



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DE MATERIAIS LENHOCELULÓSICOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Patrícia Isabel Louro Baptista

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior para obtenção do
grau de Mestre em Química Industrial/ 2º Ciclo de estudos

Covilhã, 2010

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO DE MATERIAIS LENHOCELULÓSICOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Patrícia Isabel Louro Baptista

Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior para obtenção do
grau de Mestre em Química Industrial/ 2º Ciclo de estudos

Orientadoras:

Prof. Doutora Ana Paula Coelho Duarte

Prof. Doutora Maria Emília Amaral

Covilhã, 2010

Agradecimentos

Nada na vida conquistamos sozinhos. Precisamos sempre de outras pessoas para alcançar os nossos objectivos. Muitas vezes um simples gesto pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso.

A elaboração de um trabalho desta natureza envolve-nos bastante, mas também as pessoas que nos rodeiam, pelo que agora que o estou a finalizar não quero deixar de manifestar o meu reconhecimento a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a sua realização, pelo que venho por este meio prestar-lhes o mais sincero agradecimento, com especial relevo às seguintes:

À Professora Doutora Ana Paula Duarte e à Professora Doutora Maria Emília Amaral, minhas orientadoras, por toda a disponibilidade, amizade e principalmente por confiarem no meu desempenho.

A todos os meus amigos, eles certamente saberão quem são, com especial atenção ao Nuno Gil pela amizade, incentivo, enorme paciência e por estar sempre disposto a ajudar-me em qualquer situação.

Deixo também uma palavra de agradecimento aos Professores da Universidade da Beira Interior, com os quais me cruzei no decorrer do meu percurso académico e a todos os colegas e amigos que me acompanharam em todos os momentos.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que, embora não explicitamente mencionados, contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

Por fim e muito especialmente, quero agradecer aos meus Pais, pelo carinho e força que sempre me deram e principalmente pela paciência e grande amizade com que sempre me ouviram. Obrigada pelo amor, alegria e atenção sem reservas...

A todos o meu muito obrigado!

Resumo

Os materiais lenhocelulósicos são uma fonte alternativa para a produção de etanol. *Cistus ladanifer* (esteva), é uma espécie arbustiva abundante em zonas temperadas e está disponível como resíduo florestal. Na bioconversão dos materiais lenhocelulósicos em etanol, é essencial o pré-tratamento do material antes da hidrólise enzimática para que sejam obtidos elevados rendimentos em açúcares e conseqüentemente em etanol. Neste estudo são avaliados os efeitos da temperatura de reacção, tempo de residência, concentração alcalina e o tamanho de partícula na quantidade de açúcares redutores totais, lenhina removida e sólidos recuperados resultantes do pré-tratamento alcalino de *Cistus ladanifer*. Cada amostra foi tratada segundo diferentes condições de operação e a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) foi utilizada com o objectivo de modelar o rendimento em açúcares redutores totais, lenhina removida e sólidos recuperados. A remoção máxima de açúcares redutores foi 171,6 mg/g para o tamanho de partícula de 2mm, reacções realizadas a 180 °C durante 22,5 minutos com 0,1 % de hidróxido de sódio. A remoção máxima de lenhina foi 546,5 mg/g para o tamanho de partícula de 10 mm, reacções realizadas a 160 °C durante 30 minutos com 6,0 % de hidróxido de sódio. A recuperação mínima de sólidos foi 206 mg/g para o tamanho de partícula de 1mm, reacções realizadas a 200 °C durante 30 minutos com 6,0 % de hidróxido de sódio.

Palavras-chave: *Cistus ladanifer*; Bioetanol; Biomassa; Pré-tratamento alcalino;; Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)

Abstract

Lignocellulosic materials are an alternative source for ethanol production. *Cistus Ladanifer* (rock rose) is a shrubby species abundant in temperate zones and is available as forest residues. In the bioconversion of lignocellulosic materials into ethanol is essential the pre-treatment of material prior to enzymatic hydrolysis in order to obtain high yields of sugars and consequently high yields of ethanol. In this study, we have evaluated the effects of reaction temperature, residence time, alkaline concentration and particle size on the amount of released total reducing sugars, removed lignin and resulting recovered solids from alkaline pretreatment of *Cistus ladanifer*. Each sample was treated according to different operating conditions and Response Surface Methodology (RSM) was used for the purpose of modeling the yield of total reducing sugars, removed lignin and recovered solids. The maximum removal of reducing sugars was 171.6 mg / g for the particle size of 2mm, with reactions performed at 180 ° C for 22.5 minutes with 0.1% sodium hydroxide. The maximum removal of lignin was 546.5 mg / g for the particle size of 10mm, with reactions performed at 160 ° C for 30 minutes with 6.0% sodium hydroxide. The minimum recovery of solids was 206 mg / g for the particle size of 1mm, with reactions carried out at 200 ° C for 30 minutes with 6.0% sodium hydroxide.

Keywords: *Cistus ladanifer*; Bioethanol; Biomass; alkaline Pretreatment; Response Surface Methodology (RSM)

Índice de figuras

Figura 1 - Exemplificação do ciclo do carbono (adaptado de (BEST (acedido em 06/01/2010))).	4
Figura 2 - Exemplificação das designações utilizadas para as principais partes componentes das árvores (adaptado de (Fabião 1987)).	5
Figura 3 - Secção transversal do tronco de uma árvore adulta (adaptado de Koga, 1988).	6
Figura 4 - Representação da cadeia principal da estrutura de celulose (adaptado de (U.S. Department of Energy)).	9
Figura 5 – Ultra estrutura da parede celular (adaptado de (U.S. Department of Energy)).	9
Figura 6 - Hidrólise ácida da celulose (adaptado de (D´Almeida 1981)).	11
Figura 7 – Hidrólise alcalina da celulose a temperaturas superiores a 150°C (adaptado de (Fengel e Wegener 1989)).	12
Figura 8 - Oxidação com os iões hipiodito e hipoclorito (adaptado de (D´Almeida 1981)).	13
Figura 9 - Oxidação com o ião periodato (adaptado de (Fengel e Wegener 1989)).	13
Figura 10 – Esquema da degradação enzimática da celulose (adaptado de (Schmidt 2006)).	14
Figura 11 - Principais açúcares constituintes das hemiceluloses (adaptado de (Fengel e Wegener 1989)).	15
Figura 12 – Álcoois precursores da lenhina (Adaptado de (Bierman 1996)).	17
Figura 13 – Estrutura proposta para uma lenhina de uma resinosa (Brunow, et al. 1998).	18
Figura 14 - Resposta de Superfície tri-dimensional mostrando o rendimento obtido (η) em função dos níveis (x_1) e (x_2) (adaptado de Montgomery, 2000).	31
Figura 15 - Contorno projectado de resposta constante (adaptado de Montgomery, 2000).	32
Figura 16 - Representação da natureza sequencial da RSM (adaptado de Montgomery, 2000).	33
Figura 17 – (a) Matéria-prima na floresta (b) Matéria-prima após o destroçamento na floresta e secagem à temperatura ambiente	34

Figura 18 – Representação do moinho (a) e do crivo (b).	37
Figura 19 – Curva de calibração para uma solução de DNS utilizado glucose como padrão.....	39
Figura 20 – Tamanhos de partículas, 1 mm (a); 2 mm (b); 6 mm (c); 10 mm (d).....	40
Figura 21 – Banho termostatizado de PEG 400 (a) e reactores de aço inox de 200 mL (b).....	42
Figura 22 – Frasco de vidro 100 ml.	42
Figura 23 – Matérias-primas após pré-tratamento e durante a secagem.....	43
Figura 24 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	50
Figura 25 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	51
Figura 26 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (A) e da carga (C), mantendo fixa a variável (B), 22,5 min.	52
Figura 27 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	54
Figura 28 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	55
Figura 29 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (A) e da carga (C), mantendo fixa a variável (B), 22,5 min.	56
Figura 30 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	58
Figura 31 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	58
Figura 32 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (A) e da carga (C), mantendo fixa a variável (B), 22,50 min.	59
Figura 33 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	61
Figura 34 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	62
Figura 35 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (A) e da carga (C), mantendo fixa a variável (B), 22,5 min.	63
Figura 36 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura e do tempo (B), mantendo fixa a variável (C), 3,8%.	63
Figura 37 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	66
Figura 38 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	67

Figura 39– Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (A) e da carga (C), mantendo fixa a variável (B), 22,5 min.	68
Figura 40 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	70
Figura 41 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	70
Figura 42 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (A) e da carga (C), mantendo fixa a variável (B), 22,5 min.	71
Figura 43 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	73
Figura 44 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	73
Figura 45 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	75
Figura 46 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	76
Figura 47 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	82
Figura 48 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	83
Figura 49 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	85
Figura 50 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	86
Figura 51 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	88
Figura 52 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	88
Figura 53 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	90
Figura 54 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	91
Figura 55 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	94
Figura 56 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	95
Figura 57 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	97
Figura 58 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	98
Figura 59 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	100
Figura 60 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	101

Figura 61 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (A) e da carga (C), mantendo fixa a variável (B), 22,5min.	102
Figura 62 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	103
Figura 63 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	104
Figura 64 – Representação gráfica dos valores obtidos para a lenhina removida, partindo das equações que modelam o pré-tratamento para os quatro tamanhos de partícula, na gama de temperaturas elevadas.....	107
Figura 65 – Representação gráfica dos valores obtidos para a lenhina removida, partindo das equações que modelam o pré-tratamento para os quatro tamanhos de partícula, na gama de temperaturas baixas.	108
Figura 66 – Representação gráfica dos valores obtidos para os sólidos recuperados, partindo das equações que modelam o pré-tratamento para os quatro tamanhos de partícula, na gama de temperaturas elevadas.....	109
Figura 67 – Representação gráfica dos valores obtidos para os sólidos recuperados, partindo das equações que modelam o pré-tratamento para os quatro tamanhos de partícula, na gama de temperaturas baixas.	110

Índice de tabelas

Tabela 1 – Composição química da matéria-prima (Gil, et al. 2008).....	35
Tabela 2 - Tabela de reagentes utilizados durante os ensaios experimentais	36
Tabela 3 – Intervalos nos quais varia cada factor ou variável considerada.....	41
Tabela 4 – Parâmetros definidos introduzidos no <i>software</i>	41
Tabela 5 – Matriz do desenho experimental realizado para a gama de temperaturas elevadas.....	45
Tabela 6 – Resultados dos quatro tamanhos de partícula com os açúcares redutores totais como resposta.....	46
Tabela 7 – Quadro ANOVA para a resposta dos açúcares redutores para o tamanho de partícula de 1, 2, 6 e 10 mm.....	47
Tabela 8 - Resultados dos quatro tamanhos de partícula com a lenhina como resposta.	48
Tabela 9 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 1 mm.	49
Tabela 10 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 2 mm.	53
Tabela 11 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 6 mm.	56
Tabela 12 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 10 mm.	60
Tabela 13 - Resultados dos quatro tamanhos de partícula com os sólidos recuperados como resposta.	64
Tabela 14 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 1mm.....	65
Tabela 15 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 2 mm.....	68
Tabela 16 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 6 mm.....	72
Tabela 17 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 10 mm.....	74
Tabela 18 – Matriz do desenho experimental realizado para a gama de temperaturas baixas	77

Tabela 19 – Resultados dos quatro tamanhos de partícula com os açúcares redutores totais como resposta.....	78
Tabela 20 – Quadro ANOVA para a resposta dos açúcares redutores para o tamanho de partícula de 1, 2, 6 e 10 mm.....	79
Tabela 21 - Resultados dos quatro tamanhos de partícula com a lenhina como resposta.	80
Tabela 22 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 1 mm.	81
Tabela 23 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 2 mm.	84
Tabela 24 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 6 mm.	86
Tabela 25 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 10 mm.	89
Tabela 26 - Resultados dos quatro tamanhos de partícula com os sólidos recuperados como resposta.	92
Tabela 27 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 1mm.....	93
Tabela 28 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 2 mm.....	96
Tabela 29 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 6 mm.....	99
Tabela 30 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 10 mm.....	102
Tabela 31 – Quadro resumo dos valores de “p” significativos obtidos pela análise ANOVA para a lenhina removida.	105
Tabela 32 – Quadro resumo dos valores de “p” significativos obtidos pela análise ANOVA dos sólidos recuperados.....	106

Índice

Capítulo I -	Introdução	1
Capítulo II -	Revisão Bibliográfica.....	3
II - 1	Biomassa Vegetal	3
II - 1.1	Estrutura e forma da biomassa vegetal.....	4
II - 1.1.1	Caracterização anatómica.....	5
II - 1.1.2	Caracterização morfológica	7
II - 1.2	Caracterização química e principais reacções dos componentes da biomassa.....	8
II - 1.2.1	Celulose.....	8
II - 1.2.1.1	Caracterização da celulose	8
II - 1.2.1.2	Degradação da celulose.....	10
II - 1.2.1.2.1	Degradação hidrolítica	10
II - 1.2.1.2.2	Degradação oxidativa.....	12
II - 1.2.1.2.3	Degradação microbiológica	13
II - 1.2.2	Hemiceluloses	14
II - 1.2.2.1	Caracterização das hemiceluloses	15
II - 1.2.2.2	Degradação das hemiceluloses.....	16
II - 1.2.3	Lenhina.....	17
II - 1.2.3.1	Caracterização da lenhina	17
II - 1.2.3.2	Reacções da lenhina	18
	Hidrólise ácida	19
	Hidrólise alcalina	19
	Condensação ..	19
	Oxidação.....	19
II - 1.2.4	Extractáveis da biomassa	20
II - 1.2.5	Compostos inorgânicos da biomassa	21
II - 2	Pré-tratamento de material lenhocelulósico para obtenção de bioetanol.....	21
II - 2.1	Pré-tratamento físico	22
II - 2.2	Pré-tratamento físico-químico.....	23
II - 2.2.1	<i>Steam explosion</i>	23

II - 2.2.2	<i>Ammonia fiber explosion</i> (AFEX)	23
II - 2.3	Pré-tratamento químico	24
II - 2.3.1	Ácido	24
II - 2.3.2	Alcalino	26
II - 2.3.3	Deslignificação oxidativa.....	27
II - 2.3.4	<i>Organosolv</i>	28
II - 2.3.5	Pré-tratamento com ozono	28
II - 2.4	Pré-tratamento biológico	29
II - 3	Design experimental	29
II - 3.1	Introdução	29
II - 3.2	Design de experiências – Metodologia de Superfície de Resposta (RSM).....	30
Capitulo III -	Parte Experimental	34
III - 1	Materiais e Reagentes	34
III - 1.1	Matérias-primas.....	34
III - 1.2	Material de laboratório.....	35
III - 1.3	Reagentes	36
III - 2	Métodos analíticos.....	37
III - 2.1	Determinação do teor de humidade e preparação da matéria-prima.....	37
III - 2.2	Determinação do teor de lenhina insolúvel.....	38
III - 2.3	Determinação dos açúcares redutores totais	38
III - 3	Método de Pré-tratamento	40
III - 3.1	Preparação das matérias-primas.....	40
III - 3.2	Pré-tratamento e análise dos filtrados	40
Capitulo IV -	Resultados e Discussão	44
IV - 1	Pré-tratamentos/ <i>desing</i> experimental	44
IV - 1.1	Temperaturas Elevadas	45

IV - 1.1.1 Açúcares Redutores Totais.....	46
IV - 1.1.2 Lenhina Removida (LR)	48
IV - 1.1.3 Sólidos Recuperados (Resíduos sólidos)	64
IV - 1.2 Temperaturas Baixas	77
IV - 1.2.1 Açúcares Redutores Totais.....	78
IV - 1.2.2 Lenhina Removida (LR)	80
IV - 1.2.3 Sólidos Recuperados (Resíduos sólidos)	92
IV - 2 Análise comparativa das duas gamas de temperatura.	105
Capítulo V - Conclusões e Perspectivas Futuras.....	111
Referências Bibliográficas	113

Capítulo I - Introdução

Ao longo do século passado o consumo de energia aumentou de forma contínua, com a população do mundo a crescer e o número de países industrializados simultaneamente a aumentar (Sun e Cheng 2002, Jorgensen, Kristensen e Felby 2007, Silverstein, et al. 2007). O petróleo tem sido a fonte mais procurada para colmatar o aumento do consumo de energia (Sun e Cheng 2002). O aumento do preço do petróleo e do gás natural (Hamelinck, Hooijdonk e Faaij 2005, Hahn-Hägerdal, et al. 2006, Champagne 2007) e o seu inevitável esgotamento a curto prazo pode ter consequências graves (Sun e Cheng 2002, Jorgensen, Kristensen e Felby 2007, Silverstein, et al. 2007), logo, um dos principais desafios da sociedade neste século é acompanhar a crescente procura de energias renováveis, essenciais ao actual nível de vida (Hamelinck, Hooijdonk e Faaij 2005, Hahn-Hägerdal, et al. 2006, Champagne 2007).

A problemática do aquecimento global tem provocado um aumento sobre o desenvolvimento de fontes de energias alternativas, tendo em vista a redução do uso de combustíveis fósseis e a quantidade de CO₂ produzido, bem como de outros poluentes (Sun e Cheng 2002, Silverstein, et al. 2007, Balat, Balat e Öz 2008).

De acordo com o Protocolo de Quioto, a União Europeia comprometeu-se a reduzir em 8% a emissão de gases com efeito de estufa em relação a 1990 durante o período de 2008 a 2012 (Union). Com este objectivo em conformidade com o Acordo de Partilha e Responsabilidade, Portugal não deve apresentar um aumento superior a 27% em relação ao ano de 1990 (Seixal).

Com o objectivo de satisfazer o fornecimento futuro de energia e reduzir as emissões de gases com efeito de estufa, a Comissão Europeia pretende substituir 20% dos combustíveis fósseis convencionais por combustíveis alternativos até 2020 no sector dos transportes (Balat, Balat e Öz 2008, Mészáros, et al. 2009, Piccolo e Bezzo 2009, Wit, et al. 2009).

Uma alternativa reconhecida aos combustíveis fósseis e que contribui para a redução da emissão de gases com efeito de estufa é o bioetanol (Balat, Balat e Öz 2008,

Chundawat, Venkatesh e Dale 2007). Além disso, o bioetanol pode ser usado como matéria-prima para a produção de diversos produtos químicos (Dias, et al. 2009).

A mistura de gasolina/álcool tem sido utilizada com sucesso em todos os tipos de veículos e motores que precisem de gasolina. Assim, nos anos 70, com a crise do petróleo, o etanol tornou-se num combustível alternativo (Balat, Balat e Öz 2008).

Actualmente a mistura utilizada nos motores de combustão interna é de 10% de etanol e 90% de gasolina. Em motores adaptados pode ser usada a mistura de 85% de etanol e 15% de gasolina (combustível de veículos flexíveis) ou de 95% etanol e 5% de gasolina. A adição de etanol à gasolina provoca um aumento da octanagem e reduz as emissões de CO, compostos orgânicos voláteis (VOC) e as emissões de partículas (Hamelinck, Hooijdonk e Faaij 2005, Champagne 2007). Tendo o etanol muitas características desejáveis para ser um substituto do petróleo, pode contribuir para uma suave mudança entre a petroquímica e a bioindústria (Chundawat, Venkatesh e Dale 2007).

O bioetanol é produzido em elevadas quantidades a partir de recursos naturais, como o milho e a cana-de-açúcar, beterraba, trigo, bagaço de cana, palha, resíduos agrícolas (Chundawat, Venkatesh e Dale 2007, Dias, et al. 2009, Mészáros, et al. 2009). Contudo, com o objectivo de evitar o conflito combustível/comida existe a necessidade de encontrar uma matéria-prima barata e largamente disponível (Chundawat, Venkatesh e Dale 2007).

Uma potencial fonte de produção de bioetanol de baixo custo é a utilização de materiais lenhocelulósicos (resíduos vegetais, serradura, aparas, lamas, estrume de gado, gramíneas), embora a sua aplicação seja limitada pelo elevado custo de produção de bioetanol com as tecnologias actuais (Champagne 2007).

O processo de produção de etanol a partir de materiais lenhocelulósicos inclui quatro etapas principais: O pré-tratamento, que quebra a matriz lenhocelulósica para tornar o substrato lenhocelulósico mais acessível às enzimas, sendo mais utilizados os pré-tratamentos químicos; A hidrólise, em que os substratos lenhocelulósicos são convertidos em açúcares; A fermentação, que transforma a glucose em etanol; E, por fim, a destilação, que purifica o etanol para respeitar as especificações dos combustíveis (Balat, Balat e Öz 2008, Margeot, et al. 2009, Mészáros, et al. 2009).

Capítulo II - Revisão Bibliográfica

II - 1 Biomassa Vegetal

No reino vegetal distinguem-se as 380.000 espécies conhecidas pelo tamanho, forma e organização do corpo vegetativo, apresentando as mais simples apenas um talo e as mais evoluídas um corpo diferenciado em raiz, caule, folhas e flores (Lidon, Gomes e Abrantes 2001).

A biomassa é produzida na fotossíntese, ou seja, a reacção entre a água, a luz solar e o CO₂ existente no ar que forma os hidratos de carbono que compõem os alicerces do material vegetal. A fotossíntese converte cerca de 1% da luz solar disponível para armazenamento, energia química, ou seja, a energia solar proveniente da fotossíntese é armazenada nas ligações químicas dos componentes estruturais da biomassa. Se a biomassa for processada de forma eficiente, tanto química como biologicamente, extraindo a energia armazenada nas ligações químicas e o subsequente “produto energético” combinado com oxigénio, o carbono é oxidado para produzir CO₂ e água. O processo é cíclico, porque o CO₂ é disponibilizado para produzir de novo biomassa, ao contrário da biomassa fossilizada, que tem sido utilizada, como o carvão e o petróleo. Contudo, a biomassa fossilizada leva milhões de anos a ser convertida em combustíveis fósseis, o que os torna não renováveis. A queima destes combustíveis usa biomassa “velha” e converte-a em “novo” CO₂, o que contribui para o efeito de estufa e esgota um recurso não renovável, o que faz com que o processo não seja cíclico (McKendry 2002) como se pode observar na Figura 1. A biomassa lenhocelulósica compreende um vasto grupo de materiais como resíduos agrícolas, florestais e alguns resíduos sólidos municipais (Balat, Balat e Öz 2008). É considerado biomassa florestal toda a acumulação de massa vegetal que se encontra por cima do solo, como troncos, casca, ramos e folhas da inúmera diversidade de espécies de arbustos e árvores vivas ou mortas (Hakkila 2000).

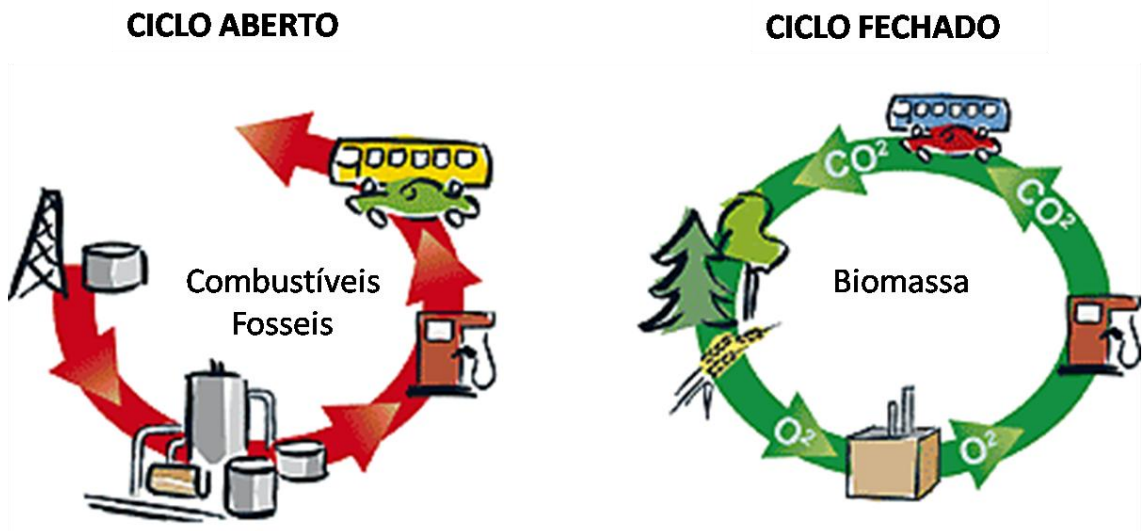


Figura 1 - Exemplificação do ciclo do carbono (adaptado de (BEST (acedido em 06/01/2010))).

II - 1.1 Estrutura e forma da biomassa vegetal

De acordo com a estatura do caule, a biomassa é geralmente classificada em ervas, subarbustos, arbustos, árvores e lianas (Lidon, Gomes e Abrantes 2001).

Assim, as plantas anuais e vivazes são classificadas como ervas, enquanto os subarbustos possuem uma altura inferior a um metro, apresentam uma base lenhosas e um carácter herbáceo na parte restante. Os arbustos apresentam uma altura inferior a cinco metros e apresentam ramos na base. Enquanto as árvores apresentam uma altura superior a cinco metros e não apresentam ramos na parte inferior (Lidon, Gomes e Abrantes 2001).

O uso de critérios definidos na identificação das estruturas vegetais, tem a vantagem de fazer corresponder a estes conceitos produtos tecnológicos bem definidos e fáceis de separar na floresta durante as operações de recolha de material lenhoso. Estas designações encontram-se ilustradas na Figura 2 (Fabião 1987).

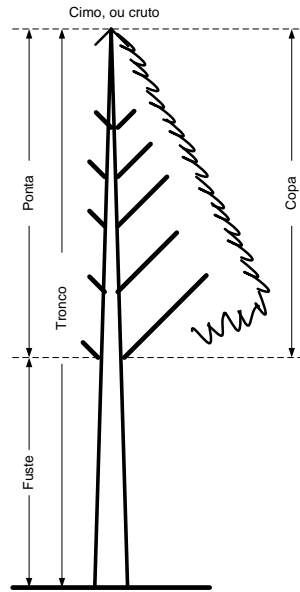


Figura 2 - Exemplificação das designações utilizadas para as principais partes componentes das árvores (adaptado de (Fabião 1987)).

II - 1.1.1 Caracterização anatômica

Nas árvores a casca externa é constituída por células mortas, enquanto a entrecasca é composta por células vivas, o floema. O xilema pode ser dividido em duas secções, borne e cerne. Borne é fisiologicamente activo e uma parte viva da madeira. As células dessa região contribuem para o armazenamento de alimentos e transporte de nutrientes das raízes para diferentes partes da árvore. E o cerne é de cor mais escura, de baixa humidade e maior densidade. As células do cerne não têm nenhuma função fisiológica e são os principais responsáveis para o apoio estrutural da árvore. A cor escura do cerne deve-se à secreção de compostos orgânicos e de resina fenólica que ajudam a proteger a árvore contra a degradação por micróbios. Durante a transição do lenho inicial para lenho tardio, o diâmetro da célula torna-se menor, enquanto a parede celular se torna mais espessa. Os traqueídos do lenho tardio proporcionam resistência mecânica, enquanto os traqueídos do lenho inicial conduzem a água e sais minerais dentro da árvore (Sjöström 1981, Fengel e Wegener 1989, Fujita e Harada 2001)

Através da análise macroscópica de uma secção transversal do caule de uma árvore adulta, representada na Figura 3, é possível distinguir os seguintes tecidos: a medula, o cerne, o borne, o câmbio, o floema e a periderme (Koga 1988).

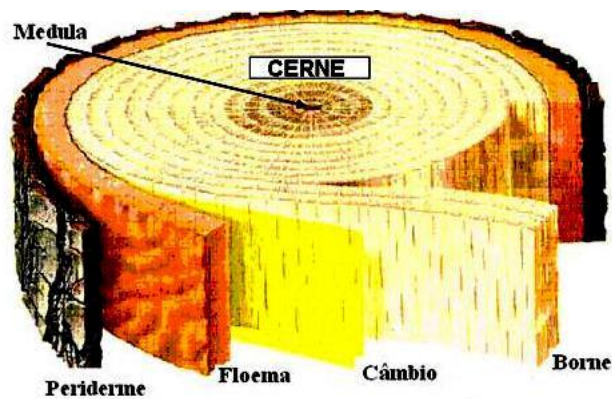


Figura 3 - Seção transversal do tronco de uma árvore adulta (adaptado de Koga, 1988).

A *medula* é o tecido localizado na região central do tronco, que se estende continuamente ao longo de todo o seu comprimento e tem por função o armazenamento de substâncias nutritivas para a planta (Koga 1988).

O *cerne* e o *borne* formam em conjunto o xilema (ou lenho), o qual ocupa a maior fracção do tronco e constitui a principal fonte de fibras da madeira. Este tecido é formado por células, orientadas na sua maioria longitudinalmente, cujas funções estão relacionadas com a condução de água e das substâncias nela dissolvidas, servindo de armazenamento e de sustentação da planta. O *cerne*, que existe apenas em árvores adultas, é constituído por células mortas, que estão envolvidas no suporte mecânico da árvore. O *borne* (a zona periférica) está fisiologicamente activo e é responsável pela condução da seiva bruta a partir da raiz e pela sustentação da árvore (Koga 1988).

O *câmbio* é uma fina camada de células vivas que aparece antes do final do primeiro ano de crescimento e que garante o crescimento radial da árvore (crescimento secundário), através da produção de células de xilema e de floema, em ciclos que variam em função das estações do ano (Koga 1988).

É através do *floema* que se realiza o transporte de seiva elaborada (hidratos de carbono resultantes da fotossíntese) desde a copa da árvore. Em certas espécies, como é o caso do eucalipto, o floema é periodicamente renovado, ao contrário do xilema que permanece relativamente imutável (Koga 1988).

A *periderme* (designada na árvore adulta por ritidoma) é composta por tecido inativo de espessura variável consoante a espécie. Esta assegura a protecção da árvore contra agressões exteriores (climatéricas, biológicas ou mecânicas) (Koga 1988).

As espécies arbustivas são anatomicamente semelhantes às árvores, existindo apenas alguma diferença na espessura das camadas definidas anteriormente.

II - 1.1.2 Caracterização morfológica

O tecido predominante no tronco é o xilema, onde podemos encontrar diferentes tipos de células, que se podem dividir, consoante a sua função, em três tipos (Esau 1997):

- ✓ Células condutoras, onde os elementos de vaso e os traqueídeos são os principais responsáveis pelo transporte da água e das substâncias nela dissolvidas. Os elementos de vaso são, em geral, alongadas, morrem na maturidade e têm paredes lenhificadas, razoavelmente espessas, apresentando uma grande quantidade de pontuações (pequenas aberturas que permitem a comunicação entre células). Ao contrário destes, os traqueídeos são células alongadas e relativamente estreitas, de extremidades fechadas e arredondadas, muito pontuadas;
- ✓ Células de suporte, onde temos os elementos fibrosos, cuja principal função é a de assegurar a sustentação da árvore. As fibras são células alongadas, finas e ocas, de paredes espessas e geralmente lenhificadas, podendo ser classificadas em duas categorias: os fibrotraqueídeos e as fibras libriformes;
- ✓ Células de armazenamento, também denominadas “células de parênquima”, que têm como função o armazenamento de nutrientes (amidos, óleos e entre outras substâncias). Estas células podem apresentar-se alinhadas longitudinalmente (parênquima axial) ou radialmente (parênquima radial ou “raios”), isoladas ou em feixes. As paredes das células parenquimáticas podem também ser espessas e lenhificadas.

II - 1.2 Caracterização química e principais reacções dos componentes da biomassa

Os materiais lenhocelulósicos são compostos basicamente por celulose (polímero de glucose), hemiceluloses (mistura de polissacarídeos, compostos essencialmente por glucose, manose, xilose e arabinose) e lenhina (Dias, et al. 2009, Hendriks e Zeeman 2009).

II - 1.2.1 Celulose

A celulose é a base estrutural das células das plantas, admitindo que 40% do carbono existente nas plantas se encontra ligado em moléculas de celulose (Fengel e Wegener 1989). A celulose é o principal constituinte da madeira (Sjöström 1981). A quantidade de celulose nas plantas varia de acordo com a sua origem (Fengel e Wegener 1989). Na maioria das espécies vegetais cerca de 40 a 50% da matéria seca é celulose, situada essencialmente na parede celular secundária (Sjöström 1981). Na madeira ela está estreitamente associada à hemicelulose e à lenhina estando a sua separação dependente de um tratamento químico intenso (Fengel e Wegener 1989).

II - 1.2.1.1 Caracterização da celulose

Dos três recursos biológicos das plantas, a celulose é a estrutura quimicamente mais simples (Pu, et al. 2008). A celulose é um homopolímero linear constituído por unidades repetidas de celobiose, dímero de β -D-anidroglicopiranosose, ligadas entre si por ligações glucosídicas β -(1-4). As suas cadeias apresentam entre 5000 a 10000 unidades de glucose (Bierman 1996), com um grau de polimerização variando entre 10 000 para o algodão e menos de 500 para vários materiais processados industrialmente (Pu, et al. 2008). A Figura 4 mostra a cadeia principal da celulose.

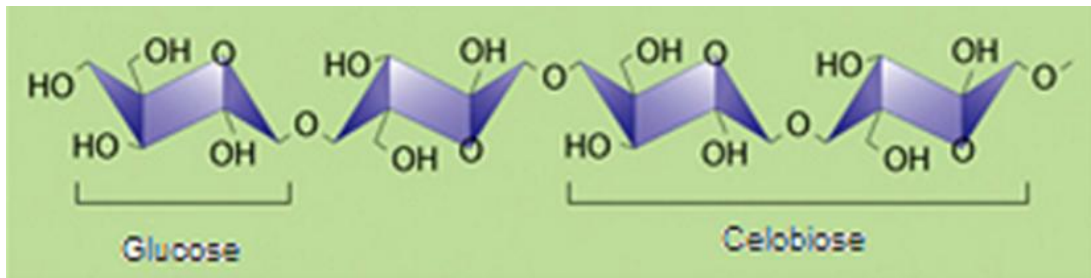


Figura 4 - Representação da cadeia principal da estrutura de celulose (adaptado de (U.S. Department of Energy))

A cadeia de celulose tem uma disposição para formar ligações intra e intermoleculares de hidrogénio dos grupos hidroxilo livres, formando fibrilas elementares, o que endurece as cadeias e promove a união numa estrutura cristalina (Pu, et al. 2008).

As fibrilas elementares são agregadas entre si, formando as microfibrilas que se organizam de forma a suportarem a parede celular. Estas microfibrilas são constituídas por regiões cristalinas rigorosamente ordenadas, devido às ligações por pontes de hidrogénio intra e intermoleculares, alternando com regiões amorfas menos ordenadas. As microfibrilas formam as macrofibrilas e estas formam fibras (Figura 5). As suas estruturas lineares e cristalinas são responsáveis pelas boas propriedades mecânicas atribuídas a madeira (Kirk e Farrel 1987).

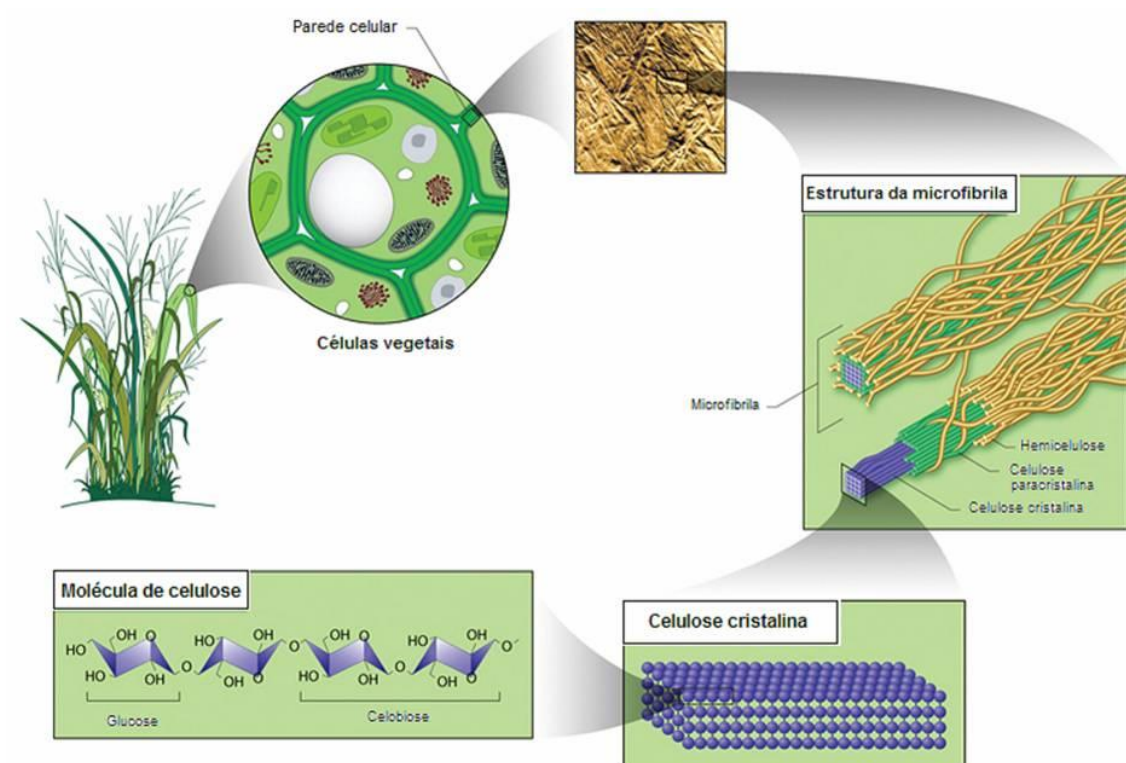


Figura 5 – Ultra estrutura da parede celular (adaptado de (U.S. Department of Energy)).

Grande parte das amostras de celulose natural apresenta vários graus de celulose amorfa, a qual reage mais facilmente aos produtos químicos e aos ataques enzimáticos (Pu, et al. 2008).

II - 1.2.1.2 Degradação da celulose

A Degradação da celulose pode ser efectuada através de várias reacções. De onde podem resultar pequenas moléculas, como a glucose.(Klemm, et al. 1998).

A sensibilidade das ligações β -glucosídicas e a presença dos três grupos hidroxilo livres em cada unidade de glucose determina a reactividade da celulose. Os grupos hidroxilo podem reagir com agentes de adição, oxidação e substituição, os grupos acetal sofrem hidrólise tanto em meio ácido como alcalino, os grupos aldeídicos terminais podem reduzir-se a grupos álcool, serem oxidados a grupos carboxílicos ou, quando em meio alcalino, rearranjados para formarem grupos terminais álcool ou carboxílico (McDonald 1969, Casey 1980).

II - 1.2.1.2.1 Degradação hidrolítica

A clivagem hidrolítica de ligações glucosídicas entre duas unidades de glucose é o modo de degradação mais importante no polímero de celulose (Klemm, et al. 1998).

A degradação hidrolítica pode ocorrer tanto em meio ácido como em meio alcalino. A reacção em meio ácido é bastante dependente da concentração do mesmo, sendo que, para concentrações elevadas a velocidade de reacção torna-se apreciável mesmo a temperaturas inferiores a 100°C. Na reacção em meio ácido dá-se a clivagem das ligações β -glucosídicas, obtendo-se como produto final a glucose, conforme ilustrado na Figura 6 (D´Almeida 1981)

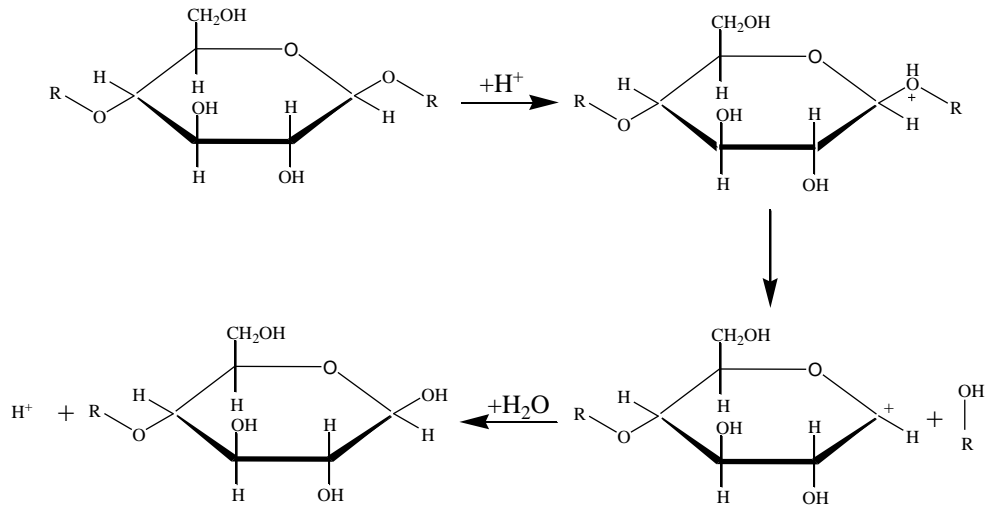


Figura 6 - Hidrólise ácida da celulose (adaptado de (D'Almeida 1981))

Geralmente a hidrólise ácida é homogénea na presença de ácidos fortes e concentrados, que dissolvem completamente a celulose, sendo o principal produto desta reacção a glucose. Em condições ácidas menos severas a hidrólise é heterogénea e a celulose conserva a sua estrutura fibrosa (Lapointe 1989).

As reacções mais importantes que ocorrem em condições alcalinas são as reacções de *peeling* dos grupos terminais redutores dos polissacarídeos e a hidrólise alcalina das ligações β -glucosídicas e dos grupos acetílicos. A reacção de *peeling* inicia-se a cerca dos $100^\circ C$ e acentua-se até aos $130^\circ C$, decrescendo posteriormente, até praticamente se extinguir, competindo directamente com a reacção de *stopping* que ocorre e que impede a continuação da degradação. Para temperaturas superiores a $150^\circ C$ ganha particular importância a hidrólise alcalina das ligações β -glucosídicas (Figura 7), que dá origem a fragmentos de polissacarídeos com uma nova extremidade redutora, diminuindo significativamente o grau de polimerização da celulose (Sjöström 1981, Fengel e Wegener 1989).

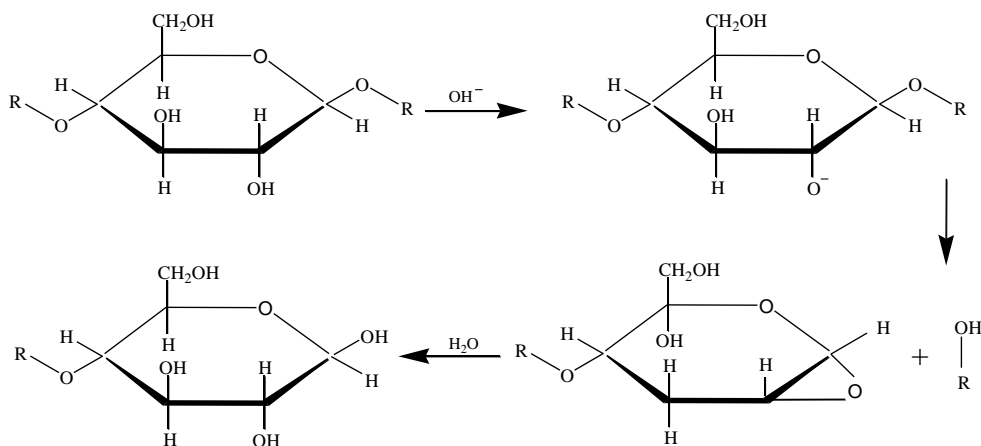


Figura 7 – Hidrólise alcalina da celulose a temperaturas superiores a 150°C (adaptado de (Fengel e Wegener 1989)).

II - 1.2.1.2.2 Degradação oxidativa

A degradação oxidativa da celulose pode seguir diversos caminhos que incluem várias medidas paralelas e de reacções consecutivas. A degradação oxidativa começa normalmente com a conversão de uma unidade de glucose anidra num derivado bastante instável, seguindo-se a abertura do anel e/ou a clivagem da cadeia (Klemm, et al. 1998).

A celulose é muito sensível a reagentes oxidantes, pelo que é facilmente oxidada. Os grupos hidroxílicos e aldeídicos são os mais susceptíveis ao ataque. A oxidação introduz grupos carbonílicos e carboxílicos em várias posições das unidades de glucose da cadeia de celulose, chamando-se à celulose oxidada, oxixelulose. As ligações glicosídicas activadas pelos grupos oxidados introduzidos nas cadeias de celulose podem sofrer degradação em meio ácido ou alcalino (Casey 1980, D'Almeida 1981).

Alguns oxidantes têm uma acção específica, atacando e criando apenas determinados grupos, dos quais se podem destacar os iões hipiodito, hipoclorito e periodato. Os dois primeiros oxidam os grupos aldeídicos, formando grupos carboxílicos (Figura 8) e o periodato oxida os grupos hidroxílicos de dois carbonos adjacentes a grupos aldeídicos, com ruptura de cadeia (Figura 9) (D'Almeida 1981, Sjöström 1981, Fengel e Wegener 1989).

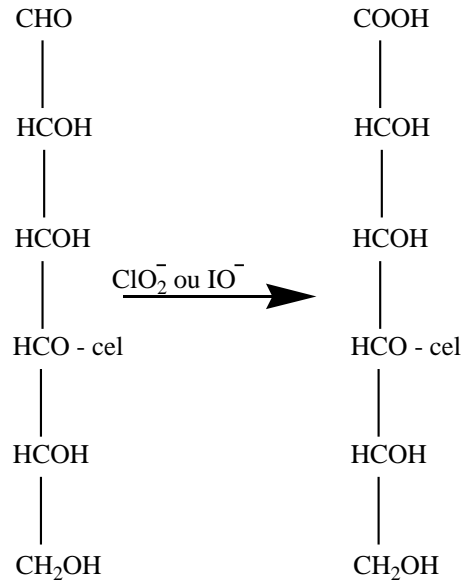


Figura 8 - Oxidação com os iões hipiodito e hipoclorito (adaptado de (D’Almeida 1981)).

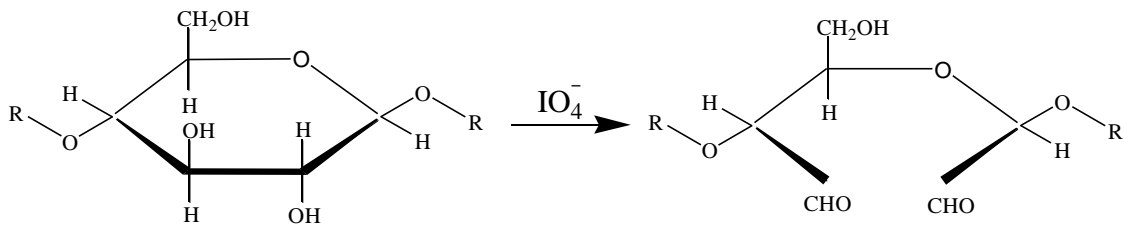


Figura 9 - Oxidação com o ião periodato (adaptado de (Fengel e Wegener 1989))

Existem agentes oxidantes não específicos como a mistura cloro/hipoclorito e o ácido crómico, que oxidam tanto os grupos aldeídicos terminais como os grupos hidroxílicos, originando grupos carboxílicos e carbonílicos (D’Almeida, 1981; Sjöström, 1981).

O oxigénio molecular também é um oxidante não específico, mas necessita de meios muito alcalinos para que ocorra oxidação (Klemm, et al. 1998).

II - 1.2.1.2.3 Degradação microbiológica

Um elevado número de microrganismos tem capacidade de produzir enzimas celulósicas, mas poucos são capazes de lançar todas as enzimas necessárias para a degradação da celulose cristalina. Enquanto as bactérias degradam a celulose através de enzimas que se ligam as células, os fungos segregam a maioria das enzimas em torno do seu meio de crescimento (Kuhad, Singh e Eriksson 1997).

Os agentes degradativos biológicos da celulose mais eficientes são os fungos filamentosos, que contêm as enzimas endoglucanases e celobiohidrolases, que hidrolisam a celulose cristalina em celobiose e a β -endoglucanases e degradam a celobiose em glucose (Figura 10) (Teeri 1997).

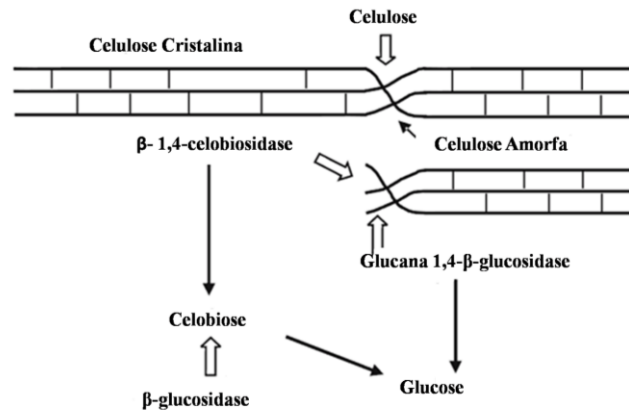


Figura 10 – Esquema da degradação enzimática da celulose (adaptado de (Schmidt 2006))

A susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática depende da sua acessibilidade. Sendo assim, é necessário que exista contacto físico directo entre as enzimas e a celulose para que ocorra degradação. Como a celulose é insolúvel em água e estruturalmente muito complexa, o contacto enzima celulose apenas pode ser proporcionado pela difusão da enzima através da estrutura da celulose. Na madeira, o factor limitante da acessibilidade das enzimas à celulose é a lenhina, uma vez que as microfibrilas de celulose estão cobertas por hemiceluloses e conseqüentemente pela lenhina (Dumitriu 1998).

A degradação provocada pelas enzimas é bastante semelhante à hidrolítica. No entanto, na degradação enzimática o ataque é localizado, pelo facto de as molécula das enzimas serem grandes e não penetrarem fácil e rapidamente na celulose (Casey 1980, D’Almeida 1981).

II - 1.2.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são o principal recurso de polissacarídeos das plantas, depois da celulose (Pu, et al. 2008).

As hemiceluloses, tal como a celulose, funcionam como apoio das paredes celulares, mas, ao contrário desta que é um homopolissacarídeo, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos. As hemiceluloses são facilmente hidrolisadas por ácidos nos seus monómeros (Sjöström 1981, Fengel e Wegener 1989).

A estrutura das hemiceluloses das resinosas possui características diferentes das hemiceluloses das folhosas, sendo a sua quantidade geralmente entre 20 e 30% em peso seco de madeira, nas duas famílias. Contudo, numa mesma árvore existem diferenças notáveis no teor e composição de hemiceluloses entre o tronco, ramos, raízes e casca (Sjöström 1981).

II - 1.2.2.1 Caracterização das hemiceluloses

As hemiceluloses têm uma estrutura complexa, constituída por diferentes polímeros como pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glucose e galactose), desoxioses e ácidos urónicos (Figura 11). Os principais componentes das hemiceluloses, quer das folhosas quer de plantas agrícolas, são as xilanas. Já das folhosas, os principais componentes são as glucomanas (Fengel e Wegener 1989, Hendriks e Zeeman 2009).

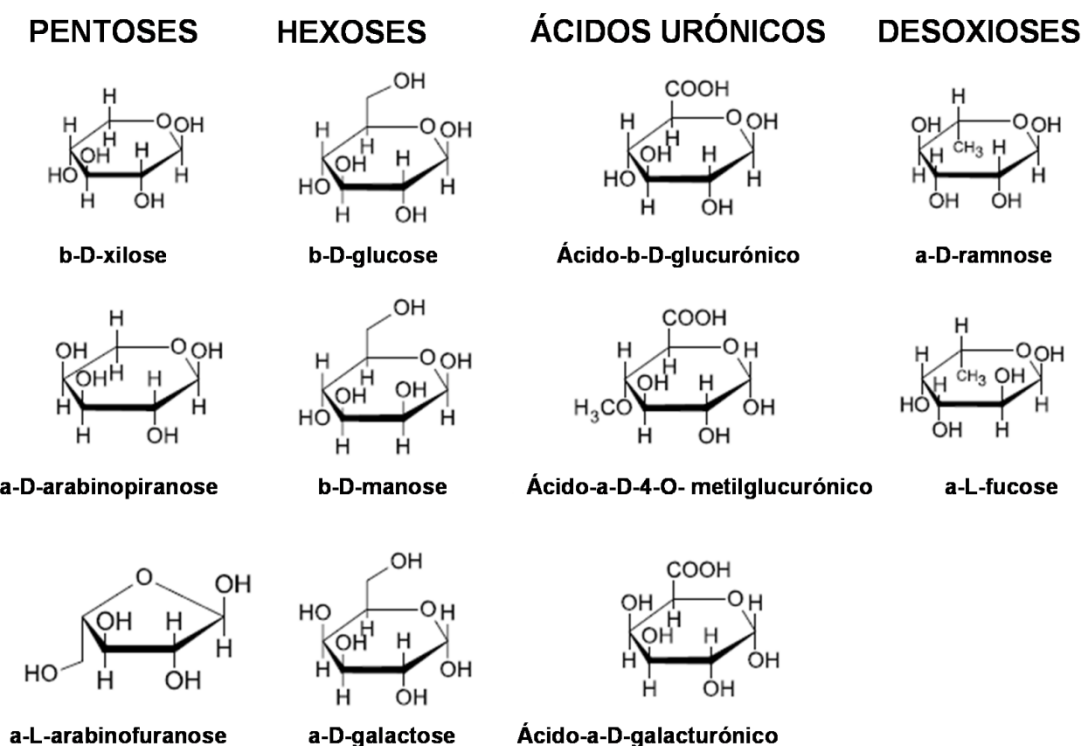


Figura 11 - Principais açúcares constituintes das hemiceluloses (adaptado de (Fengel e Wegener 1989))

Comparativamente com a celulose, as hemiceluloses possuem um peso molecular menor, a sua estrutura apresenta cadeias laterais curtas, que se baseiam em diversos açúcares, que são facilmente hidrolisáveis (Fengel e Wegener 1989, Hendriks e Zeeman 2009). Servindo de ligação entre as fibras de celulose e a lenhina, as hemiceluloses dão maior rigidez a estrutura de celulose-hemicelulose-lenhina (Laureano-Perez, et al. 2005). A solubilização dos compostos hemicelulósicos ocorre em ordem decrescente: manose, xilose, glucose, arabinose e galactose, sendo a solubilidade afectada pela variação da temperatura, ou seja, a solubilidade aumenta com o aumento da temperatura (Gray, Converse e Wyman 2003). A solubilização dos componentes lenhocelulósicos não depende apenas da temperatura, mas também de outras condições como o teor de humidade e o pH (Fengel e Wegener 1989).

Se por um lado as xilanas podem ser extraída num ambiente ácido ou alcalino, por outro, as glucomananas precisam de um ambiente mais alcalino que as xilanas e dificilmente podem ser extraídas num ambiente ácido (Fengel e Wegener 1989).

Dos três principais componentes da madeira, as hemiceluloses são o mais térmico/quimicamente sensível (Hendriks e Zeeman 2009).

II - 1.2.2.2 Degradação das hemiceluloses

O comportamento das hemiceluloses é semelhante ao da celulose. Assim, evidencia-se a importância da acessibilidade nas reacções de degradação ácida. O ácido acético libertado na hidrólise ácida dos grupos acetil das xilanas e nas glucomananas, especialmente a temperaturas elevadas, contribui significativamente para a acidez do meio reaccional (Lai 2001).

Também a degradação oxidativa das hemiceluloses é de esperar que seja semelhante à da celulose no tipo de reacção, mas será mais extensa, pois encontra-se mais acessível. A oxidação das xilanas com hipoclorito resulta na formação de uma variedade de ácidos, como os ácidos urónico, fórmico e glicólico (Lai 2001).

II - 1.2.3 Lenhina

O nome lenhina vem do latim *lignum* que significa madeira (Sjöström 1981).

Depois da celulose e da hemicelulose, a lenhina é o polímero mais abundante na natureza, encontra-se na parede celular, sendo o seu principal objectivo dar suporte estrutural à planta, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e o stress oxidativo (Hendriks e Zeeman 2009).

A lenhina é um heteropolímero composto unidades monoméricas com origem em três álcoois, *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 12), que se encontram ligadas por vários tipos de ligações. Apresenta uma estrutura amorfa, não é solúvel em água e é opticamente inactivo nesta, o que faz com que a sua degradação seja muito difícil (Fengel e Wegener 1989, Hendriks e Zeeman 2009).

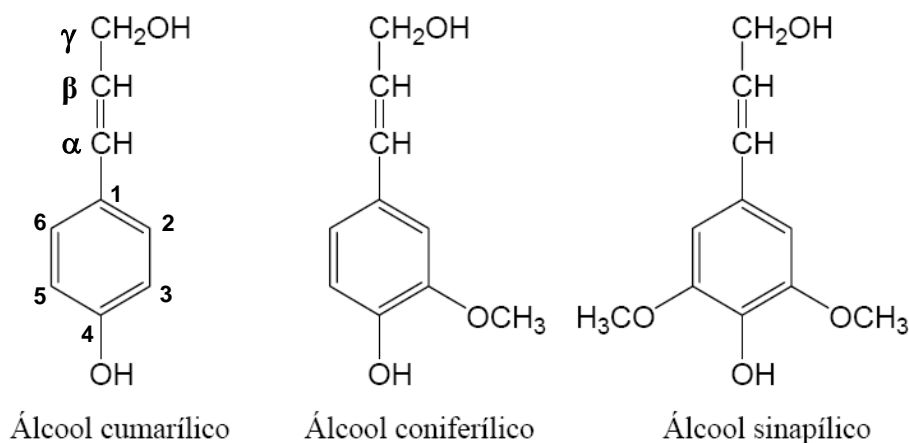


Figura 12 – Álcoois precursores da lenhina (Adaptado de (Bierman 1996)).

A solubilização da lenhina em ambientes ácidos, neutros ou alcalinos depende do seu precursor (Hendriks e Zeeman 2009).

II - 1.2.3.1 Caracterização da lenhina

Este biopolímero tem estrutura amorfa, reticulada, apresenta-se na forma de uma rede tridimensional com ligações cruzadas (Figura 13). A biossíntese da lenhina é consequência da polimerização de três tipos de monómeros de fenilpropano, derivados dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. A lenhina existente nas madeiras de

resinosas é composta principalmente por unidades originadas no álcool coniferílico. No entanto, a lenhina das madeiras de folhosas é composta principalmente por unidades originadas nos álcoois coniferílico e sinapílico. A lenhina é muito menos hidrofílica que a celulose e a hemiceluloses o que afecta a absorção de água e o intumescimento da fibra (Pu, et al. 2008).

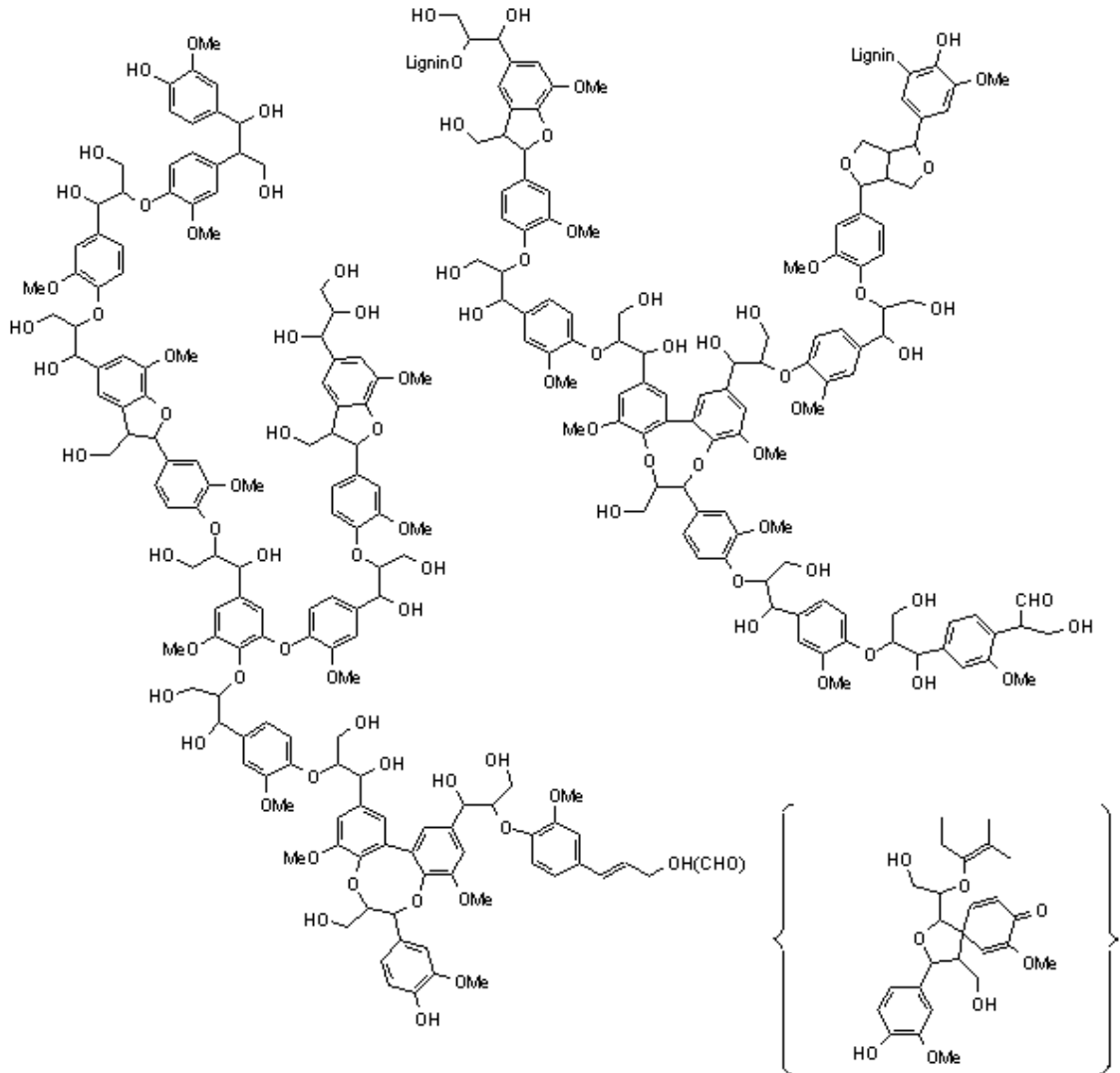


Figura 13 – Estrutura proposta para uma lenhina de uma resinosa (Brunow, et al. 1998).

II - 1.2.3.2 Reacções da lenhina

A lenhina é um polímero de elevada massa molecular, ligado aos polissacarídeos e que não possui grupos hidrofílicos suficientes para ser facilmente solubilizada. Sendo a sua

estrutura grande e altamente ramificada, é de esperar que os mecanismos lenhinolíticos sejam extracelulares. Assim as reacções da lenhina são processos muito complexos.

Hidrólise ácida

O ácido por si só não tem um efeito significativo sobre a lenhina, mas quando o ácido é combinado com outros agentes passa a ter um efeito significativo (Sjöström 1981).

O ácido só por si pode causar a hidrólise da lenhina, mas geralmente não a solubiliza. Contudo, consegue dissolver algumas fracções de lenhina de baixa massa molecular em algumas espécies de folhosas (Sjöström 1981).

Hidrólise alcalina

A lenhina sofre uma série de reacções que a solubilizam, quando é sujeita a um meio alcalino e a temperaturas elevadas ($>160^{\circ}\text{C}$), sendo a principal reacção a ruptura das ligações éter entre as unidades de fenilpropano, formando grupos fenólicos responsáveis pela dissolução da lenhina. Outras reacções que ocorrem em meio alcalino são a clivagem das ligações carbono-carbono e das ligações éter dos grupos metoxílicos (Sjöström 1981).

Condensação

As reacções de condensação podem ocorrer tanto em meio ácido como alcalino, dando origem a ligações covalentes entre fragmentos de lenhina e prejudicando a dissolução do polímero, uma vez que os fragmentos formados apresentam maior massa molecular e ligações carbono-carbono mais resistentes (Sjöström 1981).

Oxidação

A lenhina é muito susceptível de oxidação, reagindo de acordo com as condições e os agentes oxidantes utilizados e sofrendo quebras de cadeia, o que leva à sua dissolução. Agentes oxidantes como o hipoclorito, o dióxido de cloro, o ião permanganato e o ião periodato são largamente utilizados para oxidar a lenhina (Fengel e Wegener 1989).

II - 1.2.4 Extractáveis da biomassa

Os extractáveis da madeira são substâncias químicas que não são consideradas essenciais à estrutura da parede celular e da lamela média. Contrariamente à celulose, à hemicelulose e à lenhina, os extractáveis são componentes não poliméricos (excepto as pectinas e taninos condensados) e podem ser separados pela sua solubilidade em água e em solventes orgânicos (Baeza e Freer 2001, Rowell, et al. 2005, Umezawa 2001). O solvente usado para a extracção, pode servir para classificar os extractivos (Rowell, et al. 2005).

Para impermeabilizar barcos de madeira, tochas e como aglutinantes têm sido usados durante séculos os extractos de resinas, nomeadamente a resina de pinheiro. Encontram também aplicações na medicina, cosmética, tintas, vernizes, conservantes e tem sido propostos como uma fonte de combustível para motores a diesel, a vapor e eléctricos (Baeza e Freer 2001, Rowell, et al. 2005). Alguns são ainda precursores de outros produtos químicos (Rowell, et al. 2005).

Alguns dos extractivos são formados como respostas a feridas e outros fazem parte dos mecanismos de defesa das próprias plantas (Rowell, et al. 2005).

Os extractivos são químicos presentes na parede celular, constituídos principalmente por gorduras, ácidos e álcoois gordos, fenóis, terpenos, esteróides, ácidos resínicos, resinas, ceras, entre outros compostos orgânicos. Estes produtos químicos existem como monómeros, dímeros e polímeros (Rowell, et al. 2005).

A composição e a quantidade dos extractivos são dependentes da espécie, da idade e das condições ambientais em que as árvores crescem (Baeza e Freer 2001, Umezawa 2001). O conhecimento da composição e da quantidade de extractivos presentes na madeira é muito importante, pois assim são determinadas as diferenças nas propriedades das madeiras (Baeza e Freer 2001, Umezawa 2001). Alguns dos extractivos presentes na madeira são tóxicos aos fungos, bactérias e térmitas (Baeza e Freer 2001). Outros são responsáveis pela cor, cheiro, durabilidade da madeira e pelo aumento das propriedades mecânicas da madeira (Baeza e Freer 2001, Rowell, et al. 2005, Umezawa 2001). Mas também há extractivos com propriedades negativas ou indesejáveis, como por exemplo alguns extractivos que na presença de metais, provocam a corrosão destes últimos, a

inibição da fixação de colagem e de acabamentos, contribuindo também para a regressão da cor das pastas (Baeza e Freer 2001).

II - 1.2.5 Compostos inorgânicos da biomassa

Os compostos inorgânicos são normalmente referidos como o teor de cinzas, que é uma medida aproximada de sais minerais e outras matérias inorgânicas presentes na madeira após a combustão a uma temperatura de $575\pm 25^{\circ}\text{C}$. Em madeiras com grandes quantidades de sílica, o conteúdo inorgânico podem ser bastante elevados. Contudo, na maioria dos casos o seu conteúdo é inferior a 0,5%. Apesar de representar uma pequena quantidade o material inorgânico apresenta uma grande variedade de elementos químicos, sendo os principais, o Ca, Mg e o K que representam 80% das cinzas. Provavelmente existem no lenho como oxalatos, carbonatos e sulfatos ligados aos grupos carboxílicos. Os restantes 20% de matéria inorgânica são constituídos por Na, Si, B, Mn, Fe, Mo, Cu, Zn, Ag, Al, Ba, Co, Cr, Ni, Pb, Rb, Sr, Ti, Au, Ga, In, La, Li, Sn, V e Zr, alguns dos quais são essenciais ao crescimento das árvores. A distribuição e concentração destes elementos varia amplamente dentro e entre as espécies, pois dependem das condições ambientais, solo, fertilizantes utilizados, poluição do ar e mesmo na raiz, madeira, casca e folhas de uma mesma árvore (Baeza e Freer 2001, Rowell, et al. 2005).

II - 2 Pré-tratamento de material lenhocelulósico para obtenção de bioetanol

Os materiais lenhocelulósicos são fontes renováveis que podem ser utilizadas directa ou indirectamente para a produção de produtos químicos. Contudo, o aproveitamento industrial destes materiais tem sido comprometido por vários factores, como por exemplo a forte ligação que existe entre os seus três principais componentes, celulose, hemicelulose e lenhina, e a baixa eficácia dos materiais lenhocelulósicos como substratos de processos biológicos (Emmel, et al. 2003).

A parede celular actua normalmente nas plantas como uma protecção física contra organismos patogénicos, alguns dos quais contêm enzimas hidrolíticas específicas que promovem a destruição das fibras da parede celular. Do ponto de vista evolutivo a estrutura da parede celular desenvolveu-se naturalmente para evitar a penetração de organismos patogénicos. Os factores que afectam a digestibilidade enzimática estão normalmente associados numa macro escala com a porosidade da parede celular e o tamanho de partícula da biomassa. Numa micro escala, esses factores estão ligados à cristalinidade da celulose, ao seu grau de polimerização, às ramificações da cadeia das hemiceluloses e à composição da lenhina. É importante modificar as propriedades físicas e químicas da parede celular para uma vantajosa conversão biológica da celulose, que pode ser conseguida através de uma etapa de pré-tratamento. Os pré-tratamentos diferentes têm diferentes composições químicas e diferentes formas de interagir com os componentes da parede das células vegetais. Além disso, existe uma extensa variedade de matérias lenhocelulósicos, que vai desde ervas a árvores (resinosas e folhosas), que têm diferentes propriedades físicas e químicas. Por isso existe uma interdependência entre o pré-tratamento e o tipo de substrato. As propriedades físico-químicas da biomassa também têm impacto no pré-tratamento, afectando todos os processos a jusante para a produção de etanol. Assim sendo, a escolha do pré-tratamento terá um impacto económico de cada uma das fases da biorrefinaria e consequentemente é a operação central para o processamento da biomassa lenhocelulósica para a produção de combustíveis e produtos químicos (Sousa, et al. 2009).

Hoje existem várias e importantes tecnologias de pré-tratamento e podem ser classificadas, com base na natureza da ruptura da parede celular, em várias categorias:

II - 2.1 Pré-tratamento físico

O pré-tratamento físico funciona com base no princípio da redução do tamanho de partícula, por stress mecânico. Pode ser obtido através de processos como moagem seca, molhada de vibração e compressão, aumentando o desempenho das enzimas, melhorando a relação superfície/volume e em alguns casos, reduzindo o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose (Sinitsyn, Gusakov e Vlasenko 1991, Chang e Holtzapple 2000, Sousa, et al. 2009). Contudo, o pré-tratamento físico não é suficiente para aumentar a conversão de açúcar, mas a maioria dos outros pré-tratamentos exigem

uma redução mínima do tamanho de partícula, para serem mais eficazes. É importante verificar que, a partir de um certo tamanho de partícula, este tratamento torna-se economicamente inexecutável (Sousa, et al. 2009).

II - 2.2 Pré-tratamento físico-químico

II - 2.2.1 *Steam explosion*

Neste pré-tratamento a biomassa é tratada com vapor a alta pressão em condições ideais, seguida por um arrefecimento brusco e por uma expansão adiabática do conteúdo do reactor. As condições ideais são definidas como aquelas que produzem mais substrato para a hidrólise seguinte, com o mínimo de perdas devido às reacções colaterais, como é o caso da desidratação (Emmel, et al. 2003, Sousa, et al. 2009).

A vantagem deste pré-tratamento é, a fácil optimização das condições de pré-tratamento para produzir elevados rendimentos de produtos químicos específicos, a partir de uma grande variedade de biomassa vegetal. A hemicelulose, a lignina e a celulose são separadas em três correntes diferentes do processo, solúvel em água, solúvel em soluções alcalinas e insolúvel quer em água quer em soluções alcalinas. Através da hidrólise enzimática pode-se alcançar o rendimento teórico da conversão da celulose, os açúcares hemicelulósicos podem ser convertidos totalmente em combustíveis líquidos e em condições de pré-tratamento óptimas pode-se reduzir a libertação de inibidores da fermentação (Emmel, et al. 2003).

O método é eficaz para uma ampla variedade de biomassa vegetal, incluindo folhosas, resinosas, resíduos agrícolas e de outros materiais celulósicos (Emmel, et al. 2003). Contudo, os resultados do *steam explosion* são afectados pela temperatura, tempo de residência, tamanho de partícula e teor de humidade (Duff e Murrayh 1996).

II - 2.2.2 *Ammonia fiber explosion (AFEX)*

Neste pré-tratamento, a biomassa é embebida em amónia anidra a baixa temperatura e alta pressão durante algum tempo, seguindo-se de uma descompressão rápida (Dale, et

al. 1996, Moniruzzaman, et al. 1997, Foster, Dale e Doran-Peterson 2001, Sousa, et al. 2009). Devido a sua volatilidade a amónia é facilmente recuperada e pode ser reutilizada, o que permite que a biomassa esteja pronta para a hidrólise enzimática. Este tratamento permite que a hidrólise e a fermentação do substrato aconteçam sem a desintoxicação do mesmo, uma vez que as reacções que decorrem durante o tratamento não produzem inibidores para as enzimas e microrganismos (Sousa, et al. 2009). As quebras devido a descompressão melhoram a hidrólise alcalina e enzimática da biomassa. O AFEX solubiliza pouco as hemiceluloses, o que resulta numa maior quantidade de açúcares. Este tratamento é muito eficaz em substratos com baixo teor de lenhina, como no caso de resíduos agrícolas, culturas herbáceas e gramíneas, mas no que diz respeito a substratos com elevado teor de lenhina, como a biomassa lenhosa, não é muito eficiente (Dale, et al. 1996, Moniruzzaman, et al. 1997, Foster, Dale e Doran-Peterson 2001).

II - 2.3 Pré-tratamento químico

Aqui estão apresentadas a maioria das tecnologias de pré-tratamento, que compreende os métodos, ácido, alcalino e oxidativo. O funcionamento em condições óptimas dos pré-tratamentos químicos é maximizar a digestibilidade enzimática (Sousa, et al. 2009).

Este conjunto de pré-tratamentos difere no tipo de químicos e mecanismos responsáveis pelas alterações estruturais e químicas da parede celular, que resultam na melhoria da acessibilidade da enzima e uma maior produção de açúcar (Sousa, et al. 2009).

II - 2.3.1 Ácido

Existem diferentes tecnologias de pré-tratamento ácido disponíveis, como é o caso do ácido concentrado, ácido diluído e *liquid hot water*. Apesar de quimicamente estes tratamentos serem bastante semelhantes, eles actuam de maneira diferente. Enquanto o ácido diluído usa como catalisador um ácido extremamente forte, o pré-tratamento de *liquid hot water* actua em condições ácidas, porque a água se comporta como um ácido a temperaturas elevadas e devido à libertação de ácido acético, resultante da degradação das hemiceluloses nestas condições (Sousa, et al. 2009).

O ácido é responsável pela hidrólise química, visando principalmente a hemicelulose e a lenhina, solubiliza a maioria dos componentes da estrutura da parede celular e melhora a acessibilidade das enzimas a celulose. Durante este tratamento são produzidos vários produtos inibidores da hidrólise enzimática e da fermentação que são principalmente furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácidos fenólicos e aldeídos, ácido levulínico e outros ácidos alifáticos (Sousa, et al. 2009).

O pré-tratamento com ácido diluído usa normalmente ácido sulfúrico em concentrações baixas (0,05-5%) como catalisador para a solubilização da hemicelulose e da lenhina, e temperaturas entre os 160 e 220°C para minimizar a formação de produtos de degradação. Assim, se minimiza a degradação do açúcar contribui para uma produção final de açúcar maior. Contudo este processo exige uma grande lavagem da fracção sólida rica em celulose após o pré-tratamento e/ou desintoxicação do hidrolisado antes da fermentação (Sousa, et al. 2009).

Uma das principais vantagens do tratamento com ácido diluído é a eficácia na maioria das matérias-primas lenhocelulósica. E o rendimento em xilose foi superior ao do *steam explosion*, mas foi inferior ao do AFEX e de outros pré-tratamentos alcalinos. A sua principal desvantagem é a neutralização do pH após o pré-tratamento para a etapa da hidrólise enzimática (Torget, Himmel e Grohmann 1992, Nguyen, et al. 2000).

O pré-tratamento *Liquid hot water* ou auto hidrólise é muito semelhante ao *steam explosion*. A hidrólise da hemicelulose, devido à ionização da água, a altas temperaturas (160 - 230°C) e a pressões elevadas (> 5 MPa) provoca a solubilização dos açúcares da hemicelulose e a clivagem do grupo acetil. A reacção de auto hidrólise é catalisada pelo ácido acético. Outras moléculas ácidas são libertadas como consequência da degradação da lenhina (vários ácidos fenólicos) e da degradação da hemicelulose (ácido fórmico, glucurónico, entre outros), aumentando a velocidade da reacção. Estas alterações estruturais aumentam a acessibilidade e a hidrólise da celulose (Garrote, Domínguez e C.Parajó 2002). Novas variantes deste tratamento permitem um melhor controlo do pH entre 4 e 7, diminuindo a degradação de polissacarídeos não específicos (Sousa, et al. 2009). Vários outros minerais e ácidos orgânicos têm sido utilizados com sucesso como catalisadores deste tratamento (Sousa, et al. 2009).

II - 2.3.2 Alcalino

Os pré-tratamentos alcalinos utilizam bases tais como hidróxido de sódio ou hidróxido de cálcio (Hamelinck, Hooijdonk e Faaij 2005), e o seu resultado depende da composição química dos materiais, principalmente do teor de lenhina que apresentam.

Durante o pré-tratamento alcalino as primeiras reacções que ocorrem são a solvatação e a saponificação. Isto provoca um intumescimento da biomassa, o que a torna mais acessível às enzimas e bactérias (Fengel e Wegener 1989).

O tratamento de materiais lenhocelulósicos com NaOH diluído provoca o intumescimento, levando a um aumento da área superficial, ao decréscimo do grau de polimerização, ao decréscimo da cristalinidade, à quebra de algumas ligações estruturais entre lenhina e hidratos de carbono e à ruptura da estrutura da lenhina (Sun e Cheng 2002, Sánchez e Cardona 2008).

Com concentrações alcalinas elevadas podem ocorrer o *peeling* de grupos terminais, a hidrólise alcalina e a degradação e decomposição de polissacarídeos dissolvidos. A perda de polissacarídeos é causada principalmente pelo *peeling* e pelas reacções hidrolíticas (Fengel e Wegener 1989).

O *peeling* é uma vantagem para a conversão seguinte, mas, como consequência são formados compostos de baixo peso molecular, aumentando assim o risco de degradação e a perda de carbono, na forma de dióxido de carbono (Hendriks e Zeeman 2009).

Uma solução de hidróxido de potássio pode remover selectivamente as xilanas, mantendo a temperatura baixa durante a extracção (temperatura ambiente ou mais baixa) para evitar o *peeling*. Tanto as glucomanas como as xilanas podem sofrer reacção de *peeling*. Esta reacção só por si não representa um grande problema, mas quanto maior for a quantidade de hemicelulose monomérica, menor é a recuperação da hemicelulose total, o que leva a perdas de substrato digestível para o processo de produção de etanol (Hendriks e Zeeman 2009).

O tratamento alcalino pode também provocar a solubilização, a redistribuição e a condensação da lenhina e alterações no estado cristalino da celulose. Estes efeitos podem diminuir ou neutralizar os efeitos positivos da remoção de lenhina e do intumescimento da celulose (Hendriks e Zeeman 2009).

Um aspecto importante do pré-tratamento alcalino é que a biomassa só por si consome alguma da alcalinidade da solução. Assim a solução alcalina que sobra para a reacção é a solução alcalina residual. Outro aspecto importante do pré-tratamento alcalino é a mudança da estrutura da celulose para uma forma que é mais densa e termodinamicamente mais estável que a celulose nativa (Hendriks e Zeeman 2009).

O tratamento alcalino mostrou-se mais eficaz para a palha de trigo e bagaço de cana-de-açúcar com temperaturas mais baixas do que os tratamentos ácidos. Contudo, os tempos de tratamento podem durar várias horas (Pu, et al. 2008).

Para aumentar a eficiência deste tratamento na degradação da biomassa, aplicou-se um suplemento antioxidante, como o oxigénio e o peróxido de hidrogénio, que vai dissolver as hemiceluloses e degradar a lenhina, produzindo uma quantidade de celulose muito acessível às enzimas na hidrólise e na fermentação para produção de etanol (Pu, et al. 2008).

II - 2.3.3 Deslignificação oxidativa

Um dos reagentes oxidantes largamente utilizado no branqueamento da madeira é o peróxido de hidrogénio. Kim *et al* (2001) utilizaram o H_2O_2 com ácido sulfúrico, amónia e água para o pré-tratamento de carvalho pelo processo de percolação e mostraram uma considerável melhoria na hidrólise enzimática. A digestibilidade enzimática de resíduos agrícolas e madeira de carvalho foi muito melhorada pelo uso do pré-tratamento alcalino com peróxido (Bjerre, et al. 1996, Kim, Um e Park 2001).

Com o objectivo de aumentar a digestibilidade enzimática da celulose, podem ser usados agentes oxidantes para remoção da lenhina e das hemiceluloses da biomassa. Esses agentes podem reagir selectivamente com compostos aromáticos da lenhina e também as hemiceluloses e a celulose, mas estas vão contribuir negativamente para o rendimento final na hidrólise enzimática (Sousa, et al. 2009).

Uma forma deste pré-tratamento é a oxidação alcalina húmida, que opera em condições alcalinas e a elevadas temperaturas, utilizando como oxidante o ar comprimido/oxigénio ou o peróxido de hidrogénio (Sousa, et al. 2009).

II - 2.3.4 *Organosolv*

Neste pré-tratamento um solvente orgânico ou uma mistura aquosa com um solvente orgânico é utilizada para quebrar as ligações estruturais entre a lenhina e as hemiceluloses. Os solventes orgânicos normalmente utilizados são o metanol, o etanol, a acetona, o etileno glicol, entre outros (Mamman, et al. 2008). Com a adição de ácidos a este processo normalmente obtém-se um rendimento alto em xilose (Mamman, et al. 2008, Sousa, et al. 2009). Para tornar este processo rentável é fundamental a recuperação dos solventes, pois estes são extremamente caros e o processo exige equipamentos de alta pressão (Mamman, et al. 2008). A remoção dos solventes após o pré-tratamento também é importante, pois estes são inibitórios para a hidrólise enzimática e para a fermentação. Este processo é muito útil para aumentar a hidrólise enzimática, devido a deslenhificação

II - 2.3.5 Pré-tratamento com ozono

O pré-tratamento da biomassa com ozono tem algumas características desejáveis, tais como uma elevada selectividade para a remoção de lenhina, com ligeiro efeito nas hemiceluloses, o tratamento a alta e baixa temperatura e pressão e a ausência de inibidores para a fermentação (Sugimoto, et al. 2009).

O ozono é cada vez mais importante na indústria de celulose e papel como agente de deslenhificação nas sequências de branqueamento. O ozono electrófilo reage selectivamente com as ligações carbono-carbono da lenhina (Sugimoto, et al. 2009).

Segundo Sugimoto e colaboradores (2009) o rendimento de açúcares na sacarificação enzimática aumentou linearmente com o aumento da degradação da lenhina por parte do pré-tratamento com ozono no *Japanese cedar sawdust* e no *Hinoki cypress sawdust*. Após este tratamento o teor de humidade ideal passou de 40% para 90%, e observou-se a decomposição de polissacarídeos. Contudo, um tratamento extensivo com ozono leva à produção de inibidores para a produção de etanol, consumindo uma elevada quantidade de energia para a produção de ozono (Sugimoto, et al. 2009).

II - 2.4 Pré-tratamento biológico

Este tipo de pré-tratamento utiliza principalmente microrganismos solubilizadores de lenhina como os fungos *white-rot*. Estes fungos são os organismos mais eficientes para o pré-tratamento biológico da biomassa (Fan, Gharpuray e Lee 1987).

Alguns estudos indicam que o pré-tratamento biológico poderia reforçar a hidrólise enzimática e tinha como vantagens baixo consumo de energia e condições moderadas. Fungos *white-rot* que degradam a lenhina eficientemente são normalmente utilizados neste tipo de pré-tratamento. A taxa de degradação de lenhina e hidratos de carbono varia com os diferentes fungos *white-rot* (Yu, et al. 2009).

Ao contrário dos pré-tratamentos químicos, este pré-tratamento não é um processo intensivo de energia, sendo usualmente realizado com recurso ao uso de fungos (*white-rot* e certos *actinomycetes*). Durante o pré-tratamento, estes organismos segregam enzimas extra celulares, como lenhina peroxidases e lacases, que ajudam a remover uma quantidade considerável de lenhina da biomassa. Todavia, este tratamento necessita de um tempo de residência elevado (de horas até dias), o que faz com que a sua aplicação em larga escala nas operações de biorefinaria seja bastante limitada. Outra das desvantagens deste pré-tratamento é que a maioria dos microrganismos consome alguns dos hidratos de carbono da biomassa durante o crescimento, o que afectará negativamente a produção de açúcar final. Já as vantagens deste pré-tratamento podem ser mais evidentes, quando os materiais vegetais geneticamente modificados contiverem maiores teores de hidratos de carbono, que necessitem de pré-tratamentos mais suaves (Sousa, et al. 2009).

II - 3 Design experimental

II - 3.1 Introdução

O *design* experimental é uma ferramenta extremamente importante no mundo de engenharia por melhorar o desempenho de um processo industrial. Também tem extensa aplicação para desenvolvimento de novos processos (Montgomery 2000).

Um dos princípios básicos em *design* experimental é a redução do erro experimental e do número de experiências. Tendo em conta que a realização de experiências implica na maioria das vezes dispendiosos encargos financeiros e também períodos temporais muito longos, a implementação de *design* experimental permite em grande parte das situações experimentais, economia de meios, de tempo e resultados mais fiáveis (Hinkelmann e Kempthorne 2005).

A otimização é necessária para aumentar o rendimento e melhorar desempenho dos sistemas, sem aumentar o seu custo (Bas e Boyacı 2007).

Uma das técnicas utilizadas é a mudança de uma variável de cada vez, que consiste numa mudança de um parâmetro prático, mantendo os outros constantes. Esta técnica tem como principais desvantagens não ter em conta os efeitos interactivos entre variáveis e possivelmente não descrevem os efeitos completos dos parâmetros do processo. Este problema pode ser ultrapassado usando a metodologia de superfície de resposta (RSM) (Bas e Boyacı 2007).

O RSM é um conjunto útil de técnicas matemáticas e estatísticas utilizado para desenvolver, melhorar e otimizar os processos em que a resposta pretendida é influenciada por diversas variáveis. Define o efeito das variáveis independentes, isoladamente ou em combinação. Além de analisar os efeitos das variáveis independentes, a metodologia experimental desenvolve um modelo matemático que descreve um produto químico ou processo bioquímico, tendo sido importante na criação, desenvolvimento e formulação de novos produtos, bem como na melhoria de produtos existentes. (Bas e Boyacı 2007).

II - 3.2 Design de experiências – Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)

O RSM consiste num conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas que podem ser usadas para definir as relações entre as respostas e as variáveis independentes e define o efeito desta última isoladamente ou em combinação ao longo dos processos. Além de analisar os efeitos das variáveis, produz um modelo matemático a partir do qual gera uma perspectiva gráfica (Bas e Boyacı 2007).

Um estudo de otimização, usando RSM, pode ser separado em três etapas. A primeira etapa é o trabalho preliminar, no qual se determina os parâmetros independentes e os seus níveis de saída. A segunda etapa é a selecção do desenho experimental e a previsão e verificação da equação do modelo. Por último é a obtenção da superfície de resposta e o seu gráfico de contorno em função dos parâmetros independentes e a determinação dos pontos óptimos (Bas e Boyacı 2007).

Por exemplo, num processo em que se pretende encontrar os níveis de temperatura (x_1) e pressão (x_2) que maximizam o rendimento (y), o rendimento do processo é uma função dos níveis de temperatura e pressão, $y = f(x_1, x_2) + \varepsilon$ onde ε representa o ruído ou erro observado na resposta (y). Se for obtida a resposta esperada por $E(y) = f(x_1, x_2) = \eta$, então a superfície representada por $\eta = f(x_1, x_2)$ é designada por Superfície de Resposta (Montgomery 2000).

A Superfície de Resposta é normalmente representada graficamente como na Figura 14, onde η é representado em função dos níveis (x_1) e (x_2) (Montgomery, 2000).

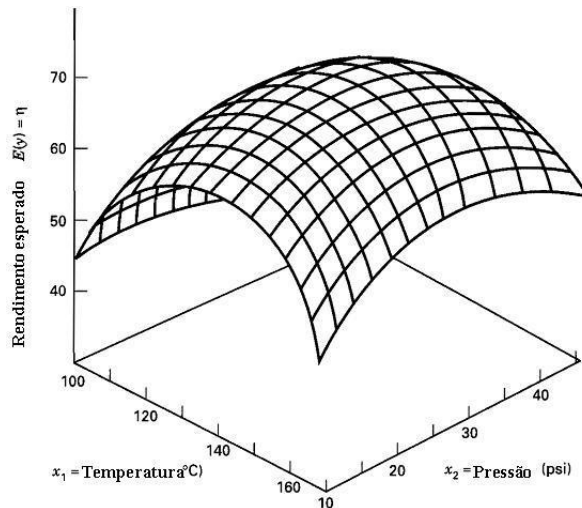


Figura 14 - Resposta de Superfície tri-dimensional mostrando o rendimento obtido (η) em função dos níveis (x_1) e (x_2) (adaptado de Montgomery, 2000).

Para ajudar a visualizar a forma de uma Superfície de Resposta, muitas vezes aparecem na representação os contornos da Superfície de Resposta, como indica a Figura 15 (Montgomery 2000).

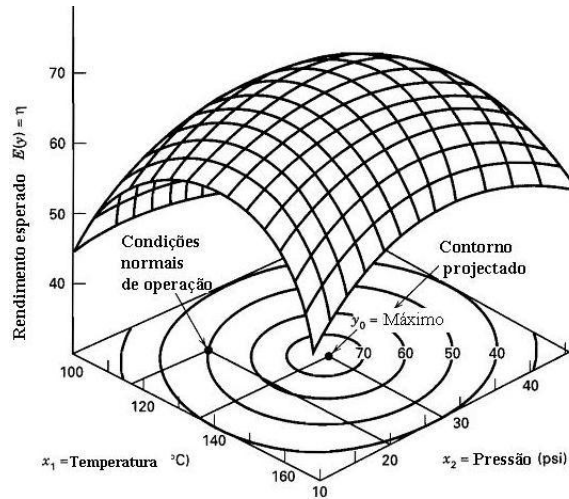


Figura 15 - Contorno projectado de resposta constante (adaptado de Montgomery, 2000).

Na representação do contorno, as linhas onde a resposta é constante são desenhadas no plano x_1, x_2 . Cada contorno corresponde a uma determinada altura da Superfície de Resposta (Montgomery 2000).

Na maior parte dos problemas RSM, a forma da relação entre a resposta e as variáveis independentes é desconhecida. Assim, o primeiro passo para a RSM é encontrar uma aproximação adequada para a verdadeira relação funcional entre a resposta (y) e o conjunto de variáveis independentes. Normalmente, é utilizado um polinómio de ordem baixa em algumas das regiões de trabalho das variáveis independentes. Se a resposta é bem modelada por uma função linear das variáveis independentes, então a função aproxima-se de um modelo de primeira ordem (Montgomery 2000).

Se existir uma curvatura no sistema, então este segue um polinómio de grau superior a um, tal como um modelo de segunda ordem. A maior parte dos desenhos experimentais de RSM utiliza um ou mais modelos. Evidentemente, é pouco provável que um modelo polinomial seja uma aproximação razoável da verdadeira relação funcional ao longo de todo o espaço das variáveis independentes, mas numa região relativamente pequena eles geralmente modelam bastante bem (Montgomery 2000).

A análise da Superfície de Resposta é então realizada na superfície representada. Se a representação da superfície é uma aproximação adequada da verdadeira função de resposta então a análise da superfície representada será aproximadamente equivalente à análise do próprio sistema. Os parâmetros do modelo podem ser estimados mais eficientemente se o *design* ou modelo experimental for utilizado para recolher os dados.

Designs para representação de Superfície de Resposta são denominados *Designs* de Superfície de Resposta (Montgomery 2000).

A RSM é um processo sequencial. Muitas vezes, quando se está num ponto da Superfície de Resposta que é afastado do óptimo, tal como o exemplo da Figura 16, existe pouca curvatura no sistema e o modelo de primeira ordem é o apropriado. O objectivo aqui é fazer com que o método experimental decorra rápida e eficazmente ao longo de um caminho de melhoria em direcção à proximidade da região óptima. Quando a região óptima é encontrada, um modelo mais elaborado, como o de segunda ordem, pode ser empregue, e pode ser realizada uma análise para localizar o ponto óptimo (Montgomery 2000).

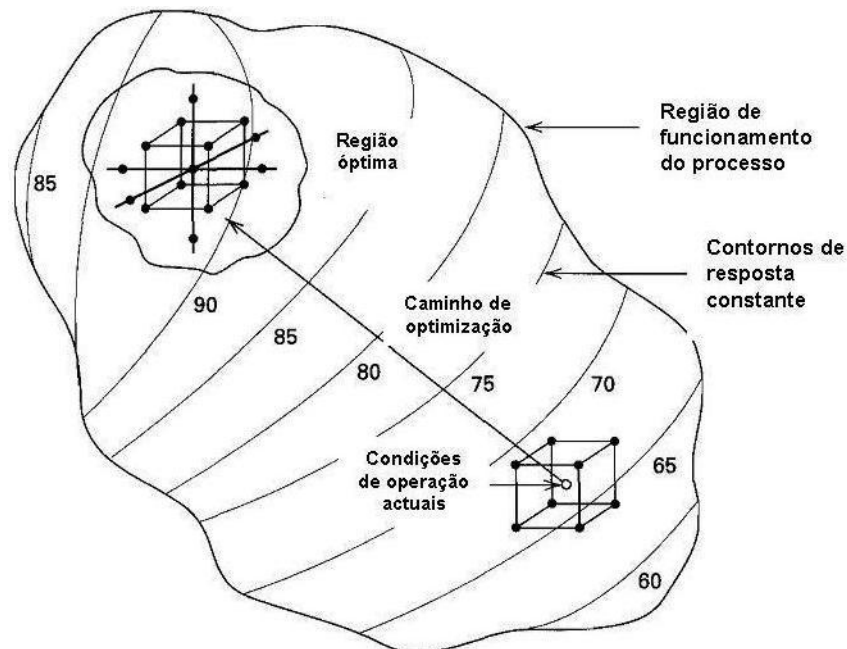


Figura 16 - Representação da natureza sequencial da RSM (adaptado de Montgomery, 2000)

O principal objectivo da RSM é a determinação do ponto óptimo das condições operacionais para um sistema ou determinar uma região do espaço na qual os factores operacionais estão cumpridos (Montgomery 2000).

Capítulo III - Parte Experimental

Neste capítulo descreve-se a matéria-prima, os materiais e os reagentes utilizados, bem como os métodos experimentais seguidos neste trabalho.

III - 1 Materiais e Reagentes

III - 1.1 Matérias-primas

A matéria-prima utilizada neste trabalho é um arbusto pertencente a espécie *Cistus ladanifer* normalmente conhecida como esteva [Figura 17 (a)], existente na região da Serra da Estrela.

A matéria-prima foi colhida, cortada grosseiramente sendo depois seca e armazenada à temperatura ambiente [Figura 17 (b)], posteriormente foi moída e crivada de acordo com o ensaio laboratorial ao qual se destinava.



Figura 17 – (a) Matéria-prima na floresta (b) Matéria-prima após o destroçamento na floresta e secagem à temperatura ambiente

A composição da matéria-prima encontra-se descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química da matéria-prima (Gil, et al. 2008)

	Extractáveis (%)	Cinzas (%)	Lenhina Insolúvel (%)	Lenhina Solúvel (%)	Lenhina Total (%)	Carboidratos totais (%)
<i>Cistus ladanifer (Esteva)</i>	7,4	3,1	32,0	2,2	34,2	55,3

III - 1.2 Material de laboratório

Na realização dos ensaios experimentais utilizou-se diverso material de laboratório, desde material corrente de vidro (pipetas, provetas, copos de precipitação, tubos de ensaio entre outros), bem como material eléctrico (placas de agitação, agitador vortex, etc.). Os equipamentos utilizados especificamente em cada método analítico encontram-se descritos no mesmo.

III - 1.3 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho encontram-se descritos na Tabela 2 de forma a facilitar a apresentação e interpretação.

Tabela 2 - Tabela de reagentes utilizados durante os ensaios experimentais

Reagente	Propriedades / marca
<ul style="list-style-type: none"> • Ácido 3,5-Dinitrossalicílico -Fórmula molecular: $(O_2N)_2C_6H_2-2-(OH)CO_2H$ -CAS n°: 609-99-4	-Massa molecular: 228.12 g/mol -Pureza: $\geq 98.0\%$ -Marca: Fluka
<ul style="list-style-type: none"> • Ácido Sulfúrico -Fórmula molecular: H_2SO_4 -CAS n°: 7664-93-9	-Massa molecular: 98.08 g/mol -Pureza: 95 -97% -Marca: Sigma – Aldrich
<ul style="list-style-type: none"> • D(+)- Glucose anidra -Fórmula molecular: $C_6H_{12}O_6$ -CAS n°: 50-99-7	-Massa molecular: 180.16 g/mol -Pureza: 99.0 % -Marca: Fluka
<ul style="list-style-type: none"> • Etanol Absoluto -Fórmula molecular: CH_3CH_2OH -CAS n°: 64-17-5	-Massa molecular: 46.07 g/mol -Pureza: 99.8 % -Marca: Sigma - Aldrich
<ul style="list-style-type: none"> • Hidróxido de Sódio -Fórmula molecular: $NaOH$ -CAS n°: 1310-73-2	-Massa molecular: 40.0 g/mol -Pureza: $\geq 98.0\%$ -Marca: Sigma – Aldrich
<ul style="list-style-type: none"> • Tartarato de Potássio e Sódio Tetrahidratado -Fórmula molecular: $KOCOCH(OH)CH(OH)COONa \cdot 4H_2O$ -CAS n°: 6381-59-5	-Massa molecular: 228.12 g/mol -Pureza: $\geq 99.98\%$ -Marca: Aldrich

III - 2 Métodos analíticos

Os métodos analíticos adoptados neste trabalho encontram-se descritos de seguida. Todas as alterações aos métodos são devidamente referidos, assim como os principais equipamentos utilizados.

III - 2.1 Determinação do teor de humidade e preparação da matéria-prima

Para a determinação do teor de humidade efectuou-se um primeiro passo de redução de tamanho e classificação de partícula. Assim a matéria-prima foi moída num moinho de laminas (Retsch Mühle – West Germany) representado na Figura 18 (a), sendo crivada num sistema de crivagem mecânico (Retsch Mühle – West Germany, Test Sieve - 5657 HAAN), representado na Figura 18 (b). A etapa de crivagem permite a separação e homogenização do material de acordo com os tamanhos de partícula pretendidos.

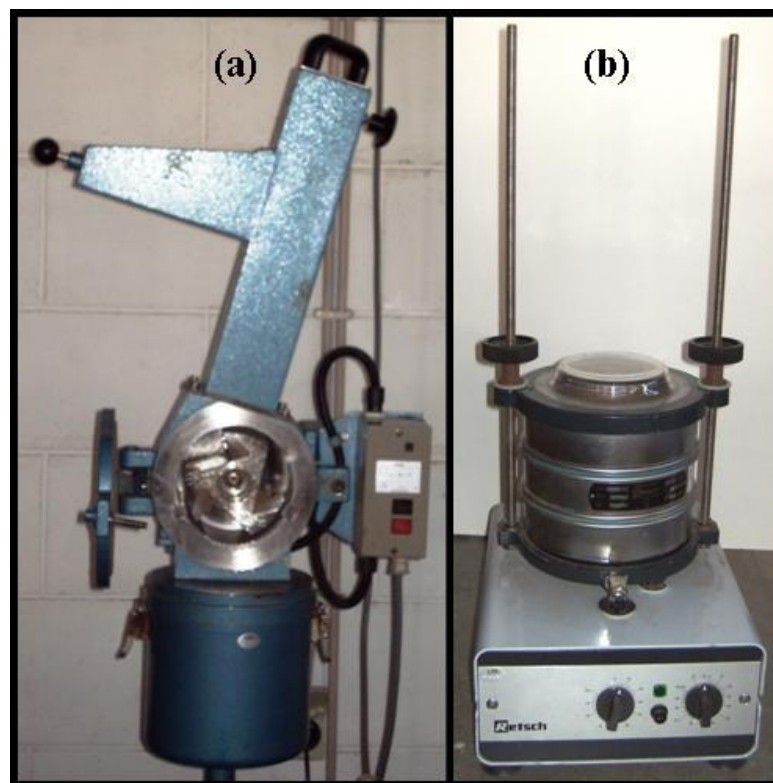


Figura 18 – Representação do moinho (a) e do crivo (b).

A matéria-prima seca ao ar apresenta um teor de humidade entre 7-10%, pois o material lenhocelulósico é altamente higroscópico. Assim o teor de humidade é determinado de acordo com a norma ISO 638-1978 (E). A determinação do teor de humidade com rigor, requer a secagem completa da amostra a temperaturas relativamente elevadas, o que pode provocar alterações na sua composição química, pelo que esta não deve ser utilizada para ensaios subsequentes.

III - 2.2 Determinação do teor de lenhina insolúvel

Para determinar a lenhina insolúvel procedeu-se a redução do pH da fracção líquida até pH 2, deixou-se repousar durante 24h a temperatura de 4°C, em seguida efectuou-se a centrifugação durante 5 minutos a uma velocidade de 4500 rpm e por fim colocou-se na estufa a 105°C \pm 5°C durante 24h, para remover toda a água presente (Baptista, Robert e Duarte 2006). O resíduo seco de lenhina é de seguida pesado.

III - 2.3 Determinação dos açúcares redutores totais

A concentração de açúcares redutores totais presentes nas soluções dos substratos tratados foi determinada através do método de Miller (1959). Este método consiste na reacção de oxidação-redução entre o ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) e os açúcares redutores, em meio alcalino e a 100°C, com formação de um complexo acastanhado o ácido 3-amino-5 nitrosalicílico, que pode ser detectado num espectrofotómetro a 540nm.

O reagente DNS é preparado diluindo 10g de ácido 3,5 dinitrossalicílico em 200ml de NaOH 2N, com agitação e aquecimento (no caso de ser necessário). Separadamente prepara-se uma solução de tartarato de potássio e sódio tetrahidratado em 500ml de

água destilada. O reagente DNS é o resultado da adição das duas soluções anteriores em balão volumétrico de 1L, sendo este aferido no final.

Para a determinação dos açúcares redutores foram realizadas curvas de calibração para cada solução de DNS preparada, utilizando como padrão soluções de D (+)-Glucose anidra em água destilada com concentrações até 5000mg/L. Valores de concentração superiores ultrapassam a validade do método. É importante ainda referir que todas as curvas de calibração efectuadas apresentam valores de R^2 superiores a 0,9987, sendo apresentado um exemplo destas curvas na Figura 19.

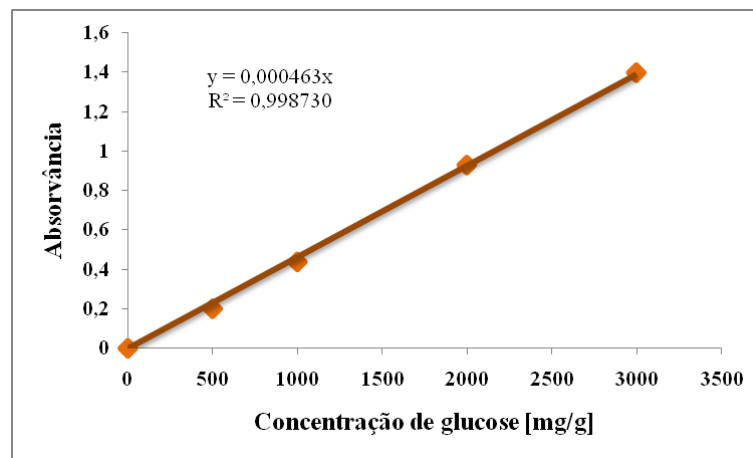


Figura 19 – Curva de calibração para uma solução de DNS utilizado glucose como padrão.

Os ensaios analíticos são efectuados em tubos de ensaio e realizados do seguinte modo, adiciona-se 1mL de amostra a analisar (no caso do branco adiciona-se 1mL de água destilada) com 1mL de reagente DNS 2mL de água destilada, agitando o tubo tapado com papel de alumínio, o tubo é colocado num banho térmico a 100°C durante 10 minutos, sendo em seguida colocado num banho gelado de modo a para a reacção e adicionando mais 6mL de água agitando muito bem em Vortex antes de efectuar a medição espectrofotométrica.

III - 3 Método de Pré-tratamento

III - 3.1 Preparação das matérias-primas

A matéria-prima apresentada na Figura 17 (b) foi moída no moinho de lâminas Figura 18 (a), no qual se encontra um crivo com dimensão de abertura de malha de 10mm. Após a moagem foi efectuada uma crivagem para aumentar a homogeneidade do material, uma vez que o trabalho consiste em 4 tamanhos de partícula distintos. A crivagem foi realizada no crivo apresentado na Figura 18(b), sendo recolhida a fracção retida no crivo de abertura de malha de 0,180mm. Após a moagem e crivagem as amostras apresentavam tamanhos notoriamente diferentes como é visível na Figura 20.

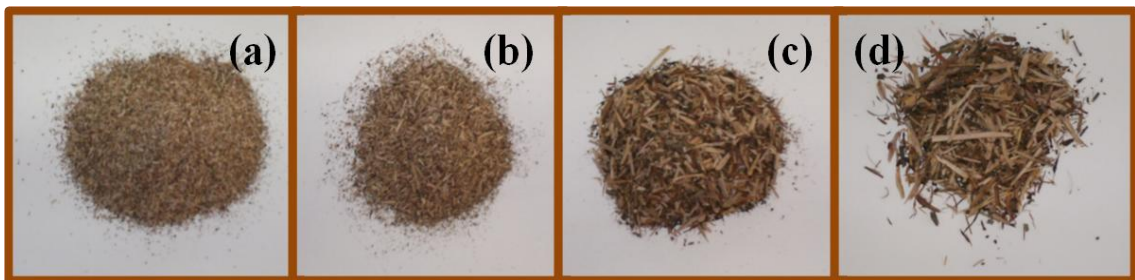


Figura 20 – Tamanhos de partículas, 1 mm (a); 2 mm (b); 6 mm (c); 10 mm (d)

III - 3.2 Pré-tratamento e análise dos filtrados

As condições dos pré-tratamentos foram determinadas de acordo com o *design* experimental obtido pela utilização do programa informático *Design Expert* v.7.1.5 (Stat-Ease *inc.* Minneapolis), recorrendo à Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) com um desenho *Central Composite Design*. Foi escolhido este tipo de desenho por permitir introduzir um grande número de factores ou variáveis independentes e fazer variar esses factores em vários níveis. As variáveis foram escolhidas de acordo com alguns autores (Sousa, et al. 2009, Silverstein, et al. 2007, Jorgensen, Kristensen e Felby 2007, Sun e Cheng 2002). Na Tabela 3 apresentam-se os intervalos nos quais cada factor varia. As condições às quais se realizaram os ensaios encontram-se descritas nas tabelas respectivas no capítulo IV.

Tabela 3 – Intervalos nos quais varia cada factor ou variável considerada.

Variável Temperatura	Tempo [min]	Temperatura [°C]	Concentração de ácido [% w/w]	Razão biomassa/líquido [g biomassa/10 ml líquido]
Elevadas	[15;30]	[160;200]	[1,6;6]	[1;10]
Baixas	[720;2160]	[30;60]	[1,6;6]	[1;10]

Na Tabela 4 são apresentados os principais parâmetros definidos no *software* que têm influência sobre o plano experimental e as condições pretendidas para cada gama de temperaturas.

Tabela 4 – Parâmetros definidos introduzidos no *software*.

Condição Temperaturas	Tipo de design	Pontos Centrais	Réplicas dos pontos Centrais	Réplicas dos pontos axiais	Total de ensaios (runs)	Respostas
Elevadas	<i>Full</i>	6	1	1	20	Açúcares redutores
Baixas						Lenhina removida
						Sólidos recuperados

Após a introdução do *software* e das principais condições às quais se realizaram os ensaios, o método de pré-tratamento é descrito de seguida de uma forma generalizada. As variáveis principais foram ajustadas de acordo com as condições pretendidas.

Os pré-tratamentos a altas temperaturas foram realizados em banho termostaticado de PEG 400 [Figura 21 (a)] com agitação constante, onde foram imersos os mini-reactores de aço inox de 200 mL [Figura 21 (b)], dentro dos quais se realizava o pré-tratamento. A amostra, 10g, foi introduzida dentro dos reactores à temperatura ambiente, bem como os 100ml da solução de NaOH com a concentração pretendida, de modo a manter a relação biomassa/líquido. Os reactores foram fechados e colocados no banho à

temperatura pretendida durante 15 minutos de aquecimento mais os tempos de reacção indicados pelo *design* experimental.

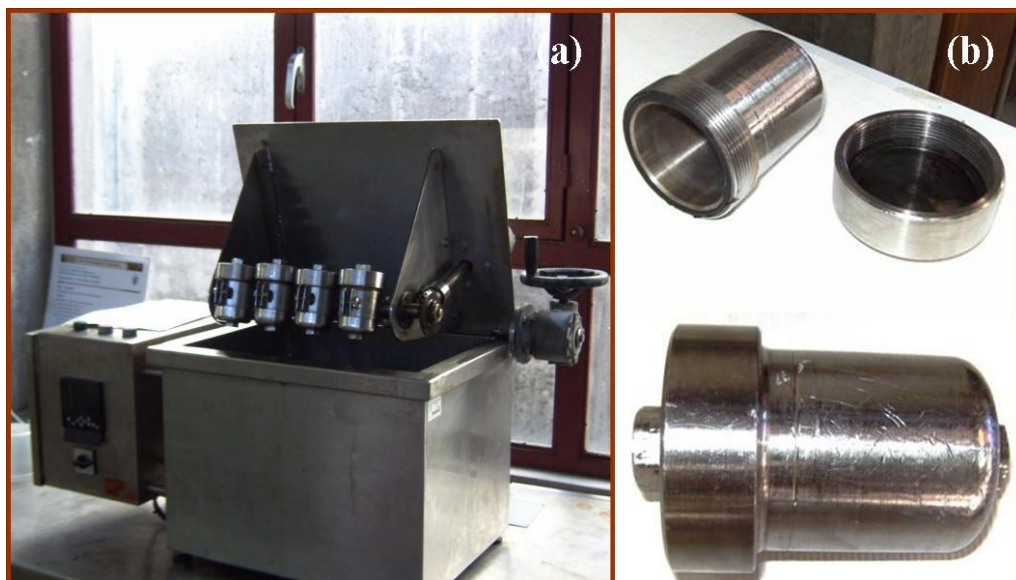


Figura 21 – Banho termostatizado de PEG 400 (a) e reactores de aço inox de 200 mL (b).

Os pré-tratamentos a baixas temperaturas foram realizados em banho termostatizado de PEG 400 com agitação constante, onde foram imersos os frascos de vidro de 100mL (Figura 22), dentro dos quais se realizava o pré-tratamento. A amostra, 7,5g, foi introduzida dentro dos reactores à temperatura ambiente, bem como os 75 ml da solução de NaOH com a concentração pretendida, de modo a manter a relação biomassa/líquido. Os frascos reaccionais foram fechados e colocados no banho à temperatura pretendida durante 15 minutos de aquecimento mais os tempos de reacção indicados pelo *design* experimental.



Figura 22 – Frasco de vidro 100 ml.

Após decorrer o tempo de reacção, os reactores e os frascos reaccionais foram retirados do banho e colocados em banho de água gelada para arrefecer durante sensivelmente 30 minutos. Os reactores foram abertos, sendo removido o conteúdo para um cadinho de placa porosa número 2, de forma a separar a fracção sólida da líquida. A fracção sólida foi lavada com água a temperatura ambiente, até perfazer uma quantidade de filtrado de 300 mL.

A fracção sólida resultante do pré-tratamento (Figura 23) foi seca numa estufa a $100\pm 5^{\circ}\text{C}$, de maneira a quantificar a matéria sólida resultante do pré-tratamento, posteriormente foram guardadas convenientemente.



Figura 23 – Matérias-primas após pré-tratamento e durante a secagem.

A fracção líquida possui pH básico e tem que ser acidificada (pH 2), sendo utilizado para este fim uma solução de ácido sulfúrico, e colocada no frio durante 24h para que haja precipitação da lenhina. Para quantificação da lenhina e clarificação da amostra para a determinação dos açúcares pelo método do DNS, foi necessária a centrifugação da fracção líquida durante 5 minutos a 4000 r.p.m. em centrífuga (Kubota KN-70). Após a centrifugação, as amostras de filtrado encontram-se preparadas para a determinação quantitativa dos açúcares redutores totais e da lenhina de acordo com os métodos descritos anteriormente.

Capítulo IV - Resultados e Discussão

IV - 1 Pré-tratamentos / *desing* experimental

Recorreu-se à Metodologia de Superfície de Resposta para se proceder à modelação do processo de pré-tratamento, como havia sido referido anteriormente. Utilizou-se o *Central Composite Desing* (CCD), associado a uma função polinomial do 2º grau, porque responde muito bem quando se pretende a optimização de um processo, com 3 ou mais variáveis a vários níveis.

O plano experimental obtido com a utilização do *software Desing Expert* é apresentado e descrito separadamente para cada gama de temperaturas

IV - 1.1 Temperaturas Elevadas

A Matriz do Desenho Experimental (variáveis reais ou actuais) obtida através do *software Design Expert* encontra-se descrita na Tabela 5.

Tabela 5 – Matriz do desenho experimental realizado para a gama de temperaturas elevadas

Std	Run	A: Temperatura [°C]	B: Tempo [min]	C: Concentração de NaOH [%]
17	1	180,0	22,5	3,8
7	2	160,0	30,0	6,0
18	3	180,0	22,5	3,8
4	4	200,0	30,0	1,6
19	5	180,0	22,5	3,8
5	6	160,0	15,0	6,0
1	7	160,0	15,0	1,6
2	8	200,0	15,0	1,6
16	9	180,0	22,5	3,8
15	10	180,0	22,5	3,8
6	11	200,0	15,0	6,0
10	12	213,6	22,5	3,8
3	13	160,0	30,0	1,6
8	14	200,0	30,0	6,0
9	15	146,4	22,5	3,8
14	16	180,0	22,5	7,5
12	17	180,0	35,1	3,8
20	18	180,0	22,5	3,8
11	19	180,0	9,9	3,8
13	20	180,0	22,5	0,1

A qualidade das correlações ajustadas foi verificada pelo coeficiente de correlação múltipla ao quadrado (R^2).

Para que possam ser analisadas de uma forma mais objectiva as variáveis são apresentadas em muitas situações pelas letras a seguir descritas, A – temperatura, B – tempo, C – concentração de NaOH (carga).

Como resposta ao tratamento alcalino, foram utilizados os ensaios dos açúcares redutores, da lenhina removida e os sólidos recuperados.

IV - 1.1.1 Açúcares Redutores Totais

Os resultados dos ensaios de açúcares redutores pelo método do DNS encontram-se enumerados na Tabela 6, para os quatro tamanhos de partícula utilizados.

Tabela 6 – Resultados dos quatro tamanhos de partícula com os açúcares redutores totais como resposta.

Run	Açúcares redutores totais [mg/g biomassa]			
	1 mm	2 mm	6 mm	10 mm
1	56,8	51,9	49,6	33,3
2	57,3	49,0	49,3	38,5
3	60,5	52,2	41,7	33,0
4	42,2	32,8	30,5	28,1
5	58,5	47,2	39,6	38,4
6	71,0	46,3	54,2	51,1
7	86,3	54,5	32,2	40,8
8	43,7	35,6	41,5	30,6
9	61,1	45,7	47,9	30,2
10	57,7	45,9	45,7	37,8
11	65,7	28,4	39,5	35,9
12	67,7	44,5	49,5	41,6
13	69,3	56,4	55,7	52,5
14	49,9	35,6	35,5	35,0
15	70,7	52,5	50,0	56,0
16	67,1	50,3	56,1	38,3
17	60,8	39,0	48,6	37,2
18	52,9	48,5	42,0	20,0
19	51,5	42,8	40,9	41,5
20	70,0	171,6	155,3	161,3

Na Tabela 7 podemos analisar a informação correspondente á análise de variância (ANOVA), para cada um dos tamanhos de partícula analisados, para o modelo de resposta.

Tabela 7 – Quadro ANOVA para a resposta dos açúcares redutores para o tamanho de partícula de 1, 2, 6 e 10 mm.

Tamanho da partícula (mm)	Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
1	Modelo	968,10	322,70	4,68	0,0157
	A-Temperatura	561,00	561,00	8,14	0,0115
	C-Carga	0,47	0,47	0,01	0,9353
	AC	406,63	406,63	5,90	0,0273
	Residual	1102,96	68,94	-	-
	Falta de ajuste	1059,38	96,31	11,05	0,0079
	Erro	43,58	8,72	-	-
	Total	2071,06	-	-	-
	R ²	0,4674	-	-	-
	R ² (ajustado)	0,3676	-	-	-
2	Modelo	8365,53	4182,76	9,03	0,0021
	C-Carga	3671,97	3671,97	7,92	0,0119
	C ²	4693,55	4693,55	10,13	0,0054
	Residual	7877,76	463,40	-	-
	Falta de ajuste	7836,66	653,06	79,45	< 0,0001
	Erro	41,10	8,22	-	-
	Total	16243,29	-	-	-
	R ²	0,5150	-	-	-
	R ² (ajustado)	0,4580	-	-	-
6	Modelo	5865,54	2932,77	7,39	0,0049
	C-Carga	1609,61	1609,61	4,06	0,0601
	C ²	4255,93	4255,93	10,72	0,0045
	Residual	6746,18	396,83	-	-
	Falta de ajuste	6669,14	555,76	36,07	0,0005
	Erro	77,04	15,41	-	-
	Total	12611,72	-	-	-
	R ²	0,4651	-	-	-
	R ² (ajustado)	0,4022	-	-	-
10	Modelo	8049,11	4024,56	8,82	0,0024
	C-Carga	2877,12	2877,12	6,31	0,0224
	C ²	5171,99	5171,99	11,34	0,0037
	Residual	7755,61	456,21	-	-
	Falta de ajuste	7532,69	627,72	14,08	0,0044
	Erro	222,92	44,58	-	-
	Total	15804,7198	-	-	-
	R ²	0,5093	-	-	-
	R ² (ajustado)	0,4516	-	-	-

De acordo com os dados da tabela, verificamos que independente do tamanho da partícula, o uso dos açúcares redutores totais como resposta do pré-tratamento alcalino na Matriz do Desenho Experimental não modela, os valores obtidos para o coeficiente de correlação (R^2) são inferiores a 0,6 o que significa que os pontos obtidos não se ajustaram ao modelo.

IV - 1.1.2 Lenhina Removida (LR)

Os resultados dos ensaios da lenhina insolúvel encontram-se descritos na Tabela 8, para os quatro tamanhos de partícula utilizados.

Tabela 8 - Resultados dos quatro tamanhos de partícula com a lenhina como resposta.

Run	Lenhina removida [mg/g biomassa]			
	1 mm	2 mm	6 mm	10 mm
1	311,2	349,3	316,3	355,7
2	394,5	389,3	444,4	546,5
3	322,3	339,4	329,7	348,1
4	180,9	228,8	227,4	200,4
5	327,0	321,7	338,6	342,4
6	394,9	448,7	441,4	387,8
7	144,6	223,1	171,2	159,5
8	174,0	271,0	295,1	212,8
9	328,6	318,9	339,0	346,4
10	332,0	321,1	338,1	344,4
11	269,7	269,8	252,7	284,8
12	219,6	192,5	213,4	212,6
13	145,0	216,9	196,2	231,7
14	258,1	267,7	248,9	255,8
15	264,0	212,6	154,9	204,8
16	336,7	330,7	330,1	379,8
17	306,5	331,6	318,6	347,5
18	323,4	324,8	338,3	355,4
19	289,2	380,2	299,0	343,6
20	34,0	1,4	17,6	23,9

Na Tabela 9 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 1 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para o modelo de resposta.

Tabela 9 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 1 mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	160636,11	22948,02	223,69	< 0,0001
A-Temperatura	5380,07	5380,07	52,44	< 0,0001
B-Tempo	43,42	43,42	0,42	0,5276
C-carga	102256,18	102256,18	996,74	< 0,0001
AC	13357,13	13357,13	130,20	< 0,0001
A²	10732,80	10732,80	104,62	< 0,0001
B²	807,19	807,19	7,87	0,0159
C²	32157,20	32157,20	313,45	< 0,0001
Residual	1231,08	102,59	-	-
Falta de ajuste	971,22	138,75	2,67	0.1486
Erro	259,86	51,97	-	-
Total	161867,19	-	-	-
R²	0,9924	-	-	-
R² (ajustado)	0,9880	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9924, mostrando que 99,24% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinómio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de Prob > F 0,1486 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$LR = -2706,36 + 27,08 \times A + 6,22 \times B + 280,67 \times C - 0,93 \times A \times C - 0,07 \times A^2 - 0,13 \times B^2 - 9,76 \times C^2$$

Equação 1

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 9) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que os efeitos lineares da temperatura e da carga são os que se revelam mais importantes na variação da resposta. A interação entre os factores temperatura e carga também é bastante significativa (p-valor $<0,0001$), assim como o efeito quadrático da temperatura e da carga. São menos relevantes, mas também importantes por apresentarem níveis de significância (p-valor $<0,05$), o factor quadrático do tempo.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor da lenhina removida por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 24 e Figura 25.

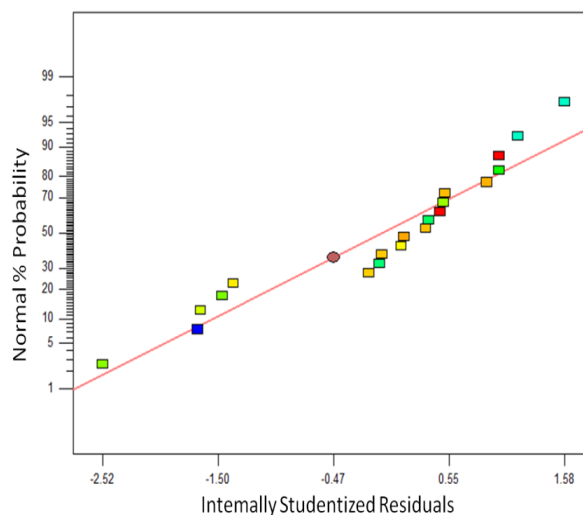


Figura 24 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

Na Figura 25 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

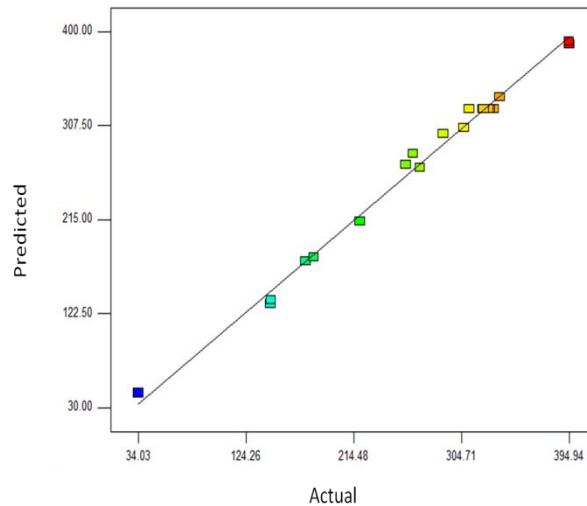


Figura 25 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 25 permite concluir que a modelação apresenta elevada linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe elevada fiabilidade na modelação obtida.

A influência de um factor em interacção com os outros dois a dois é facilmente observada nas Superfícies de Resposta (3D), onde a cor azul representa o valor mínimo e a cor vermelha o valor máximo, de lenhina removida nos pré-tratamentos efectuados.

Na Figura 26 podemos analisar o efeito da interacção entre as variáveis (temperatura e carga) que mais influenciam a resposta. O gráfico ilustra que para um aumento da temperatura como da carga há um aumento da lenhina removida, sendo mais visível esse aumento quando aumenta a carga.

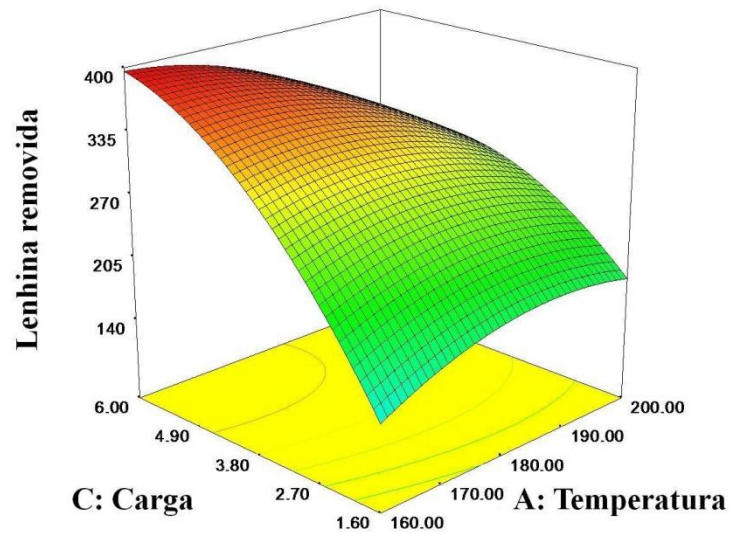


Figura 26 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (A) e da carga (C), mantendo fixa a variável (B), 22,5 min.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação da lenhina removida do pré-tratamento alcalino da esteva com tamanho de partícula de 1mm, pode dizer-se que o factor que mais influencia o resultado é a carga alcalina, seguida da temperatura.

Na Tabela 10 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 2 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 10 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 2 mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	141943,55	28388,71	14,20	< 0,0001
A-Temperatura	5511,67	5511,67	2,76	0,1190
C-carga	71679,77	71679,77	35,86	< 0,0001
AC	16227,01	16227,01	8,12	0,0129
A²	18435,84	18435,84	9,22	0,0089
C²	34231,58	34231,58	17,12	0,0010
Residual	27986,71	1999,05	-	-
Falta de ajuste	27230,39	3025,60	20,00	0,0021
Erro	756,32	151,26	-	-
Total	169930,26	-	-	-
R²	0,8353	-	-	-
R² (ajustado)	0,7765	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,8353, mostrando que 83,53% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinômio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de Prob > F 0,0021 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$LR = -3327,55 + 34,92 \times A + 293,33 \times C - 1,024 \times A \times C - 0,089 \times A^2 - 10,10 \times C^2$$

Equação 2

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 10) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que o efeito linear da carga é o que se revela mais importante na variação da resposta. São menos relevantes, mas também importantes por apresentarem níveis de significância (p-valor <0,05), os

factores quadráticos da temperatura e da carga bem como a interação dos factores temperatura e carga.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor da lenhina removida por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 27 e Figura 28

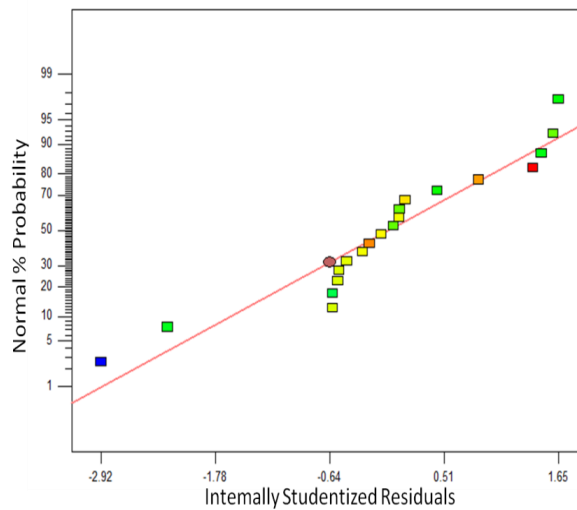


Figura 27 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

A Figura 28 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

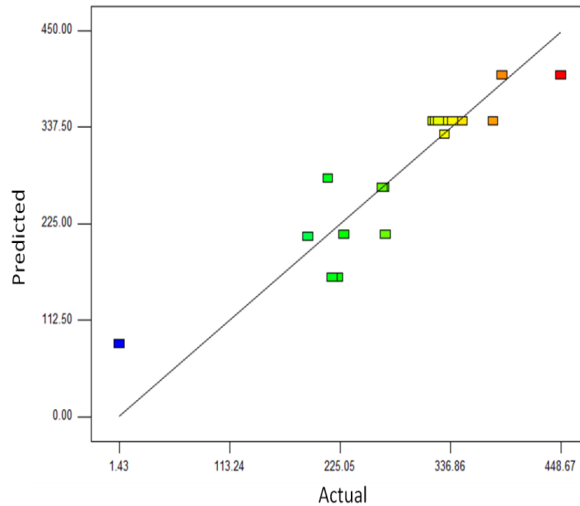


Figura 28 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 28 permite concluir que a modelação apresenta elevada linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe elevada fiabilidade na modelação obtida.

A influência de um factor em interacção com os outros dois a dois é facilmente observada nas Superfícies de Resposta (3D), onde a cor azul representa o valor mínimo e a cor vermelha o valor máximo, de lenhina removida nos pré-tratamentos efectuados.

Na Figura 29 podemos analisar o efeito da interacção entre as variáveis (temperatura e carga) que mais influenciam a resposta. O gráfico ilustra que para um aumento da temperatura como da carga há um aumento da lenhina removida, sendo mais visível esse aumento quando aumenta a carga.

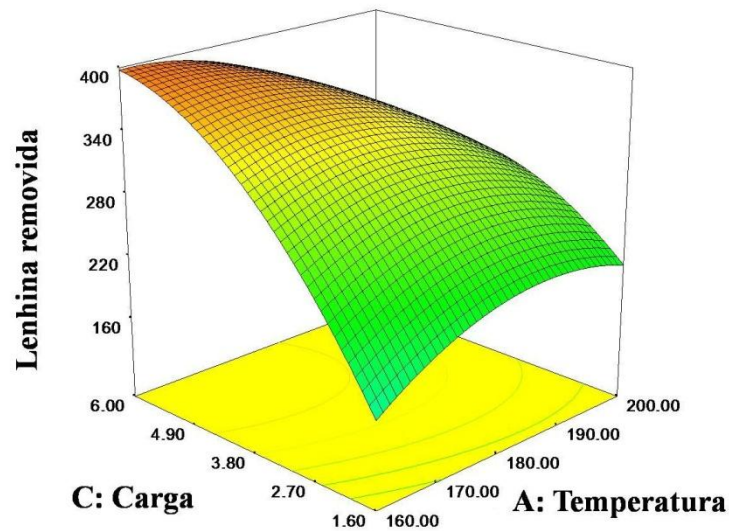


Figura 29 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (A) e da carga (C), mantendo fixa a variável (B), 22,5 min.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação da lenhina removida do pré-tratamento alcalino da esteva com tamanho de partícula de 2mm, pode dizer-se que o factor que mais influência o resultado é a carga alcalina, seguida da temperatura.

Na Tabela 11 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 6 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 11 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 6 mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	158257,61	31651,52	15,22	< 0,0001
A-Temperatura	1252,81	1252,81	0,60	0,4506
C-carga	76596,71	76596,71	36,82	< 0,0001
AC	36356,91	36356,91	17,48	0,0009
A²	21858,26	21858,26	10,51	0,0059
C²	26152,76	26152,76	12,57	0,0032
Residual	29122,56	2080,18	-	-
Falta de ajuste	28713,90	3190,43	39,04	0,0004
Erro	408,66	81,73	-	-
Total	187380,17	-	-	-
R²	0,8446	-	-	-
R² (ajustado)	0,7891	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,8446, mostrando que 84,46% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinómio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de Prob > F 0,0004 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$LR = -4020,64 + 40,22 \times A + 376,39 \times C - 1,532 \times A \times C - 0,097 \times A^2 - 8,76 \times C^2$$

Equação 3

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 11) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que o efeito linear da carga é o que se revela mais importante na variação da resposta. São menos relevantes, mas também importantes por apresentarem níveis de significância (p -valor <0,05), o efeito linear da temperatura, os factores quadráticos da temperatura e da carga bem como a interacção dos factores temperatura e carga.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor da lenhina removida por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 30 e Figura 31.

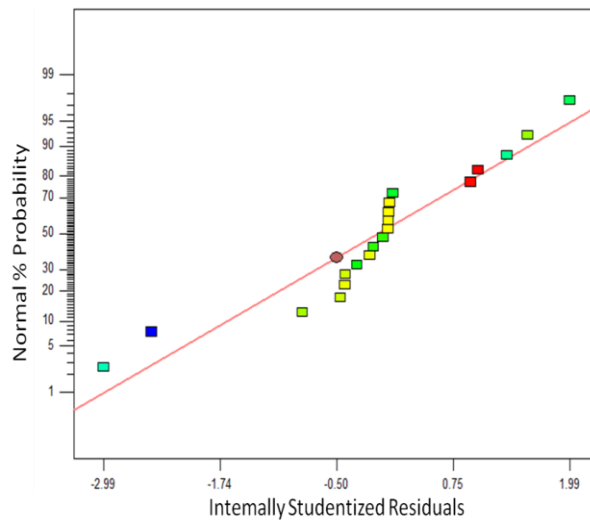


Figura 30 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

A Figura 31 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

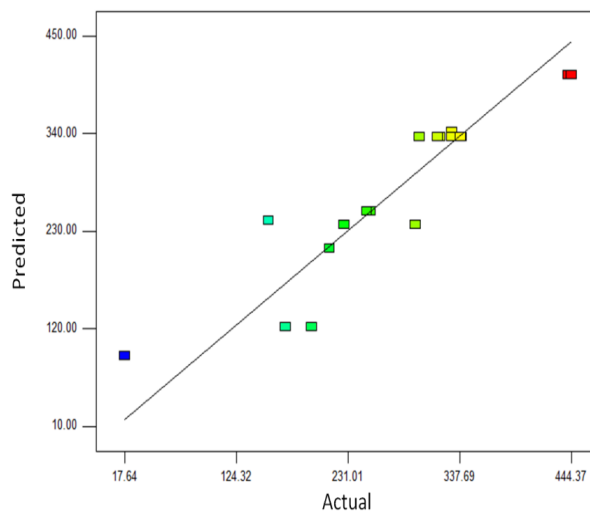


Figura 31 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 31 permite concluir que a modelação apresenta linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe fiabilidade na modelação obtida.

A influência de um factor em interacção com os outros dois a dois é facilmente observada nas Superfícies de Resposta (3D), onde a cor azul representa o valor mínimo e a cor vermelha o valor máximo, de lenhina removida nos pré-tratamentos efectuados.

Na Figura 32 podemos analisar o efeito da interacção entre as variáveis (temperatura e carga) que mais influenciam a resposta. O gráfico ilustra que para um aumento da temperatura como da carga há um aumento da lenhina removida, sendo mais visível esse aumento quando aumenta a carga.

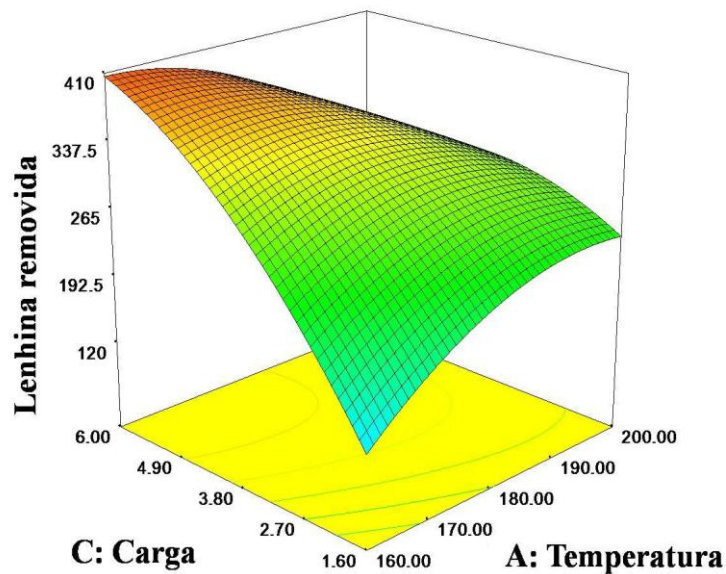


Figura 32 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (A) e da carga (C), mantendo fixa a variável (B), 22,50 min.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação da lenhina removida do pré-tratamento alcalino da esteva com tamanho de partícula de 6mm, pode dizer-se que o factor que mais influencia o resultado é a carga alcalina, seguida da temperatura.

Na Tabela 12 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 10 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 12 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 10 mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	211015,24	30145,03	19,26	< 0,0001
A-Temperatura	9416,16	9416,16	6,02	0,0304
B-Tempo	2815,98	2815,98	1,80	0,2046
C-carga	117955,08	117955,08	75,37	< 0,0001
AB	9258,20	9258,20	5,92	0,0316
AC	21593,54	21593,54	13,80	0,0030
A²	25727,78	25727,78	16,44	0,0016
C²	28754,28	28754,28	18,37	0,0011
Residual	18781,36	1565,11	-	-
Falta de ajuste	18624,24	2660,61	84,67	< 0,0001
Erro	157,12	31,42	-	-
Total	229796,60	-	-	-
R²	0,9183	-	-	-
R² (ajustado)	0,8706	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9183, mostrando que 91,83% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinômio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de $\text{Prob} > F < 0,0001$ para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$\text{LR} = -4878,31 + 46,12 \times A + 42,74 \times B + 324,58 \times C - 0,2268 \times A \times B - 1,18 \times A \times C - 0,105 \times A^2 - 9,18 \times C^2$$

Equação 4

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 12) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que o efeito linear da carga é o

que se revela mais importante na variação da resposta. São menos relevantes, mas também importantes por apresentarem níveis de significância (p -valor $<0,05$), os efeitos lineares da temperatura e do tempo, os factores quadráticos da temperatura e da carga bem como a interacção dos factores temperatura e carga.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor da lenhina removida por ser a variável que apresenta maior valor de F . O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 33 e Figura 34.

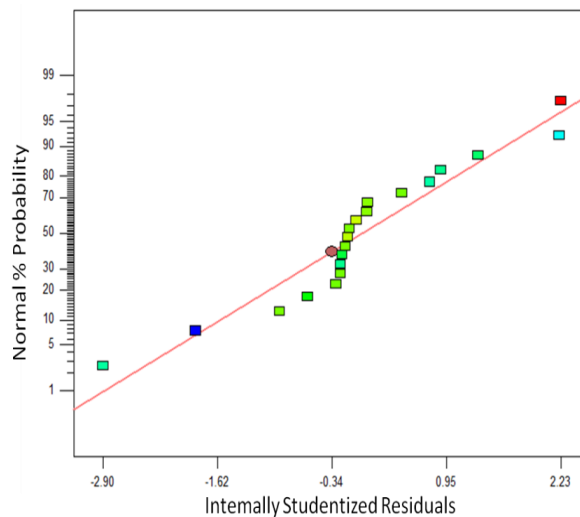


Figura 33 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

A Figura 34 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

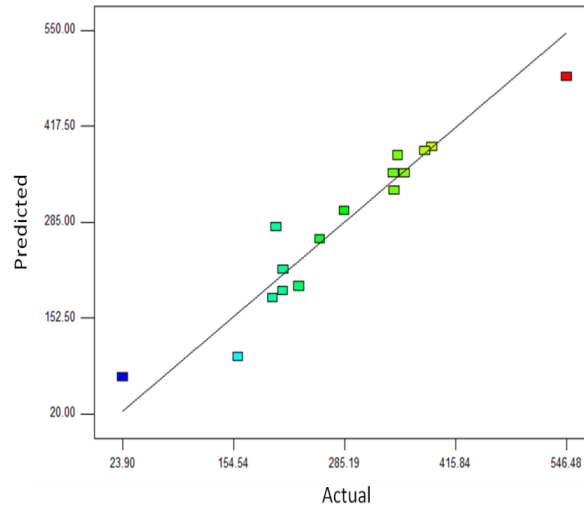


Figura 34 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 34 permite concluir que a modelação apresenta linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe fiabilidade na modelação obtida.

A influência de um factor em interacção com os outros dois a dois é facilmente observada nas Superfícies de Resposta (3D), onde a cor azul representa o valor mínimo e a cor vermelha o valor máximo, de lenhina removida nos pré-tratamentos efectuados.

Na Figura 35 podemos analisar o efeito da interacção entre as variáveis (temperatura e carga) que mais influenciam a resposta. O gráfico ilustra que para um aumento da temperatura como da carga há um aumento da lenhina removida, sendo mais visível esse aumento quando aumenta a carga.

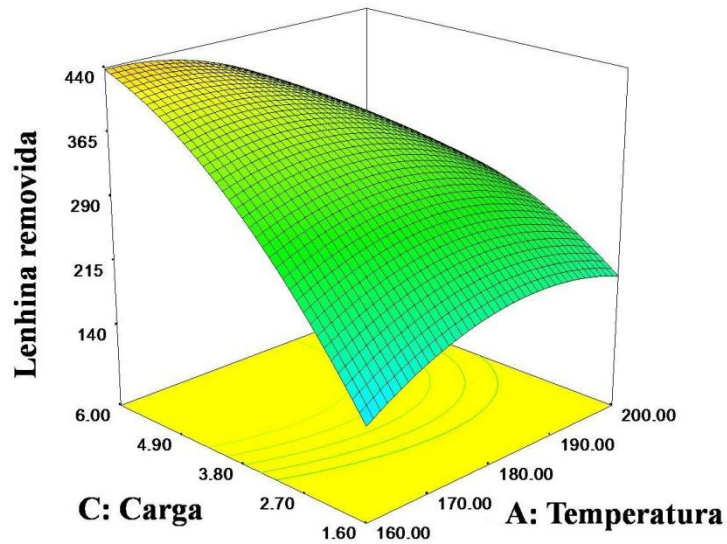


Figura 35 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (A) e da carga (C), mantendo fixa a variável (B), 22,5 min.

Na Figura 36 podemos analisar o efeito da interacção entre as variáveis (temperatura e Tempo) que apesar de menos também influenciam a resposta. O gráfico ilustra que para um aumento do tempo há um aumento da lenhina removida e a temperatura apresenta um efeito parabólico, pois a um aumento da lenhina removida aproximadamente dos 180°C e a partir dessa temperatura a uma diminuição da lenhina removida.

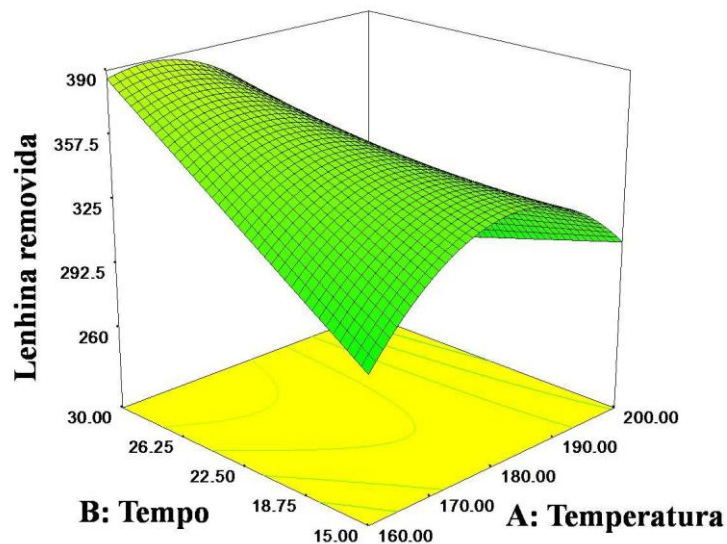


Figura 36 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura e do tempo (B), mantendo fixa a variável (C), 3,8%.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação da lenhina removida do pré-tratamento alcalino da esteva com tamanho de partícula de 10mm, pode dizer-se que o factor que mais influência o resultado é a carga alcalina, seguida do tempo e da temperatura.

IV - 1.1.3 Sólidos Recuperados (Resíduos sólidos)

Os resultados dos ensaios dos sólidos recuperados encontram-se descritos na Tabela 13, para os quatro tamanhos de partícula utilizados.

Tabela 13 - Resultados dos quatro tamanhos de partícula com os sólidos recuperados como resposta.

Run	Sólidos Recuperados [mg/g biomassa]			
	1 mm	2 mm	6 mm	10 mm
1	337,0	356,8	385,3	382,7
2	342,0	357,7	379,3	384,6
3	341,0	366,7	389,0	357,1
4	457,0	472,6	476,6	474,3
5	326,0	357,5	383,1	357,9
6	370,0	385,6	396,8	399,1
7	578,0	572,7	622,5	634,8
8	475,0	566,3	460,5	489,6
9	331,0	372,3	376,4	383,8
10	331,0	360,4	393,0	350,9
11	225,0	218,8	234,1	222,0
12	258,0	229,8	235,5	246,4
13	554,0	562,3	593,6	578,7
14	206,0	208,5	211,5	213,6
15	501,0	507,5	546,9	521,3
16	265,0	283,6	315,5	301,3
17	333,0	355,6	355,3	362,3
18	331,0	348,6	395,2	393,4
19	356,0	358,4	396,4	406,5
20	638,0	648,6	644,7	614,7

Na Tabela 14 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 1 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 14 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 1mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	264890,29	37841,47	518,70	< 0,0001
A-Temperatura	57957,91	57957,91	794,43	< 0,0001
B-Tempo	1193,72	1193,72	16,36	0,0016
C-Carga	175535,29	175535,29	2406,08	< 0,0001
AC	820,13	820,13	11,24	0,0057
A²	4490,42	4490,42	61,55	< 0,0001
B²	401,39	401,39	5,50	0,0370
C²	26780,21	26780,21	367,08	< 0,0001
Residual	875,46	72,95	-	-
Falta de ajuste	734,63	104,95	3,73	0,0833
Erro	140,83	28,17	-	-
Total	265765,75	-	-	-
R²	0,9967	-	-	-
R² (ajustado)	0,9948	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9967, mostrando que 99,67% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinômio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de Prob > F 0,0833 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$SR=2591,35-18,27\times A-5,47\times B-77,80\times C-0,23\times A\times C+0,04\times A^2+0,09\times B^2+8,91\times C^2$$

Equação 5

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 14) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que os efeitos lineares da

temperatura e da carga são os que se revelam mais importantes na variação da resposta. O efeito quadrático da carga também é bastante significativo (p-valor <0,0001). São menos relevantes, mas também importantes por apresentarem níveis de significância (p-valor <0,05), o factor quadrático da temperatura e a linearidade do tempo.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor dos sólidos recuperados por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 37 e Figura 38.

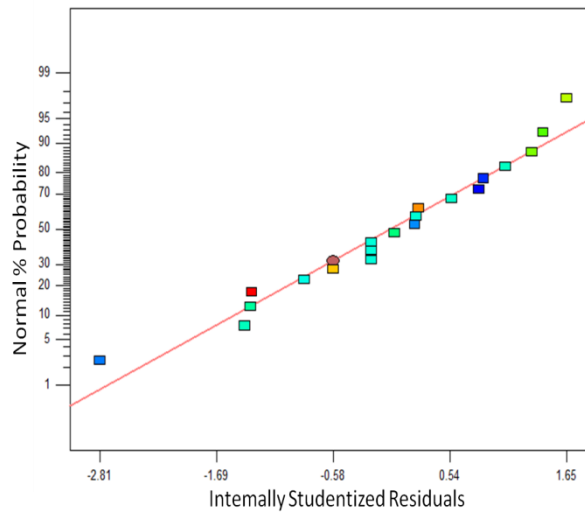


Figura 37 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

Na Figura 38 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

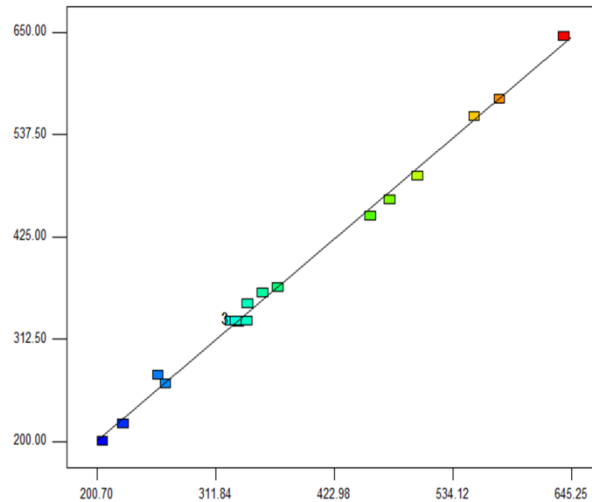


Figura 38 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 38 permite concluir que a modelação apresenta elevada linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe elevada fiabilidade na modelação obtida.

A influência de um factor em interacção com os outros dois a dois é facilmente observada nas Superfícies de Resposta (3D), onde a cor azul representa o valor mínimo e a cor vermelha o valor máximo, de lenhina removida nos pré-tratamentos efectuados.

Na Figura 39 podemos analisar o efeito da interacção entre as variáveis (temperatura e carga) que mais influenciam a resposta. O gráfico ilustra que para um aumento da temperatura como da carga há um aumento da lenhina removida, sendo mais visível esse aumento quando aumenta a carga.

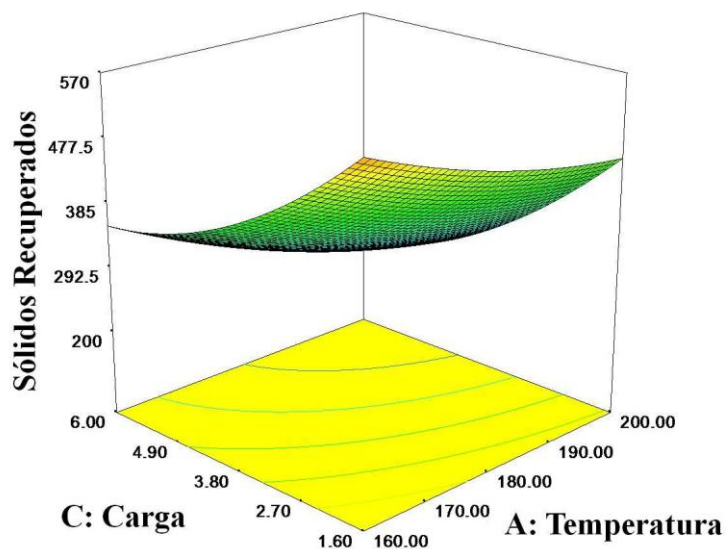


Figura 39– Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (A) e da carga (C), mantendo fixa a variável (B), 22,5 min.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação de sólidos removidos do pré-tratamento alcalino com tamanho de partícula de 1mm pode dizer-se, pode dizer-se que o factor que mais afecta o resultado é a carga alcalina seguida da temperatura.

Na Tabela 15 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 2 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 15 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 2 mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	278119,38	69529,85	93,04	< 0,0001
A-Temperatura	56592,56	56592,56	75,72	< 0,0001
C-Carga	191492,73	191492,73	256,23	< 0,0001
AC	6044,50	6044,50	8,09	0,0123
C ²	23989,59	23989,59	32,10	< 0,0001
Residual	11210,20	747,35	-	-
Falta de ajuste	10868,30	1086,83	15,89	0,0035
Erro	341,91	68,38	-	-
Total	289329,59	-	-	-
R²	0,9613	-	-	-
R² (ajustado)	0,9509	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9613, mostrando que 96,13% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinómio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de Prob > F 0,0035 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$SR=844,12-0,84\times A-4,86\times C-0,625\times A\times C+8,35\times C^2$$

Equação 6

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 15) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que os efeitos lineares da temperatura e da carga são os que se revelam mais importantes na variação da resposta. O efeito quadrático da carga também é bastante significativo (p-valor <0,0001). São menos relevantes, mas também importantes por apresentarem níveis de significância (p-valor <0,05), o factor interactivo entre a temperatura e a carga.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor dos sólidos recuperados por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 40 e Figura 41.

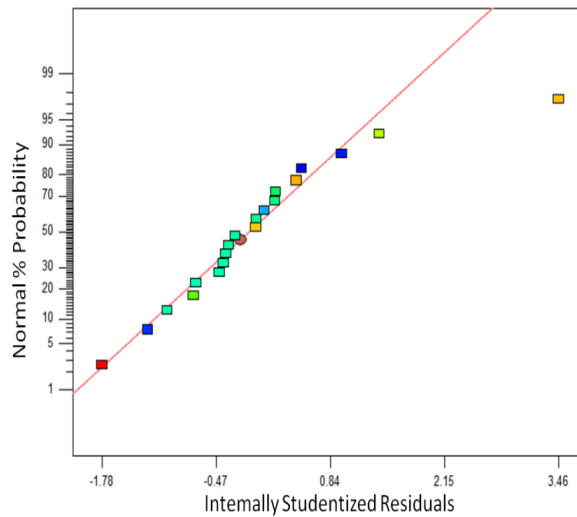


Figura 40 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

A Figura 41 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

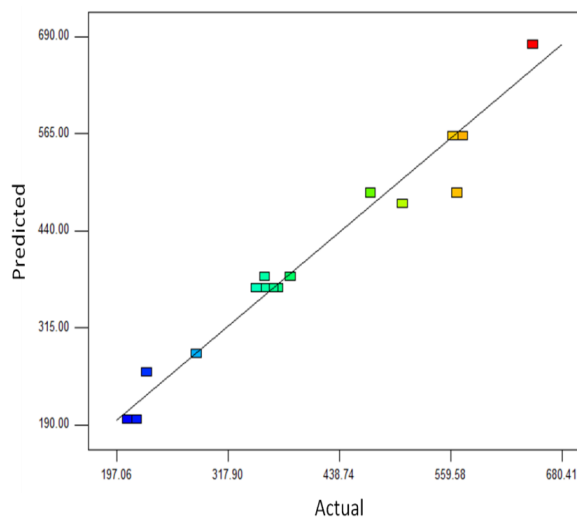


Figura 41 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 41 permite concluir que a modelação apresenta elevada linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe elevada fiabilidade na modelação obtida.

A influência de um factor em interacção com os outros dois a dois é facilmente observada nas Superfícies de Resposta (3D), onde a cor azul representa o valor mínimo

e a cor vermelha o valor máximo, de sólidos recuperados nos pré-tratamentos efectuados.

Na Figura 42 podemos analisar o efeito da interacção entre as variáveis (temperatura e carga) que mais influenciam a resposta. O gráfico ilustra que para um aumento da temperatura como da carga há um aumento dos sólidos recuperados.

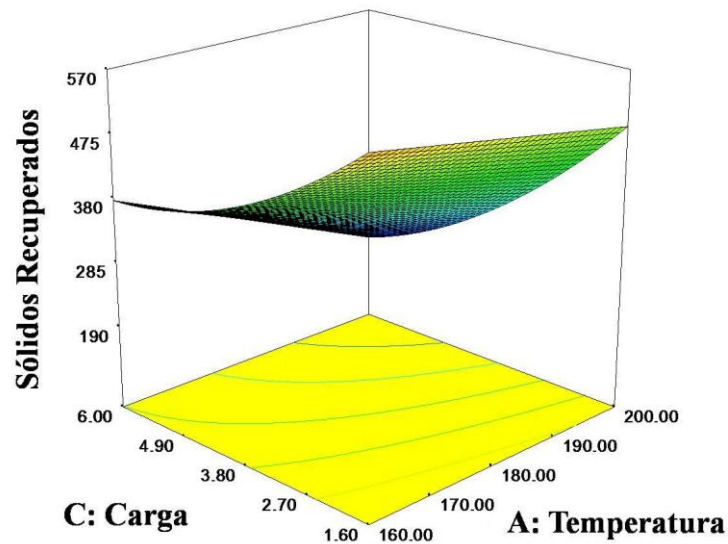


Figura 42 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (A) e da carga (C), mantendo fixa a variável (B), 22,5 min.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação dos sólidos recuperados do pré-tratamento alcalino da esteva com tamanho de partícula de 2mm, pode dizer-se que o factor que mais influencia o resultado é a carga alcalina, seguida da temperatura.

Na Tabela 16 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 6 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 16 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 6 mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	272399,82	90799,94	308,97	< 0,0001
A-Temperatura	94030,85	94030,85	319,96	< 0,0001
C-Carga	161505,66	161505,66	549,56	< 0,0001
C²	16863,31	16863,31	57,38	< 0,0001
Residual	4702,07	293,88	-	-
Falta de ajuste	4464,37	405,85	8,54	0,0141
Erro	237,70	47,54	-	-
Total	277101,89	-	-	-
R²	0,9830	-	-	-
R² (ajustado)	0,9798	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9830, mostrando que 98,30% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinômio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de Prob > F 0,0141 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$SR=1422,18-4,15\times A-102,66\times C+7,004\times C^2$$

Equação 7

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 16) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que os efeitos lineares da temperatura e da carga são os que se revelam mais importantes na variação da resposta. O efeito quadrático da carga também é bastante significativo (p-valor <0,0001).

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor dos sólidos recuperados por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 43 e Figura 44.

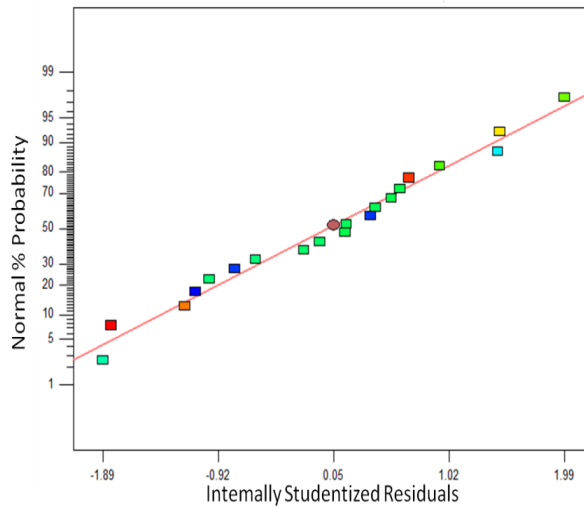


Figura 43 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

A Figura 44 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

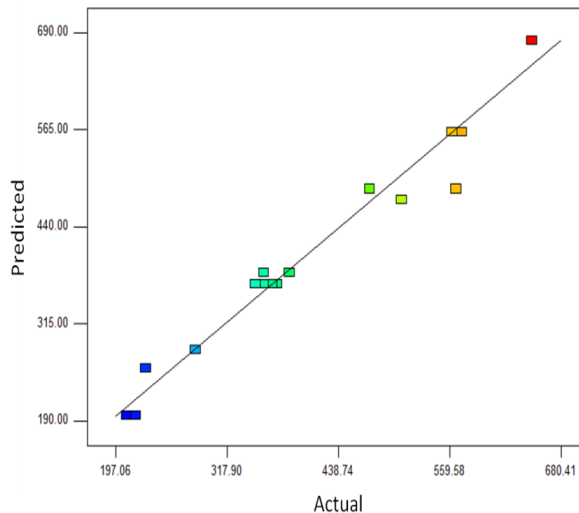


Figura 44 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 44 permite concluir que a modelação apresenta elevada linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe elevada fiabilidade na modelação obtida.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação de sólidos removidos do pré-tratamento alcalino com tamanho de partícula de 6mm pode dizer-se, pode dizer-se que o factor que mais afecta o resultado é a carga alcalina.

Na Tabela 17 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 10 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 17 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 10 mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	259073,02	86357,67	135,96	< 0,0001
A-Temperatura	82277,56	82277,56	129,53	< 0,0001
C-Carga	161511,68	161511,68	254,28	< 0,0001
C²	15283,78	15283,78	24,06	0,0002
Residual	10162,93	635,18	-	-
Falta de ajuste	8591,61	781,06	2,49	0,1626
Erro	1571,31	314,26	-	-
Total	269235,95	-	-	-
R²	0,9623	-	-	-
R² (ajustado)	0,9552	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9623, mostrando que 96,23% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinómio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de Prob > F 0,1626 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$SR=1364,4-3,88\times A-100,11\times C+6,67\times C^2$$

Equação 8

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 17) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que os efeitos lineares da temperatura e da carga são os que se revelam mais importantes na variação da resposta. São menos relevantes, mas também importantes por apresentarem níveis de significância (p-valor <0,05), o factor quadrático da carga.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor da lenhina removida por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 45 e Figura 46.

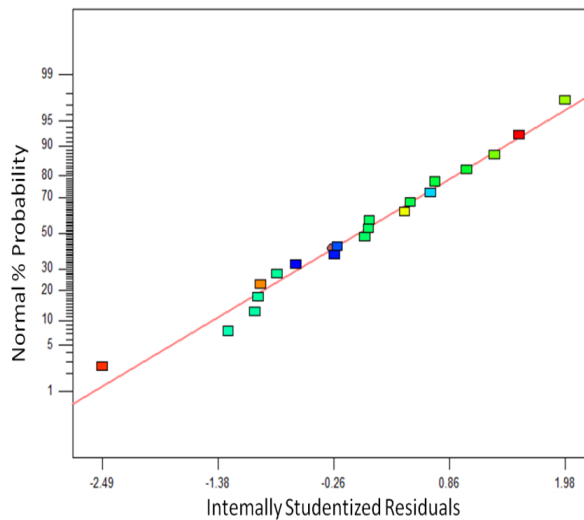


Figura 45 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

A Figura 46 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

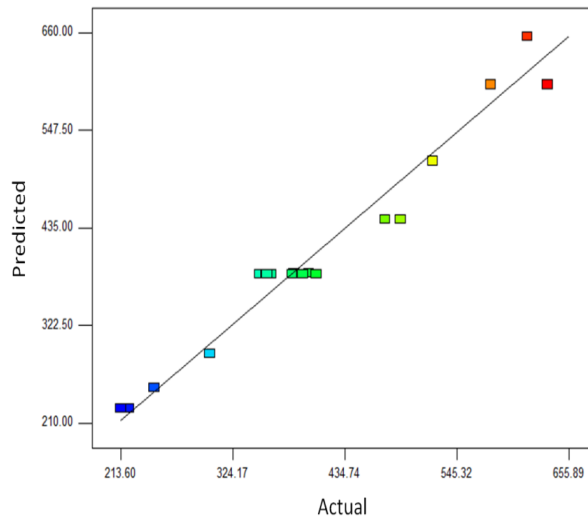


Figura 46 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 46 permite concluir que a modelação apresenta elevada linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe elevada fiabilidade na modelação obtida.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação de sólidos removidos do pré-tratamento alcalino com tamanho de partícula de 10mm pode dizer-se, pode dizer-se que o factor que mais afecta o resultado é a carga alcalina.

IV - 1.2 Temperaturas Baixas

A Matriz do Desenho Experimental (variáveis reais ou actuais) obtida através do *software Desing Expert* encontra-se descrita na Tabela 18.

Tabela 18 – Matriz do desenho experimental realizado para a gama de temperaturas baixas

Std	Run	A: Temperatura [°C]	B: Tempo [min]	C: Concentração de NaOH [%]
10	1	70,2	24,0	3,8
19	2	45,0	24,0	3,8
17	3	45,0	24,0	3,8
11	4	45,0	3,8	3,8
15	5	45,0	24,0	3,8
7	6	30,0	36,0	6,0
14	7	45,0	24,0	7,5
9	8	19,8	24,0	3,8
5	9	30,0	12,0	6,0
13	10	45,0	24,0	0,1
8	11	60,0	36,0	6,0
18	12	45,0	24,0	3,8
16	13	45,0	24,0	3,8
12	14	45,0	44,2	3,8
1	15	30,0	12,0	1,6
3	16	30,0	36,0	1,6
6	17	60,0	12,0	6,0
2	18	60,0	12,0	1,6
20	19	45,0	24,0	3,8
4	20	60,0	36,0	1,6

A qualidade das correlações ajustadas foi verificada pelo coeficiente de correlação múltipla ao quadrado (R^2).

Para que possam ser analisadas de uma forma mais objectiva as variáveis são apresentadas em muitas situações pelas letras a seguir descritas, A – temperatura, B – tempo, C – concentração de NaOH (carga).

Como resposta ao tratamento alcalino, foram utilizados os ensaios dos açúcares redutores, da lenhina removida e os sólidos recuperados.

IV - 1.2.1 Açúcares Redutores Totais

Os resultados dos ensaios de açúcares redutores pelo método do DNS encontram-se enumerados na Tabela 19, para os quatro tamanhos de partícula utilizados.

Tabela 19 – Resultados dos quatro tamanhos de partícula com os açúcares redutores totais como resposta.

Run	Açúcares redutores totais [mg/g biomassa]			
	1 mm	2 mm	6 mm	10 mm
1	53,5	52,2	58,5	47,2
2	28,9	44,8	31,6	36,5
3	40,0	43,2	33,3	30,6
4	35,0	23,8	37,2	36,2
5	36,6	46,7	31,2	31,5
6	37,7	31,6	28,0	25,9
7	33,9	37,3	34,3	43,5
8	24,0	24,2	29,7	26,3
9	43,6	35,6	29,0	35,0
10	26,1	27,3	20,7	28,2
11	54,6	45,4	47,3	39,4
12	39,9	42,5	30,7	48,1
13	36,5	41,7	34,2	30,1
14	31,4	41,7	28,1	17,5
15	37,8	34,2	33,0	33,6
16	40,4	32,2	30,6	27,5
17	56,4	43,8	44,3	37,3
18	45,2	35,4	47,9	36,1
19	37,2	41,3	35,8	35,8
20	36,1	33,9	24,8	34,0

Na Tabela 20 podemos analisar a informação correspondente á análise de variância (ANOVA), para cada um dos tamanhos de partícula analisados, para o modelo de resposta.

Tabela 20 – Quadro ANOVA para a resposta dos açúcares redutores para o tamanho de partícula de 1, 2, 6 e 10 mm.

Tamanho da partícula (mm)	Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
1	Modelo	497,62	497,62	9,54	0,0063
	A-Temperatura	497,62	497,62	9,54	0,0063
	Residual	939,05	52,17	-	-
	Falta de ajuste	856,15	65,86	3,97	0,0686
	Erro	82,90	16,58	-	-
	Total	1436,68	-	-	-
	R ²	0,3464	-	-	-
	R ² (ajustado)	0,3101	-	-	-
2	Modelo	792,49	158,50	6,67	0,0022
	A-Temperatura	379,30	379,30	15,97	0,0013
	B-Tempo	42,45	42,45	1,79	0,2026
	C-Carga	104,19	104,19	4,39	0,0549
	B ²	138,10	138,10	5,81	0,0302
	C ²	152,48	152,48	6,42	0,0239
	Residual	332,50	23,75	-	-
	Falta de ajuste	311,35	34,59	8,18	0,0162
	Erro	21,15	4,23	-	-
	Total	1124,99	-	-	-
	R ²	0,7044	-	-	-
R ² (ajustado)	0,5989	-	-	-	
6	Modelo	892,18	446,09	12,59	0,0004
	A-Temperatura	620,51	620,51	17,51	0,0006
	A ²	271,66	271,66	7,66	0,0131
	Residual	602,55	35,44	-	-
	Falta de ajuste	583,43	48,62	12,71	0,0056
	Erro	19,12	3,82	-	-
	Total	1494,73	-	-	-
	R ²	0,5969	-	-	-
	R ² (ajustado)	0,5495	-	-	-
10	Modelo	264,23	264,23	6,22	0,0226
	A-Temperatura	264,23	264,23	6,22	0,0226
	Residual	764,55	42,48	-	-
	Falta de ajuste	535,33	41,18	0,90	0,5998
	Erro	229,22	45,84	-	-
	Total	1028,78	-	-	-
	R ²	0,2568	-	-	-
	R ² (ajustado)	0,2155	-	-	-

De acordo com os dados da tabela, verificamos que independente do tamanho da partícula, o uso dos açúcares redutores totais como resposta do pré-tratamento alcalino na Matriz do Desenho Experimental não modela, os valores obtidos para o coeficiente de correlação (R^2) são inferiores a 0,6 o que significa que os pontos obtidos não se ajustaram ao modelo.

IV - 1.2.2 Lenhina Removida (LR)

Os resultados dos ensaios da lenhina insolúvel encontram-se descritos na Tabela 21, para os quatro tamanhos de partícula utilizados.

Tabela 21 - Resultados dos quatro tamanhos de partícula com a lenhina como resposta.

Run	Lenhina removida [mg/g biomassa]			
	1 mm	2 mm	6 mm	10 mm
1	227,1	215,0	187,7	159,0
2	128,3	151,0	143,0	137,6
3	152,5	153,9	143,0	108,3
4	118,8	114,8	106,5	84,0
5	157,3	149,4	84,7	108,2
6	259,7	205,0	218,3	179,3
7	308,1	267,8	302,8	306,3
8	115,1	118,5	104,0	73,8
9	256,9	210,3	152,2	224,6
10	22,0	23,2	18,3	8,0
11	302,8	352,7	341,0	314,6
12	158,4	183,6	133,6	155,3
13	155,7	137,4	130,2	98,7
14	157,9	152,5	122,3	101,2
15	83,8	83,5	60,2	57,8
16	98,5	84,3	71,4	53,5
17	271,6	266,9	275,7	256,6
18	117,8	108,2	116,2	107,0
19	149,4	144,1	141,0	142,1
20	152,3	164,8	100,0	115,8

Na Tabela 22 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 1 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 22 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 1 mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	99987,44	49993,72	69,96	< 0,0001
A-Temperatura	8164,65	8164,65	11,43	0,0036
C-Carga	91822,79	91822,79	128,49	< 0,0001
Residual	12148,40	714,61	-	-
Falta de ajuste	11516,63	959,72	7,60	0,0180
Erro	631,77	126,35	-	-
Total	112135,85	-	-	-
R²	0,8917	-	-	-
R² (ajustado)	0,8789	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,8917, mostrando que 89,17% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinómio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de Prob > F 0,0180 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$LR = -45,29 + 1,63 \times A + 37,27 \times C$$

Equação 9

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 22) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que o efeito linear da carga é o que se revela mais importante na variação da resposta. É menos relevante, mas também

importante por apresentar níveis de significância (p -valor $<0,05$), o factor linear da temperatura.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor da lenhina removida por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 47 e Figura 48.

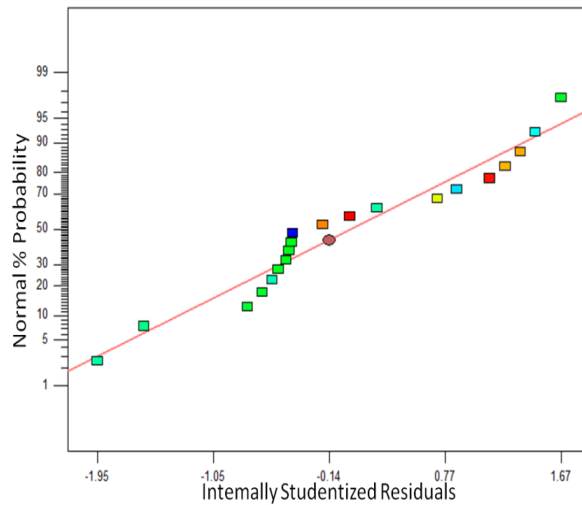


Figura 47 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

Na Figura 48 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

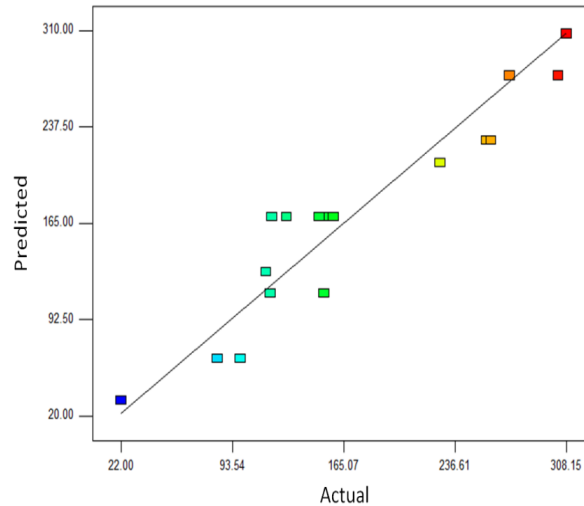


Figura 48 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 48 permite concluir que a modelação apresenta linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe fiabilidade na modelação obtida.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação da lenhina removida do pré-tratamento alcalino com tamanho de partícula de 1mm pode dizer-se, pode dizer-se que o factor que mais afecta o resultado é a carga alcalina.

Na Tabela 23 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 2 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 23 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 2 mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	90332,67	45166,34	49,77	< 0,0001
A-Temperatura	16302,97	16302,97	17,97	0,0006
C-Carga	74029,71	74029,71	81,58	< 0,0001
Residual	15426,94	907,47	-	-
Falta de ajuste	14151,38	1179,28	4,62	0,0512
Erro	1275,56	255,11	-	-
Total	105759,62	-	-	-
R²	0,8541	-	-	-
R² (ajustado)	0,8370	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,8541, mostrando que 85,41% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinómio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de Prob > F 0,0512 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$LR = -66,48 + 2,30 \times A + 33,47 \times C$$

Equação 10

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 23) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que o efeito linear da carga é o que se revela mais importante na variação da resposta. É menos relevante, mas também

importante por apresentar níveis de significância (p -valor $<0,05$), o efeito linear da temperatura.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor da lenhina removida por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 49 e Figura 50.

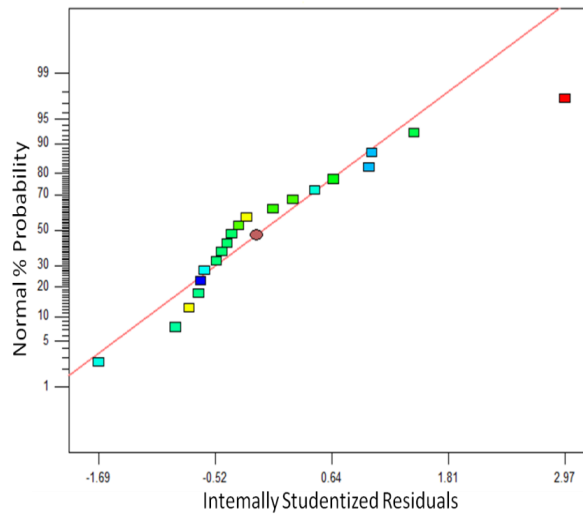


Figura 49 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

A Figura 50 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

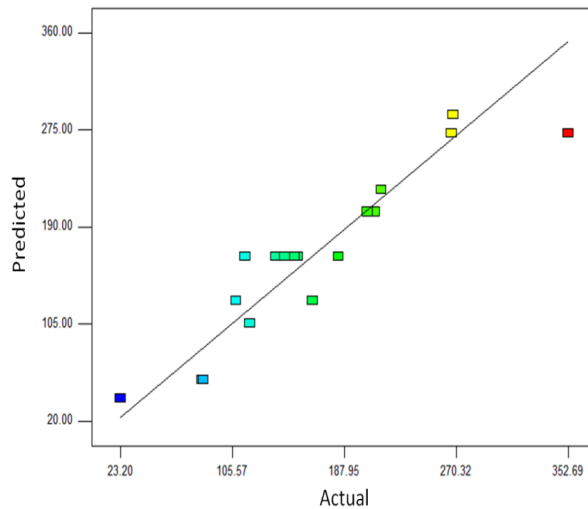


Figura 50 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 50 permite concluir que a modelação apresenta linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe fiabilidade na modelação obtida.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação da lenhina removida do pré-tratamento alcalino com tamanho de partícula de 2mm pode dizer-se, pode dizer-se que o factor que mais afecta o resultado é a carga alcalina.

Na Tabela 24 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 6 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 24 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 6 mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	107767,67	53883,83	48,40	< 0,0001
A-Temperatura	16277,33	16277,33	14,62	0,0014
C-Carga	91490,34	91490,34	82,19	< 0,0001
Residual	18924,26	1113,19	-	-
Falta de ajuste	16404,32	1367,03	2,71	0,1395
Erro	2519,95	503,99	-	-
Total	126691,93	-	-	-
R²	0,8506	-	-	-
R² (ajustado)	0,8331	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,8506, mostrando que 85,06% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinómio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de Prob > F 0,1395 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$LR = -97,34 + 2,30 \times A + 37,20 \times C$$

Equação 11

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 24) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que o efeito linear da carga é o que se revela mais importante na variação da resposta. É menos relevante, mas também importante por apresentar níveis de significância (p-valor <0,05), o efeito linear da temperatura.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor da lenhina removida por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 51 e Figura 52.

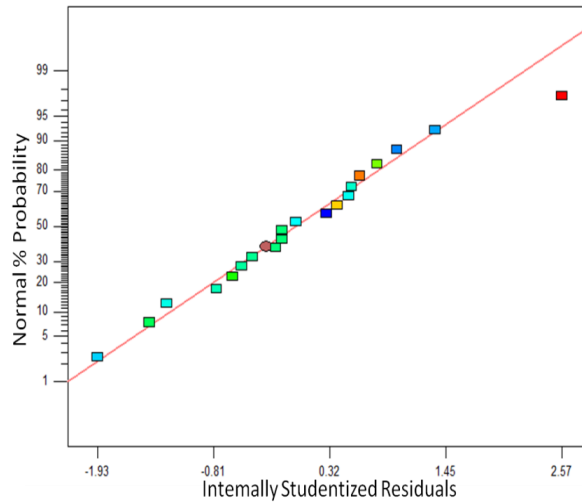


Figura 51 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

A Figura 52 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

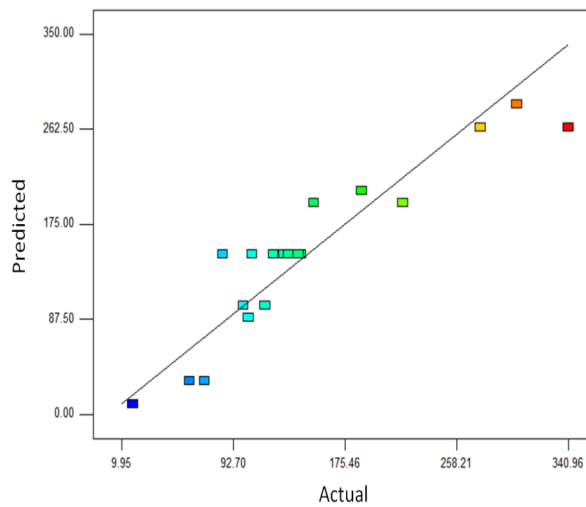


Figura 52 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 52 permite concluir que a modelação apresenta linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe fiabilidade na modelação obtida.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação da lenhina removida do pré-tratamento alcalino com tamanho de partícula de 6mm pode dizer-se, que o factor que mais afecta o resultado é a carga alcalina.

Na Tabela 25 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 10 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 25 – Quadro ANOVA para a resposta da lenhina removida para o tamanho de partícula de 10 mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	114460,74	38153,58	48,19	< 0,0001
A-Temperatura	13045,68	13045,68	16,48	0,0009
C-Carga	95603,13	95603,13	120,75	< 0,0001
C²	5811,92	5811,92	7,34	0,0155
Residual	12667,72	791,73	-	-
Falta de ajuste	10043,21	913,02	1,74	0,2814
Erro	2624,50	524,90	-	-
Total	127128,45	-	-	-
R²	0,9004	-	-	-
R² (ajustado)	0,8817	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9004, mostrando que 90,04% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinómio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de $\text{Prob} > F < 0,2814$ para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$LR = -51,86 + 2,06 \times A + 6,78 \times C + 4,11 \times C^2$$

Equação 12

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 25) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que o efeito linear da carga é o que se revela mais importante na variação da resposta. São menos relevantes, mas também importantes por apresentarem níveis de significância (p -valor $<0,05$), o efeito linear da temperatura e o factor quadrático da carga.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor da lenhina removida por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 53 e Figura 54.

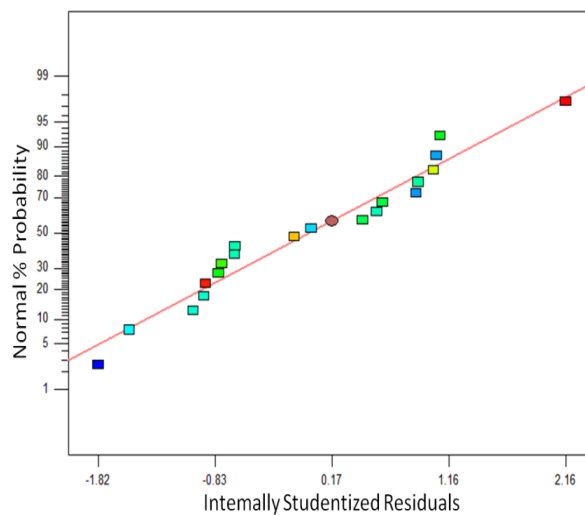


Figura 53 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

A Figura 54 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

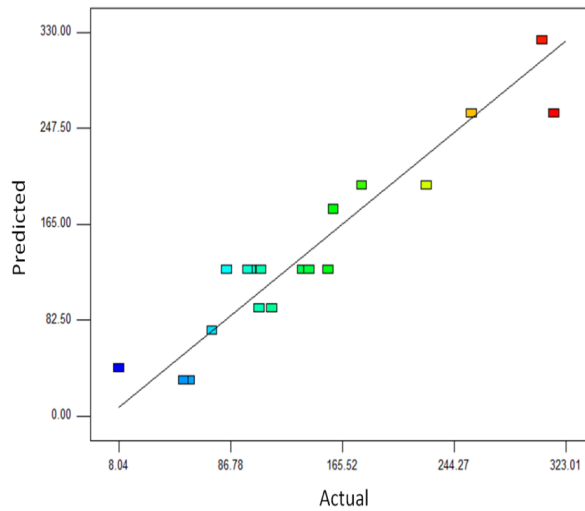


Figura 54 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 54 permite concluir que a modelação apresenta elevada linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe elevada fiabilidade na modelação obtida.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação da lenhina removida do pré-tratamento alcalino com tamanho de partícula de 10mm pode dizer-se, pode dizer-se que o factor que mais afecta o resultado é a carga alcalina.

IV - 1.2.3 Sólidos Recuperados (Resíduos sólidos)

Os resultados dos ensaios dos sólidos recuperados encontram-se descritos na Tabela 26, para os quatro tamanhos de partícula utilizados.

Tabela 26 - Resultados dos quatro tamanhos de partícula com os sólidos recuperados como resposta.

Run	Sólidos Recuperados [mg/g biomassa]			
	1 mm	2 mm	6 mm	10 mm
1	631,8	648,5	675,1	702,8
2	809,7	776,3	805,6	797,2
3	770,0	810,5	804,1	845,5
4	832,8	871,0	841,8	875,4
5	791,1	787,3	809,7	815,4
6	762,5	808,6	827,9	836,3
7	748,7	746,1	779,3	735,8
8	850,2	861,7	864,1	904,5
9	756,8	814,9	837,5	844,7
10	932,9	986,1	943,1	938,9
11	608,6	663,2	683,2	694,7
12	783,9	804,2	793,4	773,2
13	781,4	811,8	810,6	824,3
14	745,9	758,1	770,2	823,1
15	824,5	852,3	865,8	868,5
16	814,4	837,6	857,8	866,6
17	678,4	713,6	723,6	741,8
18	776,1	803,1	781,1	798,5
19	790,4	788,3	812,5	800,0
20	740,2	770,1	803,0	785,5

Na Tabela 27 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 1 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 27 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 1mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	84781,09	21195,27	20,49	< 0,0001
A-Temperatura	38205,51	38205,51	36,94	< 0,0001
B-Tempo	4809,23	4809,23	4,65	0,0477
C-Carga	31752,21	31752,21	30,70	< 0,0001
A²	10014,14	10014,14	9,68	0,0071
Residual	15513,84	1034,26	-	-
Falta de ajuste	14643,23	1464,32	8,41	0,0149
Erro	870,61	174,12	-	-
Total	100294,93	-	-	-
R²	0,8453	-	-	-
R² (ajustado)	0,8041	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,8453, mostrando que 84,53% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinômio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de Prob > F 0,0149 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$SR=833,73+6,92\times A-1,56\times B-21,92\times C-0,12\times A^2$$

Equação 13

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 27) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que os efeitos lineares da temperatura e da carga são os que se revelam mais importantes na variação da resposta. São menos relevantes, mas também importantes por apresentarem níveis de

significância (p -valor $<0,05$), o factor quadrático da temperatura e a linearidade do tempo.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor dos sólidos recuperados por ser a variável que apresenta maior valor de F . O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 55 e Figura 56.

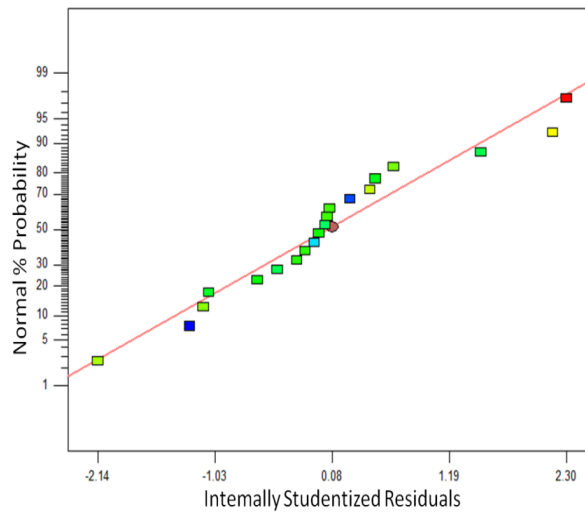


Figura 55 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

Na Figura 56 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

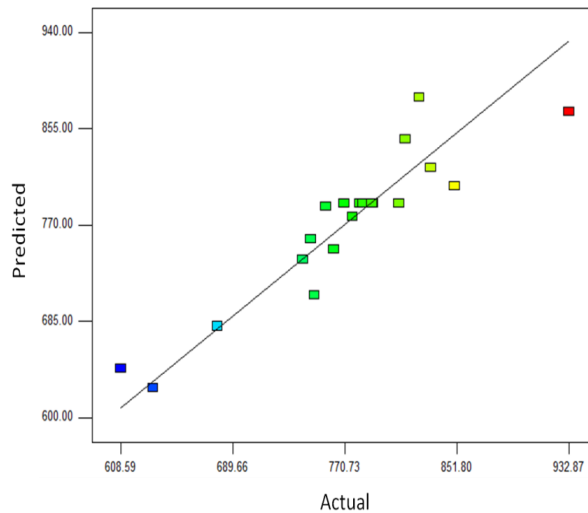


Figura 56 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 56 permite concluir que a modelação apresenta elevada linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe elevada fiabilidade na modelação obtida.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação de sólidos removidos do pré-tratamento alcalino com tamanho de partícula de 1mm pode dizer-se, pode dizer-se que o factor que mais afecta o resultado é a carga alcalina.

Na Tabela 28 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 2 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 28 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 2 mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	89392,83	17878,57	17,92	< 0,0001
A-Temperatura	38157,71	38157,71	38,24	< 0,0001
B-Tempo	6347,94	6347,94	6,36	0,0244
C-Carga	32520,14	32520,14	32,59	< 0,0001
A²	6366,96	6366,96	6,38	0,0242
C²	4891,07	4891,07	4,90	0,0439
Residual	13969,62	997,83	-	-
Falta de ajuste	12922,11	1435,79	6,85	0,0237
Erro	1047,51	209,50	-	-
Total	103362,45	-	-	-
R²	0,8648	-	-	-
R² (ajustado)	0,8166	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,8648, mostrando que 86,48% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinómio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de Prob > F 0,0237 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$SR=949,87+4,84\times A-1,80\times B-50,97\times C-0,093\times A^2+3,79\times C^2$$

Equação 14

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 28) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que os efeitos lineares da temperatura e da carga são os que se revelam mais importantes na variação da resposta. São menos relevantes, mas também importantes por apresentarem níveis de

significância (p -valor $<0,05$), o efeito linear do tempo e os factores quadráticos da temperatura e da carga.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor dos sólidos recuperados por ser a variável que apresenta maior valor de F . O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 57 e Figura 58.

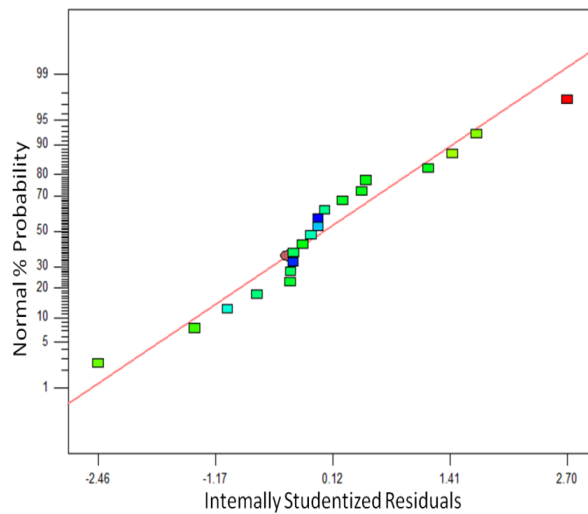


Figura 57 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

A Figura 58 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

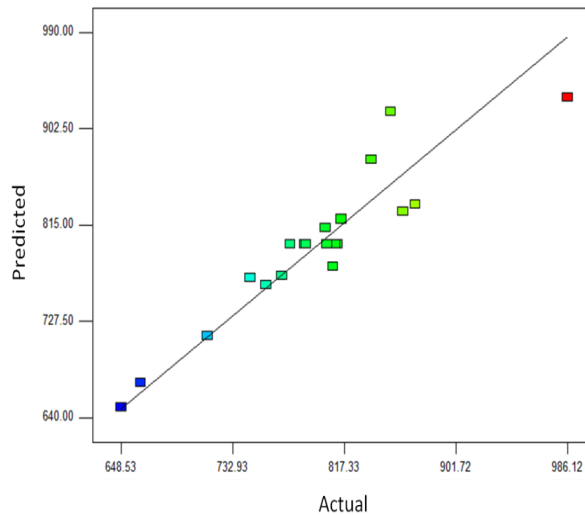


Figura 58 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 58 permite concluir que a modelação apresenta elevada linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe elevada fiabilidade na modelação obtida.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação de sólidos removidos do pré-tratamento alcalino com tamanho de partícula de 2mm pode dizer-se, que o factor que mais afecta o resultado é a carga alcalina.

Na Tabela 29 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 6 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 29 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 6 mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	68610,80	11435,13	33,82	< 0,0001
A-Temperatura	37530,05	37530,05	111,01	< 0,0001
B-Tempo	1794,86	1794,86	5,31	0,0384
C-Carga	19114,30	19114,30	56,54	< 0,0001
AC	1774,49	1774,49	5,25	0,0393
A²	3609,46	3609,46	10,68	0,0061
C²	4030,13	4030,13	11,92	0,0043
Residual	4394,98	338,08	-	-
Falta de ajuste	4154,02	519,25	10,77	0,0090
Erro	240,96	48,19	-	-
Total	73005,78	-	-	-
R²	0,9398	-	-	-
R² (ajustado)	0,9120	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9398, mostrando que 93,98% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinômio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de Prob > F 0,0090 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$SR=879,43+4,52\times A-0,96\times B-22,82\times C-0,45\times A\times C-0,07\times A^2+3,44\times C^2$$

Equação 15

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 29) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que os efeitos lineares da temperatura e da carga são os que se revelam mais importantes na variação da resposta.

São menos relevantes, mas também importantes por apresentarem níveis de significância (p -valor $<0,05$), o efeito linear do tempo, o factor interactivo da temperatura coma carga e os factores quadráticos da temperatura e da carga.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor dos sólidos recuperados por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 59 e Figura 60.

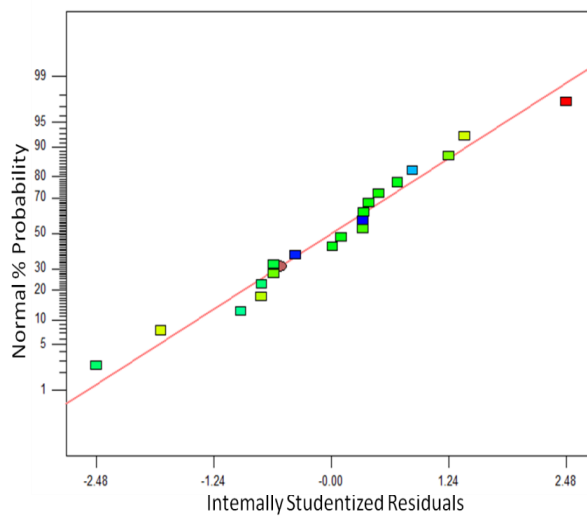


Figura 59 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

A Figura 60 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

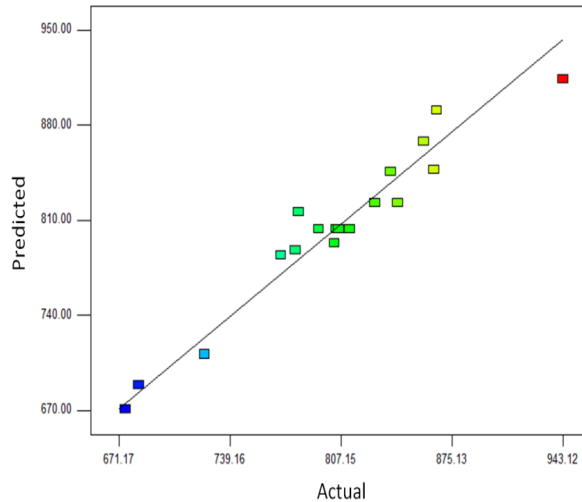


Figura 60 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (actual) e através da equação de modelação (predicted).

A análise da Figura 60 permite concluir que a modelação apresenta elevada linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe elevada fiabilidade na modelação obtida.

A influência de um factor em interacção com os outros dois a dois é facilmente observada nas Superfícies de Resposta (3D), onde a cor azul representa o valor mínimo e a cor vermelha o valor máximo, de sólidos recuperados nos pré-tratamentos efectuados.

Na Figura 61 podemos analisar o efeito da interacção entre as variáveis (temperatura e carga) que mais influenciam a resposta. O gráfico ilustra que para um aumento da temperatura como da carga há um aumento dos sólidos recuperados, sendo mais visível esse aumento quando aumenta a carga.

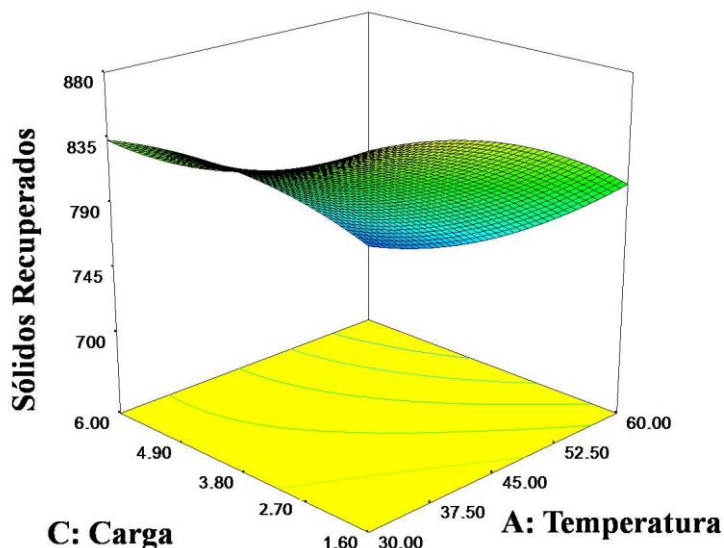


Figura 61 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (A) e da carga (C), mantendo fixa a variável (B), 22,5min.

Na Tabela 30 podemos analisar a informação (tamanho de partícula de 10 mm) correspondente á análise de variância (ANOVA), para modelo de resposta.

Tabela 30 – Quadro ANOVA para a resposta dos sólidos recuperados para o tamanho de partícula de 10 mm.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	61100,21	30550,11	32,67	< 0,0001
A-Temperatura	39503,62	39503,62	42,24	< 0,0001
C-Carga	21596,59	21596,59	23,09	0,0002
Residual	15898,36	935,20	-	-
Falta de ajuste	12787,45	1065,62	1,71	0,2876
Erro	3110,91	622,18	-	-
Total	76998,57	-	-	-
R²	0,7935	-	-	-
R² (ajustado)	0,7692	-	-	-

O modelo polinomial definitivo para a resposta tem significado para um nível de significância de 0,01%. O modelo apresenta ainda um coeficiente de correlação (R^2) de 0,7935, mostrando que 79,35% dos pontos obtidos se ajustaram ao modelo.

Os valores dos coeficientes das variáveis utilizadas para a obtenção do polinómio do 2º grau, apresentam um nível de significância inferior a 5%. A realização de um teste *t-student* para cada coeficiente permite obter o seu nível de significância.

O valor de Prob > F 0,2876 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia, Fiadeiro e Queiroz 2008).

A equação final ajustada para a resposta da lenhina removida é a seguinte:

$$SR=1043,67-3,58\times A-18,08\times C$$

Equação 16

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 30) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que o efeito linear da temperatura é o que se revela mais importante na variação da resposta. É menos relevante, mas também importantes por apresentarem níveis de significância (p-valor <0,05), o efeito linear da carga.

A carga apresenta-se de facto como sendo o factor mais importante na variação do valor da lenhina removida por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor tempo apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Desing Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 62 e Figura 63.

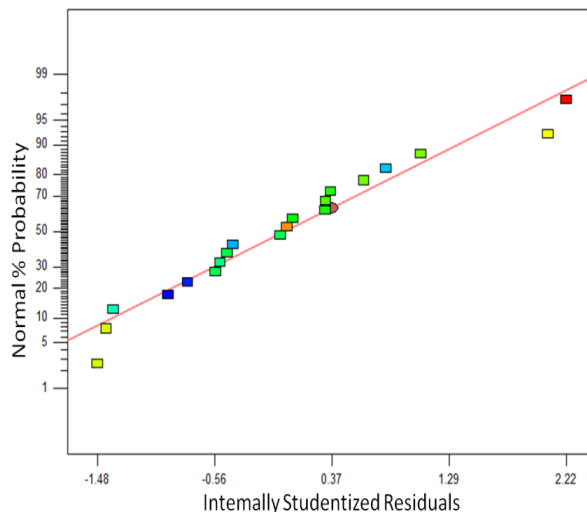


Figura 62 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

A Figura 63 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

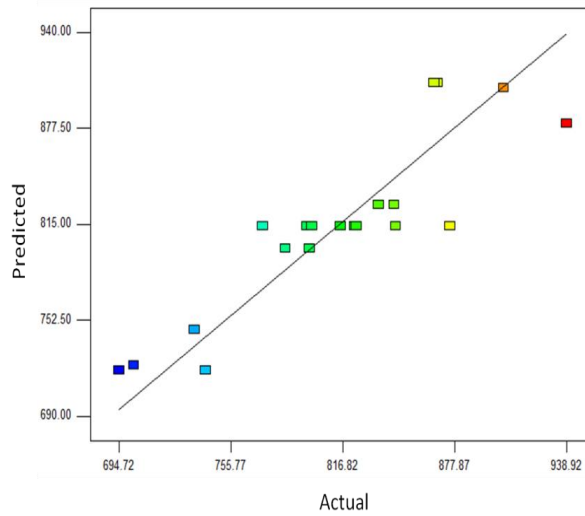


Figura 63 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 63 permite concluir que a modelação apresenta elevada linearidade quando se representam os valores obtidos experimentalmente (*actual*) e os valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada o que implica que existe elevada fiabilidade na modelação obtida.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação de sólidos removidos do pré-tratamento alcalino com tamanho de partícula de 10mm pode dizer-se, pode dizer-se que o factor que mais afecta o resultado é a carga alcalina.

IV - 2 Análise comparativa das duas gamas de temperatura.

A comparação da eficiência do pré-tratamento nas duas gamas de temperatura utilizadas neste trabalho é importante porque permite conhecer e realçar a efectividade de cada variável sobre cada resposta e qual a influência que essa variável tem sobre a resposta de cada gama de temperatura e de cada tamanho de partícula. A Tabela 31 e Tabela 32 apresentam apenas os valores de p que conferem significância às variáveis, isto é apresentam p-valor < 0,05.

Tabela 31 – Quadro resumo dos valores de “p” significativos obtidos pela análise ANOVA para a lenhina removida.

Fonte	Prob > F p-valor							
	1 mm		2mm		6mm		10mm	
	Altas temperaturas	Baixas temperaturas	Altas temperaturas	Baixas temperaturas	Altas temperaturas	Baixas temperaturas	Altas temperaturas	Baixas temperaturas
Modelo	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
A-	< 0,0001	0,0036	-	0,0006	-	0,0014	0,0304	0,0009
B-Tempo	-	-	-	-	-	-	-	-
C-Carga	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
AB	-	-	-	-	-	-	0,0316	-
AC	< 0,0001	-	0,0129	-	0,0009	-	0,003	-
A²	< 0,0001	-	0,0089	-	0,0059	-	0,0016	-
B²	0,0159	-	-	-	0,0032	-	-	-
C²	< 0,0001	-	0,001	-	-	-	0,0011	0,0155
Falta de	0,1486	0,018	0,0021	0,0512	0,0004	0,1395	< 0,0001	0,2814
R²	0,9924	0,8917	0,8353	0,8541	0,8446	0,8506	0,9183	0,9004
R² (ajustado)	0,9880	0,8789	0,7765	0,8370	0,7891	0,8331	0,8706	0,8817

Tabela 32 – Quadro resumo dos valores de “p” significativos obtidos pela análise ANOVA dos sólidos recuperados.

Fonte	Prob > F p-valor							
	1 mm		2mm		6mm		10mm	
	Altas temperaturas	Baixas temperaturas	Altas temperaturas	Baixas temperaturas	Altas temperaturas	Baixas temperaturas	Altas temperaturas	Baixas temperaturas
Modelo	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
A-	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
B-Tempo	0,0364	0,0477	-	0,0244	-	0,0384	-	-
C-Carga	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0002
AB	-	-	-	-	-	-	-	-
AC	-	-	0,0123	-	-	0,0393	-	-
A²	0,0046	0,0071	-	0,0242	-	0,0061	-	-
B²	-	-	-	-	-	-	-	-
C²	< 0,0001	-	< 0,0001	0,0439	< 0,0001	0,0043	0,0002	-
Falta de	0,0072	0,0149	0,0035	0,0237	0,0141	0,009	0,1626	0,2876
R²	0,9900	0,8453	0,9613	0,8648	0,9830	0,9398	0,9623	0,7935
R² (ajustado)	0,9864	0,8041	0,9509	0,8166	0,9798	0,9120	0,9552	0,7692

A análise global da Tabela 31 e Tabela 32 permite-nos observar que a carga e a temperatura são as variáveis que têm maior significância em qualquer das respostas. No entanto, verificamos que a temperatura tem mais importância nos sólidos recuperados do que na lenhina removida. E a variável tempo apresenta apenas significância nos sólidos recuperados.

Observa-se também que para a gama de temperaturas elevadas o R^2 é superior ao referente para a gama de temperaturas baixas independentemente do tamanho de partícula utilizado. Contudo, para todos os casos os valores de R^2 são superiores a 0,8, o que indica que mais de 80% dos pontos obtidos se ajustam ao modelo.

Verifica-se que os modelos obtidos para as duas gamas de temperatura e para os tamanhos de partícula assinalados são significativos.

Nas Figura 64, Figura 65, Figura 66 e Figura 67 encontram-se os gráficos dos valores obtidos partindo das equações que modelam os pré-tratamentos efectuados.

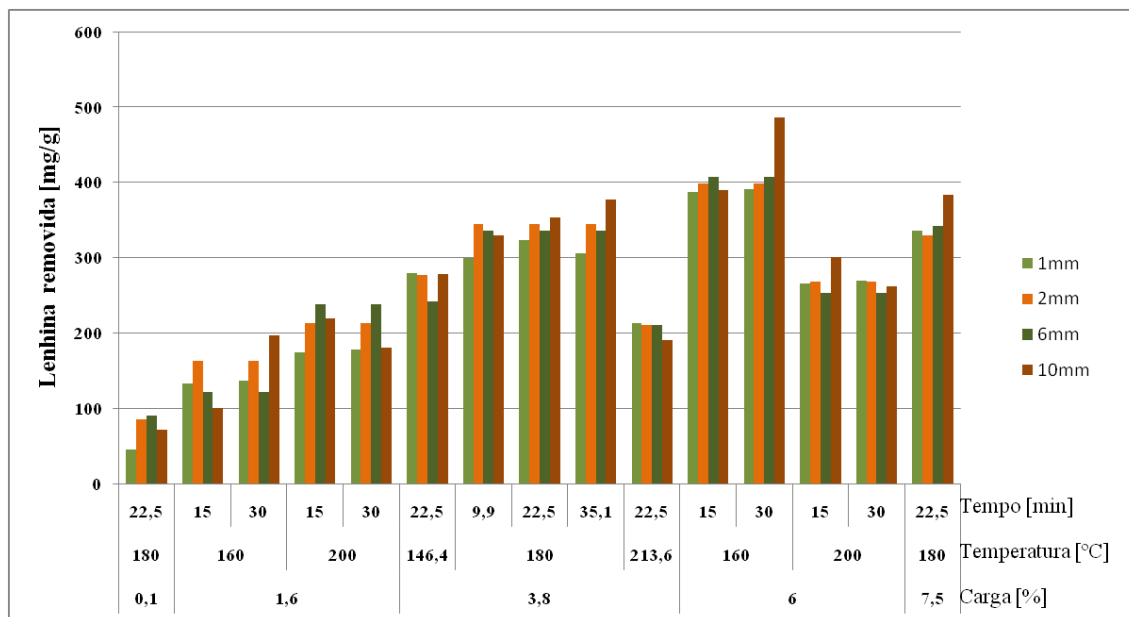


Figura 64 – Representação gráfica dos valores obtidos para a lenhina removida, partindo das equações que modelam o pré-tratamento para os quatro tamanhos de partícula, na gama de temperaturas elevadas.

O gráfico da Figura 64 ilustra um aumento da lenhina removida até temperaturas de 160°C, para temperaturas superiores observa-se um decréscimo na quantificação da lenhina, uma vez que a lenhina em meio alcalino e a estas temperaturas sofre uma série de reacções que a solubilizam, o que torna difícil a sua quantificação. Observa-se também que para temperaturas até 160°C, quanto maior for o tempo de reacção maior será a quantidade de lenhina removida.

O gráfico da Figura 65 ilustra os valores obtidos partindo das equações que modelam os pré-tratamentos dos quatro tamanhos de partículas para a série de temperaturas baixas.

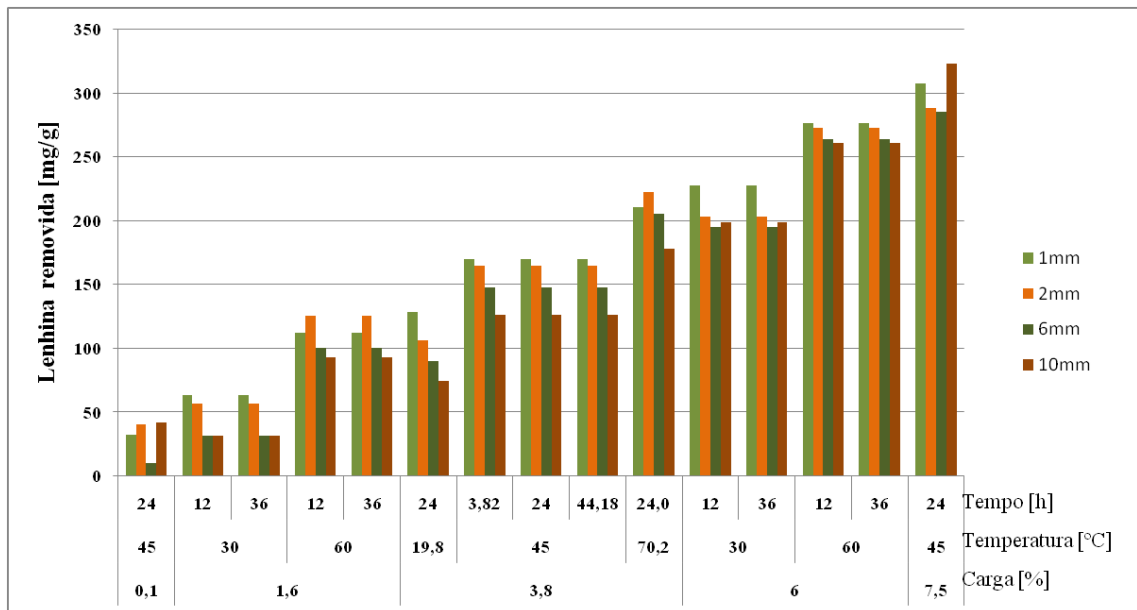


Figura 65 – Representação gráfica dos valores obtidos para a lenhina removida, partindo das equações que modelam o pré-tratamento para os quatro tamanhos de partícula, na gama de temperaturas baixas.

Através da análise do gráfico da Figura 65 verificamos que independentemente do tamanho da partícula a quantidade de lenhina removida aumenta com o aumento da carga alcalina aplicada e o factor tempo não tem influencia na remoção da lenhina uma vez que com condições de carga temperatura iguais e tempos diferentes a quantidade de lenhina removida é a mesma, ou seja nesta serie de temperaturas o que mais influencia tem na quantidade de lenhina removida é carga e a temperatura aplicada.

O gráfico da Figura 66 ilustra os valores obtidos partindo das equações que modelam os pré-tratamentos dos quatro tamanhos de partículas para a sucessão de temperaturas elevadas tendo como resposta os sólidos recuperados.

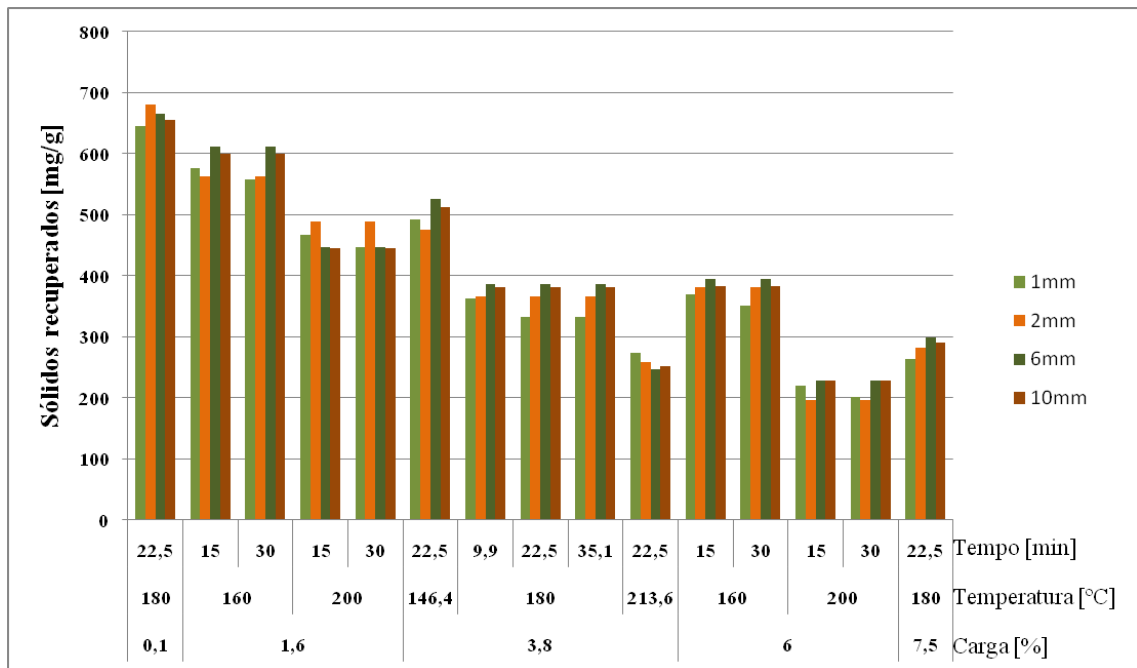


Figura 66 – Representação gráfica dos valores obtidos para os sólidos recuperados, partindo das equações que modelam o pré-tratamento para os quatro tamanhos de partícula, na gama de temperaturas elevadas.

O gráfico da Figura 66 ilustra claramente que um aumento de temperatura diminui a quantidade de sólidos recuperados, independentemente do tempo de tratamento. Outro factor que influencia os sólidos recuperados é a carga, pois quanto maior for a carga alcalina aplicada menor é a quantidade de sólidos recuperados.

O gráfico da Figura 67 ilustra os valores obtidos partindo das equações que modelam os pré-tratamentos dos quatro tamanhos de partículas para a gama de temperaturas baixas.

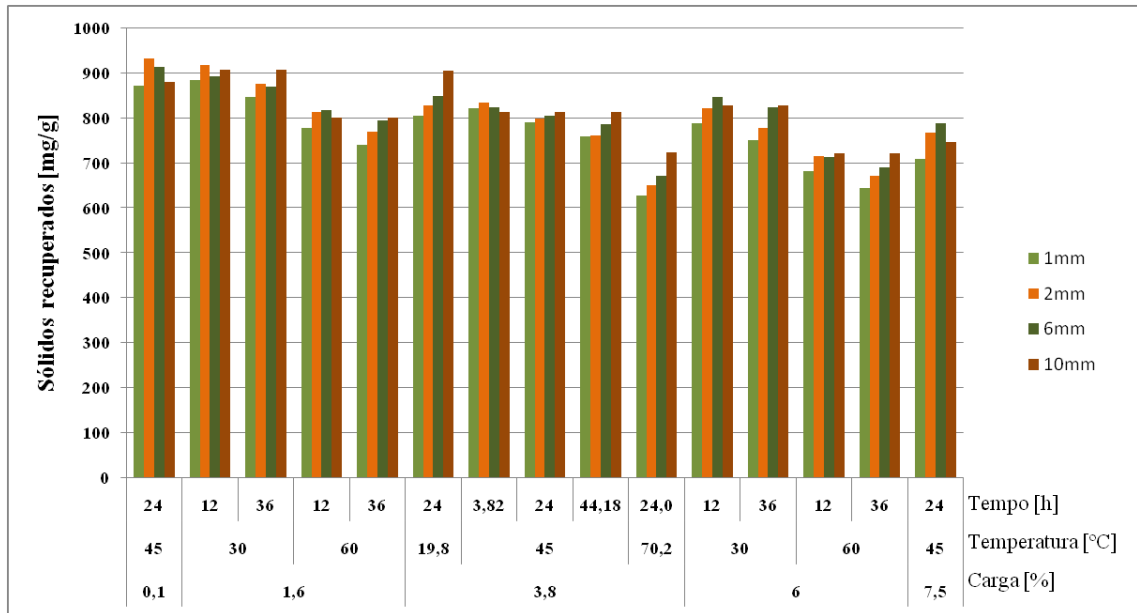


Figura 67 – Representação gráfica dos valores obtidos para os sólidos recuperados, partindo das equações que modelam o pré-tratamento para os quatro tamanhos de partícula, na gama de temperaturas baixas.

Através da análise do gráfico da Figura 67 observamos que para estas temperaturas o factor tempo apresenta alguma influência na quantidade de sólidos recuperados principalmente nos tamanhos mais pequenos, pois ai observa-se um decréscimo nos sólidos recuperados com um aumento do tempo de tratamento. Tal como acontece na gama de temperaturas elevadas, um aumento da temperatura e da carga alcalina provoca uma diminuição nos sólidos recuperados.

Capítulo V - Conclusões

e

Perspectivas Futuras

A utilização massiva de etanol no mundo requer que a tecnologia de produção seja rentável e ambientalmente sustentável (Sánchez e Cardona 2008).

A biomassa lenhocelulósica representa um grande potencial como matéria-prima para a produção de etanol. O baixo custo e a disponibilidade de uma vasta gama de materiais lenhocelulósicos (Cara, et al. 2008) oferecem muitas possibilidades para o desenvolvimento da bioindústria (Sánchez e Cardona 2008).

A biodegradabilidade da biomassa lenhocelulósica é limitada por vários factores, como a cristalinidade da celulose, a área de superfície disponível, e o teor de lenhina. Os pré-tratamentos têm um efeito sobre um ou mais destes factores (Kumar, et al. 2009), no caso do pré-tratamento alcalino apresenta um efeito positivo na área de superfície acessível, alterações na estrutura da lenhina e não presente, ou apresenta valores mínimos de fufural (Hendriks e Zeeman 2009).

As duas gamas de temperatura utilizadas neste trabalho mostraram que o factor temperatura é muito importante quando efectuamos um pré-tratamento alcalino, pois temos que ter em atenção que os componentes da biomassa sofrem vários tipos de reacções quando sujeitos a temperaturas elevadas em meio alcalino.

Na gama de temperaturas elevadas, a temperatura e a carga alcalina apresentam-se como factores de grande importância na remoção de lenhina e mesmo na quantidade de sólidos recuperados. Na remoção de lenhina verifica-se que a partir dos 160°C há uma regressão da remoção desta, pois para temperaturas superiores a 160°C a lenhina vai sofrer reacções de degradação. No caso da recuperação de sólidos quanto maior for a temperatura menor será essa recuperação.

Verificamos que na gama de temperaturas mais baixas temos que ter em conta a carga alcalina utilizada uma vez que este é o factor determinante para a remoção de lenhina e que nestas temperaturas não correm reacções de degradação da lenhina devido a temperatura. Quanto a recuperação de sólidos verifica-se uma estabilidade relativa, ou

seja, com o aumento da temperatura diminuem os sólidos recuperados, mas essa variação não é muito acentuada.

Com base nos quatro tamanhos de partícula estudados, observou-se que este factor não tem uma influência significativa no pré-tratamento assim cedo e tendo em vista o consumo energético de todo o processo, a utilização de um tamanho de partícula maior irá diminuir o consumo de energia do processo.

Os modelos quadráticos empíricos obtidos com elevada significância para a remoção da lenhina podem ser utilizados no desenvolvimento da optimização da produção de bioetanol a partir deste tipo de biomassa. Estes modelos permitem saber a influência que cada variável tem no pré-tratamento e o peso dessa mesma influência. Assim, a temperatura e a concentração alcalina para os quatro tamanhos pré-tratados neste trabalho, foram as variáveis que mais influência mostraram, permitindo uma optimização do processo.

Como perspectivas futuras o estudo do pré-tratamento de outras espécies arbustivas pode apresentar-se como mais um passo no desenvolvimento da produção de biocombustíveis, atendendo a que numa fase de produção industrial não é possível a separação individual de cada espécie, pelo que se torna imprescindível conhecer o comportamento individual de cada espécie.

Podem também ser investigadas combinações de diferentes factores do pré-tratamento, como a utilização de peróxido de hidrogénio. Ou o uso do steam explosion como pré-tratamento.

Referências Bibliográficas

Alen, R. "Structure and chemical composition of wood." Cap. 1 em *Papermaking science and technology*, 12-57. Published in cooperation with the Finnish Paper Engineers Association and TAPPI, 2000.

Baeza, Jaime, e Juanita Freer. "Chemical Characterization of Wood and Its Components." In *WOOD AND CELLULOSIC CHEMISTRY second edition, revised and expanded*, de David N.-S. Hon e Nobuo Shiraishi, 275-384. NEW YORK: MARCEL DEKKEINRC, Inc., 2001.

Balat, Mustafa, Havva Balat, e Cahide Öz. "Progress in bioethanol processing." *Progress in Energy and Combustion Science* 34, 2008: 551-573.

Baptista, Cecília, Danielle Robert, e Ana Paula Duarte. "Effect of pulping conditions on lignin structure from maritime pine kraft pulps." *Chemical Engineering Journal (2006)* 153–158 121 (2006): 153-158.

Bas, Deniz, e Ismail H. Boyacı. "Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology." *Journal of Food Engineering* 78, 2007: 836-845.

BEST. *Bioethanol for Sustainable Transport*. <http://www.best-europe.org/Pages/ContentPage.aspx?id=120> (acedido em 6 de Janeiro de 2010).

Bierman, J. *Handbook of pulping and papermaking*. 2ª Edição. California: Academic press, 1996.

Bjerre, Anne Belinda, Anne Bjerring Olesen, Tomas Fernqvist, Annette Ploger, e Anette Skammelsen Schmidt. "Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose." *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 1996: 568-577.

Brunow, G., et al. "Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin." Cap. 10 em *Lignin and Lignan Biosynthesis*, de N.G. Lewis and S. Sarkanen, 131-147. Washington, DC: ACS Symp. Ser. 697, 1998.

Cara, C., E. Ruiz, J. M. Oliva, F. Sáez, e E. Castro. "Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification." *Bioresource Technology* 99 (2008): 1839-1876.

Casey, James P. *Pulp and Paper Chemistry and Chemical Technology*. 3ª Edição. Vol. 1. New York: John Wiley & Sons Inc., 1980.

Champagne, Pascale. "Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: A Canadian perspective Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues in Canada." *Resources, Conservation and Recycling* 50, 2007: 211-230.

Chang, Vincent S., e Mark T. Holtzaple. "Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84, 2000: 5-37.

Chundawat, Shishir P. S., Balan Venkatesh, e Bruce E. Dale. "Effect of Particle Size Based Separation of Milled Corn Stover on AFEX Pretreatment and Enzymatic Digestibility." *Biotechnology and Bioengineering* 96, 2007: 219-231.

D'Almeida, M. L. O. *Celulose e papel, tecnologia de fabricação da pasta celulósica*. Vol. 1. SENAI, Escola Theobaldo De Nigris: IPT, Centro Técnico em Celulose e Papel, 1981.

Dale, B. E., C. K. Leong, T. K. Pham, V. M. Esquivel, I. Rios, e V. M. Latimer. "Hydrolysis of lignocellulosics at low enzyme levels Application of the AFEX process." *Bioresource Technology*, 56, 1996: 111-116.

Dias, Marina O.S., Adriano V. Ensinas, Silvia A. Nebra, Rubens Maciel Filho, Carlos E.V. Rossell, e Maria Regina Wolf Maciel. "Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process." *Chemical Engineering Research and Design*, 2009: doi:10.1016/j.cherd.2009.06.020.

Duff, Sheldon J. B., e William D. Murrayh. "Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review." *Bioresource Technology*, 55, 1996: 1-33.

Dumitriu, S. *Polysaccharides-structural, diversity and functional versatility*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1998.

Emmel, Alexandre, Alvaro L. Mathias, Fernando Wypych, e Luiz P. Ramos. "Fractionation of Eucalyptus grandis chips by dilute acid-catalysed steam explosion." *Bioresource Technology* 86, 2003: 105-115.

Energy, U.S. Department of. *Office of Biological and Environmental Research*. http://www.sc.doe.gov/ober/ober_top.html (acedido em 6 de Janeiro de 2010).

Esau, K. *Anatomy of seed plants*. 2ª Edição. New York: John Wiley & Sons, 1997.

Fabião, A. M. D. *Árvores e florestas*. Mem Martins: Publicações Europa-América, Lda, 1987.

Fan, L.T., M.M. Gharpuray, e Y.-H Lee. "Nature of cellulosic material." In *Cellulose hydrolysis*, 5-20. New York: Springer-Verlag, 1987.

Fengel, Dietrich, e Gerd Wegener. *Wood Chemistry Ultrastructure Reactions*. New York: Walter de Gruyter, 1989.

Foster, Brian L., Bruce E. Dale, e Joy B. Doran-Peterson. "Enzymatic hydrolysis of ammonia-treated sugar beet pulp." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91, 2001: 269-282.

Fujita, M., e H. Harada. "Ultrastructure and formation of wood cell wall." Cap. 1 em *Wood and cellulose chemistry*, de David N.-S. Hon and Nobuo Shiraish, 1-49. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001.

Garrote, Gil, Herminia Domínguez, e Juan C.Parajó. "Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production ." *Journal of Food Engineering*, 52, 2002: 211-218.

Gil, N., F.C. Domingues, M. E. Amaral, e A. P. Duarte. "CHEMICAL COMPOSITION AND ACID PRETREATMENT OF CYTISUS STRIATUS AND CISTUS LADANIFER FOR BIOETHANOL." *Bioenergy: Challenges and Opportunities; International Conference and Exhibition on Bioenergy*. Universidade do Minho, Guimarães, Portugal, 2008.

Gouveia, Isabel C., José M. Fiadeiro, e João A. Queiroz. "Enzymatic removal of plant residues from wool: Application of experimental design techniques for optimization parameters." *Biochemical Engineering Journal* 41 (2008): 157-165.

Gray, Matthew C., Alvin O. Converse, e Charles E. Wyman. "Sugar Monomer and Oligomer Solubility." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105, 2003: 179-193.

Hahn-Hägerdal, B., M. F. Gorwa-Grauslund, G. Lidén, e G. Zacchi. "Bio-ethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today." *TRENDS in Biotechnonology* 24, 2006: 549-556.

Hakkila, P. *Structure and properties of wood and woody biomass*. Vol. book 2, em *Forest resources and sustainable management*, de Seppo Kellomäki. Finland: Finnish paper Engineers' Association and TAPPI, 2000.

Hamelinck, Carlo N., Geertje van Hooijdonk, e André PC Faaij. "Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term." *Biomass and Bioenergy* 28, 2005: 384-410.

Hendriks, A.T.W.M., e G. Zeeman. "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass: Review." *Bioresource Technology*, 100, 2009: 10-18.

Hinkelmann, K., e O. Kempthorne. Vol. 2, em "*Advanced experimental design*" *Wiley series in probability and statistics*, de Design and analysis of experiments, 2005. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2005.

Jorgensen, Henning, Jan Bach Kristensen, e Claus Felby. "Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities, a review." *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1, 2007: 119-134.

Kim, Sung Bae, Byung Hwan Um, e Soon Chul Park. "Effect of Pretreatment Reagent and Hydrogen Peroxide on Enzymatic Hydrolysis of Oak in Percolation Process." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91, 2001: 81-94.

Kirk, T., e R. Farrel. "Enzimatic "combustion": the microbial degradation of lignin." *Annual Review of Microbiology* 41, 1987: 465-505.

Klemm, D., B. Philipp, T. Heinze, U. Heinze, e W Wagenknecht. "General Considerations on Structure and Reactivity of Cellulose." In *Comprehensive Cellulose Chemistry; Volume 1: Fundamentals and Analytical Methods*, de D. Klemm, B. Philipp, T. Heinze, U. Heinze e W Wagenknecht, 9-155. Weinheim: WILEY-VCH, 1998.

Koga, M. E. T. “Matérias-primas fibrosas.” In *Celulose e papel. Tecnologia de fabricação da pasta celulósica*, de M. R. Carvalho. S. Paulo, 1988.

Kuhad, Ramesh Chander, Ajay Singh, e Karl-Erik L. Eriksson. *Microorganisms and Enzymes Involved in the Degradation of Plant Fiber Cell Walls*. Vol. 57, em *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, de K.-E. L. Eriksson, 45-112. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1997.

Kumar, Parveen, Diane M. Barrett, Michael J. Delwiche, e Pieter Stroeve. “Methods for Pretreatment of lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production.” *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48 (2009): 3713-3729.

Lai, Yuan-Zong. “Chemical Degradation.” Cap. 10 em *Wood And Cellulosic Chemistry*, de David N.-S. Hon e Nobuo Shiraishi, 443-512. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001.

Lapointe, R. E. *Précis de chimie de la cellulose*. Montréal: Centre collégial de développement de matériel didactique, 1989.

Laureano-Perez, Lizbeth, Farzaneh Teymouri, Hasan Alizadeh, e Bruce E. Dale. “Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass.” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121–124, 2005: 1081-1099.

Lidon, Fernando José Cebola, Hélio Parreira Gomes, e António Campos S. Abrantes. *Anatomia e Morfologia Externa das Plantas Superiores*. Coimbra: LIDEL - Edições Técnicas, Lda, 2001.

Mamman, Ajit Singh, et al. “Furfural: Hemicellulose/xylose-derived biochemical Review.” *Biofuels, Bioproducts e Biorefining* 2, 2008: 438-454.

Margeot, Antoine, Bärbel Hahn-Hagerdal, Maria Edlund, Raphael Slade, e Frédéric Monot. “New improvements for lignocellulosic ethanol.” *Current Opinion in Biotechnology*, 2009: DOI 10.1016/j.copbio.2009.05.009.

McDonald, R. G. *Pulp and paper manufacture*. Vol. I. New York: McGraw-Hill, 1969.

McKendry, Peter. “Energy production from biomass (part 1): overview of biomass.” *Bioresource Technology*, 83 , 2002: 37-46.

Mészáros, E., E. Jakab, M. Gáspár, K. Réczey, e G. Várhegyi. “Thermal behavior of corn fibers and corn fiber gums prepared in fiber processing to ethanol.” *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 85, 2009: 11-18.

Moniruzzaman, M., B. E. Dale, R. B. Hespell, e R. J. Bothast. “Enzymatic hydrolysis of high-moisture corn fiber pretreated by AFEX and recovery and recycling of the enzyme complex.” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 67, 1997: 113-126.

Montgomery, D. C. *Design and Analysis of Experiments*. 5ª Edição. New York: John Wiley & Sons, 2000.

Nguyen, Quang A., Melvin P. Tucker, Fred A. Keller, e Fannie P. Eddy. “Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods.” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84, 2000: 561-576.

Piccolo, Chiara, e Fabrizio Bezzo. “A techno-economic comparison between two technologies for bioethanol production from lignocellulose.” *Biomass and Bioenergy* 33, 2009: 478-491.

Pu, Yunqiao, Dongcheng Zhang, Preet M. Singh, e Arthur J. Ragauskas. “The new forestry biofuels sector: Review.” *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2, 2008: 58-73.

Rowell, Roger M., Roger Pettersen, James S. Han, Jeffrey S. Rowell, e Mandla A. Tshabalala. “Cell Wall Chemistry.” In *Handbook of wood chemistry and wood composites*, de Roger M. Rowell. New York: Taylor & Francis Group, 2005.

Sánchez, Ó. J., e C. A. Cardona. “Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks: Review.” *Bioresource Technology* 99 (2008): 5270-5295.

Schmidt, Olaf. *Wood and Tree Fungi-Biology, Damage, Protection, and Use*. Berlin: Springer-Verlag, 2006.

Seixal, Câmara Municipal do. *Câmara Municipal do Seixal*. http://www.cm-seixal.pt/CMSEIXAL/AMBIENTE/Footer_Contextual/Documentos/ (acedido em 20 de Novembro de 2009).

Silverstein, Rebecca A., Ye Chen, Ratna R. Sharma-Shivappa, Michael D. Boyette, e Jason Osborne. "A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks." *Bioresource Technology*, 98, 2007: 3000-3011.

Sinitsyn, A. P., A. V. Gusakov, e E. YU. Vlasenko. "Effect of Structural and Physico-Chemical Features of Cellulosic Substrates on the Efficiency of Enzymatic Hydrolysis." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 30, 1991: 43-59.

Sjöström, Eero. *Wood Chemistry Fundamentals and Applications*. New York: Academic Press, inc., 1981.

Sousa, Leonardo da Costa, Shishir PS Chundawat, Venkatesh Balan, e Bruce E Dale. "'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies." *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 2009: 339-347.

Sugimoto, Tomoko, Kengo Magara, Shuji Hosoya, Satoshi Oosawa, Takafumi Shimoda, e Kozo Nishibori. "Ozone pretreatment of lignocellulosic materials for ethanol production: Improvement of enzymatic susceptibility of softwood." *HOLZFORSCHUNG, International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 63, 2009: 537-543.

Sun, Ye, e Jiayang Cheng. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review." *Bioresource Technology*, 83, 2002: 1-11.

Teeri, T. "Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases." *Trends in Biotechnology* 15 (1997): 160-167.

Torget, R., M. Himmel, e K. Grohmann. "Dilute-acid pretreatment of two short-rotation herbaceous crops." *Applied Biochemistry and Blotechnology*, 34, 1992: 115-123.

Umezawa, Toshiaki. "Chemistry of Extractives." In *WOOD AND CELLULOSIC CHEMISTRY second edition, revised and expanded*, de David N.-S. Hon e Nobuo Shiraishi, 213-242. NEW YORK: MARCEL DEKKEINRC, Inc., 2001.

Union, European. *EUROPA-The official website of the European Union*. <http://europa.eu/> (acedido em 20 de Novembro de 2009).

Wit, Marc de, Martin Junginger, Sander Lensink, Marc Londo, e André Faaij. “Competition between biofuels: Modeling technological learning and cost reductions over time.” *Biomass & Bioenergy*, 2009: doi:10.1016/j.biombioe.2009.07.012.

Yu, Hongbo, Guoning Guo, Xiaoyu Zhang, Keliang Yan, e Chunyan Xu. “The effect of biological pretreatment with the selective white-rot fungus *Echinodontium taxodii* on enzymatic hydrolysis of softwoods and hardwoods.” *Bioresource Technology* 100, 2009: 5170-5175.