

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR



PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS
LENHOCELULÓSICOS PARA PRODUÇÃO DE
BIOETANOL

NUNO RICARDO SILVA GIL

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

Orientadora:

Prof. Doutora Ana Paula Coelho Duarte

Covilhã, 2008

“ O futuro do abastecimento energético constitui talvez o maior e mais importante desafio da humanidade para a próxima década. É na escolha do tipo de energia que nos irá alimentar que assenta a sobrevivência do planeta enquanto sistema biológico e a sustentabilidade da economia na qual o nosso modo de vida assenta, e o grande problema é justamente conciliar estes dois aspectos até aqui incompatíveis”

José Rodrigues dos Santos

Agradecimentos

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 e/ou instituições 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, minha orientadora, que com muita paciência e disponibilidade, ouviu as minhas dúvidas, discutiu resultados e opções e principalmente por acreditar no desempenho e valor com que realizo cada ensaio laboratorial, e por toda a contribuição de saber e experiência que acrescentou a este trabalho.

A todos os meus amigos, eles certamente saberão quem são, com especial atenção à Patrícia Baptista e à Sónia Sousa pela amizade, incentivo e apoio a nível laboratorial que me deram ao longo deste trabalho.

A todas as pessoas que fazem parte do projecto de investigação no qual estou inserido, participado pelo IFADAP/Fundo florestal permanente intitulado “Produção de biocombustíveis a partir de resíduos florestais” com o número 2006.09.001055.1.

A todos aqueles que, embora não explicitamente mencionados, me ajudaram a cumprir os meus objectivos.

Por fim e muito especialmente, quero agradecer aos meus Pais, pelo carinho e força que sempre me deram e principalmente pela paciência e compreensão pela minha ausência.

A todos o meu muito obrigado!

Resumo

Os materiais lenhocelulósicos são uma fonte alternativa para a produção de etanol. *Cytisus striatus* (giesta), *Cistus ladanifer* (esteva) e *Pterospartum tridentatum* (carqueja), são espécies arbustivas abundantes em zonas temperadas e estão disponíveis como resíduos florestais interessantes. 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 consequentemente em etanol. Neste estudo são avaliados os efeitos da temperatura de reacção, tempo de residência, concentração de ácido e a razão biomassa/líquido na quantidade de açúcares redutores totais presentes nos hidrolisados resultantes dos pré-tratamentos de *Cytisus striatus*, *Cistus ladanifer* e *Pterospartum tridentatum*. 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. A remoção máxima de açúcares redutores foi 302,2 e 284,5 mg/g para *Cistus ladanifer* e *Cytisus striatus*, respectivamente. Estes resultados foram obtidos para reacções realizadas a 150 °C durante 75 minutos com 2,55 % de ácido sulfúrico e uma razão biomassa/líquido de 2 g/10 mL. Para a *Pterospartum tridentatum* a máxima remoção de açúcares totais foi de 306,1 mg/g. Este resultado foi obtido para reacções realizadas a 130 °C durante 75 minutos com 5 % de ácido sulfúrico e uma razão biomassa/líquido de 2,3 g/10 mL.

Palavras chave: *Cytisus striatus*; *Cistus ladanifer*; *Pterospartum tridentatum*; Bioetanol; Biomassa; Pré-tratamento com ácido diluído; Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)

Abstract

Lignocellulosic materials are an alternative source for ethanol production. *Cytisus striatus*, *Cistus ladanifer* and *Pterospartum tridentatum* are arbustive species abundant in temperate zones and are available as forest residues. In the bioconversion of lignocellulosic materials to ethanol, it is crucial a pretreatment of the material prior to enzymatic hydrolysis, in order to obtain high overall yields of carbohydrates and ethanol. In this study, it was evaluated the effect of reaction temperature, residence time, sulfuric acid concentration and vegetal/liquid ratio on the content of released sugars in the hydrolysates resulting from pretreatment of broom and rock-rose. Batch reactions were carried out under different operating conditions and Response Surface Methodology (RSM) was used to model the pretreatment process in order to obtain high total sugars yield. The maximum concentration of total sugars obtained was 302,2 and 284,5 mg/g for rock-rose and broom, respectively. These results were achieved when reaction was performed at 150 °C during 75 minutes with 2,55 % of sulfuric acid and a vegetal/liquid ratio of 2 g/10 mL. For *carqueja* the maximum concentration of total sugars obtained was 306,1 mg/g. This result was obtained when reaction was carried out at 130 °C during 75 minutes with 5 % of sulfuric acid and a vegetal/liquid ratio of 2,3 g/10 mL.

Keywords: *Cytisus striatus*; *Cistus ladanifer*; *Pterospartum tridentatum*; Bioethanol; Biomass; Diluted acid pre-treatment; Response Surface Methodology (RSM)

Índice

Resumo	IV
Abstract	V
Índice	VI
Índice de Figuras	IX
Índice de Tabelas	XIV
Lista de Abreviaturas	XV
Introdução	1
Capítulo I – Revisão Bibliográfica	5
1. Biomassa vegetal	5
1.1 Estrutura e forma da biomassa vegetal	6
1.1.1 Caracterização anatómica e morfológica da biomassa vegetal.....	7
1.1.1.1 Caracterização anatómica	7
1.1.1.2 Caracterização morfológica	8
1.2 Caracterização química e principais reacções dos componentes da madeira	9
1.2.1 Celulose	10
1.2.1.1 Caracterização da celulose.....	10
1.2.1.2 Degradação da celulose	11
1.2.1.2.1 Degradação hidrolítica.....	12
1.2.1.2.2 Degradação oxidativa	13
1.2.1.2.3 Degradação microbiológica	15
1.2.2 Hemiceluloses	16
1.2.2.1 Caracterização das hemiceluloses.....	16
1.2.2.2 Degradação das hemiceluloses	17
1.2.3 Lenhina	18
1.2.3.1 Caracterização da lenhina	18
1.2.3.2 Reacções da lenhina.....	20
1.2.3.2.1 Hidrólise ácida	21
1.2.3.2.2 Hidrólise alcalina	21
1.2.3.2.3 Condensação	21
1.2.3.2.4 Oxidação	21
1.2.4 Extractáveis.....	22
1.2.4.1 Fracção lipofílica	23
1.2.4.1.1 Terpenos e terpenóides	23
1.2.4.1.2 Lípidos	23
1.2.4.2 Fracção hidrofílica	24
1.2.4.2.1 Compostos fenólicos.....	24
1.2.5 Compostos inorgânicos.....	25

1.3 Caracterização química dos componentes da casca.....	26
1.3.1 Celulose	26
1.3.2 Hemiceluloses	27
1.3.3 Lenhina	27
1.3.4 Extractáveis.....	28
2. Pré-tratamento de material lenhocelulósico para obtenção de bioetanol.....	28
2.1 Pré-tratamento ácido	31
2.2 Pré-tratamento alcalino	33
2.3 Pré-tratamento com ozono	34
2.4 Pré-tratamento steam explosion.....	35
2.5 Pré-tratamento biológico.....	36
3. <i>Design</i> experimental	37
3.1 Introdução	37
3.2 Design de experiências – Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)	38
Capítulo II – Parte experimental	42
1. Materiais e reagentes	42
1.1 Matérias-primas	42
1.2 Material de laboratório.....	43
1.3 Reagentes	43
2. Métodos analíticos	44
1.1 Determinação do teor de humidade e preparação da matéria-prima	45
1.2 Determinação do teor de cinzas	46
1.3 Determinação do teor de extractáveis	46
1.4 Determinação do teor de lenhina solúvel e insolúvel	47
1.5 Determinação dos açúcares redutores totais	48
3. Método de Pré-tratamento	49
1.1 Preparação das matérias-primas.....	49
1.2 Pré-tratamento e análise dos filtrados.....	50
Capítulo III – Resultados e Discussão	54
1. Composição da biomassa florestal.....	54
2. Pré-tratamentos/ <i>design</i> experimental.....	56
2.1 Esteva.....	56

2.2 Giesta	67
2.3 Carqueja	78
4. Análise comparativa das três espécies arbustivas.....	90
Capítulo IV – Conclusões e Perspectivas Futuras	93
Referências Bibliográficas	96

Índice de Figuras

Figura 1 – Exemplificação do ciclo do carbono (adaptado de <i>Oak Ridge National Laboratory</i> , 2008).....	5
Figura 2 – Exemplificação das designações utilizadas para as principais partes componentes das árvores (adaptado de Fabião 1987).	6
Figura 3 – Secção transversal do tronco de uma árvore adulta (adaptado de Koga, 1988).	7
Figura 4 – Representação da cadeia principal da estrutura de celulose (adaptado de <i>Office of Biological and Environmental Research</i> , 2008).....	10
Figura 5 – Ultraestrutura da parede celular (adaptado de <i>Office of Biological and Environmental Research</i> , 2008).	11
Figura 6 – Hidrólise ácida da celulose (adaptado de D’Almeida, 1981).....	12
Figura 7 – Hidrólise alcalina da celulose a temperaturas superiores a 150°C (adaptado de Fengel e Wegener, 1989).	13
Figura 8 – Oxidação com os iões hipiodito e hipoclorito (adaptado de D’Almeida, 1981).....	14
Figura 9 – Oxidação com o ião periodato (adaptado de Fengel e Wegener, 1989).....	14
Figura 10 – Principais açúcares constituintes das hemiceluloses (adaptado de Fengel e Wegener, 1984).....	16
Figura 11 – Álcoois precursores da lenhina (Adaptado de Biermann, 1996).....	19
Figura 12 – Estrutura proposta para uma lenhina de uma resinoso (Brunow, 1998).....	20
Figura 13 – Exemplos de triterpenóides (esteróis) encontrados na madeira (adaptado de Sjöström, 1981).....	23
Figura 14 – Exemplos de compostos fenólicos e ácidos fenólicos presentes na madeira (Sjöström, 1981).	25

Figura 15 – Representação esquemática das alterações efectuadas durante o pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica, diminuição da cristalinidade e aumento da porosidade (adaptado de Mosier <i>et al.</i> , 2005).....	29
Figura 16 – Resposta de Superfície tri-dimensional mostrando o rendimento obtido (η) em função dos níveis (x_1) e (x_2) (adaptado de Montgomery, 2000).	39
Figura 17 – Contorno projectado de resposta constante (adaptado de Montgomery, 2000).....	39
Figura 18 – Representação da natureza sequencial da RSM (adaptado de Montgomery, 2000).....	41
Figura 19 – Matérias-primas utilizadas: (a) Esteva, (b) Giesta e (c) Carqueja.....	42
Figura 20 – Matérias-primas após destroçamento na floresta e secagem à temperatura ambiente: (a) Esteva, (b) Giesta e (c) Carqueja.....	43
Figura 21 – Representação do moinho (a) e do crivo (b).	45
Figura 22 – Curva de calibração para uma solução de DNS utilizando a glucose como padrão.....	49
Figura 23 – Matérias-primas após moagem e crivagem: (a) Esteva, (b) Giesta e (c) Carqueja.....	50
Figura 24 – Banho termostatizado de PEG 400 (a) e reactores de aço inox de 200 mL (b).....	52
Figura 25 – Matérias-primas após pré-tratamento e durante a secagem.....	53
Figura 26 – Fracção líquida do pré-tratamento: (a) a pH ácido, (b) a pH neutro.	53
Figura 27 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	60
Figura 28 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	60
Figura 29 – Representação individual das variáveis (A, B, C, D) com as restantes condições constantes: (a) B = 100°C, C = 2,55% e D = 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido; (b) A = 75 min, C = 2,55% e D = 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido; (c) A = 75	

min, B = 100°C e D = 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido; (d) A = 75 min, B = 100°C e C = 2,55%.....	62
Figura 30 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da temperatura (B), mantendo fixas as variáveis (C) e (D), 2,55% e 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.	63
Figura 31 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da concentração de ácido (C), mantendo fixas as variáveis (B) e (D), 100°C e 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.....	63
Figura 32 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da razão biomassa/líquido (D), mantendo fixas as variáveis (B) e (C), 100°C e 2,55%, respectivamente.	64
Figura 33 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (B) e da concentração de ácido (C), mantendo fixas as variáveis (A) e (D), 75 min e 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.....	65
Figura 34 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (B) e da razão biomassa/líquido (D), mantendo fixas as variáveis (A) e (C), 75 min e 2,55%, respectivamente.	65
Figura 35 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da concentração de ácido (C) e da razão biomassa/líquido (D), mantendo fixas as variáveis (A) e (B), 75 min e 100°C, respectivamente.....	66
Figura 36 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	71
Figura 37 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	71
Figura 38 – Representação individual das variáveis (A, B, C, D) com as restantes condições constantes: (a) B = 100°C, C = 2,55% e D = 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido; (b) A = 75 min, C = 2,55% e D = 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido; (c) A = 75 min, B = 100°C e D = 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido; (d) A = 75 min, B = 100°C e C = 2,55%.....	73

Figura 39 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da temperatura (B), mantendo fixas as variáveis (C) e (D), 2,55% e 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.	74
Figura 40 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da concentração de ácido (C), mantendo fixas as variáveis (B) e (D), 100°C, e 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.....	74
Figura 41 Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da razão biomassa/líquido (D) mantendo fixas as variáveis (B) e (C), 100°C e 2,55%, respectivamente.	75
Figura 42 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (B) e da concentração de ácido (C) mantendo fixas as variáveis (A) e (D), 75 min e 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.....	76
Figura 43 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (B) e da razão biomassa líquido (D) mantendo fixas as variáveis (A) e (C), 75 min e 2,55%, respectivamente.	76
Figura 44 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da concentração de ácido (C) e da razão biomassa líquido (D) mantendo fixas as variáveis (A) e (B), 75 min e 100°C, respectivamente.....	77
Figura 45 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.	82
Figura 46 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (<i>actual</i>) e através da equação de modelação (<i>predicted</i>).	82
Figura 47 – Representação individual das variáveis (A, B, C, D) com as restantes constantes: (a) B = 130°C, C = 2,75% e D = 2,3 g biomassa/ 10 mL de líquido; (b) A = 75 min, C = 2,75% e D = 2,3 g biomassa/ 10 mL de líquido; (c) A = 75 min, B = 130°C e D = 2,3 g biomassa/ 10 mL de líquido; (d) A = 75 min, B = 130°C e C = 2,75%.....	84
Figura 48 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da temperatura (B), mantendo fixas as variáveis (C) e (D), 2,75% e 2,3 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.	85

Figura 49 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da concentração de ácido (C), mantendo fixas as variáveis (B) e (D), 130°C, e 2,3 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente..... 86

Figura 50 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da razão biomassa/líquido (D), mantendo fixas as variáveis (B) e (C), 130°C e 2,75%, respectivamente. 87

Figura 51 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (B) e da concentração de ácido (C), mantendo fixas as variáveis (A) e (D), 75 min e 2,3 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente..... 87

Figura 52 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (B) e da razão biomassa/líquido (D), mantendo fixas as variáveis (A) e (C), 75 min e 2,75%, respectivamente. 88

Figura 53 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da concentração de ácido (C) e da razão biomassa/líquido (D), mantendo fixas as variáveis (A) e (B), 75 min e 130°C, respectivamente..... 89

Figura 54 – Representação gráfica dos valores obtidos para os açúcares redutores totais, partindo das equações que modelam o pré-tratamento das espécies arbustivas estudadas. 91

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Compostos alifáticos existentes na madeira (Sjöström, 1981).	24
Tabela 2 – Tabela de reagentes utilizados durante os ensaios experimentais.	44
Tabela 3 – Intervalos nos quais varia cada factor ou variável considerada.	51
Tabela 4 – Parâmetros definidos introduzidos no <i>software</i>	51
Tabela 5 – Composição química da biomassa (em base seca)	54
Tabela 6 – Matriz do desenho experimental realizado para a esteva assim como a respectiva resposta.	57
Tabela 7 – Quadro ANOVA para a resposta dos açúcares redutores para a esteva.	58
Tabela 8 – Matriz do desenho experimental realizado para a giesta assim como a respectiva resposta.	68
Tabela 9 – Quadro ANOVA para a resposta dos açúcares redutores para a giesta.	69
Tabela 10 – Matriz do desenho experimental realizado para a carqueja assim como a respectiva resposta.	79
Tabela 11 – Quadro ANOVA para a resposta dos açúcares redutores para a carqueja. .	80
Tabela 12 – Quadro resumo dos valores de “p” significativos obtidos pela análise ANOVA.	90

Lista de Abreviaturas

3D – Tridimensional

5-HMF – 5-hidroximetilfurfural

A – Tempo

ANOVA – Análise de variância

AR – Açúcares redutores totais

B – Temperatura

C – concentração de ácido

CAS nº – número de registo único no banco de dados do *Chemical Abstracts Service*

CCD – *Central Composite Design*

D – Razão biomassa/líquido

DNS – Ácido dintrosalicílico

PEG 400 – *Polyethylene glycol 400*

R^2 – Coeficiente de correlação ao quadrado

r.p.m. – Rotações por minuto

RSM – *Response Surface Methodology* (Metodologia de Superfície de Resposta)

UV/Vis – Ultravioleta/visível

Introdução

O consumo de energia em todo o mundo tem vindo a aumentar continuamente no último século devido ao crescimento da população, e à industrialização de países subdesenvolvidos. O petróleo tem sido a fonte mais procurada para colmatar o aumento do consumo de energia (Sun e Cheng, 2002).

Estima-se que a produção de petróleo decresça muito até meados do séc. XXI, pelo que, a necessidade de alternativas aos combustíveis derivados do petróleo estão a ser procuradas com o objectivo de reduzir a dependência mundial dos recursos não renováveis (Gray *et al.*, 2006). A produção de biocombustíveis como energias renováveis, tais como etanol, metano e hidrogénio, a partir de biomassa proveniente dos resíduos florestais, poderá representar uma fonte alternativa aos combustíveis fósseis. Esta alternativa, além de ultrapassar o previsível esgotamento daqueles combustíveis, tem ainda a vantagem de contribuir para a redução da emissão de gases com efeito de estufa, prevenindo assim, o aquecimento global.

Actualmente o combustível renovável mais comum é o etanol, obtido a partir do grão de milho (amido) e da cana-de-açúcar (sacarose). Espera-se que estas matérias-primas atinjam os limites de abastecimento num futuro próximo (Gray *et al.*, 2006). Assim, a biomassa lenhocelulósica é vista como uma matéria-prima atractiva para a produção de etanol (Ahring *et al.*, 1996; Larsson *et al.*, 1999; McKendry, 2002a; Gray *et al.*, 2006). Os materiais lenhocelulósicos são a matéria-prima renovável mais barata e abundante, a partir da qual podem ser produzidos combustíveis, tais como o etanol, a custos relativamente baixos (Gregg *et al.*, 1998; Palmarola-Adrados *et al.*, 2005a; Demirbas 2007; Sassner *et al.*, 2008a; Sassner *et al.*, 2008b).

O material lenhocelulósico ou biomassa lenhosa é composto por polímeros de hidratos de carbono (celulose e hemiceluloses), lenhina e uma pequena parte de outros compostos (extractáveis, ácidos, sais e minerais). A celulose e hemiceluloses, que geralmente representam dois terços da massa seca, são polissacarídeos que podem ser hidrolisados em açúcares e, eventualmente, por fermentação, convertidos em etanol. A lenhina não pode ser utilizada para produção de etanol (Hamelinck *et al.*, 2005), pelo que pode ser utilizada para produção de energia térmica por combustão.

A produção de etanol a partir de resíduos agrícolas ou outros materiais lenhocelulósicos pode ser vantajosa, devido à disponibilidade da matéria-prima, e, normalmente, a preços reduzidos (Muñoz *et al.*, 2007; Cara *et al.*, 2008a). Para tirar partido dos resíduos lenhocelulósicos como fonte de energia renovável, para produção de etanol, é importante transformá-los na maior quantidade possível de açúcares fermentáveis. Isto significa que, tanto a glucose obtida a partir da fracção de celulose, como os açúcares contidos na fracção hemicelulósica, devem ser tidos em conta, porque podem contribuir para a viabilidade económica do processo global de conversão (Cara *et al.*, 2008a).

Os materiais lenhocelulósicos podem ser hidrolisados por ácidos ou enzimas. A hidrólise com ácido sulfúrico diluído é um método simples e rápido e tem sido sugerido como tendo potencial de implementação. Elevados rendimentos em etanol têm sido obtidos com a hidrólise enzimática. No entanto, a utilização actual deste método é altamente dependente do custo das enzimas necessárias (Larsson *et al.*, 1999).

Mas, actualmente um processo baseado na hidrólise enzimática e fermentação é visto, como a mais promissora alternativa para converter os hidratos de carbono dos materiais lenhocelulósicos em etanol, com altos rendimentos e baixos custos de produção (Galbe e Zacchi, 2002; Palmarola-Adrados *et al.*, 2005b; Sassner *et al.*, 2006; Cardona e Sánchez, 2007).

A eficiência da conversão da biomassa em etanol depende sobretudo das características e da composição da matéria-prima, do pré-tratamento e da tecnologia de fermentação utilizada (Cullis *et al.*, 2003; Dien *et al.*, 2006a).

A floresta portuguesa ocupa cerca de 3,3 milhões de hectares que correspondem a 38% do território nacional. O terreno agrícola ocupa aproximadamente 33% do território, sendo 23% correspondentes a áreas de incultos. O potencial de crescimento da área arborizada é de aproximadamente o dobro, caso sejam aproveitadas as áreas de incultos e improdutivos (Inventário florestal, 2001).

Assim em Portugal, a floresta pode traduzir-se numa abundante fonte de resíduos florestais, para utilização como matéria-prima na produção de biocombustíveis. A utilização destes resíduos contribuirá para a sua valorização económica, o que se poderá traduzir num incentivo à limpeza e manutenção da floresta. A aplicação de resíduos

florestais no desenvolvimento de biocombustíveis poderá ter consequências benéficas ao nível da prevenção e controlo de incêndios florestais.

O presente trabalho enquadra-se na criação de condições de valorização energética e ecológica dos resíduos florestais regionais como os arbustos, através da produção de um biocombustível que contribua para a conservação e manutenção das áreas florestais, para a diminuição das emissões de CO₂ e que futuramente possa substituir os combustíveis fósseis.

Este trabalho de investigação pretende aplicar um pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído. Assim, a biomassa será tratada com ácido sulfúrico diluído a várias temperaturas. A concentração final de ácido sulfúrico, bem como os tempos de residência serão optimizados de modo a obter os melhores resultados em hidrólise de hemiceluloses.

Os resíduos florestais para a realização deste trabalho serão submetidos a uma redução de tamanho mecanicamente de forma a aumentar a acessibilidade dos tratamentos subsequentes. Uma vez que estes equipamentos mecânicos requerem grandes consumos energéticos, nesta etapa procurar-se-á minimizar a sua utilização através da optimização do tamanho de partícula. Estes consumos energéticos podem também ser minimizados através de um pré-tratamento físico-químico efectivo nas tarefas subsequentes, não sendo necessária uma redução acentuada da partícula.

Os resíduos sólidos finamente divididos, obtidos directamente após o pré-tratamento mecânico, serão submetidos a um pré-tratamento de modo a tornar a estrutura lenhocelulósica mais adequada ao subsequente ataque enzimático e solubilizar alguns dos constituintes, particularmente as hemiceluloses. Antes do pré-tratamento, a composição química dos resíduos de biomassa será determinada recorrendo a diferentes métodos analíticos, de modo a quantificar os polissacarídeos em termos dos principais açúcares, a lenhina insolúvel, os compostos extractáveis e as cinzas.

A literatura refere diversos meios para efectuar este pré-tratamento, incluindo químicos, físicos e biológicos, sendo o pré-tratamento ácido mais amplamente usado. A eficácia deste pré-tratamento depende de um conhecimento aprofundado dos mecanismos fundamentais, químicos e físicos que ocorrem durante este processo, bem como este vai influenciar a compreensão da relação entre a composição química e a físico-química do

material lenhocelulósico sobre a digestibilidade enzimática da celulose e hemiceluloses nos passos subsequentes.

Capítulo I – Revisão Bibliográfica

1. Biomassa vegetal

A biomassa é o material vegetal derivado da reacção entre o CO_2 existente no ar, da água e da luz solar, através da fotossíntese, para produzir hidratos de carbono que formam os alicerces da biomassa. A fotossíntese converte cerca de 1% da luz solar disponível para armazenamento de energia química. A energia solar conduzida pela 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 CO_2 e água. O processo é cíclico, porque o CO_2 é disponibilizado para produzir de novo biomassa (McKendry, 2002b) como pode observar-se na Figura 1. A biomassa lenhocelulósica compreende um vasto grupo de materiais como resíduos agrícolas, florestais e alguns resíduos sólidos municipais (Esteghlalian *et al.*, 1997; del Campo *et al.*, 2006; Balat *et al.*, 2008). É considerado biomassa florestal toda a acumulação de massa vegetal que se encontra por cima do solo, como troncos, casca, ramos, folhas, da inúmera diversidade de espécies de arbustos e árvores vivas ou mortas (Hakkila, 2000).

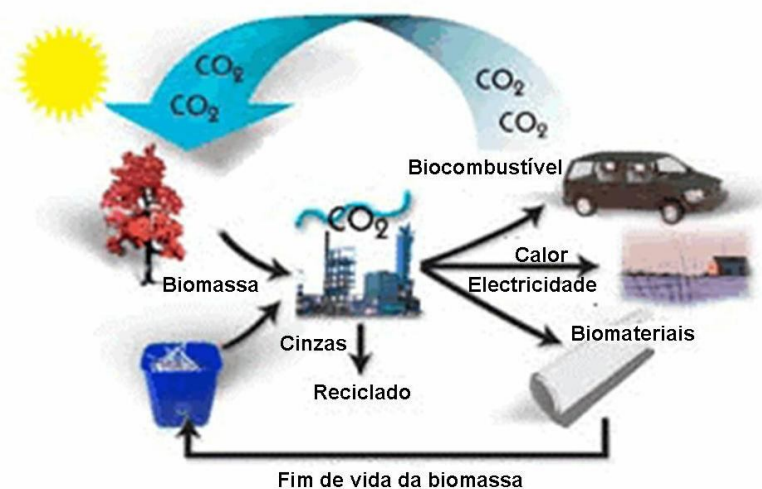


Figura 1 – Exemplificação do ciclo do carbono (adaptado de *Oak Ridge National Laboratory*, 2008).

1.1 Estrutura e forma da biomassa vegetal

Num sentido muito lato, podem considerar-se como árvores todas as plantas que possuem, incluídos no seu tronco, ramos e raízes, camadas de células envolventes que pela sua divisão repetida, fazem aumentar o seu diâmetro com o tempo (Fabião, 1987).

Um conceito mais rigoroso de árvore atribui apenas esta designação às plantas lenhosas com uma altura superior a 5m na idade adulta e um caule principal distinto, isento de ramos na parte inferior. A designação de arbusto aplica-se a plantas lenhosas com uma altura inferior a 5m e um caule geralmente muito ramificado desde a base. Devido à grande diversidade de tamanhos que pode ocorrer entre espécies e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie, as árvores podem ser classificadas, quanto às dimensões, tanto de uma forma absoluta como em relação às árvores que as rodeiam (Fabião, 1987).

O emprego 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).

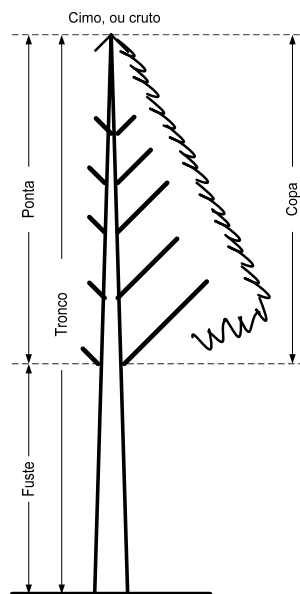


Figura 2 – Exemplificação das designações utilizadas para as principais partes componentes das árvores (adaptado de Fabião 1987).

1.1.1 Caracterização anatômica e morfológica da biomassa vegetal

1.1.1.1 Caracterização anatômica

A madeira, com uma estrutura celular diversificada, apresenta um conjunto de propriedades que a tornam especialmente apta para uma vasta gama de usos, independentemente da sua origem botânica. 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).

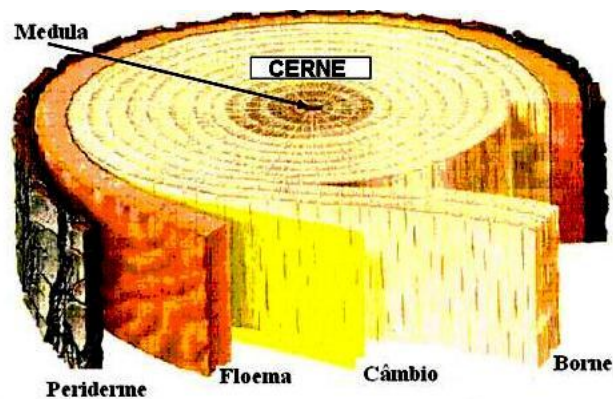


Figura 3 – Secção transversal do tronco de uma árvore adulta (adaptado de Koga, 1988).

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 substâncias nela dissolvidas, armazenamento e 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 inactivo de espessura variável consoante a espécie. Esta assegura a protecção da árvore contra agressões exteriores (climáticas, biológicas ou mecânicas) (Koga, 1988).

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

1.1.1.2 Caracterização morfológica

No xilema, tecido que ocupa a maior parte do tronco, podemos encontrar diferentes tipos de células, que se podem dividir, consoante a sua função, em três tipos (Esau, 1977):

➤ Células condutoras, onde os elementos de vaso e os traqueídeos são as principais células condutoras de água e substâncias nela dissolvidas. Este tipo de células 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” 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.

1.2 Caracterização química e principais reacções dos componentes da madeira

A madeira é um biocompósito natural muito complexo, altamente organizado a nível celular e molecular. É quimicamente composta por componentes macromoleculares e pequenas quantidades de componentes de baixo peso molecular. Apresenta cerca de 20-30 % de lenhina, 65-80 % de polissacarídeos (dos quais 40-50 % são celulose e 20-35 % são hemiceluloses) e outras substâncias de baixo peso molecular (1-3 %), representadas essencialmente por extractáveis e por compostos minerais presentes em pequenas quantidades (menos que 1%) (Sjöström, 1981). As quantidades relativas dos componentes variam mediante a espécie, a idade, a localização geográfica, a localização na floresta e mesmo ao longo da própria árvore, quer na direcção longitudinal quer na direcção transversal (Pereira, 1988).

1.2.1 Celulose

1.2.1.1 Caracterização da celulose

A celulose é o principal componente da parede celular da fibra, e corresponde a um polissacarídeo constituído por um só tipo de unidade de açúcar, com cadeias moleculares demasiadamente longas para serem solúveis à temperatura ambiente em água ou mesmo em meios ligeiramente ácidos ou alcalinos (Lapointe, 1997).

A celulose é um homopolímero linear constituído por unidades repetidas de celobiose, dímero de β -D-anidroglicopiranoose, ligadas entre si por ligações glicosídicas β -(1-4). As suas cadeias apresentam entre 5000 a 10000 unidades de glucose. A Figura 4 mostra a cadeia principal da celulose.

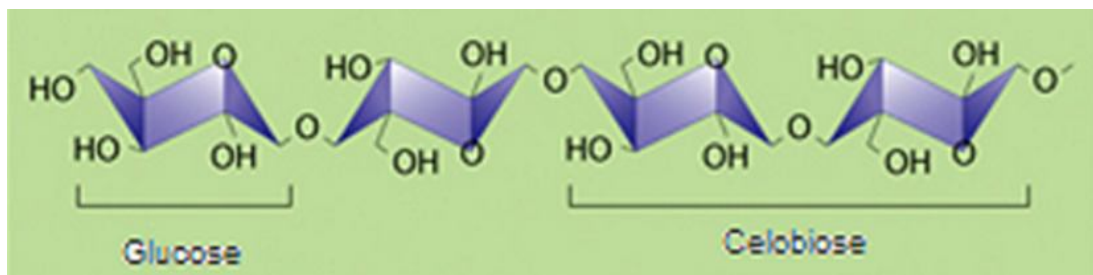


Figura 4 – Representação da cadeia principal da estrutura de celulose (adaptado de *Office of Biological and Environmental Research*, 2008).

A celulose encontra-se ligada estruturalmente às hemiceluloses e à lenhina, não sendo facilmente acessível (Ahring *et al.*, 1996; Biermann, 1996). Fisicamente, a celulose é um material sólido e branco que existe no estado amorfo-cristalino. A forma cristalina é extremamente resistente ao ataque químico e à degradação microbiana enquanto que a forma amorfa é primeiramente atacada e degradada (Biermann, 1996; Eriksson, 2002).

As moléculas de celulose são lineares e ligam-se umas às outras por pontes de hidrogénio inter-moleculares entre os grupos hidroxilos livres, formando fibrilas elementares. 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 inter-moleculares, 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 Fareel, 1987).

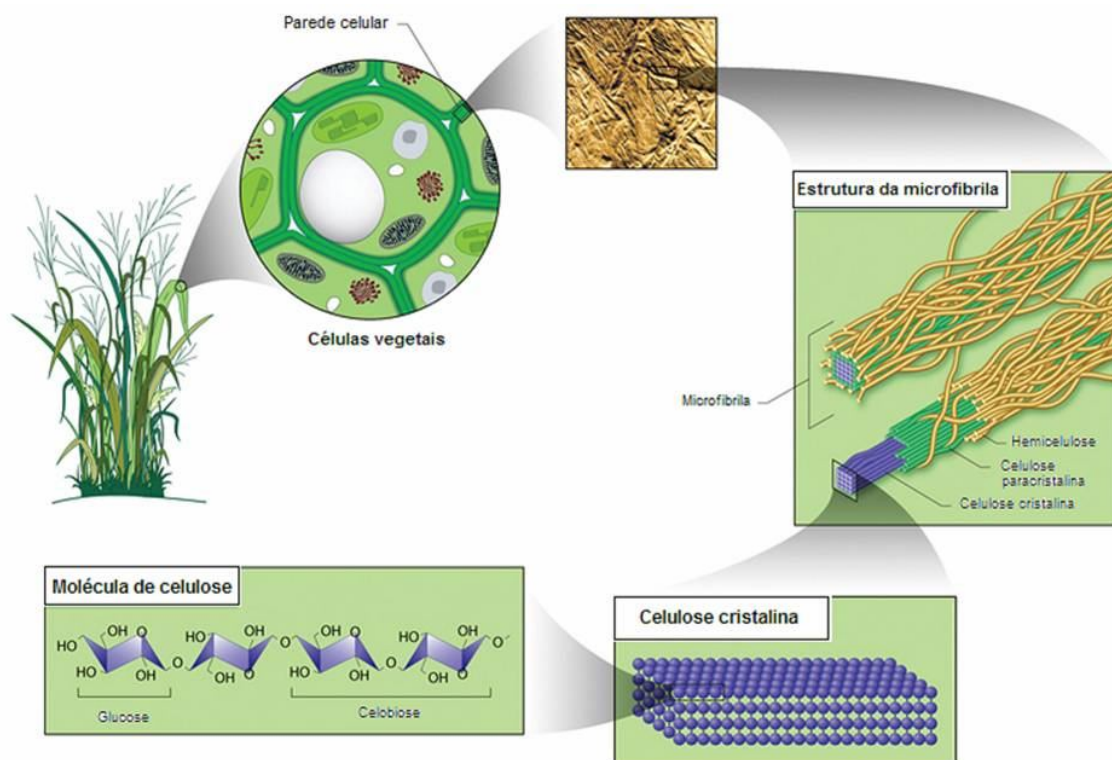


Figura 5 – Ultraestrutura da parede celular (adaptado de *Office of Biological and Environmental Research*, 2008).

1.2.1.2 Degradação da celulose

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, oxidados a grupos carboxílicos ou, quando em meio alcalino rearranjados formando grupos terminais álcool ou carboxílicos (McDonald, 1969; Casey, 1980).

Os principais meios de degradação da celulose podem ser agrupados em (Casey, 1980; D'Almeida, 1981):

- Degradação hidrolítica
- Degradação oxidativa
- Degradação microbológica

1.2.1.2.1 Degradação hidrolítica

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).

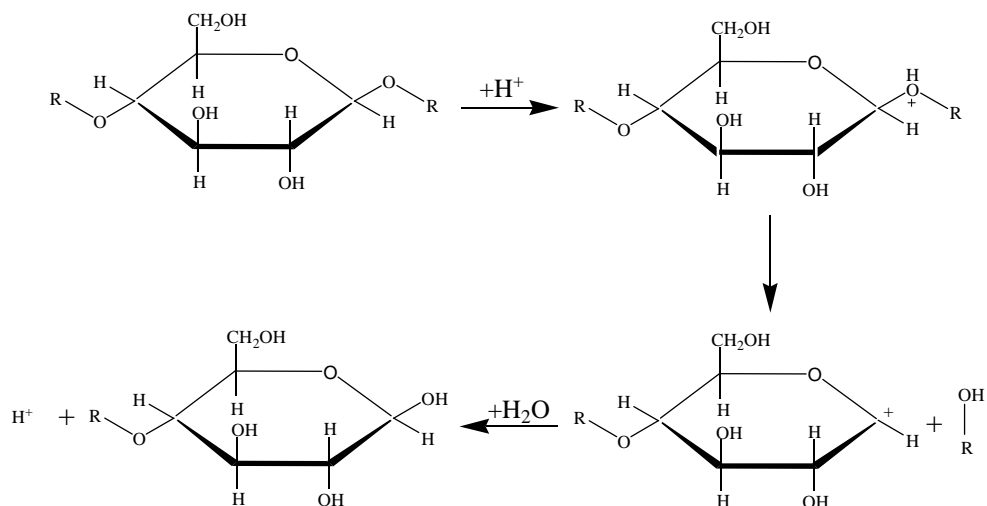


Figura 6 – Hidrólise ácida da celulose (adaptado de D'Almeida, 1981).

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, 1997).

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 cerca dos 100°C e acentua-se até aos 130°C, decrescendo posteriormente até praticamente se extinguir competindo directamente com a reacção de *stopping* que ocorre impedindo a continuação da degradação. Para temperaturas superiores a 150°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).

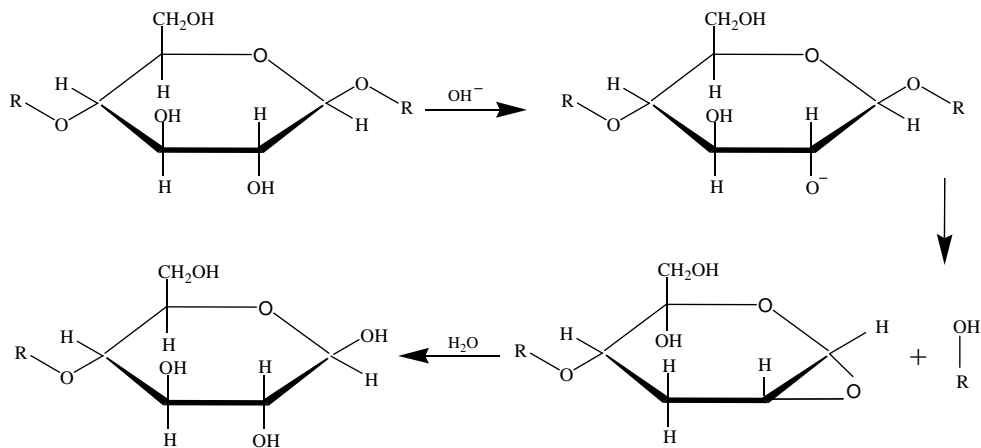


Figura 7 – Hidrólise alcalina da celulose a temperaturas superiores a 150°C (adaptado de Fengel e Wegener, 1989).

1.2.1.2.2 Degradação oxidativa

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 glucosídicas

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 Wengener, 1984).

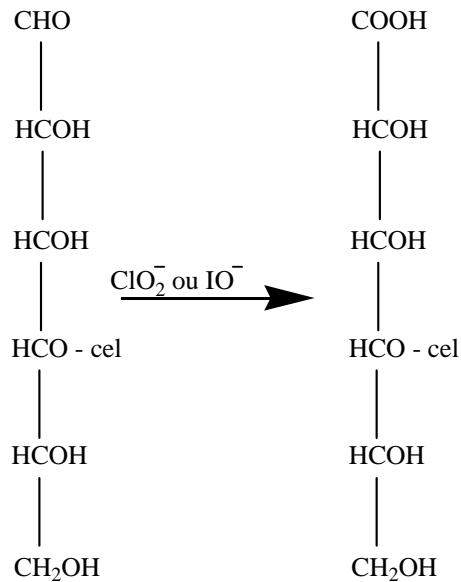


Figura 8 – Oxidação com os iões hipiodito e hipoclorito (adaptado de D’Almeida, 1981).

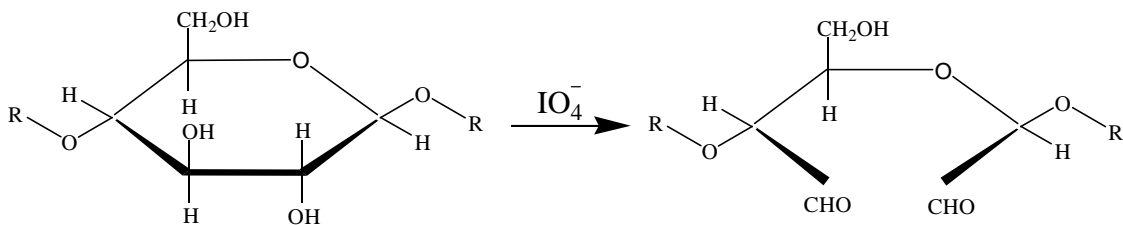


Figura 9 – Oxidação com o ião periodato (adaptado de Fengel e Wegener, 1989).

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 dióxido de cloro e o oxigénio molecular também são oxidantes não específicos mas o primeiro tem muito pouca reactividade com a celulose e o segundo necessita de meios muito alcalinos para que ocorra oxidação (D´Almeida, 1981).

1.2.1.2.3 Degradação microbiológica

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

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 (Dumitru, 1998).

A degradação provocada pelas enzimas é bastante semelhante à hidrolítica, no entanto, na 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).

1.2.2 Hemiceluloses

1.2.2.1 Caracterização das hemiceluloses

As hemiceluloses são um grupo misto de polissacarídeos não celulósicos lineares e/ou ramificados que compreende dois grandes grupos: pentosanas e hexosanas (Fengel e Wegener, 1989; Chandra *et al.*, 2007). As pentosanas são constituídas por unidades de pentoses (D-xilose, L-arabinose) e as hexosanas são constituídas por unidades de hexoses (D-glucose, D-galactose, D-manose) (Figura 10). Também apresentam pequenas quantidades de desoxioses e ácidos urónicos: ácido D-glucurónico, ácido 4-O-metil-D-glucurónico e ácido D-galacturónico e desoxioses (Fengel e Wegener, 1989).

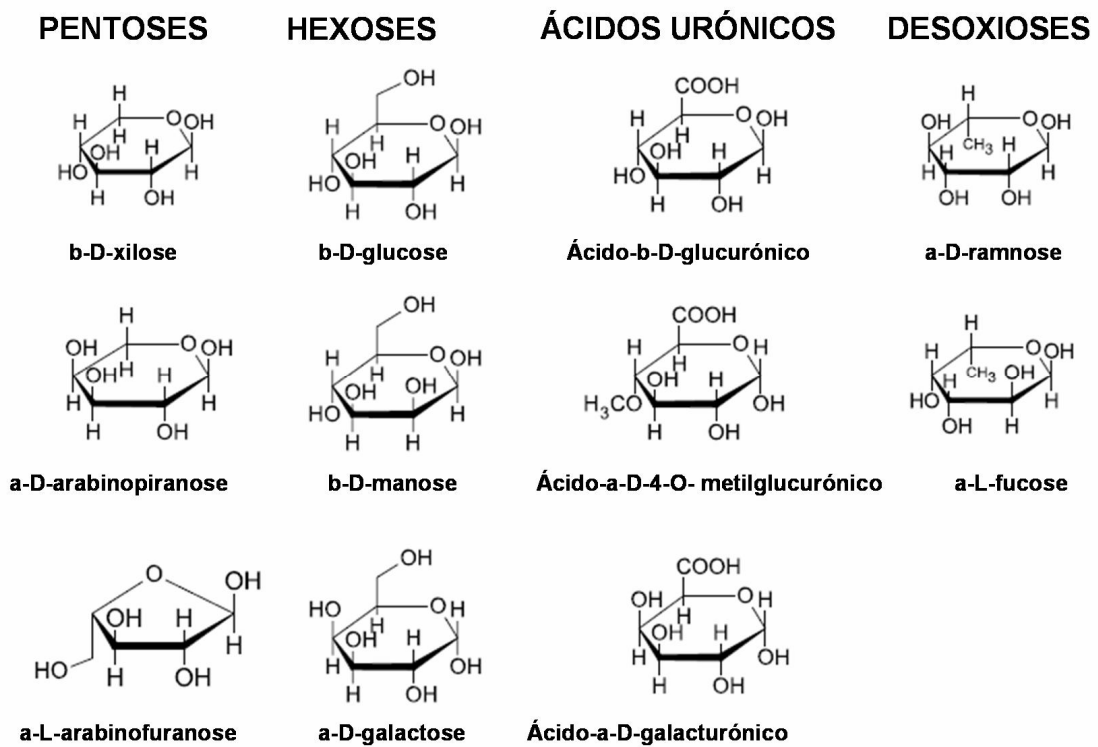


Figura 10 – Principais açúcares constituintes das hemiceluloses (adaptado de Fengel e Wegener, 1984).

Os monossacarídeos encontram-se ligados uns aos outros essencialmente por ligações glucosídicas β -(1-4), mas também se podem encontrar ligações glucosídicas β -(1-3), β -(1-6), α -(1-2), α -(1-3), α -(1-6). As hemiceluloses e a lenhina estabelecem entre si ligações covalentes. Devido ao baixo grau de polimerização (em média 200) e a sua

natureza amorfa, as hemiceluloses são mais facilmente degradadas do que a celulose. Apesar disso, ainda é necessário um sistema enzimático complexo para a sua degradação, devido à sua estrutura variável e ramificada (Sjöström, 1981).

Tal como a celulose, a principal função das hemiceluloses é conferir resistência à parede celular, actuando como matriz de suporte para as microfibrilhas de celulose (Kirk e Fareel, 1987). Fisicamente, são um material sólido e branco, raramente cristalino ou fibroso. A sua estrutura varia de acordo com o tipo de madeira. Nas madeiras de resinosas, as hemiceluloses consistem principalmente em glucomananas, galactoglucomananas e arabinanas enquanto que nas madeiras folhosas consistem em glucuronoxilanas e pequenas quantidades de glucomananas.

1.2.2.2 Degradação das hemiceluloses

As hemiceluloses são estruturalmente semelhantes à celulose, logo o tipo de reacções sofridas também é semelhante, no entanto existem diferenças importantes entre as suas reactividades, devido muito mais à sua estrutura física que química (D'Almeida, 1981; Fengel e Wegener, 1989).

Como já foi referido anteriormente as hemiceluloses contrariamente à celulose são essencialmente amorfas, o que facilita grandemente a acessibilidade aos agentes químicos. No entanto, algumas hemiceluloses podem perder alguns substituintes da sua cadeia e sofrer cristalização induzida, com formação de fortes ligações por ponte de hidrogénio entre os grupos hidroxílicos de cadeias adjacentes. Desta forma, ocorre a formação de um retículo cristalino, que dificulta o acesso dos agentes químicos e, conseqüentemente as reacções químicas (Sjöström, 1981; Fengel e Wegener, 1989).

1.2.3 Lenhina

1.2.3.1 Caracterização da lenhina

A lenhina é o segundo maior componente celular da madeira encontrando-se ligada covalentemente com as hemiceluloses e com a celulose, conferindo firmeza e rigidez à parede celular e consequentemente às plantas mantendo-as verticais. A lenhina também promove hidrofobicidade ao sistema vascular, necessária para o transporte de água e sais minerais (Vanholme *et al.*, 2008). É um polímero de estrutura amorfa, aromática, altamente ramificada e insolúvel em água. Apresenta-se na forma de uma rede tridimensional com ligações cruzadas (Sjöström, 1981).

A lenhina é um heteropolímero natural, com elevada massa molecular (600-10000 kDa), não estereoregular, com estrutura entrecruzada e formado por unidades de álcoois derivados do 1-fenilpropano, apresentando ligações alquilo-arilo, arilo-arilo e alquilo-alquilo. Durante tratamentos químicos, a sua remoção permite que as fibras de celulose e hemiceluloses sejam separadas facilmente (Kirk e Cullen, 1998). A heterogeneidade da lenhina deriva da composição química do polímero, tamanho, ligações e grupos funcionais. As diferenças existentes na composição molecular e no tipo de ligação entre os monómeros de fenilpropano devem-se essencialmente aos seus álcoois precursores (Bonini *et al.*, 2008).

Os três precursores essenciais da lenhina são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Kuhad *et al.*, 1997), os quais formam respectivamente as sub-unidades *p*-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) e siringilo (S) que compõem a lenhina (Kirk e Fareel, 1987; Boudet *et al.*, 1995). Estes precursores são formados a partir da glucose por uma variedade de reacções enzimáticas que envolvem oxidações, reduções, aminações, descarboxilação entre outras. A Figura 11 ilustra os principais álcoois precursores da lenhina. A lenhina de madeiras resinosas (*softwoods*) é constituída principalmente por unidades G, enquanto que as folhosas (*hardwoods*) por G e S. As lenhinas das monocotildóneas (gramíneas) possuem níveis mais elevados de (H) (Sjöström, 1981; Fengel e Wegener, 1989).

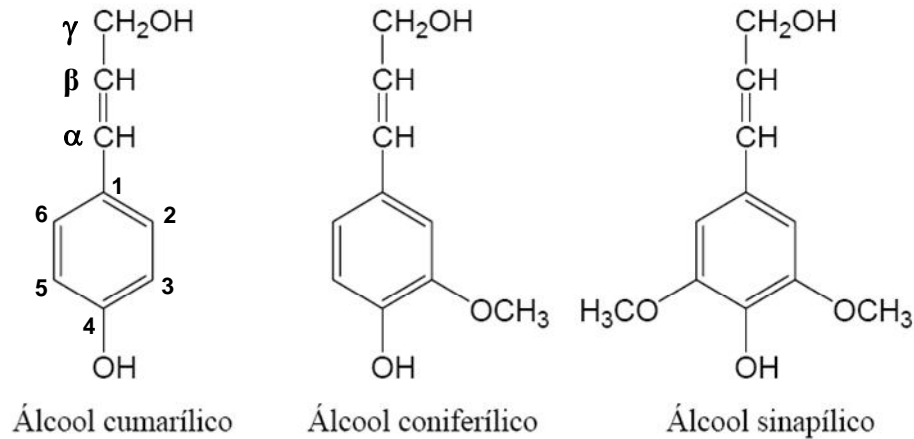


Figura 11 – Álcóois precursores da lenhina (Adaptado de Biermann, 1996).

Mais de dois terços das unidades de fenilpropano na lenhina encontram-se ligadas por ligações éter C-O-C e as unidades restantes por ligações carbono-carbono C-C (Figura 12) (Fang *et al.*, 2008). Estas ligações explicam as fortes condições necessárias para a despolimerização da lenhina e a incapacidade de originar a reversão para monómeros (Sjöström, 1981).

Os grupos funcionais da lenhina com maior influência sobre a sua reactividade são os grupos carbonílicos, grupos hidroxílicos fenólicos e grupos metoxílicos (Sjöström, 1981).

A composição da lenhina é diferente não só entre plantas de origens genéticas diferentes mas mesmo entre plantas da mesma espécie esta varia de acordo com o conteúdo de unidades de siringilo, guaiacilo e *p*-hidroxifenilo, podendo ser classificadas em várias classes de acordo com os seus elementos estruturais (Bonini *et al.*, 2008). A lenhina está covalentemente associada às hemiceluloses, na parede celular. As mais importantes são as ligações éter entre o carbono benzílico da lenhina e uma das partes do hidrato de carbono e as ligações éster entre o carbono benzílico da lenhina e os resíduos de ácidos urónicos (Sjöström, 1981).

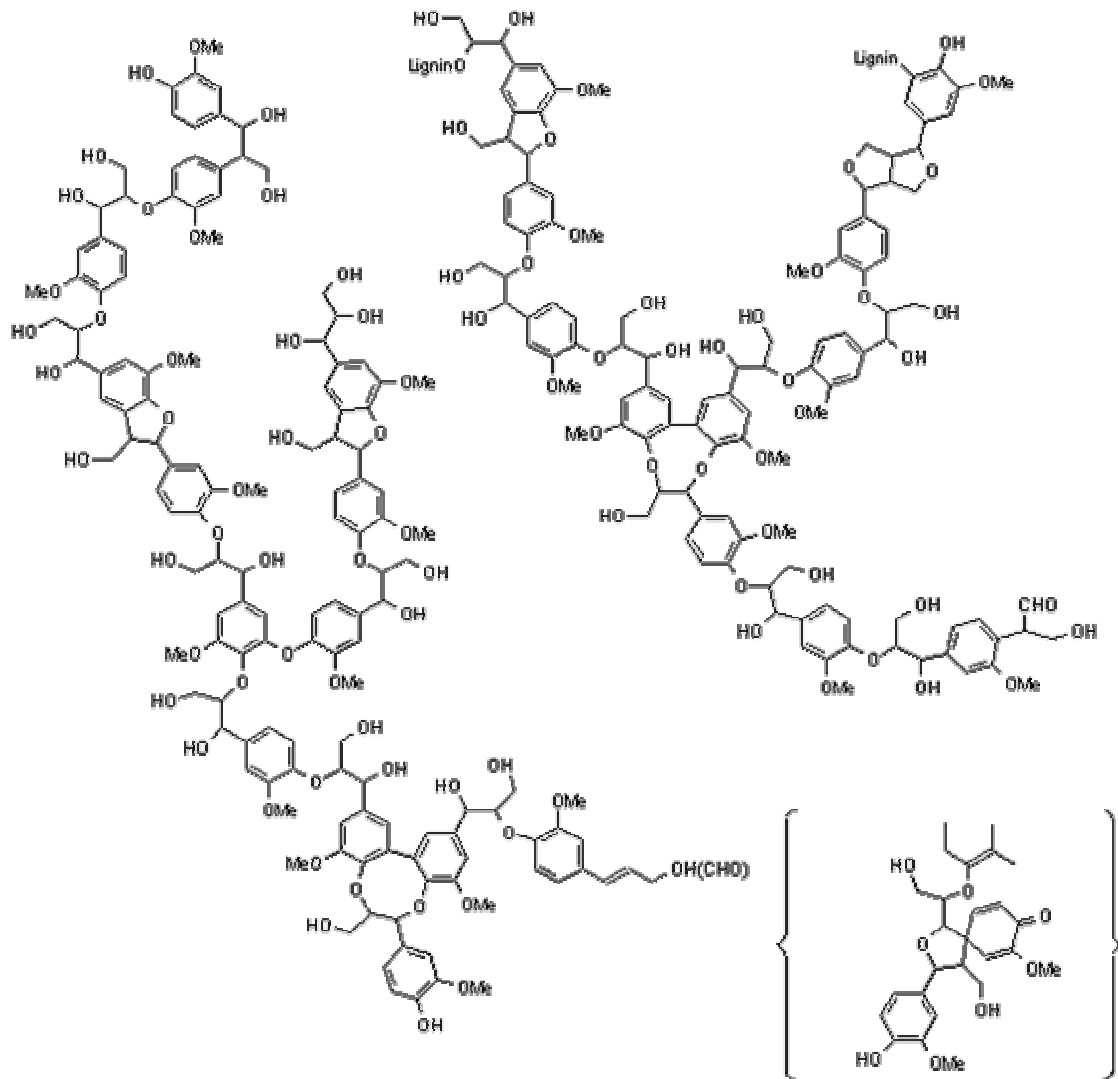


Figura 12 – Estrutura proposta para uma lenhina de uma resinosa (Brunow, 1998).

1.2.3.2 Reacções da lenhina

As reacções da lenhina são processos muito complexos, pois trata-se de um polímero de elevada massa molecular, que se encontra ligado aos polissacarídeos e que não possui grupos hidrofílicos suficientes para ser facilmente solubilizada. Assim, considerando que o polímero da lenhina é grande e altamente ramificado, deduz-se que os mecanismos lenhínicos devam ser extracelulares.

1.2.3.2.1 Hidrólise ácida

A presença de ácido por si só não tem um efeito significativo sobre a lenhina, este efeito é significativo quando o ácido é combinado com outros agentes (Sjöström, 1981).

O ácido por si só pode causar a hidrólise da lenhina, mas normalmente não a solubiliza, sendo que em algumas espécies de folhosas são dissolvidas algumas fracções de lenhina de baixa massa molecular (Sjöström, 1981).

1.2.3.2.2 Hidrólise alcalina

A lenhina quando sujeita a temperaturas elevadas ($> 160^{\circ}\text{C}$) em meio alcalino sofre uma série de reacções que a solubilizam. Pois estas reacções são principalmente de 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).

1.2.3.2.3 Condensação

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

1.2.3.2.4 Oxidação

A lenhina é bastante susceptível de oxidação, reagindo de acordo com as condições e os agentes oxidantes utilizados, 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).

1.2.4 Extractáveis

Para além dos componentes macromoleculares presentes na madeira, existe ainda uma grande variedade de componentes de baixo peso molecular solúveis em solventes orgânicos ou água. Estes componentes denominam-se genericamente por extractáveis. Estes representam apenas uma pequena fracção, sendo normalmente inferior a 10% do peso seco da madeira (Sjöström, 1981).

Estes componentes localizam-se essencialmente no lúmen das células e nas superfícies da parede celular. O seu teor e composição dependem, à semelhança dos compostos macromoleculares, de factores como a espécie, a proveniência, a idade e a localização na árvore (Sjöström, 1981; Fengel e Wegener, 1989).

Os extractáveis são agrupados em classes, tendo em conta a sua polaridade e estrutura química. Assim de acordo com a sua polaridade estes podem ser divididos em duas fracções, lipofílica e hidrofílica. Os compostos lipofílicos são solúveis em solventes orgânicos apolares e insolúveis em água. De acordo com as suas características estruturais e dentro das duas fracções podem-se identificar as seguintes famílias de compostos (Sjöström, 1981).

➤ Fracção lipofílica {
- Terpenos e Terpenóides
- Lípidos

➤ Fracção hidrofílica {
- Compostos Fenólicos

1.2.4.1 Fracção lipofílica

1.2.4.1.1 Terpenos e terpenóides

A denominação terpenos agrupa um largo número de compostos existentes nas plantas e no reino animal. A característica química comum dos terpenos é a unidade base de isopreno (2-metilbutadieno). De acordo com o número de unidades isoprénicas ligadas entre si, os terpenos são divididos nas seguintes sub-classes: monoterpenos (2 unidades), sesquiterpenos (3 unidades), diterpenos (4 unidades) e triterpenos (6 unidades). Os terpenos são hidrocarbonetos puros, os terpenóides são terpenos contendo grupos oxigenados, tais como, álcoois, ácidos carboxílicos, aldeídos e cetonas (Fengel e Wegener, 1989).

Na madeira, os terpenóides mais abundantes são os mono-, di-, tri-terpenóides. Estes encontram-se normalmente nas células de parênquima das resinosas e sobretudo das folhosas. Os triterpenóides mais vulgares são as estruturas tetracíclicas possuindo um grupo hidroxilo na posição C3, sendo estes compostos designados por fitoesteróis, na Figura 13, apresentam-se exemplos destes compostos, sendo mais abundante o β -sitosterol.

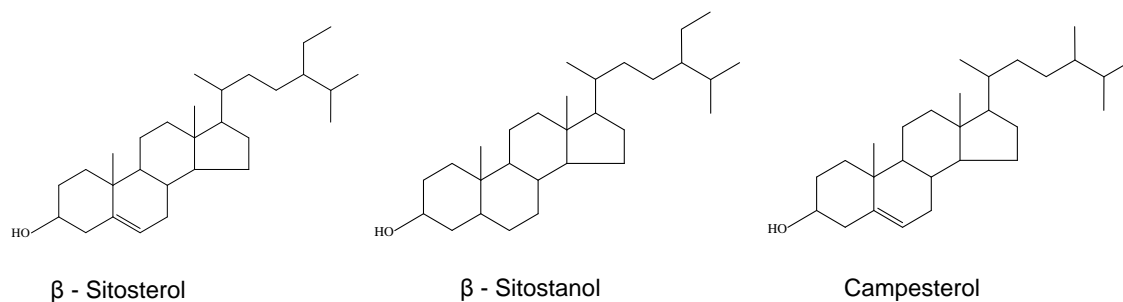


Figura 13 – Exemplos de triterpenóides (esteróis) encontrados na madeira (adaptado de Sjöström, 1981).

1.2.4.1.2 Lípidos

Os lípidos são os principais constituintes do material lipofílico presente nas células de parênquima. Os lípidos são constituídos por cadeias de comprimento variável de

hidrocarbonetos, com um número variável de insaturações. Existe uma variedade muito grande de compostos alifáticos presentes na madeira (Tabela 1).

Tabela 1 – Compostos alifáticos existentes na madeira (Sjöström, 1981).

Grupo	Estrutura	
n-alcanos	$\text{H}_3\text{C} \text{---} (\text{CH}_2)_n \text{---} \text{CH}_3$	n = 8-30
Álcoois gordos	$\text{H}_3\text{C} \text{---} (\text{CH}_2)_n \text{---} \text{CH}_2\text{OH}$	n = 16-22
Ácidos gordos	$\text{H}_3\text{C} \text{---} (\text{CH}_2)_n \text{---} \text{COOH}$	n = 10-24
Gorduras (ésteres de glicerol)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \text{---} \text{OR} \\ \\ \text{CH} \text{---} \text{OR}' \\ \\ \text{CH}_2 \text{---} \text{OR}'' \end{array}$	R, R' e R'' podem ser resíduos de ácidos gordos (alquil - CO-) ou átomos de hidrogénio (mono-, di- e triglicerídeos)
Ceras (ésteres de outros álcoois)	$\text{RO} \text{---} (\text{CH}_2)_n \text{---} \text{CH}_3$	R são resíduos de ácidos gordos
	$\text{RO} \text{---} \text{esteróide}$	
	$\text{RO} \text{---} \text{alcoól terpénico}$	

1.2.4.2 Fracção hidrofílica

1.2.4.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos constituem uma classe heterogénea de compostos que contêm na sua estrutura anéis aromáticos com grupos OH, derivados da estrutura fenil-propano. Estes encontram-se principalmente no lenho juvenil e na casca da madeira. Existem várias classes de compostos fenólicos (Sjöström, 1981):

- Lenhanos: compostos formados pela condensação de duas unidades de fenil-propano.
- Estilbenos: possuem uma dupla ligação conjugada e são muito reactivos. Estes compostos podem condensar com a lenhina sob determinadas condições termo-químicas.

- Flavonóides: são polifenóis com um esqueleto carbonado característico.
- Taninos: estão presentes em pequenas frações e são estruturalmente similares à lenhina, competindo com ela em algumas reacções químicas.
- Tropolonas: são anéis insaturados de sete membros. Formam complexos fortes com iões metálicos.

Na Figura 14 representam-se estruturas típicas de alguns compostos fenólicos simples.

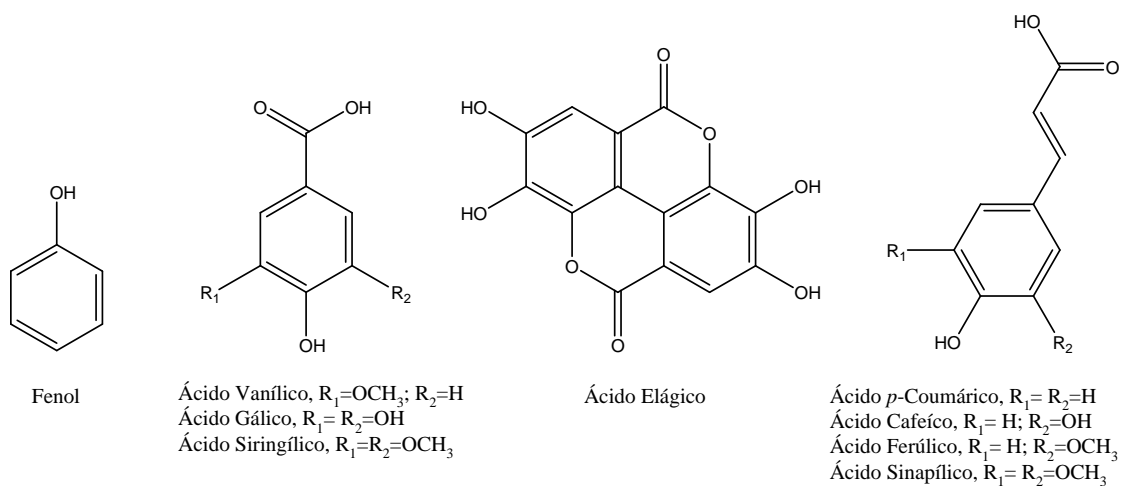


Figura 14 – Exemplos de compostos fenólicos e ácidos fenólicos presentes na madeira (Sjöström, 1981).

Os compostos fenólicos têm propriedades fungicidas e, deste modo, protegem eficazmente as árvores dos ataques microbiológicos. Estes compostos contribuem, ainda, para a cor natural da madeira (Sjöström, 1981).

1.2.5 Compostos inorgânicos

O teor de inorgânicos é usualmente referido como teor de cinzas, que é aproximadamente a quantidade de sais minerais e outras matérias inorgânicas presentes na madeira depois da combustão a uma temperatura de $575 \pm 25^\circ\text{C}$. Na maioria dos casos as quantidades de componentes inorgânicos não excedem 1% do peso em madeira. O conteúdo de inorgânicos é mais elevado em vegetais que contenham uma elevada

quantidade de sílica. Esta pequena quantidade de material inorgânico contém uma grande diversidade de elementos. Os elementos Ca, Mg e K são os principais componentes representando aproximadamente 80%. Estes elementos provavelmente existem na madeira sob a forma de oxalatos, carbonatos e sulfatos ligados aos grupos carboxílicos. Outros elementos presentes são 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. A maior parte destes componentes são essenciais ao crescimento da madeira. O teor de cinzas varia de acordo com a posição considerada na árvore, raízes, madeira, casca e folhas, dependendo também da espécie assim como das condições ambientais do local onde a árvore se desenvolveu (Rowell *et al.*, 2005).

1.3 Caracterização química dos componentes da casca

A casca é um tecido complexo composto por duas zonas principais: a zona externa e interna da casca. A zona externa, que é algumas vezes referida como ritidoma também é conhecida por periderme, é formada por três camadas. A sua espessura varia muito, entre si, entre espécies e com a idade da casca. A parte interna da casca, que é referida como floema, possui uma estrutura muito complexa e é composta por vários tipos de células (Rowell *et al.*, 2005).

A composição química da casca é muito complexa e varia entre espécies e dentro de uma mesma espécie, variando também entre as camadas interna e externa da casca. Os principais constituintes químicos da casca são: celulose, hemiceluloses, lenhina e extractáveis (Rowell *et al.*, 2005).

1.3.1 Celulose

A quantidade de celulose na casca encontra-se entre os 16-41% dependendo do método de extracção. Elevados conteúdos de extractáveis, especialmente suberina, requerem

condições severas para o isolamento da celulose. Nestas condições a quantidade de celulose é geralmente mais elevada e esta degrada-se durante o processo de isolamento. A parte externa da casca geralmente contém menos celulose que a parte interna (Rowell *et al.*, 2005).

1.3.2 Hemiceluloses

O teor de hemiceluloses varia muito para diferentes cascas. As principais hemiceluloses na casca das coníferas são as galactoglucomananas. As arabino-4-O-metilglucoronoxilanas são as principais hemiceluloses constituintes da casca das folhosas. Na generalidade xilanas e glucomananas da casca são similares com as que se encontram na madeira. Outras hemiceluloses que foram isoladas da casca incluem as 4-O-metilglucoronoxilanas, glucomananas, O-acetil-galactoglucomananas e O-acetil-4-O-metilglucoronoxilanas (Rowell *et al.*, 2005).

Em muitos casos as hemiceluloses encontradas na casca são similares com as encontradas na madeira, com as mesmas variações de composição (Rowell *et al.*, 2005).

1.3.3 Lenhina

Como no caso de outras análises envolvendo os componentes da casca, os valores apresentados na literatura para o conteúdo de lenhina podem variar dependendo dos métodos de extracção. A casca contém elevadas quantidades de taninos condensados e hidrolisáveis entre outros componentes, que podem induzir a valores elevados de lenhina sendo estes falsos (Rowell *et al.*, 2005).

A composição elementar e os grupos funcionais contidos na lenhina da casca são em tudo semelhantes aos encontrados na lenhina da madeira para as mesmas espécies. Existe menos lenhina na camada interna comparada com a camada externa (Rowell *et al.*, 2005).

1.3.4 Extractáveis

Os extractáveis que se encontram na casca podem ser terpenos, e compostos fenólicos, como flavonoides e taninos. Os monoterpenos mais comuns são os α - e β -pinenos encontrados nos abetos e pinheiros (Rowell *et al.*, 2005).

Os taninos hidrolisáveis e os condensados são a maior quantidade de extractáveis da casca, os primeiros são essencialmente ésteres de ácidos carboxílicos e açúcares, os condensados são um grupo de polímeros (Rowell *et al.*, 2005).

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

A biomassa lenhocelulósica pode ser convertida em etanol por hidrólise química ou enzimática e subsequente fermentação (Iranmahboob *et al.*, 2002; Demirbas 2007). Os principais processos de hidrólise de materiais lenhocelulósicos que produzem açúcares capazes de produzir etanol são: ácido, alcalino, térmico e enzimático (Iranmahboob *et al.*, 2002; Balat *et al.*, 2008). Na hidrólise a fracção celulósica e hemicelulósica da biomassa é convertida em açúcares, e na fermentação estes açúcares são convertidos em etanol (Hamelinck *et al.*, 2005).

A principal vantagem da hidrólise com ácido diluído, é o consumo relativamente baixo de ácido (Iranmahboob *et al.*, 2002; Galbe e Zacchi, 2002). Contudo são necessárias temperaturas elevadas para que a razão de conversão de celulose em glucose seja aceitável. Além disso, elevadas temperaturas aumentam a degradação dos açúcares das hemiceluloses e a corrosão dos equipamentos (Galbe e Zacchi, 2002; Dien *et al.*, 2006b; Teramoto *et al.*, 2008). Os açúcares podem ser degradados formando-se furfural a partir das pentoses e 5-hidroximetilfurfural (5 -HMF), a partir das hexoses (Larsson *et al.*, 1999). Estes produtos de degradação causam inibição no estágio de fermentação (Galbe e Zacchi, 2002; Cara *et al.*, 2008a; Teramoto *et al.*, 2008).

Um dos principais problemas associados à hidrólise de biomassa com ácido diluído é a má fermentabilidade dos hidrolisados produzidos. (Larsson *et al.*, 1999). Nos hidrolisados, a concentração de açúcares, bem como a concentração de subprodutos da hidrólise, dependem das condições de hidrólise (Larsson *et al.*, 1999).

A estrutura resistente da biomassa lenhocelulósica torna a hidrólise enzimática difícil (Esteghlalian *et al.*, 1997; Gray *et al.*, 2006; Öhgren *et al.*, 2007). Uma forma de minimizar a resistência da matriz lenhocelulósica ao ataque enzimático, é efectuar um pré-tratamento ao material, para melhorar a acessibilidade das enzimas ao substrato (Balat *et al.*, 2008; Sassner *et al.*, 2008a; Sassner *et al.*, 2008b). O pré-tratamento é reconhecido do ponto de vista económico, como o passo fundamental no processo da bio-conversão (Teramoto *et al.*, 2007; Cara *et al.*, 2008a). Este pré-tratamento além de remover uma parte da lenhina e hemiceluloses, reduz a cristalinidade da celulose e aumenta a porosidade dos materiais (Figura 15) (Sun e Cheng, 2005; Cara *et al.*, 2008a; Sánchez *et al.*, 2008), tornando a celulose mais acessível às enzimas (Mosier *et al.*, 2005).

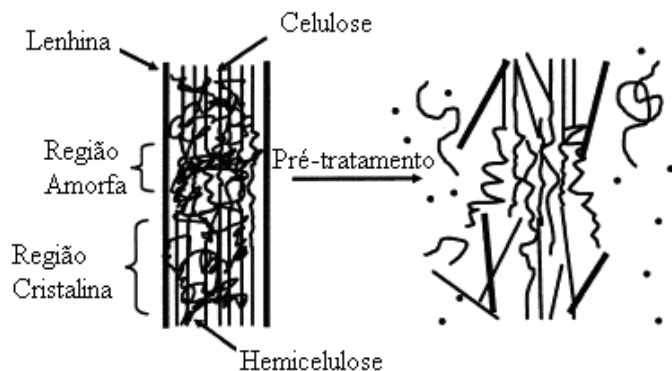


Figura 15 – Representação esquemática das alterações efectuadas durante o pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica, diminuição da cristalinidade e aumento da porosidade (adaptado de Mosier *et al.*, 2005).

O pré-tratamento de qualquer tipo de biomassa é crucial antes do processo de sacarificação enzimático (Saha *et al.*, 2005). O pré-tratamento tem de melhorar a libertação de açúcares (tanto a partir da celulose como das hemiceluloses), alterando a sua composição química e estrutural, facilitando, de forma rápida e eficiente, a hidrólise

dos polissacarídeos (Silverstein *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, tem que se evitar o mais possível a degradação destes compostos, com conseqüente formação de subprodutos que podem inibir os processos biológicos de hidrólise e fermentação (Öhgren *et al.*, 2007; Cara *et al.*, 2008a).

Dependendo das condições operacionais, a solubilização dos açúcares das hemiceluloses, como conseqüência do pré-tratamento, pode seguir regimes de reacção que conduzem à formação de produtos de degradação, tais como o furfural, o hidroximetilfurfural (HMF) (Canettieri *et al.*, 2007) e vários ácidos orgânicos (Cara *et al.*, 2008a). Alguns destes compostos, como a lenhina e outros compostos decorrentes da degradação, têm sido descritos como potenciais inibidores do crescimento de microorganismos, afectando o rendimento em etanol, no passo de fermentação (del Campo *et al.*, 2006; Teramoto *et al.*, 2007; Cara *et al.*, 2008a).

Vários métodos de pré-tratamento podem ser utilizados para facilitar a hidrólise enzimática do material lenhocelulósico (Öhgren *et al.*, 2007). Pré-tratamentos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos têm vindo a ser desenvolvidos para promover a acessibilidade das enzimas aos materiais celulósicos (Sun e Cheng, 2002).

A selecção do tipo de pré-tratamento é, possivelmente, o factor mais importante na economia do processo de produção de etanol, porque influencia o tratamento dos resíduos, a razão de conversão da celulose e a hidrólise dos açúcares das hemiceluloses e subseqüente fermentação (Foyle *et al.*, 2007). Um pré-tratamento eficiente deve satisfazer os seguintes requisitos: fomentar a produção de açúcares (Sun e Cheng, 2002), aumentar a acessibilidade da celulose à hidrólise enzimática (Palmarola-Adrados *et al.*, 2005b; Hamelinck e Faaij, 2006; Sassner *et al.*, 2006), promover a degradação com o mínimo de perda de açúcares, evitar a formação de produtos inibidores da hidrólise e minimizar a dificuldade do processo de fermentação (Sun e Cheng, 2002).

De todos os métodos de pré-tratamento, são especialmente relevantes os economicamente mais atractivos e menos agressivos a nível ambiental, tais como os que utilizam ácidos, alcalis, ozono ou vapor (Iranmahboob *et al.*, 2002).

2.1 Pré-tratamento ácido

O pré-tratamento ácido envolve a utilização de ácido sulfúrico, nítrico, acético ou clorídrico dependendo da matéria-prima (Herrera *et al.*, 2004; Silverstein *et al.*, 2007). Ácidos concentrados como o sulfúrico e o clorídrico foram usados para tratar materiais lenhocelulósicos. Apesar de serem poderosos agentes hidrolíticos da celulose, os ácidos concentrados são tóxicos, corrosivos e perigosos (Sun e Cheng, 2002). Para que este tratamento fosse viável economicamente, o ácido concentrado teria que ser recuperado após a hidrólise (Sun e Cheng, 2002).

A hidrólise com ácido diluído apresenta-se, do ponto de vista económico, em melhor posição, pois em apenas um único passo conseguem-se obter as alterações pretendidas na matéria-prima (Herrera *et al.*, 2004; Vásquez *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008). A utilização deste método de pré-tratamento tem a vantagem de não só solubilizar as hemiceluloses mas também de as converter em açúcares fermentáveis. O pré-tratamento com ácido diluído elimina ou reduz a necessidade da utilização de misturas de enzimas que degradem as hemiceluloses. Porém, dependendo da temperatura, o pré-tratamento pode gerar produtos da degradação dos açúcares, como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural que são inibidores para os microorganismos fermentativos (Sreenath e Jeffries, 2000; Saha *et al.*, 2005; Hodge *et al.*, 2008).

A hidrólise ácida das hemiceluloses nos materiais lenhocelulósicos é geralmente mais fácil de obter que a da celulose, isto devido à baixa acessibilidade/solubilidade da celulose cristalina comparada com a elevada acessibilidade e solubilidade das hemiceluloses amorfas. Assim, os monómeros das hemiceluloses são libertados mais cedo sendo sujeitos aos efeitos do ácido durante um período de tempo maior, comparando com a glucose derivada da celulose. Os açúcares das hemiceluloses são provavelmente mais degradados quimicamente durante tempos de hidrólise maiores e em condições mais extremas, geralmente para a hidrólise completa da celulose cristalina (Foyle *et al.*, 2007).

O produto da hidrólise é uma solução que contém principalmente açúcares, como a xilose, glucose, arabinose e outros compostos como oligómeros, furfural e ácido acético, que também são libertados. As ligações na fracção de hemiceluloses são mais fracas do que na fracção de celulose. Portanto, usando condições operacionais

seleccionadas, é possível uma hidrólise quase selectiva das hemiceluloses resultando a celulose e lenhina como resíduo sólido (Herrera *et al.*, 2004).

O pré-tratamento com ácido sulfúrico em concentrações inferiores a 4% (w/w) por imersão do material lenhocelulósico e em seguida aquecido a temperaturas entre 140-200 °C durante determinado período de tempo, de alguns minutos a 1 hora, são as condições normalmente utilizadas nestes pré-tratamentos. As hemiceluloses são hidrolisadas sendo uma grande parte obtida como monómeros de açúcares. A adição de ácido aumenta significativamente o rendimento da conversão das hemiceluloses (Galbe e Zacchi, 2007).

A aplicação de pré-tratamentos químicos com ácido sulfúrico diluído, (0,5-1,5%, e temperaturas perto de 160 °C) tem sido mais favorecida para aplicação industrial, uma vez que atinge elevados teores de açúcar das hemiceluloses com rendimentos em xilose de 75 a 90% (Sun e Cheng, 2002). O ácido terá que ser removido ou neutralizado antes da fermentação, o que é normalmente feito após a hidrólise de celulose (Hamelinck *et al.*, 2005).

Resultados obtidos por Sun and Cheng (2005) em pré-tratamentos efectuados em palha de centeio indicam que tempos de residência de 30 minutos não foram suficientes para a solubilização das hemiceluloses na biomassa. A aplicação de condições mais drásticas de pré-tratamento resulta no aumento da solubilização das hemiceluloses. Mais de 50% da hemiceluloses foram solubilizadas em açúcares monoméricos quando foram efectuados pré-tratamentos com 1,2% de ácido sulfúrico durante 60 minutos ou 0,9% de ácido sulfúrico durante 90 minutos (Sun e Cheng, 2005).

Pré-tratamentos realizados em palha de trigo com ácido sulfúrico diluído 0.75% (v/v) a 121°C durante uma hora apresentaram bons rendimentos em açúcares na sacarificação enzimática posterior, sem que ocorra a formação de grandes quantidades de produtos de degradação dos açúcares (furfural e 5-hidroximetilfurfural) (Saha *et al.*, 2005).

Segundo Saha e colaboradores, (2005) o rendimento em açúcares depende da percentagem de ácido e da temperatura do pré-tratamento. Estes autores obtiveram 76% de rendimento em açúcares após sacarificação enzimática em pré-tratamentos realizados em palha de trigo com 0,5% H₂SO₄ (v/v) durante 15 min a 180 °C, contudo nestas

condições foram produzidas elevadas quantidades de furfural e ácido acético, sem que contudo seja produzido 5-hidroximetilfurfural.

Temperaturas, tempos de residência, e concentrações ácidas elevadas reduziram a quantidade de sólidos recuperados depois dos pré-tratamentos em talos de algodão. A quantidade de lenhina ácida insolúvel na biomassa após o pré-tratamento ácido varia entre 28,72% [1% ácido (w/v), 30 min, 90 °C] e 40,68% [2% ácido (w/v), 60 min, 121 °C/15 psi] (Silverstein *et al.*, 2007).

Face ao exposto, pode concluir-se que o resultado do pré-tratamento com ácido diluído, em termos de açúcares libertados, depende fortemente de algumas variáveis processuais como a temperatura e a concentração de ácido e da espécie vegetal submetida ao tratamento.

2.2 Pré-tratamento alcalino

A aplicação de soluções alcalinas remove parte da lenhina (Hamelinck *et al.*, 2005; Silverstein *et al.*, 2007) e vários ácidos urónicos substituintes nas hemiceluloses que são inibidores da acessibilidade das enzimas à celulose e hemiceluloses (Silverstein *et al.*, 2007). Contudo a celulose e hemiceluloses permanecem quase intactas, pelo que são necessárias mais enzimas para digerir tanto as hemiceluloses como a celulose, aumentando assim o uso de enzima no processo (Gray *et al.*, 2006).

Os pré-tratamentos alcalinos utilizam alcalis tais como hidróxido de sódio ou hidróxido de cálcio (Hamelinck *et al.*, 2005), e o seu resultado depende da composição química dos materiais, principalmente do teor de lenhina que apresentam. 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 *et al.*, 2008).

Este pré-tratamento químico também afecta a composição da fracção não celulósica do hidrolisado, por exemplo, pré-tratamentos ácidos podem resultar em elevadas concentrações de furfural na fase líquida, enquanto que os métodos alcalinos podem

produzir elevadas concentrações de ferulato e acetato no hidrolisado. Estes compostos quando presentes na solução que contém os açúcares tem elevado efeito inibidor nos microorganismos fermentativos (Gray *et al.*, 2006).

Os reactores apresentam custos mais baixos do que os métodos ácidos, no entanto, a utilização de alcalis em concentrações mais elevadas suscita preocupações ambientais (Hamelinck *et al.*, 2005). Geralmente o pré-tratamento alcalino é mais efectivo em resíduos agrícolas e culturas herbáceas que em madeira (Sun e Cheng, 2002; Silverstein *et al.*, 2007).

2.3 Pré-tratamento com ozono

O pré-tratamento com ozono é um método bastante atractivo, por não necessitar de condições fortemente ácidas ou básicas e não produzir resíduos tóxicos no material tratado. O efeito do pré-tratamento foi tido em conta essencialmente por não se limitar apenas à degradação da lenhina (Silverstein *et al.*, 2007), as hemiceluloses são ligeiramente atacadas sendo que a celulose é muito degradada (Sun e Cheng, 2002).

Foi demonstrado que a taxa de hidrólise aumentou cinco vezes depois da remoção de 60% da lenhina com pré-tratamentos com ozono em palha de trigo. O rendimento da hidrólise enzimática aumenta de 0% para 57% quando a percentagem de lenhina diminui de 29% para 8%, após o pré-tratamento com ozono de serradura de choupo (Sun e Cheng, 2002).

As principais vantagens dos pré-tratamentos com ozono são a elevada taxa de remoção de lenhina, a ausência de produção de resíduos tóxicos nos processos seguintes e a reacção ser realizada à pressão e temperatura ambientes. No entanto, é necessária uma grande quantidade de ozono o que torna o processo muito dispendioso (Sun e Cheng, 2002).

2.4 Pré-tratamento *steam explosion*

O pré-tratamento da biomassa com vapor a alta pressão (*steam explosion*) é dado como um dos métodos de pré-tratamento mais bem sucedido (Ahring *et al.*, 1996; Glasser e Wright 1998; Sassner *et al.*, 2008a), e promissor para tornar a biomassa mais acessível ao ataque enzimático (Hamelinck *et al.*, 2005).

A biomassa moída é tratada com vapor saturado a alta pressão (20-50 bar, 210-290 °C) durante alguns minutos, a reacção é então parada por descompressão súbita até à pressão atmosférica (Hamelinck *et al.*, 2005; Cara *et al.*, 2008b). A maioria dos pré-tratamentos *steam explosion* apresentam elevado rendimento em hemiceluloses dissolvidas e baixo em solubilidade de lenhina (Hamelinck *et al.*, 2005).

O processo provoca degradação das hemiceluloses e a transformação da lenhina devido à elevada temperatura, aumentando assim o potencial de hidrólise da celulose (Duff e Murray, 1996). Estudos realizados sem adição de catalisador reportam conversões em xilose entre 45% e 65% (Hamelinck *et al.*, 2005).

Podem obter-se óptimas taxas de solubilização de hemiceluloses e hidrólise de celulose tanto a temperaturas elevadas e curto tempo de residência (270 °C, 1 min) como com temperatura mais baixa e longo tempo de residência (190 C, 10 min) (Duff e Murray, 1996).

Os principais factores que afectam o pré-tratamento *steam explosion* são o tempo de residência, a temperatura, o tamanho de partícula, a matéria-prima, a adição ou não de catalizador que pode ser ácido sulfúrico ou dióxido de enxofre (Sassner *et al.*, 2008a). O ácido catalizador é adicionado para melhorar a hidrólise enzimática e diminuir a produção de compostos inibitórios (Sun e Cheng, 2002; Söderström *et al.*, 2003; Cara *et al.*, 2008b). A matéria-prima pode, assim, ser pré-tratada em condições mais suaves, que minimizam a degradação das hemiceluloses (Sassner *et al.*, 2008a).

As principais vantagens do *steam explosion*, são o baixo consumo de energia quando comparado com métodos mecânicos e o facto de não ser necessário reciclar produtos químicos. Os métodos mecânicos convencionais exigem até mais 70% de energia do que o *steam explosion* para atingir a mesma redução de tamanho.

As limitações principais do processo *steam explosion* são a destruição de uma fracção de xilanas, a incompleta ruptura da matriz lenhina polissacarídeos, e a geração de compostos secundários que podem ser inibidores dos microorganismos fermentativos utilizados nos processos seguintes (Sun e Cheng, 2002; Söderström *et al.*, 2003). Devido à formação destes produtos de degradação a biomassa pré-tratada necessita de ser lavada com água para remover os inibidores. A lavagem diminui o rendimento global da sacarificação devido à remoção dos açúcares solúveis, tais como os gerados por hidrólise de hemiceluloses (Sun e Cheng, 2002).

Para que seja viável a longo prazo o pré-tratamento com vapor tem de apresentar um rendimento global superior e uma diminuição significativa dos custos de operação (Hamelinck *et al.*, 2005).

2.5 Pré-tratamento biológico

A complexidade e resistência das plantas lenhocelulósicas são uma primeira barreira protectora que impede a destruição celular por bactérias e fungos (Iranmahboob *et al.*, 2002). O processo de degradação enzimático tem potencial para converter os hidratos de carbono dos materiais lenhocelulósicos em etanol, com rendimentos elevados e um baixo custo de produção (Sassner *et al.*, 2008a), mas este processo biológico é fortemente inibido pela presença da lenhina. Esta inibição resulta principalmente da reduzida acessibilidade das microfibrilas de celulose, assim como, da adsorção das enzimas hidrolíticas ao polímero da lenhina (Weng *et al.*, 2008).

Os pré-tratamentos biológicos utilizam fungos (Sun e Cheng, 2002; Hamelinck *et al.*, 2005) como os *withe-rot*, *brown-rot* e *soft-rot* para degradar a lenhina e hemiceluloses (Sun e Cheng, 2002; Chandra *et al.*, 2007). A biodeslenhificação é a degradação biológica da lenhina por microorganismos. É mencionado desde meados dos anos 80 como muito útil, embora na altura fosse um processo dispendioso, com baixos rendimentos após longo tempo de reacção, e os microorganismos inibidos por derivados da lenhina (Hamelinck *et al.*, 2005).

Os fungos *brown-rot* degradam principalmente a celulose enquanto os *withe-rot* e *soft-rot* degradam tanto celulose como lenhina. Os *withe-rot* são os fungos mais efectivos no pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos (Sun e Cheng, 2002; Chandra *et al.*, 2007; Spigno *et al.*, 2008).

Este método de pré-tratamento tem vantagens pelo seu baixo consumo de energia e baixa carga poluente (Sun e Cheng, 2002; Hamelinck *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2008). No entanto, a baixa taxa de hidrólise impede a sua execução. Por vezes são combinados tratamentos biológicos e químicos para aumentar a eficiência (Hamelinck *et al.*, 2005).

3. *Design* experimental

3.1 Introdução

Experiências estatisticamente planeadas ou não, são um componente de um processo de aprendizagem. Aprender por experimentação é um mecanismo complexo que combina as esperanças da pessoa, a necessidade, o conhecimento, e os recursos (Hunter, 1999).

O método científico é um processo interactivo, onde as experiências conduzem a dados que servem para confirmar e/ou modificar ideias. Um ciclo interactivo é estabelecido entre ideias (hipóteses), o *design* da experiência, a produção de dados, e a análise subsequente (conclusão) conduzindo a novas ideias, novas experiências, novos dados, e novas conclusões. Este processo interactivo continua até que é adquirido e confirmado um estado adequado de conhecimento. A aplicação do *design* estatístico e análise de experiências acelera este processo de aprendizagem (Hunter, 1999).

As experiências são executadas por investigadores em praticamente todos os campos da ciência, para que normalmente se descubra algo sobre um processo ou sistema em particular (Montgomery, 2000). Os processos e fenómenos naturais são condicionados pela interacção de vários factores (Lazic, 2004), o que vai aumentar a complexidade deste processo experimental.

Literalmente, uma experiência é um teste. Mais formalmente, uma experiência pode ser definida como um teste ou uma série de testes, nos quais são feitas mudanças propositadas às variáveis de entrada de um processo ou sistema, de forma que possamos observar e identificar as razões para mudanças que podem ser observadas na resposta produzida (Montgomery, 2000).

Hoje o computador pessoal e *software* associado não só reduzem o tempo dedicado aos cálculos como também podem ajudar directamente na selecção de um *design* experimental. Muitos programas de *software* estatísticos vão além do *design* estatístico de experiências e incluem elementos de controlo de qualidade (Hunter, 1999).

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).

3.2 *Design* de experiências – Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) é uma junção de técnicas de matemática e estatística que são úteis em modelação e análise de problemas, nos quais a resposta pretendida é influenciada por diversas variáveis, e o objectivo principal é otimizar essa resposta. 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 16, onde η é representado em função dos níveis (x_1) e (x_2) (Montgomery, 2000).

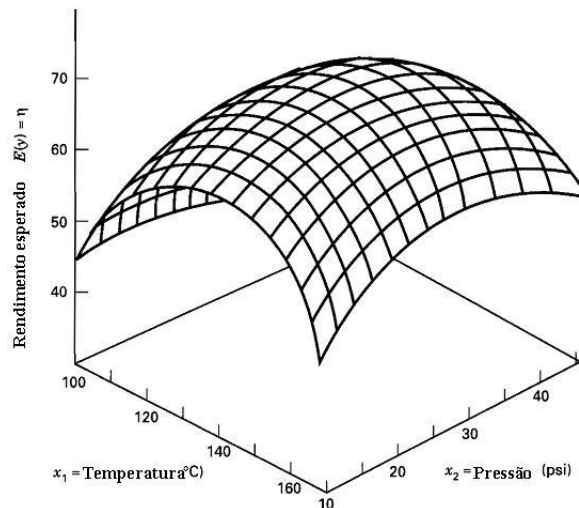


Figura 16 – Resposta de Superfície tri-dimensional mostrando o rendimento obtido (η) em função dos níveis (x_1) e (x_2) (adaptado de Montgomery, 2000).

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 17 (Montgomery, 2000).

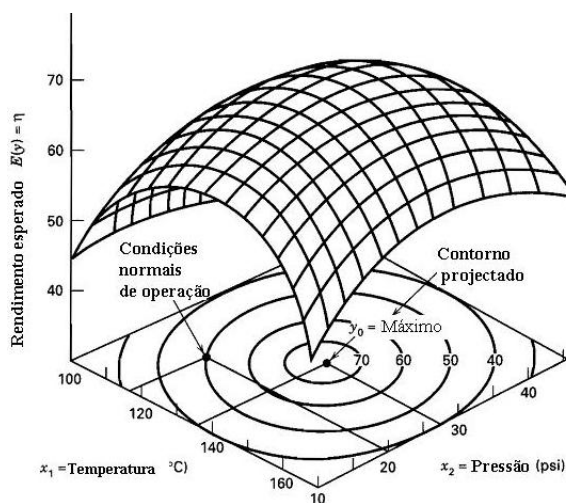


Figura 17 – Contorno projectado de resposta constante (adaptado de Montgomery, 2000).

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 18, 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).

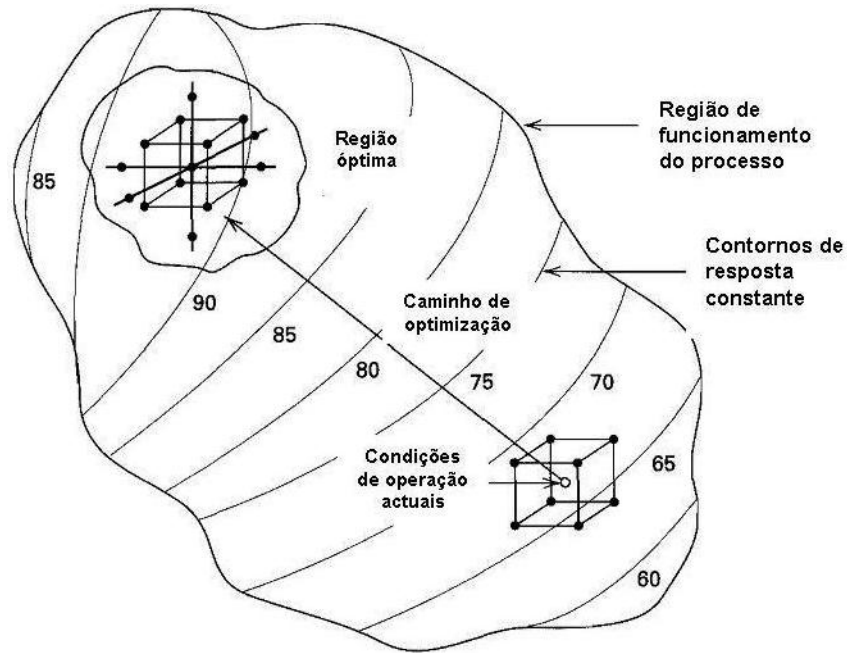


Figura 18 – Representação da natureza sequencial da RSM (adaptado de Montgomery, 2000).

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 II – Parte experimental

Neste capítulo apresentam-se as matérias-primas, os materiais e os reagentes utilizados neste trabalho e métodos experimentais seguidos.

1. Materiais e reagentes

1.1 Matérias-primas

As matérias-primas utilizadas neste trabalho são arbustos, colhidos na região da Covilhã em Maio de 2007 com a colaboração da Associação de Produtores Florestais do Paúl (Figura 19). As matérias-primas foram colhidas, cortadas grosseiramente sendo depois secas e armazenadas à temperatura ambiente (Figura 20). As espécies seleccionadas foram: *Cistus ladanifer* (esteva) [Figura 19 (a)], *Cytisus striatus* (giesta) [Figura 19 (b)] e *Pterospartum tridentatum* (Carqueja) [Figura 19 (c)]. As matérias-primas apresentadas na Figura 20 foram posteriormente moídas e crivadas de acordo com o ensaio laboratorial ao qual se destinavam. O destroçamento na floresta teve como objectivo diminuir a dimensão dos arbustos para possibilitar o seu transporte e manuseamento posteriores.



Figura 19 – Matérias-primas utilizadas: (a) Esteva, (b) Giesta e (c) Carqueja.



Figura 20 – Matérias-primas após destroçamento na floresta e secagem à temperatura ambiente: (a) Esterco, (b) Giesta e (c) Carqueja.

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, balões de fundo redondo, extractores soxhlet entre outros), bem como material eléctrico (mantas de aquecimento, placas de agitação, etc.). Os equipamentos utilizados especificamente em cada método analítico encontram-se descritos no mesmo.

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: $(\text{O}_2\text{N})_2\text{C}_6\text{H}_2\text{-2-(OH)CO}_2\text{H}$ -CAS n°: 609-99-4 	<ul style="list-style-type: none"> -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 	<ul style="list-style-type: none"> -Massa molecular: 98.08 g/mol -Pureza: 95 -97% -Marca: Sigma – Aldrich
<ul style="list-style-type: none"> • D(+)- Glucose anidra -Fórmula molecular: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_{16}$ -CAS n°: 50-99-7 	<ul style="list-style-type: none"> -Massa molecular: 180.16 g/mol -Pureza: 99.0 % -Marca: Fluka
<ul style="list-style-type: none"> • Etanol Absoluto -Fórmula molecular: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ -CAS n°: 64-17-5 	<ul style="list-style-type: none"> -Massa molecular: 46.07 g/mol -Pureza: 99.8 % -Marca: Sigma - Aldrich
<ul style="list-style-type: none"> • Hidróxido de Bário Octahidratado -Fórmula molecular: $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ -CAS n°: 12230-71-6 	<ul style="list-style-type: none"> -Massa molecular: 315.46 g/mol -Pureza: $\geq 98.0\%$ -Marca: Sigma – Aldrich
<ul style="list-style-type: none"> • Hidróxido de Sódio -Fórmula molecular: NaOH -CAS n°: 1310-73-2 	<ul style="list-style-type: none"> -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: $\text{KOCOCH(OH)CH(OH)COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -CAS n°: 6381-59-5 	<ul style="list-style-type: none"> -Massa molecular: 228.12 g/mol -Pureza: $\geq 99.98\%$ -Marca: Aldrich
<ul style="list-style-type: none"> • Tolueno -Fórmula molecular: $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ -CAS n°: 108-88-3 	<ul style="list-style-type: none"> -Massa molecular: 92.14 g/mol -Pureza: $\geq 99.7\%$ -Marca: Sigma – Aldrich

2. Métodos analíticos

Os métodos analíticos seguidos neste trabalho encontram-se descritos de seguida. Todas as alterações aos métodos são devidamente referidos, assim como os principais equipamentos utilizados. Os métodos analíticos utilizados na caracterização química das espécies vegetais encontram-se normalizados. Todos os ensaios laboratoriais foram realizados em duplicado ou triplicado de acordo com o normalizado para o ensaio.

1.1 Determinação do teor de humidade e preparação da matéria-prima

A caracterização química da madeira exige um primeiro passo de redução de tamanho e classificação de partícula. Para o efeito a matéria-prima foi moída num moinho de lâminas (Retsch Mühle – West Germany) representado na Figura 21 (a), sendo a serradura crivada num sistema de crivagem mecânico (Retsch Mühle – West Germany, Test Sieve - 5657 HAAN,) representado na Figura 21 (b). A etapa de crivagem permite a separação do material de acordo com o tamanho de partícula. Para a análise química normalizada é utilizada a fracção de material retida no crivo de 0,250 mm de abertura de malha e que passa no de 0,4 mm, de acordo com a norma Tappi 257 cm-85.

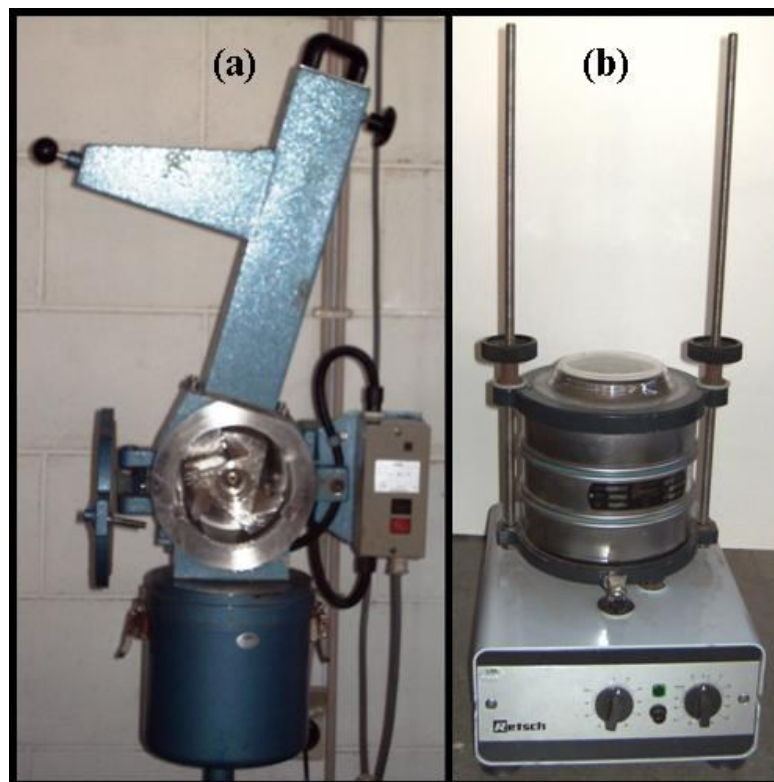


Figura 21 – Representação do moinho (a) e do crivo (b).

O material lenhocelulósico é altamente higroscópico e assim a matéria-prima seca ao ar apresenta um teor de humidade entre 7-10%. Este teor de humidade é determinado de acordo com a norma ISO 638-1978 (E). A obtenção do teor de humidade com rigor,

requer a secagem completa da amostra a temperaturas relativamente elevadas, o que pode alterar a sua composição química, pelo que esta não deve ser utilizada para ensaios seguintes. Para a caracterização química deve ser utilizada matéria-prima “tal e qual”, sendo os resultados corrigidos posteriormente após a determinação rigorosa do teor de humidade.

1.2 Determinação do teor de cinzas

O conteúdo em cinzas é a quantificação dos sais minerais e outros materiais inorgânicos contidos numa amostra de biomassa. O teor de cinzas é dado pela massa do resíduo que resulta da combustão completa da amostra, sendo a sua determinação realizada segundo a norma Tappi 211 om-93. As amostras a incinerar devem ser de matéria-prima classificada de acordo com a norma Tappi 257 cm-85, sendo a incineração realizada à temperatura de $525 \pm 25^\circ\text{C}$, em Mufla (Vulcan, 3-550). O resultado é expresso em percentagem relativa à massa de amostra absolutamente seca.

1.3 Determinação do teor de extractáveis

A quantificação do teor de extractáveis em solventes orgânicos tem mais do que uma finalidade, por um lado permite saber o conteúdo e estimar o consumo de reagentes em tratamentos posteriores. Por outro lado, é útil porque permite proceder à remoção dos extractáveis para posterior realização de alguns ensaios de caracterização química da matéria-prima uma vez que interferem directamente com eles.

A amostra classificada é colocada num cartucho de extracção e este num soxhlet, ao qual é acoplado um balão de fundo redondo com uma solução de etanol/tolueno (1:2 v/v). A amostra é então extraída durante pelo menos 24 ciclos de extracção. A quantidade extraída é quantificada após evaporação do solvente e secagem do resíduo a $105 \pm 3^\circ\text{C}$.

Esta quantificação de extractáveis é realizada de acordo com a norma Tappi 204 om-88 e a matéria-prima extraída e seca à temperatura ambiente é acondicionada para utilização nos ensaios químicos que necessitam da isenção de extractáveis (recomendado pela norma Tappi 264 om-88).

1.4 Determinação do teor de lenhina solúvel e insolúvel

A determinação do teor de lenhina no material lenhocelulósico consiste na hidrólise completa dos polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) com ácidos inorgânicos concentrados à temperatura ambiente dando origem a oligossacarídeos, os quais são hidrolisados numa segunda etapa com ácido diluído à ebulição, onde os produtos da hidrólise são solubilizados. A lenhina, que é relativamente estável nestas condições, constitui o resíduo da amostra após este tratamento.

A utilização de ácido sulfúrico concentrado para a determinação da lenhina insolúvel foi inicialmente aplicada por Klason, em 1906, e posteriormente adoptado, no essencial, pela norma Tappi 222 om-88. Assim a lenhina isolada por este método tem o nome de “lenhina de Klason”. O procedimento consiste na hidrólise dos polissacarídeos através de condições adequadas, sendo um passo determinante o tratamento com ácido sulfúrico a 72%. A mistura ácida é depois diluída com água até 3% e colocada em refluxo durante 4 horas para completar a hidrólise. Em seguida deixa-se sedimentar e filtra-se em cadinho, quantificando o material retido como lenhina insolúvel depois de seco em estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$.

A quantificação pressupõe que a lenhina da amostra não é de todo hidrolisável, nem solúvel no ácido, mas tal não se verifica e uma pequena fracção da lenhina é solubilizada nas condições do ensaio. Deste modo, deve ser também determinada a lenhina solúvel, resultante da solubilização durante a hidrólise ácida. A quantificação é determinada recorrendo a um método espectrofotométrico referido na norma Tappi um-250, utilizando um espectrofotómetro de absorção molecular UV/Vis (THERMO (spectronic) Electron – hélios gama).

A percentagem de lenhina total é calculada com base nos resultados obtidos para a lenhina solúvel e insolúvel relativamente à massa de amostra absolutamente seca sujeita a análise.

1.5 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 baseia-se 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 540 nm.

O reagente DNS é preparado diluindo 10 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico em 200 ml de NaOH 2N, com agitação e se necessário aquecimento. Separadamente prepara-se uma solução de tartarato de potássio e sódio tetrahidratado em 500 ml de água destilada. O reagente DNS é o resultado da adição das duas soluções anteriores em balão volumétrico de 1 L, sendo este aferido.

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 5000 mg/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 0,999, sendo apresentado um exemplo destas curvas na Figura 22.

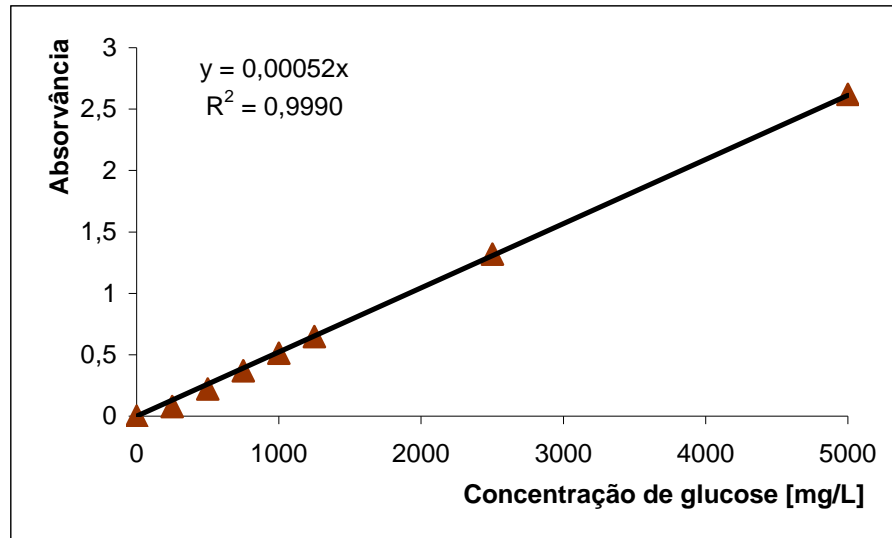


Figura 22 – Curva de calibração para uma solução de DNS utilizando a glicose como padrão.

Na realização dos ensaios analíticos, adiciona-se em tubo de ensaio 1,0 mL de reagente DNS com 1 mL de amostra a analisar e 2 mL de água destilada, agitando o tubo tapado com papel de alumínio, o tubo é levado à ebulição a 100°C em banho térmico durante 10 minutos, arrefecendo de seguida em banho gelado e adicionando mais 6 mL de água agitando muito bem em Vortex antes de efectuar a medição espectrofotométrica. Esta medição é realizada utilizando como branco uma solução preparada de acordo com o referido anteriormente, mas substituindo a amostra por água destilada.

3. Método de Pré-tratamento

1.1 Preparação das matérias-primas

As matérias-primas apresentadas na Figura 20 foram moídas no moinho de lâminas [Figura 21 (a)], no qual se encontra um crivo com dimensão de abertura de malha de 0,5 mm. Após a moagem foi realizada uma crivagem para aumentar a homogeneidade do material, uma vez que em ensaios preliminares realizados se verificou que a falta de homogeneidade do material não permitiu a obtenção de resultados válidos. A crivagem foi realizada no crivo apresentado na Figura 21 (b), sendo recolhida a fracção retida no crivo de abertura de malha de 0,180 mm. Após a moagem e crivagem as amostras

apresentavam um aspecto bastante homogêneo mas com diferenças significativas entre as três espécies, quer no aspecto visual (cor) como demonstrado na Figura 23, quer ao toque.



Figura 23 – Matérias-primas após moagem e crivagem: (a) Esteva, (b) Giesta e (c) Carqueja.

1.2 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 (Canettieri *et al.*, 2007) e alguns ensaios preliminares. Na Tabela 3 apresentam-se os intervalos nos quais cada factor varia para cada espécie arbustiva tratada. As condições às quais se realizaram os ensaios encontram-se descritas nas tabelas respectivas a cada espécie no capítulo III.

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

Variável Espécie	Tempo [min]	Temperatura [°C]	Concentração de ácido [% w/w]	Razão biomassa/líquido [g biomassa/10 ml líquido]
Esteva	[30;120]	[50;150]	[0,1;5]	[1;3]
Giesta	[30;120]	[50;150]	[0,1;5]	[1;3]
Carqueja	[30;120]	[80;180]	[0,5;5]	[1,5;3]

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

Tabela 4 – Parâmetros definidos introduzidos no *software*.

Condição Espécie	Tipo de <i>design</i>	Pontos Centrais	Réplicas dos pontos Centrais	Réplicas dos pontos axiais	Total de ensaios (<i>runs</i>)	Respostas
Esteva	<i>Full</i>	6	2	2	54	Açúcares redutores
Giesta	<i>Full</i>	6	2	2	54	Açúcares redutores
Carqueja	<i>Small</i>	4	2	2	36	Açúcares redutores

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 foram realizados em banho termostaticado de PEG 400 [Figura 24 (a)] com agitação constante, onde foram imersos os mini-reactores de aço inox de 200 mL [Figura 24 (b)], dentro dos quais se realizava o pré-tratamento. A amostra, 15g, foi introduzida dentro dos reactores à temperatura ambiente, bem como a quantidade de ácido necessário para a concentração pretendida, partindo de uma solução 30 g/L. A relação biomassa/líquido adequada foi conseguida adicionando a quantidade de água

necessária. Os reactores foram fechados e colocados no banho à temperatura pretendida durante 20 minutos de aquecimento mais os tempos de reacção indicados pelo *design* experimental.

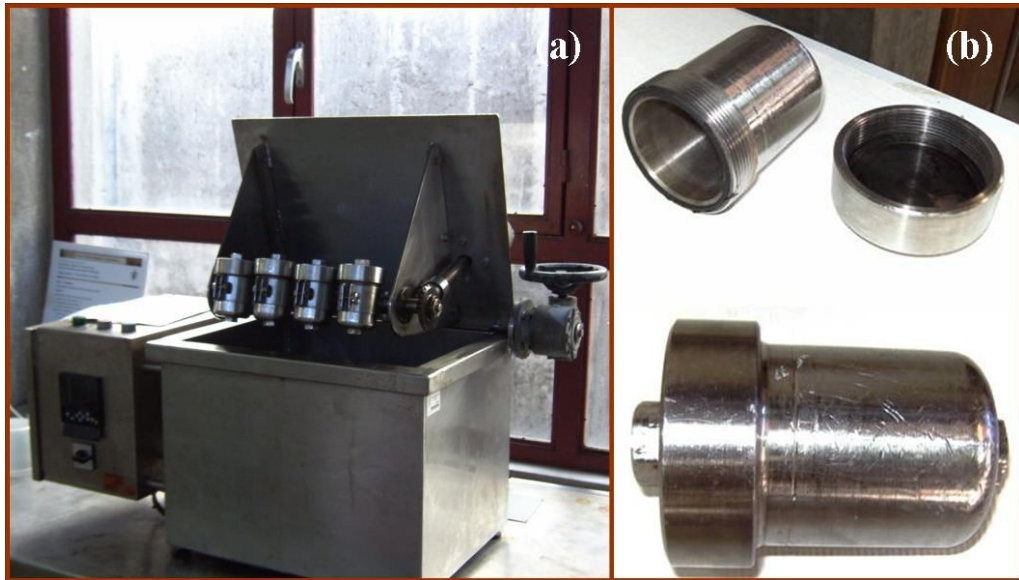


Figura 24 – Banho termostatzado de PEG 400 (a) e reactores de aço inox de 200 mL (b).

Após decorrer o tempo de reacção, os reactores 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 morna para remover o ácido residual, até perfazer uma quantidade de filtrado de 500 mL.

A fracção sólida resultante do pré-tratamento foi seca à temperatura ambiente, como se pode observar na Figura 25, e guardada convenientemente em ambiente fresco e seco.



Figura 25 – Matérias-primas após pré-tratamento e durante a secagem.

A fracção líquida [Figura 26 (a)] possui pH ácido e tem que ser neutralizada para que se possa analisar, tendo sido utilizada para esse fim uma solução de hidróxido de bário octahidratado a 20% (m/m). Após a adição deste sal ocorre a formação de um precipitado de sulfato de bário e também de outras substâncias, como alguma lenhina, o que confere à solução um aspecto opaco, como pode ser observado na Figura 26 (b). Estes precipitados não permitem a utilização de métodos espectrofotométricos, como a determinação dos açúcares pelo DNS, pelo que têm que ser removidos por centrifugação durante 10 minutos a 4500 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 de acordo com o método descrito anteriormente.

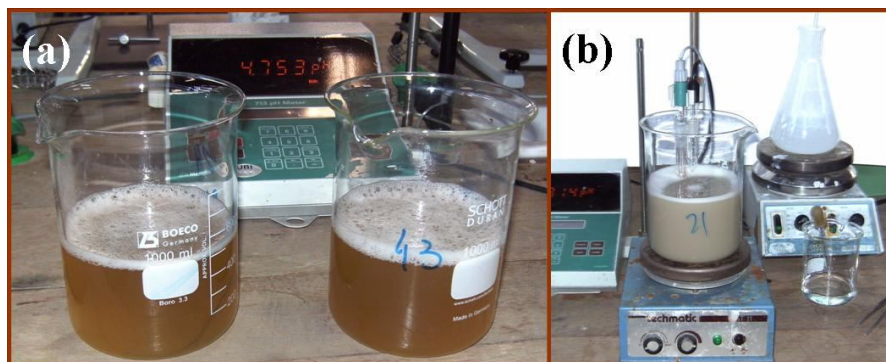


Figura 26 – Fracção líquida do pré-tratamento: (a) a pH ácido, (b) a pH neutro.

Capítulo III – Resultados e Discussão

1. Composição da biomassa florestal

A composição das três espécies arbustivas utilizadas neste estudo encontra-se descrita na Tabela 5. A composição química varia de acordo com a espécie e com a fracção da planta onde a amostra é recolhida, pelo que foi moída e crivada uma quantidade significativa de amostra com vista a minimizar esses erros. Foram analisadas duas fracções em paralelo, uma constituída apenas por caule descascado e outra pelo arbusto completo, caule casca e folhas.

Os polissacarídeos totais contidos nas amostras foram calculados por diferença relativamente aos outros componentes (extractáveis, cinzas e lenhina total).

Tabela 5 – Composição química da biomassa (em base seca)

Espécie	Fracção	Extractáveis [%]	Cinzas totais [%]	Lenhina insolúvel [%]	Lenhina solúvel [%]	Lenhina Total [%]	Polissacarídeos totais [%] ^a
Esteva	Caule sem casca	1,8	0,8	23,0	1,9	24,9	72,4
	Arbusto completo ^b	7,4	3,1	32,0	2,2	34,2	55,3
Giesta	Caule sem casca	3,4	0,6	22,0	2,1	24,1	71,9
	Arbusto completo ^b	4,7	0,8	22,4	2,3	24,7	69,9
Carqueja	Caule sem casca	5,2	0,6	24,8	2,1	26,9	67,2
	Arbusto completo ^b	12,4	1,1	36,1	3,1	39,2	47,4

^a Calculado por diferença com os outros componentes. ^b Caule, casca e folhas

A análise da Tabela 5 permite-nos verificar que existem diferenças significativas entre a constituição química das espécies arbustivas consideradas e também quando separamos fracções da planta na mesma espécie de arbusto. Para a giesta, as diferenças na constituição química não são muito significativas quando são consideradas diferentes fracções podendo mesmo considerar-se insignificantes no caso das determinações de cinzas e lenhina solúvel e insolúvel.

A carqueja apresenta elevadas percentagens de extractáveis para o arbusto completo, sendo também a espécie arbustiva que apresenta maiores percentagens de lenhina. A determinação da percentagem de polissacarídeos por diferença de massa entre o total e os constituintes determinados analiticamente, permite-nos observar que para a giesta não existem diferenças significativas quando se tem apenas madeira ou quando se considera o arbusto completo. No caso da esteva e da carqueja existem diferenças significativas na percentagem de polissacarídeos quando se consideram as duas fracções, caule limpo ou arbusto completo.

Atendendo ao objectivo deste trabalho é importante que os arbustos possuam a maior quantidade de polissacarídeos, daí e quanto a este factor a giesta seja a melhor opção atendendo ao facto que é extremamente difícil remover a casca e folhas.

2. Pré-tratamentos/*design* experimental

O plano experimental obtido através do *software Design Expert* é apresentado e descrito separadamente para cada espécie, assim como os resultados obtidos.

Como referido anteriormente, recorreu-se à Metodologia de Superfície de Resposta para se proceder à modelação do processo de pré-tratamento, já que este método é bastante utilizado para o efeito. Utilizou-se o *Central Composite Design* (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 factores (variáveis) a vários níveis.

2.1 Esteva

Os resultados obtidos através do *software Design Expert* encontram-se descritos na Tabela 6, onde podemos observar a Matriz do Desenho Experimental (variáveis reais ou actuais) com a respectiva resposta ou efeito. O resultado dos ensaios de açúcares redutores pelo método DNS foi utilizado como resposta do pré-tratamento ácido.

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 – tempo, B – temperatura, C – concentração de ácido e D – razão biomassa/líquido, sendo a resposta açúcares redutores totais definida como (AR).

Tabela 6 – Matriz do desenho experimental realizado para a esteva assim como a respectiva resposta.

Std	Run	A: Tempo [min]	B: Temperatura [°C]	C: Concentração de ácido [% w/w]	D: Razão Biomassa/Líquido [g biomassa/10 mL líquido]	Açúcares reduzidos totais [mg/g biomassa]
18	1	52,5	75	1,33	2,5	16,8
9	2	52,5	75	3,78	1,5	26,0
6	3	52,5	125	1,33	1,5	84,7
45	4	75,0	100	2,55	1,0	56,1
25	5	52,5	75	3,78	2,5	23,2
41	6	75,0	100	0,10	2,0	30,5
13	7	52,5	125	3,78	1,5	182,1
10	8	52,5	75	3,78	1,5	23,7
33	9	30,0	100	2,55	2,0	46,4
17	10	52,5	75	1,33	2,5	19,2
1	11	52,5	75	1,33	1,5	21,8
31	12	97,5	125	3,78	2,5	234,3
2	13	52,5	75	1,33	1,5	22,9
47	14	75,0	100	2,55	3,0	63,5
23	15	97,5	125	1,33	2,5	92,2
14	16	52,5	125	3,78	1,5	184,4
46	17	75,0	100	2,55	1,0	54,9
51	18	75,0	100	2,55	2,0	60,3
24	19	97,5	125	1,33	2,5	95,9
48	20	75,0	100	2,55	3,0	63,2
44	21	75,0	100	5,00	2,0	85,8
5	22	52,5	125	1,33	1,5	82,4
4	23	97,5	75	1,33	1,5	23,7
19	24	97,5	75	1,33	2,5	22,6
39	25	75,0	150	2,55	2,0	302,2
26	26	52,5	75	3,78	2,5	24,9
40	27	75,0	150	2,55	2,0	282,8
16	28	97,5	125	3,78	1,5	224,6
38	29	75,0	50	2,55	2,0	18,2
30	30	52,5	125	3,78	2,5	216,7
8	31	97,5	125	1,33	1,5	100,1
7	32	97,5	125	1,33	1,5	97,0
32	33	97,5	125	3,78	2,5	240,7
12	34	97,5	75	3,78	1,5	27,5
15	35	97,5	125	3,78	1,5	221,4
37	36	75,0	50	2,55	2,0	18,1
27	37	97,5	75	3,78	2,5	27,3
35	38	120,0	100	2,55	2,0	66,9
22	39	52,5	125	1,33	2,5	85,3
28	40	97,5	75	3,78	2,5	25,0
53	41	75,0	100	2,55	2,0	60,9
36	42	120,0	100	2,55	2,0	66,7
3	43	97,5	75	1,33	1,5	19,7
34	44	30,0	100	2,55	2,0	44,4
20	45	97,5	75	1,33	2,5	20,2
54	46	75,0	100	2,55	2,0	59,4
21	47	52,5	125	1,33	2,5	86,3
42	48	75,0	100	0,10	2,0	28,5
43	49	75,0	100	5,00	2,0	87,3
49	50	75,0	100	2,55	2,0	61,5
11	51	97,5	75	3,78	1,5	27,0
29	52	52,5	125	3,78	2,5	214,9
52	53	75,0	100	2,55	2,0	59,7
50	54	75,0	100	2,55	2,0	61,3

Na Tabela 7 podemos analisar a informação correspondente à análise de variância (ANOVA), para modelo da resposta.

Tabela 7 – Quadro ANOVA para a resposta dos açúcares redutores para a esteva.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	306404,37	21886,03	177,25	<0,0001
A-Tempo	1510,76	1510,76	12,24	0,0012
B-Temperatura	209198,91	209198,91	1694,23	<0,0001
C-Concentração de ácido	33139,38	33139,38	268,39	<0,0001
D-Razão biomassa/líquido	241,30	241,30	1,95	0,1700
AB	751,34	751,34	6,08	0,0181
AC	199,72	199,72	1,62	0,2110
AD	55,87	55,87	0,45	0,5051
BC	28646,83	28646,83	232,00	<0,0001
BD	330,13	330,13	2,67	0,1101
CD	339,34	339,34	2,75	0,1054
A ²	0,92	0,92	0,01	0,9317
B ²	25935,57	25935,57	210,04	<0,0001
C ²	4,82	4,82	0,04	0,8445
D ²	19,94	19,94	0,16	0,6900
Residual	4815,60	123,48	-	-
Falta de ajuste	4552,33	455,23	50,15	<0,0001
Erro	263,27	9,08	-	-
Total	311219,97	-	-	-
R²	0,9845	-	-	-
R² (ajustado)	0,9790	-	-	-

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 0,9845, mostrando que 98,45% 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 <0,0001 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia *et al.*, 2008).

A equação final ajustada para a resposta dos açúcares redutores é a seguinte:

$$\begin{aligned} \text{AR} = & 511,28 - 0,56 * A - 8,90 * B - 94,82 * C - 36,90 * D + 8,61 * 10^{-3} * A * B + 9,06 * 10^{-2} * A * C \\ & - 0,12 * A * D + 0,98 * B * C + 0,26 * B * D + 5,32 * C * D - 2,90 * 10^{-4} * A^2 + 3,94 * 10^{-2} * B^2 + 0,22 * C^2 \\ & + 2,73 * D^2 \end{aligned}$$

Equação 1

Analisando os resultados do quadro ANOVA (Tabela 7) e o nível de significância dos coeficientes da equação final de resposta, verificamos que os efeitos lineares da temperatura e da concentração de ácido são os que se revelam mais importantes na variação da resposta. A interacção dos factores temperatura e concentração de ácido também é bastante significativa (p-valor <0,0001), assim como o efeito quadrático da temperatura. São menos relevantes, mas também importantes por apresentarem níveis de significância (p-valor <0,05), o factor interactivo entre o tempo de reacção e a temperatura.

A temperatura apresenta-se de facto como o factor mais importante na variação do valor de açúcares redutores totais por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor razão biomassa/líquido apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

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

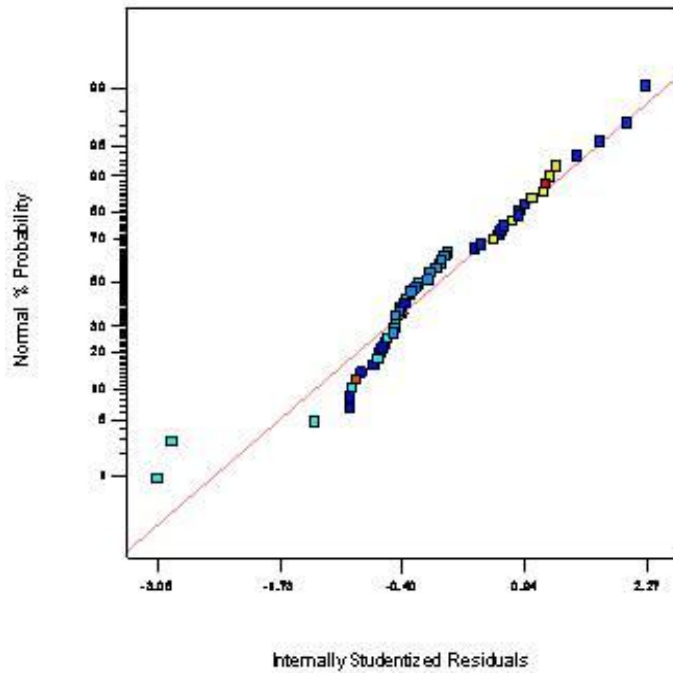


Figura 27 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

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

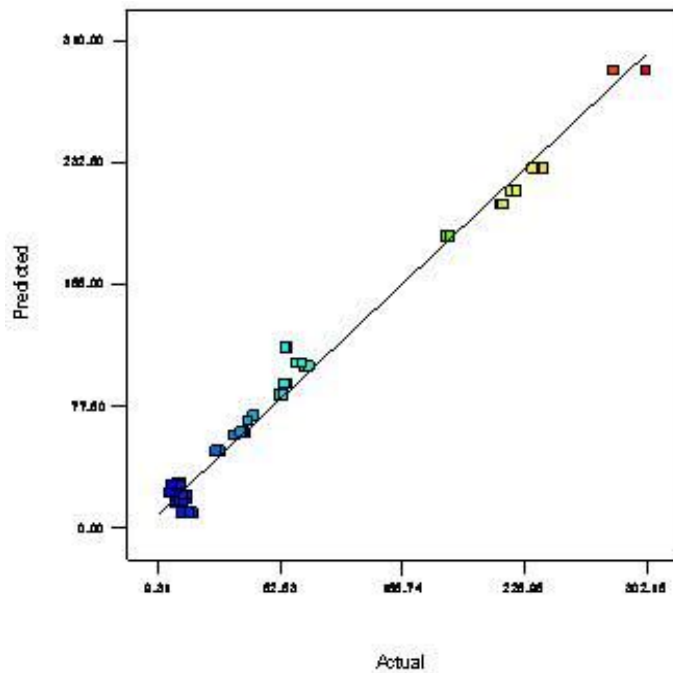


Figura 28 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

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 dos diferentes factores e os respectivos efeitos positivos ou negativos na resposta, pode ser mais facilmente evidenciado através da análise gráfica individual de cada um dos factores (Figura 29).

De acordo com a Figura 29 (a), quando aumentamos o valor do factor tempo este tem influência positiva, observando-se um aumento dos açúcares redutores, ainda que um aumento pouco significativo. O aumento do factor temperatura [Figura 29 (b)] tem influência positiva, observando-se um aumento muito significativo dos açúcares redutores de uma forma exponencial, sendo especialmente vincado esse efeito para temperaturas superiores a 100°C. A análise da Figura 29 (c) ilustra a influência da variação da concentração de ácido, certificando que um aumento nesta variável implica um aumento significativo da quantidade de açúcares redutores, tendo este factor uma influência positiva sobre a resposta. A razão biomassa/líquido [Figura 29 (d)] tem efeito positivo sobre a resposta, mas o efeito é muito pouco relevante, observando-se um pequeno aumento da quantidade de açúcares redutores.

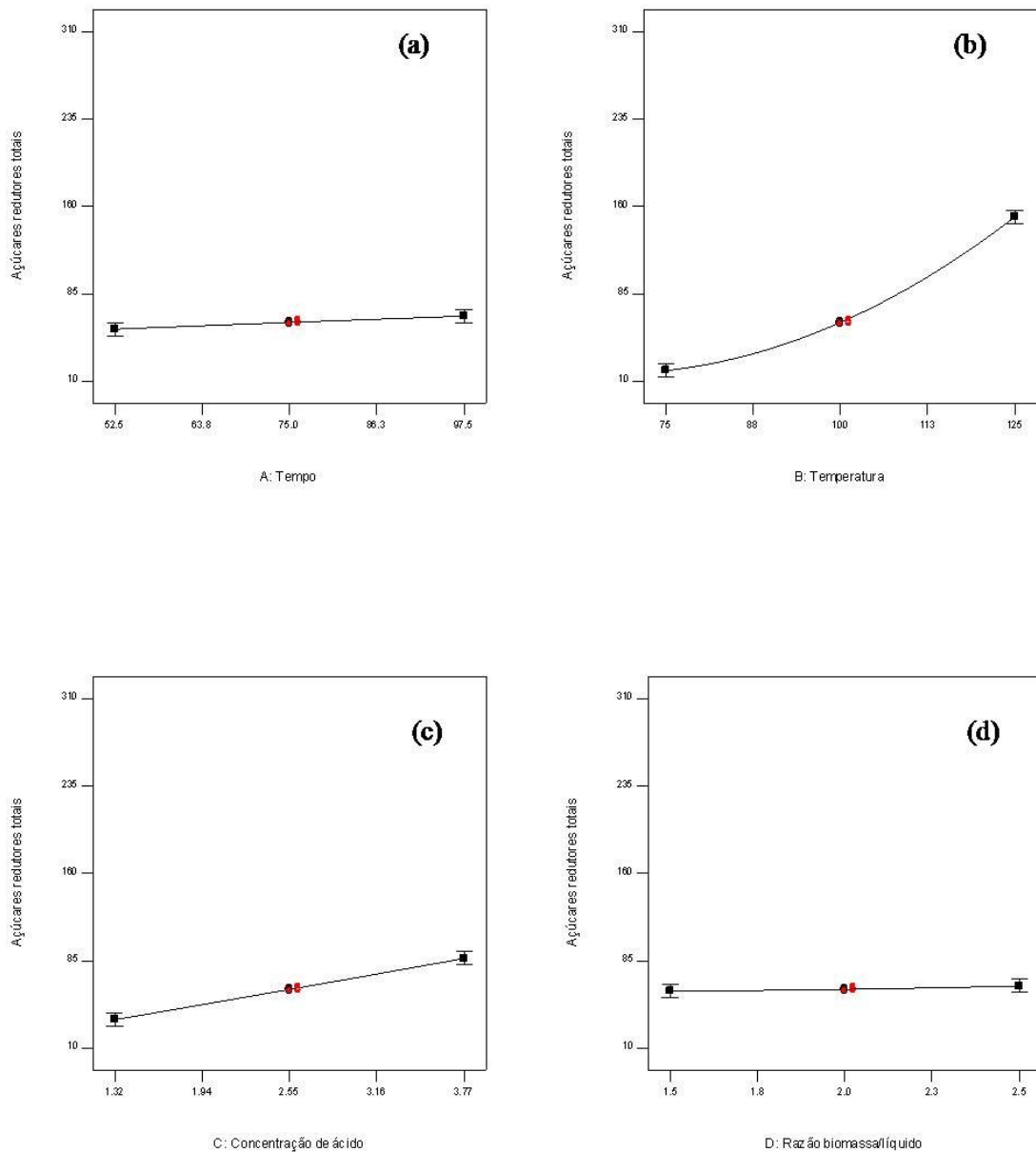


Figura 29 – Representação individual das variáveis (A, B, C, D) com as restantes condições constantes: **(a)** B = 100°C, C = 2,55% e D = 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido; **(b)** A = 75 min, C = 2,55% e D = 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido; **(c)** A = 75 min, B = 100°C e D = 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido; **(d)** A = 75 min, B = 100°C e C = 2,55%.

A influência de cada factor em interacção com os outros dois a dois, é mais fácil de observar nas Superfícies de Resposta (3D), onde a cor azul representa o valor mínimo e a cor vermelha o valor máximo, de açúcares redutores totais obtidos nos pré-tratamentos efectuados.

Na Figura 30 podemos analisar o efeito da interacção entre as variáveis tempo e temperatura, dependendo o valor da resposta quase exclusivamente da temperatura, com

elevados aumentos da quantidade de açúcares redutores para pequenos aumentos de temperatura.

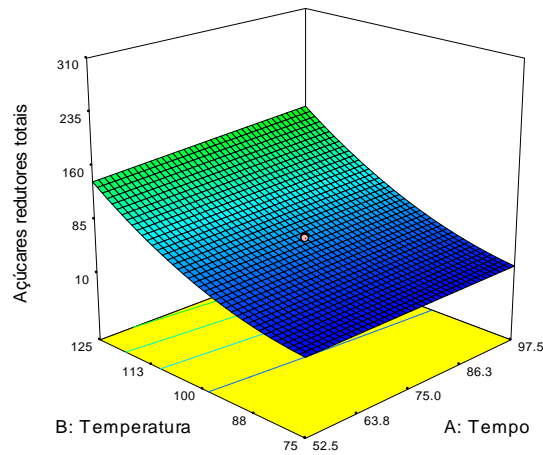


Figura 30 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da temperatura (B), mantendo fixas as variáveis (C) e (D), 2,55% e 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.

A Figura 31 exemplifica o efeito da interação entre as variáveis tempo e concentração de ácido, dependendo o valor da resposta quase exclusivamente desta última, com aumentos significativos na quantidade de açúcares redutores para pequenos aumentos de concentração.

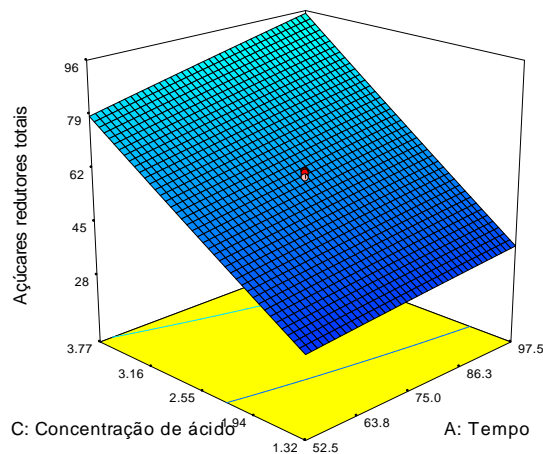


Figura 31 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da concentração de ácido (C), mantendo fixas as variáveis (B) e (D), 100°C e 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.

A Figura 32 exemplifica o efeito da interacção entre as variáveis tempo e razão biomassa/líquido, dependendo o valor da resposta quase exclusivamente do tempo e muito pouco da relação biomassa/líquido. Para tempos mais elevados, de acordo com a Figura 32, a relação biomassa/líquido apresenta um efeito bastante positivo aumentando a quantidade de açúcares redutores.

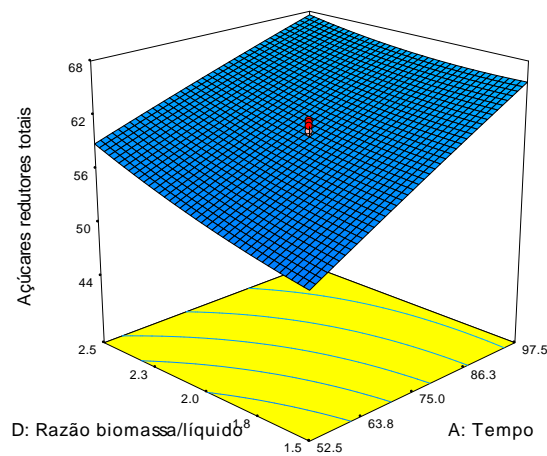


Figura 32 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da razão biomassa/líquido (D), mantendo fixas as variáveis (B) e (C), 100°C e 2,55%, respectivamente.

A Figura 33 evidencia a interacção das variáveis que mais influenciam a resposta. O gráfico ilustra que para concentrações e temperaturas mais elevadas, o aumento os açúcares redutores totais é bastante acentuado.

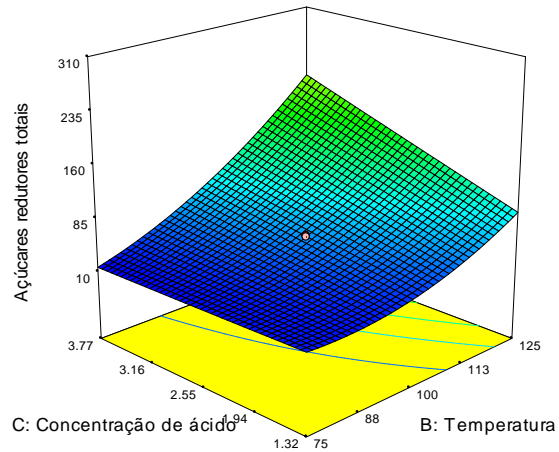


Figura 33 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (B) e da concentração de ácido (C), mantendo fixas as variáveis (A) e (D), 75 min e 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.

A Figura 34 evidencia a interacção de duas variáveis com efeitos bastante distintos na resposta. A temperatura é a variável que mais influência tem e que se faz notar bastante pela análise do gráfico, pelo contrário, a razão biomassa/líquido tem uma influência muito pequena, pelo que, a interacção entre as duas variáveis não é muito significativa.

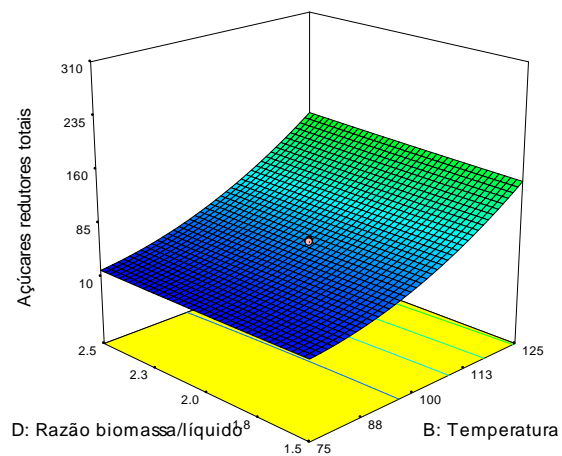


Figura 34 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (B) e da razão biomassa/líquido (D), mantendo fixas as variáveis (A) e (C), 75 min e 2,55%, respectivamente.

Também a Figura 35 representa a interacção de duas variáveis com efeitos bastante distintos na resposta. A concentração de ácido é uma das variáveis que mais influência tem, como se pode observar pela análise do gráfico que mostra um crescimento linear com o aumento da concentração. Pelo contrário, a razão biomassa/líquido tem uma influência muito pequena, pelo que a interacção entre as duas variáveis não é muito significativa.

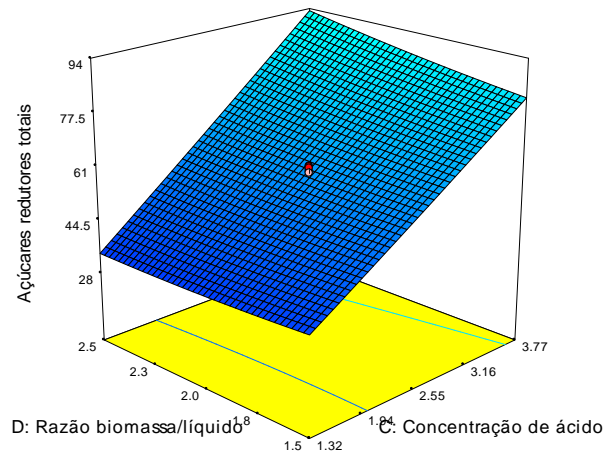


Figura 35 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da concentração de ácido (C) e da razão biomassa/líquido (D), mantendo fixas as variáveis (A) e (B), 75 min e 100°C, respectivamente.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação da obtenção de açúcares redutores totais nos filtrados dos pré-tratamentos da esteva, pode dizer-se que o factor que mais influencia o resultado é a temperatura, seguida da concentração de ácido. A interacção destes dois factores é a que mostra efeitos mais evidentes para esta espécie arbustiva, tal como foi descrito em trabalho já publicado (Gil *et al.*, 2008).

2.2 Giesta

Os resultados obtidos através do *software Design Expert* para a espécie arbustiva giesta encontram-se descritos na Tabela 8, onde podemos observar a Matriz do *Design Experimental* (variáveis reais ou actuais) com a respectiva resposta ou efeito. O resultado dos ensaios de açúcares redutores pelo método DNS foi utilizado como resposta do pré-tratamento ácido.

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 – tempo, B – temperatura, C – concentração de ácido e D – razão biomassa/líquido, sendo a resposta açúcares redutores totais definida como (AR).

Tabela 8 – Matriz do desenho experimental realizado para a giesta assim como a respectiva resposta.

Std	Run	A: Tempo [min]	B: Temperatura [°C]	C: Concentração de ácido [% w/w]	D: Razão Biomassa/Líquido [g biomassa/10 mL líquido]	Açúcares reduzidos totais [mg/g biomassa]
18	1	52,5	75	1,33	2,5	1,5
9	2	52,5	75	3,78	1,5	4,3
6	3	52,5	125	1,33	1,5	37,5
45	4	75,0	100	2,55	1,0	20,0
25	5	52,5	75	3,78	2,5	4,4
41	6	75,0	100	0,10	2,0	3,7
13	7	52,5	125	3,78	1,5	153,5
10	8	52,5	75	3,78	1,5	4,6
33	9	30,0	100	2,55	2,0	14,6
17	10	52,5	75	1,33	2,5	2,4
1	11	52,5	75	1,33	1,5	2,4
31	12	97,5	125	3,78	2,5	224,9
2	13	52,5	75	1,33	1,5	2,4
47	14	75,0	100	2,55	3,0	29,5
23	15	97,5	125	1,33	2,5	54,4
14	16	52,5	125	3,78	1,5	157,2
46	17	75,0	100	2,55	1,0	20,6
51	18	75,0	100	2,55	2,0	26,9
24	19	97,5	125	1,33	2,5	50,0
48	20	75,0	100	2,55	3,0	30,6
44	21	75,0	100	5,00	2,0	43,9
5	22	52,5	125	1,33	1,5	28,5
4	23	97,5	75	1,33	1,5	2,5
19	24	97,5	75	1,33	2,5	2,7
39	25	75,0	150	2,55	2,0	284,5
26	26	52,5	75	3,78	2,5	5,6
40	27	75,0	150	2,55	2,0	278,3
16	28	97,5	125	3,78	1,5	198,0
38	29	75,0	50	2,55	2,0	1,2
30	30	52,5	125	3,78	2,5	198,1
8	31	97,5	125	1,33	1,5	50,9
7	32	97,5	125	1,33	1,5	51,4
32	33	97,5	125	3,78	2,5	243,9
12	34	97,5	75	3,78	1,5	6,2
15	35	97,5	125	3,78	1,5	205,2
37	36	75,0	50	2,55	2,0	1,4
27	37	97,5	75	3,78	2,5	7,4
35	38	120,0	100	2,55	2,0	31,3
22	39	52,5	125	1,33	2,5	39,6
28	40	97,5	75	3,78	2,5	7,1
53	41	75,0	100	2,55	2,0	24,6
36	42	120,0	100	2,55	2,0	29,6
3	43	97,5	75	1,33	1,5	2,7
34	44	30,0	100	2,55	2,0	15,1
20	45	97,5	75	1,33	2,5	1,9
54	46	75,0	100	2,55	2,0	24,3
21	47	52,5	125	1,33	2,5	41,7
42	48	75,0	100	0,10	2,0	3,5
43	49	75,0	100	5,00	2,0	41,0
49	50	75,0	100	2,55	2,0	25,7
11	51	97,5	75	3,78	1,5	6,0
29	52	52,5	125	3,78	2,5	202,3
52	53	75,0	100	2,55	2,0	25,1
50	54	75,0	100	2,55	2,0	25,8

Na Tabela 9 podemos analisar a informação correspondente à análise de variância (ANOVA), para modelo da resposta.

Tabela 9 – Quadro ANOVA para a resposta dos açúcares redutores para a giesta.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	327180,88	23370,06	69,68	<0,0001
A-Tempo	1771,31	1771,31	5,28	0,0270
B-Temperatura	186665,59	186665,59	556,53	<0,0001
C-Concentração de ácido	41532,75	41532,75	123,83	<0,0001
D-Razão biomassa/líquido	950,86	950,86	2,83	0,1002
AB	1396,49	1396,49	4,16	0,0481
AC	364,48	364,48	1,09	0,3036
AD	39,95	39,95	0,12	0,7319
BC	45157,59	45157,59	134,63	<0,0001
BD	910,80	910,80	2,72	0,1074
CD	638,72	638,72	1,90	0,1755
A ²	34,48	34,48	0,10	0,7502
B ²	39869,13	39869,13	118,87	<0,0001
C ²	41,49	41,49	0,12	0,7269
D ²	98,97	98,97	0,30	0,5901
Residual	13080,97	335,41	-	-
Falta de ajuste	12774,77	1277,48	120,99	<0,0001
Erro	306,20	10,56	-	-
Total	340261,84	-	-	-
R ²	0,9616	-	-	-
R ² (ajustado)	0,9478	-	-	-

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 0,9616, mostrando que 96,16% 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 <0,0001 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste do modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia *et al.*, 2008).

A equação final ajustada para a resposta dos açúcares redutores é a seguinte:

$$AR=736,35-1,28*A-12,15*B-125,77*C-69,30*D+1,17*10^{-2}*A*B+0,12*A*C-9,93*10^{-2}*A*D+1,23*B*C+0,43*B*D+7,29*C*D+1,78*10^{-3}*A^2+4,89*10^{-2}*B^2+0,66*C^2+6,09*D^2$$

Equação 2

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 concentração de ácido são os que se revelam mais importantes na variação da resposta. A interacção dos factores temperatura e concentração de ácido também é bastante significativa (p-valor <0,0001), assim como o efeito quadrático da temperatura. São menos relevantes, mas também importantes por apresentarem níveis de significância (p-valor <0,05), o factor interactivo entre o tempo de reacção e a temperatura.

A temperatura apresenta-se de facto como o factor mais importante na variação do valor de açúcares redutores totais por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor razão biomassa/líquido apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa, por apresentar um nível de significância elevado, (p-valor > 0,05).

Os detalhes do diagnóstico implementado pelo *Design Expert* podem ser analisados por observação dos gráficos de diagnóstico representados na Figura 36 e Figura 37.

A observação da Figura 36 permite verificar que os valores residuais se aproximam bastante da recta de linearidade, o que significa uma boa normalização no erro dos termos.

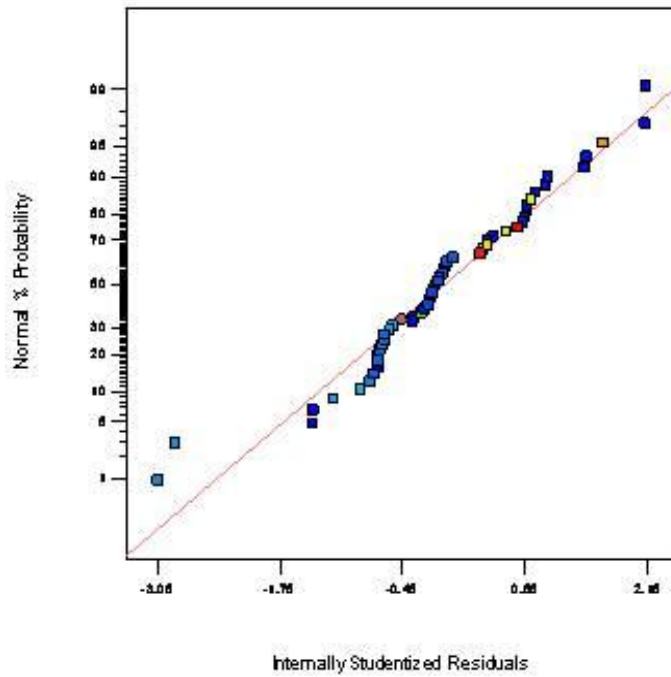


Figura 36 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

A Figura 37 ilustra a representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e dos valores obtidos (*predicted*) através da equação final ajustada.

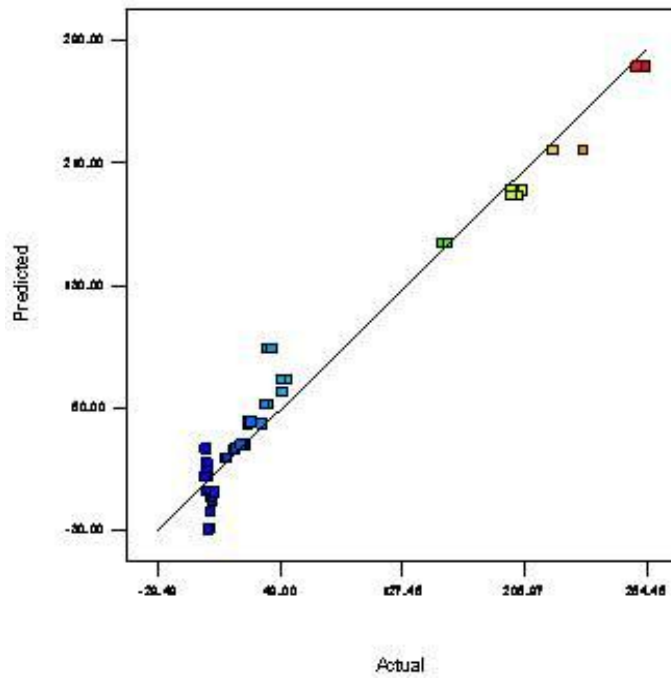


Figura 37 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

A análise da Figura 37 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 dos diferentes factores e os respectivos efeitos positivos ou negativos na resposta, pode ser mais facilmente evidenciado através da análise gráfica individual de cada um dos factores (Figura 38).

De acordo com a Figura 38 (a), quando aumentamos o valor do factor tempo este tem influência positiva, observando-se um aumento dos açúcares redutores, ainda que um aumento pouco significativo. O aumento do factor temperatura [Figura 38 (b)] tem influência positiva observando-se um aumento muito significativo dos açúcares redutores de uma forma exponencial, sendo especialmente vincado esse efeito para temperaturas superiores a 100°C. A análise da Figura 38 (c) ilustra a influência da variação da concentração de ácido, certificando que um aumento nesta variável implica um aumento significativo da quantidade de açúcares redutores, tendo este factor uma influência positiva sobre a resposta. A razão biomassa/líquido [Figura 38 (d)] tem efeito positivo sobre a resposta, mas o efeito é muito pouco relevante, observando-se um pequeno aumento da quantidade de açúcares redutores.

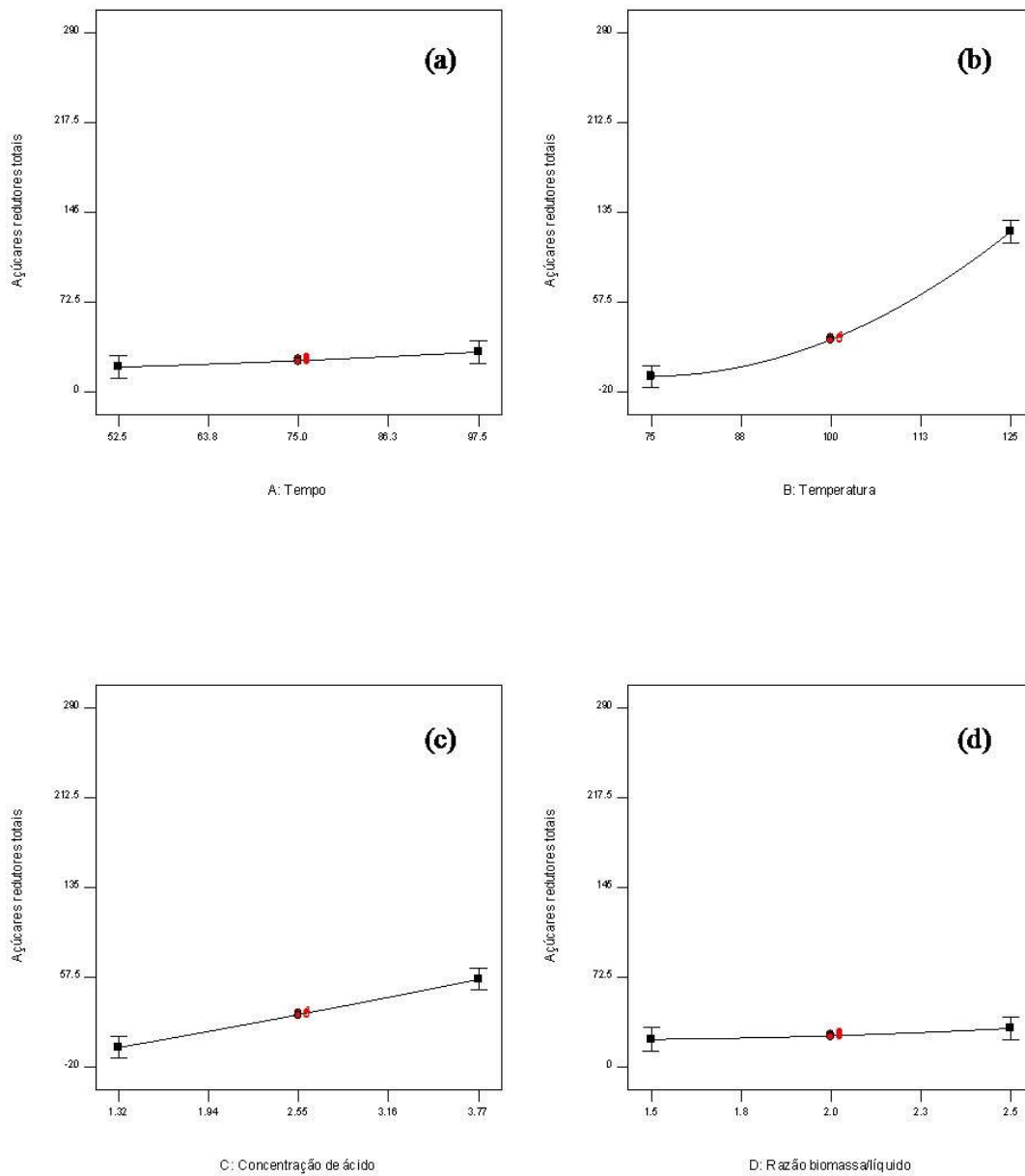


Figura 38 – Representação individual das variáveis (A, B, C, D) com as restantes condições constantes: **(a)** B = 100°C, C = 2,55% e D = 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido; **(b)** A = 75 min, C = 2,55% e D = 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido; **(c)** A = 75 min, B = 100°C e D = 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido; **(d)** A = 75 min, B = 100°C e C = 2,55%.

A influência de cada factor em interacção com os outros dois a dois, é mais fácil de observar nas Superfícies de Resposta (3D), onde a cor azul representa o valor mínimo e a cor vermelha o valor máximo, de açúcares redutores totais obtidos nos pré-tratamentos efectuados.

Na Figura 39 podemos analisar o efeito da interacção entre as variáveis tempo e temperatura, dependendo o valor da resposta quase exclusivamente da temperatura, com

elevados aumentos da quantidade de açúcares redutores para pequenos aumentos de temperatura.

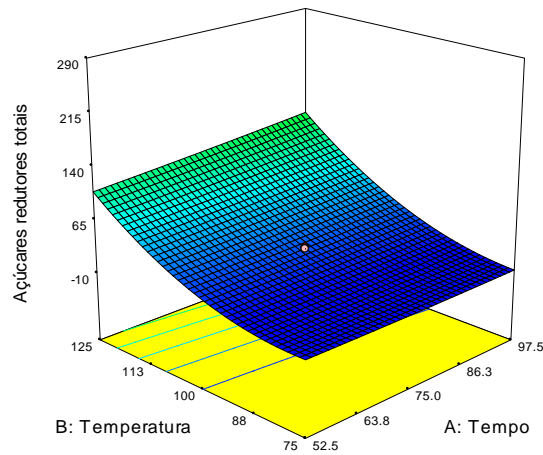


Figura 39 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da temperatura (B), mantendo fixas as variáveis (C) e (D), 2,55% e 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.

A Figura 40 exemplifica o efeito da interação entre as variáveis tempo e concentração de ácido, dependendo o valor da resposta quase exclusivamente desta última, com aumentos significativos na quantidade de açúcares redutores para pequenos aumentos de concentração.

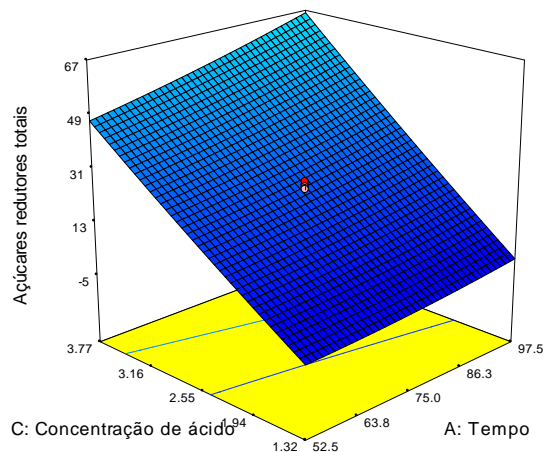


Figura 40 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da concentração de ácido (C), mantendo fixas as variáveis (B) e (D), 100°C, e 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.

A Figura 41 exemplifica o efeito da interacção entre as variáveis tempo e razão biomassa/líquido, dependendo o valor da resposta quase exclusivamente do tempo e muito pouco da relação biomassa/líquido. Para tempos mais elevados, de acordo a Figura 41, a relação biomassa/líquido apresenta um efeito bastante positivo aumentando a quantidade de açúcares redutores.

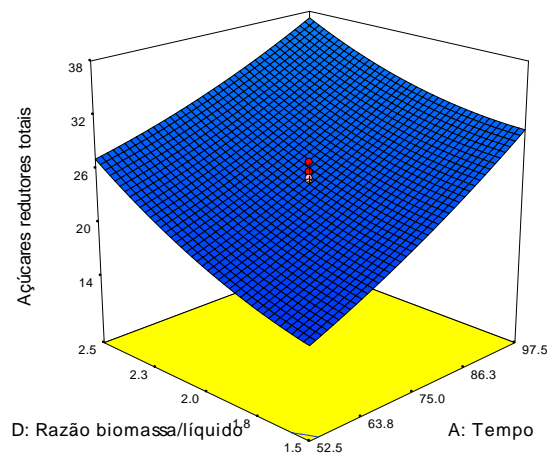


Figura 41 Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da razão biomassa/líquido (D) mantendo fixas as variáveis (B) e (C), 100°C e 2,55%, respectivamente.

A Figura 42 evidencia a interacção das variáveis que mais influenciam a resposta. O gráfico ilustra que para concentrações de ácido e temperaturas mais elevadas, o aumento dos açúcares redutores totais é bastante acentuado.

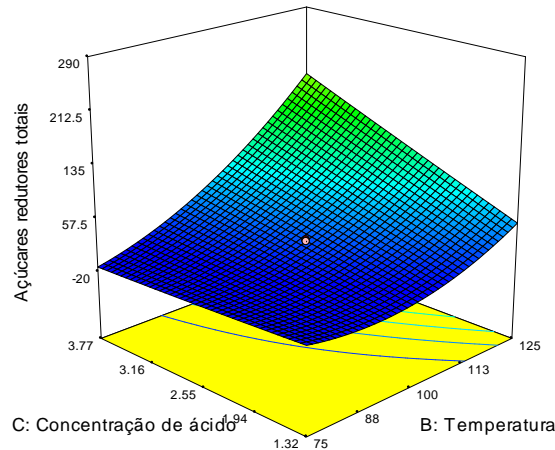


Figura 42 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (B) e da concentração de ácido (C) mantendo fixas as variáveis (A) e (D), 75 min e 2,0 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.

A Figura 43 evidencia a interacção de duas variáveis com efeitos bastante distintos na resposta. A temperatura é a variável que mais influência tem e que se faz notar bastante pela análise do gráfico, pelo contrário, a razão biomassa/líquido tem uma influência muito pequena, pelo que, a interacção entre as duas variáveis não é muito significativa.

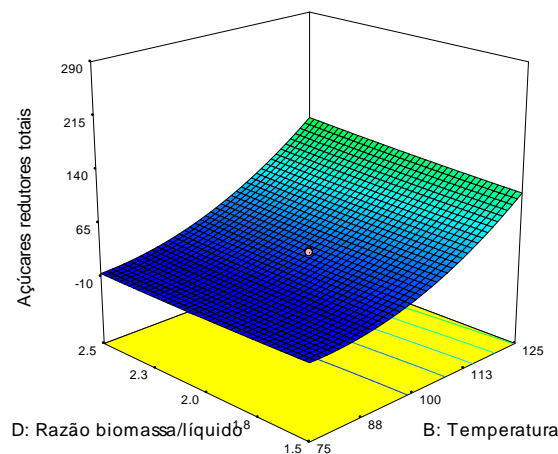


Figura 43 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (B) e da razão biomassa líquido (D) mantendo fixas as variáveis (A) e (C), 75 min e 2,55%, respectivamente.

Também a Figura 44 representa a interacção de duas variáveis com efeitos bastante distintos na resposta. A concentração de ácido é uma das variáveis que mais influencia, como se pode observar pela análise do gráfico que mostra um crescimento linear com o aumento da concentração. Pelo contrário a razão biomassa/líquido tem uma influência muito pequena, pelo que a interacção entre as duas variáveis não é muito significativa.

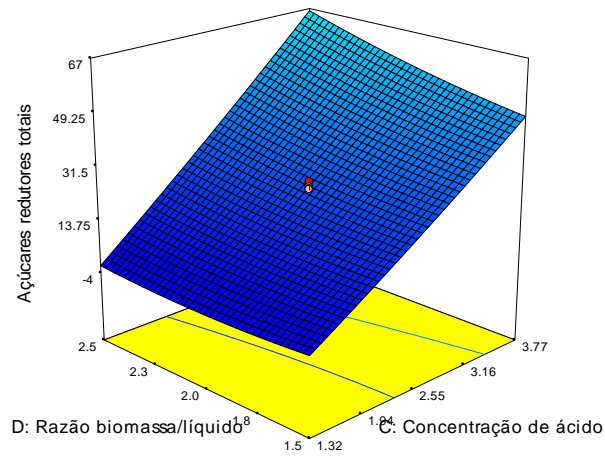


Figura 44 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da concentração de ácido (C) e da razão biomassa líquido (D) mantendo fixas as variáveis (A) e (B), 75 min e 100°C, respectivamente.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação da obtenção de açúcares redutores totais nos filtrados dos pré-tratamentos da giesta, pode dizer-se que o factor que mais influencia o resultado é a temperatura, seguida da concentração de ácido. A interacção destes dois factores é a que mostra efeitos mais evidentes para esta espécie arbustiva, tal como foi descrito em trabalho já publicado (Gil *et al.*, 2008).

2.3 Carqueja

Os resultados obtidos através do *software Design Expert* encontram-se descritos na Tabela 10, onde podemos observar a Matriz do *Design Experimental* (variáveis reais ou actuais) com a respectiva resposta ou efeito para a espécie arbustiva carqueja. O resultado dos ensaios de açúcares redutores pelo método DNS foi utilizado como resposta do pré-tratamento ácido.

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 – tempo, B – temperatura, C – concentração de ácido e D – razão biomassa/líquido, sendo a resposta açúcares redutores totais definida como (AR).

No estudo desta espécie arbustiva e atendendo ao estudo anterior da esteva e da giesta foram introduzidos condições e parâmetros diferentes no *software Design Expert*. Estas modificações foram no sentido de extremar as condições de forma a permitir tirar conclusões sobre a influência de cada variável. A alteração dos parâmetros do programa, nomeadamente o número de ensaios, teve como principal objectivo evitar desperdício de meios na realização de ensaios desnecessários, uma vez que essa mesma alteração permitiu reduzir significativamente o número de ensaios a realizar.

Tabela 10 – Matriz do desenho experimental realizado para a carqueja assim como a respectiva resposta.

Std	Run	A: Tempo [min]	B: Temperatura [°C]	C: Concentração de ácido [% w/w]	D: Razão Biomassa/Líquido [g biomassa/10 mL líquido]	Açúcares redutores totais [mg/g biomassa]
14	1	48,2	160	4,09	2,7	287,7
12	2	48,2	100	4,09	1,8	94,8
33	3	75,0	130	2,75	2,3	256,5
6	4	101,8	100	4,09	2,7	139,0
32	5	75,0	130	2,75	3,0	270,1
23	6	75,0	180	2,75	2,3	173,2
25	7	75,0	130	0,50	2,3	74,8
2	8	101,8	160	4,09	1,8	281,6
17	9	30,0	130	2,75	2,3	186,4
8	10	48,2	160	1,41	2,7	264,7
16	11	48,2	100	1,41	1,8	45,4
1	12	101,8	160	4,09	1,8	255,5
34	13	75,0	130	2,75	2,3	241,3
11	14	48,2	100	4,09	1,8	100,8
13	15	48,2	160	4,09	2,7	267,7
29	16	75,0	130	2,75	1,5	215,7
27	17	75,0	130	5,00	2,3	306,1
24	18	75,0	180	2,75	2,3	166,6
31	19	75,0	130	2,75	3,0	232,2
20	20	120,0	130	2,75	2,3	270,9
21	21	75,0	80	2,75	2,3	42,4
28	22	75,0	130	5,00	2,3	306,1
18	23	30,0	130	2,75	2,3	184,3
22	24	75,0	80	2,75	2,3	35,4
7	25	48,2	160	1,41	2,7	247,6
35	26	75,0	130	2,75	2,3	238,9
9	27	101,8	100	1,41	2,7	56,4
4	28	101,8	160	1,41	1,8	273,2
15	29	48,2	100	1,41	1,8	44,2
19	30	120,0	130	2,75	2,3	244,6
3	31	101,8	160	1,41	1,8	249,4
10	32	101,8	100	1,41	2,7	48,4
5	33	101,8	100	4,09	2,7	132,1
26	34	75,0	130	0,50	2,3	69,2
36	35	75,0	130	2,75	2,3	228,6
30	36	75,0	130	2,75	1,5	215,0

Na Tabela 11 podemos analisar a informação correspondente à análise de variância (ANOVA), para modelo da resposta.

Tabela 11 – Quadro ANOVA para a resposta dos açúcares redutores para a carqueja.

Fonte	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F	Prob > F p-valor
Modelo	262859,40	18775,67	20,89	<0,0001
A-Tempo	5241,76	5241,76	5,83	0,0250
B-Temperatura	17161,00	17161,00	19,09	0,0003
C-Concentração de ácido	45705,76	45705,76	50,84	<0,0001
D-Razão biomassa/líquido	1281,64	1281,64	1,43	0,2458
AB	132,70	132,70	0,15	0,7047
AC	62,81	62,81	0,07	0,7941
AD	18404,31	18404,31	20,47	0,0002
BC	2881,01	2881,01	3,20	0,0879
BD	1772,94	1772,94	1,97	0,1748
CD	493,95	493,95	0,55	0,4667
A ²	402,37	402,37	0,45	0,5108
B ²	48815,61	48815,61	54,30	<0,0001
C ²	5743,93	5743,93	6,39	0,0196
D ²	1,13E-05	1,13E-05	1,26E-08	0,9999
Residual	18878,25	898,96	-	-
Falta de ajuste	16307,15	8153,57	60,25	<0,0001
Erro	2571,10	135,32	-	-
Total	281737,66	-	-	-
R²	0,9330	-	-	-
R² (ajustado)	0,8883	-	-	-

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 0,9330, mostrando que 93,30% 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 <0,0001 para os desvios ao ajuste, indica que não existe falta de ajuste para o modelo, como é descrito por outros autores (Gouveia *et al.*, 2008).

A equação final ajustada para a resposta dos açúcares redutores é a seguinte:

$$AR = -1482,10 + 10,72 * A + 12,44 * B + 97,35 * C + 169,09 * D + 5,62 * 10^{-3} * A * B + 5,53 * 10^{-3} * A * C - 4,42 * A * D - 0,34 * B * C + 1,23 * B * D + 9,31 * C * D - 5,78 * 10^{-3} * A^2 - 5,15 * 10^{-2} * B^2 - 8,73 * C^2 + 3,49 * 10^{-3} * D^2$$

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 concentração de ácido e o efeito quadrático da temperatura são os factores que se revelam mais importantes na variação da resposta (p-valor <0,0001), devendo-se ter em conta o efeito linear da temperatura e a interacção dos factores tempo e razão biomassa/líquido que apesar de não apresentarem um p-valor <0,0001 o valor é muito pouco superior. São menos relevantes, mas também importantes por apresentarem níveis de significância (p-valor <0,05), o factor linear tempo e o factor quadrático concentração de ácido.

A concentração de ácido apresenta-se de facto como o factor mais importante na variação do valor de açúcares redutores totais por ser a variável que apresenta maior valor de F. O factor, razão biomassa/líquido apresenta-se como insignificante ou sem influência significativa.

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

A observação da Figura 45 permite verificar que os valores residuais se aproximam bastante da recta de linearidade, o que significa uma boa normalização no erro dos termos.

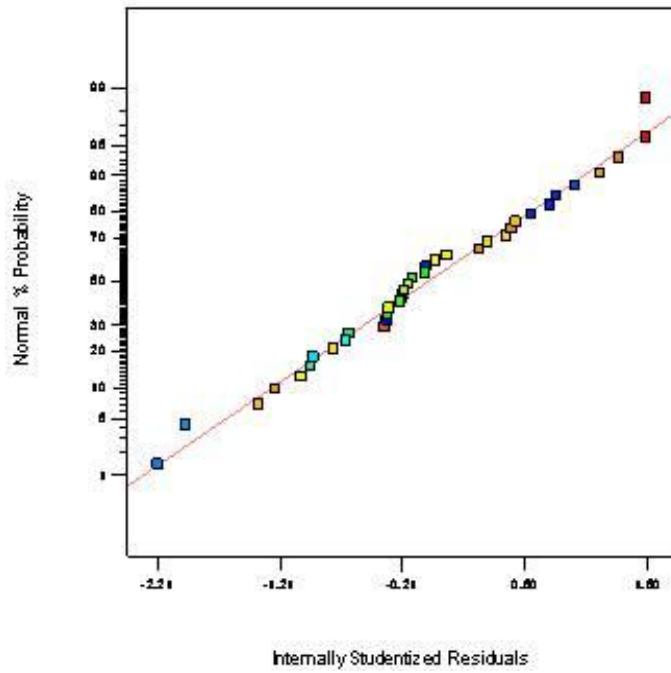


Figura 45 – Representação normal dos resíduos e da linha de linearidade.

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

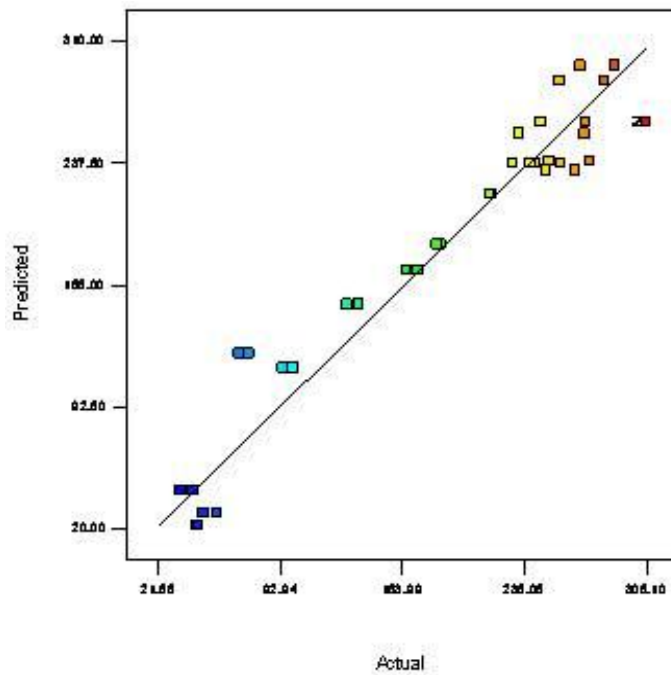


Figura 46 – Representação dos valores obtidos experimentalmente (*actual*) e através da equação de modelação (*predicted*).

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.

A influência dos diferentes factores e os respectivos efeitos positivos ou negativos na resposta, pode ser mais facilmente evidenciado através da análise gráfica individual de cada um dos factores (Figura 47).

De acordo com a Figura 47 (a), quando aumentamos o valor do factor tempo este tem influência positiva, observando-se um aumento dos açúcares redutores totais. O efeito da temperatura segue um comportamento parabólico [Figura 47 (b)], ou seja, tem influência marcadamente positiva até determinada temperatura, aproximadamente 140°C, verificando-se um decréscimo efectivo dos açúcares redutores totais para temperaturas superiores, tornando o efeito negativo muito acentuado. A análise da Figura 47 (c) ilustra a influência da variação da concentração de ácido, certificando que um aumento nesta variável implica um aumento significativo da quantidade de açúcares redutores, tendo este factor uma influência positiva sobre a resposta. A razão biomassa/líquido [Figura 47 (d)] têm efeito positivo sobre a resposta, mas o efeito é muito pouco relevante, observa-se um pequeno aumento da quantidade de açúcares redutores.

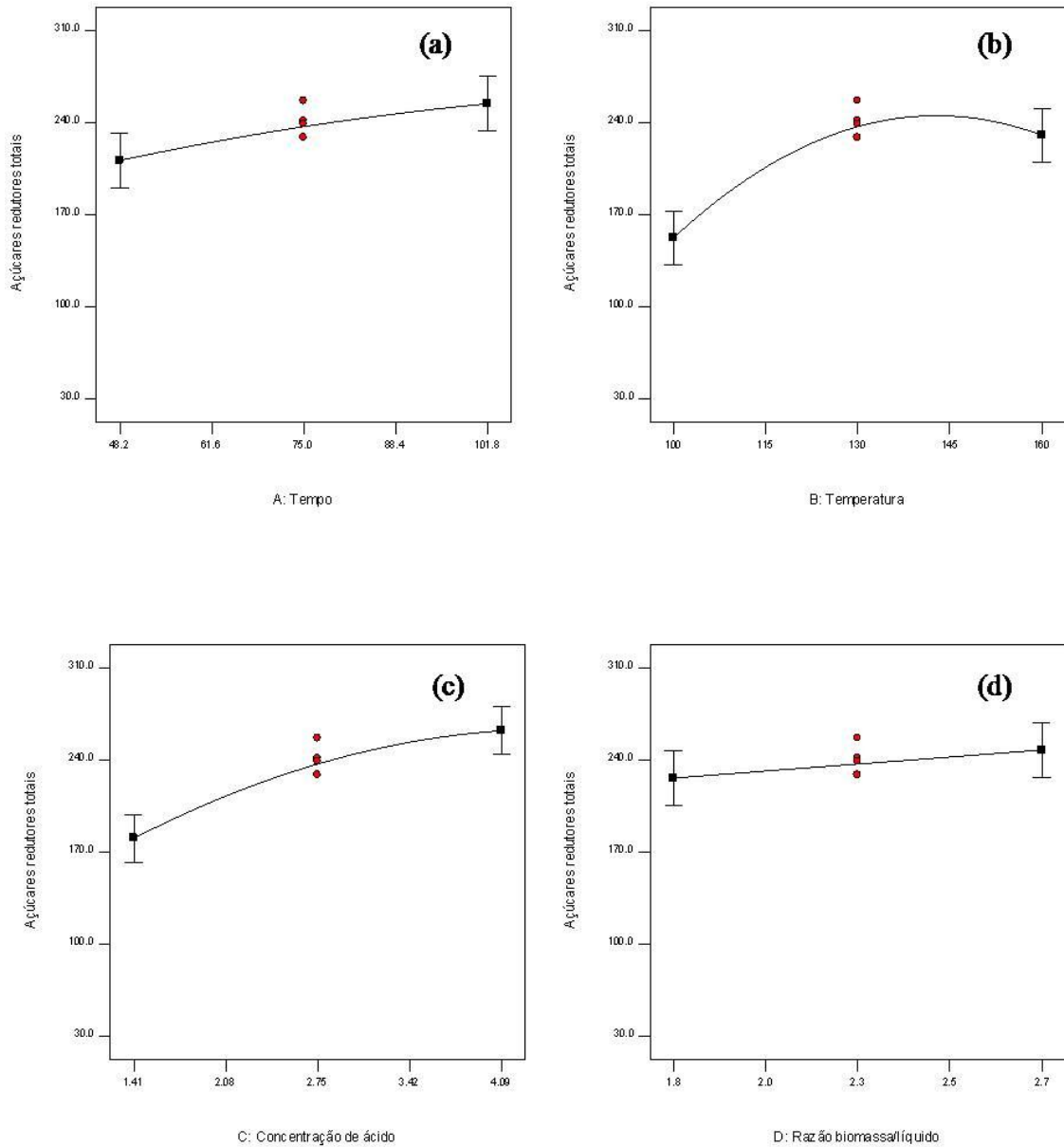


Figura 47 – Representação individual das variáveis (A, B, C, D) com as restantes constantes: **(a)** B = 130°C, C = 2,75% e D = 2,3 g biomassa/ 10 mL de líquido; **(b)** A = 75 min, C = 2,75% e D = 2,3 g biomassa/ 10 mL de líquido; **(c)** A = 75 min, B = 130°C e D = 2,3 g biomassa/ 10 mL de líquido; **(d)** A = 75 min, B = 130°C e C = 2,75%.

A influência de cada factor em interacção com os outros dois a dois, é mais fácil de observar nas Superfícies de Resposta (3D), onde a cor azul representa o valor mínimo e a cor vermelha o valor máximo, de açúcares redutores totais obtidos nos pré-tratamentos efectuados.

Na Figura 48 podemos analisar o efeito da interacção entre as variáveis tempo e temperatura, dependendo o valor da resposta quase exclusivamente da temperatura. Mas

a interacção das duas variáveis mostra-nos que a temperaturas próximas de 140°C e para tempos de reacção próximos de 100 minutos se obtêm maiores valores de açúcares redutores. Para temperaturas acima de 140 °C, observa-se uma diminuição de açúcares redutores totais, como já tinha sido referido na análise do gráfico (b) da Figura 47. Este efeito da temperatura é provavelmente devido ao facto de os açúcares libertados pela hidrólise ácida, a temperaturas elevadas, serem convertidos nos seus produtos de degradação (furfural, 5-hidroximetilfurfural, etc.). Estes produtos não são detectados e/ou doseados pelo método colorimétrico do DNS, o qual é específico para açúcares redutores. Esta diminuição na resposta não implica que para temperaturas elevadas, o pré-tratamento não resulta, terá é que ser utilizada outra resposta para seguir o método. A determinação do furfural, 5-hidroximetilfurfural e ácidos carboxílicos (acético, succínico, levulínico, fórmico, etc.) nos hidrolizados, deverá também ser utilizada como resposta neste plano experimental.

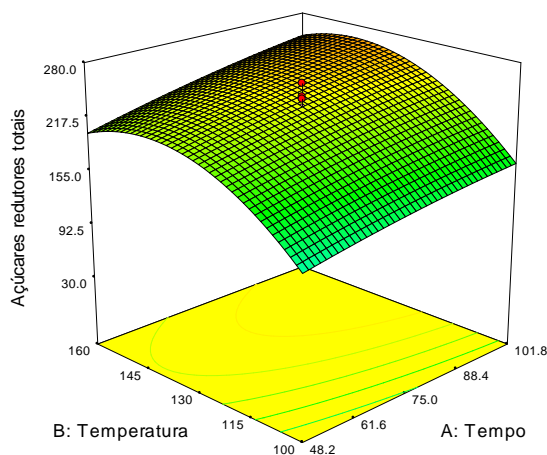


Figura 48 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da temperatura (B), mantendo fixas as variáveis (C) e (D), 2,75% e 2,3 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.

Contudo, atendendo ao objectivo principal deste tratamento, ou seja obter bioetanol no fim do processo, este início de degradação dos açúcares libertados deve ser indicativo de limite de temperatura para o pré-tratamento desta espécie. Os açúcares contidos nos hidrolizados irão ser subsequentemente fermentados a etanol e os produtos de degradação referidos são inibidores do processo de fermentação. Por outro lado, esta

degradação implica uma diminuição no rendimento final, já que os açúcares foram destruídos e portanto não podem ser transformados em bioetanol.

A Figura 49 exemplifica o efeito da interação entre as variáveis tempo e concentração de ácido, dependendo o valor da resposta quase exclusivamente desta última, com aumentos significativos na quantidade de açúcares redutores para pequenos aumentos de concentração. Podem mesmo ser atingidos valores bastante elevados, quando são utilizadas concentrações elevadas de ácido durante tempos de reacção de aproximadamente 100 min.

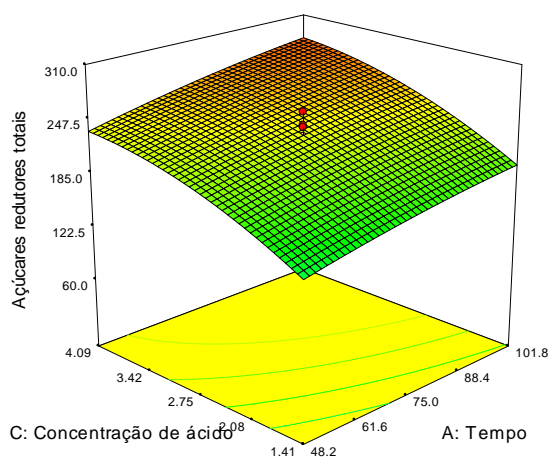


Figura 49 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da concentração de ácido (C), mantendo fixas as variáveis (B) e (D), 130°C, e 2,3 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.

A Figura 50 exemplifica o efeito da interação entre as variáveis tempo e razão biomassa/líquido, observando-se que os resultados mais significativos de açúcares redutores se obtêm quando uma das variáveis apresenta o valor máximo e a outra o mínimo e vice-versa. Para os valores mínimos de tempo e razão biomassa/líquido o valor de açúcares redutores é mínimo e para os máximos valores das variáveis a quantidade de açúcares redutores também é relativamente baixa. As variáveis apresentam efeitos positivos e negativos dependendo da zona de intervalo de variação em que se está a trabalhar.

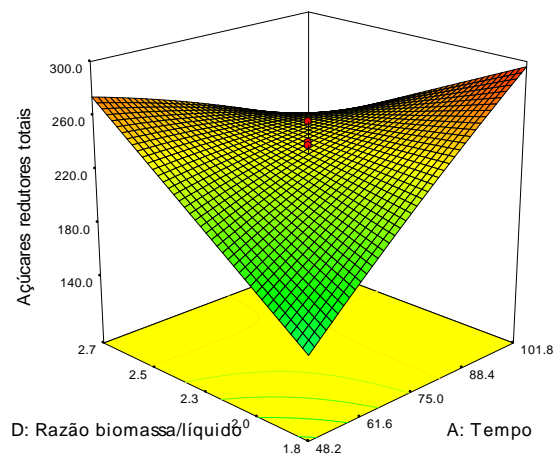


Figura 50 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função do tempo (A) e da razão biomassa/líquido (D), mantendo fixas as variáveis (B) e (C), 130°C e 2,75%, respectivamente.

A Figura 51 evidencia a interação das variáveis que mais influência tem sobre a resposta. O gráfico ilustra que para concentrações e temperaturas dentro de um certo intervalo se obtém a maior quantidade de açúcares redutores, não sendo os valores máximos das duas variáveis os mais eficientes.

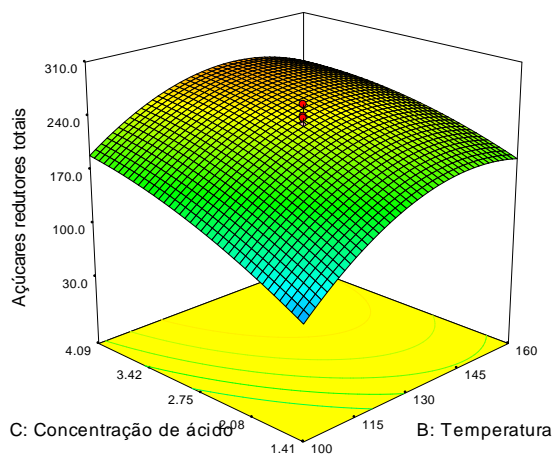


Figura 51 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (B) e da concentração de ácido (C), mantendo fixas as variáveis (A) e (D), 75 min e 2,3 g biomassa/ 10 mL de líquido, respectivamente.

A Figura 52 evidencia a interacção de duas variáveis com efeitos bastante distintos na resposta. A temperatura é uma das variáveis que mais influência tem e que se faz notar bastante pela análise do gráfico pelo contrário a razão biomassa/líquido tem uma influência muito pequena pelo que a interacção entre as duas variáveis não é muito significativa.

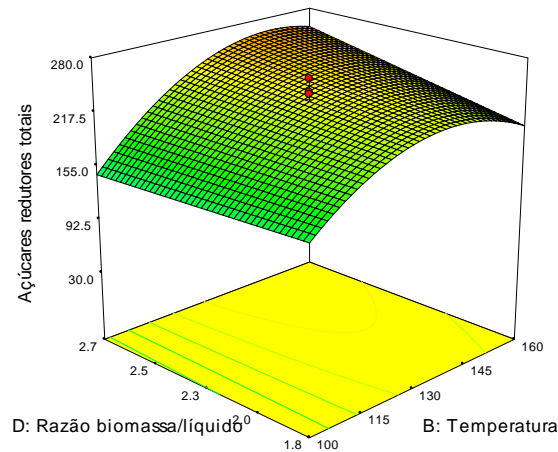


Figura 52 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da temperatura (B) e da razão biomassa/líquido (D), mantendo fixas as variáveis (A) e (C), 75 min e 2,75%, respectivamente.

Também a Figura 53 representa a interacção de duas variáveis com efeitos bastante distintos na resposta. A concentração de ácido é uma das variáveis que mais influência tem na resposta, no entanto a análise do gráfico elucidam-nos que a interacção destas duas variáveis não é efectivamente muito significativa, obtêm-se os maiores valores de remoção de açúcares quando se atingem os extremos superiores dos intervalos das variáveis.

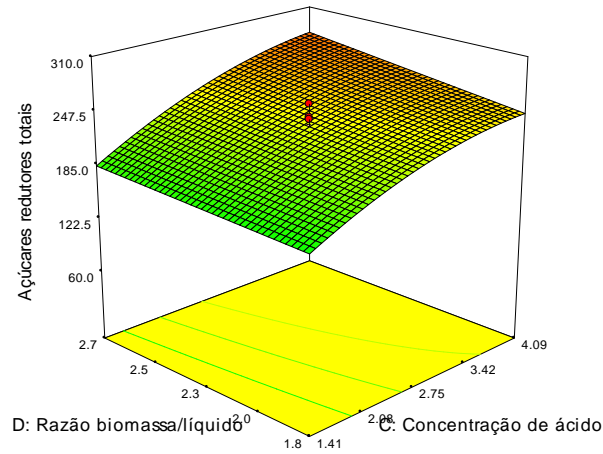


Figura 53 – Superfície de resposta (3D) para a equação, em função da concentração de ácido (C) e da razão biomassa/líquido (D), mantendo fixas as variáveis (A) e (B), 75 min e 130°C, respectivamente.

De acordo com a análise efectuada aos valores e gráficos obtidos para a modelação da obtenção de açúcares redutores totais nos filtrados dos pré-tratamentos pode dizer-se que o factor que mais influencia o resultado é a concentração de ácido seguido da temperatura. A interacção do tempo com a razão biomassa/líquido é o que nos mostra efeitos mais evidentes para esta espécie arbustiva.

4. Análise comparativa das três espécies arbustivas

A comparação da eficiência do pré-tratamento nas três espécies arbustivas (esteva, giesta e carqueja) utilizadas neste trabalho é muito importante, porque permite conhecer e realçar a efectividade de cada variável sobre a resposta e qual a influência que essa variável tem sobre a resposta de cada espécie. A Tabela 12 apresenta apenas os valores de p que conferem significância às variáveis, isto é apresentam p-valor <0,05.

Tabela 12 – Quadro resumo dos valores de “p” significativos obtidos pela análise ANOVA.

Fonte	Esteva Prob > F p-valor	Giesta Prob > F p-valor	Carqueja Prob > F p-valor
Modelo	<0,0001	<0,0001	<0,0001
A-Tempo	0,0012	0,0270	0,0250
B-Temperatura	<0,0001	<0,0001	0,0003
C-Concentração de ácido	<0,0001	<0,0001	<0,0001
D-Razão biomassa/líquido	-	-	-
AB	0,0181	0,0481	-
AC	-	-	-
AD	-	-	0,0002
BC	<0,0001	<0,0001	-
BD	-	-	-
CD	-	-	-
A ²	-	-	-
B ²	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C ²	-	-	0,0196
D ²	-	-	-
Falta de ajuste	<0,0001	<0,0001	<0,0001
R²	0,9845	0,9616	0,9330
R² (ajustado)	0,9790	0,9478	0,8883

A análise global da Tabela 12 permite-nos observar que não existem diferenças significativas no efeito que cada variável tem sobre cada espécie. No entanto, para a variável tempo, observa-se que esta é mais significativa para a Esteva do que para a Giesta e Carqueja. A variável linear razão biomassa/líquido não tem influência

significativa sobre a resposta, apesar de ter influência na interação com o tempo, para o pré-tratamento efectuado na carqueja. A Tabela 12 permite-nos observar também que os modelos obtidos para as três espécies são significativos, observando-se também os valores de R^2 , que é nos três casos superior a 0,9, o que indica que mais de 90% dos pontos obtidos se ajustam ao modelo.

Na Figura 54 encontra-se um gráfico com valores obtidos partindo das equações que modelam o pré-tratamento das espécies arbustivas estudadas.

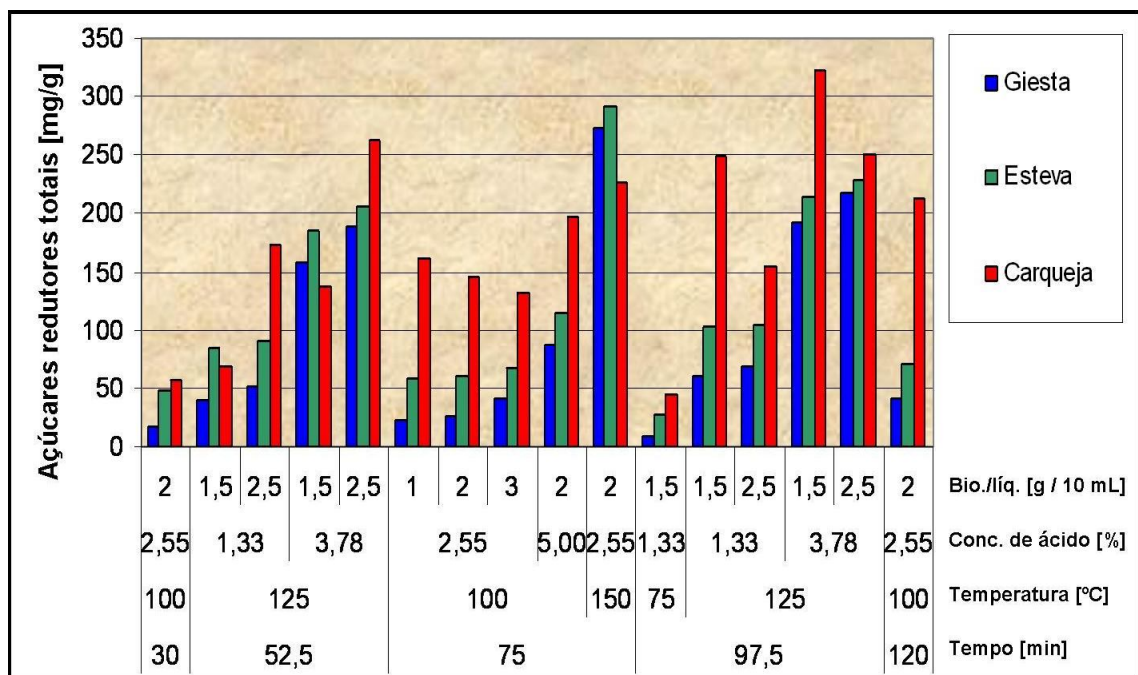


Figura 54 – Representação gráfica dos valores obtidos para os açúcares redutores totais, partindo das equações que modelam o pré-tratamento das espécies arbustivas estudadas.

O gráfico da Figura 54 ilustra claramente que a carqueja responde muito melhor ao pré-tratamento que as outras duas espécies, obtendo-se quantidades superiores de açúcares quando se têm condições de reacção semelhantes. É também explícito que se obtêm resultados bastante elevados de açúcares redutores totais para a espécie carqueja a temperaturas relativamente baixas, quando comparados com as outras espécies. É relevante o facto de na carqueja, a quantidade de açúcares ser menor para a temperatura de 150 °C, o que pode indicar uma degradação destes como já foi referido. Não existem diferenças significativas entre as espécies esteva e giesta, apresentando a giesta sempre valores inferiores mas sem diferenças significativas. Pela análise do gráfico pode

também confirmar-se, tal como mostrado Tabela 12, que a concentração de ácido e a temperatura são os factores que mais influenciam este processo. O tempo também tem uma influência significativa, quando se tem em conta as reacções efectuadas durante 30 e 60 minutos a 100 °C com 2,55 % de ácido sulfúrico e uma razão biomassa/líquido de 2 g/10 mL.

Capítulo IV – Conclusões e Perspectivas Futuras

Os materiais lenhocelulósicos são a matéria-prima renovável mais barata e abundante, a partir da qual podem ser produzidos biocombustíveis (Gregg *et al.*, 1998; Palmarola-Adrados *et al.*, 2005a; Demirbas 2007; Sassner *et al.*, 2008a; Sassner *et al.*, 2008b). A produção de etanol a partir de resíduos florestais pode ser vantajosa, devido à disponibilidade da matéria-prima e ao seu baixo custo (Muñoz *et al.*, 2007; Cara *et al.*, 2008a). Para tirar partido dos resíduos lenhocelulósicos como fonte de energia renovável, para produção de etanol, é importante transformá-los na maior quantidade possível de açúcares fermentáveis (Cara *et al.*, 2008a). A eficiência da conversão da biomassa em etanol depende sobretudo das características e composição da matéria-prima, do pré-tratamento e da tecnologia de fermentação utilizada (Cullis *et al.*, 2003; Dien *et al.*, 2006a).

A selecção do tipo de pré-tratamento é, possivelmente, o factor mais importante na economia do processo de produção de etanol, porque influencia o tratamento dos resíduos, a razão de conversão da celulose e a hidrólise dos açúcares das hemiceluloses e subsequente fermentação (Foyle *et al.*, 2007).

As três espécies estudadas neste trabalho, *Cistus ladanifer* (esteva) *Cytisus striatus* (giesta) e *Pterospartum tridentatum* (Carqueja), apresentam composições químicas e comportamentos durante o pré-tratamento ácido que permitem apresentá-las como potenciais fontes para produção de bioetanol.

A giesta, no que respeita a caracterização química, é a espécie que apresenta maior quantidade de polissacarídeos totais, quando considerado o arbusto completo. Atendendo a este facto, pode ser considerada a espécie arbustiva mais atraente quando o objectivo é a obtenção de açúcares. Contudo, de acordo com a remoção de açúcares redutores totais durante o pré-tratamento é claramente a espécie mais difícil de pré-tratar. A carqueja pelo contrário, sendo a espécie arbustiva que menor quantidade de polissacarídeos apresenta, é a espécie que melhor responde aos pré-tratamentos,

apresentando a esteva um comportamento intermédio, mas com resultados mais relevantes que a giesta.

O pré-tratamento com ácido diluído apresenta-se como bastante eficaz na solubilização de polissacarídeos existentes na biomassa, e portanto tornar estes materiais lenhocelulósicos mais acessíveis ao processo de sacarificação subsequente. As concentrações máximas de hidratos de carbono libertados, avaliados como açúcares redutores totais, foram de 302,2; 284,5 e 306,1 mg/g para a esteva, a giesta e a carqueja, respectivamente.

Os modelos quadráticos empíricos obtidos com elevada significância para a remoção de açúcares redutores totais podem ser utilizados no desenvolvimento da otimização 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, o tempo, a temperatura e a concentração de ácido para as espécies pré-tratadas neste trabalho, foram as variáveis que mais influência mostraram, permitindo uma otimização do processo.

Para a carqueja, o efeito da temperatura é bastante mais evidente, provavelmente devido ao facto de os açúcares libertados pela hidrólise ácida, a temperaturas elevadas, serem convertidos nos seus produtos de degradação. De notar que foram utilizadas temperaturas mais elevadas no caso desta espécie.

Atendendo ao objectivo principal deste tratamento, ou seja obter bioetanol no fim do processo, este início de degradação dos açúcares libertados deve ser indicativo de limite de temperatura para o pré-tratamento desta espécie. Os açúcares contidos nos hidrolizados irão ser subsequentemente fermentados a etanol e os produtos de degradação referidos são inibidores do processo de fermentação. Por outro lado, esta degradação implica uma diminuição no rendimento final, já que os açúcares foram destruídos e portanto não podem ser transformados em bioetanol.

Como perspectivas futuras e tendo em conta o trabalho realizado até aqui, torna-se bastante interessante a determinação de outros compostos existentes nos filtrados resultantes dos pré-tratamentos. Em especial, deverá ser efectuada a determinação do furfural, 5-hidroximetilfurfural e dos ácidos carboxílicos, a qual deverá também ser utilizado como resposta no plano experimental. A hidrólise enzimática pode apresentar-

se como uma resposta bastante interessante do ponto de vista do pré-tratamento, uma vez que a remoção de açúcares não permite obter uma noção clara da acessibilidade da celulose que poderia ser obtida através da hidrólise enzimática.

O conhecimento mais aprofundado da caracterização química das espécies, nomeadamente da quantidade de hidratos de carbono e da sua identificação, apresenta-se também como uma meta bastante importante.

Podem também ser investigadas combinações de diferentes factores do pré-tratamento, como a utilização de tamanhos maiores de partículas de biomassa, a qual é uma variável importante considerando o consumo de energia do processo.

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 seu comportamento individual.

Referências Bibliográficas

Ahring, B. K., Jensen, K., Nielsen, P., Bjerre, A. B., e Schmidt, A. S., “Pretreatment of wheat straw and conversion of xilose and xylan to ethanol by thermophilic anaerobic bacteria”, *Bioresource Technology*, 58: 107 – 113 (1996).

Balat, M., Balat, H., e Öz, C., “Progress in bioethanol processing” *Progress in Energy and Combustion Science*, 34: 551-573 (2008).

Bierman, J., “Handbook of pulping and papermaking”. 2^a ed., Academic press, (1996).

Bonini, C., D’Auria, M., Di Maggio, P. e Ferri, R., “Characterization and degradation of lignin from steam explosion of pine and corn stalk of lignin: The role of superoxide ion and ozone”, *Industrial crops and products*, 27: 182 – 188 (2008).

Boudet, A. M., Lapierre, C. e Grima-Petteanati, J., “Biochemistry and molecular biology of lignification”. *New Phytologist* 129: 203-236 (1995).

Brunow, G., Kilpelainen, I., Sipila, J., Syrjanen, K., Karhunen, P., Setala, H. e Rummakko, P., “Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin” in *Lignin and Lignan Biosynthesis*. Cap. 10. Eds. N.G. Lewis and S. Sarkanen, ACS Symp. Ser. 697, Washington, DC, 131-147, (1998).

Canettieri, E. V., Rocha, G. J. M., Carvalho Jr., J. A. e Silva, J. B. A., “Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology”, *Bioresource Technology*, 98: 422 – 428 (2007).

Cara, C., Ruiz, E., Oliva, J. M., Sáez, F. e Castro, E., “Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification”, *Bioresource Technology*, 99: 1869 – 1876 (2008a).

Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M. J., e Castro, E., “Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning”, *Fuel*, 87: 692-700 (2008b).

Cardona, C. A., e Sánchez, Ó. J., “Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities”, *Bioresource Technology*, 98: 2415 – 2457 (2007).

Casey, James P., “Pulp and Paper Chemistry and Chemical Technology”, Vol. I, John Wiley & Sons Inc., 3ª ed., New York, (1980).

Chandra, R. P., Bura, R., Mabee, W. E., Berlin, A., e Saddler, J. N., “Substrate pre-treatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?”, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108: 67-93 (2007).

Cullis, I. F., Saddler, J. N., e Mansfield, S. D., “Effect of initial moisture content and chip size on the bioconversion efficiency of softwood lignocellulosics”, *Wiley Interscience*, doi: 10.1002/bit.10905 (2003).

D’Almeida, M. L. O., “Celulose e papel, tecnologia de fabricação da pasta celulósica”, Vol. I, SENAI, Escola Theobaldo De Nigris, IPT, Centro Técnico em Celulose e Papel, (1981).

del Campo, I., Alegria, I., Zazpe, M., Echeverría, M., Echeverría I., “Diluted acid hydrolysis pretreatment of agri-food wastes for bioethanol production”, *Industrial crops and products*, 24: 214-221 (2006)

Demirbas, A., “Progress and recent trends in biofuels”, *Progress in Energy and Combustion Science*, 33: 1-18 (2007)

Dien, B. S., Jung, H.- J. G., Vogel, K. P., Casler, M. D., Lamb, J. F. S., Iten, L., Mitchell, R. B. e Sarath, G., ”Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass”, *Bioresource Technology*, 30: 880-891 (2006a).

Dien, B. S., Li, X.-L., Iten, L.B., Jordan, D. B., Nichols, N. N. e O’Bryan, P. J. e Cotta, M. A., “Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of monosaccharides”, *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 1137-1144 (2006b).

Duff, S. J. B. e Murray, W. D., “Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review”, *Bioresource Technology*, 55: 1 – 33 (1996).

Dumitriu, S., “Polysaccharides-structural, diversity and functional versatility”, Marcel Dekker, Inc., New York (1998).

Eriksson, T., Börjesson, J. e Tjerneld, F., “Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose”, *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 353 – 364 (2002).

Esau, K., “Anatomy of seed plants” 2^a ed., John Wiley & Sons, New York (1977).

Esteghlalian, A., Hashimoto, A. G., Fenske, J. J. e Penner, M. H., “Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass”, *Bioresource Technology*, 59: 129 – 136 (1997).

Fabião, A. M. D., “Árvores e florestas”, Publicações Europa-América, Lda, Mem Martins (1987).

Fang, Z., Sato, T., Smith, Jr. R. L., Inomata, H., Arai, K. e Kozinski, J. A., “Reaction chemistry and phase behavior of lignin in high-temperature and supercritical water”, *Bioresource Technology*, 99: 3424 – 3430 (2008).

Fengel, D. e Wegener, G., “wood chemistry, ultrastructure, reactions”, Walter de Gruyter, Berlin (1984).

Foyle, T., Jennings, L. e Mulcahy, P., “Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw” *Bioresource Technology*, 98: 3026 – 3036 (2007).

Galbe, M. e Zacchi, G., “A review of the production of ethanol from softwood”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 59: 618 – 628 (2002).

Galbe, M. e Zacchi, G., “Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production”, *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 108: 41-65 (2007).

Gil, N., Domingues, F. C., Amaral, M. E. e Duarte, A. P., “Chemical composition and acid pretreatment of *Cytisus striatus* and *Cistus ladanifer* for bioethanol production”, *in* Proceedings of the Bioenergy: Challenges and opportunities, (vol I), International conference and exhibition on bioenergy, 6 – 9 April 2008, Universidade do Minho, Guimarães, Portugal, (2008).

Glasser, W. G., e Wright, R. S., “Steam-assisted biomass fractionation. II. Fractionation behaviour of various biomass resources”, *Biomass and Bioenergy*, vol. 14, 3: 219-235 (1998).

- Gouveia, I. C., Fiadeiro, J. M. e Queirós, J. A., “Enzymatic removal of plant residues from wool: Application of experimental design techniques for optimization parameters”, *Biochemical Engineering Journal*, 41: 157-165 (2008).
- Guo, G.-L., Chen, W.-H., Men, L.-C., e Hwang, W.-S., “Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production”, *Bioresource Technology*, 99: 6046 – 6053 (2008).
- Gray, K. A., Zhao, L. e Emptage, M., “Bioethanol”, *Current Opinion in Chemical Biology*, 10: 141 – 146 (2006).
- Gregg, D. J., Boussaid, A. e Saddler, J. N., “Techno-economic evaluations of a generic wood-to-ethanol process: effect of increased cellulose yields and enzyme recycle”, *Bioresource Thechnology*, 63: 7 – 12 (1998).
- Hakkila, P., “Structure and properties of wood and woody biomass” in Kellomäki, Seppo, (Ed) “Forest resources and sustainable management”, book 2, Finnish paper Engineers` Association and TAPPI, Jyväskylä, Finland, (2000).
- Hamelinck, C. N. e Faaij, A. P. C., ”Outlook for advanced biofuels”, *Energy Policy*, 34: 3268 – 3283 (2006).
- Hamelinck, C. N., Hooijdonk, G. V. e Faaij, A. P. C., “Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term”, *Biomass and Bioenergy*, 28: 384 – 410 (2005).
- Herrera, A., Téllez – Luis S. J., González – Cabriales, J. J., Ramírez, J. A. e Vázquez, M., “Effect of hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure”, *Journal of Food Engineering*, 63: 103 – 109 (2004).
- Hinkelmann, K. e Kempthorne, O., “Design and analysis of experiments”, Vol. 2 “Advanced experimental design”, Wiley series in probability and statistics, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, (2005).
- Hodge, D. B., Karim, M. N., Schell, D. J. e McMillan J. D., “Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose”, *Bioresource Technology*, doi:10.1016/j.biortech.2008.05.015 (2008).

Hunter, J. S., “Design and analysis of experiments”, “Section 47” in Joseph M. Juran, J. M. e Godfrey A. B., *Juran's Quality Handbook*, 5ª ed., McGraw-Hill, New York, (1999).

Inventário Florestal 2001 em http://www.pefc-portugal.cffp.pt/floresta_pratic.html consultado em 12-2007.

Iranmahboob, J., Nadim, F. e Monemi, S., “Optimizing acid – hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips”, *Biomass and Bioenergy*, 22: 401 – 404 (2002).

Kirk, T. e Cullen, D. “enzymology and molecular genetics of wood degradation by with rot fungi” in Young, R. A., Atkhar, M., (Eds.) “Environmentally Friendly Technologies for Pulp and Paper Industry”, John Wiley & Sons, Inc (1998).

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

Koga, M. E. T., “Matérias-primas fibrosas” in Carvalho, M. R. (Ed), “Celulose e papel. Tecnologia de fabricação da pasta celulósica”, 2ª ed., S. Paulo (1998).

Kuhad, R. C., Singh, A. e Erikson, K. “ Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls” in “Biotechnology in the Pulp and Paper Industry”, Sheper, T., Spingger Berlin/Helsinberg (1997).

Lapointe, R. E., “Précis de chimie de la cellulose”, Centre collégial de developpment de matériel didactique, Montréal (1989).

Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn – Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G. e Nilvebrant, N.-O., “The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood”, *Enzyme and Microbial Technology*, 24: 151 – 159 (1999).

Lazic Z. R., “Statistics for Engineers, Design of Experiments in Chemical Engineering: A, Practical Guide”, Wiley-VCH., Germany (2004).

McDonald, R. G., “Pulp and paper manufacture”, Vol. I, McGraw-Hill, New York, (1969).

McKendry, P., “Energy production from biomass (part 2): overview of biomass”, *Bioresource Technology*, 83: 47 – 54 (2002a).

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

Miller, G.L., “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”, *Anal. Chem.* 31, 426–428 (1959).

Montgomery, D. C., “Design and Analysis of Experiments”, 5^a ed., John Wiley & Sons, New York, (2000).

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M. e Ladisch, M., “Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass”, *Bioresource Technology*, 96: 673 – 686 (2005).

Muñoz, C., Mendonça, R., Baeza, J., Berlin, A., Saddler, J., e Freer, J., “Bioethanol production from bio-organosolv pulps of *Pinus radiata* and *Acacia dealbata*”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82: 767 – 774 (2007).

Oak Ridge National Laboratory, em www.ornl.gov/sci/besd/highlights/biorefinery.gif consultado em 07-2008.

Office of Biological and Environmental Research, U.S. Department of Energy Office of Science em <http://genomics.energy.gov/> consultado em 04-2008.

Öhgren, K., Vehmaanperä, J., Siika-Aho, M., Galbe, M., Viikari, L. e Zacchi, G., “High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production”, *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 607 – 613 (2007).

Palmarola-Adrados B., Choteborská, P., Galbe, M. e Zacchi, G., “Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran”, *Bioresource Technology*, 96: 843 – 850 (2005a).

Palmarola-Adrados, B., Galbe, M., e Zacchi, G., “Pretreatment of barley husk for bioethanol production”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80: 85 – 91 (2005b).

Pereira, H. “Variability in the chemical composition of plantation Eucalypts (*Eucalyptus globulus*)”, *Wood and Fiber Science*, 20 (1): 82-90 (1988).

Rowell, R. M., Pettersen, R., Han, J. S., Rowell, J. S. e Tshabalala, M. A., “Cell Wall Chemistry” in Rowell R. M., (Ed), “Handbook of Wood Chemistry and wood composites”, Taylor & Francis, Florida (2005).

Saha, B. C., Iten, B. L., Cotta, M. A. e Wu, Y. V., “Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol”, *Process Biochemistry*, 40: 3693-3700 (2005).

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

Sassner, P., Galbe, M. e Zacchi G., “Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content”, *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 756 – 762 (2006).

Sassner, P., Martensson, C.-G., Galbe, M. e Zacchi G., “Steam pretreatment of H₂SO₄-impregnated *Salix* for the production of bioethanol”, *Bioresource Technology*, 99: 137 – 145 (2008a).

Sassner, P., Galbe, M. e Zacchi G., “Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials”, *Biomass and Bioenergy*, 32: 422 – 430 (2008b).

Silverstein, R. A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Boyette, M. D. e Osborne, J., “A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks”, *Bioresource Technology*, 98: 3000 – 3011 (2007).

Sjöström, E. “Wood chemistry: Fundamentals and application”, Academic Press Inc. San Diego. (1981).

Söderström, J., Pilcher, L., Galbe, M., e Zacchi, G., “Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production”, *Biomass and Bioenergy*, 24: 475-486 (2003).

Spigno, G., Pizzorno, T., e De Faveri, M. D., “Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks”, *Bioresource Technology*, 99: 4329 – 4337 (2008).

Screenath, H. K., e Jeffries, T. W., “Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts”, *Bioresource Technology*, 72: 253 – 260 (2000).

Sun, Y. e Cheng, J., “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol productions: a review”, *Bioresource Technology*, 83: 1-11 (2002).

Sun, Y. e Cheng, J. J., “Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production”, *Bioresource Technology*, 96: 1599 – 1606 (2005).

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

Teramoto, Y., Tanaka, N., Lee, S-H., e Endo, T., “Pretreatment of Eucalyptus wood chips for enzymatic saccharification using combined sulfuric acid-free ethanol cooking and ball milling”, *Biotechnology and Bioengineering*, doi:10.1002/bit. 21522 (2007).

Teramoto, Y., Lee, S-H., e Endo, T., “Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking”, *Bioresource Technology*, doi:10.1016/j.biortech.2008.04.049 (2008).

Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J. e Boerjan, W., “lignin engineering”, *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 278 –285 (2008).

Vázquez, M., Oliva, M., Téllez-Luis, S. J. e Ramírez, J. A., “Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production”, *Bioresource Technology*, 98: 3053 – 3060 (2007).

Weng, J.-K., Li, X., Bonawitz, N. D. e Chapple, C., “Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production”, *Current Opinion in Biotechnology*, 19:166–172 (2008).

Bioenergy: Challenges and Opportunities

International Conference and Exhibition on
Bioenergy

April 6th – 9th 2008

Universidade do Minho, Guimarães, Portugal

CHEMICAL COMPOSITION AND ACID PRETREATMENT OF *CYTISUS STRIATUS* AND *CISTUS LADANIFER* FOR BIOETHANOL PRODUCTION

Gil, N.¹, Domingues, F.C.^{1,2}, Amaral, M.E.^{1,3}, Duarte, A.P.^{1,3*}

¹Research Unit of Textile and Paper Materials, Universidade da Beira Interior, 6201-001 Covilhã, Portugal

²Department of Chemistry, Universidade da Beira Interior, 6201-001 Covilhã, Portugal

³Department of Paper Science and Technology, Universidade da Beira Interior, 6201-001 Covilhã, Portugal

*apduarte@ubi.pt

ABSTRACT

Lignocellulosic materials are an alternative source for ethanol production. *Cytisus striatus* (broom) and *Cistus ladanifer* (rock-rose) are arbustive species abundant in temperate zones and are available as forest residues. In the bioconversion of lignocellulosic materials to ethanol, is crucial a pretreatment of the material prior to enzymatic hydrolysis in order to obtain high overall yields of carbohydrates and ethanol. In this study, it was evaluated the effect of reaction temperature, residence time, sulfuric acid concentration and vegetal/liquid ratio on the content of released sugars in the hydrolysates resulting from pretreatment of broom and rock-rose. Batch reactions were carried out under various operating conditions and Response Surface Methodology (RSM) was used to optimize the pretreatment process in order to obtain high total sugars yield. The maximum concentration of total sugars found was 302.2 and 284.5 mg/g for rock-rose and broom, respectively. These results were achieved when reaction was performed at 150 °C during 75 minutes with 2.55 % of sulfuric acid and a vegetal/liquid ratio of 2 g/10 mL.

Keywords: *Cytisus striatus*; *Cistus ladanifer*; Bioethanol; Biomass; Diluted acid pretreatment

INTRODUCTION

In recent years, research and development efforts directed toward production of ethanol as the most promising biofuel from renewable resources, have increased. The developing of alternative resources to fossil fuels like biofuels from lignocellulosic materials is especially relevant in Portugal, where the forest covers around 38% of the territory. This forest area could represent a large quantity of forestry residues (pruning) and shrub species that can be used as raw material for bio-ethanol production. The usual renewable raw materials used in bioethanol production are corn grain and sugar cane, which supply can be limited in near future. Therefore lignocellulosic biomass is seen as an attractive feedstock for ethanol production in the future [1,2,3].

A crucial step in the production of ethanol from lignocellulosic materials is the hydrolysis of carbohydrates to monomeric sugars that can be further fermented to ethanol. The most promising method is the enzymatic hydrolysis; however it is necessary to improve the carbohydrates accessibility to enzymatic attack, what can be performed with physico-chemical pretreatments [2-6]. Pretreatment of lignocellulosic materials is required to disorganize crystalline structure of cellulose in order to expose it and modify the pores in material to allow the enzymes to penetrate into the fibres and hydrolyze the cellulose to monomeric fermentable sugars [3,7]. Moreover, hemicelluloses can be effectively solubilized into monomeric sugars and soluble oligomers, wich is achieved by dilute acid pretreatment with sulfuric acid [8]. This pretreatment has been widely studied for all the raw materials used as feedstock for ethanol production, including lignocellulosic biomass [8-13].

In the present work, the optimisation of dilute acid pretreatment conditions of two species from forest biomass, namely *Cytisus striatus* (broom) and *Cistus ladanifer* (rock-rose), was studied with the purpose of ethanol production. Although, different lignocellulosic materials have been

investigated for this purpose, dilute sulfuric acid pretreatment and saccharification of these species have not been reported. The biomass samples were characterized for chemical composition in different fractions of the vegetal and in the whole plant. The aim of this investigation was to determine the effect of acid concentration, temperature, residence time and vegetal-to-liquid ratio on release of total reducing sugars from each species of biomass feedstock. In order to attain high levels of released sugars, process optimization was followed using response surface methodology (RSM) with central composite as statistical design.

EXPERIMENTAL

Raw material

The shrubs were harvested in May 2007 and stored at room temperature during three months. Both plants consisted of stalks and leaves and were milled in a Retsch cutting mill to pass a 40-mesh sieve to a 40 mesh sieve, for the composition analysis. The feedstock for the pretreatment was milled to a particle size between 0.180 mm and 0.500 mm.

Analytical methods

The composition of the biomass with respect to extractives, acid insoluble lignin, acid soluble lignin and ashes was determined according to TAPPI standard methods. The reducing carbohydrates of filtrates from pretreatments were determined by the dinitrosalicylic acid (DNS) method [14]. All analyses were done in triplicate.

Acid pretreatment

Dilute acid pretreatments were carried out in 200 mL steel reactors immersed in a heating PEG 400 bath including agitation and controlled temperature systems. Whole plant samples (15 g, oven dry) were mixed with different volumes of diluted sulfuric acid (0.1 – 5.0% w/w). The volumes of diluted acid were set according to different plant/liquid ratios, 1 – 3 (g dried plant/10 mL liquid). Operating temperature was varied between 50 and 150 °C and residence times between 30 and 120 minutes. After reaction was completed, solids were separated from aqueous solution by filtration. The filtrates were analyzed for total reducing carbohydrates after neutralization with $\text{BaOH}\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ to pH 6.5-7.0. The solid precipitate was removed by centrifugation.

Experimental design

The experimental plan used the response surface methodology (RSM) to optimize the acid pretreatment conditions. In this respect, a rotatable central composite design was applied and the design consisted of 54 experiments with 6 center points. The studied factors were temperature, residence time, sulfuric acid concentration and vegetal-to-liquid ratio with total reducing carbohydrates in the hydrolysates as response. The quadratic model was selected for predicting the optimal point and the regression analysis was performed by Design Expert v. 7.1 (Stat-Ease Inc. Minneapolis).

RESULTS AND DISCUSSION

Biomass composition

The composition of the two shrub species used in this study is present in Table 1. The chemical composition varies depending on the species and plant fraction. The carbohydrate content was calculated by difference from the other determined components (extractives, ash and total lignin). The use of this calculated value take into account that the calculated total carbohydrate fraction is usually 3-4% larger than the determined holocellulose fraction [15] and this fraction can be around 17% higher than the sugar fraction determined by HPLC analysis [9].

The total lignin content of the two species is comparable to the lignin content of softwoods (27-30%), rather than that of herbaceous species and agricultural residues (5-20%) [1]. It is higher in the whole plant, which was used for the pretreatment, than in the stalks.

Pretreatment

The release of total reducing sugars in the hydrolysate was dependent on experimental operating conditions, as expected (Fig. 1). It was also observed that broom and rock-rose showed different

behaviors, with the first species giving smaller yields, specially in the case of milder operating conditions. Maximum concentration of reducing sugars (302.2 and 284.5 mg/g for rock-rose and broom, respectively) was achieved when reaction was carried out at 150 °C during 75 minutes with acid concentration maintained at 2.55 % and using a vegetal/liquid ratio of 2 g/10 mL (Table 2). These values are very close to those obtained for other species pretreated with similar conditions [8,10-12].

Table 1. Biomass chemical composition (on an oven-dry basis).

Species		Extractives [%]	Ash [%]	Insoluble lignin [%]	Soluble lignin [%]	Total lignin [%]	Total carbohydrates [%] ^a
Rock-rose	Stalks without bark	1.8	0.8	23.0	1.9	24.9	72.5
	Whole plant ^b	7.4	3.1	32.0	2.2	34.2	55.3
Broom	Stalks without bark	3.4	0.6	22.0	2.1	24.1	71.9
	Whole plant ^b	4.7	0.8	22.4	2.3	24.7	69.8

^aCalculated by difference from the other determined components. ^bWood, bark and leaves.

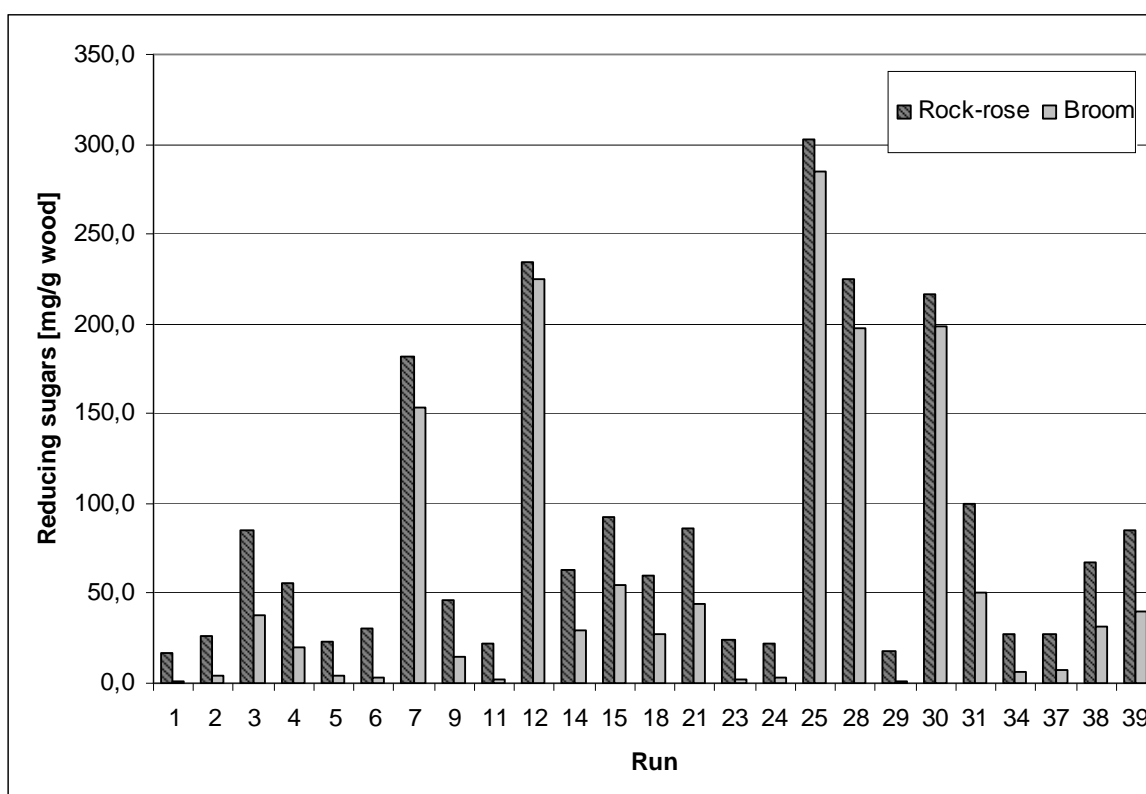


Fig. 1. Total reducing sugars released under various pretreatment conditions for both species.

The normalized independent process variables for all the experiments, reaction time (t), reaction temperature (T), acid concentration (AC) and vegetal/liquid ratio (VL), as well as the dependent variable or response for both biomass species are given in Table 2.

Table 2. Experimental design and results obtained with biomass acid pretreatment.

Run	Time [min]	Temperature [°C]	Acid concentration [% w/w]	Vegetal/liquid ratio [g wood/10 mL liquid]	Total reducing sugars [mg/g wood]	
					rock-rose	broom
1	52.5	75	1.325	2.5	16.8	1.5
2	52.5	75	3.775	1.5	26.0	4.3
3	52.5	125	1.325	1.5	84.7	37.5
4	75	100	2.55	1	56.1	20.0
5	52.5	75	3.775	2.5	23.2	4.4
6	75	100	0.1	2	30.5	3.7
7	52.5	125	3.775	1.5	182.1	153.5
8	52.5	75	3.775	1.5	23.7	4.6
9	30	100	2.55	2	46.4	14.6
10	52.5	75	1.325	2.5	19.2	2.4
11	52.5	75	1.325	1.5	21.8	2.4
12	97.5	125	3.775	2.5	234.3	224.9
13	52.5	75	1.325	1.5	22.9	2.4
14	75	100	2.55	3	63.5	29.5
15	97.5	125	1.325	2.5	92.2	54.4
16	52.5	125	3.775	1.5	184.4	157.2
17	75	100	2.55	1	54.9	20.6
18	75	100	2.55	2	60.3	26.9
19	97.5	125	1.325	2.5	95.9	50.0
20	75	100	2.55	3	63.2	30.6
21	75	100	5	2	85.8	43.9
22	52.5	125	1.325	1.5	82.4	28.5
23	97.5	75	1.325	1.5	23.7	2.5
24	97.5	75	1.325	2.5	22.6	2.7
25	75	150	2.55	2	302.2	284.5
26	52.5	75	3.775	2.5	24.9	5.6
27	75	150	2.55	2	282.8	278.3
28	97.5	125	3.775	1.5	224.6	198.0
29	75	50	2.55	2	18.2	1.2
30	52.5	125	3.775	2.5	216.7	198.1
31	97.5	125	1.325	1.5	100.1	50.9
32	97.5	125	1.325	1.5	97.0	51.4
33	97.5	125	3.775	2.5	240.7	243.9
34	97.5	75	3.775	1.5	27.5	6.2
35	97.5	125	3.775	1.5	221.4	205.2
36	75	50	2.55	2	18.1	1.4
37	97.5	75	3.775	2.5	27.3	7.4
38	120	100	2.55	2	66.9	31.3
39	52.5	125	1.325	2.5	85.3	39.6
40	97.5	75	3.775	2.5	25.0	7.1
41	75	100	2.55	2	60.9	24.6
42	120	100	2.55	2	66.7	29.6
43	97.5	75	1.325	1.5	19.7	2.7
44	30	100	2.55	2	44.4	15.1
45	97.5	75	1.325	2.5	20.2	1.9
46	75	100	2.55	2	59.4	24.3
47	52.5	125	1.325	2.5	86.3	41.7
48	75	100	0.1	2	28.5	3.5
49	75	100	5	2	87.3	41.0
50	75	100	2.55	2	61.5	25.7
51	97.5	75	3.775	1.5	27.0	6.0
52	52.5	125	3.775	2.5	214.9	202.3
53	75	100	2.55	2	59.7	25.1
54	75	100	2.55	2	61.3	25.8

The quadratic models obtained for both species are shown in Eqs. 1 (rock-rose) and 2 (broom), where (TS) represents total reducing sugars, as a function of reaction time (t), reaction temperature (T), acid concentration (AC) and vegetal/liquid ratio (VL).

$$TS = 511.28310 - 0.56484*t - 8.90017*T - 94.82212*AC - 36.89716*VL + 8.61434*10^{-3}*t*T + 0.090639*t*AC - 0.11745*t*VL + 0.97698*T*AC + 0.25696*T*VL + 5.31666*AC*VL - 2.89909*10^{-4}*t^2 + 0.039448*T^2 + 0.22391*AC^2 + 2.73425*VL^2 \quad (1)$$

$$TS = 736.35034 - 1.28441*t - 12.14981*T - 125.77382*AC - 69.29846*VL + 0.011744*t*T + 0.12245*t*AC - 0.099314*t*VL + 1.22663*T*AC + 0.42680*T*VL + 7.29412*AC*VL + 1.77585*10^{-3}*t^2 + 0.65717*AC^2 + 6.09208*VL^2 \quad (2)$$

The analysis of variance (ANOVA) of the definitive second order model for TS response of both species showed that these models have a significance level of 0.01%. The model terms are significant at more than 95% of confidence level. The model exhibited a correlation coefficient (R^2) of 0.9845 in (1) and 0.9616 in (2), showing that 98.45% and 96.16% of data points fitted the model corresponding to eq. 1 and eq. 2, respectively. Calculated total reducing sugars (Eqs. 1 and 2) differ by less than 10% from their experimental counterparts.

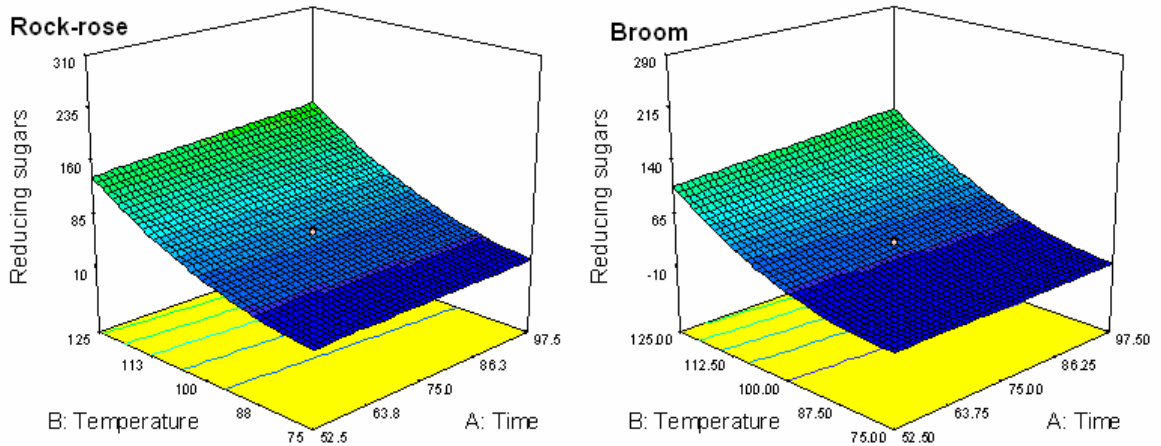


Fig. 2. Effect of reaction temperature and residence time on total reducing sugars released when acid concentration was maintained at 2.55% and vegetal/liquid ratio at 2 g/10 mL, for both species studied.

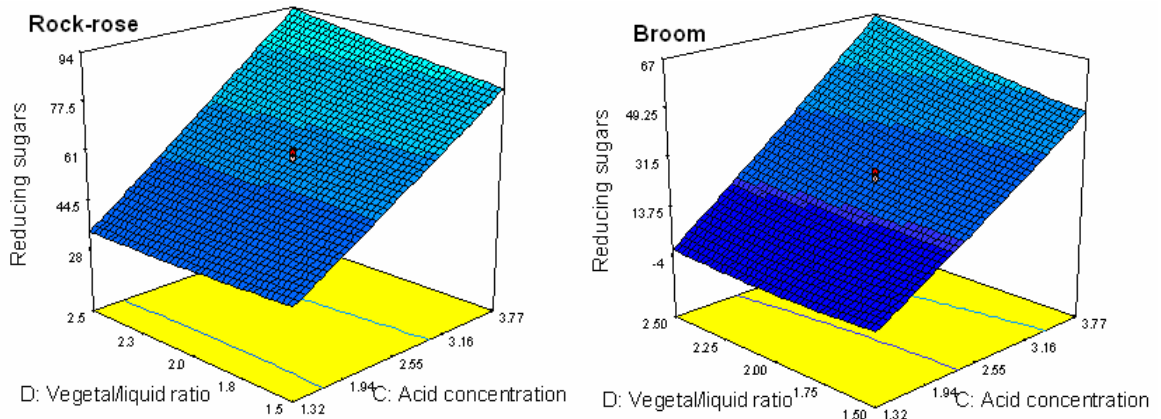


Fig. 3. Effect of acid concentration and vegetal/liquid ratio on total reducing sugars released when reaction temperature was maintained at 100 °C and residence time at 75 min, for both species studied.

The response of total reducing sugars over independent variables, T, t, VL and AC in terms of some selected response surfaces are shown in Figs 2 and 3 for both studied species. These results indicate that the yield of total reducing sugars released during acid pretreatment of rock-rose and broom is much more sensitive to changes in reaction temperature and acid concentration than it is to variations in residence time or the vegetal/liquid ratio.

CONCLUSIONS

The two biomass species examined, *Cistus ladanifer* (rock-rose) and *Cytisus striatus* (broom), displayed chemical compositions and behaviors during acid pretreatment that suggest them as potential sources for bioethanol production. Dilute acid pretreatment was effective in solubilizing carbohydrates from the biomass. Reaction temperature and acid concentration were the process conditions with higher influence in the results. Maximum concentration of released carbohydrates, evaluated as total reducing sugars, achieved was 302.2 and 284.5 mg/g for rock-rose and broom, respectively. The empirical quadratic models successfully predicted total reducing sugars solubilization and may be used in the development of the optimization of bioethanol production from this type of biomass. Nevertheless, different combinations of pretreatment factors should be investigated using larger sizes of biomass particles, which is an important variable considering the energy consumption of the process. In addition, enzymatic hydrolysis using optimized pretreatment conditions need to be studied.

Literature References

- [1] McKendry, P (2002) "Energy production from biomass (part 1): overview of biomass", *Bioresource Technology*, 83, pp 37-46.
- [2] Sánchez, OJ and Cardona, CA (2007) "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks", *Bioresource Technology*, doi: 10.1016/j.biortech.2007.11.013.
- [3] Galbe, M and Zacchi, G (2002) "A review of the production of ethanol from softwood", *Appl. Microbiology Biotechnology*, 59, pp 618-628.
- [4] Jorgensen, H; Kristensen, JB and Felby, C (2007) "Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities", *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 1, pp 119-134.
- [5] Balat, M; Balat, H and Öz, C (2008) "Progress in bioethanol processing", *Progress in Energy and Combustion Science*, doi:10.016/j.pecs.2007.11.001.
- [6] Yang, B and Wyman, CE (2008) "Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol", *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 2, pp 26-40.
- [7] Taherzadeh, MJ and Karimi, K (2007) "Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review" *Bioresources*, 2(4), pp 707-738.
- [8] Sun, Y and Cheng, JJ (2005) "Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production", *Bioresource Technology*, 96, pp 1599-1606.
- [9] Silverstein, RA; Chen, Y; Sharma-Shivappa, RR; Boyette, MD and Osborne J (2007), "A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks", *Bioresource Technology*, 98, pp 3000-3011.
- [10] Dien, BS; Jung, HJG; Vogel, KP; Casler, MD; Lamb, JFS; Iten, L.; Mitchell, RB and Srath, G (2006) "Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass and switchgrass", *Biomass & Bioenergy*, 30, pp 880-891.
- [11] Del Campo, I; Alegría, I; Zazpe, M; Echeverría, M and Echeverría, I (2006) "Diluted acid hydrolysis pretreatment of agri-food wastes for bioethanol production", *Industrial Crops and Products*, 24, pp 214-221.
- [12] Saha, BC; Iten, LB; Cotta, MA and Wu, YV (2005) "Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol", *Process Biochemistry*, 40, pp 3693-3700.
- [13] Palmarola-Adrados, B; Galbe, M and Zacchi, G (2005) "Pretreatment of barley husk for bioethanol production", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, pp 85-91.
- [14] Somogyi, M (1951) "Notes on sugar determination", *The Journal of Biological Chemistry*, pp 19-23.
- [15] Ely, RE and Moore, LA (1955) "Holocellulose and the summative analysis of forages", *Journal of Animal Science*, 14, pp 718-724.