ao grupo das angiospermas dicotiledóneas, são de baixo porte (abaixo de 6 metros) relativamente às *softwood* e às *hardwood*, ramificam-se junto ao solo e algumas espécies apresentam flores enquanto que outras apenas a sua folhagem [22].

O material lenhocelulósico é constituído por três componentes maioritários, celulose (40-60%), hemiceluloses (20-40%) e lenhina (10-24%) [23], e uma fração minoritária de outros compostos: os extratáveis e as cinzas [20].

A composição elementar da madeira, numa base seca, é aproximadamente a seguinte: 50% de carbono, 44% de oxigénio, 6% de hidrogénio e 1% de azoto. Para além destes elementos, a madeira é constituída por substâncias minerais, como cálcio, magnésio e potássio, entre outros, em quantidades vestigiais [20].

Na tabela 2 apresenta-se a composição de diferentes tipos de biomassa vegetal. A composição pode ser dividida em dois grupos: substâncias macromoleculares e substâncias de baixo peso molecular (figura 3). Os componentes macromoleculares são substâncias orgânicas presentes em qualquer madeira e, sem os quais, a mesma perde a sua identidade. Estes compostos incluem a celulose, as hemiceluloses e a lenhina e são responsáveis pelas propriedades mecânicas da madeira, representando aproximadamente 95% da matéria seca da madeira. Os componentes de baixo peso molecular são compostos orgânicos (extratáveis) e inorgânicos (cinzas) não essenciais à estrutura da madeira [20,24].

Tabela 2. Composição em porcentagem de diferentes tipos de biomassa lenhocelulósica [9].

Biomassa	Celulose	Hemiceluloses	Lenhina	Cinzas	Extrativos
Alga Verde	20 - 40	20 - 50	–	–	–
Algodão	80 - 95	5 - 20	–	–	–
Gramíneas	25 - 40	25 - 50	10 - 30	–	–
Hardwood	45 ± 2	30 ± 2	20 ± 4	0.6 ± 2	5 ± 3
Casca de Hardwood	22 - 40	20 - 38	30 - 55	0.8 ± 2	6 ± 2
Softwood	42 ± 2	27 ± 2	28 ± 3	0.5 ± 0.1	3 ± 2
Casca de Softwood	18 - 38	15 - 33	30 - 60	0.8 ± 0.2	4 ± 2
Talos de milho	39 - 47	26 - 31	3 - 5	12 - 16	1 - 3
Palha de trigo	37 - 41	27 - 32	13 - 15	11 - 14	7 ± 2
Papel de jornal	40 - 55	25 - 40	18 - 30	–	–
Pasta química	60 - 80	20 - 30	2 - 10	–	–

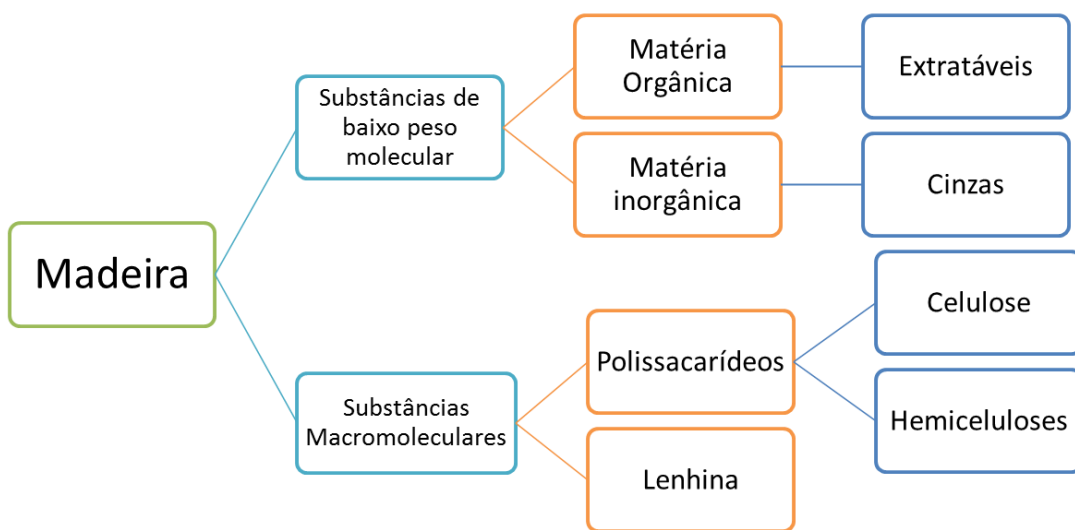


Figura 3 - Composição química qualitativa da madeira [adaptado de 20].

## II - 2.1.1 Componentes macromoleculares

### II - 2.1.1.1 Celulose

A celulose é o polímero natural mais abundante na natureza e o principal constituinte da madeira [24], encontrando-se maioritariamente na parede secundária [20]. É um homopolissacárido linear constituído por glucose ( $\beta$ -D-glucopirranose) possuindo um grau de polimerização médio bastante elevado [20, 25], variando entre os 7000 e 15000 para a madeira [20]. O tamanho da molécula de celulose é normalmente dado em termos do seu grau de polimerização, isto é, o número de unidades de anidrogucose presentes numa única cadeia [25], como é ilustrado na figura 4.

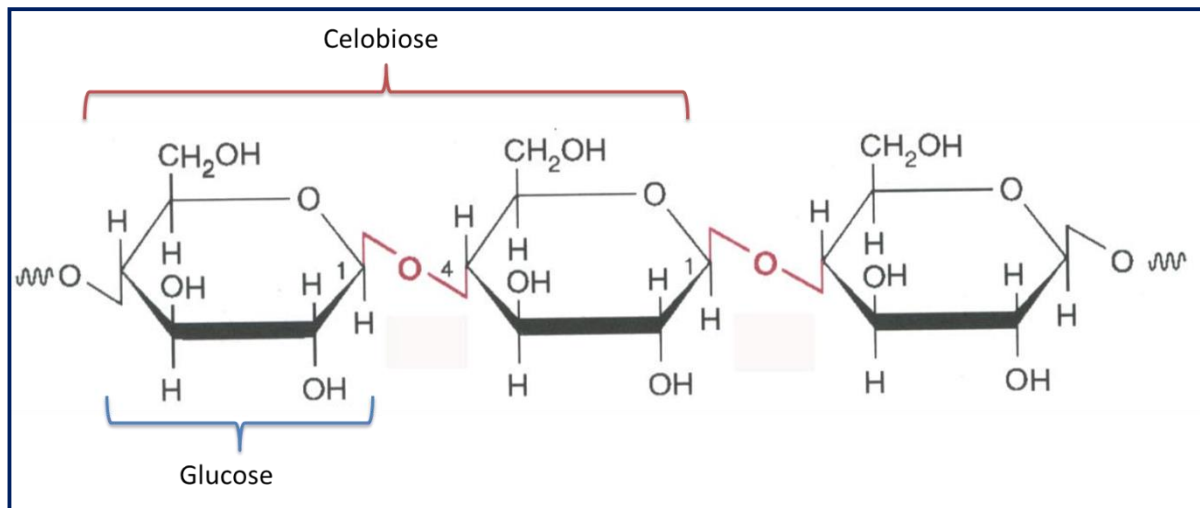


Figura 4 - Estrutura da celulose e a sua unidade estrutural, a celobiose [adaptado de 26].

Na celulose, as ligações predominantes são glicosídicas do tipo  $\beta$  (1-4), ou seja, duas moléculas de glucose ( $\beta$ -D-glucopirranose) unem-se através da eliminação de uma molécula de água entre os grupos hidroxilo dos carbonos 1 e 4 [20].

Como é representado na figura anterior (figura 4), a unidade estrutural que se repete é um dissacárido (figura 4), a celobiose, uma vez que a posição  $\beta$  do grupo hidroxilo do carbono 1 leva a um movimento de rotação de  $180^\circ$  da molécula seguinte, em relação à posição C1-C4 [20].

A estrutura supramolecular da celulose decorre da conformação da glucose e das interações entre os grupos hidroxilo, estabelecendo ligações de hidrogénio. Estas ligações podem ser de dois tipos: intramoleculares e intermoleculares. As ligações de hidrogénio intramoleculares

acontecem quando os grupos OH de glucopiranoses adjacentes, numa mesma cadeia de celulose, estabelecem uma interação entre si, conferindo alguma rigidez às cadeias individuais. As ligações de hidrogênio intermoleculares verificam-se quando há interação dos grupos OH de cadeias adjacentes, sendo responsáveis pela estrutura supramolecular da celulose [20].

Em consequência destas características, as moléculas de celulose incorporam-se em microfibrilas que possuem regiões bem organizadas, originando zonas cristalinas (60-70%), alternando com regiões menos organizadas (zonas amorfas). Por sua vez, as microfibrilas agregam-se em fibrilas e, finalmente, em fibras de celulose [20,24], como se ilustra esquematicamente na figura 5. Apesar da presença dos grupos hidroxilo, a absorção de moléculas de águas ocorre essencialmente nas zonas amorfas, devido à falta de espaços vazios na estrutura cristalina. Na madeira, as microfibrilas estão dispostas numa matriz de hemiceluloses, sendo o conjunto envolvido por lenhina como material aglutinante [24]. A celulose é bastante estável, possui elevada resistência mecânica, devido à sua estrutura química e elevado grau de polimerização, sendo pouca reativa e apresentando baixa capacidade de absorção [20,24].

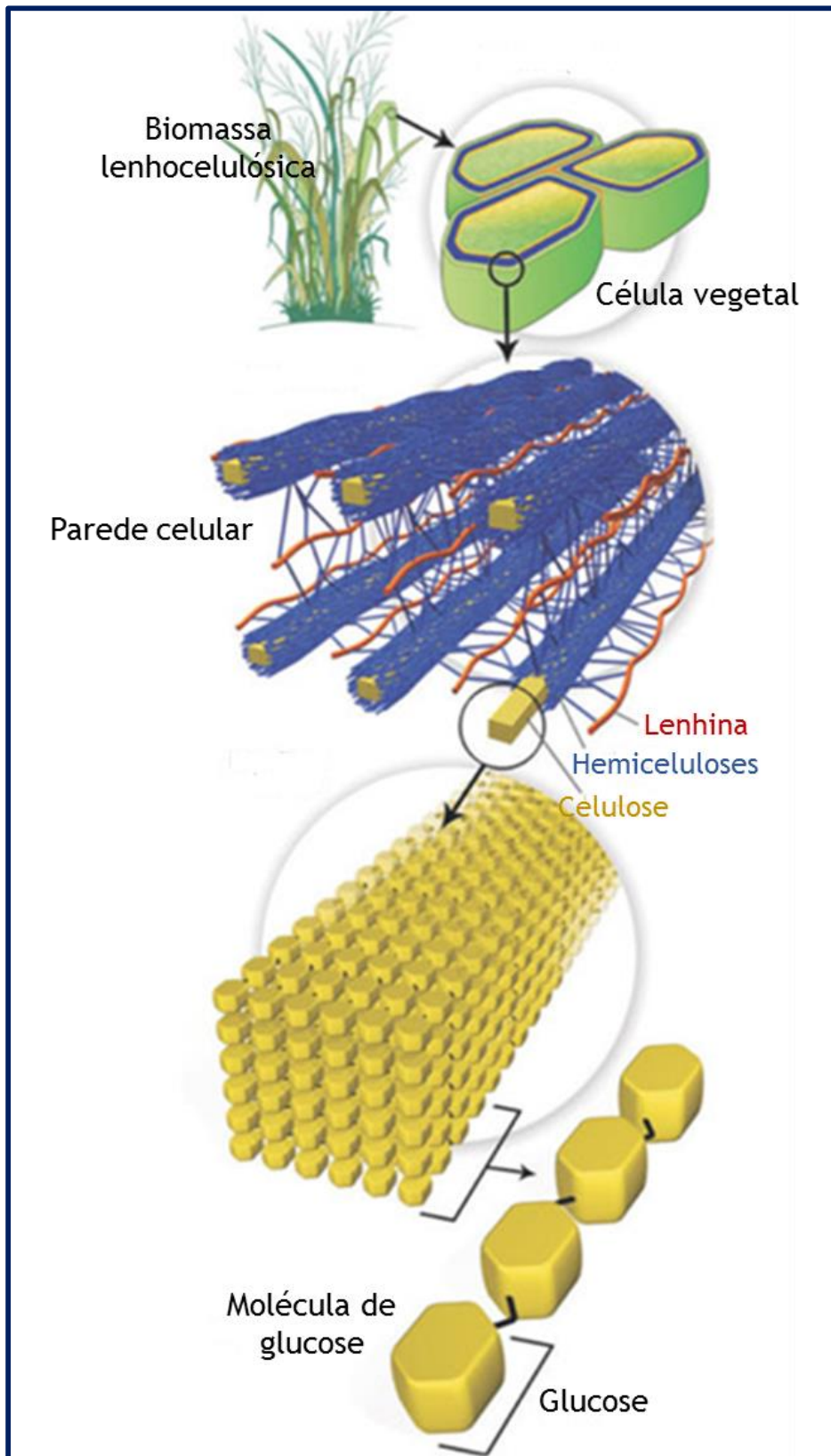


Figura 5 - Estrutura da biomassa lenhocelulósica [14].

## II - 2.1.1.1.1 Degradação da celulose

As ligações  $\beta$ -glucosídicas são quimicamente sensíveis e a presença dos três grupos hidroxilo livres em cada molécula de glucose define a reatividade da celulose, ou seja, os grupos hidroxilo podem reagir com agentes de adição, oxidação e substituição, os grupos hemiacetal sofrem hidrólise tanto em meio ácido como alcalino e, por fim, os grupos aldeídos terminais podem reduzir-se a álcoois, oxidados a grupos carboxílicos ou, ainda, quando em meio alcalino, rearranjados formando grupos terminais álcool ou carboxílicos [10].

Os principais tipos de degradação da celulose são:

- Degradação hidrolítica

A degradação hidrolítica refere-se à clivagem da ligação glicosídica entre o carbono e o oxigénio, resultando como produto final a glucose [27]. Esta degradação pode acontecer tanto em meio ácido como em meio alcalino.

Em meio ácido, a reação é muito dependente da concentração do próprio ácido, sendo que para concentrações elevadas a velocidade de reação torna-se apreciável mesmo a temperaturas inferiores a 100°C. Normalmente, a hidrólise ácida é homogénea quando são utilizados ácidos fortes e concentrados que vão dissolver a celulose por completo, sendo o principal produto desta reação a glucose. A hidrólise é heterogénea com condições mais suaves e a celulose conserva a sua estrutura fibrosa [10].

Em meio alcalino, as reações mais importantes são a hidrólise alcalina e as de *peeling*. Estas últimas ocorrem nos grupos terminais redutores dos polissacáridos, enquanto que a hidrólise alcalina das ligações  $\beta$ -glucosídicas ocorrem aleatoriamente ao longo da cadeia. A reação de *peeling* inicia-se a 100°C, aumentando com a temperatura até aos 130°C, decrescendo posteriormente até se extinguir competindo diretamente com a reação *stopping* que vai dificultar a continuação da degradação. A temperaturas superiores a 150°C a hidrólise alcalina das ligações  $\beta$ -glucosídicas é relevante dando origem a fragmentos de polissacáridos com uma nova extremidade redutora, diminuindo consideravelmente o grau de polimerização da celulose [10].

- Degradação oxidativa

A celulose é muito suscetível a reagentes oxidantes, pelo que é facilmente oxidada. A extensão da degradação depende da natureza do reagente e das condições em que ocorre a reação [27].

A reação de oxidação introduz grupos carbonilo e carboxílicos em várias posições das unidades de glucose da cadeia de celulose, designando-se a celulose oxidada por oxixelulose. As ligações glucosídicas ativadas pelos grupos oxidados introduzidos nas cadeias de celulose podem sofrer degradação em meio ácido ou alcalino [10].

- Degradação microbiológica

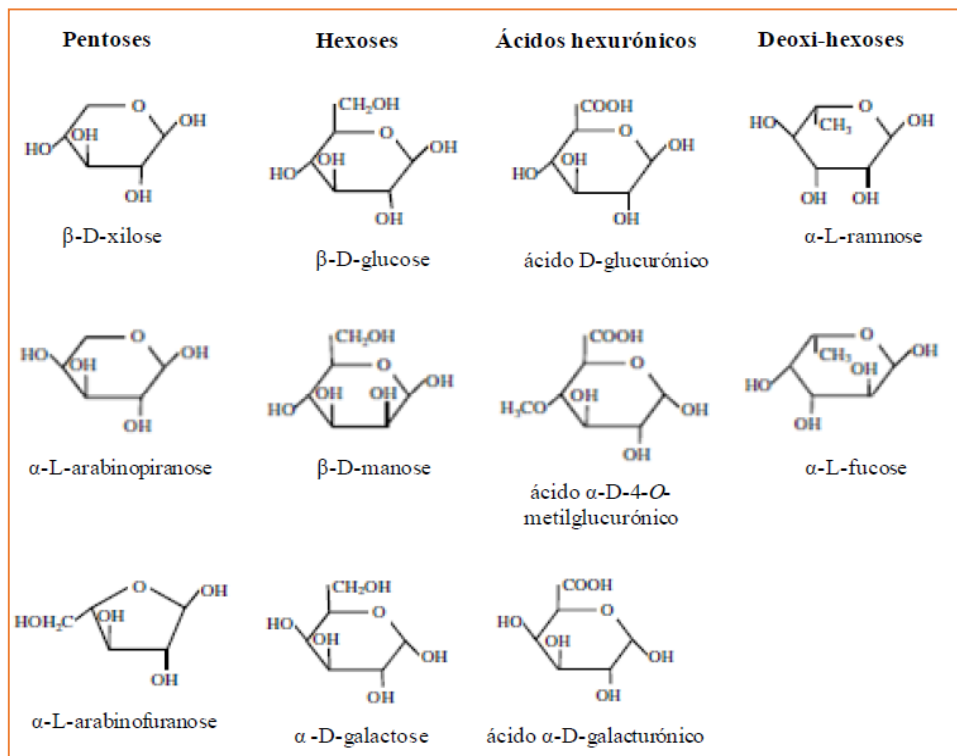
A degradação microbiológica da celulose inclui os mais eficazes agentes de degradação biológicos que são os fungos filamentosos [10], que contêm as enzimas endoglucanases e celobiohidrolases que hidrolisam a celulose cristalina em celobiose, e a  $\beta$ - endoglucanase que degrada a celobiose em glucose [28].

A celulose é sensível à hidrólise enzimática desde que exista acessibilidade; como é natural, é necessário contacto físico e direto entre as enzimas e o substrato para que ocorra a degradação. Na madeira, o fator limitante do acesso das enzimas à celulose é a lenhina, uma vez que as microfibrilas de celulose estão cobertas por hemiceluloses e naturalmente pela lenhina [10].

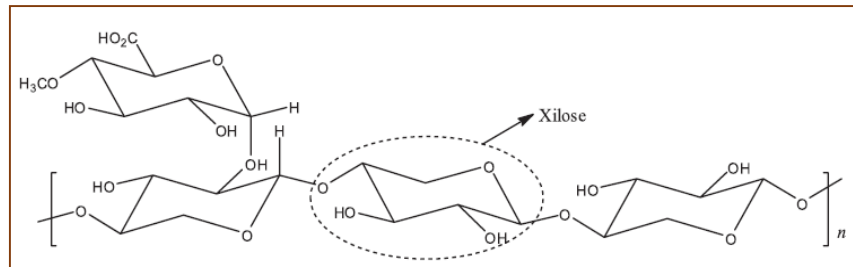
## II - 2.1.1.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são heteropolissacáridos de baixo peso molecular essencialmente amorfos, com uma estrutura ramificada. Em geral, o seu grau de polimerização entre 100 e 200, é muitíssimo inferior ao da celulose [20,24].

Por hidrólise, as hemiceluloses podem dar origem a diversos tipos de açúcares neutros, que podem ser divididos em pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose) [20]. No entanto, as hemiceluloses também podem conter outros monossacáridos em quantidades mínimas como L-fucose, L-ramnose, ácido D-glucurónico e ácido 4-O-metilglucurónico (figura 6). A cadeia principal de uma hemicelulose pode ser constituída por apenas um único tipo de açúcar, como as xilanas (D-xilose) ou por dois ou mais açúcares, como as glucomananas (D-manose e D-glucose) (figura 7) [24].



**Figura 6** - Estrutura dos monossacáridos constituintes das hemiceluloses: pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e deoxi-hexoses [24].



**Figura 7** - Representação esquemática das xilanas [14].

As hemiceluloses contêm um maior número de grupos OH disponíveis podendo estabelecer ligações com soluções alcalinas diluídas ou com água, pelo que são mais solúveis em água do que a celulose. Por apresentarem estruturas ramificadas, as hemiceluloses são mais amorfas que a celulose, logo mais suscetíveis de serem acididas, tornando-as mais reativas [20].

As hemiceluloses de *softwood* e *hardwood* diferem significativamente. As *hardwood* são maioritariamente compostas por heteroxilanas altamente acetiladas, geralmente classificadas como 4-O-metilglucuronoxilanas. As hexosanas também estão presentes, mas em quantidades muito baixas, na forma de glucomananas. Devido às suas propriedades químicas, as xilanas nas *hardwood* são relativamente instáveis à hidrólise ácida e podem sofrer auto-hidrólise sob condições suaves [25].

As *softwood* têm uma proporção maior de glucomananas e galactoglucomananas parcialmente acetiladas e as xilanas correspondem apenas a uma pequena fração do seu teor total de hemiceluloses. Como resultado, as hemiceluloses das *softwood* (principalmente hexosanas) são mais resistentes à hidrólise ácida do que as hemiceluloses de *hardwood* (principalmente pentosanas) [25].

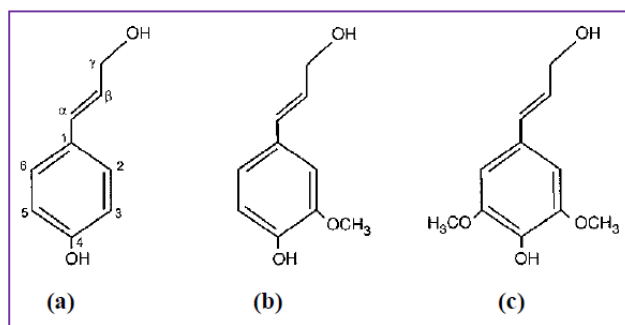
#### II - 2.1.1.2.1 Degradação das hemiceluloses

O tipo de grupos funcionais nas hemiceluloses é semelhante ao da celulose, logo a classe de reações que podem sofrer são as mesmas. Ainda assim, existem algumas diferenças entre as reatividades, devido à sua estrutura física [10]. As hemiceluloses são muito amorfas, facilitando o acesso dos agentes químicos. Pode ocorrer em algumas hemiceluloses a perda dos substituintes da sua cadeia e sofrer cristalização induzida, havendo a formação de fortes ligações por pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilos de cadeias adjacentes. Assim, há a formação de um retículo cristalino, dificultando a acesso dos agentes químicos [10].

#### II - 2.1.1.3 Lenhina

A lenhina é uma macromolécula aromática, amorfa e altamente ramificada; é o segundo polímero orgânico natural mais abundante no planeta, depois da celulose. Tem como principal função aumentar a rigidez da parede celular, diminuir a permeabilidade da parede celular à água e proteger a madeira contra microrganismos [20,24]. Este polímero apresenta um carácter hidrofóbico inibindo, assim, a absorção de água e o intumescimento das fibras. Por esta razão é necessário remover a lenhina quando se pretende obter fibras flexíveis e branqueadas; os processos de deslenhificação são pouco seletivos e afetam naturalmente a estrutura dos outros componentes da madeira, a celulose e as hemiceluloses [24].

Os três monómeros precursores da lenhina são: o álcool p-cumarílico (a), o álcool coníferílico (b) e o álcool sinapílico (c), que diferem entre si pelo número de grupos metoxilo substituintes (figura 8) [20,24]. A polimerização dos precursores, por ação enzimática, tem início com a formação de um radical fenólico estabilizado por ressonância, seguida da formação de dímeros que reagem formando três, quatro, cinco ou mais unidades de fenilpropano. As unidades aromáticas que constituem a lenhina são, geralmente, designadas por unidades do tipo siringilo (tipo S), guaiacilo (tipo G) e p-hidroxifenilo (tipo H) conforme possua dois, um ou nenhum grupo metoxilo [24].



**Figura 8** - Estrutura dos álcoois precursores da lenhina [20].

A composição química e estrutural da lenhina depende do tipo de madeira e da zona de extração na árvore, tal como nos outros componentes. Assim, nas *softwood* a lenhina maioritária é do tipo G (cerca de 95%) [20], enquanto que nas *hardwood* são compostas maioritariamente por lenhina do tipo G e do tipo S [25], sendo que o fragmento de unidades de siringilo pode variar entre 20 a 70% [20]. E, por fim, a lenhina do tipo H, tipo G e tipo S está presente nas plantas gramíneas [20].

Relativamente à estrutura da lenhina, esta distingue-se bastante dos outros constituintes da madeira devido à grande diversidade de ligações que possui, como se pode verificar pela figura 9. Podem ser ligações éter (C-O-C) ou carbono (C-C), sendo que as primeiras estão maioritariamente sob a forma de ligações  $\beta$ -O-4, quer nas *hardwood* (60%) quer nas *softwood* (50%) [20].

A lenhina é bastante amorfa devido ao facto da sua estrutura ser altamente ramificada, como referido anteriormente. Além disso, é um polímero predominantemente hidrofóbico, pouco reativo e insolúvel na maior parte dos solventes, exigindo condições bastante severas para a sua despolimerização/degradação [20].

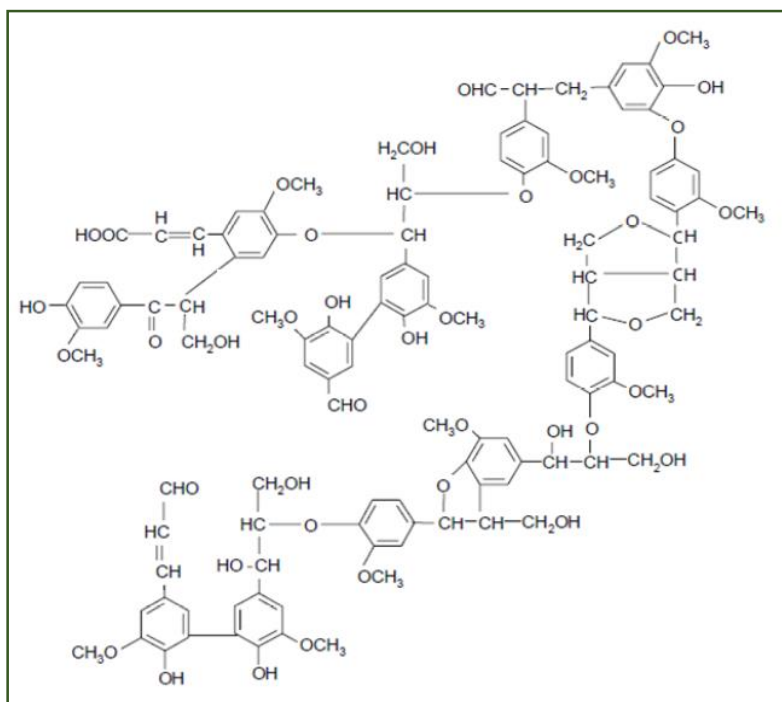


Figura 9 - Fragmento da estrutura da lenhina [24].

### II - 2.1.1.3.1 Reações da lenhina

As reações que a lenhina pode sofrer são muito diversas e complexas [10].

- Hidrólise ácida

O ácido por si só não tem capacidade de deslenhificação. Em algumas espécies de *hardwood* são dissolvidas algumas frações de lenhina de baixa massa molecular [12], mas para se tornar efetivo como agente de deslenhificação, o ácido tem de ser conjugado com outros agentes, normalmente de oxidação.

- Hidrólise alcalina

A lenhina sofre um conjunto de reações que a solubilizam, quando sujeita a temperaturas elevadas (superior a 160°C) em meio alcalino. Estas reações são de rutura das ligações éter entre as unidades de fenilpropano, que formam grupos fenólicos responsáveis pela solubilização deste biopolímero. A clivagem das ligações carbono-carbono e das ligações éter dos grupos metoxilo são outras reações que ocorrem em meio alcalino [10].

- Condensação

Estas reações de condensação podem acontecer tanto em meio ácido como em meio alcalino. As reações de condensação originam ligações covalentes entre fragmentos de lenhina que prejudicam a dissolução do polímero, visto que os fragmentos formados apresentam maior massa molecular e ligações entre as moléculas mais fortes (normalmente do tipo C-C) [12].

- Oxidação

A lenhina é suscetível de sofrer reações de oxidação, reagindo conforme as condições e os agentes oxidantes utilizados, levando à quebra de cadeia e conseqüentemente à sua dissolução. Para oxidar a lenhina, os agentes oxidantes geralmente utilizados são o hipoclorito, o dióxido de cloro, o ozono, o ião permanganato e o ião periodato [10].

## II - 2.1.2 Componentes de baixo peso molecular

### II - 2.1.2.1 Extratáveis

Os extratáveis são compostos orgânicos [24] que incluem resinas, gorduras e ácidos gordos, fenóis, fitoesteróis, sais e minerais [11] presentes na madeira e podem ser extraídos por meio de solventes orgânicos ou de água, uma vez que são componentes não estruturais e de baixo peso molecular. Os diferentes componentes dos extratáveis exercem funções biológicas e conferem à madeira diversas propriedades, tais como a cor, o cheiro, a resistência natural ao apodrecimento, entre outros, aumentando assim a sua durabilidade. Por outro lado, exercem um papel negativo no processo de produção de biocombustíveis, uma vez que são solúveis nos licores de cozimento e influenciam as principais reações envolvidas, além de diminuir o rendimento dos processos [20].

A composição dos extratáveis depende de vários fatores, tais como a espécie, a idade e a localização dentro da árvore, entre outros. As *softwood* apresentam entre 5 a 8% de extratáveis, enquanto as *hardwood* apresenta entre 2 a 4% de extratáveis [24]. Nos arbustos esses teores são normalmente superiores a 4% [29]. Os extratáveis também existem na casca, folhas, flores, frutos e sementes, sendo o seu teor nessas partes quase sempre superior ao encontrado na madeira [24].

## **II - 2.1.2.2 Cinzas**

A porção inorgânica da madeira é vulgarmente designada por cinzas, uma vez que é analisada como cinzas, após incineração a 600-850°C [20]. Esta componente mineral dos materiais lenhocelulósicos consiste em sais de sódio, potássio e cálcio com os correspondentes aniões de carbonato, fosfato, silicato, sulfato e cloreto, entre outros que permanecem após a combustão da madeira [11,20,24]. O teor e a composição das cinzas variam com as condições ambientais sob as quais a árvore cresce e com a sua localização na árvore. As madeiras provenientes de climas amenos contêm 0,2 a 0,9% de cinzas, enquanto que as madeiras de climas tropicais podem conter até 5% de cinzas [24]. Nos arbustos o teor de cinzas é de aproximadamente 1% [29]. A quantidade de cinzas na madeira é residual, no entanto são essenciais para a sobrevivência da planta vegetal e podem ter influência nas suas propriedades e na qualidade do processamento da madeira [24].

## **II - 2.2 Recalcitrância da biomassa**

A maioria dos materiais lenhocelulósicos pode ser utilizada para a produção de biocombustíveis. Porém, todos são constituídos por paredes celulares que são difíceis de desconstruir. A parede das células vegetais vivas constitui, desde logo, um primeiro obstáculo à degradação natural por parte de [30,31], tais como as pragas e de agentes patogénicos. Assim, é natural que estas estruturas complexas sejam resistentes à degradação enzimática e ataques bioquímicos por organismos vivos [31].

As paredes celulares das plantas são compostas por três componentes maioritários, como já referido anteriormente, a celulose, as hemiceluloses, a lenhina. Estes biopolímeros interpenetram-se gerando uma estrutura muito complexa, que constitui a natureza recalcitrante do material [30,32].

A lenhina e as hemiceluloses contribuem claramente para a natureza recalcitrante da biomassa vegetal. A lenhina visa proteger da degradação do material lenhocelulósico, criando uma barreira física para evitar o acesso das enzimas ao substrato celulósico. Sabe-se que a deslenhificação da biomassa aumenta a área superficial interna do material e a acessibilidade das enzimas à celulose, melhorando efetivamente a eficácia da hidrólise enzimática. A celulose também é protegida pelas hemiceluloses por mecanismos semelhantes aos da lenhina, formando uma barreira físico-química para as celulases e, uma vez que as hemiceluloses estão mais ligadas à celulose que a lenhina na parede celular, a remoção destas tem um maior impacto sobre a hidrólise enzimática da celulose, especialmente para as madeiras e plantas [33].

Para combater a natureza recalcitrante do material e melhorar a conversão da celulose em glucose, o material lenhocelulósico sofre um tratamento antes da realização da hidrólise enzimática que se designa como pré-tratamento [33].

## II - 3 Pré-tratamento do material lenhocelulósico

A produção de bioetanol a partir de material lenhocelulósico exige várias etapas: o pré-tratamento, a hidrólise, e, por fim, a fermentação (figura 10). Como a estrutura da parede celular é muito complexa, o que geralmente dificulta a bioconversão, o que também se designa por recalcitrância, a fase do pré-tratamento constitui uma das etapas mais significativas em termos de custos de operação, para além de influenciar diretamente os custos das restantes etapas do processo [14].

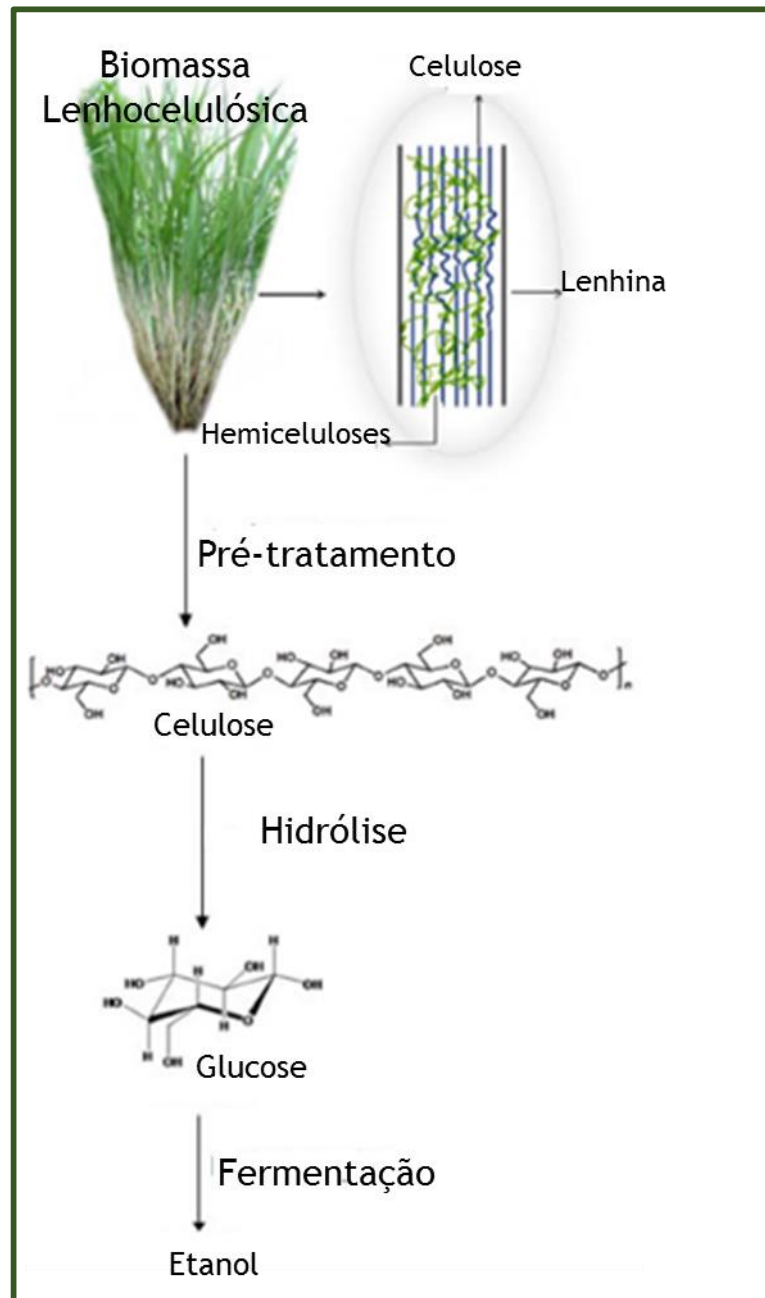


Figura 10- Representação esquemática da produção de etanol a partir de material lenhocelulósico [14].

Apenas por ação enzimática, conversão da celulose em glicose pode apresentar um rendimento muito baixo (inferior a 20%). Este fato deve-se, principalmente, à estrutura altamente cristalina da celulose, dificultando o acesso dos sítios ativos das enzimas ao substrato. Por outro lado, a lenhina limita a hidrólise, uma vez que impede o intumescimento das fibras e assim a sua porosidade interna. Por isso, é necessária uma etapa de pré-tratamento [7] a fim de remover a lenhina e as hemiceluloses, ou uma parte destas, aumentar a área superficial interna e externa diminuir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, expondo a celulose à ação enzimática, como é representado na figura 11 [14].

Assim, o desafio do processamento mais importante na produção de bioetanol é o pré-tratamento da biomassa [6]. O pré-tratamento ideal tem de ir de encontro aos seguintes objetivos: (1) aumentar o potencial de libertação dos açúcares na etapa posterior de hidrólise enzimática, (2) evitar a degradação ou perda de açúcares, (3) minimizar a formação de subprodutos que inibam a hidrólise enzimática e a fermentação subsequentes, e (4) ser rentável [3]. O pré-tratamento tem sido visto como uma das etapas mais caras de processamento dentro da conversão do material lenhocelulósico em açúcares fermentáveis [36].

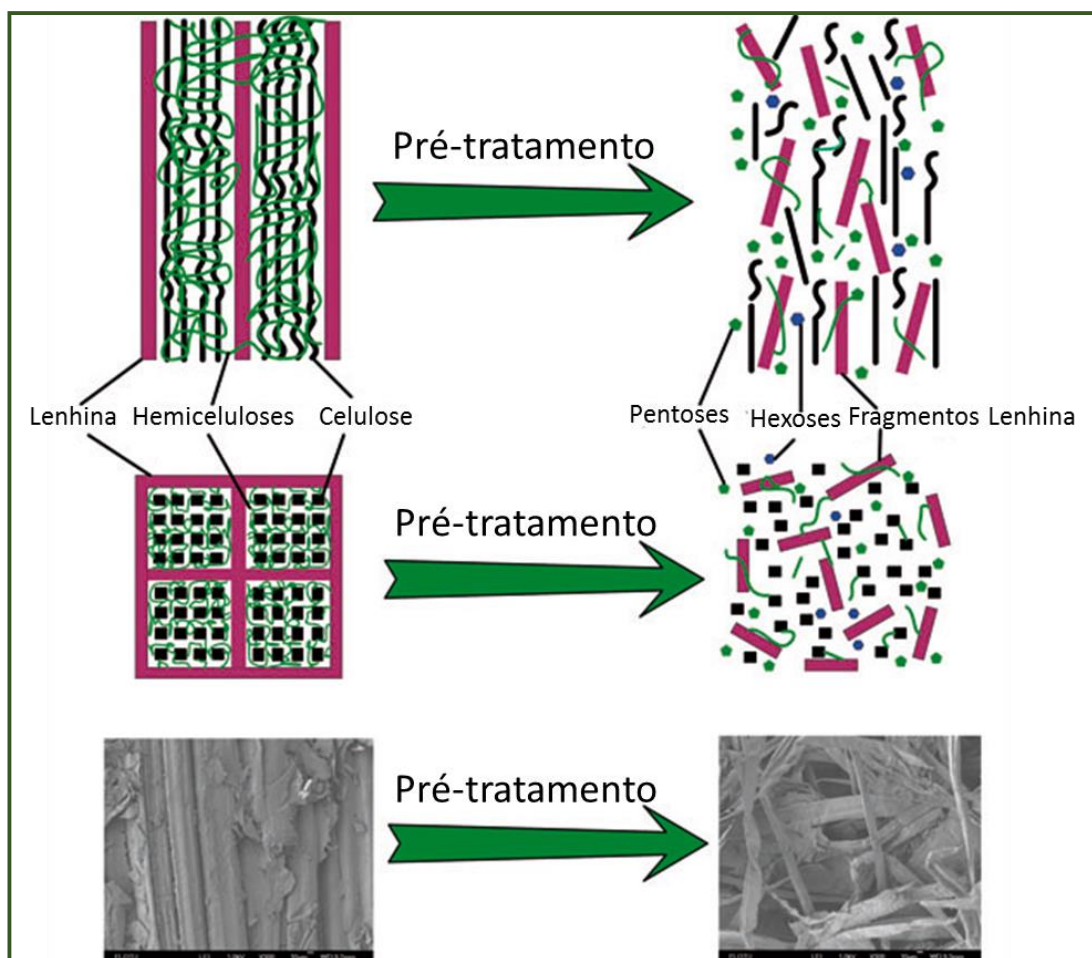


Figura 11 - Efeito do pré-tratamento na estrutura do material lenhocelulósico [adaptado de 37].

Existem diversos tipos de pré-tratamentos que utilizam a ação de diferentes agentes químicos e diferentes formas de interagir com os constituintes da parede celular das plantas. Além disso, existe uma vasta variedade de materiais lenhocelulósicos suscetíveis de serem usados, que vão desde plantas herbáceas a árvores (*softwood* e *hardwood*) e que apresentam diferentes propriedades físicas e químicas [38]. Por isso existe uma interdependência entre o pré-tratamento e o tipo de substrato a processar [12].

Além disso, o pré-tratamento tem um impacto técnico nas etapas a jusante, que naturalmente tem implicações económicas sobre as restantes etapas e sobre a viabilidade global do processo, quer vise a produção de combustíveis e produtos quer apenas a de produtos químicos [38]. Atualmente, existem várias tecnologias de pré-tratamentos, que podem ser classificadas, com base na natureza do(s) meio(s) escolhido(s) para conseguir romper a da parede celular: pré-tratamentos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos [12].

## II - 3.1 Requisitos de um pré-tratamento eficiente

No pré-tratamento é necessário ter em conta alguns fatores para que esta etapa seja efetuada com sucesso:

- Rendimentos elevados para várias matérias-primas

O pré-tratamento dever ser suficientemente flexível para acomodar variações na composição da matéria-prima, o que nem sempre ocorre; de facto alguns são mais adequados para determinadas biomassas e insuficientes para outras (por exemplo, plantas herbáceas versus *softwood* ou *hardwood*) [9].

- Biomassa pré-tratada facilmente digestível

O produto maioritário do pré-tratamento da biomassa é a celulose que deve ser facilmente digestível com rendimentos superiores a 90% em menos de 3-5 dias com cargas enzimáticas menores que 10 FPU (*Filter paper unit*)/g de celulose [34].

- Evitar a produção de compostos inibitórios da hidrólise e fermentação

O pré-tratamento não deve dar origem a produtos de degradação que inibam as operações seguintes, mas de facto não é isso se verifica [35].

- Redução do tamanho da biomassa

A redução do tamanho da biomassa deve ser levada a cabo com o mínimo de consumo de energia, a teores de sólidos tão elevados quanto possível, e em equipamentos utilizando materiais de construção adequados para suportar os produtos químicos e as condições de operação quando a biomassa é sujeita a tratamentos mais rigorosos, tais como os pré-tratamentos físico-químicos [35].

- Compatibilidade da fermentação

Depois da hidrólise enzimática, o hidrolisado é submetido à fermentação; os microrganismos fermentativos devem ser compatíveis com os componentes do hidrolisado, para que os açúcares recuperados sejam convertidos com sucesso em etanol [35].

- Recuperação da lenhina

Os processos de recuperação de lenhina do(s) hidrolisado(s) devem ser eficazes, a fim de simplificar os processos que se seguem, a hidrólise e a fermentação, e valorizar todos os produtos [34].

- Requisitos mínimos de calor e energia

O calor e a energia elétrica requeridos para o pré-tratamento devem ser o mais baixo possível [35].

## **II - 3.2 Pré-tratamentos Físicos**

O pré-tratamento físico mais comum consiste na redução do tamanho de partícula, por *stress* mecânico. É normalmente o primeiro passo para a produção de etanol a partir da biomassa e visa aumentar a área superficial específica do material, por forma a aumentar a acessibilidade dos reagentes e/ou das enzimas ou microrganismos aos substratos. Contudo, este pré-tratamento não é suficiente para aumentar substancialmente a conversão de açúcares, mas a maioria dos outros pré-tratamentos exige uma redução mínima do tamanho de partícula, para serem eficazes. Além disso, leva à diminuição do grau de polimerização e da cristalinidade da biomassa [6,37,39].

### **II - 3.2.1 Trituração Mecânica**

Este pré-tratamento tem como objetivo uma redução do tamanho das partículas e da cristalinidade dos materiais lenhocelulósicos, a fim de aumentar a superfície específica e reduzir o grau de polimerização da celulose. Este pode ser produzido por uma combinação de vários processos tais como destroçar, moer ou triturar dependendo do tamanho final da partícula do material que se deseja obter (10-30 mm depois do destroçamento e 0,2-2 mm após moagem ou trituração). Podem usar-se diferentes processos de moagem (moinho de bolas, dois rolos de moagem, moagem de martelos). O consumo de energia deste pré-tratamento é relativamente alto, dependendo do tamanho final da partícula que se pretende e das características da biomassa [3,35,39].

### **II - 3.2.2 Extrusão**

O processo de extrusão é um método de pré-tratamento novo e promissor para a conversão de material lenhocelulósico em bioetanol. Neste método, o material é sujeito a elevadas tensões de corte e mistura, sob temperaturas adequadas, resultando em alterações físicas e químicas durante a passagem através da extrusora. A velocidade do parafuso e a temperatura do tambor são selecionados para quebrar a estrutura da celulose, causando desfibração, fibrilação e encurtamento das fibras, aumentando a acessibilidade dos hidratos de carbono ao ataque enzimático. As condições de operação a usar nas etapas subsequentes, devem ser devidamente selecionados a fim de obter o máximo de eficiência no processo global. Estudos recentes de aplicação de enzimas, usando como pré-tratamento o processo de extrusão, mostraram que esta tecnologia é promissora para a produção bioetanol [35].

## II - 3.3 Pré-tratamentos Químicos

Os pré-tratamentos químicos consistem em processos que utilizam diversos produtos químicos para tratar a biomassa sob diversas condições de operação [37], num curto espaço de tempo [6]. Os mecanismos destes pré-tratamentos são diferentes, dependendo dos produtos químicos usados e das condições de operação em cada pré-tratamento [37]. Estes pré-tratamentos visam solubilizar as hemiceluloses e a lenhina, a fim de expor a celulose à hidrólise ácida e/ou enzimática subsequente [25].

### II - 3.3.1 Ácido

O pré-tratamento ácido é considerado uma das técnicas mais importantes e relevantes para a obtenção de altos rendimentos em açúcares partindo de materiais lenhocelulósicos [6].

Os ácidos mais usados são os seguintes: sulfúrico, nítrico, acético ou clorídrico, dependendo da matéria-prima. Os ácidos concentrados (por exemplo, sulfúrico e clorídrico) foram usados para tratar materiais lenhocelulósicos. Apesar de serem poderosos agentes hidrolíticos da celulose, os ácidos concentrados são tóxicos, corrosivos e perigosos. Para que este tratamento fosse viável economicamente, o ácido concentrado teria que ser recuperado após a hidrólise [3,10].

Do ponto de vista económico, o tratamento com ácido diluído é o mais favorável, obtendo-se as alterações pretendidas no caso de algumas matérias-primas [10]. Este método de pré-tratamento tem a vantagem de solubilizar uma parte dos componentes da estrutura da parede celular e melhorar a acessibilidade das enzimas à celulose [12].

O pré-tratamento com ácido diluído em concentrações baixas (0,05-5%) [12] elimina ou diminui a necessidade da utilização de complexo enzimático para degradar as hemiceluloses. Contudo, dependendo da temperatura, o pré-tratamento pode gerar produtos da degradação dos açúcares, como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural que são inibidores para os microrganismos no passo da fermentação [10].

A hidrólise ácida das hemiceluloses nos materiais lenhocelulósicos é mais fácil de obter do que a da celulose, devido à maior acessibilidade das hemiceluloses amorfas e ao seu baixo grau de polimerização. Assim, é natural que os hidrolisados desta fase contenham maioritariamente açúcares derivados das hemiceluloses. Por outro lado, como os monómeros das hemiceluloses são libertados mais cedo do que a glucose da celulose, irão estar sujeitos aos efeitos do ácido durante um período de tempo maior. Assim, se por hipótese se aplicassem condições drásticas

que conduzissem à hidrólise completa da celulose cristalina os açúcares das hemiceluloses seriam severamente degradados quimicamente, inibindo os processos biológicos posteriores [10].

O pré-tratamento com ácido sulfúrico com cargas inferiores a 4% (w/w), a temperaturas entre 140-200°C durante um determinado período de tempo, de alguns minutos a 1 hora, são as condições normalmente utilizadas nestes pré-tratamentos [36,40]. As hemiceluloses são hidrolisadas sendo uma grande parte obtida como monómero. O rendimento da conversão das hemiceluloses aumenta com a carga de ácido e com a temperatura, mas depende naturalmente da espécie vegetal submetida ao tratamento [10].

## II - 3.3.2 Alcalino

Os pré-tratamentos alcalinos utilizam bases, tais como o hidróxido de sódio (NaOH) ou o hidróxido de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>). O seu resultado depende da composição química da biomassa, principalmente do teor de lenhina que contém [10,12]. O procedimento com hidróxido de sódio diluído provoca intumescimento do material, resultando no aumento da área superficial, a diminuição do grau de polimerização da celulose, o decréscimo da cristalinidade, a rutura de ligações estruturais entre a lenhina e os hidratos de carbono e a quebra da estrutura da lenhina [3,10].

Este pré-tratamento traduz-se na remoção de alguma lenhina e de ácidos urónicos que estão presentes nas hemiceluloses como grupos substituintes e que são inibidores da acessibilidade das enzimas à celulose e hemiceluloses. No entanto, estes dois componentes da madeira permanecem quase intactos, isto é, é necessária maior carga enzimática para os digerir, levando assim ao aumento do uso de enzimas no processo [10].

O tratamento alcalino também afeta a composição da fração não celulósica do hidrolisado; enquanto que o pré-tratamento ácido referido anteriormente (seção II - 3.4.1) pode gerar concentrações elevadas de furfural na fase líquida, os alcalinos podem causar elevadas concentrações de ferulato e acetato. Estes compostos apresentam um elevado efeito inibidor nos microrganismos na etapa de fermentação [10].

O pré-tratamento alcalino pode também provocar a solubilização, a redistribuição e a condensação da lenhina e a transformação na cristalinidade da celulose. Estes efeitos podem ser prejudiciais para as etapas seguintes do processo [41].

Um ponto importante deste pré-tratamento é que a biomassa só por si consome alguma da alcalinidade da solução. Desta forma, a solução alcalina que resta para a reação é a solução

alcalina residual [41]. Outro aspeto não menos importante do pré-tratamento alcalino é a alteração da organização estrutural da celulose para uma forma que é mais densa e termodinamicamente mais estável que a celulose nativa [12].

O custo dos reatores necessários ao tratamento alcalino é, em geral, inferior ao correspondente para os tratamentos ácidos. Geralmente, o tratamento alcalino é mais eficaz em resíduos agrícolas e plantas herbáceas que em madeira [10].

Para que este pré-tratamento seja mais eficaz na degradação da biomassa, pode aplicar-se um reagente oxidante suplementar, como o oxigénio e/ou o peróxido de hidrogénio, que vai dissolver as hemiceluloses e degradar a lenhina, produzindo uma quantidade de celulose mais acessível às enzimas na hidrólise e na fermentação [12].

### **II - 3.3.3 Organosolv**

Neste pré-tratamento, o material lenhocelulósico é misturado com um solvente orgânico ou uma mistura aquosa com solvente orgânico, para quebrar as ligações estruturais entre a lenhina e as hemiceluloses, deixando a celulose intacta na fase sólida [6,42]. Normalmente, os solventes orgânicos utilizados são metanol, etanol, ácido acético, acetona, entre outros [3,6]. Os ácidos orgânicos tais como, oxálico, acetilsalicílico e ácido salicílico podem também ser usados como catalisadores neste tipo de pré-tratamento [3]. Com altas temperaturas (superior a 185°C), a adição de catalisadores é desnecessária para satisfazer a deslenhificação. Geralmente, pode ser obtido um elevado rendimento de xilose com a adição de ácido [3,42].

No final do tratamento, os solventes orgânicos utilizados no processo têm de ser recuperados através de evaporação e condensação e reciclados para reduzir o custo; além disso a utilização de alguns destes compostos orgânicos, atendendo à sua elevada volatilidade exige equipamentos de alta pressão o que encarece o processo. A remoção dos solventes também é necessário porque os solventes podem inibir/diminuir para o crescimento de organismos na hidrólise enzimática e na fermentação [3,12].

### **II - 3.3.4 Ozonólise**

O pré-tratamento de ozonólise consiste no uso de ozono para oxidar a lenhina e as hemiceluloses e aumentar a biodegradabilidade da celulose [39]. Geralmente, este método é

realizado à temperatura ambiente, sendo eficaz na remoção de lenhina não havendo a formação de subprodutos tóxicos [42].

Este pré-tratamento tem sido largamente utilizado para reduzir o teor de lenhina de resíduos agrícolas e florestais. Mostrou-se que o tratamento com ozono removeu 49% da lenhina em talos de milho e 55-59% da lenhina nos talos previamente auto-hidrolisados (livre das hemiceluloses). Uma desvantagem do tratamento com ozono é a necessidade de utilizar uma grande quantidade de ozono, o que pode tornar o processo dispendioso [36].

## II - 3.4 Pré-tratamentos Físico-químicos

Este tipo de pré-tratamentos combinam uma ação física forte com uma moderada ação química, sendo considerados mais eficazes que o pré-tratamento físico [42]. De notar que, por exemplo, o processo SPORL também combina ação física com uma forte ação química. Neste caso a intensidade da ação química será maior do que a física, ao contrário do que ocorre nos restantes tratamentos físico-químicos.

### II - 3.4.1 SPORL

O pré-tratamento designado por *Sulfite Pretreatment to Overcome the Recalcitrance of Lignocellulose* (SPORL) é um método recente desenvolvido para a produção de etanol partindo da matéria-prima lenhocelulósica [43]. Este tratamento evidencia a capacidade de superar a natureza recalcitrante inerente aos materiais lenhocelulósicos [44]. Na sua essência, um tratamento químico semelhante tem sido utilizado durante séculos para obter pasta para papel: o conhecido processo ao sulfito [37]. Assim, a tecnologia é madura e as barreiras tecnológicas para a sua comercialização são baixas [44].

Este pré-tratamento consiste num tratamento químico e térmico de curta duração da matéria-prima, seguido de uma redução mecânica de tamanho do material, com libertação de uma percentagem significativa de fibras e de elementos finos [44]. Como mostra a figura 12, as aparas de madeira ou de outras matérias-primas reagem, primeiramente, com uma solução de sulfito de sódio, magnésio ou cálcio, a 160°C-190°C e pH 2-5 durante 10 a 30 minutos [32,45]; de seguida são sujeitas a um processo de desfibração num refinador de discos para diminuir o tamanho da biomassa a fim de criar um substrato fibroso para as duas fases seguintes, a hidrólise e a fermentação [44].

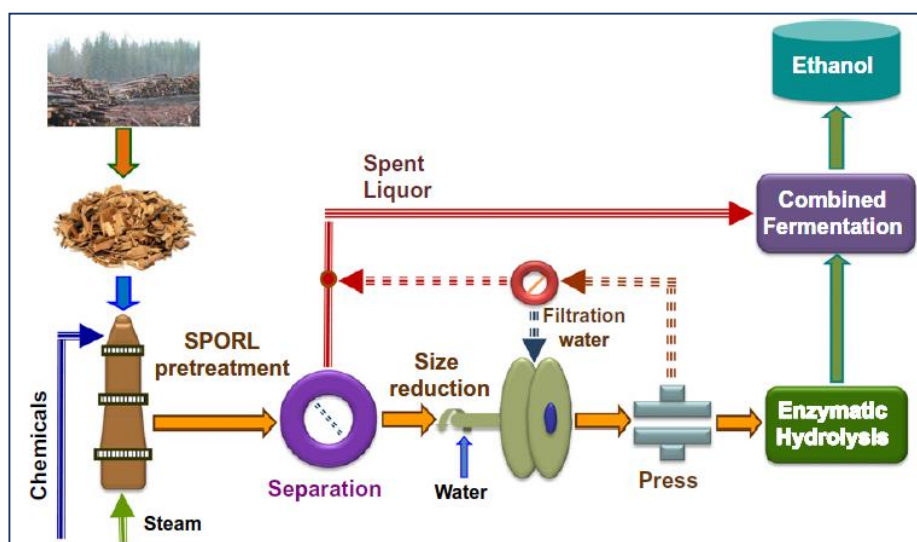


Figura 12 - Diagrama esquemático do processo SPORL completado com a fermentação dos açúcares a etanol [46].

Os termos sulfito e bissulfito são usados indistintamente neste pré-tratamento, porque o que podemos encontrar no licor do pré-tratamento como substâncias ativas podem ser o sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), o bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) ou a combinação de dois ou três reagentes: sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) e dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$  ou  $\text{H}_2\text{SO}_3$ ), dependendo do pH da solução e da temperatura do pré-tratamento [31,44].

O hidrolisado do pré-tratamento é uma solução composta principalmente por açúcares, como a xilose, glucose, arabinose, e/ou os correspondentes compostos na sua forma de oligómeros, furfural e ácido acético, que também são libertados. Tendo em conta as diferentes velocidades de hidrólise/solubilização das hemiceluloses e celulose, usando condições operacionais selecionadas, é possível uma hidrólise relativamente seletiva das hemiceluloses, resultando a celulose e lenhina como resíduo sólido [47].

O SPORL baseia-se nos seguintes princípios: (1) o meio ácido é eficiente na remoção das hemiceluloses, o que é evidenciado pela quantidade de xilose presente no hidrolisado de uma *hardwood* (cujas hemicelulose predominante é a xilana); (2) o meio ácido é eficaz na despolimerização da xilana e da celulose; (3) a sulfonação da lenhina aumenta o seu carácter hidrofílico, melhorando a eficiência das enzimas na etapa da hidrólise; (4) os graus de dissolução das hemiceluloses, a degradação da celulose, e sulfonação e condensação da lenhina são aumentados com o tempo de reação, com a temperatura e com a diminuição do pH [31,44,48].

## II - 3.4.2 *Steam explosion*

Este pré-tratamento consiste no tratamento da biomassa com vapor a alta pressão, seguido da expansão rápida do material (*steam explosion*) e é considerado como um dos métodos de pré-tratamento mais bem sucedidos e promissores para tornar a biomassa mais acessível ao ataque enzimático [10].

A biomassa moída sofre um aquecimento a alta pressão (20-50 bar, 160-270°C) durante segundos ou até mesmo minutos e em seguida, por decompressão súbita até à pressão atmosférica, obtendo-se a desfibração do material [39]. A maioria dos pré-tratamentos *steam explosion* apresenta elevada remoção de hemiceluloses e baixa extração de lenhina [10].

Este procedimento causa a degradação das hemiceluloses e a rutura da lenhina devido à elevada temperatura, aumentando assim o potencial de hidrólise da celulose [3]. Estudos realizados sem adição de ácido reportam remoções de xilose entre 45% e 65% [10].

Solubilizações apropriadas de hemiceluloses e hidrólise de celulose podem ser alcançadas tanto a temperaturas elevadas e curtos tempos de residência (270°C, 1 min), como a temperatura mais baixa e longos tempos de residência (190°C, 10 min) [3].

O pré-tratamento *steam explosion* é afetado pelos seguintes fatores: o tempo de residência, a temperatura, o tamanho de partícula, o tipo de matéria-prima e a adição ou não de catalisador, que pode ser ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>). O catalisador é adicionado a fim de melhorar a hidrólise enzimática e diminuir a formação de compostos que possam inibir os microrganismos fermentativos [3,10]. Assim, a biomassa pode ser tratada em condições mais suaves, que minimizam a produção de compostos inibitórios [10]. A adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), ou dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), normalmente com cargas moderadas (0,3-3% (w/w)), podem promover uma hidrólise enzimática eficaz, diminuindo a formação de compostos inibitórios e conduzir a uma maior remoção de hemiceluloses [3,36].

As principais vantagens do *steam explosion* são o baixo consumo de energia quando comparado com pré-tratamentos físicos. Os métodos mecânicos convencionais requerem até mais 70% de energia do que o pré-tratamento *steam explosion* [3,10].

As principais limitações do processo *steam explosion* são a destruição de uma parte das xilanas, a quebra incompleta da matriz lenhocelulósica, e a formação de compostos secundários que podem ser inibitórios para os microrganismos fermentativos [3,10]. Devido à formação destes produtos de degradação, a biomassa pré-tratada necessita de ser lavada com água para remover os inibidores. A lavagem diminui o rendimento global da sacarificação devido à remoção dos açúcares solúveis, gerados por hidrólise das hemiceluloses [3].

### II - 3.4.3 Pirólise

A pirólise é um processo endotérmico, onde os materiais são tratados a uma temperatura superior a 300°C, pelo que, a celulose se decompõe rapidamente para produzir produtos gasosos tais como H<sub>2</sub>, CO e carvão residual [6,11]. A decomposição é mais lenta e formam-se poucos produtos voláteis a temperaturas baixas. O carvão residual é tratado por lixiviação com água ou com um ácido fraco. O lixiviado de água contém fonte de carbono suficiente para suportar o crescimento microbiano para a produção de bioetanol. A glucose é o principal componente dos lixiviados de água. Uma média de 55% do peso total da biomassa é perdida durante a lixiviação [6].

### II - 3.4.4 AFEX

O pré-tratamento *Ammonia fiber explosion* (AFEX) é um tratamento físico-químico alcalino [36]. Neste processo, o material é embebido em amónia (0,3-2 kg amónia por kg de biomassa seca) a temperaturas moderadas (60-140°C) e alta pressão durante 5 a 45 minutos, seguindo-se uma descompressão rápida [38], similar ao pré-tratamento *steam explosion* [36].

Este pré-tratamento não liberta diretamente os açúcares, mas permite que os polímeros (celulose e hemiceluloses), sejam atacados mais uniformemente por via enzimática [30]. Para que o processo tenha viabilidade económica, é necessário realizar a recuperação eficiente do amoníaco devido ao seu elevado custo. Esta recuperação é possível por evaporação seguida de condensação [6], uma vez que o amoníaco é muito volátil, permitindo assim que a biomassa esteja pronta para a hidrólise enzimática [38].

Este tratamento permite que a hidrólise enzimática e a fermentação alcoólica do substrato aconteçam sem a desintoxicação, uma vez que as reações que ocorrem durante o processo não produzem inibidores (por exemplo, ácidos orgânicos). Dado que não tem lugar libertação de açúcares no pré-tratamento AFEX, o resíduo sólido requer maior carga de enzimas para libertar os açúcares fermentáveis [38]. Em contrapartida, podem libertar-se nesta fase todos os açúcares da biomassa inicial.

Os principais parâmetros que influenciam este processo são a carga de amoníaco, a temperatura, a pressão, o teor de humidade da biomassa e o tempo de residência [6].

O pré-tratamento AFEX é muito eficaz em matéria-prima que contém baixo teor de lenhina, como é o caso de resíduos agrícolas, plantas herbáceas e gramíneas, mas no que diz respeito a substratos com elevado teor de lenhina não é o suficiente [12].

### **II - 3.4.5 *Liquid hot water***

O pré-tratamento *Liquid hot water* é um tratamento hidrotérmico que não necessita da decompressão rápida e não utiliza qualquer catalisador ou produtos químicos [36]. A pressão da água é mantida acima da pressão de vapor à temperatura (160-240°C) e provoca alterações na estrutura do material lenhocelulósico [35].

Este método consiste em solubilizar as hemiceluloses, tornando a celulose mais acessível e evitando a formação de inibidores para as duas etapas seguintes [49]. Para evitar a formação de inibidores, o pH deve ser mantido entre 4 e 7 [35,36], uma vez que nesta gama de pH as hemiceluloses são mantidas na forma de oligómeros, diminuindo assim a formação de monómeros e os respetivos produtos de degradação [35].

Após o tratamento, o produto obtido pode ser filtrado originando duas frações: uma fração de celulose sólida e outra fração líquida rica em açúcares derivados das hemiceluloses [35].

Alguns investigadores verificaram que o pré-tratamento *Liquid hot water* é capaz de remover até 80% das hemiceluloses e melhorar o acesso das enzimas em plantas herbáceas [35,50]. Este processo pode repetir-se, pelo menos duas vezes, levando à otimização do processo. Uma grande parte da lenhina é despolimerizada e solubilizada, mas não se alcança a deslenhificação completa, devido à recondensação de substâncias solúveis derivadas de lenhina [35].

Verifica-se que o *Liquid hot water* tem custos reduzidos, já que não utiliza catalisador e o custo de construção do reator é moderado, devido ao baixo potencial de corrosão. Uma grande vantagem deste processo é que as hemiceluloses e a lenhina solubilizadas e os produtos de degradação estão presentes em concentrações baixas. Comparando com o pré-tratamento *steam explosion*, existe uma crescente recuperação de açúcares e menor formação de produtos inibitórios. A nível industrial, o processo não é muito rentável devido aos elevados consumos de água e energia [35].

## II - 3.5 Pré-tratamento biológico

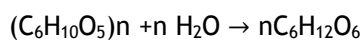
A parede celular das plantas vegetais é muito complexa, o que vai impedir as bactérias e os fungos de destruírem essa barreira protetora. A degradação utilizando enzimas tem potencial na conversão dos açúcares da biomassa em etanol, com rendimentos elevados e um baixo custo de produção, mas este processo biológico é altamente inibido pela existência da lenhina. O conceito de biodeslenhificação traduz-se na degradação biológica da lenhina por microrganismos [10].

O pré-tratamento biológico envolve a utilização de fungos, tais como *brown-*, *white-* e *soft-rot*, que são agentes que degradam a lenhina e polissacáridos da biomassa [36]. O *brown-rot* ataca principalmente a celulose, os outros dois fungos vão atacar a lenhina e a celulose. Os fungos *white-rot* são os mais eficientes para tratar biologicamente o material lenhocelulósico [3].

As grandes vantagens deste pré-tratamento são requerer baixa energia (as reações ocorrem a baixa temperatura) e ser ambientalmente sustentável. Contudo, a taxa de hidrólise após o pré-tratamento biológico é ainda, em geral, muito baixa [3,30]. As desvantagens são: longo tempo de residência (de horas ou até mesmo dias), o que torna a sua aplicação em larga escala muito limitada; muitos dos microrganismos utilizados neste tratamento consomem parte dos hidratos de carbono do material lenhocelulósico durante o crescimento, o que terá um impacto negativo na produção final de açúcar [12,38].

## II - 4 Hidrólise do material lenhocelulósico

Após a realização do pré-tratamento, os hidratos de carbono da biomassa precisam de ser convertidos em açúcares simples antes de sofrer a fermentação. No processo de hidrólise há a quebra de uma molécula por adição de uma molécula de água [36,51]:



Existem dois métodos mais usuais: hidrólise química (hidrólise com ácido diluído ou concentrado) e hidrólise enzimática [45]. Este último apresenta as seguintes vantagens: condições de reação suaves (pH 4,8 e temperatura entre os 45-50°C), altos rendimentos e custos de funcionamento baixos, face à hidrólise química [51].

### II - 4.1 Hidrólise química

A hidrólise química consiste na exposição da biomassa a um produto químico por um período de tempo e temperatura específica, resultando monómeros de açúcar a partir dos polímeros de celulose e das hemiceluloses [52].

Neste tipo de hidrólise, o pré-tratamento e a hidrólise podem ser realizadas num único passo, sendo que os ácidos podem ser adicionados apenas na hidrólise. Existem dois tipos de hidrólise química: ácido diluído e ácido concentrado, cada uma com as suas condições [36]. A comparação entre as vantagens e as desvantagens destes dois métodos é representada na tabela 3.

Tabela 3 - Comparação entre os métodos de hidrólise ácido diluído e a ácido concentrado [52].

Método de hidrólise	Vantagens	Desvantagens
Ácido Concentrado	<ul style="list-style-type: none"><li>• Reação a baixa temperatura</li><li>• Elevado rendimento de açúcares</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Consumo elevado de ácido</li><li>• Corrosão do equipamento</li><li>• Elevado consumo de energia para a recuperação do ácido</li><li>• Tempo de reação longo (2-6h)</li></ul>
Ácido Diluído	<ul style="list-style-type: none"><li>• Baixo consumo de ácido</li><li>• Tempo de reação curto</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Reação a altas temperaturas</li><li>• Baixo rendimento de açúcares</li><li>• Corrosão do equipamento</li><li>• Formação indesejável de subprodutos</li></ul>

## II - 4.2 Hidrólise enzimática

Como já foi referido anteriormente, um dos desafios do processo de bioconversão de materiais lenhocelulósicos em bioetanol é ultrapassar a resistência natural da biomassa à hidrólise enzimática. A celulose é intrinsecamente resistente ao ataque enzimático e em combinação com a lenhina e as hemiceluloses, que constituem um “escudo” protetor em torno da celulose, a hidrólise enzimática da celulose é muito limitada [53]. Os pré-tratamentos da biomassa lenhocelulósica visam precisamente remover esse escudo e expor a celulose.

A hidrólise enzimática da celulose é realizada por enzimas designadas celulase que são de elevada especificidade. Os produtos da hidrólise são normalmente açúcares redutores, incluindo a glucose [3].

Uma das vantagens desta hidrólise é seu baixo custo quando comparado com as hidrólises químicas, uma vez que as condições de tratamento são moderadas (pH 4,8 e uma temperatura 45-50°C) [36], não havendo problemas de corrosão. Tanto as bactérias como os fungos podem produzir as celulases para a hidrólise dos materiais lenhocelulósicos [3].

A figura 13 apresenta um perfil típico da conversão da celulose em açúcares. De realçar que a atividade das celulases depende do grau de polimerização, da cristalinidade da celulose e da sua agregação com as hemiceluloses e a lenhina [1].

### II - 4.2.1 Mecanismo de hidrólise das celulases

A hidrólise enzimática da celulose é uma reação heterogénea, em que enzimas convertem a celulose em açúcares fermentáveis [1]. Este é um processo complexo, visto que é necessário o contacto físico entre a enzima e o substrato para as celulases levarem a cabo a sua atividade hidrolítica [54]. Esta etapa importante consiste em três passos: as enzimas adsorvem na superfície da celulose, desempenhando diversas ações catalíticas; a biodegradação da celulose a açúcares fermentáveis; depois de terminada a reação, a celulase separa-se dos substratos (desadsorção) adsorvendo noutra parte da celulose [1,54], como é apresentado na figura 13.

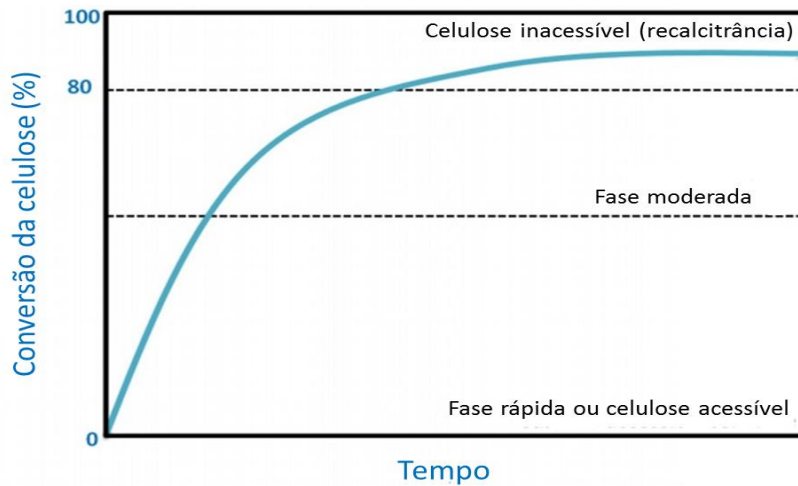


Figura 13 - Percurso do tempo típico da hidrólise enzimática da celulose [adaptado 55].

As celulasas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia hidrolisando a celulose [36,56]. Pelo menos três grandes grupos de enzimas estão envolvidos no processo de hidrólise enzimática da celulose (figura 14): (1) endoglucanase (EG, endo-1,4-D-glucanohidrolase, ou EC 3.2.1.4) que ataca as regiões de baixa cristalinidade na fibra de celulose; (2) exoglucanase ou celobiohidrolase (CBH, 1,4- $\beta$ -D-glucana ou celobiohidrolase, ou EC 3.2.1.91) que degrada as extremidades da cadeia de celulose; (3)  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) que hidroliza a celobiose para formar a glicose [6,56,57]. Dependendo dos substratos, para além destas três enzimas ainda pode ser adicionado um conjunto de outras enzimas para auxiliar o ataque às hemiceluloses, tais como glucuronidase, acetilesterase, xilanase,  $\beta$ -xilosidase, galatomanase e glucomananase [3].

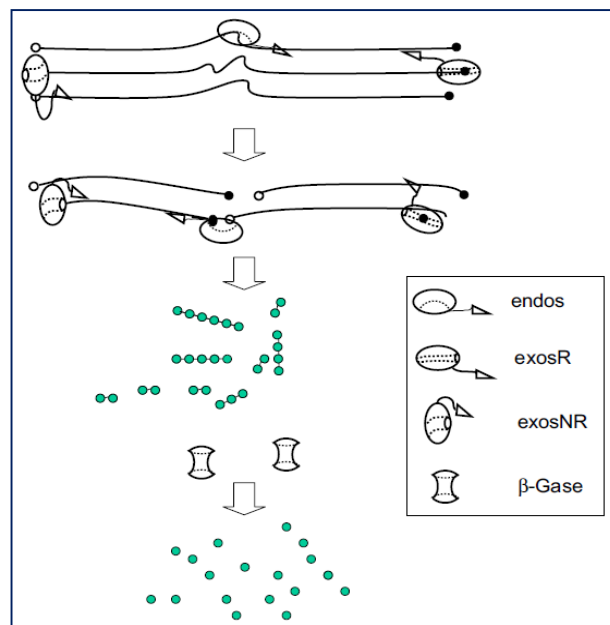


Figura 14 - Mecanismo da hidrólise enzimática da celulose [58].

## **II - 4.2.2 Fatores que afetam a hidrólise enzimática**

A hidrólise enzimática do material lenhocelulósico tem-se confrontado com inúmeros obstáculos que enfraquecem a performance das enzimas [59]. Os fatores que afetam a hidrólise enzimática da celulose são: concentração de substrato, atividade da celulase e as condições de reação, tais como a temperatura, pH, bem como outros parâmetros. Para melhorar o rendimento e a taxa da hidrólise enzimática, a investigação tem-se centrado na otimização do processo de hidrólise e no aumento da atividade das celulases [57,60].

Além disso, os fatores limitantes que condicionam a hidrólise enzimática do material lenhocelulósico foram divididos em dois grupos: características estruturais da biomassa e mecanismo enzimático. No entanto, a natureza recalcitrante do substrato e a multiplicidade de enzimas torna difícil compreender totalmente as interações entre enzimas e substrato [1]. Provou-se que diversas características da biomassa podem dificultar a velocidade e extensão da hidrólise pelas celulases, apesar da ação destas também alterar as características do substrato à medida que a hidrólise se realiza [1,61].

### **II - 4.2.2.1 Substrato**

O substrato decompõe-se em celulose, hemiceluloses e lenhina, embora ainda não se compreenda cabalmente até que ponto é que estas características têm impacto na velocidade de hidrólise da celulose [61].

Um dos principais fatores que influencia o rendimento e a velocidade inicial da hidrólise da celulose pelas enzimas é a concentração do substrato. Para níveis baixos de substrato o rendimento e a velocidade de reação de hidrólise aumenta com a concentração do substrato. No entanto, para elevadas concentrações de substrato, pode haver inibição pelo substrato, o que diminui a velocidade da hidrólise [3]. A sensibilidade das celulases à biomassa depende das características estruturais e físico-químicas do substrato [1,62]. As características químicas são as composições dos seus constituintes, já referidos anteriormente. Relativamente às características físicas, deve referir-se a área superficial (relacionada com o tamanho das partículas), a cristalinidade, a distribuição da lenhina na matriz da biomassa, o grau de polimerização da celulose, o volume dos poros e a distribuição de tamanhos dos poros. Este conjunto de características determinam a área superficial acessível às enzimas e outros reagentes [62].

O acesso das enzimas ao material lenhocelulósico tem efetivamente um papel importante na melhoria da hidrólise enzimática. As celulases adsorvem à superfície das partículas de substrato antes da hidrólise se iniciar. A estrutura dessas partículas, em combinação com o tamanho e

geometria das celulases, determinam se as ligações  $\beta$ -glucosídicas estão ou não acessíveis ao ataque enzimático [1]. A celulose altamente cristalina é menos acessível ao ataque por celulases do que a celulose amorfa [62].

A lenhina, de natureza hidrofóbica e associada às microfibrilas de celulose, é identificada como sendo o principal inibidor do ataque enzimático à celulose, evitando a acessibilidade das enzimas [62]. Estudos demonstram que a digestibilidade da biomassa é aumentada com a remoção da lenhina [63]. A deslenhificação causa um intumescimento da biomassa, rutura da estrutura da lenhina e, subsequentemente, leva a uma aumento da área superficial interna e volume médio dos poros. Por outro lado, a adsorção irreversível das enzimas à lenhina prejudica o seu desempenho [1,62].

A remoção das hemiceluloses também melhora a digestão da celulose para um dado conteúdo em lenhina, por aumento da acessibilidade das celulases à celulose [62].

## II - 4.2.2.2 Celulases

A inibição do complexo de celulases pelo produto final, a inativação térmica e a adsorção irreversível das celulases, poderão também estar relacionados com a atuação das celulases. A atividade das celulases é inibida pela celobiose e, em menor extensão, pela glucose, quando existentes em excesso (inibição por produto). Para diminuir a inibição, existem diversos métodos, tais como a utilização de elevadas concentrações de enzimas e a adição de  $\beta$ -glucosidases durante a hidrólise [1].

O aumento da concentração de celulases no processo, até um certo nível, pode melhorar o rendimento e a velocidade da hidrólise, mas irá aumentar significativamente o custo do processo [3]. Na prática, dependendo do tipo de substrato a ser hidrolisado, a concentração das celulases costuma variar entre 7 e 33 FPU/g de substrato [64] - De acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, 1 FPU é a quantidade de enzima que consegue libertar o valor de 2.0 mg de açúcar redutor, sob a forma de glucose, de uma tira de 50 mg de papel de filtro (correspondente a 4% de conversão) em 60 minutos à temperatura e pH ótimos da enzima [9]. Se a hidrólise for conduzida em descontínuo (hidrólise e fermentação efetuadas separadamente e sequencialmente), onde não há a remoção de açúcares, geralmente, é necessária uma maior quantidade de enzima. Neste caso, quando podem ser produzidas concentrações inibitórias de açúcares deve-se adicionar  $\beta$ -glucosidases para a conversão da celobiose num produto menos inibidor, a glucose [1].

### **II - 4.2.2.3 Condições da reação**

As condições da hidrólise enzimática do material lenhocelulósico são normalmente um pH aproximado de 4,8 e a uma temperatura de 45-50°C. Geralmente, a mistura reacional é sujeita a agitação de forma a conseguir uma mistura eficiente, apesar de não pode ser muito intensa, pois poderá levar à inativação das enzimas. O uso de baixa concentração de substrato pode conduzir a um processo pouco eficiente, e uma elevada concentração de celulasas pode aumentar os custos. No entanto, a razão substrato/enzima não deve ser demasiado elevada (inibição) [1].

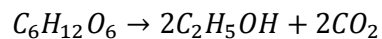
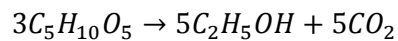
A hidrólise pode ser otimizada ao adicionar certos surfactantes, pois estes são capazes de modificar as características da celulose e minimizar a ligação irreversível da celulase com a celulose e a lenhina [3].

As enzimas, eventualmente, podem ser recuperadas e recicladas, apesar da qualidade das enzimas diminuir gradualmente. O material lenhocelulósico depois de sujeito ao pré-tratamento químico pode conter compostos inibidores, havendo necessidade de os remover [1].

## II - 5 Fermentação

A fermentação envolve uma variedade de microrganismo que utilizam os açúcares fermentáveis para produzir álcool etílico e outros subprodutos [51]. Da longa diversidade de microrganismos que já foram descobertos, nem todos conseguem metabolizar os dois tipos de açúcares (pentoses e hexoses) que são importantes neste processo de produção de bioetanol. Por exemplo, a bactéria *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais utilizado nesta etapa, no entanto, só fermenta hexoses. Ainda está em investigação a mutação de microrganismos com o objetivo de fermentar hexoses e pentoses em simultâneo [65].

De acordo com as seguintes reações, teoricamente, o rendimento máximo é 0,51 kg de etanol e 0,49 kg de dióxido de carbono por kg de açúcar [50]:



### II - 5.1 Configuração das etapas do processo de produção de bioetanol

Para concluir o processo de produção de bioetanol, a última operação é a fermentação. Assim, quando a biomassa é submetida à hidrólise enzimática são possíveis diferentes níveis de integração de processos, como é apresentado na figura 15. Em todos os casos, o pré-tratamento é requerido, a fim de tornar a celulose mais acessível às enzimas e para hidrolisar as hemiceluloses [1].

A conformação onde as etapas são individuais e sequenciais denomina-se por Hidrólise e Fermentação Separadas (ou sequenciais) (SHF - *Separate Hydrolysis and Fermentation*), e tem sido o processo mais investigado. A realização da fermentação das pentoses terá de ser realizada em unidades independentes, uma vez que os microrganismos fermentadores de pentoses fermentem pentoses e hexoses mais lentamente que microrganismos que só assimilam hexoses. Além disso, os microrganismos anteriores são mais sensíveis a inibidores e ao etanol produzido [1,65].

A maior vantagem deste método é que é possível conduzir a hidrólise da celulose e fermentação nas suas condições ótimas [36]. A sua desvantagem é a inibição da atividade das celulasas e  $\beta$ -glucosídase pelos açúcares libertados, celobiose e glucose [36]; isto é, o problema nesta operação é que a glucose e a celobiose permanecem no mesmo meio que a celulose e as

celulases e estes mono e dissacáridos inibem a ação da celulase. Mesmo que os rendimentos possam ser melhorados adicionando grandes quantidades de celulase, esta estratégia aumenta o custo do processo. Para contornar este problema adiciona-se o microrganismo fermentativo ao mesmo reator onde estão a ser produzidos os açúcares. Desta forma, a glucose e a celobiose são rapidamente fermentadas a etanol, reduzindo drasticamente a acumulação destes produtos e de custos dos equipamentos e, assim, dos custos associados à produção de etanol [7]. Este procedimento denomina-se sacarificação e fermentação simultâneas (SSF - *Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Este processo apresenta diversas vantagens: (1) uma maior velocidade de hidrólise, evitando o problema de inibição das enzimas pelo produto, (2) necessita de menor quantidade de enzimas, (3) maior rendimento de produto; (4) reduz o risco de contaminação e (5) diminui o número de reatores envolvidos. No entanto, como existe a necessidade de trabalhar em condições de hidrólise que não as ótimas, e não é possível utilizar concentrações de substrato muito elevadas, devido ao problema de mistura mecânica e insuficiente transferência de massa, os custos do processo aumentam [1,3,36].

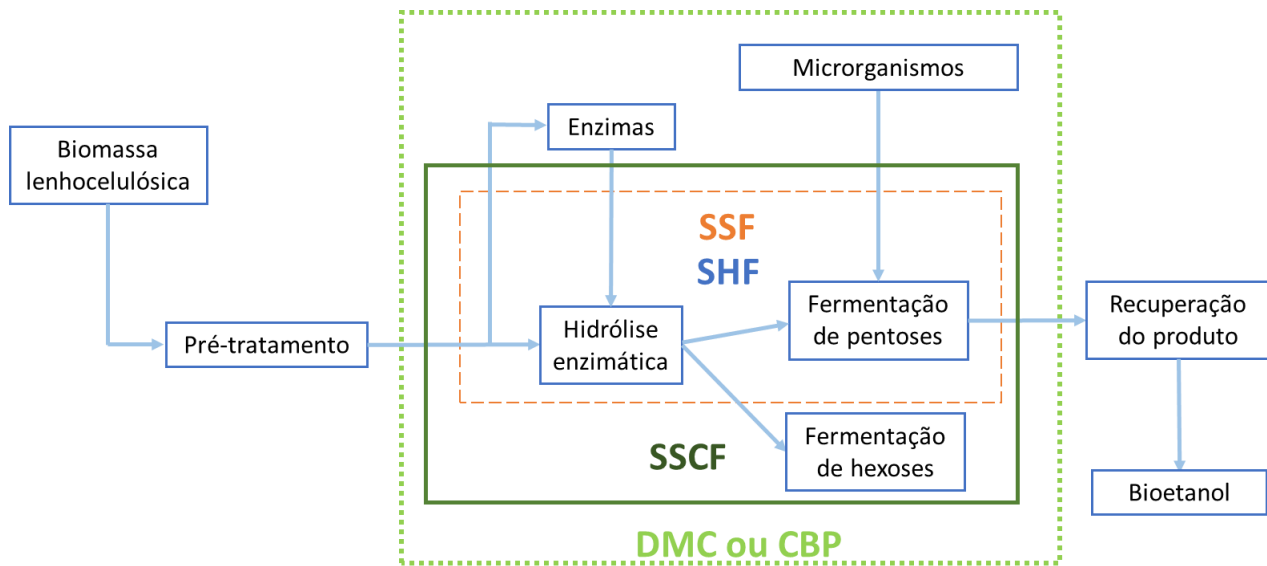
Apesar da temperatura do processo SSF poder não ser a temperatura ótima para ambos os processos envolvidos, o desempenho é melhor em termos de velocidades, rendimentos e concentrações de etanol do que na hidrólise separada à temperatura ótima da hidrólise [7].

Outro modo de operação é a sacarificação e co-fermentação em simultâneo (SSCF - *Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*), onde co-fermentação se refere à fermentação simultânea de hexoses e pentoses [1].

Em todos os métodos considerados até este ponto, é requerida uma unidade operacional para produção de enzimas. No bioprocessamento consolidado (CBP - *Consolidated Bioprocessing*), também conhecido como conversão microbiana direta (DMC - *Direct Microbial Conversion*) [1], combina-se a produção de celulases com a hidrólise da celulose e a fermentação da glucose num único passo. A principal vantagem deste processo é a redução do número de reatores, simplificando a operação e reduzindo custos de produtos químicos [1]. Este processo é baseado na utilização de mono- ou co-culturas de microrganismos que fermentam a celulose a etanol.

A configuração CBP parece ser uma forma alternativa com enorme potencial e sendo o ponto final lógico da evolução da produção de etanol a partir de biomassa lenhocelulósica [1]. No entanto, não existem microrganismos ou combinações compatíveis de microrganismos que produzam celulases e outras enzimas nos elevados níveis requeridos e também produzam etanol nas elevadas concentrações e rendimentos necessários, embora alguns microrganismos já combinem múltiplas funções [1]. As desvantagens são rendimentos baixos de etanol, causados

pela formação de subprodutos (ácido láctico) e baixa tolerância dos microrganismos para o etanol (3,5% (w/w)) [36].



**Figura 15** - Esquema geral do processo para a produção de etanol a partir de biomassa lenhocelulósica, incluindo as opções de integração de processos [adaptado de 1,65].

# Capítulo III - Parte experimental

## III - 1 Materiais e Reagentes

### III - 1.1 Matéria-prima

Neste trabalho, a matéria-prima utilizada foi a *Cytisus striatus* (Figura 16), conhecida por giesta amarela que é um dos arbustos mais abundante na parte ocidental da Península Ibérica e Noroeste de Marrocos. Em Portugal pode-se encontrar em todo o território continental. Cresce na floresta, terrenos baldios e abandonados pela agricultura, encostas pedregosas, e bermas de caminhos; é frequente em ambiente rupestres. É utilizada no fabrico de vassouras, como combustível e como planta medicinal [66]. A giesta é uma planta arbustiva de 1 a 3 metros de altura, ramificada, caducifólia, com ramos abundantes, estriados e flexíveis [66, 67].

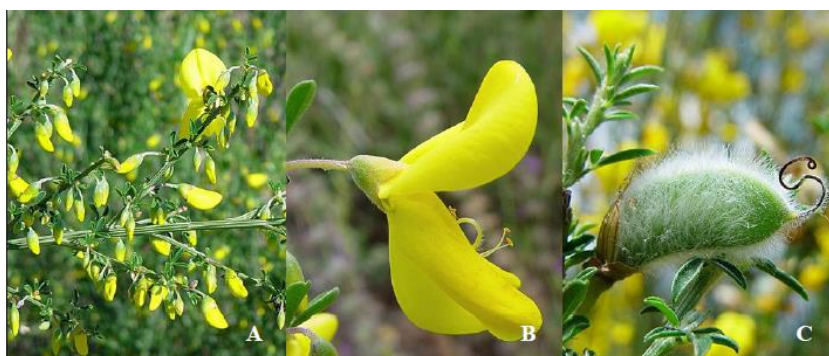


Figura 16 - A) *Cytisus striatus* em floração; B) Flor; C) Fruto [66].

A giesta foi colhida em Setembro de 2012, tendo-se escolhido ramos de diâmetro 5 mm e 30 mm, que de seguida foram descascados e triturados, como mostra a figura 17.



Figura 17 - Ramos de Giesta amarela cortados (a) e Giesta triturada (b).

### **III - 1.2 Material de Laboratório**

Na realização deste trabalho utilizou-se material de vidro, placas de aquecimento e de agitação, um desintegrador/triturador e, ainda um banho termostático com polietilenoglicol onde os reatores do pré-tratamento são colocados. Os reatores são de aço inox e apresentam um volume total de 200 mL. Os equipamentos específicos dos métodos analíticos serão descritos posteriormente.

### **III - 1.3 Reagentes**

A lista dos reagentes químicos utilizados neste trabalho encontra-se na tabela 4.

Tabela 4 - Reagentes utilizados neste trabalho.

Reagentes	Fórmula química	Propriedades
Bissulfito de sódio	NaHSO <sub>3</sub>	Massa molecular: 104,061 g/mol Pureza: 99% Marca: Sigm Aldrich CAS n°:7631-90-5
Ácido sulfúrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Massa molecular: 98,08 g/mol Pureza: 96% Marca: Panreac CAS n°:7664-93-9
Permanganato de potássio	KMnO <sub>4</sub>	Massa molecular: 158,03 g/mol Pureza: ≥ 99% Marca: BDH Laboratory Supplies CAS n°: 7722-64-7
Iodeto de potássio	KI	Massa molecular: 166,0028 g/mol Pureza: 99,0% Marca: Labor Spirit CAS n°: 7681-11-0
Ácido cítrico monohidratado	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ·H <sub>2</sub> O	Massa molecular: 210,14 g/mol Pureza: 99,5% Marca: Panreac CAS n°: 5949-29-1
Acetato tri-sódio di-hidratado	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Massa molecular: 294,10 g/mol Pureza: 99% Marca: Panreac CAS n°: 6132-04-3
Tiosulfato de sódio pentahidratado	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Massa molecular: 248,18 g/mol Pureza: ≥ 99,5% Marca: Merck CAS n°: 7772-98-7
D -Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Massa molecular: 108,16 g/mol Pureza: 99,5% Marca: Pronolab CAS n°: 50-99-7
Celobiose	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Massa molecular: 342,30 g/mol Pureza: 99,5% Marca: Merck CAS n°: 528-50-7
D-Xilose	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Massa molecular: 150,13 g/mol Pureza: 99,5% Marca: Merck CAS n°: 58-86-6
Azida de sódio	NaN <sub>3</sub>	Massa molecular = 65,01 g/mol Pureza: ≥ 99,5% Marca: Sigma-Aldrich CAS n°: 26628-22-8

### III - 1.4 Complexo enzimático

Para a realização da hidrólise enzimática do resíduo sólido utilizou-se um complexo enzimático, isto é, um cocktail de enzimas apropriado para hidrolisar o material lenhocelulósico. Neste caso foi utilizado o kit de enzimas para a produção de etanol celulósico da Novozymes®, constituído por 6 soluções como se mostra na figura 18. As principais características destas enzimas encontram-se enumeradas na tabela seguinte (tabela 5).



Figura 18 - Kit de enzimas etanol celulósico da Novozymes®.

Tabela 5 - Classificação das enzimas e as condições recomendadas [68].

Número NS	Tipo de enzima	Densidade <sup>1</sup> (g/ml)	Gama de pH	Temperatura (°C)	Dosagem (%w/w (TS)) <sup>2</sup>
NS 22086 (Novozymes)	Complexo de celulase	1,15	5,0 - 5,5	45 - 50	1-5%
NS 22083 (Novozymes)	Xilanase	1,09	4,5 - 6,0	35 - 55	0,05-0,25%
NS 22118 (Novozymes)	β- glucosidase	1,2	2,5 - 6,5	45 - 70	0,2-0,6%
NS 22119 (Novozymes)	Complexo de enzima	1,19	4,5 - 6,0	25 - 55	0,05-0,4%
NS 22002 (Novozymes)	β- glucanase e xilanase	1,20	5,0 - 6,5	40 - 60	0,4-2%
NS 22035 (Novozymes)	Glucoamilase	1,15	4,5 - 5,5	60 - 70	0,01-0,06%

1) Valores de densidade aproximados

2) TS = Sólidos totais

Como as enzimas apresentam uma elevada viscosidade, a dosagem a aplicar é bastante baixa e a quantidade de biomassa a tratar em cada tubo falcon (usado como bioreator) também é baixa preparou-se uma solução diluída de cada solução original, adicionando a cada tudo de falcon a dosagem enzimática mais baixa recomendada pela Novozymes®.

## III - 2 Procedimentos Experimentais

### III - 2.1 Preparação da matéria-prima

Antes de efetuar qualquer análise, a giesta sofreu uma redução de tamanho utilizando um moinho de facas (Retsch Mühle - West Germany), equipado com um crivo de 10 mm de abertura (figura 19) e de seguida, o material obtido foi seco à temperatura ambiente e conservada num saco bem fechado para não ganhar humidade.



Figura 19 - Crivo com abertura de 10 mm.

### III - 2.2 Pré-tratamento ao sulfito

Depois da preparação (seção III-2.1) do material lenhocelulósico, este foi submetido a um pré-tratamento com bissulfito de sódio ( $\text{NaHSO}_3$ ), com e sem adição de ácido sulfúrico, obedecendo a um plano experimental. As condições experimentais estudadas foram as seguintes: as carga de bissulfito de sódio (relativamente à massa de biomassa, base seca) aplicadas foram de 0%, 1%, 2%, 3% e 4% (m/m), enquanto que a carga de ácido sulfúrico foram de 0%, 0.75%, 1.5%, 2.25% e 3% (m/m).

Os pré-tratamentos foram realizados num banho termostaticado de polietilenoglicol (PEG) com agitação constante, onde foram imersos os reatores, como mostra a figura 20. Nos reatores colocou-se 25 g de biomassa (base seca) e 125 mL de solução aquosa, correspondente a um rácio sólido:líquido de 1:5,02 para os ensaios às temperaturas 150°C, 160°C e 180°C. Nos ensaios a 170°C e 190°C utilizou-se um rácio sólido:líquido de 1:5,08, colocando 20 g de biomassa e 100 mL de solução. Os reatores foram então fechados e colocados no banho que se encontrava à temperatura ambiente. O perfil da temperatura aplicado foi o seguinte: elevação gradual da temperatura até 90°C durante 60 minutos; um patamar de 60 minutos a 90°C (impregnação); subida gradual até à temperatura pretendida (150°C, 160°C, 170°C, 180°C e 190°C) em 90 minutos; e por fim um patamar de 30 minutos com amostras retiradas a diferentes tempos durante esses 30 minutos, sendo arrefecidas em água fria.

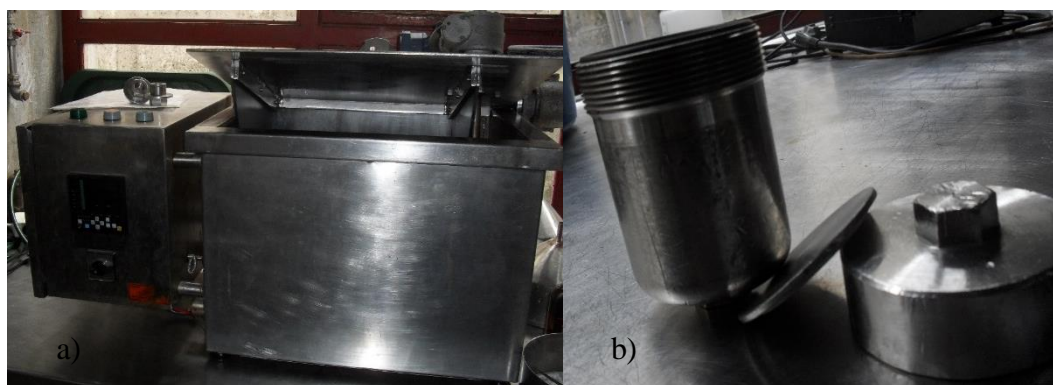


Figura 20 - Banho termostatizado de PEG 400 (a) e reatores de aço inox de 200 mL (b).

Este pré-tratamento visa remover a lenhina e as hemiceluloses, reduzir a cristalinidade da celulose, e aumentar a porosidade do material lenhocelulósico para favorecer a entrada das enzimas na etapa posterior de hidrólise enzimática [60]. A tabela 6 resume as condições usadas no pré-tratamento ao sulfito.

Tabela 6 - Condições do pré-tratamento ao sulfito (relação sólido:líquido aproximadamente 1:5).

Bissulfito de sódio (% (m/m))	Ácido sulfúrico (% (m/m))	Temperatura (°C)	pH inicial	Tempo de pré-tratamento a Tmax (min)
2	1,5	150	1,61	0; 15; 30
4	3		1,49	0; 15; 30
1	0,75	160	1,89	7,5; 22,5
	2,25		1,44	7,5; 22,5
3	0,75		2,12	7,5; 22,5
	2,25		1,63	7,5
2	3	170	1,55	15
	0		4,08	15
	1,5		1,85	0; 15; 30
4	1,5		2,06	15
0	1,5		1,66	15
1	0,75		180	2,04
	2,25	1,89		22,5
3	0,75	1,44		7,5; 22,5
	2,25	2,25		7,5
	2,25	2,12		22,5
	2,25	1,63		7,5; 22,5
2	1,5	190	1,77	0; 15; 30
0	0,75		1,82	0; 15; 30

Após o pré-tratamento, realizou-se a leitura do pH final do hidrolisado de cada pré-tratamento e adicionou-se água destilada com igual volume ao de licor, de seguida o resíduo sólido foi triturado num desintegrador de laboratório durante 1 minuto à rotação mais elevada, finalmente foi lavado com água por filtração sob vácuo num funil de Büchner e papel de filtro, até a água da lavagem ficar límpida. Os sólidos resultantes incluindo o papel de filtros foram

pesados e o teor de matéria seca (TMS) foi determinada como descrito na secção III - 3.1. O rendimento em resíduo sólido foi determinado para cada um das amostras, através da seguinte fórmula:

$$\text{Resíduo sólido} = \frac{\left( (massa\ total - massa\ do\ saco) \times \frac{TMS}{100} \right) - massa\ seca\ do\ papel\ de\ filtro}{massa\ inicial\ de\ madeira\ (base\ seca)} \times 100 \quad (\text{eq.1})$$

O Índice Kappa do resíduo sólido de cada reator foi de acordo com o exposto na secção III - 3.2, com o objetivo de obter uma estimativa para o teor de lenhina. Depois de desfragmentado, o resíduo sólido, sempre mantido humedecido, foi posteriormente submetido à hidrólise enzimática, de acordo com o descrito na secção seguinte (secção III - 2.3). Os compostos existentes no hidrolisado do pré-tratamento foram submetidos a tratamento em autoclave durante 1 hora a 121°C acertando previamente o pH para 2. Este procedimento decorreu da constatação de que uma parte dos polissacáridos existentes no hidrolisado ácido estava sob a forma de oligómeros, sendo necessário recorrer a um tratamento térmico extra para os converter para monómeros. Os hidrolisados dos pré-tratamentos bem como os hidrolisados enzimáticos foram analisados por HPLC (secção III - 3.4), a fim de determinar o rendimento em açúcares, e monitorizar a libertação de produtos de degradação, nomeadamente ácidos orgânicos (acético e fórmico) e inibidores de fermentação (furfural e hidroximetilfurfural).

### III - 2.3 Hidrólise Enzimática

Depois do pré-tratamento do material lenhocelulósico, seguiu-se a hidrólise enzimática das biomassas pré-tratadas. Para isso foi preparado um tampão citrato de pH 5,5 a 50 mM ao qual foram adicionados 4 ppm de azida de sódio com a função de antibiótico, para prevenir a proliferação bacteriana ao longo dos ensaios. O tampão e as biomassas foram colocados em tubos falcon de 50 mL, aos quais foi adicionado o cocktail enzimático (cuja preparação é descrita na secção III-1.4), perfazendo cada tubo o volume total de 40 mL, com um teor de sólidos de 1%. Por fim, uma colher de esferas de vidro de 0,3 mm foi adicionada a cada tubo para melhorar a agitação. Todos os tubos foram homogeneizados no vórtex e introduzidos num banho termostaticado a 50°C (figura 21) durante 7, 15, 24, 48, 96h, sendo que se realizaram duplicados de cada tubo.

A atividade das celulasas foi determinada de acordo com o Procedimento Laboratorial do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) para a Determinação de Atividades de Celulasas, tendo-se obtido o valor de 66,14 FPU/mL [9]. Considerando o volume de solução de enzima tomada, a carga de celulasas foi de 3 FPU/g de biomassa.

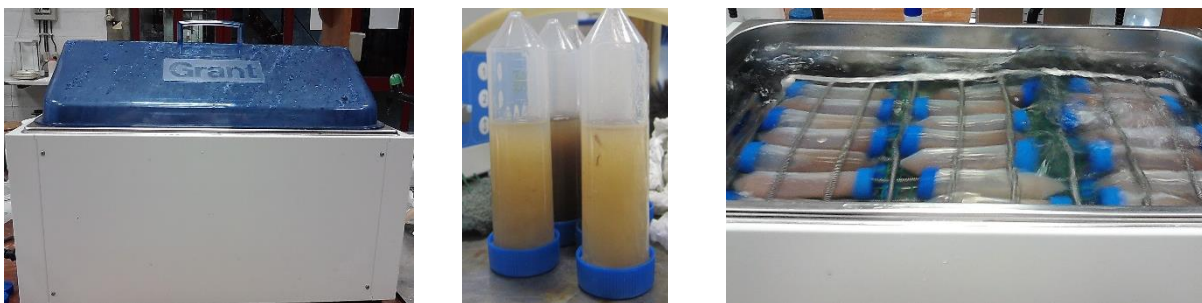


Figura 21 - Ilustração do procedimento da hidrólise enzimática.

### III - 3 Métodos Analíticos

Nesta seção apresentam-se os métodos analíticos adotados neste trabalho para caracterizar as matérias-primas e os produtos dos processos de transformação.

#### III - 3.1 Determinação do teor da matéria seca

Os teores de matéria seca (TMS) determinados ao longo do procedimento experimental seguiram a norma ISO 638:08. O TMS é definido como a razão entre a massa da amostra, depois da secagem, a uma temperatura de  $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em condições específicas, e a massa correspondente antes da secagem; é normalmente expressa em percentagem. Para algumas amostras, a determinação do teor de matéria seca foi realizada utilizando uma balança de infravermelhos (IR), que simula o processo acima referido.

#### III - 3.2 Quantificação da lenhina solúvel

A quantificação da lenhina solúvel no hidrolisado ácido mostra-nos a quantidade de lenhina que o pré-tratamento ao sulfito conseguiu retirar da biomassa em estudo, apesar de uma grande parte da lenhina ter ficado condensada nas fibras da madeira.

Para esta quantificação recorreu-se ao procedimento analítico do NREL para a Determinação de hidratos de carbono estruturais e a lenhina na biomassa [69], que consiste na medida da absorvância dos hidrolisados, realizada a um comprimento de onda de 205 nm, em células de

quartzo com percurso ótico de 1 cm, usando um espectrofotómetro de UV-Visível *Thermo Scientific Helios Omega*. Foi assumido o valor de absorvância de  $110 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para a lenhina solúvel [70]. As leituras foram feitas em duplicado, realizando diluições apropriadas, de modo a ler as absorvâncias na gama de 0,2 a 0,7. Uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 3% (w/w) (solução branco) foi utilizada para diluir as amostras em estudo. Assim, a concentração de lenhina solúvel (LS) foi calculada de acordo com a lei Lambert-Beer, tendo em conta o fator de diluição.

A percentagem de lenhina libertada para os hidrolisados do pré-tratamento (%LS), relativamente à madeira inicial foi calculada da seguinte forma:

$$\% LS = \frac{LS \times Vt}{P} \times 100$$

Onde:

%LS = percentagem de lenhina solúvel (%)

Vt = volume total de hidrolisado (L)

P = peso inicial da madeira em base seca (g)

### III - 3.3 Determinação do Índice Kappa

Para avaliar o desempenho do pré-tratamento é importante estimar o teor de lenhina residual do resíduo sólido. Considerando a morosidade do ensaio da lenhina de klason, optou-se pelo ensaio do índice kappa.

Para esta determinação recorreu-se ao procedimento descrito na norma Portuguesa NP-3186/95, que tem por objetivo a determinação do teor de lenhina residual em pastas.

O índice kappa está relacionado com a suscetibilidade dos compostos à oxidação pelo permanganato de potássio, pelo que para além da lenhina, são oxidados os restantes compostos suscetíveis de oxidação nas condições do ensaio.

### III - 3.4 HPLC

Utilizou-se a técnica HPLC (*High Performance/Pressure Liquid Chromatography*) para quantificar a libertação de açúcares e os produtos de degradação durante o pré-tratamento e a hidrólise enzimática.

Neste método foi utilizada uma coluna (Bio-Rad)<sup>®</sup> Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) cheia com uma matriz à base de polímero (poliestireno divinilbenzeno) que separa os compostos usando uma técnica cromatográfica de partição moderada por iões. Os compostos são injetados na coluna, onde ocorre a separação, e posteriormente detetados através de um medidor de índice refração (RI), e por um detetor ultravioleta (UV) a um comprimento de onda de 280 nm, obtendo-se os respetivos cromatogramas, como é ilustrado na figura 22.

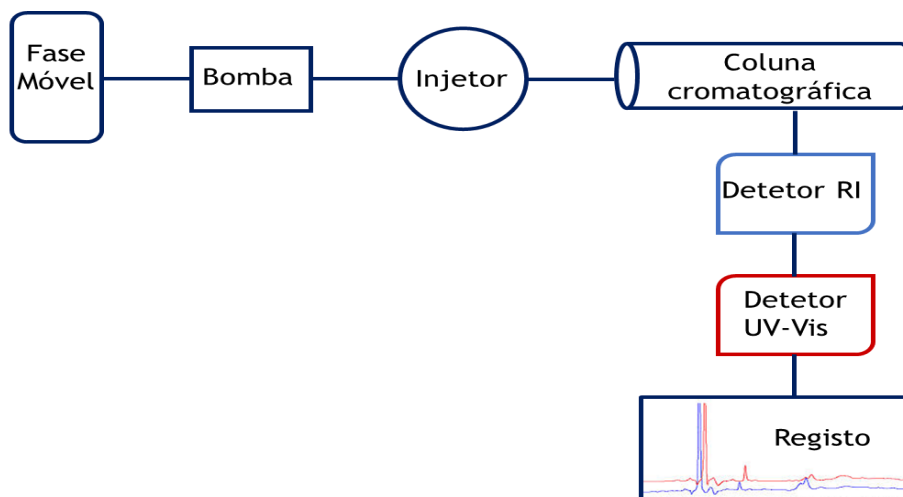


Figura 22 - Representação esquemática do equipamento HPLC [adaptado de 9,71].

Antes de efetuar as determinações desejadas foram preparadas soluções padrão de glucose, xilose, celobiose e ácido acético (1, 2, 4, 10 mg/mL), que foram injetadas e obtidas as retas de calibração, que traduzem a relação entre as áreas dos picos e a respetiva concentração da solução em análise. Na figura 23 estão representadas as retas de calibração obtidas para a glucose, xilose, celobiose e ácido acético, bem como as respetivas equações e coeficientes de correlação linear. Efetuou-se a calibração do ácido acético com a intenção de controlar a geração de produtos de degradação na fase de hidrólise.

Para o furfural, HMF e ácido fórmico utilizaram-se as restas de calibração disponíveis no laboratório onde foi realizado o presente estudo.

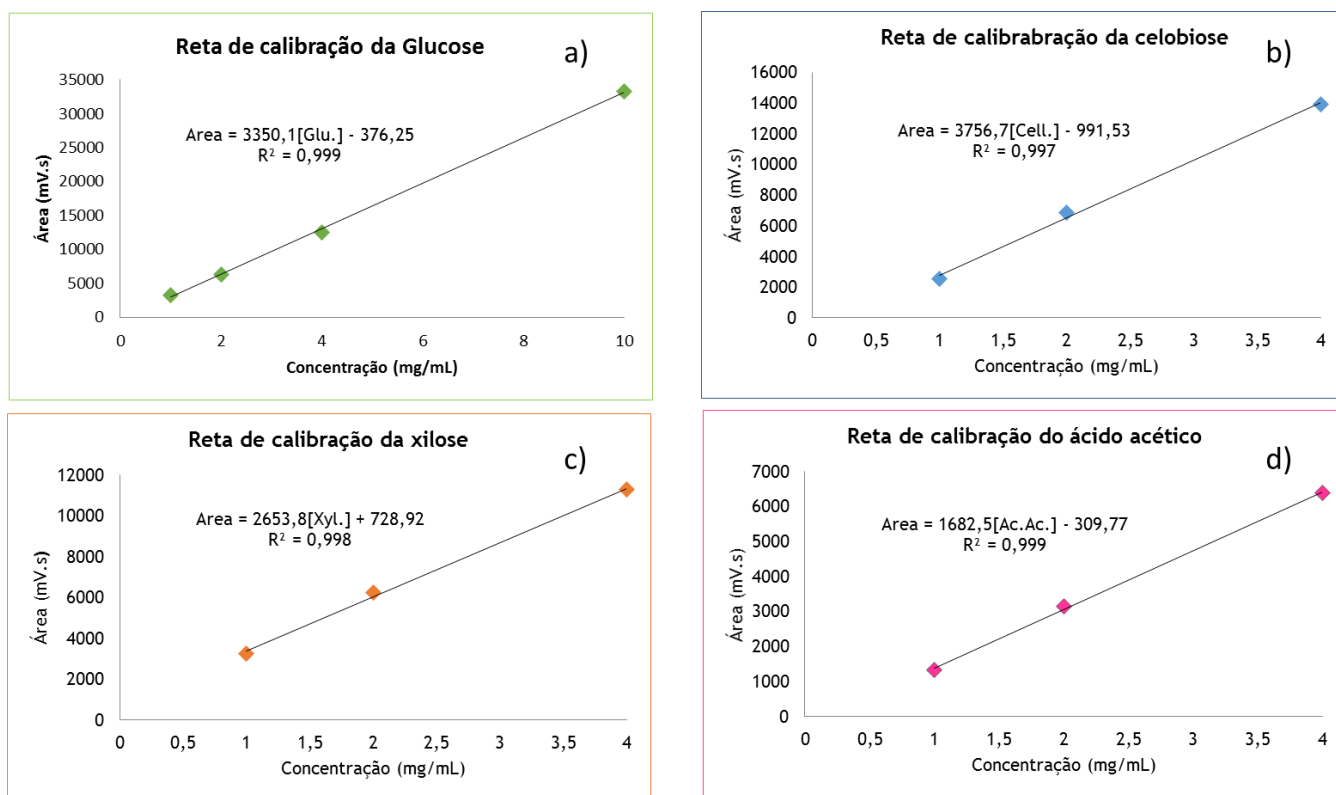


Figura 23 - Retas de calibração obtidas para a glucose (a), celobiose (b), xilose (c) e ácido acético (d) com caudal 0,4 mL/min.

### III - 3.4.1 Determinação de açúcares no HPLC

As amostras analisadas no HPLC foram previamente filtradas através de membranas de nitrocelulose com uma porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ . Estas amostras foram eluídas num sistema isocrático com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 5 mM, a 60 °C, com um caudal de 0,4 mL/min para o hidrolisado do pré-tratamento e 0,6 mL/min para os hidrolisados enzimáticos. O volume de injeção foi de 50  $\mu\text{m}$  e os açúcares foram detetados por detetores acoplados de RI e UV-visível. Este último monitoriza o furfural e HMF. Com auxílio das retas de calibração, determinaram-se as concentrações de glucose, xilose, celobiose, ácido acético, furfural e HMF nas amostras injetadas.

Foram introduzidos fatores de correção de hidratação no cálculo da glucose e da xilose, ou seja, a concentração da glucose foi multiplicada por 0,9 e a concentração de xilose por 0,88,

corrigindo as moléculas de água introduzidas na reação de hidrólise dos correspondentes polissacáridos.

### **III - 3.5 Microscópio ótico**

Para monitorizar as modificações das fibras ao longo da hidrólise enzimática, amostras de 0, 7, 24 e 96 horas de hidrólise de algumas biomassas foram observadas ao microscópio ótico. A preparação das amostras seguiu os procedimentos convencionais: uma gota de cada amostra foi colocada numa lâmina plana limpa e uma lamela de cobertura foi colocado em cima, formando um ângulo, com uma borda a tocar na lâmina e, largar suavemente. As observações foram feitas utilizando um condensador de campo escuro, tendo-se registado as imagens.

## Capítulo IV - Resultados e Discussão

Com base no objetivo do trabalho, na informação disponível na literatura e em experiência prévia, decidiu-se explorar a seguinte gama de condições operatórias: carga de bissulfito de sódio 0-4% (sobre matéria seca), carga de ácido sulfúrico 0-3% (sobre matéria seca), temperatura máxima de 150-190°C, tempo a temperatura máxima 0-30 minutos. Com base nesta gama de variáveis, desenhou-se um plano experimental do tipo  $2^4$  fatorial + estrela (*Central Composite Design*  $2^4$  + star) para o pré-tratamento. Este plano representa um compromisso entre a carga de trabalho a realizar e a qualidade e quantidade de informação a obter. O tratamento enzimático do resíduo sólido foi realizado em condições fixas, definidas na parte experimental da tese.

Recorrendo ao procedimento da NREL (secção III - 3.3), obteve-se a composição química da matéria-prima original, tendo-se obtido os resultados da tabela 7. Estes resultados comparam bem com os obtidos por Gil et al. [29], para esta mesma espécie. De facto, o teor de lenhina total de 27,4% compara com os 26,9%, reportado por Gil et al. [29]. O teor de glucose e restantes açúcares também é semelhante.

Tabela 7 - Composição química da matéria-prima, giesta.

Constituintes	Composição da giesta (%)
Glucose e celobiose	41,55
Xilose	15,74
Manose	3,02
Galactose	2,89
Lenhina Solúvel	3,83
Lenhina Insolúvel	23,57
Ácido Fórmico	1,60
Ácido Acético	4,06
HMF	0,12
Furfural	0,67

Os resultados que irão ser apresentados neste capítulo dizem respeito às duas fases de tratamento da biomassa: (1) o pré-tratamento do material lenhocelulósico com hidrogenossulfito de sódio e ácido sulfúrico a diferentes temperaturas e tempos de reação, de acordo com o plano experimental e (2) a hidrólise enzimática do resíduo sólido resultante do processo anterior com um cocktail enzimático (tipo de enzimas, cargas e condições definidas na secção III - 1.4 da parte experimental). De modo a facilitar a apresentação e análise dos resultados, cada uma destas etapas vai ser apresentada separadamente. Assim, apresentam-se

primeiro os resultados do pré-tratamento e posteriormente os resultados da hidrólise enzimática.

## IV - 1 Análise do pré-tratamento ao sulfito

A tabela 8 resume os resultados obtidos para o pré-tratamento ao sulfito com ácido sulfúrico a diferentes temperaturas e tempos de reação. Assim, como resposta, analisaram-se as seguintes variáveis: pH final, açúcares recuperados; produtos de degradação identificados (nomeadamente o furfural, o hidroximetilfurfural e o ácido fórmico); ácido acético; lenhina solúvel; resíduo sólido; lenhina no resíduo sólido e, por fim, o rendimento global, de modo a fechar o balanço de massa do processo. Todos os compostos existentes no hidrolisado estão expressos como a massa de produto recuperado, face a massa de biomassa alimentada, expresso em percentagem. Na última coluna da tabela faz-se um balanço global aos sólidos com vista a identificar eventuais problemas de perda de massa ou de produtos não identificados.

É de referir, ainda, que a tabela 8 contém informação relativa aos açúcares e produtos de degradação dos açúcares recuperados do pré-tratamento após este ter sido submetido a um tratamento adicional de hidrólise ácida (pH  $\approx$  1,5, temperatura 121°C e 1h em autoclave) com objetivos puramente analíticos. Os resultados resultantes do pré-tratamento não sujeito à hidrólise ácida referida anteriormente, encontra-se nos Anexos. Os resultados dos componentes recuperados diretamente do pré-tratamento (antes de sofrer a hidrólise ácida adicional acima referida) encontram-se em anexo. De facto, verificou-se que para algumas condições de pré-tratamento (as mais suaves, como era expectável), uma parte dos hidratos de carbono libertados para o meio reacional permanecem como oligossacáridos. Em virtude do sistema cromatográfico utilizado para a determinação dos açúcares e ácidos orgânicos não os detetar, procedeu-se à referida hidrólise complementar em autoclave, que os despolimerizou, permitindo assim a sua contabilização. A análise posterior dos resultados baseou-se neste últimos resultados.

Antes de fazer a apresentação gráfica usual das superfícies de resposta, optou-se por fazer uma análise genérica dos resultados obtidos, relativamente às variáveis de resposta mais relevantes.

Começando pelo pH, deve referir-se que se trata de um parâmetro que é simultaneamente causa e consequência; isto é, o pH é um parâmetro determinante da libertação e despolimerização dos açúcares e das respetivas reações de degradação que conduzem à formação de ácidos (tais como os ácidos fórmico e levulínico), mas por esta última via afetam o próprio pH do meio. Condições demasiado ácidas favorecem a formação de produtos de degradação que podem ser prejudiciais para o desempenho das enzimas e dos microrganismos da fermentação alcoólica, mas por outro lado sem uma hidrólise mínima dos hemiceluloses e

despolimerização da celulose, as enzimas terão muita dificuldade em aceder à celulose para realizar a função de despolimerização e libertação da glucose.

Os valores de pH final estão na gama 1,56 - 3,05, o que, comparando com pH inicial, permite concluir que, em geral, ocorre um aumento do pH em vez de uma diminuição decorrente da libertação de ácido acético dos grupos acetilo das xilanas. Este fato deve ficar a dever-se à libertação de componentes com carácter alcalino, que não é compensado pelos ácidos libertados. No entanto, a maior libertação destes ácidos corresponde a um menor pH final.

Tabela 8 - Balanço de massa do pré-tratamento ao sulfito.

Sulf (%)	Ác. Sulf (%)	Pré-tratamento		pH		Açúcares (%)		Produtos de degradação (%)				Desc. (%)*	Lenhina solúvel (%)	Índice kappa	Resid sólido (%)*	Rend total (%)*		
		temp (min)	Temp (°C)	in	fin	Gluc*	XMG*	Furfur*	HMF*	Ác. Acét*	Ác. Fórm*							
2	1,5	0	150	1,63	1,77	0,22	3,28	0,021	0,000	1,16	0,12	2,18	3,5	63	83,3	93,8		
		15			1,81	1,30	7,57	0,071	0,004	1,99	0,10	1,70	2,5	91	78,2	93,4		
		30			1,75	2,05	13,77	0,120	0,009	3,82	0,39	5,05	3,9	96	76,1	105,2		
4	3	0		150	1,49	1,5	1,72	10,23	0,068	0,004	2,93	0,25	3,99	3,6	72	73,4	96,2	
		15				1,43	2,03	12,25	0,131	0,006	3,40	0,31	2,80	3,7	96	68,2	92,8	
		30				1,46	2,00	13,57	0,139	0,001	3,74	0,21	4,69	4,5	124	64,4	93,2	
3	0,75	7,5			160	2,12	2,43	0,84	5,25	0,005	0,005	1,35	0,06	1,34	4,0	90	84,8	97,6
		22,5					2,39	2,40	14,14	0,124	0,009	3,82	0,19	2,41	5,1	105	70,0	98,2
	2,25	7,5				1,63	1,53	1,48	12,02	0,149	0,014	3,53	0,24	10,37	2,3	113	68,8	98,9
		22,5	1,56				1,91	14,13	0,175	0,014	3,81	0,25	2,03	3,9	120	64,8	91,0	
1	0,75	7,5	160			1,89	2,46	1,25	3,98	0,051	0,001	1,76	0,23	2,87	2,3	96	83,5	95,9
		22,5					2,48	1,51	8,80	0,128	0,008	2,48	0,21	10,58	1,6	108	78,1	103,4
	2,25	7,5		1,44		1,63	2,14	13,19	0,161	0,015	3,50	0,55	9,58	2,1	103	63,9	95,1	
		22,5				1,59	2,18	17,87	0,183	0,024	4,85	0,58	3,16	2,5	113	63,4	94,7	
2	1,5	0		170		1,63	1,86	1,28	10,40	0,157	0,011	2,76	0,17	1,74	1,2	105	66,6	84,3
		15			1,97		0,69	11,29	0,174	0,027	2,88	0,25	5,21	3,4	112	62,2	86,1	
		30			2,04		0,79	12,51	0,219	0,021	3,66	0,18	1,53	2,6	115	62,1	83,6	
0	1,5	15			170	1,66	2,12	0,67	11,28	0,187	0,017	3,11	0,19	1,54	1,4	134	63,7	82,1
2	0	15				4,08	3,48	0,55	10,53	0,175	0,011	2,79	0,11	1,84	3,7	118	68,8	88,5
	3	15	1,55			1,56	1,76	15,20	0,264	0,034	5,32	0,32	2,85	3,8	132	57,3	86,8	
4	1,5	15	170			2,06	1,89	0,63	10,87	0,332	0,023	2,83	0,54	6,62	6,1	102	56,0	84,0

Sulf (%)	Ác. Sulf (%)	Pré-tratamento		pH		Açúcares (%)		Produtos de degradação (%)				Desc. (%)*	Lenhina solúvel (%)	Índice kappa	Resid sólido (%)*	Rend total (%)*	
		temp (min)	Temp (°C)	in	fin	Gluc*	XMG*	Furfur*	HMF*	Ác. Acét*	Ác. Fórm*						
3	0,75	7,5	180	2,12	2,33	0,92	15,56	0,599	0,020	4,77	0,21	2,04	5,4	134	72,6	102,1	
		22,5			1,94	0,85	12,54	0,792	0,053	4,82	0,22	1,48	5,3	150	64,9	91,0	
	2,25	7,5		1,63	1,57	1,12	13,86	0,623	0,025	4,26	0,23	2,04	4,0	145	58,6	84,8	
		22,5			1,56	1,66	12,03	0,834	0,039	4,93	0,25	1,51	4,5	168	60,9	86,6	
1	0,75	7,5		180	1,89	2,33	0,87	15,61	0,482	0,026	4,58	0,23	2,08	2,3	135	72,1	98,3
		22,5				2,24	1,00	15,80	0,777	0,042	6,18	0,29	2,97	2,2	167	66,8	96,1
	2,25	7,5			1,44	1,58	1,40	14,49	0,705	0,025	4,70	0,62	1,85	2,2	138	64,9	90,9
		22,5				1,61	1,67	11,23	0,825	0,039	3,92	0,16	6,05	2,3	142	59,7	85,9
2	1,5	0	190		1,63	1,92	1,06	16,17	0,212	0,006	4,93	0,31	2,86	4,3	119	64,1	94,0
		15				2,02	1,34	11,09	0,302	0,080	5,35	0,25	1,50	5,7	176	60,9	86,5
		30				2,14	1,25	6,06	0,201	0,105	4,88	0,21	1,20	5,4	176	58,0	77,3
0	0,75	0			190	1,82	2,98	0,73	13,25	0,217	0,021	4,01	0,29	2,11	2,1	144	66,4
		15		3,04			0,73	10,55	0,224	0,007	4,63	0,27	2,53	2,3	163	64,8	86,0
		30		3,05			0,72	7,03	0,169	0,126	4,96	0,34	2,82	3,2	164	63,2	82,6

\***Legenda:** Sulf - Sulfito de sódio; Ac. Sulf - Ácido Sulfúrico; Gluc - Glucose (onde em alguns casos se inclui a celobiose); XMG - Xilose, Manose, Galatose; Furfur - Furfural; HMF - Hidroximetilfurfural; Ac. Acét - Ácido acético; Ac. Fórm - Ácido Fórmico; Desc. - Desconhecidos (componentes presentes no licor que não estão identificados); Resid sólido - Resíduo sólido (calculado pela equação 1); Rend total - Rendimento total.

Com vista a avaliar o efeito das variáveis mais importantes vai representar-se o seu efeito, mantendo as restantes variáveis fixas. As figuras 24 e 25 representam o efeito da temperatura, para uma das condições de pré-tratamento mais suaves ( $\text{NaHSO}_3 = 2\%$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4 = 1.5\%$ , tempo do pré-tratamento a temperatura máxima ( $T_{\text{máx}} = 0$  min) sobre o resíduo sólido e os compostos libertados para o hidrolisado recuperado. De referir que antes de atingir a temperatura máxima, o material é sujeito a um patamar a  $90^\circ\text{C}$ , durante 60 minutos e uma rampa de mais 90 minutos até à temperatura máxima

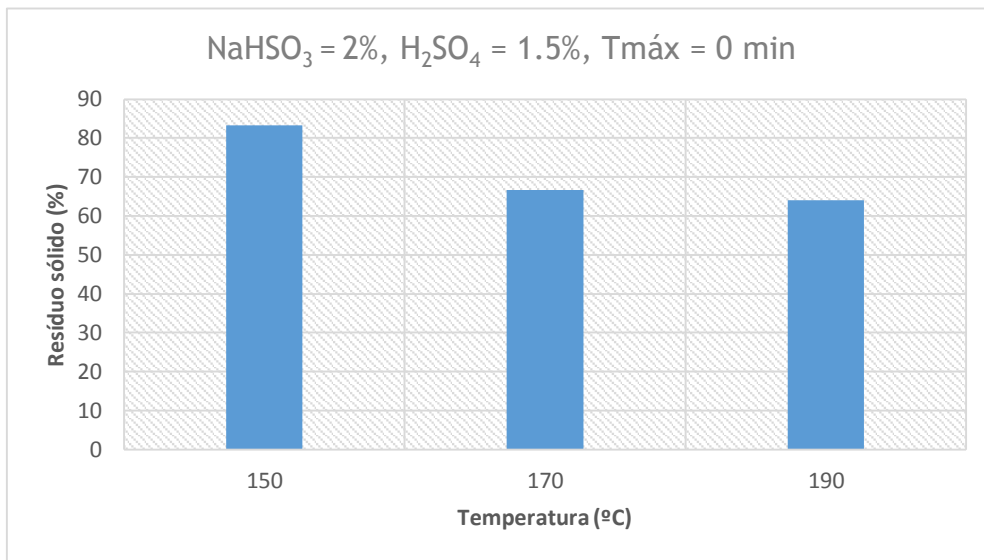


Figura 24 - Efeito da temperatura sobre o resíduo sólido, mantendo as cargas  $\text{NaHSO}_3 = 2\%$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4 = 1,5\%$  e tempo  $T_{\text{max}} = 0$  minutos.

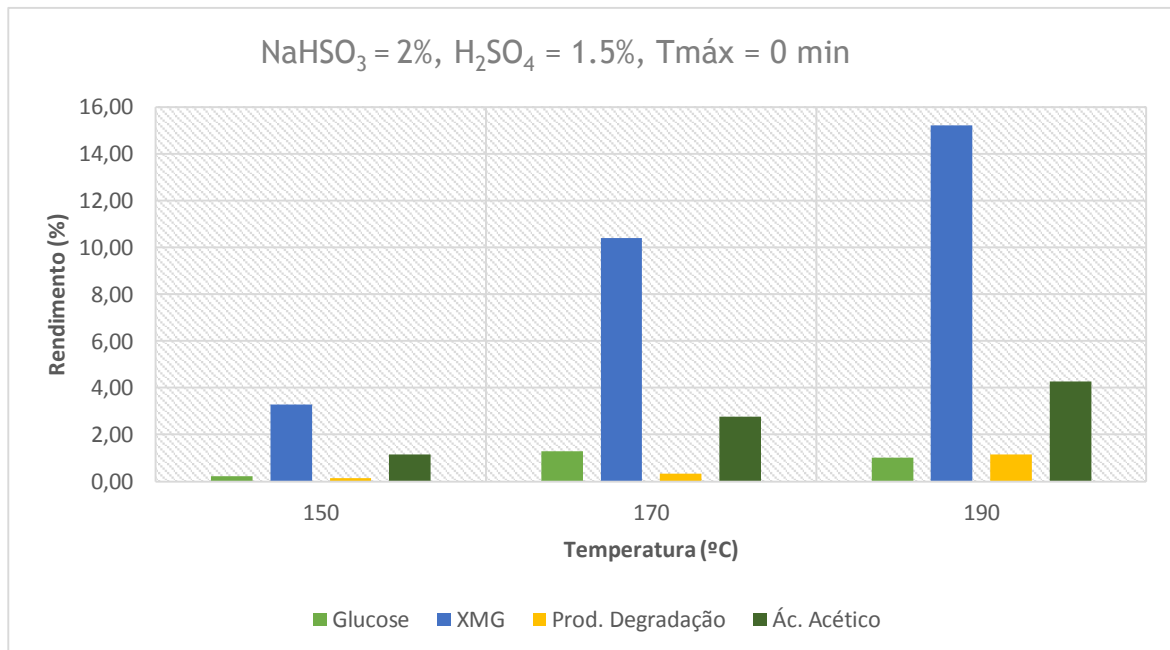
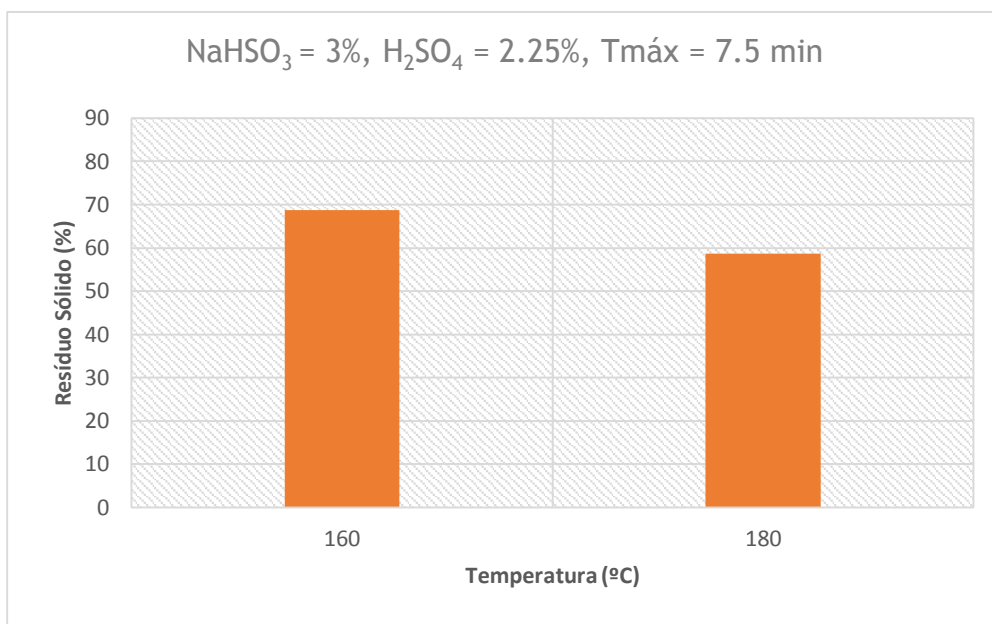


Figura 25 - Variação do teor dos açúcares e dos produtos de degradação libertados em função da temperatura, mantendo as cargas  $\text{NaHSO}_3 = 2\%$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4 = 1,5\%$  e tempo  $T_{\text{max}} = 0$  minutos.

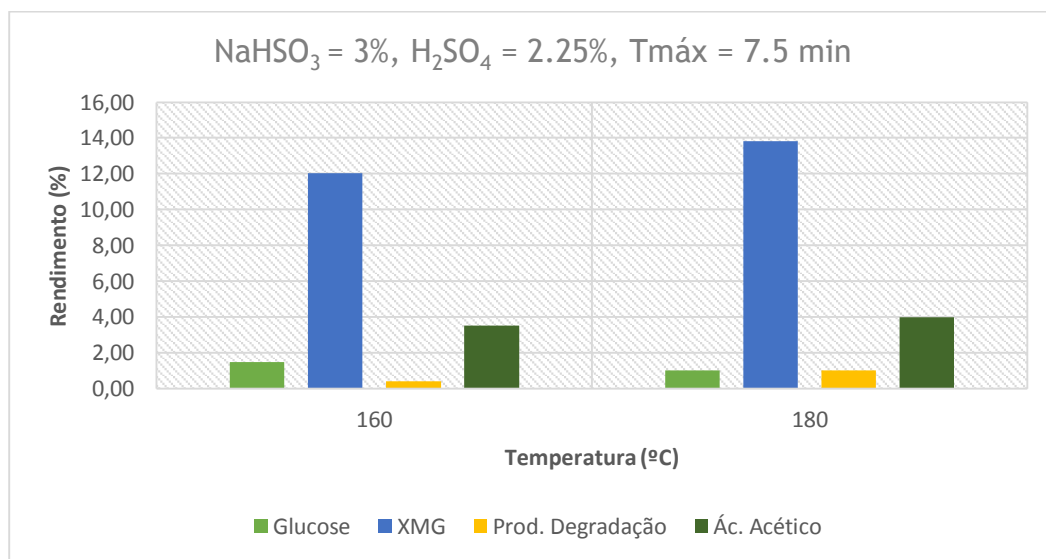
De acordo com o esperado, a quantidade de sólido recuperado diminui significativamente com a temperatura máxima imposta, evidenciando o seu papel nas várias reações que têm lugar. No que respeita ao hidrolisado, esse efeito é também revelado. De facto, a percentagem de açúcares totais recuperados (face ao material inicial) aumenta de 3,50%, para 11,68% e 16,23%, respetivamente quando a temperatura máxima aumenta de 150°C para 170°C e desta para 190°C. A esta última temperatura objetivo (sem tempo de permanência a 190°C; apenas o tratamento térmico decorrente da imposição da rampa de aquecimento), a quantidade de conjunta de xilose, manose, galactose e ácido acético (este último, maioritariamente resultante dos grupos substituintes nas xilanas) libertada atinge cerca de 20% do material original. Quando este resultado é comparado com os componentes correspondentes na biomassa original (25,7%), podemos concluir pela elevada eficácia do processo na remoção do material mais acessível. Como se pode verificar na tabela 8, o incremento do tempo a temperatura máxima de 0, para 15 minutos e deste para 30 minutos conduz a resultados experimentais anómalos para a temperatura de 190°C, no que respeita aos açúcares recuperados. No entanto, a massa de resíduo sólido recuperado diminui com o aumento do tempo de reação, tal como esperado, o que parece indicar algum problema na determinação dos açúcares.

As figuras 26 e 27 representam o efeito da temperatura para condições mais severas ( $\text{NaHSO}_3 = 3\%$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4 = 2.25\%$ ,  $T_{\text{máx}} = 7.5 \text{ min}$ ) sobre o resíduo sólido e os compostos libertados para o hidrolisado. Como acontece no caso anterior, aqui também o resultado foi o esperado, isto é, o resíduo sólido diminui e a quantidade dos açúcares totais recuperados aumenta de 13,50% para 14,82% respetivamente para as temperaturas 160°C e 180°C.

Comparando as figuras 24 e 26 podemos verificar que com condições químicas mais suaves, e condições térmicas mais drásticas (190°C), o resíduo sólido recuperado é superior ao da situação inversa; provavelmente à custa de um ligeiro aumento dos produtos de degradação (figura 25 versus 26). Confrontando as temperaturas de 150°C e 160°C (figura 25 versus 27), verifica-se que o tratamento a 160°C tem um grande efeito na biomassa, uma vez que se verifica uma maior libertação de açúcares e de produtos de degradação e até mesmo de ácido acético.



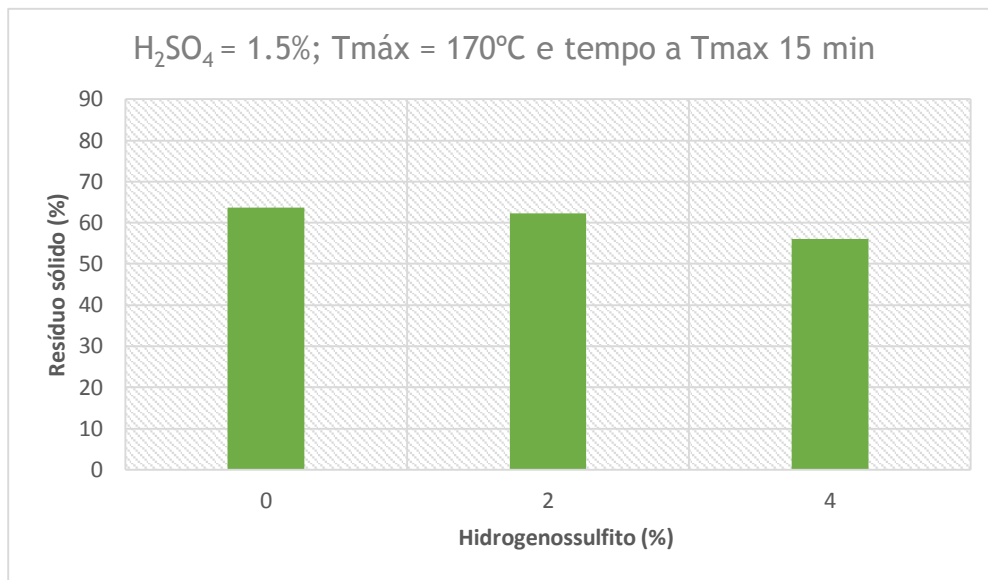
**Figura 26** - Efeito da temperatura sobre o resíduo sólido, mantendo as cargas NaHSO<sub>3</sub> = 3% e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 2.25%, tempo a T<sub>máx</sub> = 7.5 minutos.



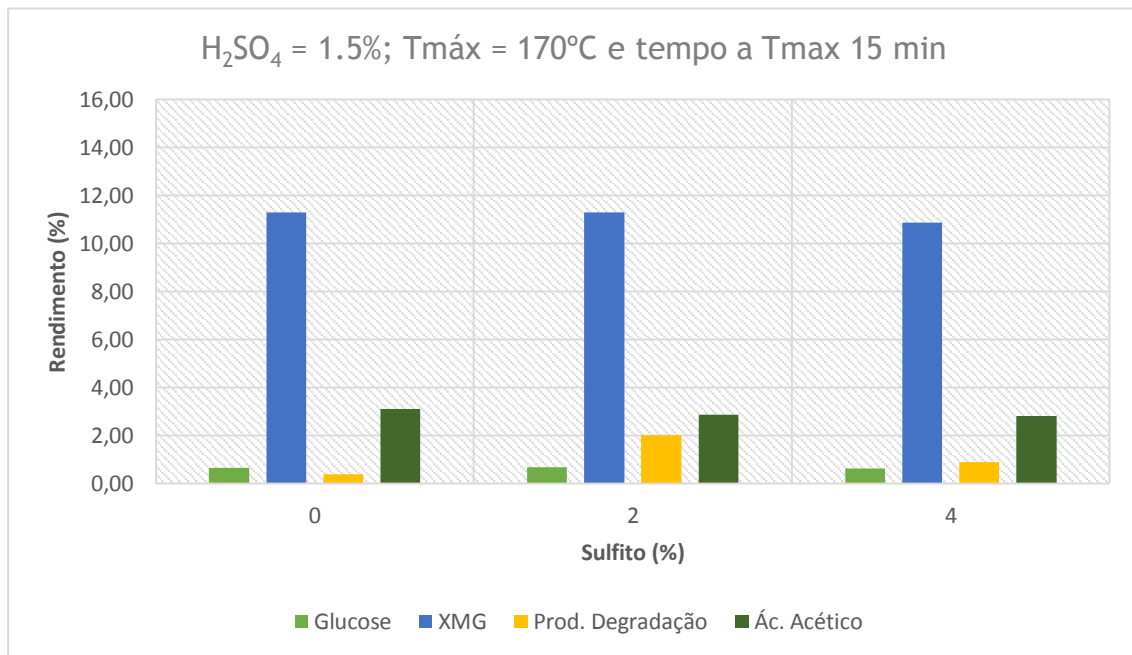
**Figura 27** - Variação do teor dos açúcares e dos produtos de degradação libertados em função da temperatura, mantendo as cargas NaHSO<sub>3</sub> = 3% e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 2.25%, tempo a T<sub>máx</sub> = 7.5 minutos.

Relativamente, ao efeito da carga de NaHSO<sub>3</sub> (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 1,5%; T<sub>máx</sub> = 170°C e tempo a T<sub>máx</sub> 15 min), que se apresenta nas figuras 28 e 29, podemos dizer que não é muito significativo sobre a biomassa, visto que, os açúcares recuperados são 11,98%, 11,95% e 11,55% respetivamente para 0%, 2% e 4% de carga de sulfito de sódio; os produtos de degradação e o ácido acético oscilam um pouco, mas não há uma diferença significativa. O efeito sobre o resíduo sólido apresenta uma tendência de decréscimo, mas é de facto, pouco significante. Os resultados

sugerem que este material é pouco sensível à carga de bissulfito de sódio. Resultados com tendência semelhantes foram observados para o eucalipto [72].

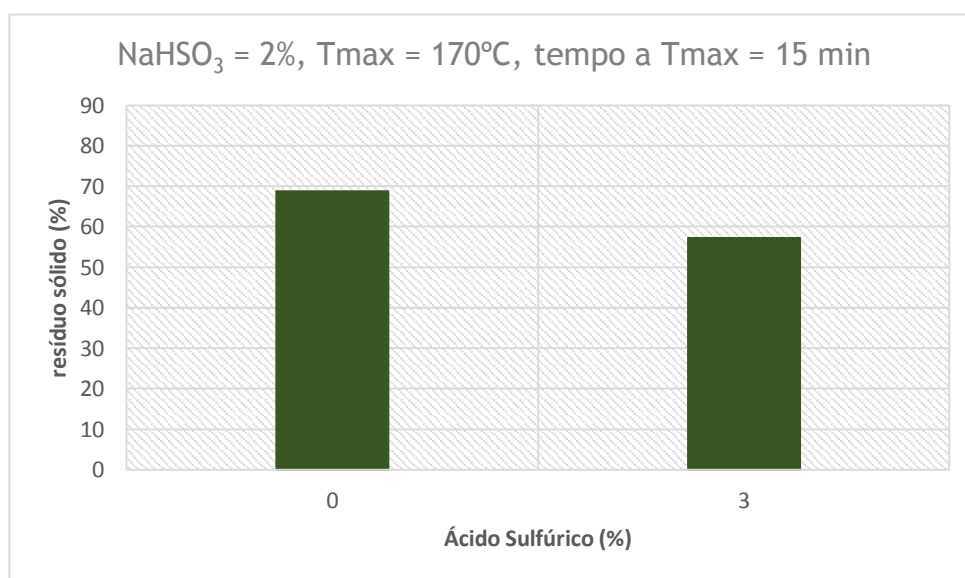


**Figura 28** - Resíduo sólido em função da carga, mantendo a carga de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 1.5%, T<sub>max</sub> = 170°C e tempo a T<sub>max</sub> = 15 minutos.



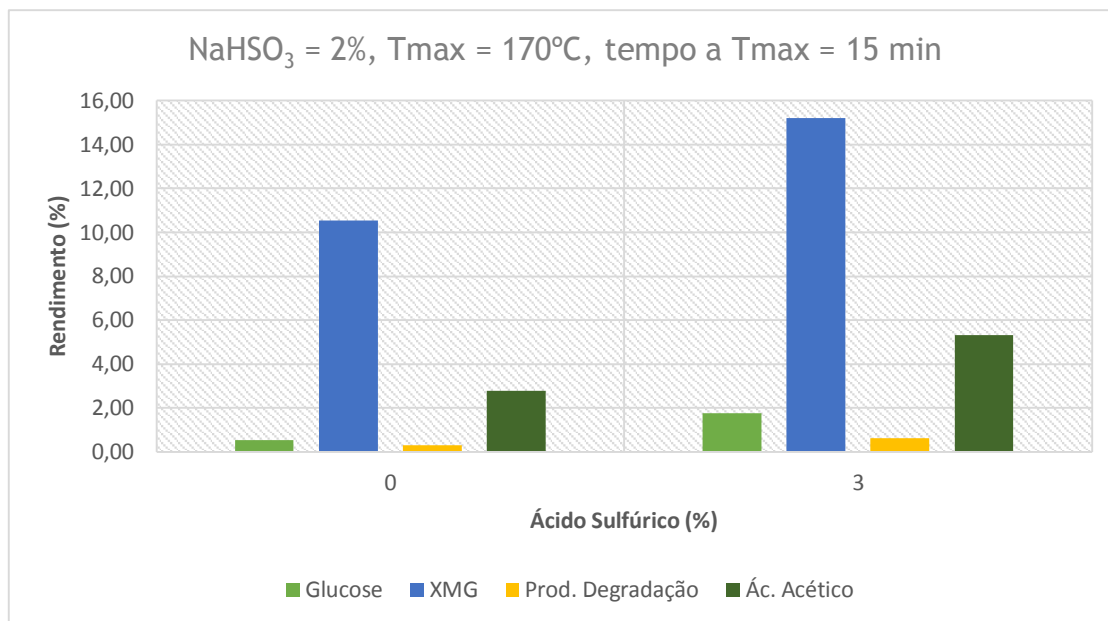
**Figura 29** - Variação do teor dos açúcares e dos produtos de degradação libertados em função das cargas de NaHSO<sub>3</sub>, mantendo a carga de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 1.5%, T<sub>max</sub> = 170°C e tempo a T<sub>max</sub> - 15 minutos.

O efeito da carga de ácido sulfúrico pode observar-se nas figuras 30 e 31 ( $\text{NaHSO}_3 = 2\%$ ,  $T_{\text{max}} = 170^\circ\text{C}$ , tempo a  $T_{\text{max}} = 15$  min). De referir que mesmo sem adição de ácido, há uma libertação muito significativa de açúcares (superior a 10%), o que demonstra o potencial do pré-tratamento mesmo em condições muito suaves. A adição de 3% de ácido (sobre o material inicial) traduziu-se num aumento muito significativo da recuperação de açúcares neutros (11,08% versus 16,96%), de ácido acético (2,79% versus 5,32%) e um aumento ligeiro dos produtos de degradação (0,29% versus 0,62%). Estes resultados demonstram que a carga de ácido é uma variável muito significativa, o que está de acordo com os resultados da literatura [33,57]. Por outro lado, o nível de libertação de açúcares é bastante elevado indicando a libertação quase total dos polissacáridos não celulósicos, para a carga de ácido mais elevada. De acordo, com o incremento de açúcares libertados, a quantidade de resíduo sólido recuperado diminui, com o aumento da carga de ácido sulfúrico.



**Figura 30** - Efeito da carga de ácido sulfúrico sobre o resíduo sólido, mantendo a carga de  $\text{NaHSO}_3 = 2\%$ ,  $T_{\text{max}} = 170^\circ\text{C}$  e tempo a  $T_{\text{max}} = 15$  minutos.

Ainda na tabela 8, podemos verificar que o aumento da carga de ácido sulfúrico no licor de pré-tratamento resulta no aumento do índice kappa do resíduo sólido. Este aumento do índice kappa pode ser justificado pela provável condensação e deposição da lenhina nas fibras.



**Figura 31** - Variação do teor dos açúcares e dos produtos de degradação libertados em função das cargas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mantendo a carga de NaHSO<sub>3</sub> = 2%, Tmax = 170°C e um tempo a Tmax = 15 minutos.

Relativamente à lenhina solúvel, esta aumenta com o aumento da carga de hidrogenossulfito, como podemos ver na tabela 8. Por exemplo, quando a carga de NaHSO<sub>3</sub> aumenta de 1% para 3%, mantendo a carga de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 2.25%, verificamos um aumento do teor de lenhina no hidrolisado de cerca de 2% para cerca de 4%. Este facto deve-se à maior extensão do processo de sulfonação da lenhina, tornando-a mais hidrofílica, e, desta forma, facilitando a sua extração da biomassa, o que constitui um dos objetivos deste tipo de pré-tratamento. Se aumentarmos a carga de ácido o teor de lenhina solúvel também aumenta.

Com base no plano experimental (CCD 2<sup>4</sup> fatorial - estrela) e recorrendo ao programa Statgraphic® Plus 5, estabeleceu-se matematicamente o efeito dos diferentes fatores (carga NaHSO<sub>3</sub>, carga H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, temperatura e tempo a Tmax) sobre diferentes variáveis respostas. A tabela 9 contém os parâmetros do modelo de ajuste fornecidos pelo Statgraphic, bem como os correspondentes desvios padrão. A título de exemplo, apresenta-se a equação correspondente à variável (resposta) XMG (Xilose + Manose + Galatose), onde se podem observar as interações entre os fatores (por exemplo: AD - interação entre a carga de hidrogenossulfito e o tempo a Tmax) e os efeitos quadráticos (C<sup>2</sup>).

$$XMG = 13,987 + 0,394 A + 3,060 B + 1,543 C + 0,545 D - 0,124 A^2 - 0,957 AB - 0,652 AC - 0,081 AD - 0,037 B^2 - 5,377 BC - 2,403 BD - 1,802 C^2 - 2,295 CD - 0,741 D^2$$

Tabela 9 - Parâmetros dos modelos de ajuste pelo Statgraphic® Plus 5, para as diferentes respostas para o pré-tratamento.

Variáveis	Média	A*	B*	C*	D*	AA	AB	AC	AD	BB	BC	BD	CC	CD	DD
Glucose	0,943	0,017	0,669	- 0,483	0,0414	0,069	- 0,122	- 0,072	0,140	0,265	- 0,139	- 0,279	0,346	0,022	0,206
Desvio padrão	± 0,316	± 0,224	± 0,224	± 0,224	± 0,224	± 0,224	± 0,274	± 0,274	± 0,274	± 0,237	± 0,274	± 0,274	± 0,237	± 0,274	± 0,237
XMG	13,987	0,394	3,060	1,543	0,545	- 0,124	- 0,957	- 0,652	- 0,081	- 0,037	- 5,377	- 2,403	- 1,802	- 2,295	- 0,741
Desvio padrão	± 1,237	± 0,874	± 0,874	± 0,874	± 0,874	± 0,927	± 1,071	± 1,071	± 1,071	± 0,927	± 1,071	± 1,071	± 0,927	± 1,071	± 0,927
Ácido Acético	3,785	0,101	0,981	1,416	0,374	- 0,0009	- 0,089	-0,0015	0,226	0,295	- 1,342	-0,7465	0,0812	- 0,0812	- 0,125
Desvio padrão	± 0,362	± 0,256	± 0,256	± 0,256	± 0,256	± 0,272	± 0,313	± 0,313	± 0,313	± 0,272	± 0,313	± 0,313	± 0,272	± 0,313	± 0,272
Prod. Degradação	0,488	- 0,09	0,223	0,464	0,089	0,064	- 0,098	0,06	0,066	0,087	- 0,095	- 0,122	0,062	0,020	0,048
Desvio padrão	± 0,151	± 0,107	± 0,107	± 0,107	± 0,107	± 0,114	± 0,131	± 0,131	± 0,131	± 0,114	± 0,131	± 0,131	± 0,114	± 0,131	± 0,114
Subtotal	21,267	-1,574	5,51	2,883	2,722	0,019	0,296	1,086	- 0,348	0,973	- 6,676	- 5,077	- 1,357	- 4,065	- 0,605
Desvio Padrão	± 2,666	± 1,885	± 1,885	± 1,885	± 1,885	± 2,309	± 2,309	± 2,309	± 2,309	± 1,999	± 2,309	± 2,309	± 1,999	± 2,309	± 1,999

\*Legenda: A - Hidrogenossulfito de sódio; B - Ácido Sulfúrico; C - Temperatura; D - Tempo

A título ilustrativo, a figura 32 apresenta o efeito padronizado e a superfície de resposta dos fatores para a variável glucose recuperada.

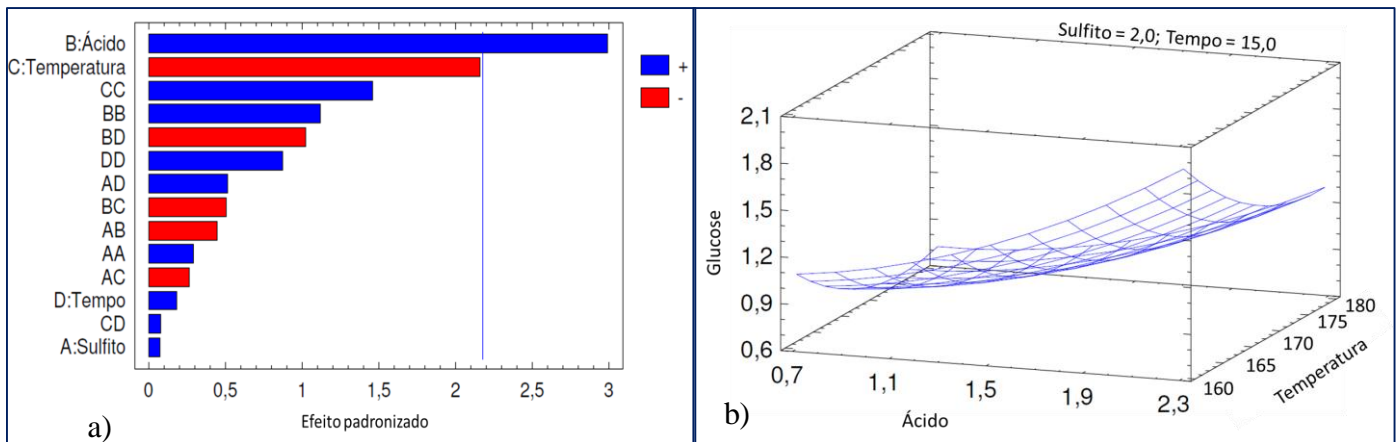
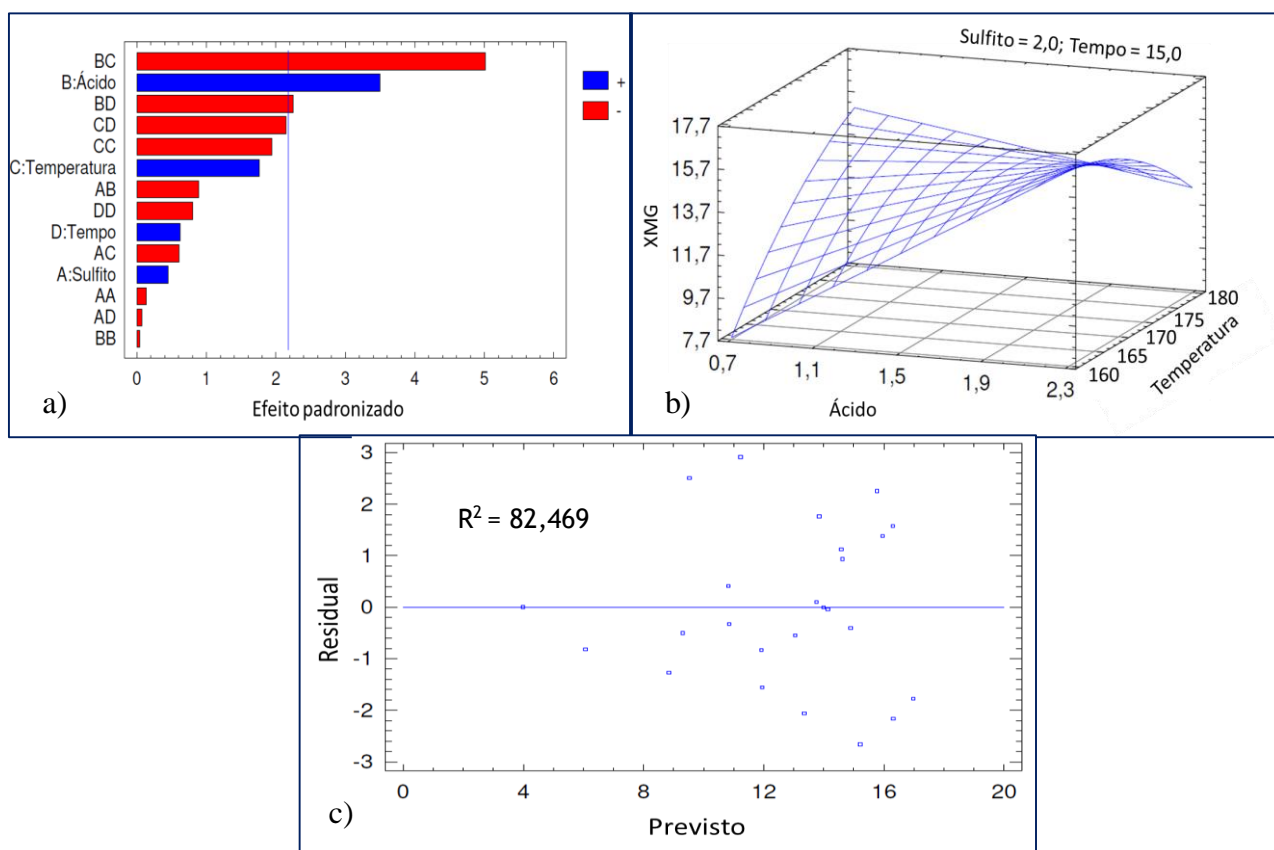


Figura 32 - Efeito padronizado (a) e a superfície de resposta dos fatores (b) para a variável Glucose.

Neste caso, a temperatura tem um efeito negativo, enquanto que o ácido apresenta um efeito muito positivo.

Na figura 33 apresenta-se uma representação equivalente para conjunto xilose, manose e galactose. A razão para estes três açúcares aparecerem agrupados prende-se simplesmente com o facto de a coluna de cromatografia usada não apresentar capacidade de os separar. Por outro lado, sabe-se que neste tipo de biomassa as hemiceluloses dominante são as xilanas, pelo que não se justifica investimento laboratorial adicional para separar os três componentes

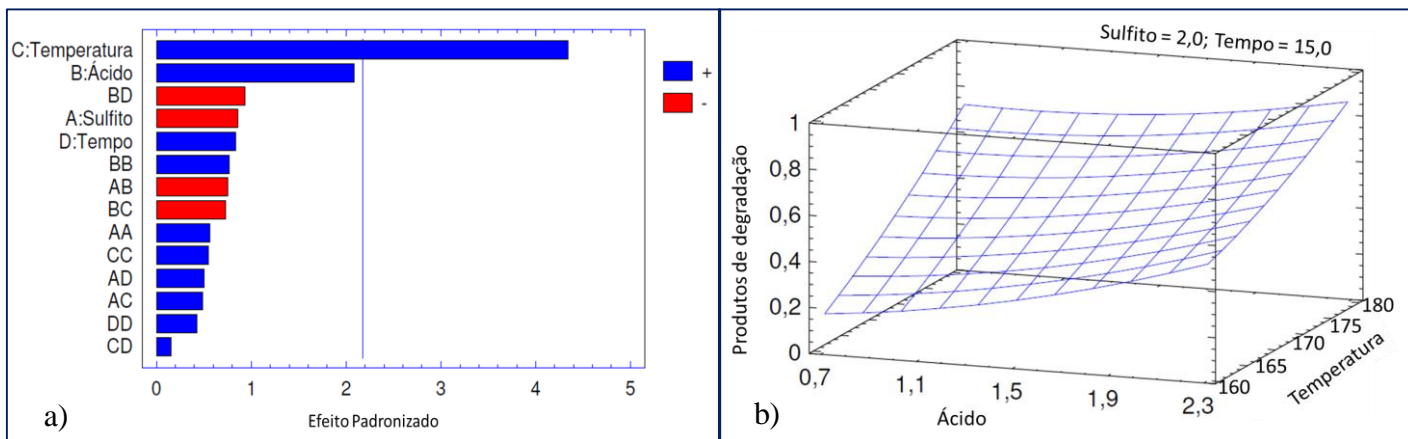


**Figura 33** - Efeito padronizado (a), a superfície de resposta dos fatores (b) e os resíduos (c) para a variável XMG.

Com vista a avaliar a qualidade do ajuste, na figura 33-c) apresentam-se os resíduos do ajuste; como se pode verificar, os resíduos estão uniformemente distribuídos, o que indica um ajuste aceitável, apesar de existir uma variabilidade significativa.

No caso da resposta XMG, verificamos que muitas das interações tem um efeito negativo; a interação temperatura carga de ácido é particularmente negativa, o que é evidenciado na figura 33-a) e b). De facto, a uma carga baixa de ácido (0,7%), um incremento da temperatura de 160°C para 180°C, provoca um aumento acentuado dos açúcares libertados, ocorrendo o inverso para a carga mais elevada de ácido (2,3%).

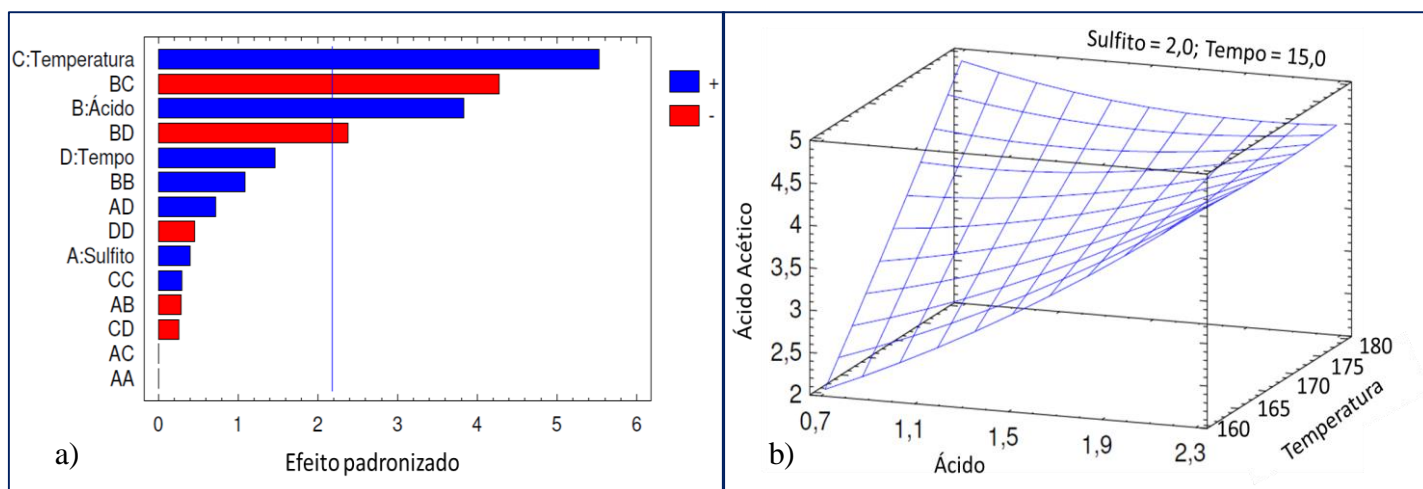
A figura 34 representa o efeito padronizado e a superfície de resposta dos fatores para a variável produtos de degradação.



**Figura 34** - Efeito padronizado (a) e a superfície de resposta dos fatores (b) para a variável produtos de degradação.

Os dois fatores mais relevantes são a temperatura e a carga de ácido (ambos positivos), embora a temperatura tenha um efeito mais marcado. Estes resultados sugerem que as reações de degradação dos açúcares devem apresentar uma energia de ativação elevada.

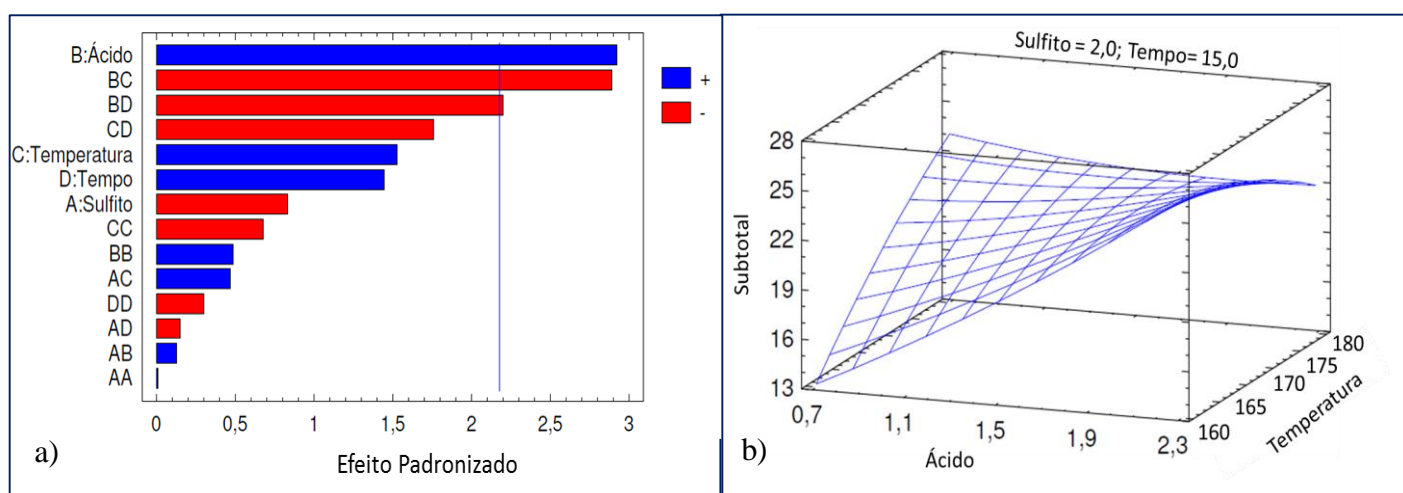
A figura 35 apresenta o efeito padronizado e a superfície de resposta dos fatores para a variável Ácido acético.



**Figura 35** - Efeito padronizado (a) e a superfície de resposta dos fatores (b) para a variável ácido acético.

No caso do ácido acético, a temperatura tem um efeito positivo (figura 35-a), tal como a carga de ácido sulfúrico; a interação entre estes dois fatores apresenta uma resposta negativa. A superfície de resposta (figura 35-b) mostra algumas semelhanças como a dos produtos de degradação.

Na figura 36-b, apresenta-se a superfície de resposta para a variável subtotal (que representa a totalidade dos componentes libertados no licor do pré-tratamento) em função da carga de ácido e da temperatura.



**Figura 36** - Efeito padronizado (a) e a superfície de resposta dos fatores (b) para a variável “Subtotal”.

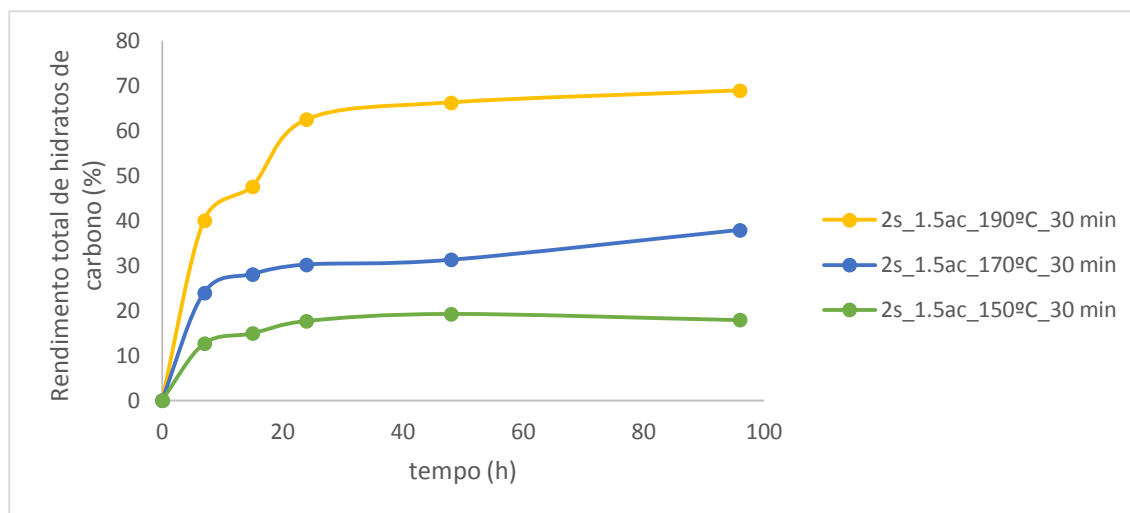
Na figura 36-a apresenta-se o efeito padronizado dos vários fatores. O efeito positivo mais forte é a carga de ácido, enquanto que o efeito da interação do ácido com a temperatura (BC) é negativo, o que significa que quando estes dois fatores estão em níveis altos tem um efeito muito negativo na libertação de açúcares e restantes componentes. De facto, esta interação é visível na figura 36-b; para a carga de ácido de 0,7%, o incremento da Tmax conduz a um aumento acentuado de “Subtotal”; no entanto quando a carga de ácido já é elevada (2,3%), o incremento da Tmax traduz-se num decréscimo do “Subtotal”.

## IV - 2 Efeito da hidrólise enzimática

No material previamente tratado com sulfito em meio ácido é necessário estimar o teor de lenhina, com vista a calcular a quantidade de açúcares totais disponíveis no resíduo sólido, e, assim, calcular a eficiência da etapa de hidrólise enzimática. Para este efeito determinou-se o índice kappa no resíduo sólido. Para converter o índice kappa em teor de lenhina residual utilizou-se um fator multiplicativo de 0,15.

Nas figuras seguintes apresentam-se a evolução temporal do rendimento dos polissacáridos libertados pelo cocktail enzimático. Os resultados obtidos evidenciam a influência das condições de pré-tratamento sobre a velocidade e extensão da hidrólise dos açúcares.

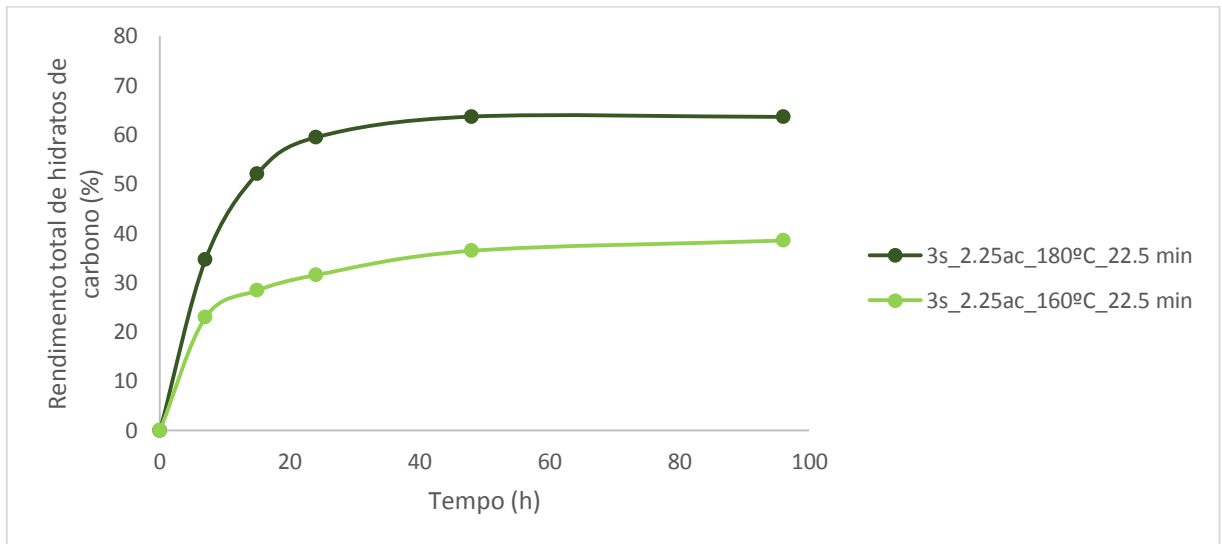
A figura 37 representa o efeito da temperatura máxima de pré-tratamento, para ambiente químico suave ( $\text{NaHSO}_3 = 2\%$ ;  $\text{H}_2\text{SO}_4 = 1.5\%$ ; tempo  $T_{\text{máx}} = 30$  min), sobre a hidrólise enzimática. Verifica-se que a temperatura tem um grande efeito neste processo, uma vez que o rendimento de hidratos de carbono a  $190^\circ\text{C}$  é de aproximadamente 70%, enquanto que a  $150^\circ\text{C}$  é de cerca 20%. De notar que o rendimento do resíduo sólido na hidrólise ácida apresenta o seguinte comportamento: 76,1% ( $150^\circ\text{C}$ ), 62,1% ( $170^\circ\text{C}$ ) e 58,0% ( $190^\circ\text{C}$ ); isto é, uma perda adicional de 18,1% de sólidos no pré-tratamento (76,1 versus 58,0%) traduziu-se num ganho de 50% (70% versus 20%) na percentagem de açúcares libertados na hidrólise enzimática.



**Figura 37** - Rendimento total de hidratos de carbono na hidrólise enzimática da madeira pré-tratada em condições químicas suaves.

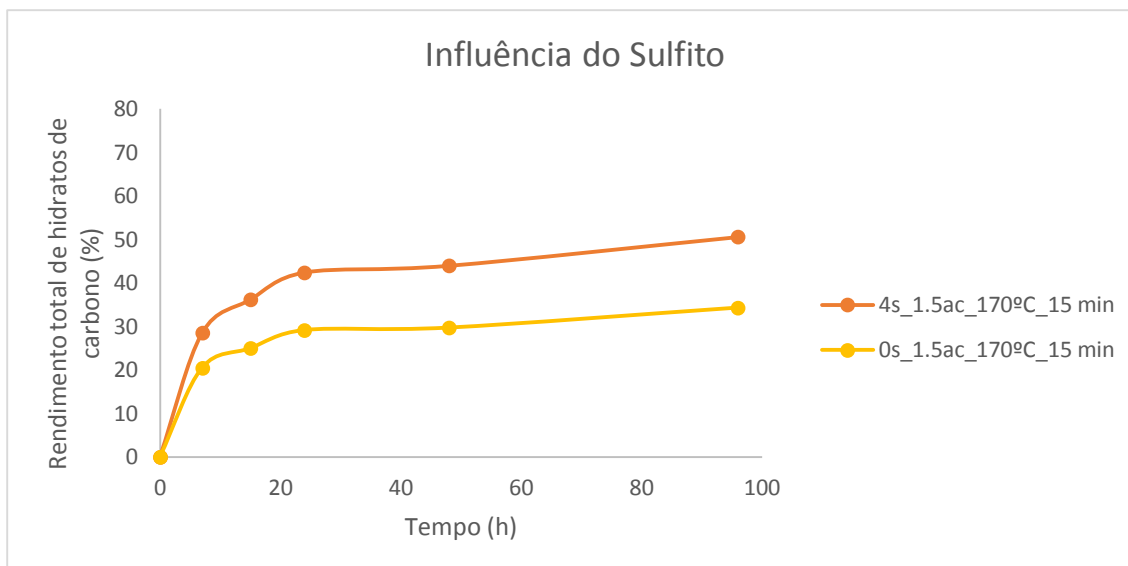
A figura 38 representa efeito da temperatura no pré-tratamento, para condições de ambiente químico mais severas ( $\text{NaHSO}_3 = 3\%$ ;  $\text{H}_2\text{SO}_4 = 2.25\%$ ; tempo  $T_{\text{máx}} = 22.5$  min). Mais uma vez, o

efeito da temperatura prevalece. No entanto, se compararmos a figura 37 com a 38, podemos verificar que a temperatura máxima do pré-tratamento influencia a hidrólise enzimática, pois mesmo com cargas de químicos mais severas a 180°C o rendimento total de hidratos de carbono é inferior a 65%, o que não se verifica a 190°C (rendimento total aproximadamente 70%). As figuras 37 e 38 evidenciam ainda a grande velocidade inicial da hidrólise enzimática, e sugerem que tempos longos não trazem benefícios adicionais significativos, já que a extensão da libertação de açúcares estabiliza ao cabo de 24-48 horas.



**Figura 38** - Rendimento total de hidratos de carbono na hidrólise enzimática da madeira pré-tratada em condições químicas severas.

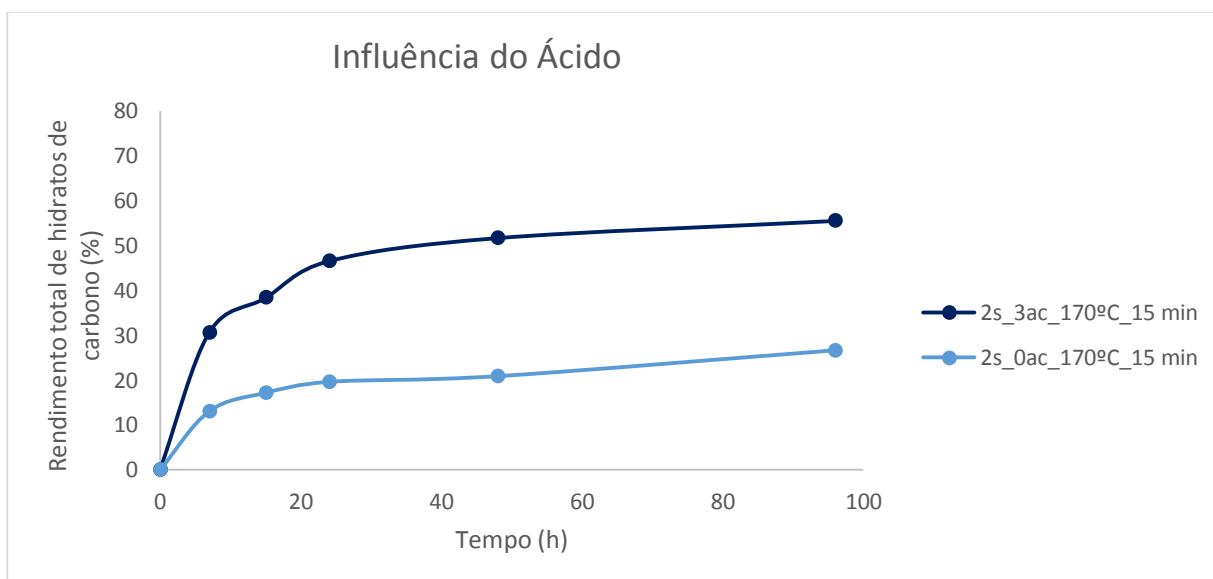
Relativamente ao efeito da carga de  $\text{NaHSO}_3$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4 = 1.5\%$ ;  $T_{\text{máx}} = 170^\circ\text{C}$ ; tempo  $T_{\text{máx}} = 15$  min), verifica-se um aumento de rendimento de hidratos de carbono (30% versus 50%) com a introdução do sulfito. Os resíduos sólidos do pré-tratamento destes dois ensaios é 56,0% e 63,7% para 4% e 0% de  $\text{NaHSO}_3$ , respetivamente; isto é, uma variação de 7,7 unidades (63,7% versus 56%) traduz-se por incremento na libertação de açúcares na hidrólise enzimática de 20 unidade (de 30% para 50%).



**Figura 39** - Rendimento total de hidratos de carbono na hidrólise enzimática da madeira pré-tratada (influência do hidrogenossulfito).

O efeito da carga de ácido sulfúrico sobre a hidrólise enzimática pode observar-se na figura 40 ( $\text{NaHSO}_3 = 2\%$ ;  $T_{\text{máx}} = 170^\circ\text{C}$ ; tempo  $T_{\text{máx}} = 22.5$  min). O ácido aumenta o rendimento de hidratos de carbono em cerca de 30 unidades (25% para 55%). Os resíduos sólidos do pré-tratamento destes dois ensaios apresentam rendimentos de 57,3% e 68,8% para 3% e 0% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , respectivamente.

Em resumo, todos os resultados apresentados indicam a forte interação entre o pré-tratamento e o desempenho do resíduo sólido na hidrólise enzimática.



**Figura 40** - Rendimento total de hidratos de carbono na hidrólise enzimática da madeira pré-tratada (influência do ácido).

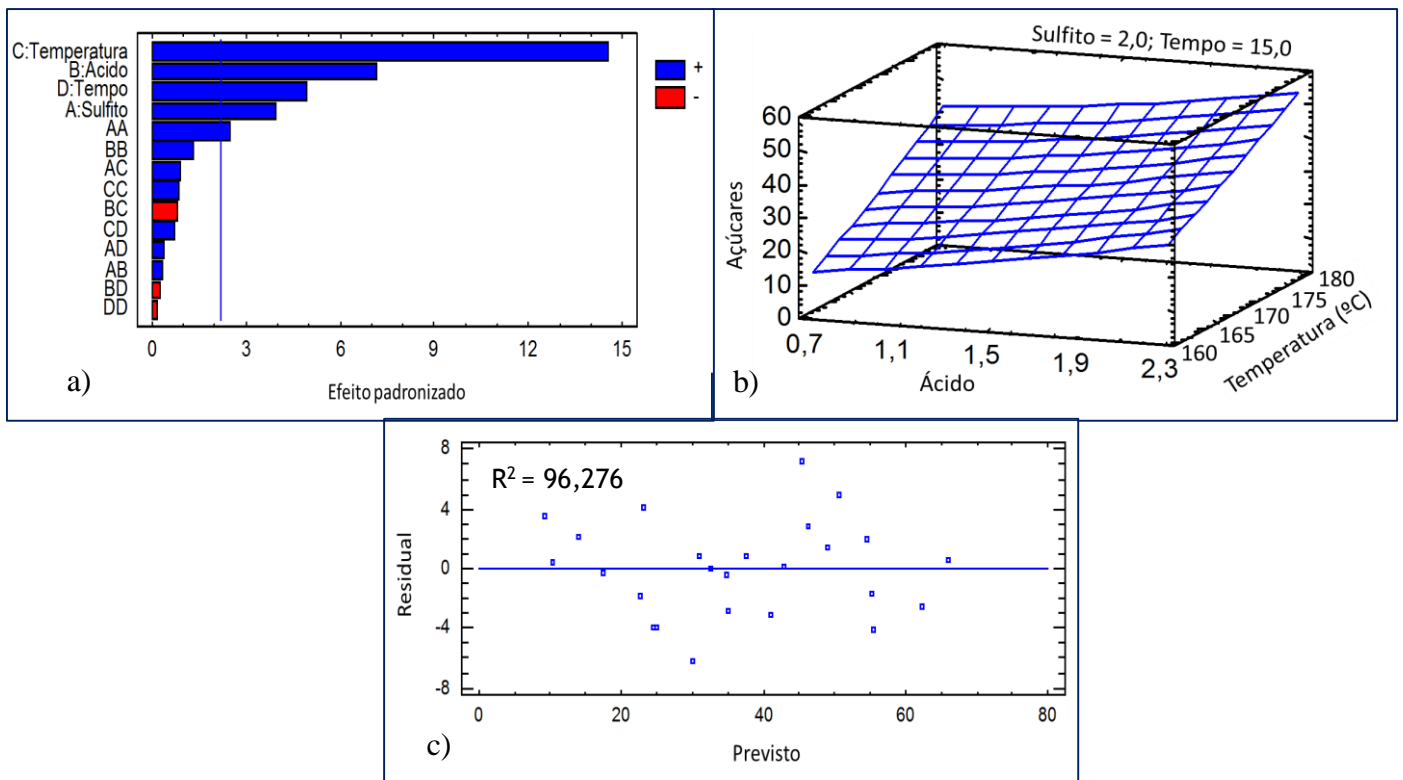
Depois da análise empírica acabada de apresentar, os resultados obtidos para os açúcares libertados (glucose e xilose) na hidrólise enzimática ao cabo de 96 horas foram submetidos ao tratamento estatístico através do programa Statgraphic® Plus 5. A tabela seguinte (tabela 10) resume o efeito dos fatores sobre a variável (glucose + xilose), apresentando-se também a equação de ajuste correspondente. Os fatores com maior impacto são a carga de ácido e a temperatura no pré-tratamento, embora a carga de sulfito e o tempo também apresentem um efeito positivo.

**Tabela 10** - Parâmetros dos modelos de ajuste pelo Statgraphic® Plus 5, para a resposta 96 horas da hidrólise enzimática.

Açúcares libertados a 96 horas		Desvio Padrão
Média	32,51	± 2,586
A	7,166	± 1,829
B	13,022	± 1,829
C	26,535	± 1,829
D	8,940	± 1,829
AA	4,729	± 1,939
AB	0,665	± 2,239
AC	1,955	± 2,239
AD	0,783	± 2,239
BB	2,539	± 1,939
BC	- 1,743	± 2,239
BD	- 0,55	± 2,239
CC	1,619	± 1,939
CD	1,575	± 2,239
DD	- 0,231	± 1,939

$$Açúcares = 32,51 + 7,166 A + 13,022 B + 26,535 C + 8,940 D + 4,729 A^2 + 0,665 AB + 1,955 AC + 0,783 AD + 2,539 B^2 - 1,743 BC - 0,55 BD + 1,619 C^2 + 1,575 CD - 0,231 D^2$$

A figura 41 a ilustra a superfície de resposta dos açúcares, mantendo fixo a carga de sulfito e o tempo de pré-tratamento a temperatura máxima, revelando o efeito positivo da temperatura e da carga de ácido.




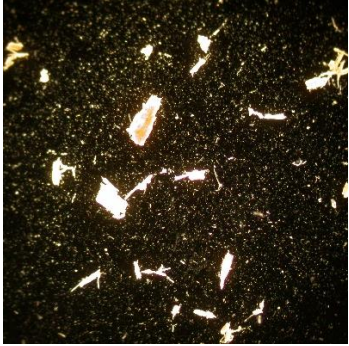
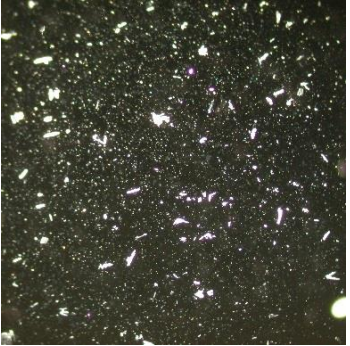

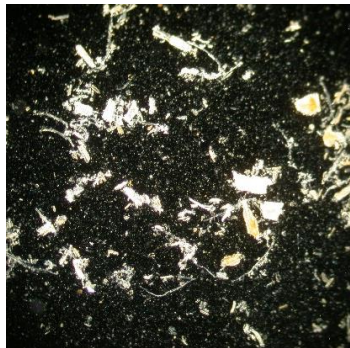

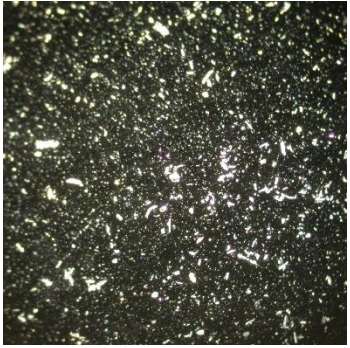
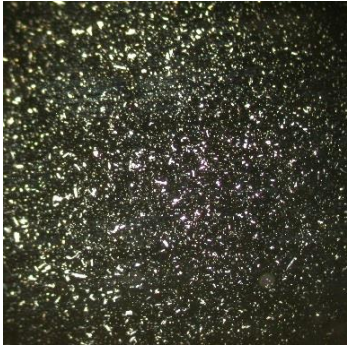
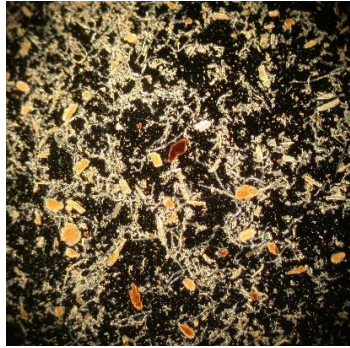
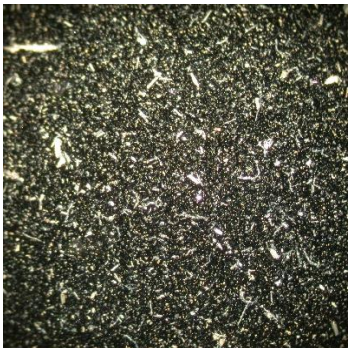


**Figura 41** - Efeito padronizado (a), a superfície de resposta dos fatores (b) e os resíduos (c) para a variável açúcares libertados.

Na figura 41-a verifica-se que no processo da hidrólise enzimática todas as variáveis em estudo influenciam positivamente a libertação dos açúcares. No entanto, a temperatura e o ácido sulfúrico são as que mais afetam o processo, uma vez que a biomassa está mais destruída quando estas duas variáveis predominam.

A figura 41 c ilustra a bondade do modelo, já que os resíduos estão aleatoriamente distribuídos. O mesmo se pode concluir pelo elevado  $R^2$  (96,276) que o modelo apresenta.

## **IV - 2.1 Efeito da hidrólise enzimática na morfologia**

Como pode ser observado nas figuras seguintes, há uma diminuição no tamanho das fibras ao longo da hidrólise enzimática. O efeito da temperatura máxima do pré-tratamento é igualmente visível; quanto maior a temperatura a que o material for submetido, mais desintegrada a biomassa fica.

Condições	0 horas	7 horas	24 horas	96 horas
2s_1.5ac_ 150_30 min				
2s_1.5ac_ 170_30 min				
2s_1.5ac_ 190_30 min				




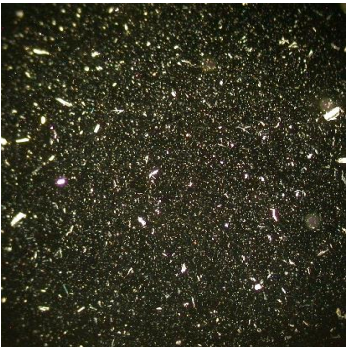
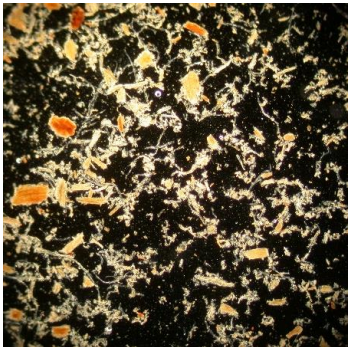

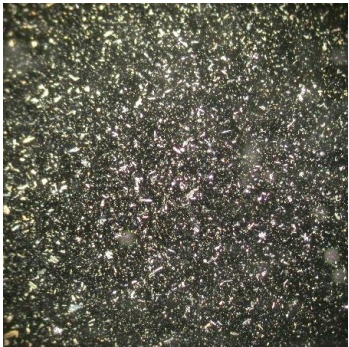

Condições	0 horas	7 horas	24 horas	96 horas
3s_2.25ac_ 160_22.5 min				
3s_2.25ac_ 180_22.5 min				

Figura 42 - Observação dos resíduos sólidos das biomassas pré-tratadas ao longo da hidrólise enzimática (0,7,24,96 horas), ao microscópio ótico a 40x.

# Capítulo V - Conclusão e perspectivas de trabalho futuro

As principais conclusões a retirar deste trabalho são as seguintes:

- O pré-tratamento da biomassa com hidrogenossulfito de sódio, em meio ácido, altera estrutura e a composição da matéria-prima, tornando-a muito mais apta ao tratamento enzimático;
- As condições do pré-tratamento têm um efeito sobre a quantidade de açúcares totais recuperados e sobre os produtos de degradação gerados no estágio de pré-tratamento; para uma dada carga de sulfito, condições mais ácidas conduzem a maior libertação de açúcares e maior fragmentação do material, mas também a maior produção de produtos de degradação;
- Cargas moderadas de bissulfito de sódio (1%) e ácido sulfúrico (2.25%), mostram-se capazes de libertar praticamente todas as hemiceluloses da matéria-prima;
- O tratamento enzimático mostrou-se muito sensível às condições do pré-tratamento; a percentagem de açúcares libertados na hidrólise enzimática variou entre 5,99% a 68,87%; condições mais ácidas aumentam a velocidade e a extensão da hidrólise enzimática dos polissacáridos;
- Os resultados obtidos, tanto no pré-tratamento como na hidrólise enzimática são promissores, no entanto alguns aspetos carecem de investigação adicional, nomeadamente:
  - “Um certo” carácter alcalino da biomassa deve ser investigado, já afeta o pH do meio reacional, variável muito importante para a libertação dos açúcares;
  - Quantificação do consumo de energia na desfibrção após pré-tratamento;
  - Utilização de um refinador em vez do triturador para proceder à desfibrção do material pré-tratado;
  - Otimização da aplicação do complexo enzimático.



## Referências Bibliográficas

- [1]: Ferreira SMP. Produção de celulases e hidrólise enzimática de materiais lenhocelulósicos para a produção de biocombustíveis. Dissertação de Mestrado em Bioquímica 2008.
- [2]: Santos SPJ. Biocombustíveis: análise ao nível da competitividade na UE. Dissertação de Mestrado em Economia 2009.
- [3]: Sun Y, Chen J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresources technology* 2002; 83: 1-11.
- [4]: Nigam PS, Singh A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science* 2011; 37: 52-68.
- [5]: Fernandes DLA, Silva CM, Xavier AMRB, Evtuguin DV. Fractionation of sulphite spent liquor for biochemical processing using ion exchange resins. *Journal of Biotechnology* 2012; 162: 415-421.
- [6]: Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy* 2012; 37: 19-27.
- [7]: Ogeda TL, Petri DFS. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova* 2010; 33: 1549-1558.
- [8]: Costa LV. Estudo da influência do oxigénio na produção de bioetanol. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Química 2011.
- [9]: Costa VLD. Effect of physical and physical-chemical pretreatments on the sugar release of lignocellulosic materials through an enzymatic cocktail. Dissertação de Mestrado em Química Industrial 2013.
- [10]: Gil NRS. Pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos para produção de bioetanol. Dissertação de Mestrado em Química Industrial 2008.
- [11]: Singh R, Shukla A, Tiwari S, Srivastava M. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potencial. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2014; 32: 713-728.
- [12]: Baptista PIL. Pré-tratamento alcalino de materiais lenhocelulósicos para a produção de bioetanol. Dissertação de Mestrado em Química Industrial 2010.

- [13]: Correia MF. Produção de bioetanol a partir de licor de cozimento ao sulfito ácido. Dissertação de Mestrado em Materiais Derivados de Recursos Renováveis 2008.
- [14]: Santos FA, Queiróz JH, Colodette JL, Fernandes SA, Guimarães VM, Rezende ST. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. Química Nova 2012; 35: 1004-1010.
- [15]: Malhão VLF. O caso de Portugal na aplicação das políticas Europeias no domínio dos biocombustíveis. Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologias do Ambiente 2009.
- [16]: Henriques HJC. Variabilidade do uso de bioetanol como combustível alternativo. Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica 2012.
- [17]: Ribeiro PR, Carvalho JRM, Geris R. Furfural - da biomassa ao laboratório de química orgânica. Química Nova 2012; 35: 1046-1051.
- [18]: Guedes CLB, Adão DC, Quessada TP, Borsato D, Galão OF, Mauro ED, Pérez JMM, Rocha JD. Avaliação de biocombustível derivado do bio-óleo obtido por pirólise rápida de biomassa lignocelulósica como aditivo para a gasolina. Química Nova 2010; 33: 781-786.
- [19]: Silva FMF. Energia Biomassa 2010 <<http://efab3e7.webnode.pt/energias-renovaveis/energia-biomassa/>> (acedido em Março de 2014)
- [20]: Silva CCR. Análise de variáveis processuais do cozimento ao sulfito ácido. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química 2008.
- [21]: Carvalho W, Canilha L, Ferraz A, Milagres AMF. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. Química Nova 2009; 32: 2191-2195.
- [22]: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Arbusto>> (Acedido em Junho de 2014)
- [23]: Daorattanachai P, Viriya-empikul N, Laosiripojana N, Faungnawakij K. Effects of Kraft lignin on hydrolysis/dehydration of sugars, cellulosic and lignocellulosic biomass under hot compressed water. Bioresource Technology 2013; 144: 504-512.
- [24]: Marques APS. Caracterização e Transformação de lenhosulfatos de *Eucalyptus globulus*. Dissertação de Doutoramento em Química 2011.
- [25]: Ramos LP. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. Química Nova 2003; 26: 863-871.
- [26]: <<http://professores.unisantabr/maramagenta/celulavegetal.asp>> (acedido em Abril de 2014)

- [27]: Casey JP. Pulp and paper: chemistry and chemical technology. New York: John Wiley & Sons 1980; 3<sup>a</sup>edition
- [28]: Prasad S, Singh A, Joshi HC. Ethanol as an alternative fuel from agricultural industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling* 2007; 50: 1-39.
- [29]: Gil N, Domingues FC, Amaral ME, Duarte AP. Optimization of dilute acid pretreatment of *Cytisus striatus* and *Cistus ladanifer* for bioethanol production. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 2012; 6:1-7
- [30]: Phitsuwan P, Sakka K, Ratanakhanokchai K. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass and Bioenergy* 2013; 58: 390-405.
- [31]: Yang L, Cao J, Mao J, Jin Y. Sodium carbonate-sodium sulfite pretreatment for improving the enzymatic hydrolysis of rice straw. *Industrial Crops and Products* 2013; 43: 711-717.
- [32]: Zhu JY, Pan X, Jr Zalesny RS. Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance. *Appl Microbiol Bioethanol* 2010; 87: 847-857.
- [33]: Li X, Luo X, Li K, Zhu JY, Fougere JD, Clarke K. Effects of SPORL and Dilute Acid pretreatment on Substrate Morphology, Cell Physical and Chemical Wall Structures, and Subsequent Enzymatic Hydrolysis of Lodgepole Pine. *Appl Biochemistry Biotechnology* 2012; 168: 1558-1567.
- [34]: Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulose ethanol. *Biofuel Bioproducts e Biorefining* 2008; 2: 26-40.
- [35]: Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* 2010; 101: 4851-4861.
- [36]: Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management* 2011; 52: 858-875.
- [37]: Zhao X, Zhang L, Liu D. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining* 2012; 6: 561-579.

- [38]: Sousa LC, Chundawat SPS, Balan V, Dale BE. "Cradle-to-grave" assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Current Opinion in Biotechnology* 2009; 20: 339-347.
- [39]: Mood SH, Golfeshan AH, Tabatabaei M, Jouzani GS, Najafi GH, Gholami M, Ardjmand M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2013; 27: 77-93.
- [40]: Galbe M, Zacchi G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 2007; 108: 41-65.
- [41]: Hendriks ATWM, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 2009; 100: 10-18.
- [42]: Idi A, Mohamad S E. Bioethanol from second generation feedstock (lignocellulose biomass). *Interdisciplinary Journal of Contemporary Research in Business* 2011; 3
- [43]: Zhang DS, Yang Q, Zhu JY, Pan XJ. Sulfite (SPORL) pretreatment of switchgrass for enzymatic saccharification. *Bioresource Technology* 2013; 129: 127-134.
- [44]: Zhu JY, Pan XJ, Wang GS, Gleisner R. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. *Bioresource Technology* 2009; 100: 2411-2418.
- [45]: Vohra M, Manwar J, Manmode R, Padgilwar S, Patil S. Bioethanol production: feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2014; 2: 573-584.
- [46]: Tian S, Luo XL, Yang XS, Zhu JY. Robust cellulosic ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine using an adapted strain *Saccharomyces cerevisiae* without detoxification. *Bioresource Technology* 2010; 101: 8678-8685.
- [47]: Herrera A, Téllez-Luis S, González-Cabriales JJ, Ramírez JA, Vázquez M. Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw atmospheric pressure. *Journal of Food Engineering* 2004; 63: 103-109.
- [48]: Bu L, Xing Y, Yu H, Gao Y, Jiang J. Comparative study of sulfite pretreatments for robust enzymatic saccharification of corn cob residue. *Biotechnology for Biofuels* 2012; 5-87.
- [49]: Zheng Y, Pan Z, Z R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int J Agri & Biol Eng* 2009; 2
- [50]: Hamelinck CN, vanHooijdonk G, Faaij APC. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass & Bioenergy* 2005; 28: 384-410.

- [51]: Balat M, Balat H, Cahide O. Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science 2008; 34: 551-573.
- [52]: Taherzadeh M J, Karim K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. BioResources 2007; 2(3): 472-499.
- [53]: Pan X, Xie D, Gilkes N, Gregg DJ, Saddler JN. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. Applied Biochemistry and Biotechnology 2005; 121-124: 1069-1080.
- [54]: vanWyk JPH. Cellulase adsorption-desorption and cellulose saccharification during enzymatic hydrolysis of cellulose materials. Biotechnology Letters 1997; 19: 775-778.
- [55]: Arantes V, Saddler JN. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. Biotechnology for biofuel 2011; 4:3
- [56]: Castro AM. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. Química Nova 2010; 33: 181-188.
- [57]: Ferreira S, Duarte AP, Ribeiro MHL, Queiroz JA, Domingues FC. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. Biochemical Engineering Journal 2009; 45: 192-200.
- [58]: Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. Biotechnology Advances 2006; 24: 452-481.
- [59]: Jørgensen H, Kristensen JB, Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. Biofuels Bioproducts & Biorefining 2007; 1: 119-134.
- [60]: Brummer V, Jurena T, Hlavacek V, Omelkova J, Bebar L, Gabriel P, Stehlik P. Enzymatic hydrolysis of pretreated waste paper - Source of raw material for production of liquid biofuels. Bioresource Technology 2014; 152: 543-547.
- [61]: Mansfield SD, Mooney C, Saddler JN. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. Biotechnology Progress 1999; 15: 804-816.
- [62]: Zhu L, O'Dwyer JP, Chang VS, Granda CB, Holtzaple MT. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. Bioresource Technology 2008; 99: 3817-3828.

[63]: Öhgren K, Bura R, Saddler J, Zacchi G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology* 2007; 98: 2503-2510

[64]: Santos JRA, Gouveia ER. Produção de Bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de produtos Agroindustriais* 2009; 11: 27-33.

[65]: Dogaris I, Mamma D, Kekos D. Biotechnological production of ethanol from renewable resource by *Neurospora crassa*: an alternative to conventional yeast fermentation? *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013; 77: 1457-1473.

[66]: Pineal JVS. Efeito do processo de secagem no potencial antioxidante e na composição fitoquímica de plantas medicinais da família *Fabaceae*. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia 2012.

[67]: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Cytisus\\_striatus](http://pt.wikipedia.org/wiki/Cytisus_striatus)> (acedido em Agosto de 2014)

[68]: Novozymes - Rethink Tomorrow < <http://www.bioenergy.novozymes.com/en/cellulosic-ethanol/insight/Pages/default.aspx> > (Acedido em Abril 2014).

[69]: Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass - Laboratory Analytical Procedure. National Renewable Energy Laboratory 2008.

[70]: Yang Q, Pan X. Pretreatment of *Agave Americana* stalk for enzymatic saccharification. *Bioresource Technology* 2012; 126: 336-340.

[71]:<[http://www.reitoria.uri.br/~vivencias/Numero\\_003/artigos/vencedores/area\\_ciencias\\_agrarias/area\\_ciencias\\_agrarias\\_01.htm](http://www.reitoria.uri.br/~vivencias/Numero_003/artigos/vencedores/area_ciencias_agrarias/area_ciencias_agrarias_01.htm)> (acedido em Junho de 2014).

[72]: Costa VL, Gomes TP, Simões R. Effect of acid sulphite pre-treatment on sugar release through an enzymatic cocktail: comparative study of eucalypt, broom and pine - Em preparação

## **Normas consultadas para este trabalho:**

Norma Portuguesa - Determinação do índice kappa; NP-3186:1995

ISO 638:2000 - Paper, board and pulps; Determination of dry matter content - Oven-drying method

## Anexos

Tabela 11- Resultados do pré-tratamento com sulfito ácido, não sujeitos ao autoclave.

Sulf (%)	Ác. Sulf (%)	Pré-tratamento		pH		Açúcares (%)		Produtos de degradação (%)				Desc. (%)	Lenhina solúvel	Índice kappa	Resid sólíd (%)	Rend total (%)	
		temp (min)	Temp (°C)	in	fin	Gluc	XMG	Furfur	HMF	Ác. Acét	Ác. Fórm						
2	1,5	0	150	1,63	1,77	0,13	0,83	0,013	0,002	1,03	0,14	1,90	3,5	63	83,3	90,9	
		15			1,81	0,15	1,63	0,024	0,003	0,60	0,04	1,44	2,5	91	78,2	84,6	
		30			1,75	0,32	4,75	0,080	0,008	1,83	0,12	2,83	3,9	96	76,1	89,9	
4	3	0		150	1,49	1,5	0,17	3,11	0,015	0,005	1,33	0,21	2,42	3,6	72	73,4	84,3
		15				1,43	2,90	7,41	0,068	0,004	1,95	0,10	3,43	3,7	96	68,2	87,8
		30				1,46	1,63	10,12	0,125	0,011	2,57	0,18	6,98	4,5	124	64,4	90,5
3	0,75	7,5	160		2,12	2,43	0,07	0,46	0,024	0,004	0,55	0,33	1,00	4,0	90	84,8	91,2
		22,5				2,39	1,54	1,65	0,062	0,007	0,84	0,39	2,27	5,1	105	70,0	81,8
	2,25	7,5			1,63	1,53	1,48	12,02	0,149	0,014	3,53	0,24	10,37	2,3	113	68,8	98,9
		22,5		1,56		1,60	10,53	0,145	0,012	2,41	0,20	3,79	3,9	120	64,8	87,4	
1	0,75	7,5		160	1,89	2,46	1,02	1,52	0,044	0,007	0,62	0,13	3,77	2,3	96	83,5	92,9
		22,5				2,48	1,02	1,11	0,050	0,007	0,53	0,10	1,29	1,6	108	78,1	83,8
	2,25	7,5			1,44	1,63	2,13	13,19	0,161	0,015	3,50	0,55	9,58	2,1	103	63,9	95,1
		22,5				1,59	1,82	14,34	0,297	0,022	3,78	0,41	5,60	2,5	113	63,4	92,2

Sulf (%)	Ác. Sulf (%)	Pré-tratamento		pH		Açúcares (%)		Produtos de degradação (%)				Desc. (%)	Lenhina solúvel	Índice kappa	Resid sólido (%)	Rend total (%)	
		temp (min)	Temp (°C)	in	fin	Gluc	XMG	Furfur	HMF	Ác. Acét	Ác. Fórm						
2	1,5	0	170	1,63	1,86	0,41	6,49	0,125	0,012	1,54	0,16	6,10	1,2	105	66,6	82,6	
		15			1,97	0,69	11,29	0,174	0,027	2,88	0,25	5,21	3,4	112	62,2	86,1	
		30			2,04	0,63	10,57	0,371	0,031	2,86	0,19	4,29	2,6	115	62,1	83,6	
0	1,5	15		1,66	2,12	1,16	8,87	0,157	0,214	2,11	0,22	7,68	1,4	134	63,7	85,5	
2	0	15		4,08	3,48	0,23	0,93	0,074	0,009	0,72	0,08	1,84	3,7	118	68,8	76,4	
	3	15		1,55	1,56	1,66	14,55	0,647	0,043	1,66	0,37	2,49	3,8	132	57,3	82,5	
4	1,5	15		2,06	1,89	0,63	10,87	0,332	0,023	2,83	0,54	6,62	6,1	102	56,0	84,0	
3	0,75	7,5	180	2,12	2,33	0,65	9,54	0,537	0,048	2,76	0,44	5,76	5,4	134	72,6	97,7	
		22,5			1,94	0,69	10,58	0,685	0,086	3,77	0,16	3,96	5,3	150	64,9	90,1	
	2,25	7,5		1,63	1,57	1,01	13,81	0,585	0,047	3,99	0,37	2,95	4,0	145	58,6	85,4	
		22,5			1,56	1,55	13,14	0,827	0,100	5,11	0,20	2,06	4,5	168	60,9	88,4	
1	0,75	7,5		180	1,89	2,33	0,50	7,70	0,201	0,038	2,11	0,21	5,87	2,3	135	72,1	91,0
		22,5				2,24	2,09	11,48	0,254	0,074	3,76	0,24	7,38	2,2	167	66,8	94,3
	2,25	7,5			1,44	1,58	1,13	13,86	0,570	0,051	4,12	0,38	2,65	2,2	138	64,9	89,9
		22,5	1,61			1,51	11,50	0,766	0,088	4,12	0,38	2,65	2,3	142	59,7	83,0	
2	1,5	0	190		1,63	1,92	1,01	15,22	0,766	0,072	4,26	0,31	4,70	4,3	119	64,1	94,7
		15				2,02	1,41	12,57	0,793	0,091	5,62	0,26	3,31	5,7	176	60,9	90,6
		30				2,14	0,97	6,18	0,980	0,152	4,52	0,11	1,48	5,4	176	58,0	77,8
0	0,75	0		190	1,82	2,98	0,33	5,42	0,364	0,031	1,53	0,34	2,83	2,1	144	66,4	79,3
		15				3,04	1,56	6,61	0,140	0,076	2,86	0,25	6,65	2,3	163	64,8	85,2
		30				3,05	0,55	5,55	1,117	0,162	4,19	0,26	4,13	3,2	164	63,2	82,3

\***Legenda:** Sulf - Sulfito de sódio; Ac. Sulf - Ácido Sulfúrico; Gluc - Glucose (onde em alguns casos se inclui a celobiose); XMG - Xilose, Manose, Galatose; Furfur - Furfural; HMF - Hidroximetilfurfural; Ac. Acét - Ácido acético; Ac. Fórm - Ácido Fórmico; Desc. - Desconhecidos (componentes presentes no licor que não estão identificados); Resid sólido - Resíduo sólido (calculado pela equação 1); Rend total - Rendimento total