



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA** Escola Superior de Tecnologia e de Gestão

## **Produção de etanol a partir da palha de cevada**

**Mariana Martinho Barbosa**

Relatório final da Dissertação apresentado à  
**Escola Superior de Tecnologia e de Gestão**  
**Instituto Politécnico de Bragança**

para obtenção do grau de Mestre em  
**Engenharia Química**

**Julho 2011**

# **Produção de etanol a partir de palha de cevada**

**Mariana Martinho Barbosa**

Relatório Final da Dissertação apresentado à  
**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**  
**Instituto Politécnico de Bragança**

para a obtenção do grau de Mestre em  
**Engenharia Química**

Orientadores:

**Professora Filomena Barreiro**

**Dr. Ignácio Ballesteros**

**Julho 2011**

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Filomena Barreiro, orientadora desta tese, pela sua disponibilidade e preocupação na realização deste trabalho. Agradeço profundamente a orientação e apoio ao longo destes últimos meses.

A la Dra Mercedes Ballesteros, responsable de la Unidad de Biomass del CIEMAT, y al Dra Paloma Manzanares por su inestimable apoyo, su confianza y por poner a mi alcance todos los medios necesarios durante mi estancia. Al Dr. Ignacio Ballesteros por toda su ayuda, su disponibilidad y sus comentarios y correcciones durante la realización de mi trabajo. A los demás doctores y trabajadores de la Unidad, muchas gracias por su ayuda y orientación.

Todos han contribuido de una manera o de otra a que esta estancia en CIEMAT fuera tan gratificante y enriquecedora para mí. De todos ellos siempre me quedará un buen recuerdo.

A todos os professores da ESTIG, em particular aos docentes do Departamento de Tecnologia Química e Biológica, que ao longo da minha formação académica me proporcionaram os conhecimentos necessários para a realização deste trabalho.

À minha família e amigos. Obrigada por todo o apoio prestado e por estarem comigo nos bons e maus momentos.

E, por fim, aos meus pais e irmão por serem o meu grande pilar. Obrigada por todo o amor, carinho, paciência e confiança que sempre depositaram em mim e por estarem sempre presentes na minha vida.

## RESUMO

O combate ao aquecimento global, através da redução das emissões de gases com efeitos de estufa (GEE), a diversificação das fontes energéticas e a redução da sua dependência, a preocupação com a futura escassez ou aumento excessivo dos preços dos combustíveis de origem fóssil (petróleo), bem como a promoção do desenvolvimento rural constituem os principais objectivos que a UE pretende atingir com a substituição dos combustíveis convencionais pelos biocombustíveis.

Os biocombustíveis líquidos, constituídos pelo bioetanol e biodiesel, representam uma boa alternativa aos combustíveis convencionais, uma vez que podem integrar-se facilmente nos actuais sistemas de distribuição e ser utilizados nos motores dos automóveis sem que estes tenham que sofrer grandes alterações na sua estrutura.

Actualmente, os processos de produção de bioetanol produzidos à escala industrial utilizam matérias-primas de origem amilácea ou açucarada, originando um intenso debate sobre a sustentabilidade desta biomassa. Desta forma, o bioetanol produzido de biomassa lenhocelulósica representa uma alternativa viável, já que as matérias-primas se encontram amplamente distribuídas, não competem com o mercado alimentar e são mais baratas que os recursos agrícolas convencionais.

A presente Tese de Mestrado visa estudar as diferentes etapas de produção de etanol a partir da palha de cevada. Com o intuito de modificar a estrutura da biomassa lenhocelulósica, para facilitar o acesso das enzimas na etapa de hidrólise enzimática, a matéria-prima foi pré-tratada utilizando um tratamento hidrotérmico designado *Liquid Hot Water* (LHW). O etanol foi obtido do resíduo sólido pré-tratado (RSI), mediante um processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SFS), utilizando a levedura *Saccharomyces Cerevisiae*.

A melhor taxa de recuperação de glucose no resíduo sólido decorrente da aplicação do pré-tratamento de LHW foi de 91,71% tendo sido obtida para as condições de 185°C, 10 minutos e 2% ácido acético. Não obstante, o teste de hidrólise enzimática (HE) com os RSI preparados para diferentes condições de processo apontou que o melhor rendimento de glucose (91,80%) é obtido para as condições de pré-tratamento de 195°C, 10 minutos e 2% ácido acético. Estas duas condições foram utilizadas a uma escala superior (2L) tendo os RSI resultantes sido usados no processo de SFS. A concentração máxima de etanol (21,96 g/l) correspondente a um rendimento de 69,5% foi obtida com o RSI correspondente às condições 195°C, 10 minutos e 2% ácido acético.

**Palavras-chave:** Biomassa lenhocelulósica, bioetanol, Pré-tratamento, Sacarificação e Fermentação Simultâneas.

## ABSTRACT

The fight against global warming, by reducing the emission of greenhouse gases, the diversification of energy sources and reduction on its dependence, the apprehension concerning future scarcity or excessive increase in fossil fuels (petroleum) prices, as well as the promotion of rural development are the main objectives that EU wishes to achieve with the substitution of conventional fuels by biofuels.

Liquid biofuels, i.e., bioethanol and biodiesel, constitute good alternatives to conventional fuels since they can be easily integrated into current fuel systems distribution and can be used in car engines without major changes in its structure.

Nowadays, production of ethanol relies on bioethanol from starch and sugars; nevertheless a considerable debate on its sustainability is in focus. In this context, bioethanol produced from lignocellulosic biomass is an interesting alternative since these raw materials are much widely distributed, do not compete with food crops and are also less expensive than conventional agricultural feedstocks.

The present Master Thesis addresses the study of the different stages involved in the ethanol production from barley straw. In order to promote structure modifications of lignocellulosic biomass, thus facilitating enzymes access in the enzymatic hydrolysis step, the raw material was pretreated with liquid hot water (LHW). Ethanol was produced from the obtained LHW solid residue (RSI) by means of a Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) process, using the yeast *Saccharomyces Cerevisiae*.

The maximum glucose recovery achieved in the solid residue from the LHW pretreatment was 91.71%, obtained by using the conditions of 185 °C, 10 minutes and 2% acetic acid. Nevertheless, the enzymatic hydrolysis test (HE) with RSI prepared with different process conditions pointed out that the best yield of glucose (91.80%) is obtained by using 195 °C, 10 minutes and 2% acetic acid. These two set of experimental conditions were further used at a higher scale level (2 L) and the resulting RSI used in the SFS process. The maximum achieved ethanol concentration (21.96 g/l) corresponding to a yield of 69.5%, resulted from the RSI obtained using 195 °C, 10 minutes and 2% acetic acid.

**Keywords:** Lignocellulosic biomass, bioethanol, Pre-treatment, Simultaneous Saccharification and Fermentation.

## ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Importância, motivação e objectivos.....	1
1.2. Organização da tese.....	2
2.BIOCOMBUSTÍVEIS .....	3
3.COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DA BIOMASSA LENHOCELULÓSICA .....	7
3.1. Celulose.....	8
3.2. Hemicelulose.....	9
3.3. Lenhina.....	10
3.4. Outros compostos.....	11
4.PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DA BIOMASSA LENHOCELULÓSICA PELA VIA ENZIMÁTICA .....	13
4.1. Pré-tratamento .....	14
4.1.1. Pré-tratamento físicos.....	15
4.1.2. Pré-tratamentos químicos.....	16
4.1.3. Pré-tratamentos físico-químicos.....	17
4.1.4. Pré-tratamentos biológicos.....	18
4.2. Hidrólise enzimática.....	19
4.3. Fermentação .....	21
4.4. Sacarificação e fermentação simultâneas .....	22
5.DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	24
5.1. Caracterização da matéria-prima.....	25
5.2. Pré-tratamento .....	28
5.3. Hidrólise enzimática.....	35
5.4. Sacarificação e fermentação simultâneas (SFS).....	38
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO.....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
8. ANEXOS.....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 - Classificação dos componentes dos materiais lenhocelulósicos.....	7
Figura 3.2 - Estrutura da cadeia de celulose.....	9
Figura 3.3 - Estrutura da lenhina proposta por Adler (1977) .....	11
Figura 4.1 - Esquema geral do processo de produção de etanol via enzimática .....	13
Figura 4.2 –Efeito do pré-tratamento na acessibilidade das enzimas degradantes.....	14
Figura 4.3 - Sistema enzimático utilizado na degradação da celulose .....	19
Figura 4.4 – Esquema da cinética de degradação da celulose.....	20
Figura 4.5 – Esquema da cinética de Michaelis-Menton .....	20
Figura 4.6 – Reacção da glucose para a obtenção de etanol .....	21
Figura 5.1 – Esquema simplificado dos processos experimentais utilizados no presente trabalho e respectivos produtos.....	24
Figura 5.2 - Esquema do procedimento de análise da composição da palha de cevada.....	25
Figura 5.3 – Reactor do tipo autoclave utilizado para o pré-tratamento LHW .....	29
Figura 5.4 – (a) Amostra inicial e (b) Material pré-tratado.....	30
Figura 5.5 – (a) Sistema de filtração com a fracção líquida do material pré-tratado e (b) Fracção sólida do material pré-tratado.....	30
Figura 5.6 – Efeito das condições de pré-tratamento na recuperação de xilose.....	34
Figura 5.7 – Efeito das condições de pré-tratamento na recuperação de glucose .....	35
Figura 5.8 –Rendimento de hidrólise enzimática a 24h .....	36
Figura 5.9 – Rendimento de hidrólise enzimática a 48h .....	36
Figura 5.10 – Rendimento de hidrólise enzimática a 72h .....	37
Figura 5.11 – Rendimento global de hidrólise enzimática.....	38
Figura 5.12 – Hidrólise enzimática num aparelho Certomat®.....	40
Figura 5.13 –Rendimento de HE para uma carga de enzimas de 15 UPF.....	41
Figura 5.14 –Rendimento de HE para uma carga de enzimas de 20 UPF.....	41
Figura 5.15 – Cromatógrafo utilizado para a determinação de etanol .....	42
Figura 5.16 – Desempenho da <i>S. cerevisiae</i> no processo de SFS .....	44
Figura 5.17 –Rendimento do processo de SFS.....	45

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Biocombustíveis de primeira geração .....	4
Tabela 2.2 - Biocombustíveis de segunda geração.....	4
Tabela 2.3 - Biocombustíveis de terceira geração.....	5
Tabela 2.4 - Biocombustíveis de quarta geração.....	5
Tabela 3.1 - Composição de alguns materiais lignocelulósicos .....	8
Tabela 5.1 – Composição da palha de cevada.....	28
Tabela 5.2 – Composição da fracção sólida após o pré-tratamento .....	32
Tabela 5.3 – Valores de pH e composição em açúcares da fracção líquida obtida após o pré-tratamento.....	32
Tabela 5.4 – Compostos tóxicos da degradação de açúcares (g/L).....	33
Tabela 5.5 – Composição da fracção sólida após o pré-tratamento no reactor de 2L de capacidade.....	39
Tabela 5.6 – Valores de pH e composição em açúcares da fracção líquida obtida após o pré-tratamento.....	39
Tabela 5.7 – Valores obtidos durante o processo de SFS .....	43

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Importância, motivação e objectivos

Numa época em que o mundo assiste a um défice de matérias-primas, principalmente ao nível do sector energético, há uma crescente necessidade de procura e utilização de novas fontes de energia que contornem a escassez e o aumento do preço das fontes de energia não renováveis mais utilizadas nos dias de hoje. O petróleo, o gás natural e os seus derivados representam 55% do consumo mundial de energia e, como combustíveis fósseis, as suas reservas são finitas e o seu abastecimento possui alguns problemas de segurança para muitos dos países que os importam (Bioetanol de cana, 2008).

Paralelamente, a combustão crescente de combustíveis fósseis, iniciada há aproximadamente 60 anos, tem provocado a acumulação de gases responsáveis pelo efeito de estufa na atmosfera, particularmente de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), e consequentemente diversas alterações climáticas. As emissões globais de CO<sub>2</sub> resultantes da incineração de combustíveis fósseis atingiram, em 2006, o valor recorde de 8.23 biliões de toneladas, 20% superior ao valor registado em 2000 (Portal Ecodebate, 2008). Neste âmbito, a procura de fontes de energia renováveis com menor impacto ambiental e que se apresentem como alternativas ao uso do petróleo mobiliza cada vez mais os sectores industriais, sociais, governamentais e académicos. As energias renováveis não se esgotam, não geram resíduos de difícil tratamento e reduzem as emissões de gases que provocam o efeito de estufa. Para além disso contribuem para a diminuição da dependência energética. Perante este cenário, os biocombustíveis passaram a constar definitivamente da agenda dos governos e políticas da maioria dos países do mundo.

O presente trabalho visa contribuir para o desenvolvimento de biocombustíveis de 2ª geração a partir da palha de cevada. O plano de trabalho experimental decorreu no CIEMAT e compreendeu três etapas: (1) Caracterização da matéria-prima; (2) Estudo de um pré-tratamento hidrotérmico (*Liquid Hot Water*) e (3) Obtenção de bioetanol a partir do resíduo pré-tratado por hidrólise enzimática e fermentação.

## 1.2. Organização da tese

No capítulo 2, **Biocombustíveis**, é apresentada uma revisão bibliográfica sobre os diferentes tipos de biocombustíveis, dando-se especial relevância aos biocombustíveis líquidos, nomeadamente ao bioetanol. Classificam-se ainda os biocombustíveis provenientes de fontes renováveis de acordo com a sua tecnologia de produção.

No capítulo 3, **Composição e estrutura da biomassa lenhocelulósica**, é apresentada uma classificação dos materiais lenhocelulósicos, bem como a caracterização dos principais componentes que os constituem (celulose, hemicelulose, lenhina).

No capítulo 4, **Produção de etanol a partir da biomassa lenhocelulósica por via enzimática**, faz-se uma comparação entre hidrólise ácida e enzimática. É apresentado também um esquema geral sobre o processo de produção de etanol, caracterizando-se ainda cada uma das etapas que o incorporam.

No capítulo 5, **Desenvolvimento experimental**, apresentam-se os procedimentos das diferentes etapas de produção de etanol e respectivos resultados obtidos.

No capítulo 6, **Conclusões**, são apresentadas as considerações finais sobre o trabalho realizado.

## 2. BIOCOMBUSTÍVEIS

Os biocombustíveis englobam os combustíveis líquidos ou gasosos produzidos através da biomassa vegetal, sendo os principais biocombustíveis líquidos o bioetanol e biodiesel, e os gasosos o hidrogénio e o metano. Estes combustíveis de origem vegetal possuem características semelhantes aos combustíveis fósseis, o que faz com que possam ser utilizados nos motores dos automóveis sem ser necessário efectuar grandes modificações nos mesmos (Domínguez, 2003).

Os biocombustíveis líquidos podem ser utilizados eficientemente em motores de combustão interna, que equipam os mais diversos veículos motorizados e que são classificados, de acordo com a forma como se inicia a combustão, em dois tipos: motores de ciclo de Otto, com ignição por faísca, para os quais o biocombustível recomendado é o bioetanol; e os motores de ciclo Diesel, cuja ignição é obtida por compressão e que podem utilizar eficazmente o biodiesel. Em ambos os casos, podem utilizar-se os biocombustíveis no seu estado puro ou misturados com os combustíveis convencionais derivados do petróleo (Bioetanol de cana, 2008).

Os biocombustíveis provenientes de fontes renováveis podem ser classificados, de acordo com a sua tecnologia de produção, em biocombustíveis de primeira, segunda, terceira ou quarta geração. Os biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de matérias-primas de uso alimentar, ricas em óleos ou açúcares simples. A matéria-prima extraída a partir das sementes de plantas oleaginosas é transformada em biodiesel através de processos de esterificação. Já a matéria-prima que contém açúcares é processada para a produção de álcool etílico, posteriormente utilizado como combustível ou aditivo para gasolina. No entanto, a produção deste tipo de combustíveis é considerada economicamente desvantajosa e, para além disso, compete com os produtos alimentares destinados ao consumo humano. A Tabela 2.1 mostra exemplos de biocombustíveis de 1ª geração.

Os biocombustíveis de segunda geração são provenientes de matérias-primas, como a palha, resíduos de madeira, resíduos agrícolas e serragem, bem como de plantas de curta rotação e algas de crescimento rápido. Embora este tipo de biocombustíveis permita uma melhoria do balanço de CO<sub>2</sub>, apresenta relativamente aos de 1ª geração, a desvantagem de exigirem um consumo elevado de combustíveis fósseis na sua produção, sendo o balanço quase sempre desfavorável. A Tabela 2.2 mostra exemplos de biocombustíveis de 2ª geração.

Tabela 2.1 – Biocombustíveis de primeira geração (Adaptado de Sims et al, 2008)

<b>Tipo de biocombustível</b>	<b>Biomassa</b>	<b>Processo de produção</b>
<b>Bioetanol</b>	Beterraba sacarina, cana-de-açúcar, sorgo, etc.	Hidrólise e Fermentação
<b>Óleo vegetal</b>	Plantas oleaginosas (ex: sementes de colza)	Prensagem a frio Extracção
<b>Biodiesel</b>	Plantas oleaginosas (ex: sementes de colza e girassol, soja, etc.) Óleos alimentares usados	Prensagem a frio Extracção Transesterificação
<b>Biogás</b>	Biomassa húmida	Digestão anaeróbia
<b>Bio-ETBE (éter etil-ter-butílico)</b>	Bioetanol	Síntese química

Tabela 2.2 – Biocombustíveis de segunda geração (Adaptado de Sims et al., 2008)

<b>Tipo de biocombustível</b>	<b>Biomassa</b>	<b>Processo de produção</b>
<b>Bioetanol</b>	Material lenhocelulósico	Hidrólise (modificada com pré-tratamentos) Fermentação
<b>Biocombustíveis sintéticos</b>	Material lenhocelulósico	Gasificação e síntese
<b>Biodiesel (híbridos de primeira e segunda geração)</b>	Óleos vegetais e gorduras animais	Hidrogenação
<b>Biogás (SNG - <i>Synthetic Natural Gas</i>)</b>	Material lenhocelulósico	Gasificação e síntese
<b>Bio-hidrogénio</b>	Material lenhocelulósico	Gasificação e síntese Processos biológicos

Os biocombustíveis de terceira e quarta geração são produzidos a partir de novas fontes de biomassa, por exemplo culturas modificadas e algas, usando processos de genética moderna e de nanotecnologia. As Tabelas 2.3 e 2.4 mostram exemplos de biocombustíveis de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração, respectivamente.

Tabela 2.3 – Biocombustíveis de terceira geração (Adaptado de Demirbas, 2009)

Tipo de biocombustível	Biomassa	Processo de produção
Biodiesel ( <i>Oilgae Algae diesel</i> )	Algas	Genética ou nanotecnologia Esterificação

Tabela 2.4 – Biocombustíveis de quarta geração (Adaptado de Demirbas, 2009)

Tipo de biocombustível	Biomassa	Processo de produção
Biodiesel	Óleo vegetal (proveniente de algas)	Conversão hidrolítica Desoxigenação

O bioetanol caracteriza o etanol que é produzido a partir da biomassa e/ou da fracção biodegradável de resíduos para a utilização como biocombustível. O etanol, ou álcool etílico, é uma substância, com fórmula molecular  $C_2H_6O$ , incolor, volátil, inflamável e totalmente solúvel em água. Pode ser utilizado na sua forma pura, após modificações nos motores convencionais, ou em misturas com gasolina desde 10%, podendo atingir valores superiores, como por exemplo no E-85 (15% de gasolina e 85% de etanol).

O estabelecimento de objectivos ambiciosos no que diz respeito ao aumento do consumo de etanol para os próximos anos exige um aumento significativo da sua produção, o que motiva o investimento na investigação e desenvolvimento, quer de novas matérias-primas (biocombustíveis de 3ª e 4ª geração), quer de novas tecnologias para a conversão de matérias-primas lenhocelulósicas (biocombustíveis de 2ª geração) (Bastos, 2007).

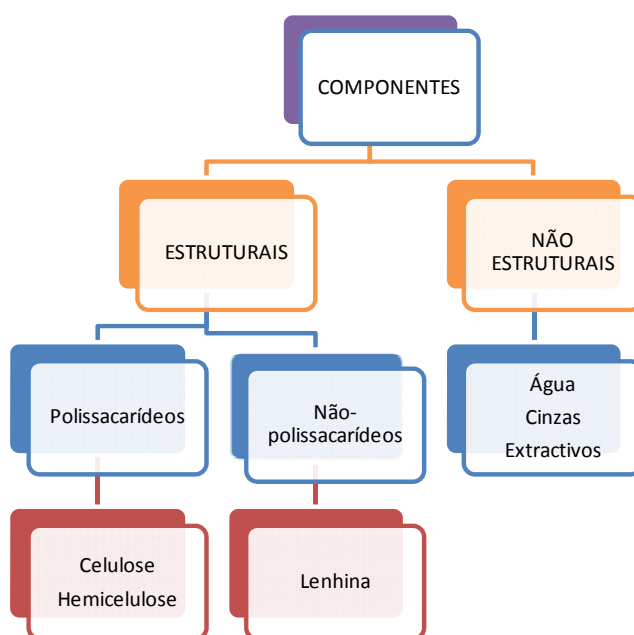
Portugal possui algumas limitações para competir no sector de produção de biocombustíveis, devido sobretudo a problemas edafo-climáticos, necessidades alimentares da população e limitações impostas pelo acordo entre os Estados Unidos da América e a União Europeia respeitante à utilização de áreas de pousio para a produção de plantas oleaginosas destinadas a usos industriais (Diniz, 2008).

A Galp Energia assinou, em 2008, um acordo de cooperação com Moçambique para a produção, comercialização e distribuição de biocombustíveis. Este projecto inovador prevê o investimento na produção de duas culturas, *jatropha* e palma, que não concorrem com a cadeia alimentar e permitem o aproveitamento de solos com menor potencial agrícola. Durante 2009 e 2010, e em antecipação à imposição legal de incorporação de biocombustíveis nos combustíveis rodoviários, o que marcou 2009

como o ano de viragem no sector dos biocombustíveis em Portugal e Espanha, esta empresa revelou-se, ainda, pioneira na promoção da sustentabilidade rodoviária com a introdução de produtos de origem renovável no dia-a-dia dos automobilistas (Galp Energia, 2010).

### 3. COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DA BIOMASSA LENHOCELULÓSICA

Entende-se por materiais lenhocelulósicos, a biomassa de origem vegetal que é constituída maioritariamente por polissacarídeos, como a celulose e a hemicelulose, e por lenhina (componentes estruturais), juntamente com outros componentes minoritários que não fazem parte da estrutura da parede celular, como é o caso das cinzas e extractivos. A Figura 3.1 mostra de forma esquemática a composição dos materiais lenhocelulósicos.



**Figura 3.1** – Classificação dos componentes dos materiais lenhocelulósicos

**Fonte:** Adaptado de Jiménez, 2009

A celulose e a hemicelulose são polissacarídeos de elevada massa molecular representando cerca de 60 a 80% do peso total dos materiais lenhocelulósicos, sendo que a lenhina, um polímero amorfo complexo constituído por unidades de fenilpropano, representa 20 a 35% do peso total destes materiais (Pejó, 2010).

A biomassa lenhocelulósica é tradicionalmente classificada, de acordo com as suas propriedades físicas, químicas e mecânicas como: madeira resinosa, vulgarmente designada de madeira macia, e que é característica das árvores de folha persistente; madeira folhosa, também denominada madeira dura, e que é proveniente das árvores de folha caduca; e biomassa proveniente de culturas anuais ou biomassa não lenhosa. A Tabela 3.1 mostra a composição de diferentes tipos de biomassa lenhocelulósica.

**Tabela 3.1** – Composição de alguns materiais lignocelulósicos (Adaptado de Pejó, 2010)

<b>Biomassa</b>	<b>Glucano</b>	<b>Xilano</b>	<b>Manano</b>	<b>Galactano</b>	<b>Arabinano</b>	<b>Lenhina</b>
<b>Madeiras duras</b>						
Choupo	43.5	15.5	2.5	2.3	1.5	26.2
Nogueira	46.2	16.5	2.6	---	1.8	21.9
<b>Madeiras macias</b>						
Pinheiro	46.4	7.8	10.6	---	2.2	29.4
<b>Culturas anuais</b>						
Palha de trigo	30.2	18.7	---	0.8	2.8	17
Palha de cevada	33.1	20.2	---	0.9	3.8	16.1

### **3.1. Celulose**

A celulose é a macromolécula mais abundante na Terra e o componente maioritário dos materiais lenhocelulósicos, existindo na proporção de 40 a 50% nas madeiras e de 25 a 40% nas plantas anuais. Distingue-se dos extractivos pela sua insolubilidade em água e solventes orgânicos, da hemicelulose pela sua insolubilidade em soluções aquosas básicas e da lenhina pela sua solubilidade em ácidos e resistência a agentes oxidantes (Browning, 1967).

A celulose é um polímero formado por unidades de D-glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ , sendo que, tanto as suas propriedades físicas e químicas como as suas funções na natureza, são determinadas pela disposição fibrilar das suas moléculas e pela sua natureza cristalina (Martín e Manzanares, 1994). O seu grau de polimerização pode variar entre 500 a 15000 unidades. É sintetizada por uma ampla variedade de organismos vivos e, apesar da maior parte da celulose processada para a produção industrial ser proveniente de plantas, algumas bactérias (cianobactérias), fungos e algas verdes também são capazes de a sintetizar (Nobles et al., 2001; Zogaj et al., 2001).

As propriedades físicas e químicas da celulose apenas se podem entender através do conhecimento conjunto da sua natureza química e da sua estrutura e morfologia no estado sólido, especialmente no fibroso. Exceptuando os poucos casos em que as reacções químicas podem ser levadas a cabo em solução, a maior parte das

modificações químicas da celulose à escala laboratorial e industrial têm que ser desenvolvidas em sistemas heterogêneos (Martín e Manzanares, 1994).

Quando está numa conformação completamente estendida, a molécula de celulose possui a forma de uma fita planar apresentando a cada duas unidades consecutivas uma rotação de 180 ° em torno do eixo principal. Desta forma, a unidade de repetição estrutural da celulose, glucose, repete-se o número de vezes correspondente à metade do grau de polimerização da molécula (Martín e Manzanares, 1994). A figura 3.2 mostra a estrutura da celulose pondo em evidência a unidade repetitiva.

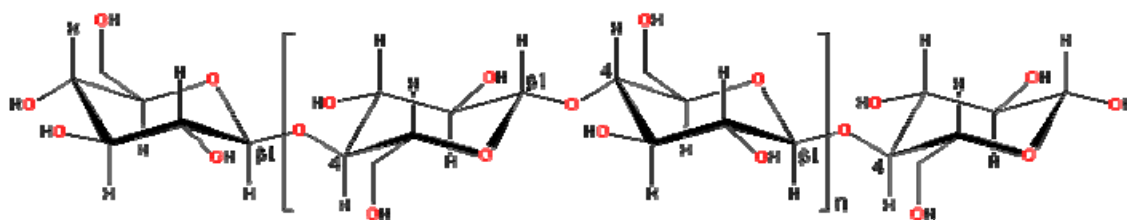


Figura 3.2 - Estrutura da cadeia de celulose

### 3.2. Hemicelulose

São polissacarídeos estruturais de peso molecular relativamente baixo e que se encontram nas paredes celulares com o intuito de proporcionar a união entre a lenhina e a celulose. São geralmente constituídos por uma cadeia principal que pode conter uma única unidade (homopolímero), como é o caso dos xilanos, ou mais que uma unidade (copolímero), tal como os glucomananos (Fengel e Wegener, 1989). Os polímeros hemicelulósicos são constituídos principalmente por três hexoses (glucose, galactose e manose) e duas pentoses (xilose e arabinose), podendo também detectar-se pequenas quantidades de ramosse e frutose (Ferraz et al., 2000).

A composição e estrutura das hemiceluloses variam consoante os diferentes tipos de biomassa. Nas madeiras duras, por exemplo, o xilano é o polímero mais abundante, está altamente substituído por grupos acetilo e pode representar até 30% do peso total (Dahlman et al., 2003; Fengel e Wegener, 1989). No caso das madeiras macias, o polímero mais abundante é o galactoglucomanano que apresenta maior quantidade de unidades de manose e galactose que as anteriores (Dahlman et al., 2003). Nas plantas anuais, os componentes hemicelulósicos são muito parecidos aos das madeiras duras,

mas, tal como as madeiras macias, apresentam menor proporção de grupos acetilo (Fengel e Wegener, 1989).

Entre as características que diferenciam a hemicelulose da celulose enquadram-se a sua maior capacidade de hidrólise em meio ácido e solubilidade em soluções alcalinas, o grau de polimerização (entre 200-300 nas hemiceluloses relativamente a 500-15000 na celulose), a presença de ramificações, a heterogeneidade e a ausência de cristalinidade, já que a hemicelulose é um polímero amorfo. Comparativamente com a lenhina, apresenta maior resistência à oxidação (Ferraz et al., 2000).

### **3.3. Lenhina**

A lenhina é o terceiro componente maioritário dos materiais lenhocelulósicos e, desta forma, o terceiro polímero natural mais abundante na natureza, apenas ultrapassado, tal como se constatou anteriormente, pela celulose e hemicelulose (Buranov e Mazza, 2008). A molécula da lenhina, que possui uma elevada massa molecular, é formada a partir da junção de vários ácidos e alcoóis fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico e sinapílico), o que resulta numa estrutura tridimensional e amorfa (Jiménez, 2009). Esta estrutura característica da lenhina proporciona uma maior rigidez às células, tornando-as impermeáveis e protegendo-as de ataques enzimáticos (Thomas, 1983). Para além de conferir rigidez estrutural e sustentar as fibras dos polissacarídeos participa também no transporte de água, nutrientes e metabólitos. Devido à sua complexidade e heterogeneidade, não é possível descrever uma estrutura definida para a lenhina, sendo que, no entanto, inúmeros modelos representando a sua estrutura têm vindo a ser propostos (Adler, 1977, Bardet et al., 2006; Ferapontova et al., 2006). A Figura 3.3 mostra a estrutura da lenhina proposta por Adler (1977).

Tal como a hemicelulose, a estrutura da lenhina varia para os diferentes materiais lenhocelulósicos. Se nas madeiras, a sua estrutura química tem sido amplamente estudada, nos materiais agrícolas, todavia, a sua estrutura e interações entre os demais componentes da parede celular não são muito conhecidos. Os valores referenciados para o teor de lenhina nos materiais lenhocelulósicos são de 20 a 26% nas madeiras macias, 26 a 32% nas madeiras resinosas e 10% a 20% nas culturas anuais (Falkehag, 1975; Glasser, 1990; Holtzaple, 1993).

As ligações entre a lenhina e a hemicelulose realizam-se com o auxílio de intermediários cinâmílicos, principalmente o ácido ferúlico, diferúlico e o ácido p-cumárico, que por sua vez se unem à cadeia principal de xilano através de intermediários monoméricos. Estas ligações entre os constituintes da lenhina são muito fortes e afectam a hidrólise enzimática, pelo que têm vindo a ser estudados diversos métodos físicos e químicos que utilizem a deslenhificação como uma etapa prévia da hidrólise, de modo a aumentar o seu rendimento final (Berlin et al., 2005; Pan et al., 2005).

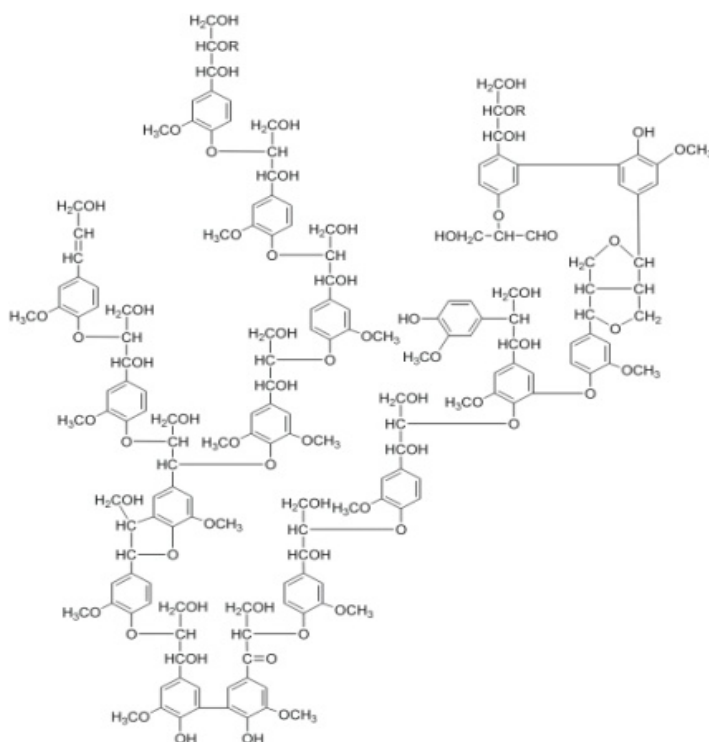


Figura 3.3 - Estrutura da lenhina proposta por Adler (1977)

### 3.4. Outros compostos

Os materiais lenhocelulósicos podem conter também uma extensa variedade de extrativos orgânicos (ácidos gordos, ceras, proteínas, açúcares simples, pectinas, gomas, resinas, óleos essenciais, etc.), que podem ser extraídos com solventes polares ou apolares (Silva, 2009). São compostos intermédios do metabolismo do vegetal que lhe proporcionam reserva energética e protecção contra os ataques de microrganismos e insectos, mas que possuem um efeito inibitório nos processos de conversão de biomassa (Fengel e Wegener, 1989). Para além dos extractivos, a biomassa vegetal contém ainda

uma pequena quantidade de espécies inorgânicas (potássio, sódio, cálcio, etc.), resultantes dos nutrientes adquiridos durante o seu crescimento (Yu et al., 2008).

#### 4. PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DA BIOMASSA LENHOCELULÓSICA PELA VIA ENZIMÁTICA

Para que os polissacarídeos da biomassa lenhocelulósica se transformem em açúcares potencialmente fermentáveis, é necessário que esta passe por uma etapa de hidrólise. Esta hidrólise pode ser realizada por processos ácidos ou enzimáticos (Domínguez, 2003). A hidrólise ácida consiste num processo químico que, através da acção de catalisadores, transforma as cadeias dos polissacarídeos constituintes da biomassa (celulose e hemicelulose) nos seus monómeros elementares. Podem utilizar-se os ácidos sulfúrico, clorídrico, sulfuroso, fosfórico, nítrico e fórmico, sendo que apenas o sulfúrico e o clorídrico são utilizados industrialmente. Já a hidrólise enzimática é um processo catalisado por um conjunto de enzimas, denominadas celulasas, formando uma mistura com diferentes actividades enzimáticas cuja acção conjunta promove a degradação da celulose. Os produtores deste tipo de enzimas são as plantas superiores, alguns invertebrados e, principalmente, os microrganismos, como bactérias e fungos. As celulasas de origem fúngica têm sido as mais utilizadas devido à capacidade que estes microrganismos têm em produzi-las em elevadas quantidades e de forma extracelular, facilitando, assim, a sua separação nos meios de cultivo (Domínguez, 2003).

O processo de produção de etanol a partir da biomassa lenhocelulósica utilizando a hidrólise enzimática engloba as seguintes etapas (figura 4.1): (1) pré-tratamento, (2) hidrólise enzimática, (3) fermentação e (4) destilação (Pejó, 2010).

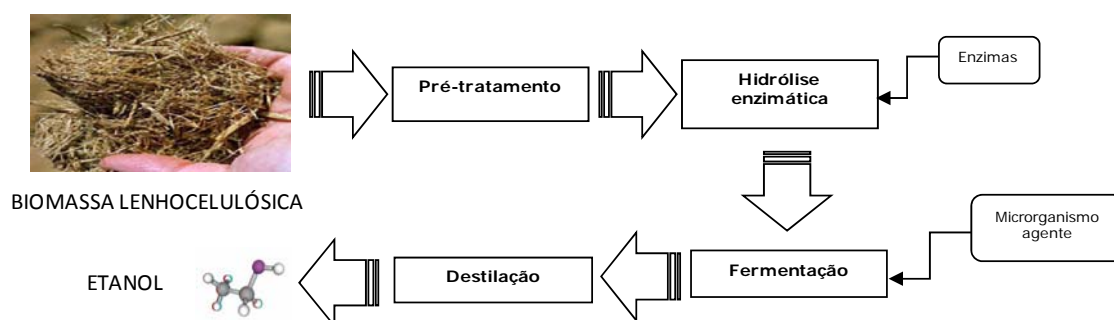


Figura 4.1 – Esquema geral do processo de produção de etanol via enzimática

Fonte: Adaptado de Pejó, 2010

## 4.1. Pré-tratamento

Quando, para a hidrólise da celulose, se utilizam catalisadores enzimáticos, a existência de uma etapa de pré-tratamento adquire uma importância crucial, devido às características dos materiais lenhocelulósicos anteriormente mencionadas.

A incubação de materiais celulósicos de forma natural na presença de celulases resulta em rendimentos inferiores a 20%, devido à forte ligação da celulose com a lenhina, o que constitui uma barreira física à penetração das enzimas (Lynd et al., 2002). Os objetivos principais do pré-tratamento são: (1) alterar as características estruturais da celulose, tais como, a cristalinidade e o grau de polimerização; (2) dissociar o revestimento formado pela hemicelulose e a lenhina em torno da celulose, com o intuito de proporcionar uma maior adesão das enzimas à mesma; (3) aumentar a área superficial do material; (4) provocar a solubilização ou redistribuição da lenhina e (5) diminuir a presença de substâncias que dificultem a hidrólise (Pejó, 2010; Dominguez, 2003). Além disso, um pré-tratamento deve possuir baixo custo energético e baixo investimento, utilizar reagentes baratos e facilmente recuperáveis, e ser aplicável a diversos substratos (Dominguez, 2003).

De acordo com a sua natureza, os pré-tratamentos podem ser classificados em: físicos, químicos, biológicos e físico-químicos (Sun e Cheng, 2002). A Figura 4.2 mostra de forma esquemática o efeito do pré-tratamento num material lenhocelulósico.

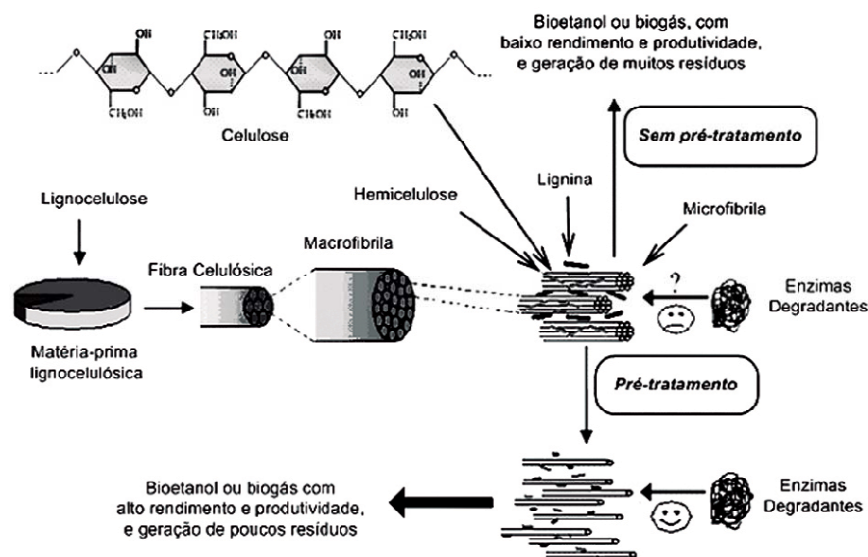


Figura 4.2 – Efeito do pré-tratamento na acessibilidade das enzimas degradantes

Fonte: Taherzadeh e Karimi, 2008

Quando a biomassa lenhocelulósica é submetida a condições severas durante a etapa de pré-tratamento, como temperatura elevada, pressão e ambiente ácido, pode ocorrer degradação da lenhina e dos açúcares (celulósicos ou hemicelulósicos) originando produtos tóxicos, que podem afectar as posteriores etapas de hidrólise e fermentação. A natureza e concentração destes produtos dependem: (1) tipo de matéria-prima, (2) do pré-tratamento utilizado e das condições do mesmo e (3) da utilização ou não de catalisadores (Domínguez, 2003 e Pejó, 2010). Esses produtos tóxicos dividem-se em três grupos (Larsson, 2000): derivados do furano, ácidos alifáticos de baixo peso molecular e derivados fenólicos. Desta forma, os principais compostos tóxicos originados no pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica são: (1) furfural, originado a partir da degradação das pentoses (arabinose e xilose), (2) o 5-hidroximetilfurfural (HMF) formado a partir da degradação das hexoses (glucose, galactose e manose) e, por fim, (3) o 4-hidroxibenzaldeído, vanilina, seringaldeído, ácido cumárico e ácido ferúlico a partir da degradação da lenhina. Por sua vez, alguns destes compostos podem degradar-se noutros compostos: o furfural em ácido fórmico e o HMF em quantidades equimoleculares de ácido fórmico e levulínico (ácidos alifáticos). Forma-se, ainda, ácido acético procedente da hidrólise dos grupos acetilo da hemicelulose (Domínguez, 2003).

Os compostos tóxicos presentes na fracção líquida resultante do pré-tratamento dependem do tipo de madeira utilizada como matéria-prima. Assim, os hidrolisados provenientes do pré-tratamento de madeiras duras possuem uma maior concentração de furfural e de ácido acético comparativamente com os provenientes do pré-tratamento de madeiras macias, devido ao seu grande conteúdo em pentoses e grupos acetilo (Domínguez, 2003).

#### **4.1.1. Pré-tratamentos físicos**

Dentro dos pré-tratamentos físicos enquadram-se aqueles que utilizam a moagem de impacto, aplicando forças de cisalhamento e de redução da cristalinidade da celulose (Sanchez e Cardona, 2008, Sun e Cheng, 2002). São exemplos de pré-tratamentos físicos a trituração mecânica e a radiação de alta energia. Os requisitos energéticos necessários para este tipo de processos dependem do tamanho da partícula que se pretende alcançar e da matéria-prima a pré-tratar (Pejó, 2010).

O método de trituração mecânica consiste na trituração dos materiais lenhocelulósicos através de uma combinação de forças de desagregação e trituração, o que reduz a cristalinidade da celulose e aumenta a superfície específica e a densidade aparente, facilitando posteriormente a hidrólise da matéria (Sun e Cheng, 2002). Existem diferentes tipos de moinhos para esse efeito: moinhos de esferas, martelos, pás, rolos, etc. Este método possui o inconveniente de precisar de um elevado consumo energético (Dominguez, 2003).

A radiação de alta energia rompe as ligações  $\beta$ -glicosídicas e as ligações entre a celulose e a lenhina, sendo, no entanto, uma técnica de difícil aplicação devido à baixa densidade dos materiais a tratar e às elevadas quantidades requeridas que obrigam à existência de instalações muito complexas e de custo elevado (Khan et al., 1986; Dominguez, 2003).

#### **4.1.2. Pré-tratamentos químicos**

Este tipo de tratamento tem como objectivo solubilizar a fracção de lenhina e alterar a estrutura da celulose, facilitando a acção das enzimas (Domínguez, 2003). Os principais pré-tratamentos químicos são: (1) a oxidação húmida, que tem a vantagem de praticamente não gerar sub-produtos, consistindo em colocar a biomassa em contacto com a água a elevadas temperaturas e na presença de oxigénio; (2) o tratamento com ozono, que possui uma série de vantagens como a eliminação efectiva da lenhina, a não geração de produtos tóxicos que possam afectar as etapas posteriores do processo e o facto da reacção se processar à temperatura ambiente e à pressão atmosférica, sendo, contudo, um método dispendioso, devido à grande quantidade de ozono utilizado no processo; (3) a hidrólise alcalina, que provoca um inchamento da biomassa, fomentando um aumento da área superficial, uma diminuição da cristalinidade, uma melhor separação entre as unidades estruturais da lenhina e os polissacarídeos, e simultaneamente a degradação da lenhina; e por fim (4) o tratamento com solventes orgânicos, que consiste em aplicar uma mistura de solventes orgânicos ou aquosos (metanol, etanol, acetona e etilenoglicol) juntamente com um catalisador ácido (ácido clorídrico ou sulfúrico) de modo a provocar a ruptura das ligações internas da lenhina e da hemicelulose.

### 4.1.3. Pré-tratamentos físico-químicos

De todos os pré-tratamentos físico-químicos, o método de explosão a vapor (EV) tem vindo a ser o mais utilizado para o tratamento da biomassa lenhocelulósica. Trata-se de um pré-tratamento hidrotérmico, onde a biomassa é submetida à acção de vapor saturado, durante um determinado período de tempo, que pode variar desde alguns segundos a vários minutos. Após este tempo de tratamento, o material é submetido a uma brusca descompressão (Domínguez, 2003; Pejó, 2010). O efeito deste pré-tratamento traduz-se numa combinação de alterações físicas e químicas. A brusca descompressão a que o material é sujeito provoca a evaporação da água interna, criando forças de cisalhamento, que levam à separação das fibras (alteração física). Já a alteração química é provocada pela auto-hidrólise da hemicelulose, isto é, os grupos acetilo presentes nas hemiceluloses produzem ácido acético que, à temperatura do processo, catalisa a hidrólise da hemicelulose.

Durante este tratamento as ligações entre a lenhina e os polissacarídeos são parcialmente destruídas, obtendo-se um produto fibroso no qual a celulose passa a ser susceptível à hidrólise enzimática. A hemicelulose é facilmente recuperada no lavado e a sua despolimerização depende das condições de tratamento. A lenhina pode ser extraída e utilizada para diferentes finalidades, sem que para isso necessite de sofrer grandes modificações.

As variáveis mais importantes a controlar no processo de pré-tratamento de EV são a temperatura, o tempo de residência, o tamanho da partícula e a humidade (Duff e Murray, 1996). Tem como principais vantagens: (1) a possibilidade de utilizar partículas de tamanho relativamente grande e evitar a adição de catalisadores ácidos (à excepção das madeiras macias), (2) a alta recuperação de açúcares, (3) elevados rendimentos na hidrólise enzimática que sucede a esta etapa e (4) a capacidade de ser implementado à escala industrial. Entre as suas limitações encontram-se a ocorrência de degradação parcial dos açúcares hemicelulósicos e a geração de compostos tóxicos que podem afectar as etapas posteriores de hidrólise e fermentação (Pejó, 2010). Para a eliminação destes compostos, o material pré-tratado deve ser lavado com água antes de passar às etapas posteriores (Domínguez, 2003).

Outra tecnologia de pré-tratamento hidrotérmico consiste no tratamento da biomassa com água quente, por um processo conhecido por *Liquid Hot Water* (LHW). Neste pré-tratamento a biomassa lenhocelulósica é penetrada com água no estado líquido, a alta

pressão e temperatura, hidratando a celulose e removendo a hemicelulose e parte da lenhina (Taherzadeh e Karimi, 2007). Esta hidratação da celulose provoca um aumento da área superficial acessível da biomassa, melhorando-a para a hidrólise enzimática. As principais vantagens inerentes a este processo são: (1) o elevado potencial para gerar fibras reactivas; (2) a elevada recuperação de pentosas e (3) a obtenção de um hidrolisado com baixo teor de produtos inibidores da fermentação da glucose (Laser et al.).

A principal diferença entre o LHW e os pré-tratamentos a vapor consiste na quantidade de produtos solubilizados e na concentração dos mesmos, isto é, num tratamento com água quente a quantidade de produtos solubilizados é maior enquanto a concentração desses produtos é menor relativamente aos pré-tratamentos a vapor (Blobeleter, 1994). Hendriks e Zeeman (2009) relacionam esta ocorrência com a elevada quantidade de água adicionada neste tratamento comparativamente aos tratamentos com vapor. Devido a estas baixas concentrações, o risco de degradação da hemicelulose e lenhina em produtos tóxicos como o furfural e o 4-hidroxibenzaldeído, respectivamente, é menor num pré-tratamento LHW (Hendriks e Zeeman, 2009).

Outro método físico-químico muito utilizado no pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica é a EV com adição de amoníaco (AFEX – *Ammonia Fiber Explosion*). Neste método, o material é previamente impregnado com amoníaco líquido a temperaturas que rondam os 90 °C, durante aproximadamente 30 minutos (Sun e Cheng, 2002). A principal diferença relativamente ao método de EV reside no facto de num processo AFEX, a hemicelulose não ser solubilizada. As vantagens deste método são praticamente as mesmas que as do anterior, nomeadamente a possibilidade de se utilizarem tamanhos de partícula elevados, sem que isso afecte a eficiência do processo, e a não produção de inibidores que possam comprometer as etapas posteriores. No entanto, perde eficiência para biomassas com alto teor de lenhina (Domínguez, 2003).

#### **4.1.4. Pré-tratamentos biológicos**

Os pré-tratamentos biológicos consistem em submeter o material lenhocelulósico à acção de fungos, com o objectivo de degradar a lenhina e a hemicelulose, eliminando as barreiras que protegem a celulose tornando-a mais vulnerável ao posterior ataque enzimático. Estes métodos têm a vantagem de se realizarem em condições ambientais

suaves e de possuírem um baixo consumo energético. Contudo, alguns dos fungos utilizados também consomem a celulose o que compromete o rendimento final do processo. Além disso, é um processo demasiado lento (Domínguez, 2003; Pejó, 2010).

#### 4.2. Hidrólise enzimática

O material insolúvel obtido através do pré-tratamento é constituído principalmente por celulose e lenhina, uma vez que grande parte dos açúcares hemicelulósicos são solubilizados durante o processo. A etapa posterior consiste na hidrólise enzimática, que tem como finalidade degradar as cadeias de celulose em monómeros de glucose (Pejó, 2010).

A hidrólise enzimática consiste na degradação da celulose através de um grupo de enzimas, denominado celulasas, produzindo açúcares redutores passíveis de serem fermentados por leveduras ou bactérias para produzir etanol (Figura 4.3). Este grupo enzimático é constituído por: (1) Endo- $\beta$ -glucanases (endo-1,4-D-glucanohidrolase), que atacam as zonas de baixa cristalinidade da fibra celulósica, formando cadeias com extremidades livres; (2) Exo- $\beta$ -glucanase ou celobiohidrolase (1,4- $\beta$ -D-glucano celobiohidrolase), que se liga às extremidades das cadeias formando glucose e celobiose; e (3)  $\beta$ -glucosidase, responsável por dissociar a celobiose produzindo duas moléculas de glucose.

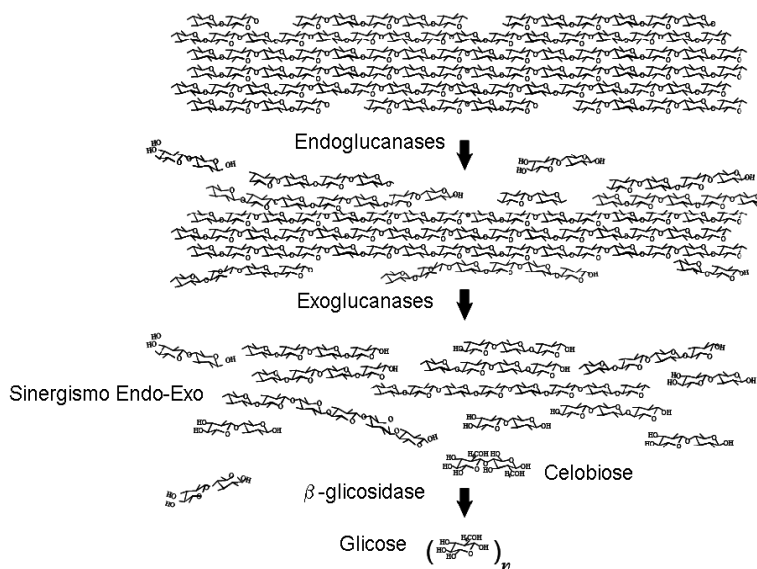
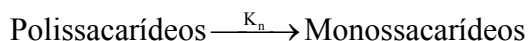


Figura 4.3 – Sistema enzimático utilizado na degradação da celulose

Fonte: Silva, 2009

O mecanismo da hidrólise enzimática é dividido em três etapas (Kosaric et al., 2001): (1) decomposição das ligações glicosídicas por parte das enzimas endo-β-gluconases, (2) ataque sinérgico das enzimas endo-β-gluconases e exo-β-gluconase e, por fim, (3) catálise da hidrólise dos oligossacarídeos pelas enzimas β-glicosidase.

Quanto à cinética consiste, de uma maneira geral, na decomposição dos polissacarídeos em monossacarídeos, como representado na Figura 4.4.



**Figura 4.4** – Esquema da cinética de degradação dos polissacarídeos

A cinética enzimática é geralmente descrita de acordo com a teoria desenvolvida por L. Michaelis e M. L. Menten. Esta teoria considera que a enzima, E, se liga ao substrato S, formando o complexo enzima-substrato, ES, que é catalisado, formando o complexo enzima-produto, EP, que por último é destruído, originando o produto P e reabilitando a enzima, tal como demonstra a figura 4.5.



**Figura 4.5** – Esquema da cinética de Michaelis-Menton

A equação de Michaelis-Menten é a equação de velocidade de uma reacção catalisada por enzimas e com um único substrato. Esta equação relaciona a velocidade inicial (velocidade na qual a concentração de produto em relação ao tempo é constante), a velocidade máxima e a concentração inicial de substrato, através de uma constante chamada  $K_M$  (constante de Michaelis-Menten). Por sua vez, a constante de Michaelis-Menton equivale à concentração de substrato onde a velocidade inicial da reacção é igual à metade da velocidade máxima.

$$v_0 = \frac{v_{\text{máx}} [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{eq. 1})$$

$$K_M = [S] \rightarrow v_0 = \frac{1}{2} v_{\text{máx}} \quad (\text{eq. 2})$$

O processo de hidrólise enzimática apresenta algumas vantagens relativamente aos processos realizados com ácido, nomeadamente o facto de ocorrer a temperaturas baixas (40-50°C) e gerar subprodutos de degradação em baixa concentração (Silva, 2010b).

Os principais inconvenientes da hidrólise enzimática estão relacionados com a necessidade de utilizar uma concentração elevada de enzimas motivada pela baixa actividade específica e com a própria natureza do material a tratar. Além disso, o custo de produção das enzimas é elevado e representa uma parte significativa do custo total do processo (Pejó, 2010).

### 4.3. Fermentação

A fermentação, quando aplicada a qualquer matéria-prima que contenha açúcares fermentáveis pode resultar em etanol (Lin, 2006). Consiste na conversão anaeróbia ou aeróbia de açúcares em dióxido de carbono e álcool por acção de microrganismos, dos quais resultam também uma variedade de produtos, tais como fármacos, ácidos orgânicos e álcoois (Hassan, 2008).

Após a etapa de hidrólise, onde os polissacarídeos existentes na matéria-prima são degradados em moléculas de glucose, efectua-se então a fermentação, cujo procedimento consiste numa série de reacções químicas que transformam os açúcares em etanol. A reacção de fermentação é originada por fungos e bactérias que se alimentam dos açúcares enquanto produzem dióxido de carbono e etanol (Figura 4.5).

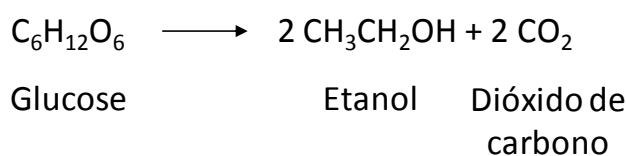


Figura 4.6 – Reacção da glucose para a obtenção de etanol

A levedura mais utilizada nos processos fermentativos é a *Saccharomyces cerevisiae* dado possuir um potencial fermentativo bastante elevado. Esta levedura pode crescer tanto em açúcares simples, como a glucose, como em dissacarídeos, como é o caso da sacarose (Lin e Tanaka, 2006). A *S. cerevisiae* é a única levedura que pode crescer tão rapidamente em condições aeróbias como em condições anaeróbias. Esta capacidade é

de extrema utilidade em muitas das suas aplicações industriais, como é o caso da fermentação da cerveja e do vinho e da produção em grande escala de bioetanol. O bioetanol é geralmente produzido por fermentação anaeróbia da *S. cerevisiae* (Hassan, 2008).

Para uma fermentação ser realizada com sucesso é importante que se perceba o que acontece durante o processo e como o controlar de modo a obter as condições óptimas de operação. De uma maneira geral, o processo de fermentação consiste nas seguintes etapas: (1) preparação de um meio de cultura adequado ao desenvolvimento do microrganismo agente, (2) passagem do meio de cultura para um fermentador e (3) adição do microrganismo responsável pela fermentação (Schmidell e Facciotti, 2001).

Os principais parâmetros a controlar num processo de fermentação são a temperatura, pH, velocidade de agitação, oxigénio dissolvido e quantidade de nutriente fornecido.

Existem diversas formas de conduzir o processo de fermentação, com o intuito de aumentar o rendimento do produto desejado, como por exemplo: (1) variar a disposição e o volume do fermentador, (2) reutilizar o microrganismo agente num novo ciclo de fermentação e (3) alterar o modo de alimentação do meio de cultura.

#### **4.4. Sacarificação e fermentação simultâneas**

A ideia do processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SFS) foi patenteada em 1976 por Gauss e constitui, hoje em dia, um dos avanços mais importantes no processo global de produção de etanol a partir da biomassa lenhocelulósica, no qual a hidrólise e a fermentação têm lugar no mesmo reactor (Pejó, 2010; Xiaojian e Chun, 2008).

Desta forma, a glucose produzida durante a hidrólise, por acção das celulasas é directamente convertida em etanol pelas leveduras. Esta conversão contínua da glucose reflecte-se num rendimento de hidrólise superior, na necessidade de concentrações de enzima inferiores, na redução do tempo total do processo e numa maior produtividade de etanol (Alfani et al., 2000; Ballesteros et al., 2002). Para além disso, a presença do etanol na fermentação torna a mistura menos vulnerável ao ataque de microrganismos indesejados (Sasikumar e Viruthagiri, 2010).

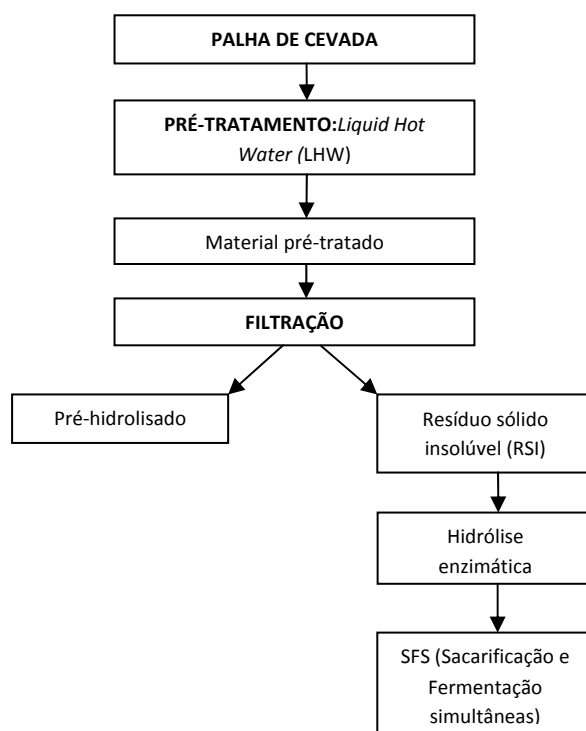
A SFS consiste assim num processo viável e eficiente que pode ser implementado para diferentes matérias-primas e tecnologias de pré-tratamento, mas que apresenta alguns

problemas, uma vez que, as condições ótimas de pH e temperatura são diferentes nas etapas de hidrólise e fermentação, sendo necessário encontrar condições que sejam favoráveis a ambas (Pejó, 2010). O pH ótimo para a hidrólise enzimática encontra-se próximo de 4.8, enquanto o pH da fermentação é superior a 5, variando com o tipo de microrganismo utilizado. No que diz respeito à temperatura ótima, a da hidrólise encontra-se próxima dos 50°C, sendo que as leveduras geralmente utilizadas na produção de etanol trabalham em redor dos 37°C. Assim, o uso de leveduras termotolerantes capazes de crescer e fermentar a temperaturas superiores a 40°C e, por isso, mais próximas das temperaturas ótimas da hidrólise, representa uma boa alternativa para contornar este problema. A *Kluyveromyces marxianus* é a bactéria mais utilizada para esse efeito (Domínguez, 2003; Pejó, 2010). Este processo é, ainda, incapaz de fermentar as pentoses e não possibilita a reciclagem de células (Pejó, 2010).

## 5. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho realizado nesta tese de mestrado consistiu na produção de etanol a partir da palha de cevada, empregando um pré-tratamento com água líquida quente (*Liquid Hot Water* - LHW) e ácido acético. A escolha deste ácido fraco deve-se ao facto de este corresponder a um ácido que também pode ser gerado durante o pré-tratamento do material em questão, nomeadamente pela ruptura dos grupos acetilo das hemiceluloses ocorridas nessa etapa.

Pretende-se obter as condições que proporcionem uma boa recuperação de açúcares na etapa de pré-tratamento e um bom rendimento de hidrólise enzimática, conduzindo desta forma a uma taxa elevada de produção de etanol. O procedimento experimental (processos aplicados e produtos obtidos) utilizado no trabalho encontra-se esquematizado na Figura 5.1.



**Figura 5.1** – Esquema simplificado dos processos experimentais utilizados no presente trabalho e respectivos produtos

## 5.1. Caracterização da matéria-prima

A palha de cevada foi caracterizada de acordo com os métodos recomendados pelo Laboratório Nacional de Energias Renováveis dos EUA (NREL) para a determinação dos compostos principais dos materiais lenhocelulósicos (NREL, 2009). Todos os ensaios foram realizados em triplicado. O esquema da Figura 5.2 representa o procedimento de análise utilizado para a análise da matéria-prima utilizada.

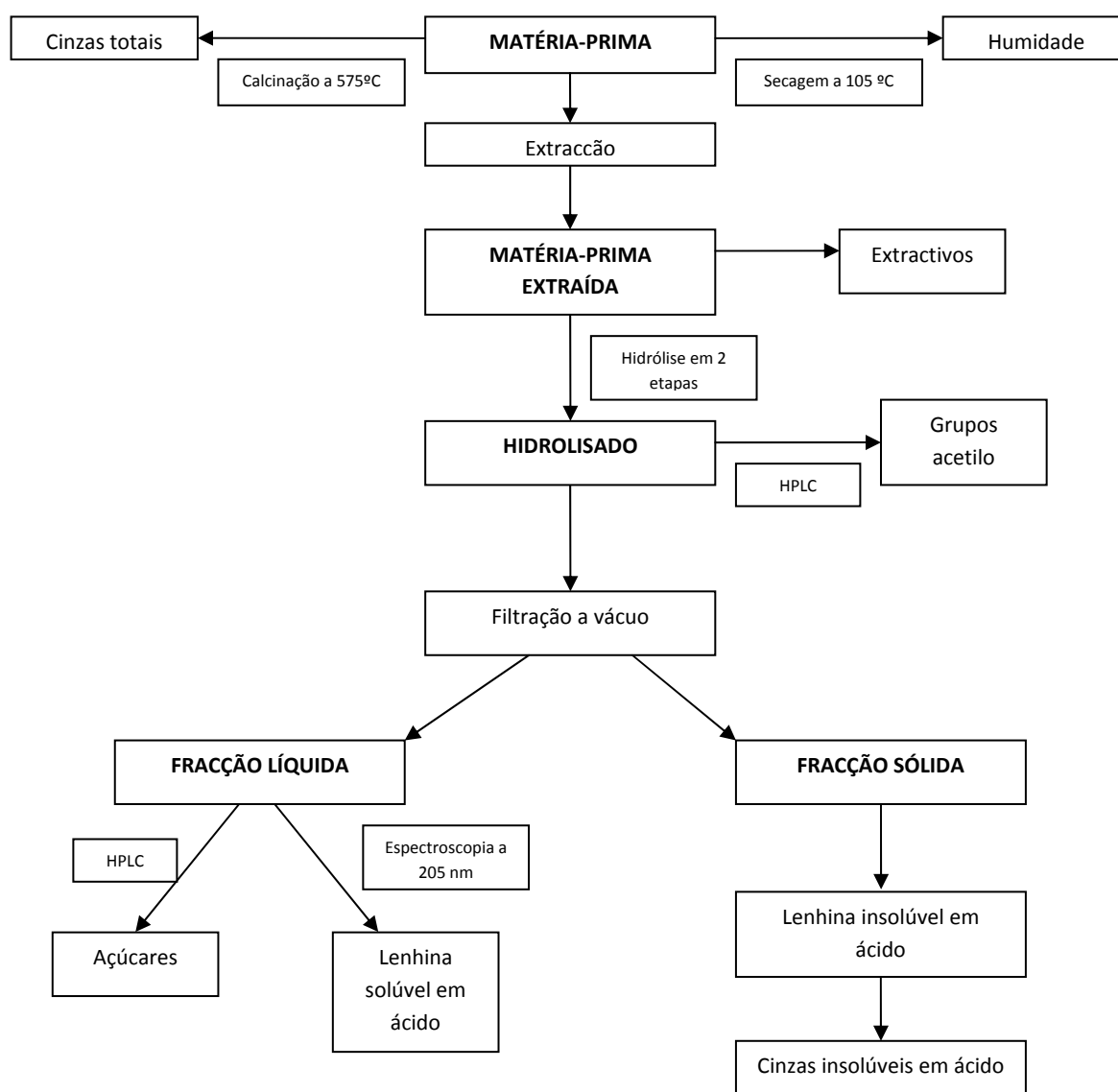


Figura 5.2 – Esquema do procedimento de análise da composição da palha de cevada

Todos os procedimentos do NREL utilizados neste trabalho, foram aplicados a amostras com baixo teor de humidade (<10%). Um elevado teor de humidade altera a concentração efectiva de ácido na etapa de hidrólise ácida, o que, por sua vez, provoca uma diminuição do conteúdo de hidratos de carbono, devido a uma hidrólise incompleta dos polímeros (NREL, 2009).

Numa primeira etapa realizou-se a separação do material não estrutural da biomassa (extractivos), de modo a prevenir interferências nas etapas posteriores da análise. Para isso deve-se efectuar uma preparação prévia das amostras, convertendo-as num material de tamanho regular para prevenir a interferência na análise de composição. Um tamanho inferior pode derivar numa diminuição do conteúdo de hidratos de carbono (e conseqüente aumento do teor de lenhina), devido a uma excessiva degradação destes. Pelo contrário, um tamanho superior pode levar a uma diminuição do conteúdo de hidratos de carbono resultante de uma hidrólise incompleta (NREL, 2009). Desta forma, procedeu-se à determinação da fracção de grossos e finos que constituem a palha de cevada, moendo a matéria-prima a 2 mm e fazendo-a passar sucessivamente por peneiros de 0,85 mm e 0,2 mm. A percentagem de grossos obtida (definida como a fracção com tamanho superior a 0,2 mm) foi de 84,6%, enquanto a de finos (definida como a fracção com tamanho inferior a 0,2 mm) foi de 15,4%. A análise da composição realizou-se sobre a fracção de grossos e refere-se, posteriormente, à biomassa completa (grossos+finos) quando corrigida pelo conteúdo em cinzas.

Realizada a separação de grossos e finos, submeteu-se a fracção de grossos a uma extracção em duas etapas, utilizando água e etanol. O método utilizado foi a extracção automática, que consiste em colocar as células de extracção, previamente preparadas com filtros de vidro de tamanho adequado no fundo e 1g de amostra, no extractor automático. Ao extracto aquoso final foram retirados 25 mL para hidrólise com ácido sulfúrico (30 minutos, a 121°C), e 5 mL destinados à análise dos grupos acetilo por HPLC. O restante volume foi colocado num evaporador rotativo equipado com um banho termostático a operar a 40°C e com sistema de vácuo. Terminada a evaporação de todo o líquido, colocou-se o balão na estufa a 105°C, durante 24h, e pesou-se o resíduo obtido. O procedimento adoptado para a extracção com etanol foi semelhante.

As cinzas (material inorgânico da biomassa), tanto as estruturais como as extraíveis, devem ser medidas como uma parte da composição total da biomassa. As cinzas estruturais são o material inorgânico unido à estrutura física da biomassa, enquanto as extraíveis são as que se podem extrair lavando o material.

O conteúdo em cinzas totais é obtido através do resíduo que permanece após uma oxidação a seco (oxidação a 550-600°C). Em síntese, pesou-se aproximadamente 0.5 g das amostras de grossos e finos e colocaram-se numa mufla a 575°C, durante 8 horas. Decorrido este tempo, anotou-se o peso final. O conteúdo de cinzas totais é dado pela soma das cinzas obtidas para os grossos e finos, devidamente corrigido pelo conteúdo de humidade.

Por fim, utilizou-se a biomassa livre de extractivos para a determinação dos hidratos de carbono estruturais e da lenhina solúvel em ácido, realizando-se para o efeito uma hidrólise com ácido sulfúrico, durante 1h a 121°C, a amostras previamente preparadas. Esta preparação prévia consistiu na pesagem de 0,3g de amostra livre de extractivos, à qual se adicionaram 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% levando-se a mistura a um banho a 30°C, durante 1 hora. Posteriormente, transferiram-se os hidrolisados para um frasco e juntaram-se 84 mL de água destilada a cada um deles. Paralelamente a este procedimento, prepararam-se uma série de padrões de recuperação de açúcares (SRS), que se levaram a hidrolisar juntamente com as amostras e que foram posteriormente utilizados para corrigir as perdas provocadas pela destruição de açúcares durante a hidrólise em meio ácido diluído. Os açúcares utilizados como padrões de recuperação foram a glucose, xilose e galactose, pesando-se 0,3 g de cada um deles e adicionando-lhes 84 mL de água e 3mL de ácido sulfúrico a 72% (m/m).

Após a hidrólise ácida procedeu-se à filtração das amostras utilizando filtros de nylon. A fracção sólida é guardada a 105°C, durante 24h. Parte da fracção líquida é então utilizada para a determinação dos hidratos de carbono poliméricos e da lenhina solúvel em ácido. Os hidratos de carbono poliméricos são determinados por HPLC, enquanto a lenhina solúvel em ácido é determinada por espectroscopia UV-VIS. A fracção sólida é utilizada para a determinação da lenhina insolúvel em ácido. Para isso, submeteu-se o filtrado a uma oxidação seca, colocando-o, após 24h de secagem numa estufa a 105°C, numa mufla durante 8 horas, a 575°C, seguindo-se a pesagem das cinzas obtidas. A lenhina é obtida pela diferença entre o peso do resíduo obtido a 105°C e das cinzas obtidas a 575°C, devidamente corrigidos pelo peso seco da amostra inicial. O valor de extractivos é utilizado como factor de correcção para calcular a composição da biomassa completa, uma vez que a análise dos componentes da biomassa foi realizada numa base livre de extractivos. Os valores da Tabela 5.1 referem-se à biomassa completa.

Tabela 5.1.- Composição da palha de cevada

Componente		Teor (% m/m)
Componentes lenhocelulósicos	Celulose	37,8±0,18
	Hemicelulose	24,9±0,56
	Lenhina (*)	13,7±0,51
Composição em açúcares simples	Glucose	41,6±0,19
	Xilose	24,3±0,37
	Galactose	0,8±0,22
	Arabinose	2,8±0,17
	Manose	0,1±0,02
Cinzas		7,0±0,19
Extractivos	Água	11,4
	Etanol	1,75
	Total (**)	10,5
Grupos acetilo		1,6±0,11
Total (***)		95,5

(\*) Lenhina insolúvel em ácido (12,54)+Lenhina solúvel em ácido (1,16)

(\*\*) %P.seco grossos\*(%Ext.etanol+%Ext.agua)+%P.seco finos\*%Ext(corrigido com valor das cinzas)

(\*\*\*) Lenhocelulósicos+Cinzas+Extractivos+grupos acetilo

A palha de cevada analisada contém celulose (37,8±0,18%), hemicelulose (24,9±0,56%) e lenhina (13,7±0,51%) que somadas constituem 76,4% do seu peso total. O conteúdo em extrativos e cinzas alcança, respectivamente, 10,5 e 7,0±0,19%.

## 5.2. Pré-tratamento

Na produção de etanol, a etapa de pré-tratamento da biomassa tem como principal objectivo facilitar o acesso das enzimas celulósicas à celulose, aumentando, desta forma, o rendimento na etapa posterior de hidrólise enzimática. Assim, num pré-tratamento deve-se maximizar a produção de açúcares ou a capacidade de produzir açúcares mediante hidrólise enzimática, em detrimento da degradação destes em produtos não desejáveis. Uma produção elevada de açúcares fermentáveis nesta fase é de elevada importância para a competitividade económica do processo de produção de etanol a partir da biomassa lenhocelulósica.

Neste trabalho realizou-se um pré-tratamento hidrotérmico designado *Liquid Hot Water* (LHW) que consiste na utilização de água a temperatura elevada sob pressão para que, após penetração desta na biomassa, a área superficial de contacto aumente tornando mais eficiente a hidrólise enzimática.

Numa primeira fase, realizaram-se diversos ensaios variando a temperatura (175, 185 e 195°C), o tempo (10 e 25 minutos) e a concentração de ácido acético (1, 2 e 4 %). Esta concentração de ácido acético foi escolhida tendo em conta a percentagem de grupos acetilo da palha de cevada (1,6%, m/m). Inicialmente escolheram-se os valores de 1 e 2% (m/m) por serem valores próximos do obtido, tendo-se, mais tarde, testado uma concentração superior (4%, m/m) por não se ter verificado grande variabilidade para os valores referidos anteriormente (1 e 2 %).

Para os ensaios de pré-tratamento utilizou-se um reactor do tipo autoclave (modelo EZE-Seal, Autoclave Engineers, Erie, PA) com 0,5L de capacidade dotado com controlo de temperatura e pressão e agitação (Figura 5.3).

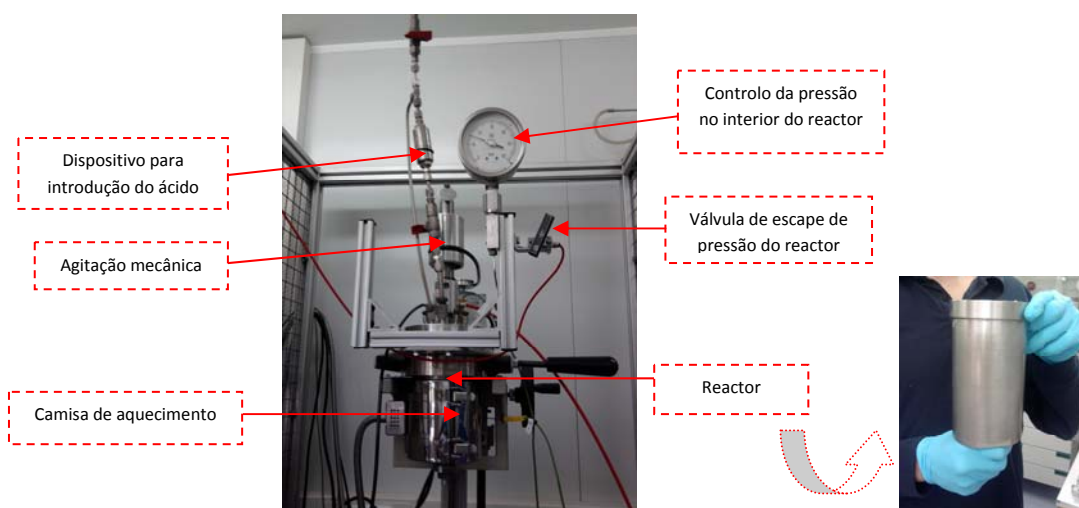
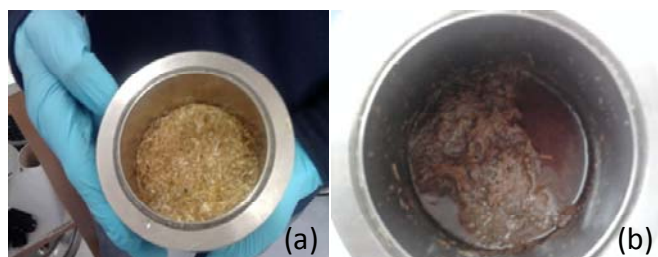


Figura 5.3 – Reactor do tipo autoclave utilizado para o pré-tratamento LHW

A relação sólido/líquido utilizado no reactor foi de 10% (m/v), o que corresponde à utilização de 35g de palha de cevada para 350 mL de água. Uma vez terminado o tempo do pré-tratamento retirou-se a camisa de aquecimento e arrefeceu-se o reactor com água e gelo. Quando a temperatura no interior do reactor atingiu aproximadamente 70°C, aliviou-se a pressão na válvula de escape e abriu-se o reactor. A Figura 5.4 mostra o aspecto do material antes e após a aplicação do pré-tratamento.

Entre os principais inconvenientes associados a este procedimento experimental destaca-se a dificuldade em controlar a temperatura no interior do reactor, uma vez que esse controlo é feito através da camisa de aquecimento, o que motivou a ocorrência de algumas oscilações ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) durante o curso do pré-tratamento. Adicionalmente, o tempo

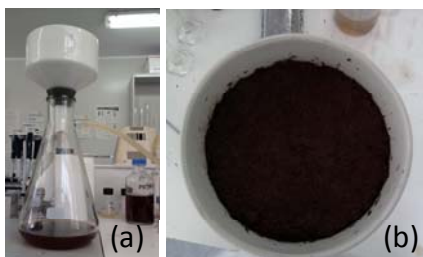
para atingir a temperatura pretendida variou ligeiramente entre experiências, uma vez que, normalmente, se realizaram mais que uma experiência diária, o que fez com que na segunda experiência o reactor já se encontrasse aquecido e o tempo necessário para atingir a temperatura pretendida fosse inferior.



**Figura 5.4 – (a) Amostra inicial e (b) Material pré-tratado**

O material pré-tratado obtido foi então submetido a um balanço material. Primeiramente foi filtrado com um funil de Büchner, separando-se as fracções líquida da sólida (Figura 5.5). Da fracção líquida retiraram-se 25mL para efectuar a hidrólise ácida (com 0,54 mL de  $H_2SO_4$  a  $121^\circ C$ , 30 minutos) cuja análise posterior por HPLC permite determinar os açúcares obtidos. O restante líquido foi utilizado para medição do pH e cálculo da percentagem de sólidos solúveis, bem como para a determinação de oligómeros e produtos tóxicos, por HPLC.

Para a fracção sólida determinou-se o seu peso e conteúdo em humidade. Posteriormente a fracção sólida foi lavada com 1L de água destilada e novamente pesada para determinação da humidade. A fracção sólida lavada foi depois caracterizada de acordo com os métodos do NREL, tal como descrito anteriormente para a matéria-prima (excepto os extractivos), com o intuito de obter uma visão global do efeito do pré-tratamento sobre a composição da palha de cevada.



**Figura 5.5– (a) Sistema de filtração com a fracção líquida do material pré-tratado e (b) Fracção sólida do material pré-tratado**

A Tabela 5.2 mostra os resultados da recuperação de sólidos insolúveis e da composição dos mesmos após o pré-tratamento (dados expressos em base seca). Aumentando a temperatura verifica-se, de uma maneira geral, um aumento da quantidade de celulose e lenhina, associado a uma progressiva solubilização da hemicelulose na fracção líquida. Para todas as condições aplicadas constata-se ainda que o conteúdo de hemicelulose é inferior ao existente na matéria-prima, sendo que o material pré-tratado se encontra enriquecido em celulose e lenhina, o que seria de esperar, uma vez que um dos objectivos desta etapa visa concentrar a celulose, deixando-a disponível para a hidrólise enzimática, e solubilizar a hemicelulose. No que diz respeito à lenhina, o valor obtido deve-se, possivelmente, ao facto de o material pré-tratado não se encontrar livre de extractivos e de estes se encontrarem associados à lenhina, sendo, por isso, contabilizados como tal, o que pode significar que o teor obtido está sobrevalorizado.

Já a recuperação de sólidos insolúveis diminui à medida que as condições do processo se tornam mais severas, o que faz com que os valores superiores se verifiquem para as condições mais suaves.

Na Tabela 5.3 estão representados os dados relativos à composição da fracção líquida (valores expressos em g/100 g de matéria-prima), bem como os valores de pH de cada um dos ensaios realizados. A fracção líquida é maioritariamente constituída por açúcares solubilizados procedentes da fracção hemicelulósica e por produtos tóxicos gerados durante o pré-tratamento. Verifica-se que a xilose é o açúcar maioritário, sendo que o valor mais elevado se observou quando se utilizaram as condições de 185°C, 25 minutos e 2% de ácido acético. Demonstra-se ainda que, tal como referido anteriormente, a utilização de condições mais severas no tratamento favorece a solubilização da xilose (açúcar maioritário da fracção hemicelulósica) na fracção líquida. Quanto aos valores de pH verifica-se que, tal como seria de esperar, estes diminuem com o aumento da temperatura e concentração de ácido acético empregue. Para evitar a formação de produtos inibidores é importante manter o pH na gama aproximada de 4-7, uma vez que estas condições de pH minimizam a formação de monossacarídeos e, conseqüentemente, a geração de compostos tóxicos a partir destes (Kohlmann et al., 1995; Mosier et al., 2005; Weil et al., 1997).

**Tabela 5.2** – Composição da fracção sólida após o pré-tratamento

<b>FRACÇÃO SÓLIDA</b>				
<b>Condições</b>	<b>Recuperação de sólidos insolúveis</b>	<b>Celulose</b>	<b>Hemicelulose</b>	<b>Lenhina insolúvel em ácido</b>
Matéria-prima	---	<b>37.8</b>	<b>24.9</b>	<b>12.5</b>
175°C 10' 4%	65.3	50.4	22.1	21.80
175°C 25' 1%	65.5	52.6	19.2	23.6
175°C 25' 2%	59.6	55.8	18.5	24.4
175°C 25' 4%	62.6	55.0	13.7	24.5
185°C 10' 1%	60.6	56.6	16.0	28.0
185°C 10' 2%	5.70	58.4	15.0	25.6
185°C 10' 4%	58.4	53.8	13.7	24.1
185°C 25' 1%	54.9	59.9	11.2	27.2
185°C 25' 2%	57.1	57.5	8.3	26.8
185°C 25' 4%	55.2	57.4	7.6	27.5
195°C 10' 1%	57.2	58.4	7.6	26.7
195°C 10' 2%	56.1	59.4	7.2	27.8
195°C 10' 4%	54.3	62.1	6.4	27.8

**Tabela 5.3** – Valores de pH e composição em açúcares da fracção líquida obtida após o pré-tratamento

<b>FRACÇÃO LÍQUIDA</b>						
<b>Condições</b>	<b>pH</b>	<b>Glucose</b>	<b>Xilose</b>	<b>Galactose</b>	<b>Arabinose</b>	<b>Manose</b>
175°C 10' 4%	4.1	3.0	8.8	0.8	1.9	0.2
175°C 25' 1%	4.3	2.9	10.7	0.7	1.9	0.2
175°C 25' 2%	4.1	2.9	11.2	0.8	1.8	0.2
175°C 25' 4%	4.0	3.0	12.2	1.0	1.6	0.2
185°C 10' 1%	4.2	2.7	12.1	0.7	1.6	0.2
185°C 10' 2%	4.2	3.1	13.4	0.9	1.8	0.2
185°C 10' 4%	3.9	2.9	13.1	0.8	1.7	0.2
185°C 25' 1%	4.0	3.1	14.3	0.8	1.4	0.2
185°C 25' 2%	4.0	3.3	15.7	1.0	1.6	0.2
185°C 25' 4%	3.8	2.5	12.2	0.8	1.0	0.2
195°C 10' 1%	3.9	2.6	12.2	0.7	0.8	0.2
195°C 10' 2%	3.9	2.6	12.3	0.7	0.8	0.2
195°C 10' 4%	3.6	2.5	11.3	0.7	0.6	0.0

Durante a etapa de pré-tratamento originam-se uma série de produtos de degradação, potencialmente inibidores para etapas posteriores de hidrólise enzimática e fermentação (Pejó, 2010). A Tabela 5.4 mostra os valores dos compostos tóxicos identificados na fracção líquida resultante do pré-tratamento LHW. Verifica-se que, à medida que as condições do processo se tornam mais severas, aumenta também, de uma maneira geral, a concentração dos compostos tóxicos identificados, sendo que os resultados superiores se obtêm a 195°C, 10 minutos e 4% de ácido acético. O ácido acético foi o composto maioritário, sendo o seu valor máximo de 7,00 g/L. Esta concentração elevada deve-se,

não só, à concentração de ácido adicionado ao processo, mas também à hidrólise dos grupos acetilo das hemiceluloses que se formam durante o pré-tratamento. O ácido fórmico, proveniente da degradação a elevadas temperaturas do furfural e hidroximetilfurfural (HMF), foi o composto detectado com segunda maior concentração, correspondendo a valores entre 0,81 e 1,78 g/L. A concentração de furfural e HMF também aumenta à medida que se aumenta a temperatura, tempo e concentração de ácido. A concentração de furfural, proveniente da degradação das pentoses (principalmente da xilose), variou entre 0,15 e 1,42 g/L. Os valores apresentados para este composto apenas explicam em parte a degradação das pentoses, uma vez que, por se tratar de um composto volátil, é possível que ocorram perdas durante o pré-tratamento (Allen et al., 2001; Laser et al., 2002). Já o HMF, resultante da degradação das hexoses, foi detectado em menor quantidade que o furfural (0,06-0,14 g/L) devido ao facto de, em biomassas herbáceas, a hemicelulose apresentar um teor inferior de hexoses (Pejó, 2010).

**Tabela 5.4** – Compostos tóxicos da degradação de açúcares (g/L)

<b>COMPOSTOS TÓXICOS</b>				
<b>Condições</b>	<b>Furfural</b>	<b>HMF</b>	<b>Ácido acético</b>	<b>Fórmico</b>
175°C 10' 4%	0.15	0.06	5.80	0.85
175°C 25' 1%	0.22	0.07	2.54	0.83
175°C 25' 2%	0.28	0.08	3.25	0.87
175°C 25' 4%	0.37	0.10	5.54	1.13
185°C 10' 1%	0.32	0.07	2.81	0.81
185°C 10' 2%	0.31	0.07	2.81	0.91
185°C 10' 4%	0.35	0.08	5.96	1.19
185°C 25' 1%	0.66	0.12	3.33	1.31
185°C 25' 2%	0.98	0.12	4.69	1.55
185°C 25' 4%	1.05	0.14	6.48	1.51
195°C 10' 1%	0.95	0.13	3.29	1.63
195°C 10' 2%	0.95	0.11	4.15	1.65
195°C 10' 4%	1.42	0.14	7.00	1.78

A Figura 5.6 representa o efeito das condições de pré-tratamento na recuperação de xilose, açúcar maioritário da fracção hemicelulósica, tanto na fracção líquida como na sólida. Verifica-se que a recuperação total obtida para temperaturas mais suaves é superior estando em alguns casos muito próxima dos 100%. A 175°C, 25 minutos e 1% ácido acético, a recuperação total ultrapassa mesmo os 100%, devido a eventuais erros de medição ocorridos durante o balanço efectuado ao material pré-tratado. No entanto,

para estas condições verifica-se que a recuperação no líquido é inferior a 50%, pelo que é necessário aumentar a temperatura até 185°C para se obterem recuperações superiores. Para 195°C verifica-se que a xilose começa a degradar-se. No que diz respeito à influência da concentração de ácido, verifica-se que a recuperação de xilose no líquido aumenta quando a concentração aumenta de 1 para 2% e diminui quando a mesma aumenta para 4%. Para a temperatura de 195°C e tempo de 10 minutos não se verificam efeitos significativos decorrentes do aumento da concentração de ácido acético.

Em síntese, conclui-se que as condições para as quais se obtêm recuperações de xilose superiores correspondem aos ensaios realizados a 185°C e 2% de ácido acético utilizando tempos de 10 e 25 minutos. No entanto, para os ensaios posteriores de hidrólise, escolheu-se o tempo de 10 minutos dado que quando se utiliza este tempo se verifica a melhor combinação entre recuperação total e recuperação de xilose no líquido.

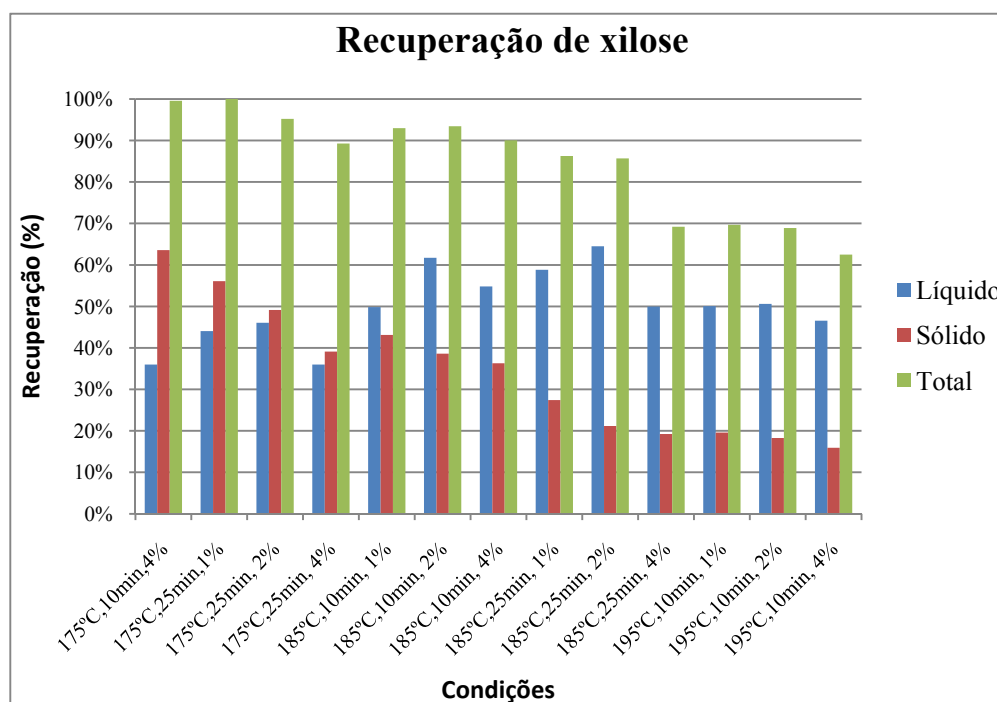


Figura 5.6 – Efeito das condições de pré-tratamento na recuperação da xilose

A Figura 5.7 mostra de forma similar a recuperação da glucose em função das condições utilizadas no processo. Os resultados mostram que para todas as condições utilizadas se verificou uma baixa solubilização da glucose, obtendo-se uma recuperação no sólido superior a 80% em todos os casos. Esta elevada recuperação de glucose pode dever-se também à presença de amido, polissacarídeo presente nos materiais herbáceos e constituído por unidades de glucose. Os valores superiores de recuperação de glucose

obtêm-se para as condições experimentais de 185°C e 10 minutos, elegendo-se para as posteriores etapas de HE e SFS, tal como anteriormente, o substrato obtido a 185°C, 10 minutos e 2% de ácido acético.

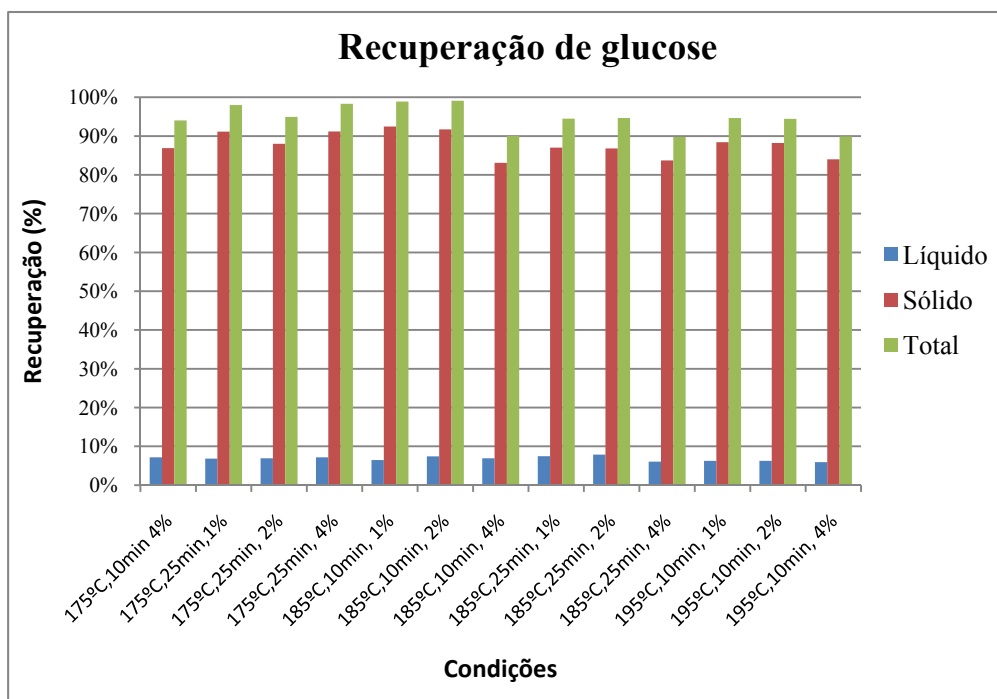


Figura 5.7 – Efeito das condições de pré-tratamento na recuperação de glucose

### 5.3. Hidrólise enzimática

Com o objectivo de avaliar a eficácia do pré-tratamento realizaram-se ensaios de hidrólise enzimática, utilizando as fracções sólidas obtidas nas diferentes condições. A hidrólise enzimática foi realizada a 50°C e pH 4,8 (solução tampão de citrato de sódio a 0.05 M) e uma concentração de substrato de 5% (m/V). As enzimas utilizadas foram a Novozym® 50013 (celulase) e a Novozym® 50010 ( $\beta$ -glucosidase), com uma dose de 15 unidades de papel filtro/g substrato. A duração da hidrólise foi de 72h, sendo que de 24 em 24h se retiraram amostras para a análise de açúcares por HPLC. As Figuras 5.8, 5.9 e 5.10 mostram os resultados obtidos para 24, 48 e 72 h, respectivamente.

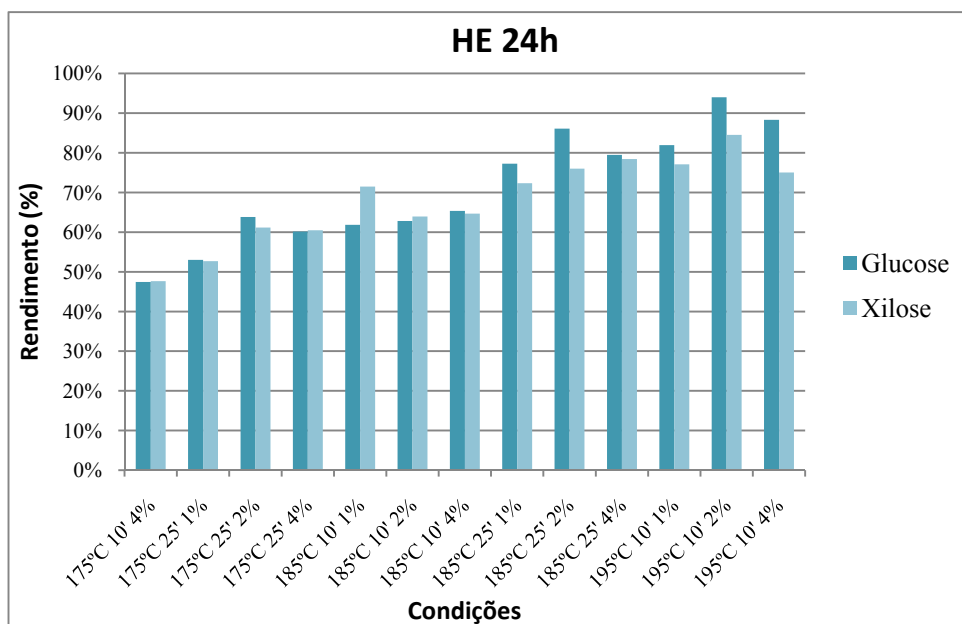


Figura 5.8 – Rendimento de hidrólise enzimática a 24h

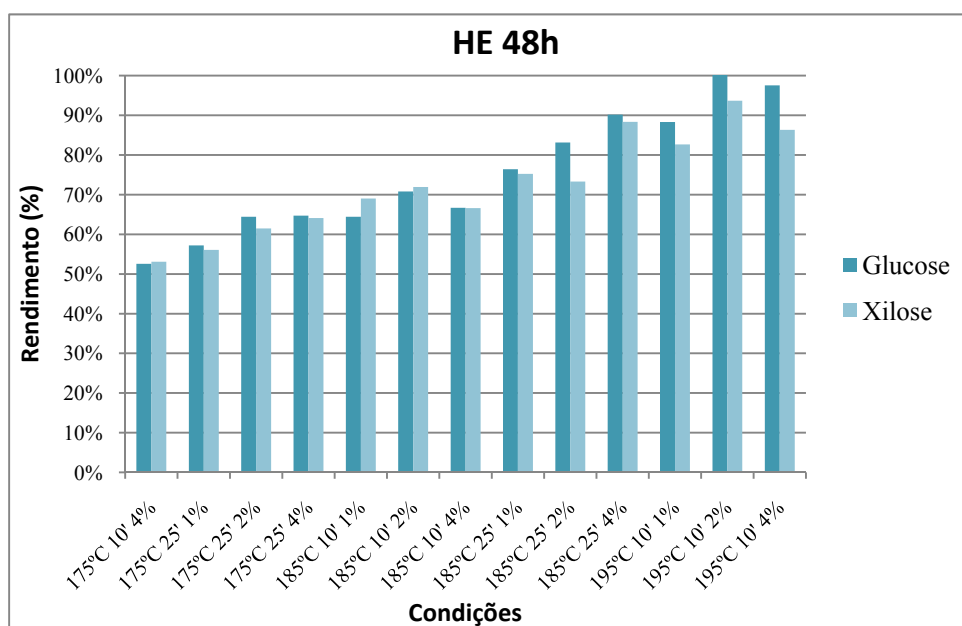


Figura 5.9 – Rendimento de hidrólise enzimática a 48h

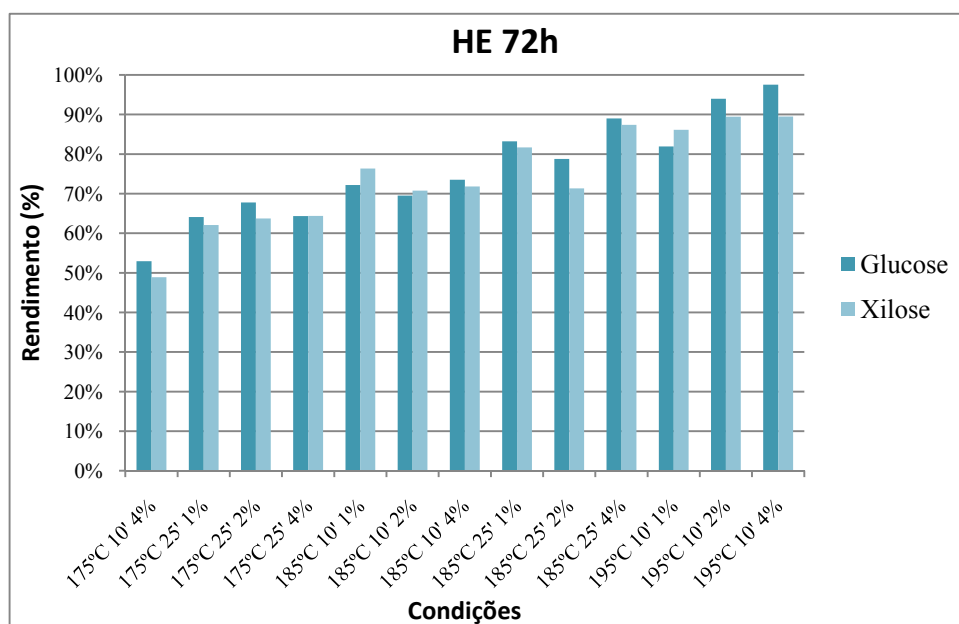


Figura 5.10 – Rendimento de hidrólise enzimática a 72h

No que respeita à glucose verifica-se que há um aumento do rendimento de hidrólise à medida que se aumentam tanto o tempo como a temperatura do processo. Já a concentração de ácido acético parece não influenciar muito o rendimento de hidrólise nas condições mais suaves do processo, sendo que à medida que se aumenta a temperatura se verifica uma maior influência nesta variável. Quanto à xilose verifica-se uma tendência similar, sendo que a influência da concentração de ácido acético é mais evidente para temperaturas e tempos superiores. Apesar de não se terem realizado experiências a 195°C e 25 minutos seria de esperar que, para estas condições, a influência da concentração de ácido acético fosse ainda mais perceptível.

Da análise dos rendimentos para os três tempos de colheita de amostra conclui-se ainda que a actividade das enzimas é superior nas primeiras 24 horas, uma vez que não se verificam grandes alterações nos rendimentos a partir desse período. No gráfico relativo às 48h verifica-se que, para 195°C e tempo de 10 minutos utilizando 2% ácido acético, o rendimento de glucose ultrapassa os 100%, o que se pode dever ao facto da diluição não ter sido realizada correctamente.

Para avaliar a eficácia do pré-tratamento calculou-se o rendimento global de açúcares e utilizou-se este parâmetro para seleccionar as condições de pré-tratamento que conduzem aos maiores rendimentos. Este parâmetro é definido como a razão entre os açúcares produzidos tanto na etapa de pré-tratamento como na HE, e os açúcares

presentes na matéria-prima. A Figura 5.11 mostra os resultados dos rendimentos globais de glucose e xilose. Constata-se que para condições mais suaves de pré-tratamento o rendimento global de xilose é superior ao de glucose, invertendo-se esta situação à medida que se aumenta a severidade do pré-tratamento. Isto verifica-se devido ao facto da xilose começar a solubilizar a uma temperatura intermédia, degradando-se nas condições mais elevadas.

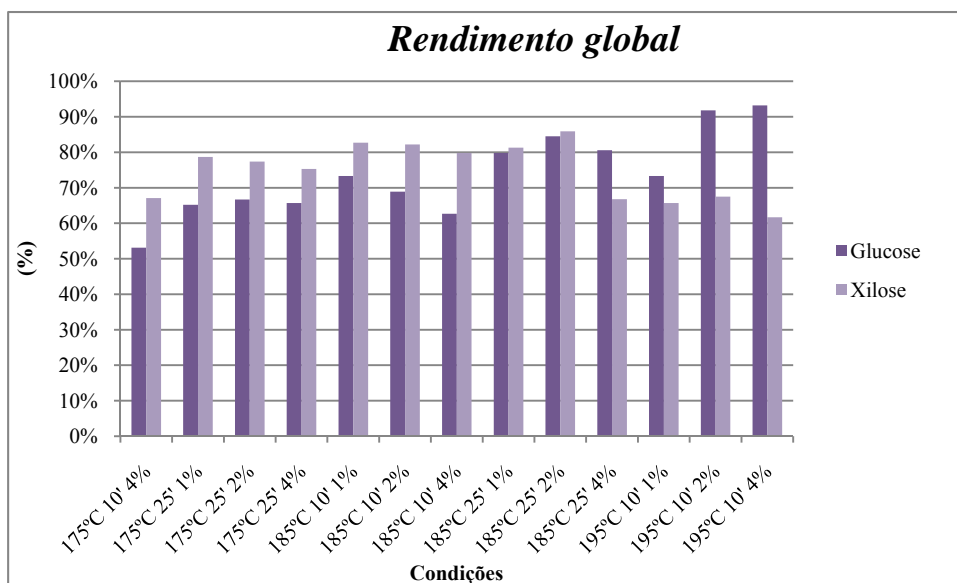


Figura 5.11 – Rendimento global de hidrólise enzimática

Com base nos estudos realizados conclui-se que os melhores rendimentos globais de glucose, e que portanto facilitam a etapa seguinte onde são utilizados microrganismos capazes de a fermentar produzindo etanol, são obtidos para as condições 195°C, 10', 2% e 195°C, 10', 4%, não existindo uma diferença significativa entre ambas. No entanto, elegeu-se, para a etapa de SFS posterior as condições que utilizam 2% de ácido acético, uma vez que é a que apresenta maior rendimento de xilose.

#### 5.4. Sacarificação e fermentação simultâneas (SFS)

Após a determinação da recuperação de açúcares e do rendimento global de hidrólise enzimática, elegeram-se as condições onde foram obtidos os melhores resultados, ou seja, 185°C, 10 minutos e 2% de ácido acético e 195°C, 10 minutos e 2% de ácido acético, respectivamente, e realizaram-se ensaios de pré-tratamento LHW num reactor

idêntico ao anterior mas com maior capacidade (2L), de modo a obter uma quantidade suficiente de substrato para os ensaios posteriores de HE e SFS. Introduziram-se inicialmente 100g de palha e 1L de água e procedeu-se de forma idêntica à anteriormente descrita antes e após o pré-tratamento. Os ensaios foram realizados em duplicado. No final do pré-tratamento juntaram-se os substratos obtidos nas duas réplicas realizadas e analisou-se o produto final de acordo com as metodologias descritas anteriormente. Os resultados obtidos para a fracção sólida são apresentados na Tabela 5.5. A análise da fracção líquida é mostrada na Tabela 5.6. Neste caso a análise foi realizada para as duas réplicas em separado (designadas por (1) e (2)).

**Tabela 5.5** – Composição da fracção sólida após o pré-tratamento no reactor de 2L de capacidade

<b>FRACÇÃO SÓLIDA</b>				
<b>Condições</b>	<b>Recuperação de sólidos insolúveis</b>	<b>Celulose</b>	<b>Hemicelulose</b>	<b>Lenhina insolúvel em ácido</b>
Matéria-prima	---	<b>37.8</b>	<b>24.9</b>	<b>12.5</b>
185°C 10' 2%	66.9	53.2	12.4	24.2
195°C 10' 2%	58.4	61.2	6.4	28.0

**Tabela 5.6** – Valores de pH e composição em açúcares da fracção líquida obtida após o pré-tratamento

<b>FRACÇÃO LÍQUIDA</b>						
<b>Condições</b>	<b>pH</b>	<b>Glucose</b>	<b>Xilose</b>	<b>Galactose</b>	<b>Arabinose</b>	<b>Manose</b>
185°C 10' 2% (1)	4.0	2.9	14.3	0.8	1.4	0.0
185°C 10' 2% (2)	4.0	3.0	14.4	1.0	1.8	0.0
195°C 10' 2% (1)	3.8	2.4	9.6	0.7	0.6	0.0
195°C 10' 2% (2)	3.9	2.6	12.8	0.9	0.9	0.0

Com o objectivo de estudar quais as melhores condições de HE a aplicar nos ensaios de SFS, realizou-se um estudo prévio sobre a influência de diferentes concentrações de enzima (15 ou 20 UPF) e de substrato (5, 10 e 15% m/V) nos rendimentos de HE do material pré-tratado obtido na actividade anterior.

Para este estudo foi utilizada uma mistura de enzimas com actividade celulase e hemicelulase. Como celulase utilizou-se a enzima Cellic C (preparação enzimática com actividade celulase e  $\beta$ -glucosidade) e como hemicelulase a Cellic H (enzima com actividade principal endoxilase). A hidrólise enzimática foi levada a cabo a 50°C e pH 4.8 (solução tampão de citrato de sódio 0.05M), durante 72h (Figura 5.13). Cada um dos

ensaios foi realizado em duplicado. Os resultados obtidos ao fim de 72h estão representados nas Figuras 5.13 e 5.14.



Figura 5.12 – Hidrólise enzimática num aparelho Certomat®

A análise das Figuras 5.13 e 5.14 permite concluir que se obteve um rendimento superior para as hidrólises realizadas com 20 UPF. Os baixos rendimentos obtidos para as concentrações de sólidos de 10 e 15 % (m/V) podem ser justificados pelo facto de, nas primeiras 48h, se terem verificado dificuldades de homogeneização destas amostras, dificuldade essa associada ao elevado teor de sólidos comparativamente com o volume da solução tampão utilizada. Desta forma, o meio torna-se cada vez mais denso com o aumento do teor de sólidos, dificultando a actividade das enzimas, o que se reflecte em rendimentos de hidrólise inferiores.

Apesar dos maiores rendimentos de hidrólise se terem verificado para uma carga de sólidos de 5% (m/V), os ensaios de SFS foram realizados com uma carga de sólidos de 10% (m/V). Independentemente da temperatura a que se realiza o processo, a concentração de sólidos deve ser tão elevada quanto possível para assegurar altas concentrações de açúcares no meio que permitam obter elevadas concentrações finais de etanol. Para além disso, nos processos de SFS não se acumulam produtos de hidrólise, pelo que em princípio se podem utilizar cargas de sólidos superiores. No entanto, num processo de SFS convencional a quantidade de substrato está geralmente limitada a 10% (m/V), devido à elevada viscosidade apresentada pela maioria dos materiais lenhocelulósicos que dificulta a fluidez dos meios no reactor (Rosgaard et al., 2007; Varga et al, 2004).

Das Figuras 5.13 e 5.14 destaca-se, ainda, o aumento do rendimento da xilose relativamente aos ensaios anteriores, realizados com as enzimas NS50010 e NS50013,

uma vez que foram utilizadas as enzimas Cellic CTec e Cellic HTec e esta última apresenta actividade hemicelulase, o que não se verificava na mistura utilizada anteriormente.

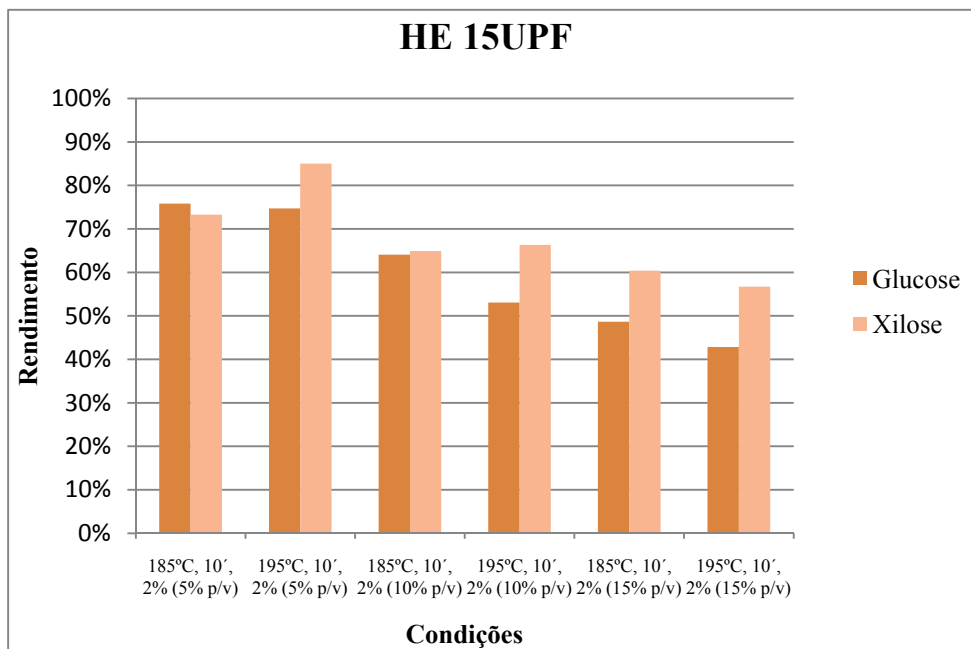


Figura 5.13 – Rendimento de HE para uma carga de enzimas de 15 UPF

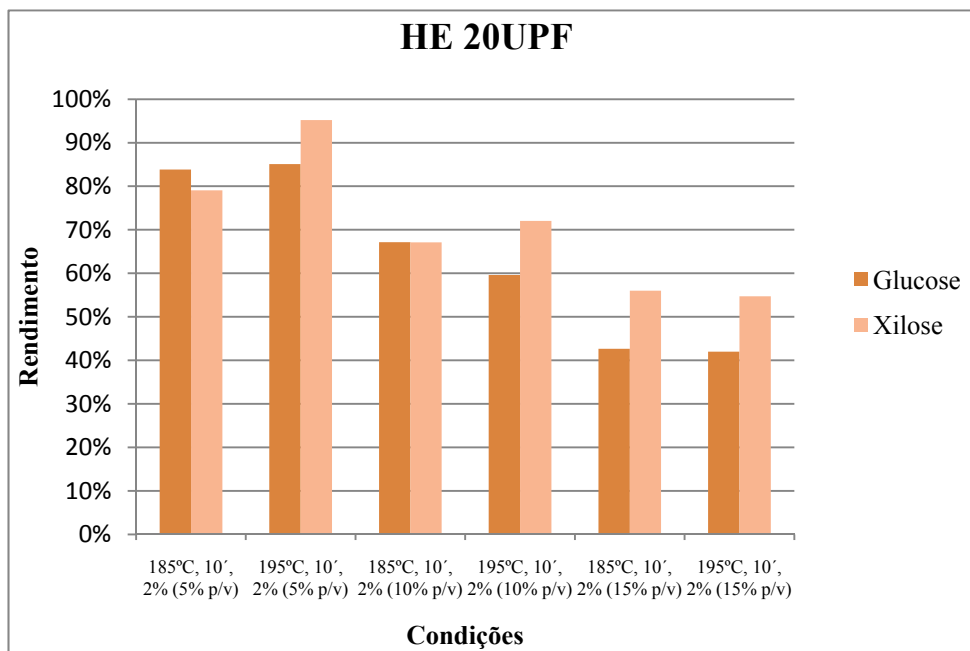


Figura 5.14 – Rendimento de HE para uma carga de enzimas de 20 UPF

O processo de SFS, em que a sacarificação e fermentação da celulose têm lugar no mesmo reactor, representa um dos mais importantes avanços relacionados com a produção de etanol a partir da biomassa lenhocelulósica (Pejó, 2010). A presença no mesmo reactor do microrganismo responsável pela fermentação e das enzimas utilizadas na hidrólise evitam a acumulação de glucose e celobiose no meio, o que se traduz num maior rendimento de hidrólise e maior produtividade de etanol.

Os ensaios de SFS foram realizados em matrizes tipo Erlenmeyer de 100 mL contendo 25 mL de meio. Tal como referido no início deste ponto, como meio de fermentação utilizou-se a fracção sólida do material pré-tratado, com uma carga de sólidos de 10% (m/v), à qual se acrescentou uma solução de enzima de 20 UPF. Utilizou-se uma mistura de enzimas com actividade celulase e hemicelulase, sendo as enzimas utilizadas a Cellic C e Cellic H, respectivamente. Os microrganismos utilizado foi o *Saccharomyces cerevisiae*, activado com 30g de glucose e sais de extracto de levedura, sulfato de amónio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e hidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), durante 16h. As amostras foram inoculadas com 1mL do microrganismo e incubadas durante 72h, a 35°C e uma agitação de 150 rpm. Os ensaios foram realizados em duplicado. Retiraram-se amostras a cada 24h e centrifugaram-se para eliminar o resíduo insolúvel. Parte do líquido resultante foi diluído (1/4) e analisado em cromatografia gasosa com detector FID (*Flame Ionization Detector*) para a determinação de etanol (Figura 5.15) e em HPLC para a determinação dos açúcares resultantes.



Figura 5.15 – Cromatógrafo utilizado para a determinação de etanol

A levedura utilizada no processo de SFS foi a *S. cerevisiae*. Este microrganismo é muito utilizado nos processos de fermentação alcoólica devido à sua alta tolerância ao etanol, aos compostos tóxicos produzidos durante o pré-tratamento e ao facto de conduzirem a rendimentos próximos do máximo teórico (0,51 g/g) (Pejó, 2010). O desempenho da *S.*

*cerevisiae* está representado na Figura 5.16. A Tabela 5.7 lista os valores, obtidos por cromatografia para a glucose, xilose e etanol nas 72h do processo de SFS. Como se pode observar houve uma rápida actuação da levedura logo nas primeiras 24h do processo, uma vez que a glucose foi quase toda convertida durante esse período de tempo. No entanto, para o primeiro ensaio a 185°C, 10 minutos e 2% ácido acético verifica-se que essa conversão é mais lenta. Esta situação pode estar relacionada com problemas de fluidez do meio que dificultam a acção do microrganismo.

Como seria de esperar, devido à incapacidade da *S. cerevisiae* de fermentar a xilose, a concentração deste açúcar mantém-se praticamente constante ao longo das 72h do processo.

**Tabela 5.7** – Valores obtidos durante o processo de SFS (g/L)

	<b>Etanol</b>	<b>Glucose</b>	<b>Xilose</b>
<b>24h</b>			
<b>185°C,10',2% (1)</b>	8.05	5.73	3.79
<b>185°C,10',2% (2)</b>	10.85	0.98	3.67
<b>195°C,10',2% (1)</b>	14.93	0.93	2.68
<b>195°C,10',2% (2)</b>	15.01	0.93	2.72
<b>48h</b>			
<b>185°C,10',2% (1)</b>	13.53	0.00	3.34
<b>185°C,10',2% (2)</b>	13.17	0.00	3.07
<b>195°C,10',2% (1)</b>	18.95	0.00	2.64
<b>195°C,10',2% (2)</b>	19.22	0.00	2.78
<b>72h</b>			
<b>185°C,10',2% (1)</b>	13.86	0.00	3.88
<b>185°C,10',2% (2)</b>	14.21	0.00	3.73
<b>195°C,10',2% (1)</b>	21.23	0.00	2.52
<b>195°C,10',2% (2)</b>	21.29	0.00	2.58

A Figura 5.16 representa o desempenho da *S. cerevisiae* na conversão da glucose em etanol. Verifica-se que o aumento mais significativo da concentração ocorreu nas primeiras 24h, onde, para todas as condições, se obteve uma concentração acima dos 8 g/L. Nas 48h de processo constata-se que já não há glucose no meio, o que se reflecte num aumento rápido da concentração de etanol, para valores de aproximadamente 13 g/L para 185°C e 19 g/L para 195°C. No entanto, a concentração máxima (21,26 g/L) foi obtida após 72h a 195°C, 10' e 2%.

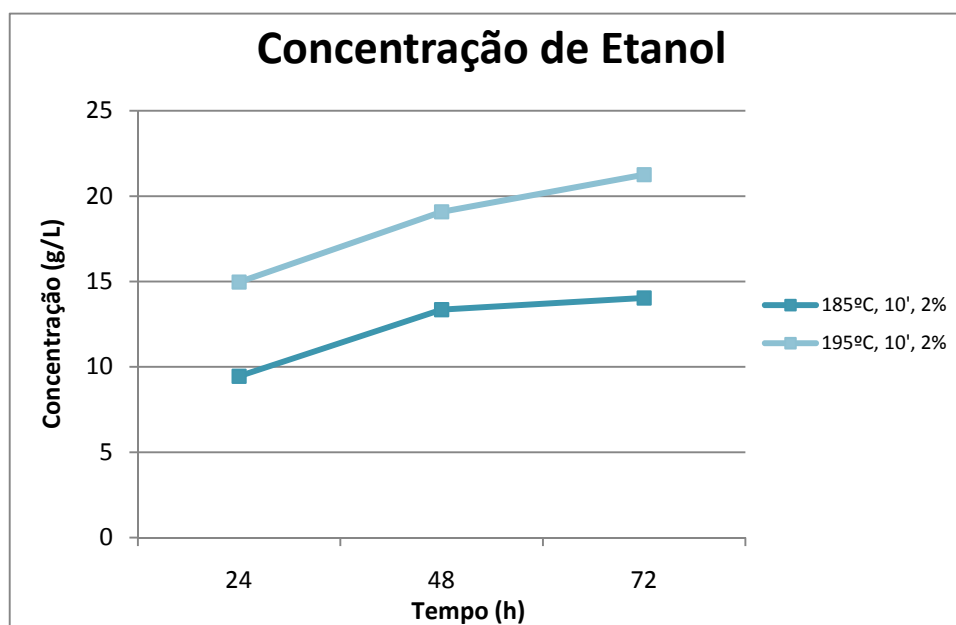


Figura 5.16 – Desempenho da *S. cerevisiae* no processo de SFS

A Figura 5.17 representa os rendimentos do processo de SFS, obtidos para 24, 48 e 72h. Os baixos rendimentos obtidos nas primeiras 24h do processo, podem ser justificados pela concentração de sólidos utilizada (10% m/V), visto que na recolha das amostras se verificou que estas estavam pouco homogêneas e apresentavam pouca fluidez. Uma alternativa para contornar este problema passaria pela realização de uma etapa prévia de pré-hidrólise, em que as enzimas ao hidrolisarem o substrato antes da inoculação das leveduras tornariam o meio mais fluido e fácil de manusear. No entanto, deve-se ter em atenção que a desactivação das celulasas depende do tempo e da temperatura, pelo que, em processos de SFS precedidos por pré-hidrólises onde as enzimas são submetidas a elevadas temperaturas durante elevados períodos de tempo, podem ocorrer fenómenos de desactivação enzimática (Öhgren et al., 2007; Tengbord et al., 2001). À medida que o tempo de processo aumenta, verifica-se um incremento do rendimento, sendo que o valor mais elevado (69,5%) se obtém para as 72h utilizando o substrato pré-tratado a 195°C, 10' e 2% de ácido acético. Este facto corrobora o verificado anteriormente, uma vez que estas condições conduziram a um rendimento de hidrólise enzimática superior.

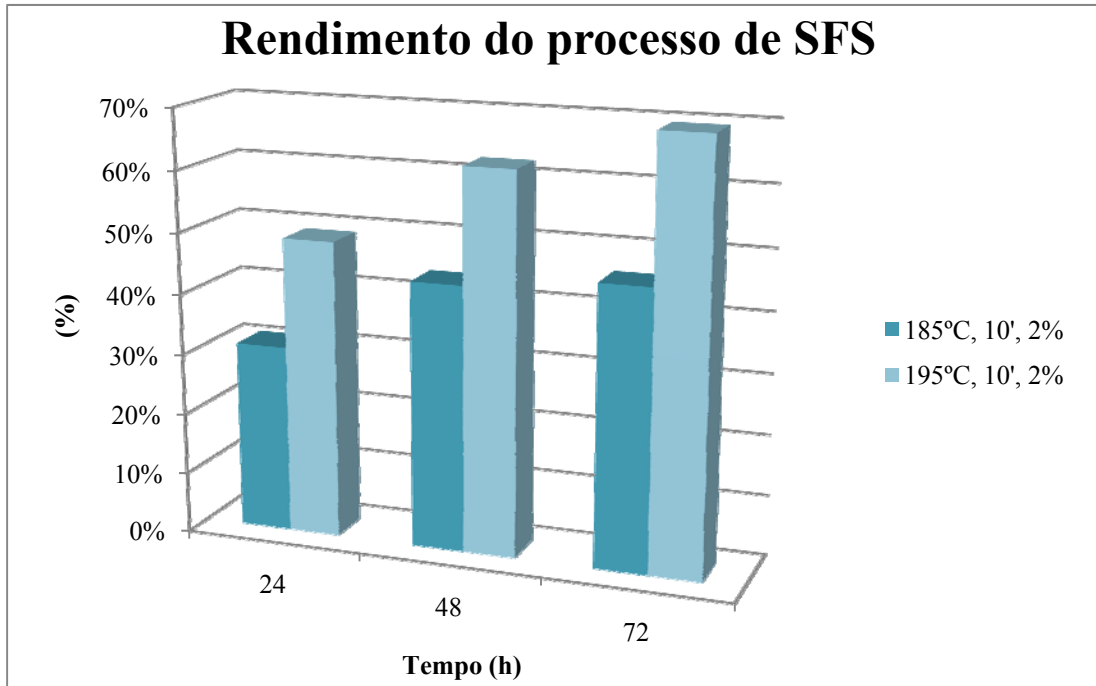


Figura 5.17 – Rendimentos do processo de SFS

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO

Tendo em conta as inúmeras vantagens associadas à utilização dos biocombustíveis líquidos, vários países a nível mundial têm vindo a considerar indispensável o incentivo à sua produção. No caso de Portugal, são vários os tipos de culturas que podem ser utilizados para a produção de bioetanol, nomeadamente a biomassa de origem agrícola e florestal. A utilização de biomassa de origem nacional contribui ainda para a diminuição da dependência energética de Portugal em relação ao exterior, contribuindo para uma maior segurança energética do nosso país.

O presente trabalho consistiu na realização de um estudo sobre a produção de etanol a partir da palha de cevada. O procedimento experimental dividiu-se essencialmente em três etapas: (1) Determinação da composição da biomassa; (2) Pré-tratamento com água quente líquida (LHW) e ácido acético e (3) Obtenção de etanol a partir do resíduo sólido insolúvel (RSI) pré-tratado, mediante o processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SFS).

A cevada é um cereal tradicionalmente plantado em países de clima temperado. É muito utilizada para alimentação de animais, tanto sob a forma de rações, como por utilização directa do grão. O grão da cevada é também muito utilizado na fabricação de bebidas, na composição de farinhas para alimentação infantil, na produção de medicamentos e na formulação de produtos dietéticos.

A caracterização da palha de cevada foi realizada de acordo com os métodos recomendados pelo Laboratório Nacional de Energias Renováveis dos EUA (NREL) para a determinação dos componentes estruturais da biomassa lenhocelulósica. Pela aplicação desses métodos verificou-se que a palha de cevada analisada contém celulose ( $37,8 \pm 0,18\%$ ), hemicelulose ( $24,9 \pm 0,56\%$ ) e lenhina ( $13,7 \pm 0,51\%$ ) que somadas constituem 76,4% do seu peso total. Adicionalmente apresentou um conteúdo em extrativos de 10,5% e um teor de cinzas de  $7,0 \pm 0,19\%$ .

O pré-tratamento com água quente líquida (LHW), com adição de ácido acético, foi o pré-tratamento escolhido para a realização deste estudo. Foram realizados diversos ensaios utilizando diferentes temperaturas (175, 185 e 195°C), tempos de tratamento (10

e 25 minutos) e concentração de ácido acético (1, 2 e 4 %). Este pré-tratamento revelou-se um método efectivo alterando a estrutura da palha de cevada, facilitando a posterior acessibilidade das enzimas na etapa de hidrólise enzimática. Tal como seria de esperar, o tratamento por LHW provocou uma solubilização parcial da hemicelulose na fracção líquida e uma concentração da celulose e da lenhina no resíduo sólido insolúvel (RSI). Verificou-se que a fracção líquida, obtida após filtração do material pré-tratado, é maioritariamente constituída por açúcares solubilizados procedentes da fracção hemicelulósica e produtos tóxicos gerados durante o pré-tratamento. A xilose foi o açúcar obtido em maior quantidade, sendo que a aplicação de condições mais severas no processo de pré-tratamento favorece a sua solubilização. A maior recuperação de açúcares, 61,72% de xilose no líquido e 91,71% de glucose no sólido, verificou-se quando se utilizaram as seguintes condições de pré-tratamento: temperatura de 185°C, tempo de 10 minutos e concentração de ácido acético de 2%.

Para avaliar a eficácia do pré-tratamento, realizaram-se ensaios de hidrólise enzimática (HE), utilizando as enzimas Novozym ® 50013 (celulase) e 50010 ( $\beta$ -glucosidase). Conclui-se que, de uma forma geral, os rendimentos de HE aumentaram com o aumento do tempo e da temperatura utilizados no pré-tratamento. A concentração de ácido acético utilizada revelou ter pouca influência no rendimento obtido. Nestes ensaios de HE, realizados com o RSI, obtiveram-se rendimentos superiores a 80% para as condições mais severas de pré-tratamento, sendo que a melhor combinação para os valores obtidos para a glucose e a xilose (91,8 e 67,5%, respectivamente), se verificou para as condições de 195°C, 10 minutos e 2% ácido acético.

O processo de SFS utilizando a palha de cevada pré-tratada visando a produção etanol foi realizado para uma carga de enzimas e sólidos de 20 UPF e 10% (m/V), respectivamente. Estas condições foram seleccionadas após um estudo prévio de HE com as enzimas Cellic CTec (preparação enzimática com actividade celulase e  $\beta$ -glucosidade) e Cellic HTec (enzima com actividade principal endoxilase). A concentração mais elevada de etanol, 21,26 g/L, foi obtida com o substrato proveniente do pré-tratamento realizado nas condições de 195°C, 10 minutos e 2% de ácido acético. O rendimento de etanol correspondente foi de 69,5%.

Durante a realização deste trabalho experimental uma das principais dificuldades correspondeu à etapa de SFS, decorrente da falta de fluidez das amostras que foi principalmente notória nas primeiras horas de processo e para cargas de sólidos iguais ou superiores a 10% (m/V). Uma forma possível de contornar este problema consiste na realização de uma etapa de pré-hidrólise, uma vez que a viscosidade dos materiais lenhocelulósicos diminui com o aumento da actividade celulósica devido à perda de estrutura e à diminuição da capacidade de retenção de água (Rosgaard et al., 2007). Esta etapa consiste na realização de uma hidrólise enzimática, antes do processo de SFS, onde as enzimas hidrolisam o substrato antes da inoculação das leveduras. Esta hidrólise enzimática pode ser realizada a uma temperatura superior à da SFS, uma vez que ocorre na ausência de leveduras, o que aumenta a taxa de hidrólise enzimática e, consequentemente, a taxa de liquefacção do meio (Jørgensen et al., 2007). Esta maior fluidez proporciona uma melhor agitação do meio, levando a uma distribuição mais uniforme das enzimas e microrganismo e a um melhor controlo do pH e da temperatura. Outra opção para conseguir concentrações superiores de sólidos no meio sem gerar problemas de viscosidade excessiva consiste na utilização de processos semi-contínuos (Rudolf et al., 2005; Varga et al., 2004). Nestes casos, a adição do substrato é efectuada de forma gradual, o que implica uma hidrólise contínua do material. As enzimas são acrescentadas juntamente com o substrato, o que provoca uma diminuição da viscosidade, favorecendo a homogeneização do meio. Este processo representa uma alternativa muito viável ao processo de SFS convencional, uma vez que melhora a eficiência do processo, conduzindo a concentrações de etanol superiores.

Face aos resultados obtidos e problemas identificados no decorrer da realização do presente trabalho, sugere-se como trabalho futuro o estudo do efeito da utilização de uma etapa de pré-hidrólise antecedendo o processo de SFS, assim como o estudo da viabilidade de utilização de processos semi-contínuos nesta etapa.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, E., 1977. Lignin chemistry-past, present and future. *Wood Sci. Technol.* 11, 169-218.

Alfani A., Gallifuoco F., Saporosi A., Spera A., Cantarella M., 2000. Comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25, 184-192.

Allen S.G., Schulman D., Lichwa J., Antal M.J., 2001. A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. *Industrial Engineering and Chemistry Research* 40, 2934-2941.

Ballesteros I., Negro M.J., Oliva J.M., Cabañas A., Manzanares P., Ballesteros M., 2006. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1-3, 496-508.

Ballesteros I., Oliva J.M., Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros M., 2002. Simultaneous saccharification and fermentation process for converting the cellulosic fraction of olive oil extraction residue into ethanol. *Grasas y Aceites* 53, 282-288.

Bardet, M., Lundquist, K., Parkas, J., Robert, D., Von Unge, S., 2006. C- 13 assignments of the carbon atoms in the aromatic rings of lignin model compounds of the arylglycerol beta- aryl ether type. *Magnetic Resonance Chemistry*, 44 (10): 976- 979.

Bastos, V. D., 2007. Etanol, álcoolquímica e Biorrefinarias.

Berlin, A.; Gilkes, N.; Kurabi, A.; Bura, R.; Tu, M.; Kilburn, D.; Saddler, J, 2005. Weak ligninbinding enzymes - a novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.121, p.163–170.

Bioetanol de cana, 2008. Disponível em: <<http://www.bioetanoldecana.org>>. Acesso em: 8 Dez. 2010.

Bobleter, O., 1994. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog. Polym. Sci.* 19, 797–841.

Brown R.M., 2003. Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 42, 487-495.

Browning, B.L., 1967. *Methods of wood chemistry*. Ed. John Wiley & Sons. New York.

Buranov A.U. y Mazza G., 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products* 28, 237-259.

Cara C., Romero I., Oliva J.M., Sáez F., Castro E., 2007. Liquid Hot Water pretreatment of olive tree pruning residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 136-140.

Dahlman O., Jacobs A., Sjöberg J., 2003. Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps. *Cellulose* 10, 325-334.

Demirbas, A., 2009. Biohydrogen, For Future Engine Fuel Demands. In Chapter 3. *Biofuels*, pp. 61-84. Springer Verlag.

Diniz, D. S., 2008. Produção de álcool etílico utilizando como matérias primas resíduos florestais e agrícolas. Tese de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa.

Domínguez, J.M.O., 2003. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tese de Doutoramento. Universidad Complutense de Madrid.

Duff S. J. B. & Murray W. D. (1996) Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel ethanol. *Bioresour. Technol.* 55: 1-33.

Falkehag, S.I., 1975. Lignin in materials. *App. Polym. Symposium*, 28: 247- 257.

Fengel D. y Wegener G., 1989. Wood, Chemistry, Ultrastructure and Reactions. Berlin-New York: Walter de Gruyter.

Ferapontova, E.E., Castillo, J., Gorton, L., 2006. Bioelectrocatalytic properties of lignin peroxidase from *Phanaerochaete chrysosporium* in reactions with phenols, catechols and lignin- model compounds. *Biochemistry and Biophysics Acta General Subject*, 1760 (9): 1343- 1354.

Ferraz, A., Baeza, J., Rodriguez, J., Freer, J., 2000. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. *Biores. Technol.*, 74 (3): 201- 212.

Galp Energia, 2010. Disponible em: <[www.galpenergia.com/PT](http://www.galpenergia.com/PT)>. Acceso em: 7 Jun. 2011.

Glasser, W.G., 1990. Lignina. En: *Pulpa y papel. Química y tecnología química*. Ed. Wiley & Sons, Inc. México D.F. pp. 71- 150.

Hassan, M.S.B.M., 2008. Batch Ethanol fermentation using glucose derived from tapioca flour starch by *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of inoculum age and agitation speed. Thesis to the degree of bachelor. Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering. Universiti Malaysia Pahang, May 2008.

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

Holtzapple, M.T., 1993. Lignin. En: *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. Ed. Academic Press., Londres. pp. 2731- 2738.

Jiménez, S.C., 2009. Fraccionamiento integral de vegetales no alimentarios para la obtención de pasta celulósica y subproductos. Memoria para optar al grado de doctor. Universidad de Huelva.

Jørgensen, H., Kristensen, J.,B., Felby, C., 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 1, 119-134.

Khan A. W., Labrie J. P., & McKewn J., 1986. Effect of electron-beam irradiation pretreatment on the enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnol Bioeng.* 28: 1449-1453.

Kohlmann, K.L., Westgate, P.J., Sarikaya, A., Velayudhan, A., Weil, J., Hendrickson, R., Ladisch, M.R., 1995. Enhanced enzyme activities on hydrated lignocellulosic substrates. BTEC paper 127. In: 207th American Chemical Society National Meeting, ACS Symposium series No. 618. *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates*, pp. 237–255.

Kosaric N, Pieper H. J., Vardar-Sukan F., 2001. *The biotechnology of ethanol: Classical and future applications* - edited by M. Roehr. Weinheim, Alemanha.

Larsson S., Quintana S., Reimann A., Nilvebrant N.O., Jonsson, L.J., 2000. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-86, 617-632.

Laser M., Schulman D., Allen S. G., Lichwa J., Antal Jr. M. J., Lynd L. R., 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cana bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology* 81: 33-44.

Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol Fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 627-642.

Lynd L.R., Weimer P. J., Van Zyl W.H., Pretorius I. S., 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 506-577.

Martín, C., Manzanares, P., 1994. Biomasa lignocelulósica. Polímeros constitutivos. *Processos Biológicos de Degradación de la Lignina*. CIEMAT 754, ISSN 0214-087X. Madrid, 1994.

Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., Ladisch, M.R., 2005. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresour. Technol.* 96, 1986–1993.

Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros I., Oliva J.M., Cabañas A., Ballesteros, M., 2003. Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105, 87-100.

Nobles D.R., Romanovicz D.K., Brown R.M., 2001. Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? *Plant Physiology* 127, 529-542.

NREL, 2009. Disponível em: <[http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html)>. Acesso em: 7 Jun. 2011

Öhgren K., Vehmaanpera J., Siika-aho M., Galbe M., Viikari L., Zacchi, G., 2007. 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

Pan, X.; Xie, D.; Gilkes, N.; Gregg, D. J.; Saddler, J. N., 2005. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p.1069-1079.

Pejó, M.E.T., 2010. Bioetanol de Paja de Trigo: estratégias de integração de las etapas del processo. Tesis doctoral. Universidade Complutense de Madrid.

Portal Ecodebate, 2008. Queima de combustíveis fósseis no mundo cresce e eleva risco de aquecimento. Disponível em: <<http://www.ecodebate.com.br/2008/04/11/>>. Acesso em: 8 Dez. 2010

Rosgaard, L., Andric, P., Dam-Johansen, K., Pedersen, S., Meyer, A., S., 2007. Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 143, 27-40.

Rudolf, A., Alkasrawi, M., Zacchi, G., Lidén, G., 2005. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology* 37, 195-204.

Sasikumar, E., Viruthagiri, T., 2010. Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of Sugarcane Bagasse – Kinetics and Modeling. *International Journal of Chemical and Biological Engineering* 3:2.

Schmidell, W., Facciotti, M.C.R., 2001. *Biorreatores e Processos Fermentativos*. Cap. 8 In: *Biotecnologia Industrial*, vol. 2, Engenharia Bioquímica.

Schmidell, W., Lima, U.A., Aquarone, E., et al., São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda.

Silva, V. F. N., 2009. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Tese de Mestrado.

Silva, N. L. C., 2010a. Produção de Bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da Indústria de Celulose, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Tese de Mestrado.

Silva M., Júnior J., Júnior C., 2010b. Produção de etanol de segunda geração: uma revisão. *Pensamento plural: Revista Científica da UNIFAE*, São João da Boa Vista, v.4, n.2.

Sims, R., Taylor, M., Saddler, J., Mabee, W., 2008. From 1st- to 2nd- generation biofuel Technologies- Full report- An overview of current industry and RD& Activities. International Energy Agency, Nov. 2008.

Sun Y., Cheng J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83: 1-11.

Taherzadeh, M, Karimi, K., 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*, Vol. 2(3), p. 472-499.

Taherzadeh, M, Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 9, p. 1621-1651.

Tengborg C., Galbe M., Zacchi G., 2001. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam pretreated softwood. *Biotechnology Progress* 17, 110-117.

Thomas, R.J. ,1983. Wood anatomy and permeability En: *Wood and Agricultural Residues*. Ed. Academic Press. New York.

Varga, E., Klinke, B., Réczey, K., Thomsen, B., 2004. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering* 88, 567-574.

Weil, J.R., Brewer, M., Hendrickson, R., Sarikaya, A., Ladisch, M.R., 1997. Continuous pH monitoring during pretreatment of yellow poplar wood sawdust by pressure cooking in water. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 68, 21–40.

Wyman C.E.,1996. *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*. Taylor & Francis, Washington.

Xiaojian, M., Chun, C., 2008. Application in fuel ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation coupled with separation. *Zheng Zhou University*. Setembro, 2008.

Yu, Y.; Lou, X.; Wu, H. Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot-Compressed Water and Its Comparisons with Other Hydrolysis Methods. *Energy & Fuels*, v.22, p.46–60, 2008.

Zhang, Y.H.P., 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.35, p.367–375.

Zheng Y. Z., Lin H. M., & Tsao G. T., 1998. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnol. Prog.* 14: 890-896.

Zogaj X., Nimtz M., Rohde M., Bokranz W., Romling U., 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology* 39, 1452-1463.

## **8. ANEXOS**

**A1. Caracterização da palha de cevada**

**A2. Pré-tratamento LHW com ácido acético**

**A3. Ensaios de HE (diferentes cargas de sólidos e enzimas)**

**A4. Rendimento global de HE**

**A5. Ensaios de SFS**

## **A1. Caracterização da palha de cevada**

Neste anexo são apresentados os procedimentos e cálculos realizados na caracterização da palha de cevada, de acordo com os procedimentos do NREL.

### 1. Preparação das amostras para determinação da composição:

Moeram-se 50g de amostra a 2mm e fizeram-se passar por peneiros de 0,85 e 0,2 mm. A fracção retida no peneiro de 0,85 mm, foi reprocessada e o processo repetido até que não houvesse biomassa nesse peneiro. A biomassa que se depositou no último recipiente constitui a fracção de finos (tamanho inferior a 0,2 mm), enquanto que a restante é referente à fracção de grossos (tamanho compreendido entre 0,85 e 0,2 mm). A percentagem de ambas as fracções é calculada através das seguintes expressões:

$$\% \text{Grossos} = \frac{P_{\text{grossos}}}{P_{\text{grossos}} + P_{\text{finos}}} \times 100$$

$$\% \text{Finos} = \frac{P_{\text{finos}}}{P_{\text{finos}} + P_{\text{grossos}}} \times 100$$

A fracção de grossos foi conservada para determinação da composição, enquanto que a de finos foi utilizada para a determinação do teor de cinzas. Os valores obtidos na composição quando corrigidos pelo conteúdo de cinzas, reportam-se à biomassa completa.

### 2. Determinação dos extractivos:

Para a determinação dos extractivos procedeu-se à extracção com água e etanol utilizando um extractor automático. Tal procedimento consiste em colocar as células de extracção contendo 1 g de amostra, previamente preparadas com filtros de vidro de tamanho adequado no fundo. O extractor automático utilizado foi o ASE Del Dionex, com os seguintes parâmetros:

- Pressão: 1500 Psi
- Temperatura: 100 °C
- Tempo de pré-aquecimento: 0
- Tempo de aquecimento: 5 minutos

- Tempo estático: 7 minutos
- Volume de lavagem: 150%
- Ciclos estáticos: 3

Foram realizadas duas extracções com água e uma com etanol. Ao volume de água obtido no total (resultante das duas extracções) retiraram-se 25 mL para a hidrólise com ácido sulfúrico (durante 30 minutos, a 121°C) e 5 mL para análise em HPLC. O restante volume foi colocado num evaporador rotativo equipado com um banho a 40°C e um sistema de vácuo. Uma vez evaporada toda a água, colocou-se o balão na estufa a 105°C, durante 24h, e pesou-se. O etanol do extracto alcoólico foi evaporado da mesma forma. A percentagem de extractivos é calculada através da seguinte expressão:

$$\% \text{ Extractivos} = \frac{P_{\text{balão+resíduo}} - P_{\text{balão}}}{T_{\text{peso a 105°C}}} \times 100$$

$P_{\text{balão}}$  – peso inicial do balão volumétrico;

$P_{\text{balão+resíduo}}$  – peso do balão com o resíduo que permanece após evaporação;

$T_{\text{seco a 105°C}}$  – teor de massa seca da amostra (1 – Fração de humidade).

### 3. Determinação dos componentes estruturais e não-estruturais:

Para medir os componentes estruturais e não-estruturais da palha de cevada foi necessária uma preparação prévia das amostras para a análise e hidrólise. Essa preparação consistiu na pesagem de 0,3g de amostra livre de extractivos, à qual se adicionaram 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72% e se levou a um banho a 30°C, durante 1 hora. Posteriormente, transferiram-se os hidrolisados para um frasco e juntaram-se 84 mL de água destilada a cada um deles. Colocaram-se, então, os frascos numa autoclave durante 1 hora, a 121°C.

Paralelamente a este procedimento, prepararam-se uma série de standards de recuperação de açúcares (SRS), que se levaram a hidrolisar juntamente com as amostras e que foram posteriormente utilizados para corrigir as perdas provocadas pela destruição de açúcares durante a hidrólise com ácido diluído. Os açúcares utilizados foram a glicose, xilose e galactose, pesando-se 0,3 g de cada um deles e adicionando-lhes 84 mL

de água e 3mL de ácido sulfúrico a 72%. Após a hidrólise ácida procedeu-se à filtração das amostras, com filtros de nylon.

### 3.1. Determinação da lenhina insolúvel em ácido:

Para a determinação da lenhina insolúvel em ácido utilizou-se a fracção sólida resultante da filtração da amostra hidrolizada de acordo com o procedimento descrito no ponto anterior. Depositou-se o filtro juntamente com a amostra em cadinhos de porcelana, previamente secos numa mufla a 575°C durante 4 horas, numa estufa, a 105°C, até peso constante. Anotou-se o peso do conjunto retirado da estufa para os cálculos da lenhina insolúvel em ácido e colocou-se seguidamente numa mufla a 575°C, durante 4 horas. Pesou-se novamente para a determinação das cinzas insolúveis em ácido. A lenhina insolúvel em ácido (LIA) é calculada através da seguinte expressão:

$$\% \text{LIA} = \frac{P_{\text{resíduo}, 105^{\circ}\text{C}} - P_{\text{cinzas}, 575^{\circ}\text{C}}}{P_{\text{amostra}} \times T_{\text{seco a } 105^{\circ}\text{C}}} \times 100$$

Onde:

$P_{\text{resíduo}, 105^{\circ}\text{C}}$  – peso do filtro e do resíduo sólido, após secagem a 105°C;

$P_{\text{cinzas}, 575^{\circ}\text{C}}$  – peso das cinzas obtidas, após oxidação a seco a 575°C;

$P_{\text{amostra}}$  – peso inicial da amostra

$T_{\text{seco a } 105^{\circ}\text{C}}$  – teor de massa seca da amostra (1 – Fração de humidade)

### 3.2. Determinação da lenhina solúvel em ácido:

A lenhina solúvel em ácido determinou-se por espectroscopia UV-VIS, a um comprimento de onda de 205 nm. A determinação da lenhina solúvel em ácido (LSA) é dada pela seguinte expressão:

$$\% \text{LSA} = \frac{A \times V_f \times F_d}{\epsilon \times P_{\text{amostra}} \times T_{\text{seco a } 105^{\circ}\text{C}}} \times 100$$

Onde,

A – absorvância da amostra a um comprimento de onda de 205 nm.

$V_f$  – Volume de filtrado

$F_d$  – factor de diluição

$\epsilon$  - coeficiente de absorvidade molar da biomassa para o comprimento de onda de 205 nm

$P_{\text{amostra}}$  – peso inicial da amostra

$T_{\text{seco a } 105^{\circ}\text{C}}$  – teor de massa seca da amostra (1 – Fração humidade)

A lenhina total é calculada através da soma da lenhina solúvel e insolúvel em ácido.

### 3.3. Determinação dos grupos acetilo:

Os grupos alifáticos presentes nos materiais herbáceos são fundamentalmente grupos acetilo que se podem combinar, como grupos O-acilo, com os polissacarídeos. Para a sua separação é necessário a realização de uma hidrólise ácida. O ácido acético obtido da separação dos grupos O-acilo é quantificado por HPLC (através de uma amostra da parte líquida obtida da filtração referida no ponto “Determinação dos componentes estruturais e não-estruturais”)

### 3.4. Determinação do teor de cinzas:

Para determinação do teor de cinzas totais na biomassa, submete-se uma amostra de 0,5 g de matéria-prima já extraída a uma oxidação a seco, levando-a, durante 8 horas, a uma mufla a  $575^{\circ}\text{C}$ . Após este período de tempo procede-se ao seu arrefecimento de forma lenta e pesa-se. O teor de cinzas totais é dado por:

$$\% \text{Cinzas totais} = \frac{P_{\text{cinzas a } 575^{\circ}\text{C}}}{T_{\text{seco a } 105^{\circ}\text{C}}} \times 100$$

$P_{\text{cinzas, } 575^{\circ}\text{C}}$  – peso das cinzas obtidas, após oxidação a seco a  $575^{\circ}\text{C}$ ;

$T_{\text{seco a } 105^{\circ}\text{C}}$  – teor de massa seca da amostra (1 – Fração humidade).

Para a determinação das cinzas correspondente à fracção de grossos e finos, procedeu-se de forma idêntica.

## A2. Pré-tratamento LHW com ácido acético

Foram realizados 13 ensaios utilizando três temperaturas (175, 185 e 195°C), dois tempos (10 e 25 minutos) e três concentrações de ácido acético (1, 2 e 4%). A Tabela A2.1 mostra as condições utilizadas para todos os ensaios realizados.

Tabela A2.1 – Ensaios realizados no reactor LHW

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ácido acético (% m/m) (g ácido/100 g palha)
175	10	4
175	25	1
175	25	2
175	25	4
185	10	1
185	10	2
185	10	4
185	25	1
185	25	2
185	25	4
195	10	1
195	10	2
195	10	4

Cada reacção utilizou 35 g de palha e adicionou-se um volume de 5mL da solução de ácido. Para cada concentração de ácido foi preparada uma solução de 50 mL de forma a manter a uniformidade da concentração em todos os ensaios. Tomando como referência a concentração de 1% de ácido acético:

1. Cálculo da quantidade necessária de ácido acético para cada ensaio:

$$\frac{1\text{g ácido}}{100\text{g palha}} \times 35\text{g palha} = 0.35\text{g ácido}$$

2. Cálculo da quantidade de ácido necessária para preparar os 50 mL de solução tendo por base que os 5 mL devem conter a quantidade desejada de ácido (0.35g):

$$\frac{0.35\text{g ácido}}{5\text{ mL solução}} \times 50\text{ mL solução} = 3.5\text{ g ácido}$$

3. Cálculo do volume de ácido correspondente a 3.5 g ( $\rho=1.05\text{ kg/L}$ ):

$$3.5\text{g ácido} \times \frac{1\text{kg}}{1000\text{g}} \times \frac{1\text{L}}{1.05\text{ kg}} = 0.0033\text{ L} = 3.3\text{ mL ácido acético}$$

Em síntese para a preparação dos 50 mL da solução pretendida (1% de ácido acético) mediram-se 3.3 mL do ácido para um balão de 50 mL e perpez-se com água. Para a preparação das outras concentrações seguiu-se uma metodologia semelhante. Para a solução de 2% e 4% utilizou-se um volume de 6.6 e 13.3 mL, respectivamente.

### A3. Ensaios de HE (diferentes cargas de sólidos e enzimas)

Os ensaios de HE foram efectuados com diferentes cargas de sólidos (5, 10 e 15%) e de enzimas (15 e 20 UPF). Os ensaios foram realizados com os produtos dos ensaios de LHW 2L, 185°C, 10', 2% e 195°C, 10', 2%. O total de ensaios para cada produto LHW foi de 6, uma vez que foram efectuadas 2 réplicas de cada ensaio, o total de matrizes preparados foi de 12.

Para a preparação dos ensaios seguiu-se a seguinte metodologia e foram realizados os seguintes cálculos:

#### 1. Resíduo sólido insolúvel (RSI) das amostras:

✓ **185°C, 10', 2%:** Humidade=77.09%  $\Rightarrow$  Peso seco=22.91%

✓ **195°C, 10', 2%:** Humidade=76.39%  $\Rightarrow$  Peso seco=23.61%

#### 2. Cálculo do resíduo sólido em base húmida (X):

✓ **5%:** 1g RSI seco/19 mL

✓ **10%:** 2g RSI seco/18 mL

✓ **15%:** 3g RSI seco/17 mL

#### **185°C, 10', 2%:**

$$\begin{array}{l} 100 \text{ g} \rightarrow 22.91 \text{ g RSI seco} \\ X \rightarrow 1 \text{ g RSI} \\ \quad \rightarrow 2 \text{ g RSI} \\ \quad \rightarrow 3 \text{ g RSI} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 100 \text{ g} \\ X \\ \quad \\ \quad \end{array}} \right\} \begin{array}{l} X= 4.36\text{g} \\ X= 8.73\text{g} \\ X=13.1\text{g} \end{array}$$

#### **195°C, 10', 2%:**

$$\begin{array}{l} 100 \text{ g} \rightarrow 23.61 \text{ g RSI seco} \\ X \rightarrow 1 \text{ g RSI} \\ \quad \rightarrow 2 \text{ g RSI} \\ \rightarrow 3 \text{ g RSI} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 100 \text{ g} \\ X \\ \quad \\ \rightarrow 3 \text{ g RSI} \end{array}} \right\} \begin{array}{l} X= 4.24\text{g} \\ X= 8.47\text{g} \\ X=12.7\text{g} \end{array}$$

#### 3. Preparação da solução de enzima:

As soluções de enzima foram preparadas para cada uma das concentrações de sólidos e enzimas, de modo a conseguir homogeneidade em todos os matrizes preparados evitando acumulação de erros de medição. A solução de enzima foi preparada de forma a ser suficiente para 5 matrizes e prevendo que podem haver perdas durante a

preparação dos mesmos. Pretende-se que os resultados sejam expressos em unidades de papel de filtro por g de glucose, pelo que se deve ter em conta a quantidade de celulose presente no substrato pré-tratado. As concentrações de celulose a 185°C e 195°C são, respectivamente, 53.208 e 61.166g/100g de matéria-prima. Admite-se, assim, que a quantidade de celulose nos dois substratos é de 0.6g tendo por base 1g de matéria-prima (RSI), uma vez que não produz grande influência nos resultados finais e facilita os cálculos e a preparação dos matrizes.

Tomando como exemplo solução de enzima 1 (15UPF e 5%):

$$5 \text{ matrizes} \times 1 \text{g RSI} \times 0.6 \text{g glucose} \times 15 \text{UPF} = 45 \frac{\text{UPF}}{\text{g glucose}}$$

Como se pretende realizar uma mistura de enzimas contendo a Cellic CTec e Cellic HTec, é necessário estabelecer uma relação entre elas. Assim, utilizou-se 90% de Cellic CTec e 10% de Cellic HTec, expresso em proteínas, o que se traduz numa proporção de 64 UPF de Cellic CTec para 36 UPF de Cellic HTec.

$$\text{Cellic CTec} : \frac{1 \text{mL}}{124 \text{UPF}} \times 45 \text{UPF} = 0.363 \text{mL}$$

$$\text{Cellic HTec} : \frac{0.363 \text{mL}}{64 \text{UPF}} \times 36 \text{UPF} = 0.204 \text{mL}$$

Tal como referido anteriormente, a solução de enzima foi preparada de forma a ser suficiente para preparar 5 matrizes sendo que a cada um deles se acrescenta 5 mL da mesma, o que dá um total necessário de 25 mL. A quantidade de tampão que se deve acrescentar a cada um dos matrizes é então calculada pela diferença entre o volume final de solução de enzima a preparar e o volume de enzimas:

$$\text{Solução tampão} = 25 - 0.323 - 0.204 = 24.4 \text{mL}$$

Para a preparação das restantes soluções de enzima procedeu-se de forma análoga. Os valores obtidos estão representados na tabela A3.1.

**Tabela A3.1 – Preparação das soluções de enzima**

Solução de enzima	Cellic C (mL)	Cellic H (mL)	Solução tampão (mL)
1 (15UPF, 5%)	0.363	0.204	24.4
2 (15UPF, 10%)	0.726	0.408	23.9
3 (15UPF, 15%)	1.089	0.613	23.3
4 (20UPF, 5%)	0.484	0.272	24.2
5 (20UPF, 10%)	0.968	0.544	23.5
6 (20UPF, 15%)	1.452	0.816	22.7

#### 4. Preparação dos matrizes para a HE:

A preparação dos matrizes para HE foi efectuada pesando a quantidade de substrato respectiva a cada uma das condições e acrescentando 5mL da solução de enzima correspondente à carga de sólidos e enzima desejada. Por fim a quantidade de solução tampão necessária para completar o volume correspondente a cada uma da carga de sólidos utilizada foi adicionada. Por exemplo, para 185°C, 10', 2% acético e uma carga de sólidos de 5% (1g RSI seco /19 mL):

$$\text{Solução tampão} = 19 - 5 - 3.36^* = 10.6\text{mL}$$

\*Valor de RSI presente no líquido (para uma carga de sólidos de 5% tem-se 1g de RSI seco)

A tabela A3.2 representa as quantidades de substrato, solução de enzima e solução tampão necessárias para a preparação dos matrizes para os diferentes ensaios de HE. A quantidade de solução de enzima é igual para todas as condições, variando apenas a solução de enzima adicionada.

**Tabela A3.2 – Preparação dos matrizes para os ensaios de HE**

Condições	Amostra	Quantidade de RSI (g)	Solução de enzima (mL)	Solução tampão (mL)
185°C, 10', 2% (5% p/v)	1	4.36	5	10.6
	2			
195°C, 10', 2% (5% p/v)	3	4.24	5	10.7
	4			
185°C, 10', 2% (10% p/v)	5	8.73	5	6.27
	6			
195°C, 10', 2% (10% p/v)	7	8.47	5	6.53
	8			
185°C, 10', 2% (15% p/v)	9	13.1	5	1.90
	10			
195°C, 10', 2% (15% p/v)	11	12.7	5	2.92
	12			

## 5. Cálculo do rendimento de HE:

O rendimento de glucose resultante de um processo de HE é dado por:

$$\eta = \frac{\text{glucose produzida}}{\text{glucose potencial}} \times 100$$

Considerando a experiência a 185°C, 10', 2% de ácido acético e uma carga de sólidos e de enzima de 5% (m/v) e 15 UPF, respectivamente, a glucose produzida e potencial é calculada de acordo com o seguinte procedimento:

- ✓ Glucose (resíduo sólido obtido do pré-tratamento)= 58.529 %

$$\frac{58.529 \text{ g glucose}}{100 \text{ g matéria-prima}} \times 1 \text{ g RSI seco} = 0.585 \text{ g glucose potencial}$$

- ✓ Glucose resultante da HE=23.278 g/L

$$\frac{23.278 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} \times 19 \text{ mL} = 0.442 \text{ g glucose produzida}$$

Então,

$$\eta = \frac{0.422}{0.585} \times 100 = 75.6\%$$

Para o cálculo do rendimento em xilose procede-se da mesma forma. Os resultados obtidos para o tempo de 72h estão representados nas A3.3 a A3.6.

**Tabela A3.3 – Resultados da HE com 15 UPF – rendimento em glucose**

Condições	Glucose	Glucose potencial	Glucose produzida	Rendimento	Média
185°C, 10', 2% (5% p/v)	23.278	0.585	0.442	75.6%	75.8%
185°C, 10', 2% (5% p/v)	23.427	0.585	0.445	76.1%	
195°C, 10', 2% (5% p/v)	24.065	0.612	0.457	74.8%	74.7%
195°C, 10', 2% (5% p/v)	24.040	0.612	0.457	74.7%	
185°C, 10', 2% (10% p/v)	40.371	1.171	0.727	62.1%	64.1%
185°C, 10', 2% (10% p/v)	42.974	1.171	0.774	66.1%	
195°C, 10', 2% (10% p/v)	36.475	1.223	0.657	53.7%	53.1%
195°C, 10', 2% (10% p/v)	35.650	1.223	0.642	52.5%	
185°C, 10', 2% (15% p/v)	50.609	1.756	0.860	49.0%	48.6%
185°C, 10', 2% (15% p/v)	49.860	1.756	0.848	48.3%	
195°C, 10', 2% (15% p/v)	46.642	1.835	0.793	43.2%	42.8%
195°C, 10', 2% (15% p/v)	45.821	1.835	0.779	42.5%	

Tabela A3.4 – Resultados da HE com 15 UPF – rendimento em xilose

Condições	Xilose	Xilose potencial	Xilose produzida	Rendimento	Média
185°C, 10', 2% (5% p/v)	5.256	0.585	0.100	17.1%	17.1%
185°C, 10', 2% (5% p/v)	5.280	0.585	0.100	17.1%	
195°C, 10', 2% (5% p/v)	3.299	0.612	0.063	10.2%	10.1%
195°C, 10', 2% (5% p/v)	3.224	0.612	0.061	10.0%	
185°C, 10', 2% (10% p/v)	9.140	1.171	0.174	14.8%	15.2%
185°C, 10', 2% (10% p/v)	9.533	1.171	0.181	15.5%	
195°C, 10', 2% (10% p/v)	5.164	1.223	0.098	8.0%	7.9%
195°C, 10', 2% (10% p/v)	5.015	1.223	0.095	7.8%	
185°C, 10', 2% (15% p/v)	13.006	1.756	0.247	14.1%	14.1%
185°C, 10', 2% (15% p/v)	13.036	1.756	0.248	14.1%	
195°C, 10', 2% (15% p/v)	6.562	1.835	0.125	6.8%	6.8%
195°C, 10', 2% (15% p/v)	6.492	1.835	0.123	6.7%	

Tabela A3.5 – Resultados da HE com 20 UPF – rendimento em glucose

Condições	Glucose	Glucose potencial	Glucose produzida	Rendimento	Média
185°C, 10', 2% (5% p/v)	25.285	0.585	0.480	82.1%	83.8%
185°C, 10', 2% (5% p/v)	26.361	0.585	0.501	85.6%	
195°C, 10', 2% (5% p/v)	27.477	0.612	0.522	85.4%	85.1%
195°C, 10', 2% (5% p/v)	27.319	0.612	0.519	84.9%	
185°C, 10', 2% (10% p/v)	42.793	1.171	0.770	65.8%	67.2%
185°C, 10', 2% (10% p/v)	44.556	1.171	0.802	68.5%	
195°C, 10', 2% (10% p/v)	40.090	1.223	0.722	59.0%	59.6%
195°C, 10', 2% (10% p/v)	40.950	1.223	0.737	60.3%	
185°C, 10', 2% (15% p/v)	46.184	1.756	0.785	44.7%	42.6%
185°C, 10', 2% (15% p/v)	41.914	1.756	0.713	40.6%	
195°C, 10', 2% (15% p/v)	42.447	1.835	0.722	39.3%	42.0%
195°C, 10', 2% (15% p/v)	48.191	1.835	0.819	44.6%	

Tabela A3.6 – Resultados da HE com 20 UPF – rendimento em xilose

Condições	Xilose	Xilose potencial	Xilose produzida	Rendimento	Média
185°C, 10', 2% (5% p/v)	5.509	0.585	0.105	17.9%	18.5%
185°C, 10', 2% (5% p/v)	5.861	0.585	0.111	19.0%	
195°C, 10', 2% (5% p/v)	3.627	0.612	0.069	11.3%	11.3%
195°C, 10', 2% (5% p/v)	3.678	0.612	0.070	11.4%	
185°C, 10', 2% (10% p/v)	9.610	1.171	0.183	15.6%	15.7%
185°C, 10', 2% (10% p/v)	9.693	1.171	0.184	15.7%	
195°C, 10', 2% (10% p/v)	5.650	1.223	0.107	8.8%	8.6%
195°C, 10', 2% (10% p/v)	5.405	1.223	0.103	8.4%	
185°C, 10', 2% (15% p/v)	12.346	1.756	0.235	13.4%	13.1%
185°C, 10', 2% (15% p/v)	11.814	1.756	0.224	12.8%	
195°C, 10', 2% (15% p/v)	6.071	1.835	0.115	6.3%	6.5%
195°C, 10', 2% (15% p/v)	6.524	1.835	0.124	6.8%	

#### A4. Rendimento global da HE

Para se obter uma visão global da HE, realizada após todos os ensaios de pré-tratamento, calculou-se o rendimento global do processo (*Overall Yield*) para a glucose e xilose. De seguida apresenta-se um exemplo de cálculo do rendimento de glucose para o ensaio realizado a 175°C, 10', 4%.

O rendimento de hidrólise enzimática é 52.9%. Se em 100g de matéria-prima pré-tratada se obtém 55.387g de glucose, calcula-se então o valor correspondente ao rendimento obtido:

$$\frac{55.387 \text{ g glucose}}{100 \text{ g mat – prima pré – tratada}} \times 52.9 = 29.3 \text{ g glucose}$$

Este valor corresponde à glucose obtida após a HE por 100 g de matéria-prima pré-tratada, sendo necessário calcular o valor de glucose correspondente para o resíduo sólido insolúvel obtido após pré-tratamento (65.28 g):

$$\frac{29.3 \text{ g glucose}}{100 \text{ g mat – prima pré – tratada}} \times 65.28 \text{ g de RSI} = 19.1 \text{ g glucose}$$

A matéria-prima inicial é constituída por 41.6% de glucose. As fracções sólida e líquida do material pré-tratado após a HE são constituídas por 19.1 e 2.97 g de glucose (ver tabela 5.3), respectivamente, o que dá um total de 22.1% de glucose.

Assim, o rendimento global ( $\eta_G$ ) é dado por:

$$\eta_G = \frac{22.1}{41.6} \times 100 = 53\%$$

Para a xilose o procedimento de cálculo é o mesmo. Os rendimentos globais para as restantes condições são calculados da mesma forma e estão representados na tabela A4.1.

**Tabela A4.1** – Resultados da HE com 20 UPF – rendimentos globais em glucose e xilose

<b>Condições</b>	<b><math>\eta_G</math></b>	<b><math>\eta_X</math></b>
175°C 10' 4%	53.1%	67.1%
175°C 25' 1%	65.2%	78.7%
175°C 25' 2%	66.7%	77.4%
175°C 25' 4%	65.7%	75.3%
185°C 10' 1%	73.3%	82.7%
185°C 10' 2%	68.9%	82.2%
185°C 10' 4%	62.7%	79.8%
185°C 25' 1%	79.8%	81.3%
185°C 25' 2%	84.5%	85.9%
185°C 25' 4%	80.6%	66.8%
195°C 10' 1%	73.3%	65.7%
195°C 10' 2%	91.8%	67.5%
195°C 10' 4%	93.2%	61.7%

## A5. Preparação dos matrizes para os ensaios de SFS

A preparação dos matrizes para os ensaios de SFS realizou-se de forma idêntica à descrita anteriormente para os ensaios de HE, sendo que a única diferença reside na adição do microrganismo responsável pela fermentação, *S. cerevisiae*, e de sais de extracto de levedura (0.05g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.05g) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.025g). Os ensaios de SFS realizaram-se com uma concentração de enzimas e de sólidos de 20UPF e 10% (m/V), respectivamente. Assim sendo retirou-se 1mL de solução tampão e adicionou-se a mesma quantidade de microrganismo a todos os matrizes (Tabela A4.1).

Tabela A4.1 – Preparação dos matrizes para os ensaios de SFS

Condições	Quantidade de substrato (g)	Solução de enzima (mL)	Solução tampão (mL)	Inóculo do microrganismo (mL)
185°C, 10', 2%	8.73	5	5.27	1
195°C, 10', 2%	8.47	5	5.53	1

### 1. Cálculo do rendimento de SFS:

Os rendimentos do processo de SFS são calculados pela razão entre o valor de etanol obtido do processo e o valor máximo de etanol que se poderia obter, tendo em conta a glucose potencial obtida do pré-tratamento (60 g/L) e o valor máximo teórico (0.51 g/g). O procedimento de cálculo é representado de seguida.

Valor máximo de etanol = Valor máximo teórico × Glucose potencial após pré-tratamento

$$\text{Valor máximo de etanol} = 0.51 \times 60 = 30.60 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Assim o rendimento, para 185°C-10'-2%, é dado por:

$$\eta = \frac{8.46}{30.60} \times 100 = 27.6\%$$

Os restantes rendimentos são apresentados na Tabela A4.2.

**Tabela A4.2 – Rendimentos obtidos para 24, 48 e 72h do processo de SFS**

<b>Rendimento</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>185°C,10',2%</b>	30.9%	43.6%	45.9%
<b>195°C,10',2%</b>	48.9%	62.4%	69.5%