



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Avaliação do potencial de produção de etanol de 2ª geração a partir dos resíduos das podas do olival

Nuno Cláudio da Rocha Meses Pedro

Tese para obtenção do Grau de Doutor em
Química
Doutoramento

Orientador: Professora Doutora Ana Paula Duarte

Covilhã, Agosto de 2013

Dedicatória

À minha mulher Ana
e aos meus filhos Francisco e João

Agradecimentos

Ao finalizarmos este trabalho não podemos deixar de expressar o mais sincero reconhecimento a todos aqueles que, sendo pessoas ou instituições, contribuíram com a sua ajuda para que o mesmo fosse levado a bom termo.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Doutora Ana Paula Duarte, Professora Catedrática da Universidade da Beira Interior, pelo interesse, disponibilidade e competência na orientação deste trabalho. Agradeço-lhe todas as sugestões e conhecimentos que me transmitiu ao longo de todos estes anos.

À Direcção da Escola Superior Agrária de Castelo Branco e ao seu Conselho Científico pelas facilidades concedidas, determinantes para a concretização deste trabalho.

Ao Instituto Politécnico de Castelo Branco por ter permitido a realização deste trabalho tendo facultado ainda as condições necessárias para a sua prossecução.

À Novozymes agradeço a disponibilização gratuita dos complexos enzimáticos testados.

Ao Professor Doutor Rui Bezerra, do departamento de Bioquímica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, agradeço-lhe os conselhos e todo o apoio que me facultou.

Ao Engenheiro Nuno Gil agradeço-lhe toda a ajuda que me forneceu no primeiro ano do Doutoramento permitindo-me ficar familiarizado com os procedimentos e equipamentos do Laboratório de Química do Papel.

À Doutora Irene Fraga agradeço-lhe para além da amizade, o apoio, a disponibilidade e os conhecimentos que me transmitiu durante a realização da hidrólise enzimática.

Ao Professor Rogério, à Professora Ana Paula Costa, à Professora Emília, à Sónia e ao Roberto por toda a disponibilidade que sempre manifestaram face às minhas solicitações.

A todos os meus amigos pelo incentivo dado para a conclusão deste trabalho e por serem meus amigos.

À minha família gostaria de expressar um agradecimento muito especial pelo carinho e amizade que demonstraram e pelo incentivo em todas as horas.

Aos meus filhos pelo carinho que me manifestaram em todas as horas, mesmo naquelas que não lhes foram dedicadas.

À Ana pelo grande e incondicional apoio e por ter conseguido manter a família unida, mesmo nos momentos em que não estávamos todos juntos.

Resumo

Os resíduos das podas do olival constituem um resíduo agrícola largamente disponível em Portugal. Estima-se que as quantidades de material produzido anualmente nas podas do Olival possam ascender a 290 000 toneladas por ano. Este material, sem qualquer utilização comercial até ao presente, pode assim ser valorizado servindo como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração. Este processo exige a realização de três etapas sequenciais: pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação.

O objectivo do presente trabalho consiste em avaliar o potencial de produção de etanol de segunda geração com base na libertação de açúcares resultante de diferentes pré-tratamentos e da hidrólise enzimática subsequente.

Neste trabalho foram testados quatro pré-tratamentos: 1) com ácido sulfúrico diluído [temperatura: 60 a 180 °C, tempo: 30 a 120 minutos e concentração de H_2SO_4 : 0,50 a 5,00% (w/w)], 2) com hidróxido de sódio [temperatura: 40 a 140 °C, tempo: 20 a 120 minutos e concentração de NaOH: 0,31 a 61,9 % (w/w)], 3) com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogénio [tempo de 45 minutos, temperatura: 40 a 140 °C, concentração de NaOH: 0,31 a 6,19% (w / w) e concentração de H_2O_2 : 0,31 a 6,19% (w/w)] e 4) com amoníaco [temperatura: 50 a 100 °C, tempo: 60 a 480 minutos e concentração de NH_3 : 1,00 a 15,00% (w/w)].

Os ensaios de hidrólise enzimática nos resíduos sólidos dos pré-tratados foram realizados com uma concentração de sólidos de 5% (w/v), em tampão citrato 50mM com pH de 4,8 e com uma concentração de BSA de 60mg/g de biomassa seca. A mistura de reacção foi incubada a 50°C, durante 174h, num agitador orbital com agitação de 150rpm. Para a hidrólise enzimática foram utilizados três complexos enzimáticos comerciais da Novozymes (Dinamarca), NS22086 (complexo de celulasas - 148FPU/ml), NS22118 (b-glucosidase - 426 p-NPGU/ml) e NS22083 (Xilanase - 7498 IU/ml) tendo sido testadas duas cargas enzimáticas 6FPU/g de substrato, 18 p-NPGU/g de substrato, 18 IU/g de substrato e 18FPU/g de substrato, 36 p-NPGU/g de substrato, 36 IU/g de substrato.

A biomassa utilizada apresentou uma composição em hidratos de carbono de 51,25% sendo a glucose o principal constituinte com 33,59%. Os teores de lenhina e extractáveis determinados na biomassa foram respectivamente de 24,96% e 15,84%.

O pré-tratamento realizado com ácido sulfúrico com uma concentração de 4,09% (w/w), durante 102 minutos e com uma temperatura de 156°C apresentou um rendimento de 84% na hidrólise enzimática realizada com 18FPU/g de substrato, 36 p-NPGU/g de substrato e 36 IU/g de substrato. Nestas condições atingiu-se a maior taxa de açúcares disponíveis para fermentação, correspondendo a soma dos açúcares libertados para o hidrolisado durante o pré-tratamento com os açúcares libertados durante a hidrólise enzimática, a 90% dos açúcares existentes na biomassa.

Palavras-chave

Podas de olival, etanol de 2ª geração, pré-tratamento, hidrólise enzimática

Abstract

Waste from pruning of olive grove is a largely agricultural residue available in Portugal. It is estimated that the quantity of material produced annually in the olive pruning may amount to 290 000 tons per year. This material without any commercial use, up to present, can be used as a raw material for the production of second generation ethanol. This process requires the completion of three sequential steps: pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation.

The aim of this study is to evaluate the potential production of second generation ethanol based on the release of sugars resulting from different pretreatments and subsequent enzymatic hydrolysis. In this work, 4 pretreatments were tested: 1) with dilute sulfuric acid [temperature: 60 to 180 °C, time: 30 to 120 minutes and H_2SO_4 concentration: 0,50 to 5,00% (w/w)], 2) with sodium hydroxide [temperature: 40 to 140 °C, time: 20 to 120 minutes and NaOH concentration: 0,31 to 61,9 % (w/w)], 3) with sodium hydroxide and hydrogen peroxide [time: 45 minutes, temperature: 40 to 140 °C, NaOH concentration: 0,31 to 6,19% (w / w) and H_2O_2 concentration: 0,31 to 6,19% (w/w)] and 4) with ammonia [temperature: 50 to 100 °C, time: 1 to 8 hours and NH_3 concentration: 1,00 a 15,00% (w/w)].

Enzymatic hydrolysis experiments on pretreated solid fraction were performed at 5% (w/v) solid concentration in 50 mM citrate buffer with pH 4.8 and a BSA concentration of 60 mg/g dry biomass. The reaction mixture was incubated at 50°C for 168 h in an orbital shaker with agitation at 150 rpm. Three commercial enzyme preparations from Novozymes (Denmark), NS22086 (cellulase complex - 148FPU/ml), NS22118 (b-glucosidase - 426 p-NPGU/ml) and NS22083 (Xylanase - 7498 IU/ml), were used in enzymatic hydrolysis. Two enzyme concentrations were tested: 6FPU enzyme/g of substrate, p-NPGU 18/g of substrate, 18 IU/g substrate and 18FPU/g of substrate, p-NPGU 36/g of substrate, 36 IU/g of substrate.

Total carbohydrate content of the initial biomass was 51.25%, in which glucose was the major constituent with 33.59%. Contents of lignin and extractable found in biomass were 24.96% and 15.84%, respectively.

The pre-treatment carried out with sulfuric acid with a H_2SO_4 concentration of 4.09% (w / w) for 102 minutes at a temperature of 156 °C, performed with 18FPU / g of substrate, 36 p-NPGU / g substrate and 36 IU / g of substrate, has presented a enzymatic hydrolysis yield of 84%. In these conditions, 90% of sugars were available for fermentation, corresponding this value to the sum of the sugars released into the hydrolyzate during the pre-treatment with the sugars released during enzymatic hydrolysis.

Keywords

Pruning of olive groves, 2nd generation ethanol, pretreatment, enzymatic hydrolysis

Índice

Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica	1
1.1 - Contexto energético	2
1.1.1 - Os combustíveis fósseis no sector dos transportes	2
1.1.2 - Biocombustíveis	3
1.1.3 - Biocombustíveis de 1ª e 2ª geração	5
1.1.4 - Biomassa residual do sector olivícola	8
1.2 - Composição da biomassa lenhocelulósica	12
1.2.1 - Celulose	13
1.2.2 - Hemiceluloses	16
1.2.3 - Lenhina	19
1.2.4 - Extractáveis	22
1.3 - Pré-tratamentos	23
1.3.1 - Pré-tratamento ácido	26
1.3.2 - Pré-tratamento alcalino	28
1.3.3 - Pré-tratamento com peróxido de hidrogénio em meio alcalino	30
1.3.4 - Outros pré-tratamentos	31
1.4 - Hidrólise enzimática	32
1.5 - Fermentação	36
1.6 - Conversão de biomassa em etanol: integração de processos	37
1.7 - Processos industriais de produção de etanol celulósico	40
 Capítulo 2 - Metodologia	 43
2.1 - Métodos analíticos	45
2.1.1 - Materiais e reagentes	45
2.1.2 - Preparação da matéria-prima	46
2.1.3 - Extractáveis	46
2.1.4 - Cinzas	46
2.1.5 - Lenhina	47
2.1.6 - Açúcares redutores totais	48
2.1.7 - Açúcares e produtos de degradação	48
2.2 - Pré-tratamentos	50
2.2.1 - Análise química dos hidrolisados resultantes do pré-tratamento	51
2.2.2 - Análise química dos resíduos sólidos resultantes do pré-tratamento	52
2.2.3 - Condições de pré-tratamento	53

2.3 - Hidrólise enzimática	57
2.3.1 - Determinação da actividade das celulasas	57
2.3.2 - Determinação da actividade das β - glucosidases	58
2.3.3 - Determinação da actividade das xilanases	59
2.3.4 - Hidrólise Enzimática	60
2.3.5 - Determinação das interacções entre os complexos enzimáticos	62
Capítulo 3 - Resultados e discussão	65
3.1 - Composição da matéria-prima	66
3.2 - Pré-tratamento com ácido sulfúrico	68
3.2.1 - Açúcares redutores totais no hidrolisado dos pré-tratamentos com H_2SO_4	68
3.2.2 - Açúcares individualizados e produtos de degradação presentes no hidrolisado nos pré-tratamentos com H_2SO_4	72
3.2.3 - Solubilização da glucose nos pré-tratamentos com H_2SO_4	76
3.2.4 - Solubilização da xilose nos pré-tratamentos com H_2SO_4	79
3.2.5 - Solubilização da arabinose nos pré-tratamentos com H_2SO_4	82
3.2.6 - Formação de produtos de degradação nos hidrolisados resultantes de pré-tratamentos com H_2SO_4	84
3.2.7 - Proporção de resíduo sólido nos pré-tratamentos com H_2SO_4	87
3.2.8 - Proporção de lenhina no resíduo sólido	90
3.2.9 - Proporção de glucose no resíduo sólido	93
3.2.10 - Proporção de xilose no resíduo sólido	95
3.2.11 - Proporção de arabinose no resíduo sólido	97
3.2.12 - Considerações finais sobre o pré-tratamento com ácido sulfúrico	100
3.3 - Pré-tratamento com hidróxido de sódio	102
3.3.1 - Lenhina no Hidrolisado alcalino (LH_{AL})	102
3.3.2 - Constituição do resíduo sólido	104
3.3.3 - Considerações finais sobre o pré-tratamento com hidróxido de sódio	113
3.4 - Pré-tratamento com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogénio	114
3.4.1 - Lenhina no Hidrolisado alcalino com adição de peróxido (LH_{ALP})	114
3.4.2 - Constituição do resíduo sólido	117
3.4.3 - Considerações finais sobre o pré-tratamento com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogénio	130
3.5 - Pré-tratamento com amoníaco por imersão	131
3.5.1 - Lenhina no Hidrolisado de NH_3 (LH_{NH3})	131
3.5.2 - Constituição do resíduo sólido	132
3.5.3 - Considerações finais sobre o pré-tratamento com amoníaco	142

3.6 - Hidrólise enzimática dos pré-tratados	143
3.6.1 - Hidrólise enzimática dos pré-tratados com ácido sulfúrico	143
3.6.2 - Hidrólise enzimática dos pré-tratados com hidróxido de sódio	147
3.6.3 - Hidrólise enzimática dos pré-tratados com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogénio	153
3.6.4 - Hidrólise enzimática dos pré-tratados com amoníaco	156
3.6.5 - Determinação das interações entre os complexos enzimáticos	159
3.6.6 - Açúcares libertados na hidrólise enzimática em função do tipo de pré-tratamento	163
 Capítulo 4 - Considerações finais	 165
 Bibliografia	 171

Lista de Figuras

Figura 1.1	Evolução regional do consumo de petróleo entre 1987 e 2012 expresso em milhões de barris diários	2
Figura 1.2	Evolução do consumo sectorial do petróleo entre 1971 e 2010 em Mtep	3
Figura 1.3	Produção mundial de biocombustíveis em 2002 e 2012 expressa em Mtep	5
Figura 1.4	Produção de etanol de 1ª e 2ª geração	6
Figura 1.5	Emissões estimadas de GEE por unidade de energia produzida nos combustíveis fósseis e nos biocombustíveis de 1ª e 2ª geração	7
7Figura 1.6	Distribuição potencial do olival no mundo e listagem dos seis países com maior área de olival em 2011	9
Figura 1.7	Distribuição das áreas de olival, em 2009, por região agrícola	9
Figura 1.8	Mecanização nas operações de colheita, poda e recolha de resíduos no Olival	10
Figura 1.9	Parede celular de um material lenhoso. 1) Modelo convencional da parede celular com lamela média (ML), parede primária (PW), parede secundária externa (s1), parede secundária intermédia (S2) e parede secundária interna (S3). 2) Distribuição relativa dos constituintes da parede celular nas diferentes camadas da parede celular. 3) Secção transversal de traqueídeos de lenho inicial.	12
Figura 1.10	Cadeia de celulose	13
Figura 1.11	Hidrólise ácida da celulose	14
Figura 1.12	Hidrólise alcalina da celulose a temperaturas superiores a 150°C	15
Figura 1.13	Principais açúcares constituintes das hemiceluloses	16
Figura 1.14	Estrutura primária do O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano	17
Figura 1.15	Estrutura primária do glucomanano	17
Figura 1.16	Principais tipos de hemiceluloses encontradas em materiais lenhocelulósicos com diferentes origens florestais	18

Figura 1.17	Precusores primários da lenhina p-cumarílico (MH), coniferílico (MG) e sinapílico (MS) e unidades estruturais da lenhina p-hidroxifenilo (PH), guaiacilo (PG) e siringilo (PS)	19
Figura 1.18	Estrutura das ligações mais representativas na lenhina	20
Figura 1.19	Estrutura proposta para uma lenhina de uma resinosa (a) e de uma folhosa (b)	21
Figura 1.20	Estrutura da Oleuropeína	22
Figura 1.21	Apresentação esquemática dos efeitos do pré-tratamento no material lenho celulósico	23
Figura 1.22	Imagens SEM de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico 1,56% (w/w) aquecido por microondas. Sem pré-tratamento(a), a 130°C (b), a 160° (c) e a 190°C (d)	27
Figura 1.23	Produtos de degradação passíveis de serem gerados em pré-tratamentos ácidos	27
Figura 1.24	Imagens SEM de palha de arroz antes e depois de pré-tratamento com 2,0% de NaOH	28
Figura 1.25	Representação esquemática da quebra das ligações ésteres entre a lenhina e os hidratos de carbono, por reacção com amoníaco (a) e por hidrólise alcalina (b)	28
Figura 1.26	Representação esquemática do ataque enzimática à celulose	33
Figura 1.27	Representação esquemática da actuação dos complexos enzimáticos sobre O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano	34
Figura 1.28	Representação esquemática da acção inibitória sobre as enzimas de alguns compostos	34
Figura 1.29	Hidrólise enzimática sem BSA (A) e com BSA (B)	36
Figura 1.30	Integração das várias etapas no processo de produção de etanol celulósico	37
Figura 1.31	Unidades de produção de etanol celulósico (actuais e previstas até 2016)	40
Figura 2.1	Banho termostatzado de PEG 400 (a), reactores de aço inox de 200 mL (b) e determinação do teor de matéria seca do material (c)	50
Figura 2.3	Curva de calibração para uma solução de DNS utilizando a glucose como padrão	52

Figura 2.4	Relação entre a libertação de glucose e a concentração de enzima NS22086	58
Figura 2.5	Recta de calibração do p-nitrofenol	59
Figura 2.6	Recta de calibração da xilose	60
Figura 3.1	Relação entre os valores observados e os valores estimados na estimativa das quantidades médias de ART libertados para o hidrolisado	70
Figura 3.2	Representação individual das variáveis (A, B, C) com as restantes condições constantes: (a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min	71
Figura 3.3	Representação 3D do efeito conjugado da temperatura e da concentração de ácido sulfúrico nas quantidades libertadas de ART para o hidrolisado (Tempo = 75 minutos)	71
Figura 3.4	Concentrações de açúcares, ácido acético e produtos de degradação encontradas nos hidrolisados resultantes de pré-tratamento ácido, em % da amostra	73
Figura 3.5	Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico (c) nas taxas de solubilização da glucose com as restantes condições constantes: (a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min	77
Figura 3.6	Efeito conjugado da temperatura e da concentração de ácido sulfúrico na solubilização da glucose (Tempo constante = 75 minutos)	78
Figura 3.7	Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico (c) nas taxas de solubilização da xilose com as restantes condições constantes: (a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min	80
Figura 3.8	Efeito conjugado da temperatura e da concentração de ácido sulfúrico na solubilização da xilose (Tempo constante = 75 minutos)	81
Figura 3.9	Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico (c) nas taxas de solubilização da arabinose com as restantes condições constantes: (a) B = 75min e C = 2,75%; b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min	83

Figura 3.10	Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico (c) nas taxas de subprodutos e produtos de degradação encontradas no hidrolisado, em % da amostra, com as restantes condições constantes: (a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min	85
Figura 3.11	Efeito conjugado da temperatura e do tempo nas taxas de subprodutos e produtos de degradação encontradas nos hidrolisados ($H_2SO_4 = 2,75\%$)	86
Figura 3.12	Proporção do resíduo sólido em percentagem do peso da amostra	87
Figura 3.13	Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico na proporção do resíduo sólido, em % da amostra, com as restantes condições constantes: (a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min	89
Figura 3.14	Constituição do resíduo sólido nas diferentes condições de pré-tratamento	90
Figura 3.15	Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico no teor de lenhina presente no resíduo sólido, em % do resíduo sólido, com as restantes condições constantes: (a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min	92
Figura 3.16	Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico no teor de glucose presente no resíduo sólido, em % do resíduo sólido, com as restantes condições constantes: (a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min	94
Figura 3.17	Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico no teor de xilose presente no resíduo sólido, em % do resíduo sólido, com as restantes condições constantes: (a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min	96
Figura 3.18	Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico no teor de arabinose presente no resíduo sólido, em % do resíduo sólido, com as restantes condições constantes: (a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min	98

Figura 3.19	Efeito da conjugação dos factores no teor de arabinose no resíduo sólido (a) Efeito conjugado da temperatura e da concentração de ácido, tempo = 75min (b) Efeito conjugado do tempo e da temperatura, [H ₂ SO ₄] = 2,75% (c) Efeito conjugado da concentração de ácido e do tempo, temperatura = 120°C	99
Figura 3.20	Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de hidróxido de sódio nas quantidades de LHAL, com as restantes condições constantes: (a) B = 70min e C = 3,25%; (b) A = 70°C e C = 3,25%; (c) A = 70°C e B = 70min	103
Figura 3.21	Peso do resíduo sólido resultante do pré-tratamento alcalino com NaOH (expresso em percentagem do peso da amostra seca) A - Temperatura (°C), B - Tempo (min.), C - Concentração de NaOH (% w/w)	106
Figura 3.22	Lenhina presente nos resíduos sólidos resultantes dos pré-tratamentos alcalinos com NaOH, expressa em percentagem do peso seco da amostra A - Temperatura (°C), B - Tempo (min.), C - Concentração de NaOH (% w/w)	107
Figura 3.23	Taxas de retenção de açúcares (TRA) nos resíduos sólidos resultantes do pré-tratamento alcalino com NaOH, expressas em percentagem do peso seco da amostra A - Temperatura (°C), B - Tempo (min.), C - Concentração de NaOH (% w/w)	108
Figura 3.24	Teores de glucose, xilose e arabinose presente nos resíduos sólidos do pré-tratamento alcalino com NaOH, expressos em % da amostra A - Temperatura (°C), B - Tempo (min.), C - Concentração de NaOH (% w/w)	110
Figura 3.25	Comparação das TRA entre os pré-tratamentos modelados e os pré-tratamentos extra	112
Figura 3.26	Influência da temperatura, concentração de NaOH e concentração de H ₂ O ₂ na estimativa da LH _{ALP}	115
Figura 3.27	Peso do resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NaOH e H ₂ O ₂ (expresso em percentagem do peso da amostra seca) A - Temperatura, B - Concentração de NaOH (% w/w), C - Concentração de H ₂ O ₂ (% w/w)	118

Figura 3.28	Teores de lenhina lenhina, em % do peso da amostra, determinada nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos com NaOH e H ₂ O ₂ A - Temperatura, B - Concentração de NaOH (% w/w), C - Concentração de H ₂ O ₂ (% w/w)	120
Figura 3.29	Efeito da temperatura (a), da concentração de NaOH (b) e da concentração de H ₂ O ₂ (c) nos teores de lenhina presente no RS, com as restantes condições constantes: (a) B = 3,25 % e C = 3,25%; (b) A = 90°C e C = 3,25%; (c) A = 90°C e B = 3,25%	122
Figura 3.30	Influência da adição de peróxido de hidrogénio na variação dos teores de lenhina no resíduo sólido	123
Figura 3.31	TRA determinadas nos resíduos sólidos nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos com NaOH e H ₂ O ₂ A - Temperatura, B - Concentração de NaOH (% w/w), C - Concentração de H ₂ O ₂ (% w/w)	124
Figura 3.32	Evolução das taxas de retenção de glucose, xilose e arabinose em função da variação da concentração de H ₂ O ₂ aplicada A - Temperatura, B - Concentração de NaOH (% w/w), C - Concentração de H ₂ O ₂ (% w/w)	126
Figura 3.33	Efeito da temperatura (a), da concentração de NaOH (b) e da concentração de H ₂ O ₂ (c) e (d) nos teores de arabinose presente no resíduo sólido, com as restantes condições constantes: (a) B = 3,25 % e C = 3,25%; (b) A = 90°C e C = 3,25%; (c) A = 90°C e B = 3,25%;	128
Figura 3.34	Efeito da conjugação entre a temperatura e a concentração de H ₂ O ₂ nos teores de arabinose retida no resíduo sólido para concentrações de NaOH iguais a 1,50% e 5,00%	129
Figura 3.35	Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de NH ₃ (c) e (d) no peso seco resíduo sólido, com as restantes condições constantes: (a) B = 4,5h e C = 8,00%; (b) A = 75°C e C = 8,00%; (c) A = 75°C e B = 4,5h; (d) A = 93,5°C e B = 4,5h	134
Figura 3.36	Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de NH ₃ (c) no teor de lenhina presente no resíduo sólido, com as restantes condições constantes: (a) B = 4,5h e C = 8,00%; (b) A = 75°C e C = 8,00%; (c) A = 75°C e B = 4,5h	136

Figura 3.37	Teores de lenhina e açúcares presentes no resíduo sólido dos pré-tratamentos com NH_3 , expressos em % da amostra A - Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), B - Tempo (min.), C - Concentração de NH_3 (% w/w)	137
Figura 3.38	Teores de glucose, xilose e arabinose presente nos resíduos sólidos do pré-tratamento alcalino com NH_3 , expressos em % da amostra A - Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), B - Tempo (min.), C - Concentração de NH_3 (% w/w)	140
Figura 3.39	Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com H_2SO_4 , com aplicação de uma carga enzimática de 6PFU, 12 p-NPGU e 12 IU por grama de substrato	144
Figura 3.40	Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com H_2SO_4 , com aplicação de uma carga enzimática de 18PFU, 36 p-NPGU e 36 IU por grama de substrato	145
Figura 3.41	Soma dos açúcares libertados no hidrolisado dos pré-tratamentos com ácido sulfúrico e na hidrólise enzimática com 18FPU, 36 p-NPGU e 36 IU por grama de substrato, expressos em percentagem dos açúcares presentes na amostra	146
Figura 3.42	Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com NaOH (modelados), com a aplicação de uma carga enzimática de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU por grama substrato A - Temperatura, B - Tempo e C - Concentração de NaOH (% w/w)	149
Figura 3.43	Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com NaOH (modelados), com a aplicação de uma carga enzimática de 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato A - Temperatura, B - Tempo e C - Concentração de NaOH (% w/w)	150
Figura 3.44	Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com NaOH (extra), com a aplicação de uma carga enzimática de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU por grama substrato A - Temperatura, B - Tempo e C - Concentração de NaOH (% w/w)	151
Figura 3.45	Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com NaOH (extra), com a aplicação de uma carga enzimática de 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato A - Temperatura, B - Tempo e C - Concentração de NaOH (% w/w)	152

Figura 3.46	Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com NaOH e H ₂ O ₂ , com a aplicação de uma carga enzimática de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU por grama substrato A - Temperatura, B - Concentração de NaOH (% w/w) e C - Concentração de H ₂ O ₂ (% w/w)	154
Figura 3.47	Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com NaOH e H ₂ O ₂ , com a aplicação de uma carga enzimática de 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato A - Temperatura, B - Concentração de NaOH (% w/w) e C - Concentração de H ₂ O ₂ (% w/w)	155
Figura 3.48	Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com NH ₃ , com a aplicação de uma carga enzimática de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU por grama substrato.	157
Figura 3.49	Evolução da TLA durante a HE nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos com NH ₃ aplicando uma concentração enzimática de 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato	158
Figura 3.50	Influência da concentração da celulase e do teor de sólidos na libertação de açúcares redutores, às 42h (a) e às 139h (b) com as restantes condições constantes: Beta-glucosidase = 165 p-NPGU; Xilanase = 82,5 IU	161
Figura 3.51	Quantidade de açúcares libertados nos 3 melhores resultados na HE, de cada pré-tratamento, após 174h de HE, em função da quantidade de açúcares existentes no RS, tendo em conta os açúcares existentes em 100g de biomassa	163

Lista de Diagramas

Diagrama 2.1	Metodologia utilizada na análise dos pré-tratamentos	44
--------------	--	----

Lista de Tabelas

Tabela 1.1	Teores de incorporação de biocombustíveis, em teor energético em Portugal para o sector dos transportes de acordo com o Decreto - Lei n.º 117/2010 e quantidades de gasolina e gasóleo que devem ser substituídas por biocombustíveis considerando o consumo verificado em 2011	4
Tabela 1.2	Balanço energético e emissões equivalentes de CO ₂ por quilómetro de alguns combustíveis	7
Tabela 1.3	Disponibilidades de biomassa passíveis de serem utilizadas na produção de biocombustíveis de 2ª geração tendo em conta o seu custo de aquisição	8
Tabela 1.4	Evolução entre 2007 e 2011 da produção de azeite, produção de azeitona e da área de ocupação do olival	11
Tabela 1.5	Percentagens de azeite e resíduos obtidos em função da tecnologia de extracção	11
Tabela 1.6	Métodos de pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos	25
Tabela 1.7	Exemplos de pré-tratamentos com ácido diluído	26
Tabela 1.8	Exemplos de pré-tratamentos alcalinos realizados com NaOH e NH ₃	29
Tabela 1.9	Exemplos de pré-tratamentos alcalinos com peróxido de hidrogénio	30
Tabela 1.10	Potencialidades e as fraquezas de alguns microorganismos utilizados no processo fermentativos	37
Tabela 1.11	Empresas com unidades de produção comercial de etanol celulósico	41
Tabela 2.1	Reagentes utilizados durante os ensaios experimentais	45
Tabela 2.2	Concentrações utilizadas para calibração de açúcares e produtos de degradação	49
Tabela 2.3	Condições de ensaio testadas no pré-tratamento com ácido sulfúrico	53
Tabela 2.4	Condições de ensaio testadas no pré-tratamento com hidróxido de sódio	54
Tabela 2.5	Condições de ensaio testadas no pré-tratamento com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogénio	55

Tabela 2.6	Condições de ensaio testadas no pré-tratamento com amoníaco	56
Tabela 2.7	Combinações testadas para determinação das interações entre os complexos enzimáticos	62
Tabela 3.1	Composição química da matéria - prima	66
Tabela 3.2	Composição em glucose, xilose e lenhina em materiais lenhocelulósicos (% em base seca)	67
Tabela 3.3	Quantidades médias de ART libertados para o hidrolisado em função das diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico	68
Tabela 3.4	Análise de variância, com modelo de resposta cúbico reduzido, para estimativa das quantidades médias de ART libertados para o hidrolisado, no pré-tratamento ácido	69
Tabela 3.5	Composição química dos hidrolisados resultantes do pré-tratamento com ácido sulfúrico (em % de amostra)	73
Tabela 3.6	Análise ANOVA para estimativa das taxas de solubilização da glucose no pré-tratamento com H_2SO_4	76
Tabela 3.7	Análise ANOVA para estimativa das taxas de solubilização da xilose no pré-tratamento com H_2SO_4	79
Tabela 3.8	Análise ANOVA para estimativa das taxas de solubilização da arabinose no pré-tratamento com H_2SO_4	82
Tabela 3.9	Análise ANOVA para estimativa das taxas de subprodutos e produtos de degradação no pré-tratamento com H_2SO_4	84
Tabela 3.10	Análise ANOVA para estimativa da proporção do peso seco do resíduo sólido resultante de pré-tratamento com H_2SO_4	88
Tabela 3.11	Análise ANOVA para estimativa dos teores de lenhina no resíduo sólido resultante de pré-tratamento com H_2SO_4	91
Tabela 3.12	Análise ANOVA para estimativa da proporção de glucose no resíduo sólido resultante de pré-tratamento com H_2SO_4	93
Tabela 3.13	Análise ANOVA para estimativa da proporção de xilose no resíduo sólido resultante de pré-tratamento com H_2SO_4	95
Tabela 3.14	Análise ANOVA para estimativa da proporção de arabinose no resíduo sólido resultante de pré-tratamento com H_2SO_4	97
Tabela 3.15	Análise ANOVA para estimativa das taxas de LH_{AL}	102

Tabela 3.16	Diferença entre as taxas de LH_{AL} observada e estimada	104
Tabela 3.17	Constituição do resíduo sólido (RS) resultante do pré-tratamento com NaOH	105
Tabela 3.18	Teores de glucose, xilose e arabinose presentes no resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NaOH	109
Tabela 3.19	Análise ANOVA para estimativa de LH_{ALP}	114
Tabela 3.20	Diferença entre as taxas de LH_{ALP} observada e estimada, expressas em percentagem da amostra	116
Tabela 3.21	Constituição do resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NaOH e H_2O_2	117
Tabela 3.22	Análise ANOVA para estimativa do peso seco do resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NaOH e H_2O_2	119
Tabela 3.23	Análise ANOVA para os teores de lenhina presente nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos com NaOH e H_2O_2	121
Tabela 3.24	Teores de glucose, xilose e arabinose presentes nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos com NaOH e H_2O_2	125
Tabela 3.25	Análise ANOVA para estimativa dos teores de arabinose presente nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos com NaOH e H_2O_2	127
Tabela 3.26	Taxas de LH_{NH_3} observadas, expressas em percentagem da amostra	131
Tabela 3.27	Constituição do resíduo sólido (RS) resultante do pré-tratamento com NH_3	132
Tabela 3.28	Análise ANOVA para estimativa do peso seco do resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NH_3	133
Tabela 3.29	Análise ANOVA para estimativa da lenhina presente no resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NH_3	135
Tabela 3.30	Teores de glucose, xilose e arabinose presentes no resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NH_3	139
Tabela 3.31	TLA na HE expressas em função da quantidade de açúcares presente nos resíduos sólidos dos pré-tratados com H_2SO_4	143
Tabela 3.32	TLA na HE expressas em função da quantidade de açúcares presente nos resíduos sólidos dos pré-tratados com NaOH	147

Tabela 3.33	TLA na HE expressas em função da quantidade de açúcares presente nos resíduos sólidos dos pré-tratados alcalinos com adição de H ₂ O ₂	153
Tabela 3.34	TLA na HE expressas em função da quantidade de açúcares presente nos resíduos sólidos dos pré-tratados com NH ₃	156
Tabela 3.35	Libertação de açúcares redutores e rendimento da hidrólise, às 42 e 139 horas, em função dos valores mínimo, médio e máximo de cada um dos factores utilizados	159
Tabela 3.36	Estimativa da libertação de açúcares, para as 42 e 139h, em função dos teores de celulase (A), beta-glucosidase (B), xilanase (C) e sólidos (D) utilizados	160

Lista de Acrónimos

AAE	Agencia Andaluza de la Energia
AIL	Acid insoluble lignin
ANOVA	Analysis of variance
APPB	Associação Portuguesa de Produtores de Biocombustíveis
ART	Açúcares redutores totais
ASL	Acid soluble lignin
BP	British Petroleum
BSA	Bovine serum albumin
CNN	Cable News Network
DGEG	Direcção Geral de Energia e Geologia
DNS	Ácido 3,5 dinitrossalicílico
EBTP	European Biofuels Technology Platform
EU	European Union
FAO	Food and Agriculture Organization
FPU	Filter paper unit
GEE	Gases com efeito de estufa
HE	Hidrólise enzimática
HMF	Hidroximetilfurfural
IEA	International Energy Agency
INE	Instituto Nacional de Estatística
IU	International units
LHAL	Lenhina no Hidrolisado alcalino
LHALP	Lenhina no Hidrolisado alcalino com adição de peróxido
LH _{NH3}	Lenhina no Hidrolisado de NH ₃
LK	Lenhina de Klasson
Lp	Lenhina precipitada
Ls	Lenhina dissolvida
Mtep	Milhões de toneladas equivalentes de petróleo
NPGU	p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside unit
NREL	National Renewable Energy Laboratory
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PFC	Compostos perfluorados
R.A.	Taxa de retenção de arabinose no resíduo sólido
R.G.	Teor de retenção de glucose no resíduo sólido
R.X.	Taxa de retenção de xilose no resíduo sólido
RS	Resíduo sólido do pré-tratamento
TLA	Taxas de libertação de açúcares durante a hidrólise enzimática
TRA	Taxa de retenção de açúcares
TRL	Taxa de remoção de lenhina
w/w	peso/peso

Introdução

As fontes de energia renováveis caracterizam-se, em termos gerais, pela sua disponibilidade descentralizada, por apresentarem uma capacidade de se auto-regenerarem em curtos períodos de tempo e pelos reduzidos impactes ambientais decorrentes da sua utilização. A procura pelos recursos energéticos endógenos poderá dar um importante contributo para a redução do consumo de energia fóssil, com reflexos directos sobre os preocupantes impactes ambientais a si associados, permitindo assim, a melhoria da qualidade do ar, da saúde das populações, bem como, a redução/ controlo da importante e crescente poluição industrial e urbana, com respectivas implicações para o aquecimento global. A promoção das energias renováveis permite, para além da redução da dependência energética também a diversificação geográfica da energia primária, ou seja, a possibilidade desta ser produzida numa geografia mais alargada (redução da dependência estratégica). Neste último ponto é usual ouvir falar de produção de energia descentralizada, quer isto dizer que a sua produção é realizada de acordo com a distribuição do recurso, gerando por isso, um desenvolvimento alargado a todo o território, e não apenas às regiões mais industrializadas. Este facto pode assim, tornar esta energia determinante na promoção da economia e na criação de emprego em regiões rurais.

Em 2011 o sector dos transportes representava em Portugal 35,8 % do consumo final de energia (DGEG, 2013). Esta importante percentagem é partilhada pela maioria das sociedades desenvolvidas criando uma dependência energética com consequências ambientais difíceis de contornar. Actualmente, os EUA e o Brasil são os maiores produtores de bioetanol utilizando respectivamente para a sua produção Milho e Cana-de-açúcar (OECD-FAO, 2011). Sem surpresas, a crescente procura energética e em particular de biocombustíveis exigirá no futuro um acréscimo exponencial nas quantidades de matéria primas requeridas provocando um grande desequilíbrio no mercado alimentar, seja por substituição do destino do produto (cereais), seja pela conversão de terras de criação de gado em plantações de Cana-de-Açúcar. Eticamente não é aceitável a utilização de alimentos para a produção de combustíveis para os transportes, em detrimento da alimentação humana e animal. Com vista a corrigir esta situação, a União Europeia a partir de 2006 faz a distinção entre bioetanol de primeira geração, como aquele onde a matéria-prima provém do sector alimentar, e o bioetanol de segunda geração, aquele que se obtém utilizando matérias-primas que não provêm desse sector (UE, 2006). Todavia, os processos de obtenção de bioetanol de segunda geração são mais complexos envolvendo tecnologias e processos em desenvolvimento sendo, no presente, mais onerosa a sua produção. No entanto, os avanços que se esperam obter em termos laboratoriais sugerem que num futuro próximo a produção de biocombustíveis de segunda geração possa ser competitiva.

A produção de etanol por métodos bioquímicos baseia-se na aplicação de um conjunto de processos de extracção, separação e de conversão biológica dos componentes elementares da biomassa como meio de produzir biocombustíveis, bioprodutos e bioenergia. Os processos

utilizados na plataforma bioquímica têm o objectivo de extrair os açúcares simples existentes nos componentes principais dos materiais lenhocelulósicos (celulose, hemiceluloses e lenhina) através da quebra das estruturas polimerizadas da celulose e da hemicelulose seguida do posterior processo fermentativo, no qual através da acção de alguns microorganismos o açúcar é convertido em etanol. Como os açúcares nos materiais lenhocelulósicos não se encontram acessíveis ao tratamento enzimático, é necessária a realização prévia de um pré-tratamento, podendo este ser efectuado por métodos químicos, térmicos ou biológicos.

Após o pré-tratamento, na etapa de hidrólise enzimática a quebra das estruturas polimerizadas da celulose e hemicelulose passa a ser realizada por intermédio de carbohidrolases, convertendo-se estas moléculas em açúcares simples passíveis de serem digeridos pelos organismos fermentativos. Na etapa de fermentação são por norma utilizadas leveduras, geneticamente modificadas, de forma a aumentar a quantidade de hidratos de carbono que são convertidos em etanol.

A produção de etanol a partir da utilização dos resíduos das podas do olival permitirá valorizar um resíduo agrícola, comum nos países da orla da bacia do mediterrâneo, sem qualquer utilização comercial, numa matéria-prima passível de ser utilizada na produção de etanol de 2ª geração. A viabilidade prática dos projectos de produção de etanol a partir de material lenhocelulósico pode ainda ser melhorada se, para além do etanol, existir o aproveitamento dos compostos intermédios que são gerados na sua produção aplicando um conceito de biorrefinaria.

O objectivo deste trabalho consiste em analisar o potencial de produção de etanol de 2ª geração a partir dos resíduos das podas do olival. Esse potencial será avaliado com base na libertação de açúcares disponíveis para fermentação resultantes de diferentes pré-tratamentos e da hidrólise enzimática subsequente.

Os pré-tratamentos serão realizados com ácido sulfúrico, com hidróxido de sódio, com hidróxido de sódio com adição de peróxido de hidrogénio e com amoníaco sendo as condições de ensaio, em cada um deles, resultantes de modelação estatística. Posteriormente na etapa de hidrólise enzimática testar-se-ão duas cargas de enzimas, de modo a perceber a influência da quantidade de enzimas utilizada na libertação de açúcares da biomassa para o processo fermentativo.

O trabalho apresentado encontra-se estruturado em 4 capítulos.

No primeiro capítulo realizamos a revisão bibliográfica começando por um enquadramento do contexto energético no sector dos transportes no subcapítulo 1.1, aproveitando para diferenciar os biocombustíveis de 1ª dos de 2ª geração. Neste subcapítulo também realizamos o levantamento das disponibilidades de biomassa em Portugal caracterizando-se com maior detalhe a biomassa resultante do sector olivícola.

A composição do material lenhocelulósico é realizada no subcapítulo 1.2 com a caracterização dos seus constituintes: celulose, hemiceluloses, lenhina e extractáveis. Posteriormente, realizamos no subcapítulo 1.3 uma caracterização dos pré-tratamentos que serão utilizados no presente trabalho, não deixando contudo de descrever sumariamente

outros pré-tratamentos existentes. O processo de hidrólise enzimática com a descrição da actuação dos diferentes complexos enzimáticos, bem como dos factores que podem condicionar negativamente ou positivamente esta etapa, é apresentada no subcapítulo 1.4. No subcapítulo 1.5 faz-se uma breve descrição do processo fermentativo sendo depois apresentado no subcapítulo 1.6 as diferentes possibilidades de integração de processos na produção de etanol de 2ª geração. Finalmente no subcapítulo 1.7 são apresentadas as unidades industriais de produção de etanol de 2ª geração mostrando a sua localização e capacidade de produção.

No segundo capítulo descrevemos a metodologia utilizada para a realização dos ensaios realizados.

No capítulo dos resultados (capítulo 3) começamos por apresentar, no subcapítulo 3.1, a composição química do material lenhocelulósico utilizado no presente trabalho. Nos subcapítulos 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5 apresentamos os resultados respectivamente dos pré-tratamentos com ácido sulfúrico, com hidróxido de sódio, com hidróxido de sódio com adição de peróxido de hidrogénio e com amoníaco. No subcapítulo 3.6 apresentamos os resultados da hidrólise enzimática dos resíduos sólidos resultantes dos ensaios de maior severidade dos pré-tratamentos efectuados.

Finalmente, no capítulo 4 enunciaremos as principais conclusões resultantes do presente estudo.

Capítulo 1 - Revisão Bibliográfica

1.1 - Contexto energético

1.1.1 - Os combustíveis fósseis no sector dos transportes

Impulsionada pelo aumento da industrialização e da população, a procura global por energia e matérias-primas está em constante crescimento. Uma vez que as principais fontes mundiais de energia e produtos químicos têm origem nos combustíveis fósseis, este crescimento levanta importantes questões a nível ambiental, económico e social. O petróleo é explorado num ritmo muito mais rápido do que a sua regeneração natural no planeta, através do ciclo do carbono, estando ainda a sua localização confinada a um número limitado de países. Estes, nem sempre com estabilidade política conduzem a uma forte oscilação nos preços face às dúvidas de abastecimento e produção. O encarecimento do petróleo, de \$31.34 em 2004 para \$102.52 em 2013 (World Bank, 2013), não se deve à diminuição da sua produção, mas antes ao aumento do consumo, especialmente na região ásia-pacífico, aliado ao aumento dos custos na sua exploração. Na Figura 1.1 podemos observar a evolução regional do consumo de petróleo, entre 1987 e 2012, expressa em milhões de barris diários.

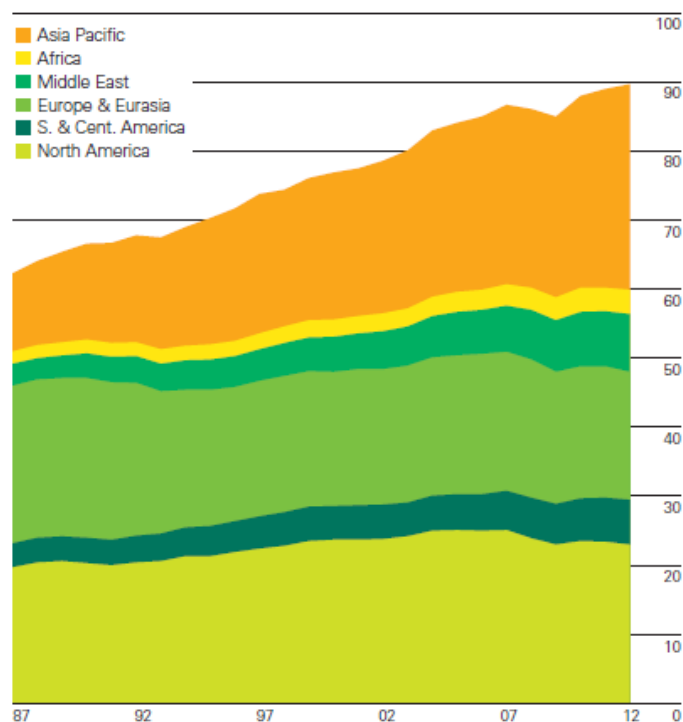


Figura 1.1 - Evolução regional do consumo de petróleo entre 1987 e 2012 expresso em milhões de barris diários (BP, 2013)

O aumento da produção de petróleo nos últimos anos tem sido incrementado através da exploração de depósitos oceânicos localizados a grandes profundidades (offshore deepwater), com custos elevados, e por explorações designadas de não convencionais (onshore unconventional) de que são exemplo o gás de xisto e as areias betuminosas, com fortes implicações a nível ambiental.

Desta produção mundial de petróleo, o sector dos transportes foi responsável, em 2010, pelo consumo de 2 196 milhões de toneladas equivalentes de petróleo (Mtep) quando em 1973 este valor se situava nos 1 021 Mtep. Esta evolução equivale a um aumento de 115%, entre 1973 e 2010. A figura 1.2 apresenta a evolução do consumo sectorial do petróleo entre 1973 e 2010.

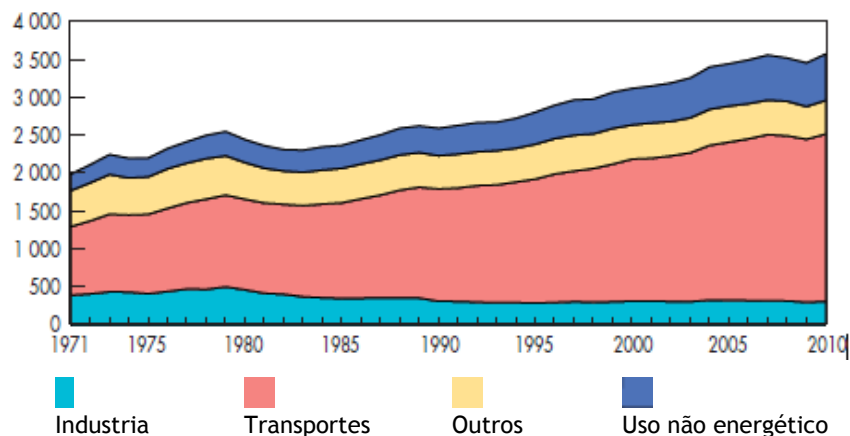


Figura 1.2 - Evolução do consumo sectorial do petróleo entre 1971 e 2010 em Mtep (IEA, 2012)

O aumento do consumo de petróleo conduz a um aumento das emissões dos gases com efeito de estufa (GEE), particularmente visível na contabilização das emissões de CO₂. Entre 1973 e 2010 as emissões de CO₂ aumentaram no sector dos transportes de 7 912 para 10 948 Mton, correspondendo a um aumento de 38,4% (IEA, 2012). As emissões de GEE, provocadas pela utilização de combustíveis fósseis desde a revolução industrial, são consideradas por inúmeros especialistas como causadoras de alterações climáticas.

O protocolo de Quioto assinado em 1998, do qual Portugal foi país signatário, teve como objectivo limitar a emissão de GEE (CO₂, CH₄, N₂O e PFCs) nomeadamente através da tributação de veículos com base nas emissões de CO₂ (OCDE, 2011).

1.1.2 - Biocombustíveis

A introdução de biocombustíveis no sector dos transportes no espaço europeu foi regulamentada através Directiva nº 2003/30/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 8 de Maio. Esta directiva teve como objectivos principais dar cumprimento ao estabelecido no protocolo de Quioto (Directiva 2003/30/CE ponto 6), reduzir a importação de combustíveis fósseis, dos quais a comunidade europeia se encontra dependente (Directiva 2003/30/CE ponto 7) e paralelamente criar novas oportunidades para um desenvolvimento rural sustentável alicerçado numa agricultura multifuncional (Directiva 2003/30/CE ponto 15).

Em Portugal a utilização de biocombustíveis nos transportes foi regulamentada através do Decreto-Lei nº 62/2006, de 21 de Março, que transpõe para o direito nacional a Directiva nº 2003/30/CE, no qual são definidas as quotas mínimas de incorporação de biocombustíveis. Complementarmente, o Decreto-Lei nº 66/2006, de 22 de Março, alterou o Código dos Impostos Especiais de Consumo (CIEC), prevendo nomeadamente que os biocombustíveis

beneficiassem de isenção, total ou parcial, de imposto sobre produtos petrolíferos e energéticos (ISP), e estipulou condições de concessão do benefício. O Decreto - Lei n.º 117/2010, de 25 de Outubro, que transpõe para a ordem jurídica interna os artigos 17.º a 19.º e os anexos III e V da Directiva n.º 2009/28/CE, do Conselho e do Parlamento Europeu, de 23 de Abril, e o n.º 6 do artigo 1.º e o anexo IV da Directiva n.º 2009/30/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Abril, estabelece os critérios de sustentabilidade para a produção e utilização de biocombustíveis definindo os limites de incorporação obrigatória de biocombustíveis de 2011 a 2020. A tabela 1.1 apresenta as taxas de incorporação de biocombustíveis que deverão ser cumpridas em Portugal de 2011 a 2020 de acordo com o Decreto - Lei n.º 117/2010, bem como as quantidades, em toneladas, de gasolina e gasóleo, que deverão ser substituídas, considerando o consumo verificado em 2011 (DGEG, 2013) e aplicando o teor de incorporação de igual modo nos dois combustíveis.

Tabela 1.1 - Teores de incorporação de biocombustíveis, em teor energético em Portugal para o sector dos transportes de acordo com o Decreto - Lei n.º 117/2010 e quantidades de gasolina e gasóleo que devem ser substituídas por biocombustíveis considerando o consumo verificado em 2011 (DGEG, 2013)

Ano	Teores de incorporação	Substituição gasolina 2011 (ton.)	Substituição gasóleo 2011 (ton.)
2011 e 2012	5,0%	62 459	235 775
2013 e 2014	5,5%	68 705	259 353
2015 e 2016	7,5%	93 689	353 663
2017 e 2018	9,0%	112 426	424 396
2019 e 2020	10,0%	124 918	459 552

Em termos mundiais a produção de biocombustíveis encontra-se concentrada no continente americano sendo dominada pela produção de etanol. No espaço europeu verifica-se uma situação inversa, suplantando a produção de biodiesel largamente a produção de etanol. A figura 1.3 apresenta a produção mundial de etanol e biodiesel, em termos regionais, expressa em milhões de toneladas equivalentes de petróleo (Mtep)

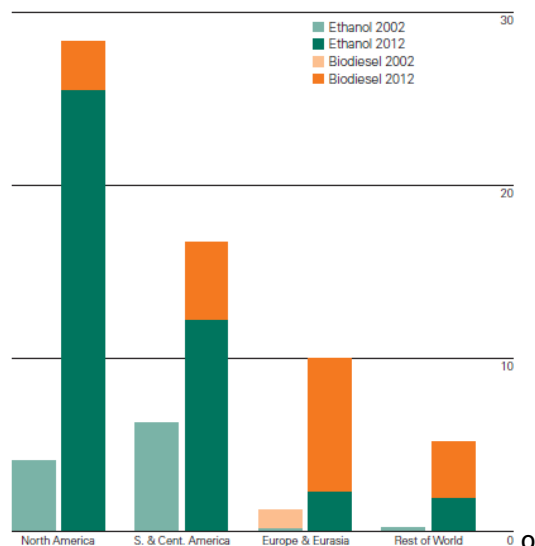


Figura 1.3 - Produção mundial de biocombustíveis em 2002 e 2012 expressa em Mtep (BP, 2013)

Em Portugal não existe até ao momento produção de etanol, importando o país gasolina com incorporação de etanol de outros estados membros, de modo a perfazer a quota de incorporação definida institucionalmente. No entanto, Portugal produziu em 2011 cerca de 351 000 toneladas de biodiesel tendo incorporado nos transportes nacionais toda a sua produção. Esta quantidade coloca Portugal, em 2011, com uma taxa de incorporação, em termos energéticos, de 5,0%. A capacidade instalada em Portugal, em 2011, no conjunto das seis unidades industriais produtoras de biodiesel ascendia a 575 000 toneladas estando ainda proposta uma terceira unidade industrial com uma capacidade de 50 000 toneladas (APPB, 2013; Mendes, 2011).

1.1.3 - Biocombustíveis de 1ª e 2ª geração

Os biocombustíveis utilizados em Portugal, tal como no resto do Mundo, são na sua maioria biocombustíveis considerados de 1ª geração, ou seja, biocombustíveis produzidos a partir de culturas cerealíferas, como o trigo na Europa ou o milho nos EUA, de culturas oleaginosas, como a colza, a soja ou o girassol ou de culturas açucareiras como a cana-de-açúcar no Brasil ou a beterraba sacarina na Europa. A sua utilização pretendeu aumentar a segurança de fornecimento energético, promover o desenvolvimento das empresas agrícolas, reduzir a importação de combustíveis fósseis e mitigar as emissões de GEE (Sims *et al.*, 2008). No entanto, a utilização comercial destes biocombustíveis desencadeou uma atenção muito grande dos meios de comunicação, devida ao intenso debate sobre a subida de preços de alguns alimentos com base na competição entre alimentos e biocombustíveis (CNN, 2008) sendo posteriormente equacionados também os impactes ambientais da sua utilização, a disponibilidade de terras e a sustentabilidade da sua produção. Por forma a garantir a sustentabilidade dos recursos desenvolveu-se nos últimos anos uma nova vaga de biocombustíveis denominados como de 2ª geração, obtidos a partir de biomassa

lenhocelulósica. A produção de biocombustíveis de 2ª geração pode gerar como produtos o **etanol celulósico** obtido por processos bioquímicos, através da conversão em etanol da celulose e hemiceluloses presentes na biomassa (Sims *et al.*, 2008), o bio-óleo **BtL** (Biomass-to-liquid) utilizando um processo de pirólise (Bridgwater, 2001), o gás de síntese (**SNG**) obtido por um processo de gasificação (Rajvanshi, 1986) e o **biodiesel HVO** (Hidrotreating of Vegetable Oils) obtido a partir de hidrocarbonetos parafínicos (Aatola *et al.*, 2008). A figura 1.4 apresenta o fluxograma de produção de etanol a partir de culturas cerealíferas, açucareiras e de materiais lenhocelulósicos

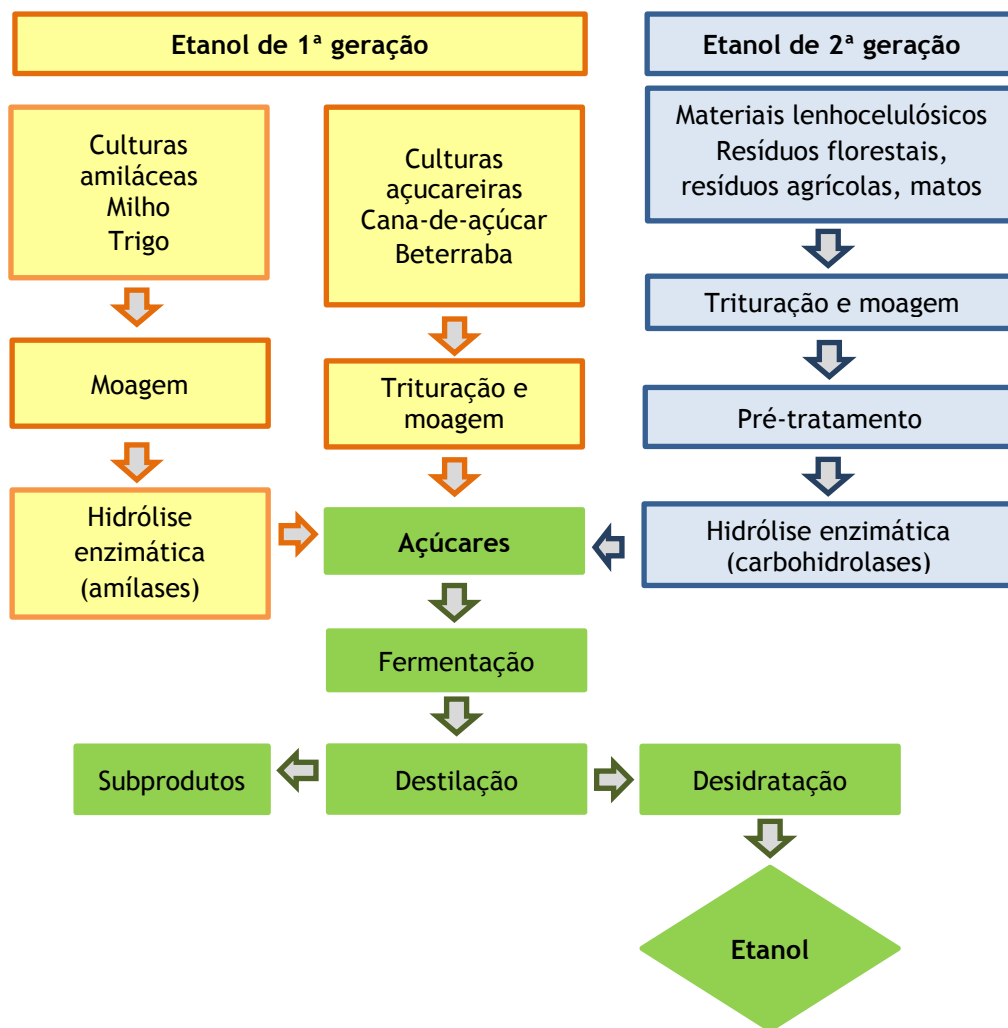


Figura 1.4 - Produção de etanol de 1ª e 2ª geração (adaptado EBTP, 2013)

Globalmente, os biocombustíveis de 2ª geração possuem a vantagem de não competir directamente com a produção alimentar. A utilização de materiais lenhocelulósicos poderá resultar numa maior produção de biocombustível por unidade de superfície utilizada, exigindo menos produtos químicos e menor consumo de energia para a sua produção, facultando um rendimento mais elevado em termos de energia líquida produzida por hectare. Assim, aliada a uma maior sustentabilidade de exploração dos recursos verifica-se para o etanol celulósico reduções significativas nas emissões estimadas de GEE por unidade de energia produzida

relativamente aos combustíveis fósseis tradicionais, mas também aos biocombustíveis de 1ª geração, como pode ser observado na figura 1.5.

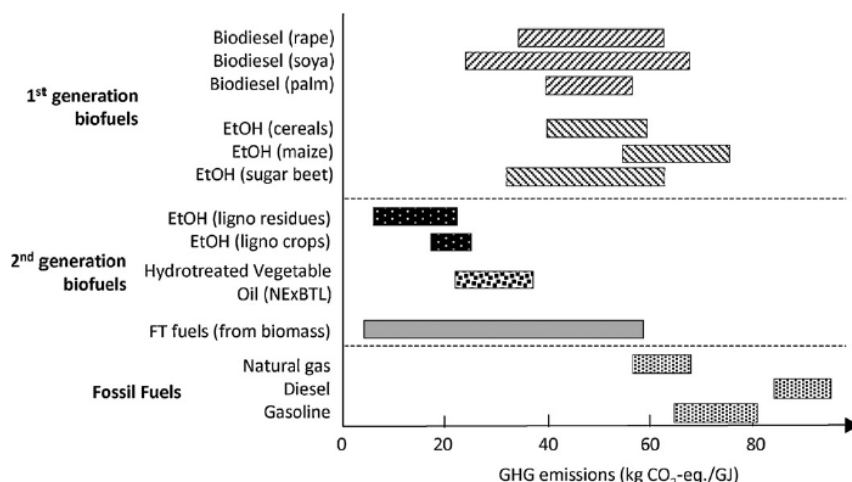


Figura 1.5 - Emissões estimadas de GEE por unidade de energia produzida nos combustíveis fósseis e nos biocombustíveis de 1ª e 2ª geração (Centi *et al.*, 2011).

Outro factor importante em termos de sustentabilidade na utilização de biocombustíveis é a razão entre a energia gerada pelo combustível face à energia necessária para a sua produção. A tabela 1.2 apresenta para alguns combustíveis o balanço energético e as emissões equivalentes de CO₂ geradas por cada quilómetro percorrido. O balanço energético expressa a razão entre a quantidade de energia produzida pelo combustível (Energy Output - E_{out}) face à quantidade de energia necessária para a sua produção (Energy Input - E_{in}). A sua leitura permite-nos verificar que o etanol de cana-de-açúcar, o biogás, o biodiesel produzido pelo processo de Fischer-Tropsch e o etanol celulósico, a par de uma redução nas emissões de CO₂, podem atingir um balanço energético 8 vezes superior ao da gasolina e do gasóleo, tornando estes biocombustíveis mais sustentáveis do ponto de vista energético e de emissões.

Tabela 1.2 - Balanço energético e emissões equivalentes de CO₂ por quilómetro de alguns combustíveis (Cherubini *et al.*, 2009)

Combustível	E_{out}/E_{in}	g CO ₂ eq./km
Etanol de cana-de-açúcar	4,0 - 6,7	50-75
Etanol (milho, trigo, beterraba)	1,2 - 2,0	100-195
Biogás	2,5 - 6,7	25-100
Biodiesel (colza, soja, girassol)	1,4 - 2,5	80-140
Biodiesel por Fischer-Tropsch	2,5 - 6,7	15-55
Etanol celulósico	2,2 - 6,7	25-50
Gasolina	0,8	210-220
Gasóleo	0,8	185-220

1.1.4 - Biomassa residual do sector olivícola

Define-se como biomassa para produção de energia renovável, segundo o artigo 2º da Directiva 2009/28/CE de 23 de Abril de 2009, *a fracção biodegradável de produtos, resíduos e detritos de origem biológica provenientes da agricultura (incluindo substâncias de origem vegetal e animal), da exploração florestal e de indústrias afins, incluindo da pesca e da aquicultura, bem como a fracção biodegradável dos resíduos industriais e urbanos*. Na tabela 1.3 apresentamos as disponibilidades de biomassa (quantidades superiores a 30 000 toneladas/ano) passíveis de serem utilizadas na produção de biocombustíveis de 2ª geração em Portugal tendo em conta o seu custo de aquisição.

Tabela 1.3 - Disponibilidades de biomassa passíveis de serem utilizadas na produção de biocombustíveis de 2ª geração tendo em conta o seu custo de aquisição
(Dias, 2002; Levy e Cabeças, 2006; Netto, 2008).

Material lenhocelulósico	Quantidade (ton. secas/ano)	Utilização actual	Preço médio (Euros/ton))
Palhas de trigo	215 000	AA	35,21
Palha cevada	24 000	AA	35,21
Palha centeio	37 000	AA	35,21
Palha arroz	112 000	AA	-
Caules de milho	791 000	AA	25,00
Caules de girassol	38 000	AA	-
Resíduos florestais	988 000	Ind e E	22,37
Matos	600 000	SU	-
Resíduos das podas da vinha	294 000	SU	-
Resíduos das podas do olival	147 000	SU	-
Resíduos da produção de farinha de trigo	209 000	R	114,72
Resíduos do arroz	45 000	Ind	-
Bagaço de azeitona	61 000	R	-
		E	120,00
Bagaço de soja	308 000	R	214,48
Bagaço de Girassol	138 000	R	139,66
RSU - papel e cartão	835 187	Rec	90,00
		E	-
RSU - fracção orgânica	497 826	E	-

Legenda:

AA - alimentação animal, Ind - Indústria, E - Energia, R - Rações,
Rec - Reciclagem, SU - Sem Utilização

A área plantada de olival aumentou mundialmente entre 1991 e 2011, cerca de 29,7%, passando de 7,4 para 9,6 milhões de hectares. A sua implantação encontra-se principalmente concentrada nos países da orla do mediterrâneo, mas também noutras geografias como no continente americano ou na Austrália. A figura 1.6 apresenta a distribuição potencial do olival no mundo e a listagem dos seis países com maior área de olival registada em 2011. Portugal ocupava em 2011, a 9ª posição na lista da FAO, dos países com maior área de olival e maior quantidade de azeitona produzida (FAO, 2011).



Países	Área de olival (ha)
Espanha	2 330 400
Tunísia	1 779 950
Itália	1 144 420
Grécia	850 000
Turquia	798 493
Síria	684 490

Figura 1.6 - Distribuição potencial do olival no mundo e listagem dos seis países com maior área de olival em 2011 (FAO, 2011)

De acordo com os dados do Instituto Nacional de Estatística (INE, 2013), o olival ocupava em 2012 uma área de 346 778ha sendo a cultura agrícola com maior área de ocupação, com área superior ao cultivo de cereais para grão (287 778ha), de culturas forrageiras (225 622) e da vinha (179 469ha). A distribuição desta cultura concentra-se como podemos observar na figura 1.7 especialmente nas regiões do Alentejo, Trás-os-Montes e Beira Interior.

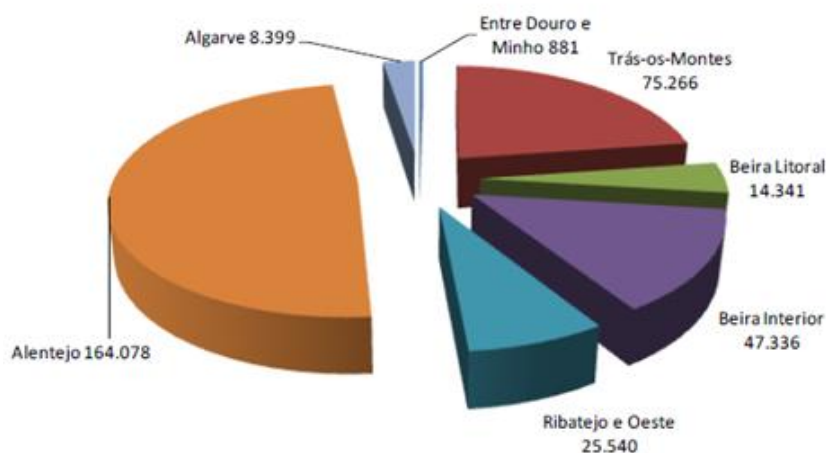


Figura 1.7 - Distribuição das áreas de olival, em 2009, por região agrícola (INE, 2011)

A biomassa proveniente do sector olivícola compreende os resíduos das podas provenientes da condução do olival e o bagaço e os efluentes resultantes da produção de azeite. O olival e a indústria associada representam uma importante fonte de biomassa produzindo anualmente

cada hectare de olival, cerca de 6 toneladas de azeitona e 3 toneladas de resíduos de podas (AAE, 2013). A poda, efectuada obrigatoriamente para a produção do fruto, realiza-se com uma periodicidade bi-anual ou tri-anual sendo constituída por ramos e casca, em cerca 74,1%, e por folhas nos restantes 25,9% (Sodean, 2004).

A posterior eliminação destes resíduos é necessária para evitar o aparecimento de problemas fitossanitários, sendo prática corrente no nosso País o amontoamento destes resíduos e posterior queima ou a trituração e espalhamento nos campos da estilha resultante, com os consequentes custos de eliminação associados estimados em 73 €/ha (Herrera, 2012).

Nos últimos anos tem-se registado uma conversão de olivais tradicionais (de sequeiro) com densidades de 100 árvores/ha em olivais super intensivos (de regadio) com densidades muito elevadas, que podem atingir as 1975 árvores/ha. Estes olivais apresentam um menor tamanho das árvores, estando organizados em sebes, permitindo desse modo uma maior facilidade de mecanização nas operações de poda e recolha de resíduos (Ferreira, 2010; Jorge, 2012; Olint, 2013). A figura 1.8 mostra algumas operações mecanizadas na exploração do olival.



Figura 1.8 - Mecanização nas operações de colheita, poda e recolha de resíduos no Olival (Olint, 2013; Spinelli *et al.*, 2011)

A produção de azeite em Portugal, pese embora a variabilidade produtiva induzida pelas condições climáticas de ano para ano, tem aumentado consistentemente nos últimos anos em Portugal. Esse crescimento deve-se principalmente à alteração da produtividade de azeitona por hectare, uma vez que a área de ocupação da cultura tem-se mantido praticamente inalterável. A tabela 1.4 apresenta a evolução, entre 2007 e 2011, da produção de azeite, da produção de azeitona e da área de ocupação do olival em Portugal Continental.

Tabela 1.4 - Evolução entre 2007 e 2011 da produção de azeite, produção de azeitona e da área de ocupação do olival

Ano	Produção de azeite (hl) (INE, 2012a)	Produção de azeitona (ton.) (INE, 2012b)	Área de olival (ha) (INE, 2013)
2011	831 914	510 773	345 683
2010	686 832	435 009	343 219
2009	681 850	414 687	344 199
2008	587 422	336 479	347 140
2007	353 574	203 968	347 369

Relativamente aos resíduos provenientes da produção de azeite eles diferem de acordo com a tecnologia de transformação utilizada. A tabela seguinte apresenta, em função da tecnologia de extracção, as quantidades de azeite e resíduos produzidos.

Tabela 1.5 - Percentagens de azeite e resíduos obtidos em função da tecnologia de extracção (Caputo *et al.*, 2003)

Tipo de lagar	Entradas	Quantidades	Saídas	Quantidades produzidas
Prensas	Azeitona	1 000kg	Azeite	200kg
	Água de lavagem	0,1-0,12 m ³	Bagaço	400kg
			Efluente	400 - 600L
Três fases	Azeitona	1 000kg	Azeite	200kg
	Água de lavagem	0,1-0,12 m ³	Bagaço	400-500kg
	Água de decantação	0,5 - 1,0 m ³	Efluente	1000 - 1200L
Duas fases	Azeitona	1 000kg	Azeite	200kg
	Água de lavagem	0,1-0,12 m ³	Bagaço	400kg
			Efluente	85-110L

1.2 - Composição da biomassa lenhocelulósica

O material lenhocelulósico pode ser geralmente dividido em quatro componentes principais: celulose (30 a 50%), hemicelulose (15 a 35%), lenhina (10 a 30%) e outras substâncias que não fazem parte da parede celular representadas essencialmente por extractáveis e por compostos minerais presentes em pequenas quantidades (1-3%). Na parede celular os polissacarídeos, celulose e hemicelulose, encontram-se intimamente ligados com a lenhina por meio de ligações covalentes e por pontes de hidrogénio tornando a estrutura da biomassa altamente robusta e resistente a qualquer tratamento (Limayem e Ricke, 2012). As quantidades relativas destes componentes variam na parede celular de acordo com a espécie, idade, localização geográfica, localização na floresta e mesmo ao longo da própria árvore, quer na direcção longitudinal quer na direcção transversal (Pereira, 1988). Na figura 1.9 apresenta-se a estrutura simplificada da parede celular de um material lenhoso.

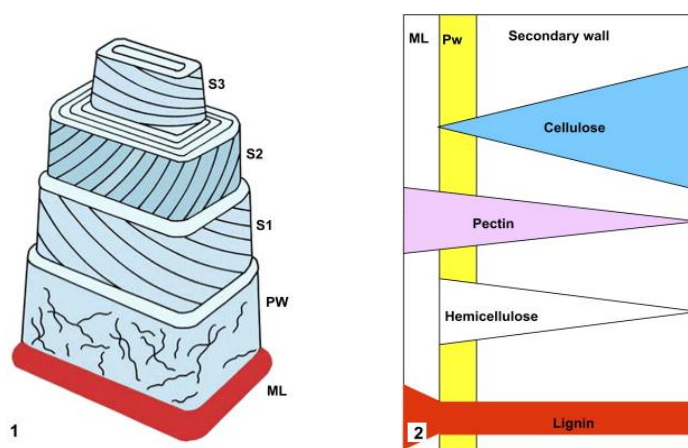


Figura 1.9 - Parede celular de um material lenhoso. 1) Modelo convencional da parede celular com lamela média (ML), parede primária (PW), parede secundária externa (s1), parede secundária intermédia (S2) e parede secundária interna (S3). 2) Distribuição relativa dos constituintes da parede celular nas diferentes camadas da parede celular. (Adaptado Schwarze, 2007)

A parede celular é formada por cinco camadas concêntricas (ML, PW, S₁, S₂ e S₃) com diferente estrutura e composição química. A lamela média, com uma espessura de 0,05 a 0,20 µm, actua como elemento de separação entre células sendo constituída principalmente por lenhina (70 a 80%), hemiceluloses e pectinas. A lenhina presente na lamela média representa apenas cerca de 10 a 15% da lenhina presente na parede celular. A parede externa (parede primária - PW) possui uma espessura aproximada de 0,1-0,2µm, contendo cerca de 10% da celulose, 20% da hemicelulose e 70% de lenhina presente na parede celular. A parede secundária constitui cerca de 80% do peso seco da parede vegetal sendo formada maioritariamente por celulose e hemiceluloses originadas em diferentes fases de

desenvolvimento. Dentro da parede secundária encontra-se o lúmen que é porção da célula que contém as substâncias intracelulares (Sun, 2010).

1.2.1 Celulose

A celulose é o polímero orgânico mais abundante na terra, sendo encontrada em todas as plantas terrestres, e mesmo em muitas plantas aquáticas, como algas. A celulose é um homopolissacarídeo formado pela ligação de um conjunto de monómeros de glucose, na forma piranósica, unidos por ligações glucosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ que podem chegar a vários milhares de unidades formando uma cadeia linear (Fengel e Wegener, 1984). A celulose é um componente estrutural da parede celular constituindo cerca de 45% do seu peso seco. Muitas das propriedades da celulose encontram-se dependentes do seu grau de polimerização (DP), isto é, do número de moléculas de glucose que constituem uma molécula de celulose. A fórmula química da celulose é $C_{6n}H_{10n+2}O_{5n+1}$ indicando n o grau de polimerização. Na figura 1.10 apresenta-se a estrutura de uma cadeia deste polímero.

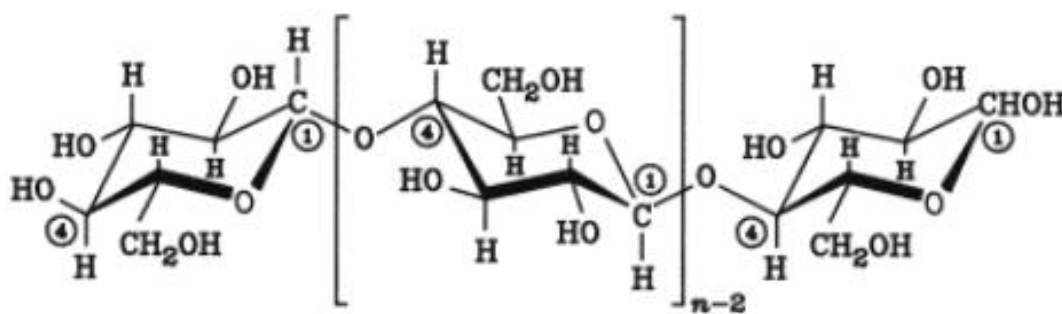


Figura 1.10 - Cadeia de celulose (Harmsen, 2010)

O arranjo em cadeias longas, fruto das ligações glucosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ juntamente com o facto de o polímero possuir grupos hidroxilo de ambos os lados dos monómeros, permite a formação de ligações por pontes de hidrogénio entre as moléculas de celulose. Estas ligações permitem agregar estas cadeias em longos feixes formando microfibrilhas, nas quais regiões altamente organizadas (cristalina) alternam com regiões menos organizadas (amorfas) (Sjostrom, 1993). A existência de regiões cristalinas e regiões amorfas faz com que a reactividade da celulose seja heterogénea, existindo como tal diferentes acessibilidades aos reagentes químicos.

As reacções mais importantes a serem destacadas para a celulose correspondem a (1) reacções das ligações glucosídicas (degradação da celulose) e (2) reacções de adição.

(1) Reacções das ligações glucosídicas - consistem na quebra da ligação acetal da cadeia de celulose pela acção de um ácido ou base. A figura 1.11 mostra a hidrólise ácida da celulose

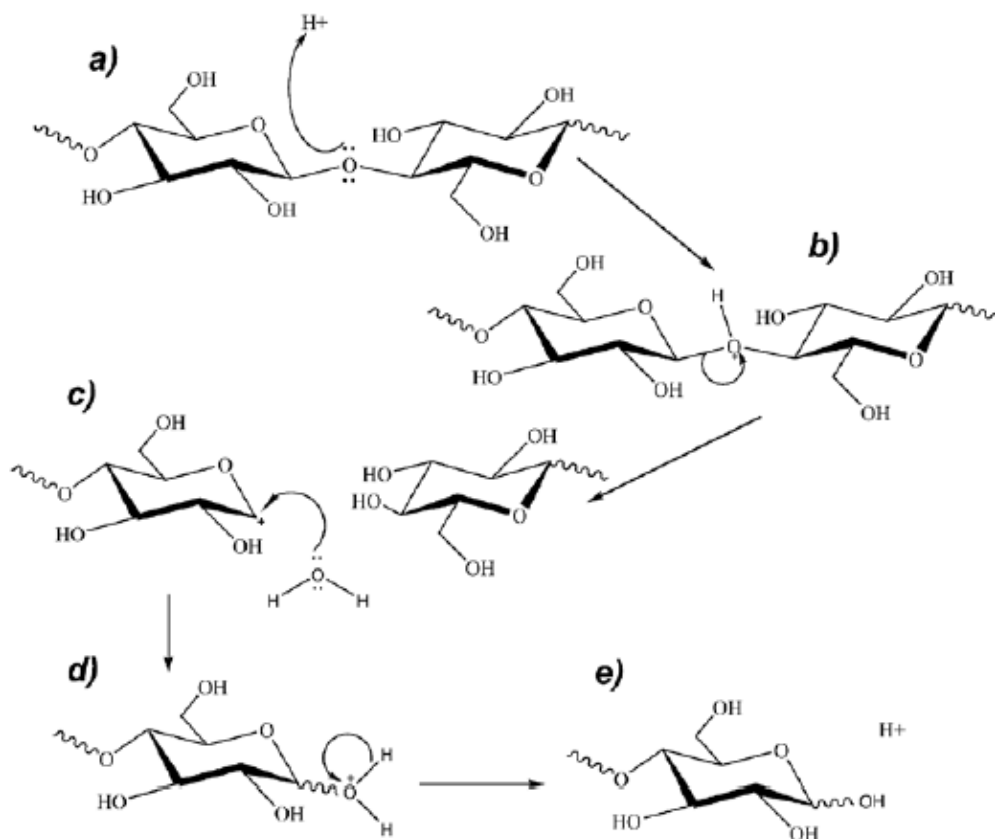


Figura 1.11 - Hidrólise ácida da celulose (Gil, 2008; Ogeda e Petri, 2010)

A degradação hidrolítica pode ser homogénea ou heterogénea, dependendo se a celulose é, respectivamente, solúvel ou não no meio de reacção. Na hidrólise heterogénea, como com ácido sulfúrico, a celulose mantém sua estrutura fibrosa. Nesta hidrólise em primeiro lugar dá-se o ataque e a solubilização da celulose das regiões amorfas, mais acessíveis à penetração do reagente. Em seguida, a velocidade de hidrólise diminui, correspondendo esta diminuição à degradação da celulose nas regiões cristalinas ou ordenadas. A fracção mais facilmente hidrolisável representa, geralmente, 10 a 12% em peso do conteúdo em celulose (Klock *et al.*, 2005; Lapoint, 2000).

Em meio alcalino, utilizando reagentes como NaOH e NH₃, ocorrem reacções de peeling dos grupos terminais redutores dos polissacarídeos e a hidrólise alcalina das ligações β-glucosídicas e dos grupos acetílicos. A figura 1.12 apresenta a hidrólise alcalina da celulose.

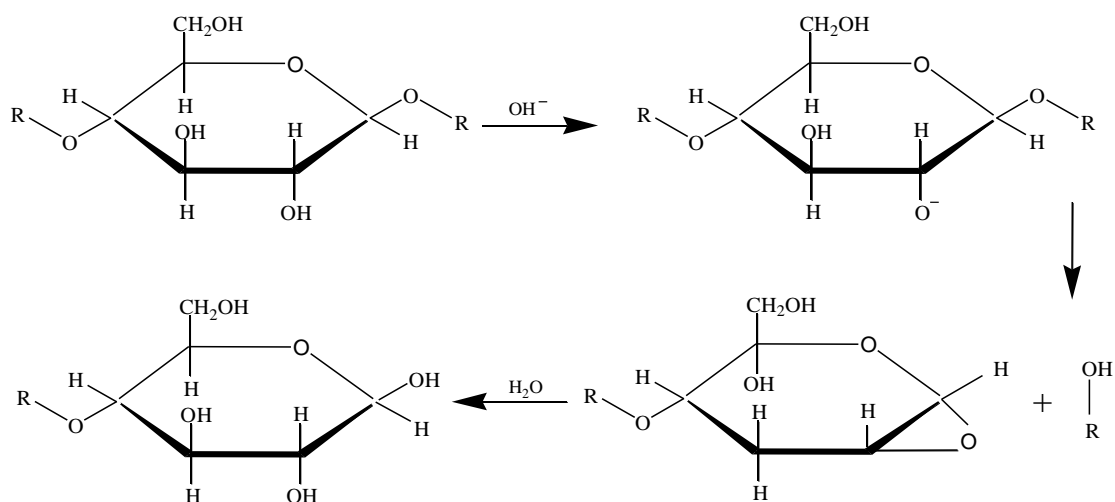


Figura 1.12 - Hidrólise alcalina da celulose a temperaturas superiores a 150°C (Gil, 2008)

(2) Reacções de adição - os componentes químicos que proporcionam a ocorrência de reacção de adição com a celulose, em geral, são agentes de inchamento (swelling). A introdução do agente de adição entre as cadeias de celulose leva ao inchamento da fibra podendo afastar as cadeias de celulose uma das outras, ficando as fibras em solução. O tamanho da molécula do reagente, a concentração aplicada e a temperatura são factores que condicionam o efeito de swelling. Note-se que remoção do reagente causa a regeneração da celulose. A aplicação de tratamentos com NaOH pode provocar, além do efeito de swelling, uma alteração na estrutura da celulose, levando à formação de uma Celulose II, a qual de um ponto de vista termodinâmico é considerada mais estável (Fengel e Wegener, 1984; Klock *et al.*, 2005).

1.2.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses, também designadas de polioses, diferem da celulose por serem compostas por diferentes açúcares, com cadeias estruturais mais pequenas e mais ramificadas, o seu DP varia entre 80 e 200. Os açúcares que entram na sua composição podem ser pentoses, como a β -D-xilose, α -D-arabinopiranoose e α -D-arabinofuranose, hexoses como a β -D-glucose, β -D-manose e α -D-Galactose, ácidos urónicos como o ácido β -D-glucurónico, ácido α -D-4-O-metilglucurónico e ácido α -D-galacturónico e desoxioses (α -D-Ramnose e α -L-fucose) (Fengel e Wegener, 1984; Sun, 2010). A figura 1.13 apresenta os principais açúcares constituintes das hemiceluloses.

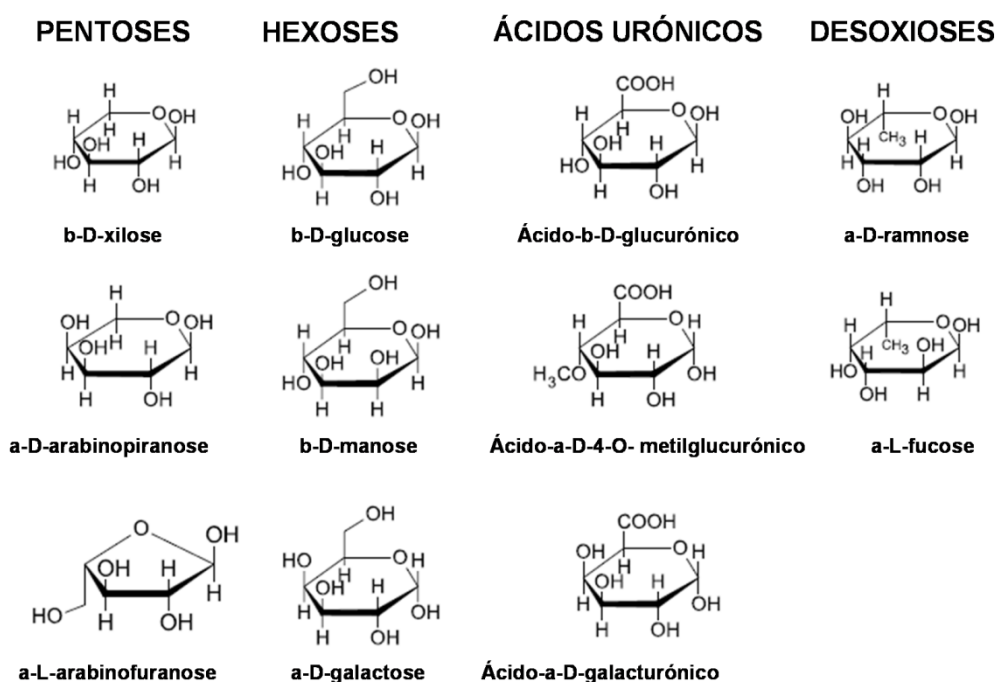


Figura 1.13 - Principais açúcares constituintes das hemiceluloses
(adaptado de Fengel e Wegener, 1984)

As hemiceluloses possuem a função de interligar a lenhina às fibras de celulose tornando a matriz celulose-hemicelulose-lenhina mais rígida (Laureano-Perez *et al.*, 2005) dando origem ao designado Complexo Lenhina-Polissacáridos (LPC - Lignin-Polysaccharide Complexes) (Fengel e Wegener, 1984; Sjostrom, 1993).

As hemiceluloses encontradas nas folhosas (angiospérmicas) encontram-se por norma parcialmente acetiladas O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano (Glucuronoxilanos - GX), sendo a base da sua constituição um homopolímero de D-xilose na forma piranósica unido por ligações β (1 \rightarrow 4). Dependendo da espécie considerada dentro das angiospérmicas o conteúdo em xilano pode variar entre 15 a 30% do peso da madeira seca.

Este esqueleto base de xilose encontra-se ligado a grupos O-acetil nas posições C2 ou C3. Em cada 10 moléculas de xilose por norma existem 7 ligações a grupos O-acetil e 1 ligação ao ácido 4-O-metil-D-glucorónico na posição C2. Na figura 1.14 podemos observar a estrutura primária do O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano.



Figura 1.14 - Estrutura primária do O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano
(Mikkonen e Tenkanen, 2012)

Um segundo tipos de hemiceluloses, que pode representar cerca de 2-5% da constituição das madeiras de angiospérmicas, são os glucomananos (GM), formados por uma proporção semelhante de β-D-glucopiranoose e β-D-manopiranoose unidas por ligações β (1→4). A proporção de glucose: manose nestas hemiceluloses pode variar entre 1:2 e 1:1. Na figura 1.15 podemos visualizar a estrutura primária do glucomanano

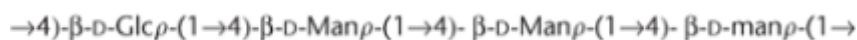
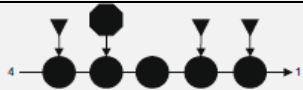
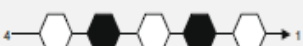
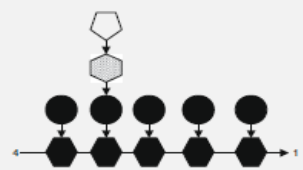
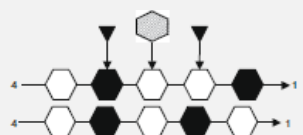
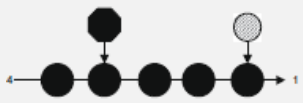
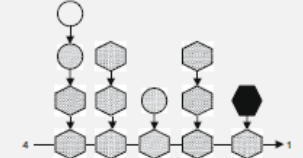


Figura 1.15 - Estrutura primária do glucomanano (Sjostrom, 1993)

Um terceiro tipo de hemiceluloses que pode estar presente na constituição de algumas angiospérmicas, podendo também aparecer em pequenas quantidades em herbáceas, são os Xiloglucanos (XG). Este tipo de hemiceluloses, que pode representar 2-25% do peso seco das angiospérmicas, consiste num esqueleto de unidades de D-glucopiranoose ligadas por ligações β-1,4. A este esqueleto ligam-se lateralmente unidades de D-xilopiranoose numa proporção de 75%. Às unidades de D-xilopiranoose podem ainda estar ligados resíduos de L-arabinose e D-galactose formando cadeias laterais bi ou tri-glicosídicas (Gírio *et al.*, 2010).

A figura seguinte apresenta os principais tipos de hemiceluloses encontradas em materiais lenho celulósicos florestais.

Tipo de hemicelulose	Abreviatura	Origem Biológica	Teor ^a	Representação esquemática
Glucoronoxilanos	GX	Folhosas	15-30	
Glucomananas	GM	Folhosas Resinosas	2-5	
Xiloglucanos	XG	Folhosas Herbáceas	2-25	
Galactoglucomananas	GGM	Resinosas	10-25	
Arabinoglucoronoxilanos	AGX	Resinosas Herbáceas Cereais	5-10	
Arabinogalactanos	AG	Resinosas	1-3,35	

^a - % da biomassa seca


 β -D-Galp; β -D-Glcp; β -D-Manp; β -D-Xylp; β -L-Araf; β -L-Arap; α -L-Fucp; \bullet 4-O-Me- α -D-GlcpA; ∇ , Acetyl; \blacklozenge , Feruloyl.

Figura 1.16 - Principais tipos de hemiceluloses encontradas em materiais lenhocelulósicos com diferentes origens florestais (Adaptado de Gírio *et al.*, 2010)

As hemiceluloses contrariamente à celulose são essencialmente amorfas, o que facilita grandemente a acessibilidade aos agentes químicos. No entanto, algumas hemiceluloses podem perder alguns substituintes da sua cadeia e sofrer cristalização induzida, com formação de fortes ligações por ponte de hidrogénio entre os grupos hidroxílicos de cadeias adjacentes. Desta forma, ocorre a formação de um retículo cristalino, que dificulta o acesso dos agentes químicos e, conseqüentemente as reacções químicas (Fengel e Wegener, 1984; Sjostrom, 1993)

1.2.3 Lenhina

A palavra lenhina deriva do latim *lignum*, que significa madeira. A lenhina é um dos principais componentes vasculares das plantas e é o segundo polímero natural mais abundante no reino vegetal (Lebo *et al.*, 2002). A lenhina tem um papel preponderante no transporte de água, nutrientes e metabólitos. Confere rigidez à parede celular e está intimamente ligada à celulose e hemiceluloses, facultando assim uma estrutura dotada de resistência mecânica. (Fengel e Wegener, 1984). A lenhina desempenha ainda um papel de protecção contra agentes patogénicos exteriores nas plantas superiores (Sjostrom, 1993).

A lenhina é um polímero aromático e rígido com um peso molecular de 10 000Da, proveniente da condensação desidrogenativa de três álcoois cinâmicos precursores, p-cumarílico, coniferílico e sinapílico, que diferem entre si pelo grau de metoxilação. Estes álcoois formam respectivamente as sub-unidades p-hidroxifenilo (H), guaiacilo (G) e siringilo (S) que compõem a lenhina. Na figura 1.17 podemos observar os precursores da biossíntese da lenhina bem como as suas unidades estruturais.

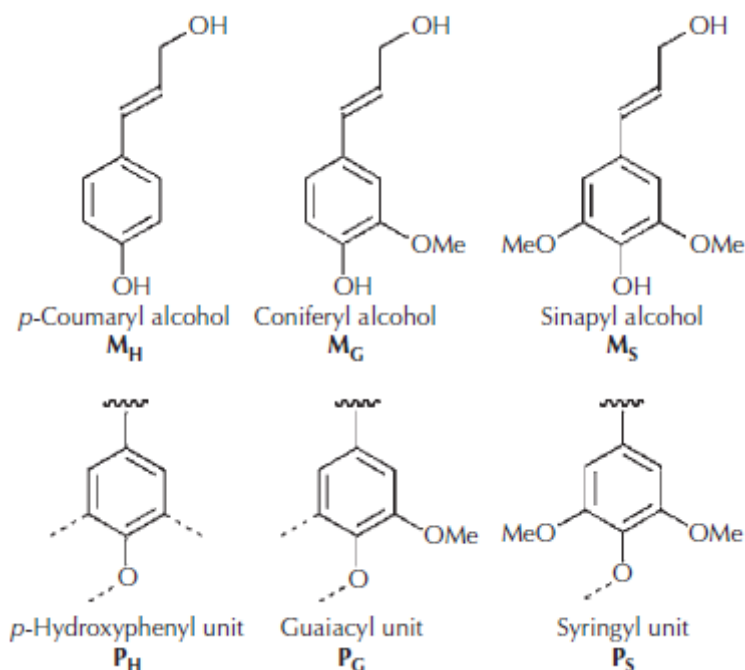


Figura 1.17 - Precursores primários da lenhina p-cumarílico (M_H), coniferílico (M_G) e sinapílico (M_S) e unidades estruturais da lenhina p-hidroxifenilo (P_H), guaiacilo (P_G) e siringilo (P_S) (Sun, 2010)

As lenhinas das madeiras das resinosas (gimnospérmicas), das folhosas (angiospérmicas, dicotiledóneas) e das gramíneas (angiospérmicas, monocotiledóneas) diferem na proporção relativa das unidades estruturais - guaiacilo (G), siringilo (S) e p-hidroxifenilo (H). Apesar da variabilidade observada na composição das lenhinas, as madeiras das resinosas, folhosas e

gramíneas apresentam, tendencialmente, lenhinas dos géneros G, GS e HGS, respectivamente (Alves, 2010; Fengel e Wegener, 1984). Ensaios determinaram razões G:S:H de 94:1:5 para o Abeto (resinosas), de 56:40:4 para a Faia (folhosa) e de 1:1:1 para herbáceas (Fengel e Wegener, 1984; Kogel- knabner, 2002). Estas unidades (S,G,H), considerando os diferentes centros reactivos dos radicais, podem-se unir por diferentes tipos de ligação. As ligações B-O-4 são as mais abundantes constituindo 50 a 60% do total. Na figura 1.18 apresentamos as ligações mais comuns entre os monómeros de lenhina.

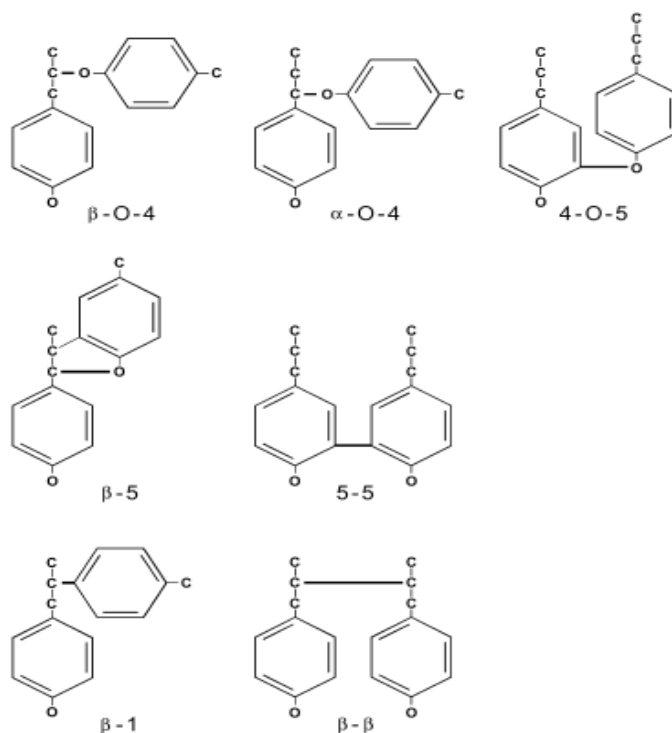


Figura 1.18 - Estrutura das ligações mais representativas na lenhina (Kogel- knabner, 2002)

A relativa estabilidade das ligações químicas determina a reactividade da lenhina como um todo, apesar dos vários tipos de ligações existentes na lenhina apresentarem distinta reactividade face a diferentes condições. A ligação B-O-4 é relativamente instável levando à condensação da lenhina por acção de ácidos fortes e levando a uma degradação da lenhina na presença de soluções alcalinas fortes ou na presença de fortes agentes oxidantes. (Jeffries, 1987).

A lenhina não se encontra apenas depositada na parede celular com os açúcares, encontrando-se quimicamente ligada às hemiceluloses numa proporção de 1 por 35 unidades de fenilpropano. As ligações com o glucano não são frequentes ocorrendo esporadicamente nos terminais não redutores do açúcar. A lenhina está covalentemente associada às hemiceluloses, na parede celular. A ligação com a xilose ocorre nos carbonos 2 e 3 e no carbono 5 na cadeia lateral da arabinose. A arabinose, xilose e o 4-O-metilglucorónico ácido são os açúcares com os quais a lenhina estabelece as ligações mais frequentes, nomeadamente, as ligações éter entre o anel aromático da lenhina e o açúcar e as ligações

éster entre o anel aromático da lenhina e os resíduos de ácidos urónicos (Jeffries, 1987; Sjostrom, 1993). A figura 1.19 apresenta um modelo de lenhina proposto para o choupo.

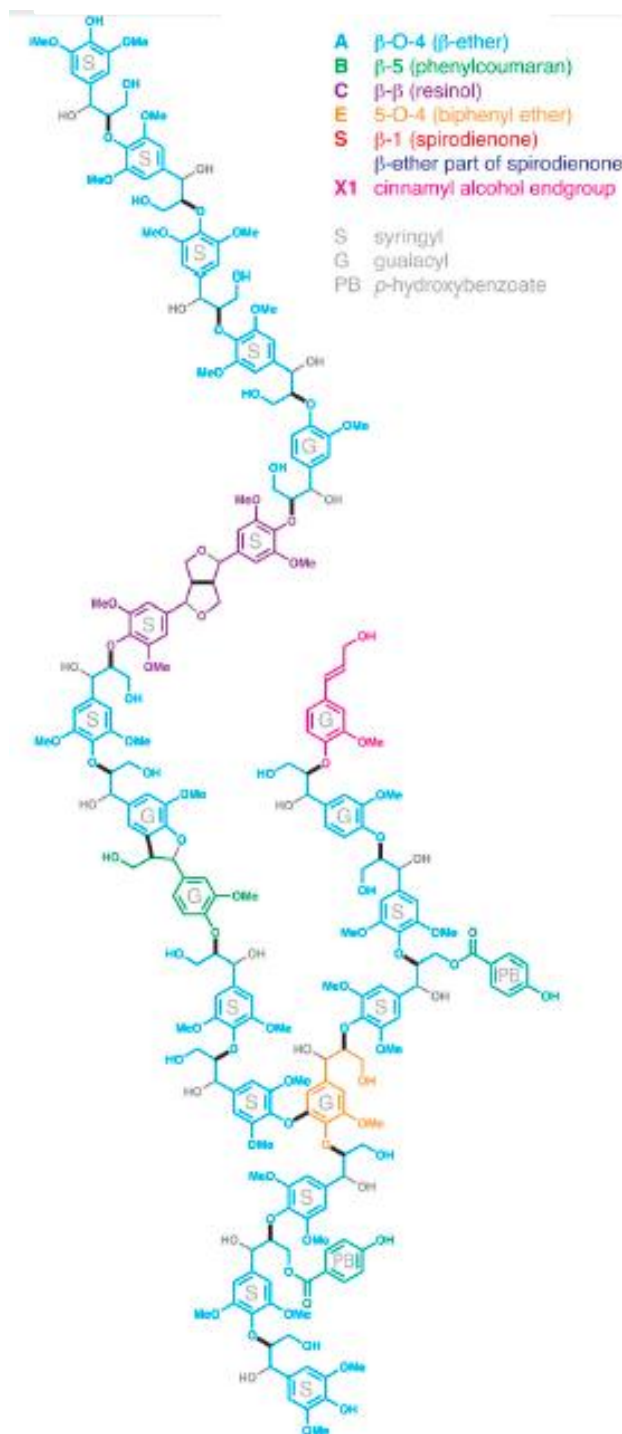


Figura 1.19 - Estrutura proposta para a lenhina do choupo
(Stewart *et al.*, 2009)

1.2.4 Extractáveis

Para além dos componentes macromoleculares presentes na madeira, existe ainda uma grande variedade de componentes de baixo peso molecular, solúveis em solventes orgânicos ou água, denominados genericamente por extractáveis. Os extractáveis são agrupados em classes, tendo em conta a sua polaridade e estrutura química. Assim de acordo com a sua polaridade estes podem ser divididos em duas fracções. Uma fracção lipofílica na qual se encontram os terpenos e terpenóides, mas também os lípidos, e uma fracção hidrofílica da qual fazem parte os compostos fenólicos (Fengel e Wegener, 1984; Gil, 2008).

Os resíduos das podas do olival possuem compostos fenólicos nomeadamente flavonóides nas folhas e lignanos na madeira e na casca (Altarejos *et al.*, 2005).

As folhas presentes nos resíduos das podas possuem na sua constituição uma grande quantidade e variabilidade de extractáveis sendo os mais representativos os compostos fenólicos Oleuropeína e Hidroxitirosol, os quais podem representar mais de 25% do peso seco das folhas (Erbay e Icier, 2010). Para além destes produtos foram encontrados outros extractáveis em menor proporção como flavonóides e derivados de ácidos hidroxicinâmicos (Benavente-García *et al.*, 2000; Erbay e Icier, 2010; Herrero *et al.*, 2011; Pérez-Bonilla *et al.*, 2006; Zbidi *et al.*, 2009). A figura 1.20 apresenta a estrutura da Oleuropeína, um dos principais extractáveis encontrados nos resíduos das podas do olival.

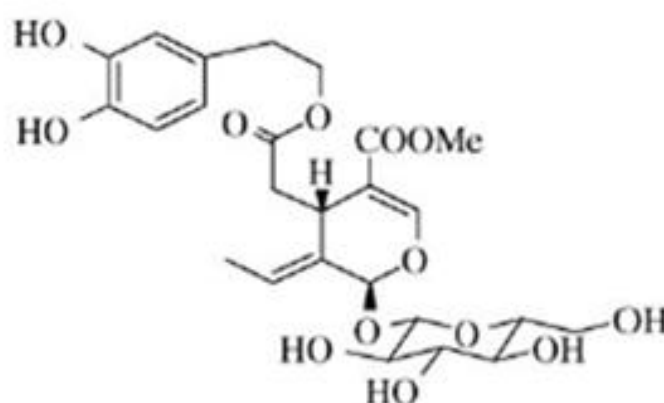


Figura 1.20 - Estrutura da Oleuropeína (Pérez-Bonilla *et al.*, 2006)

1.3 - Pré-tratamentos

A produção de etanol a partir de materiais lenho celulósicos compreende cinco etapas: pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação, separação do produto e pós tratamento da fracção líquida (Hendriks e Zeeman, 2009; Mosier *et al.*, 2005). O pré-tratamento constitui uma etapa fundamental para reduzir a recalcitrância da biomassa para as etapas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação (Zhu e Pan, 2010). Esta etapa embora fundamental, pois sem ela a eficiência da hidrólise enzimática dificilmente ultrapassa os 20%, constitui uma das etapas mais caras de todo o processo de produção de álcool a partir de material lenho celulósico (Alvira *et al.*, 2010; Hendriks e Zeeman, 2009). Contudo Wyman refere que mais caro que efectuar pré-tratamento é não realizá-lo, uma vez que esta etapa é responsável pelo controlo do rendimento dos açúcares, quer das hemiceluloses quer da celulose, influenciando por essa via a viabilidade económica de todo o processo (Wyman, 2007). A figura 1.21 apresenta o efeito esperado com a aplicação do pré-tratamento.

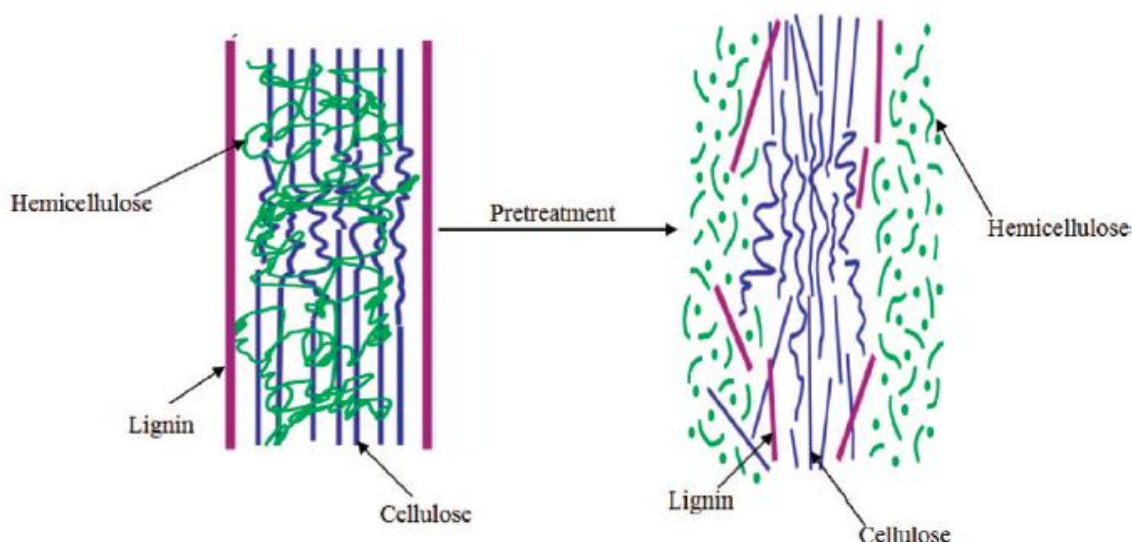


Figura 1.21 - Apresentação esquemática dos efeitos do pré-tratamento no material lenho celulósico (Hsu *et al.*, 1980)

O pré-tratamento tem como objectivo tornar acessíveis ao tratamento enzimático a celulose e hemicelulose (Pu *et al.*, 2008). A escolha do método de pré-tratamento, bem como a severidade dos factores utilizados, deve ser realizada tendo em conta que os materiais lenho celulósicos apresentam diferenças significativas na sua constituição e estrutura. Estas diferenças fazem-se sentir nas diferentes partes da planta (tronco, ramos e folhas) variando também, dentro destas, em função da idade, do estágio de desenvolvimento e de outras condições (Kumar *et al.*, 2009a). Se o pré-tratamento não for suficientemente severo o resíduo sólido resultante não será facilmente hidrolisado enzimaticamente, se porventura for demasiado severo conduzirá a formação de produtos de degradação que inibirão os microorganismos fermentativos (Balat, 2011; Mosier *et al.*, 2005).

A implementação dos pré-tratamentos visa limitar os principais factores inibidores da hidrólise enzimática, actuando sobre (1) a cristalinidade da celulose, (2) o volume dos poros, (3) a área superficial disponível, (4) o teor e estrutura da lenhina, (5) o conteúdo e o grau de acetilação das hemiceluloses (Alvira *et al.*, 2010; Hendriks e Zeeman, 2009; Taherzadeh e Karimi, 2008).

(1) Nos materiais lenho celulósicos a maior parte da celulose (cerca de 2/3) encontra-se na forma cristalina, estando o restante 1/3 na forma amorfa (desorganizada). Esta desorganização da forma amorfa faz com que estas regiões sejam mais facilmente acessíveis pelas enzimas verificando-se uma hidrólise enzimática mais rápida nestas regiões. Nas regiões cristalinas, a maior dificuldade de acesso provoca uma maior resistência à hidrólise com a consequente redução da velocidade da reacção hidrolítica. (2) Outro factor que influencia o acesso das enzimas ao substrato é o volume do poro. Grethlein ao realizar pré-tratamentos ácidos em folhosas e resinosas concluiu que o acesso das enzimas estava directamente relacionado com o volume do poro do substrato, sendo necessário para a entrada das celulasas um diâmetro nominal de 51Å (Grethlein, 1985). (3) A área superficial disponível (m^2/g) possui duas componentes, a área superficial externa e a interna, sendo que o aumento de ambas as componentes favorece a acessibilidade das enzimas ao substrato. O aumento da área superficial externa é realizado através da redução do tamanho da partícula sendo considerada por diversos autores como um pré-tratamento físico (Kumar *et al.*, 2009a; Sun e Cheng, 2002; Zhu e Pan, 2010), enquanto o aumento da área superficial interna pode ser realizada pelo uso de solventes polares, como a água, o etanol ou o ácido acético. A secagem da biomassa pode conduzir a uma redução da área superficial interna provocando o encolhimento ou mesmo do colapso irreversível dos capilares (Taherzadeh e Karimi, 2008).

(4) A presença da lenhina impede a hidrólise enzimática de diversos modos. Primeiro, constituindo uma barreira física que impede o acesso da enzima ao substrato que se pretende hidrolisar. Depois, impedindo o inchamento (Swelling) da celulose e com isso a facilidade de entrada das enzimas dentro da celulose. Ramos e colaboradores apontam que este efeito poderá estar relacionado com o tipo de lenhina, sugerindo que a maior presença de grupos guaiacilo parece limitar o efeito de inchamento swelling. Este facto explicaria porque razão as resinosas apresentam por norma maior recalcitrância que as folhoasas (Ramos *et al.*, 1992). Por fim, a possibilidade de ligação não produtiva da lenhina às enzimas. O estabelecimento destas ligações conduz a uma diminuição das enzimas disponíveis no processo de hidrólise, com a consequente redução das taxas de conversão obtidas. Este último efeito parece ser potenciado com lenhina dissolvida, como acontece em pré-tratamentos alcalinos (Taherzadeh e Karimi, 2008).

(5) A remoção das hemiceluloses, para além de eliminação da barreira física, provoca um aumento do tamanho do poro promovendo a acessibilidade da enzima ao substrato. O grau de acetilação é importante na digestão enzimática das hemiceluloses, uma vez que os grupos acetilo, juntamente com a lenhina, encontram-se ligados ao esqueleto das hemiceluloses podendo dificultar a sua hidrólise (Chang e Holtzapple, 2000).

Os pré-tratamentos podem ser classificados como: Físicos, Químicos, Biológicos e Combinados. A tabela 1.6 apresenta os vários tipos de pré-tratamentos passíveis de serem utilizados em materiais lenhocelulósicos.

Tabela 1.6 - Métodos de pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos

Método de pré-tratamento	Processo	Referência
Físicos	Ultra-sons	(Nikolic <i>et al.</i> , 2010)
	Microondas	(Binod <i>et al.</i> , 2012)
	Irradiação	(Bak <i>et al.</i> , 2009)
	Explosão com vapor	(Zhang e Chen, 2012)
	Hidrotérmico	(Wan <i>et al.</i> , 2011)
Químico: Ácido	Ácido Sulfúrico	(Castro <i>et al.</i> , 2011)
	Ácido fosfórico	(Avci <i>et al.</i> , 2012)
	Ácido nítrico	(Zhang <i>et al.</i> , 2011)
	SPORL ¹	(Zhu <i>et al.</i> , 2009)
Químico: Alcalino	Hidróxido de sódio	(Wang <i>et al.</i> , 2012)
	Amoníaco	(Rollin <i>et al.</i> , 2011)
Químico: Oxidação	Peróxido de hidrogénio	(Banerjee <i>et al.</i> , 2011)
	Ozono	(Sannigrahi <i>et al.</i> , 2012)
	Oxidação húmida	(Klinke <i>et al.</i> , 2002)
Químico: Solventes orgânicos	Etanol	(Buranov e Mazza, 2012)
	COSLIF ²	(Sathitsuksanoh <i>et al.</i> , 2012)
Combinados: Físico - Químicos	AFEX ³	(Bals <i>et al.</i> , 2012)
	SE ⁴ com SO ₂	(Monavari <i>et al.</i> , 2010)
	SE ⁴ com CO ₂	(Srinivasan e Ju, 2011)
Biológicos	Fungos	(Salvachua <i>et al.</i> , 2011)

SPORL¹ - Sulfite Pretreatment to Overcome Recalcitrance of Lignocellulose

COSLIF² - Cellulose solvent- and organic solvent-based lignocellulose fractionation

AFEX³ - Ammonia Fiber Explosion

SE⁴ - Steam Explosion

1.3.1 - Pré-tratamento ácido

O principal objectivo do pré-tratamento ácido é a solubilização da fracção hemicelulósica da biomassa tornando a celulose mais acessível ao ataque enzimático. Este tipo de pré-tratamentos é realizado usualmente com ácido diluído (< 4% w/w) sendo o ácido sulfúrico o reagente mais amplamente utilizado (Kumar *et al.*, 2009). Para além do ácido sulfúrico têm sido testados em menor escala outros ácidos, como o ácido nítrico, o ácido fosfórico e o ácido oxálico (Avci *et al.*, 2012; Ivetić *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2011a). A aplicação de pré-tratamentos com ácido diluído aparece como a metodologia mais favorável para aplicações industriais sendo considerada barata e efectiva (Alvira *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2009). A tabela 1.7 apresenta alguns exemplos de pré-tratamentos com ácido diluído.

Tabela 1.7 - Exemplos de pré-tratamentos com ácido diluído

Material	Condições de pré-tratamento	Resultados	Referência
Caules de algodão	121°C, 90min., H ₂ SO ₄ 2,0% (w/v)	>90% Xs	(Silverstein <i>et al.</i> , 2007)
Casca de soja	153°C, 60min., H ₂ SO ₄ 1,7% (w/v)	EH = 87%	(Cassales <i>et al.</i> , 2011)
Palha de milho	106-108°C, 6h, H ₂ SO ₄ 1,5% (w/v)	76,7 Xs	(Chen <i>et al.</i> , 2009)
Bagaço de cana-de-açúcar	128°C, 5,6 min., HNO ₃ 6,0% (w/w)	E = 6,7	(Rodríguez-Chong <i>et al.</i> , 2004)
	128°C, 7,6min., HCl 6,0% (w/w)	E = 10,1	
	128°C, 5,6 min., H ₂ SO ₄ 6,0% (w/w)	E = 10,5	
Choupo	158°C, 13 min., C ₂ H ₂ O ₄ 3,7% (w/w)	72,0 Xs	(Kim <i>et al.</i> , 2011b)
Pinheiro	160°C, 20min., H ₂ SO ₄ 1,2% (w/w)	75,8 Xs	(Li <i>et al.</i> , 2013)
		92,9 As	
Eucalipto	160°C, 20 min., H ₂ SO ₄ 1,2% (w/w)	72,6 Xs	(Li <i>et al.</i> , 2013)
		89,1 As	
Podas de Olival	170°C, 10min., H ₂ SO ₄ 1,4% (w/w)	100,0 Xs EH = 56,5%	(Cara <i>et al.</i> , 2007a)

Xs - % de solubilização da xilose, As - % solubilização da arabinose

EH - rendimento da hidrólise enzimática

E - Eficiência (açúcares libertados/inibidores libertados)

Os pré-tratamentos com ácido diluído podem ser realizados com dois tipos de temperatura, com temperaturas altas (T > 160°C), as quais são indicadas para processos de fluxo contínuo sendo aplicada uma carga reduzida de sólidos (peso do substrato/peso da reacção de mistura = 5-10%) ou com temperaturas consideradas baixas (T < 160°C) adequadas para processos descontínuos nas quais a carga de sólidos oscila entre 10 e 40% (Balat, 2011; Kumar *et al.*, 2009; Sun e Cheng, 2002; Sun e Cheng, 2003). Na figura 1.22 podemos observar o efeito do aumento da temperatura em pré-tratamentos realizados com ácido sulfúrico sobre a estrutura vegetal do bagaço de cana-de-açúcar.

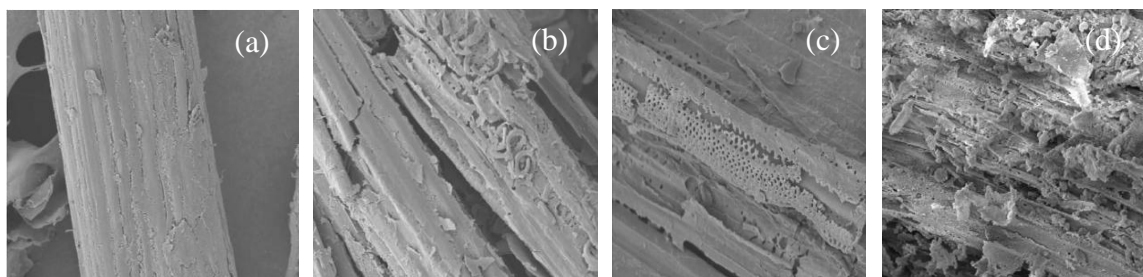


Figura 1.22 - Imagens SEM de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico 1,56% (w/w) aquecido por microondas. Sem pré-tratamento(a), a 130°C (b), a 160° (c) e a 190°C (d) (Chen *et al.*, 2011)

O pré-tratamento ácido possui a vantagem de poder ser utilizado em diversos materiais como em herbáceas, em resíduos agrícolas ou em madeiras florestais. No entanto, na sua aplicação devem ser evitadas condições muito severas de pré-tratamento que conduzam à formação de produtos de degradação. Dependendo das condições seleccionadas a fracção líquida resultante do pré-tratamento pode ser constituída por monossacáridos (glucose, xilose, arabinose), produtos da decomposição das hemiceluloses como o ácido acético, o qual é gerado pela quebra dos grupos acetilo ligados às hemiceluloses, e produtos de decomposição dos monossacáridos, como o furfural resultante da degradação das pentoses e o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) resultante da degradação das hexoses (Cardona *et al.*, 2010). A figura 1.23 apresenta os produtos de degradação passíveis de serem gerados em pré-tratamentos ácidos.

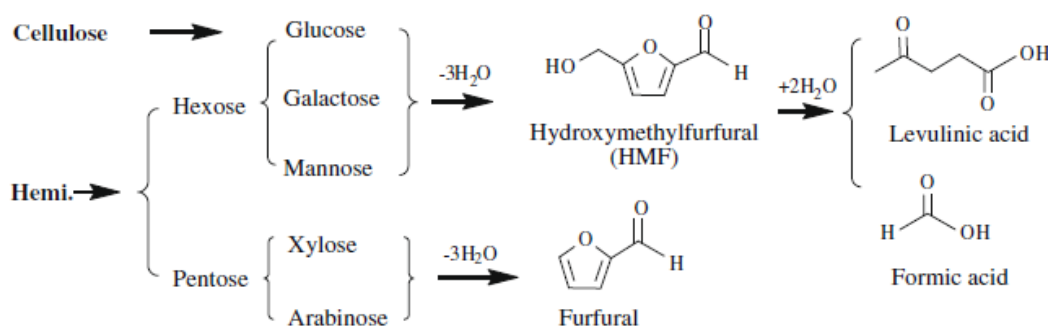


Figura 1.23 - Produtos de degradação passíveis de serem gerados em pré-tratamentos ácidos (Shuai *et al.*, 2010)

1.3.2 - Pré-tratamento alcalino

O objectivo principal do pré-tratamento alcalino consiste na remoção da lenhina de modo a permitir uma maior acessibilidade das enzimas à celulose e hemiceluloses presentes na biomassa. Este pré-tratamento utiliza diversas bases incluindo hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, hidróxido de potássio e amoníaco (Zheng *et al.*, 2009). O pré-tratamento alcalino provoca o aumento da área superficial disponível causando um inchamento da biomassa aumentando por essa via a acessibilidade das enzimas aos hidratos de carbono, reduzindo simultaneamente o grau de polimerização (DP) e a cristalinidade da celulose. A figura 1.24 apresenta o efeito de inchamento ou intumescimento causado num pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio sobre a estrutura celular da palha de arroz.

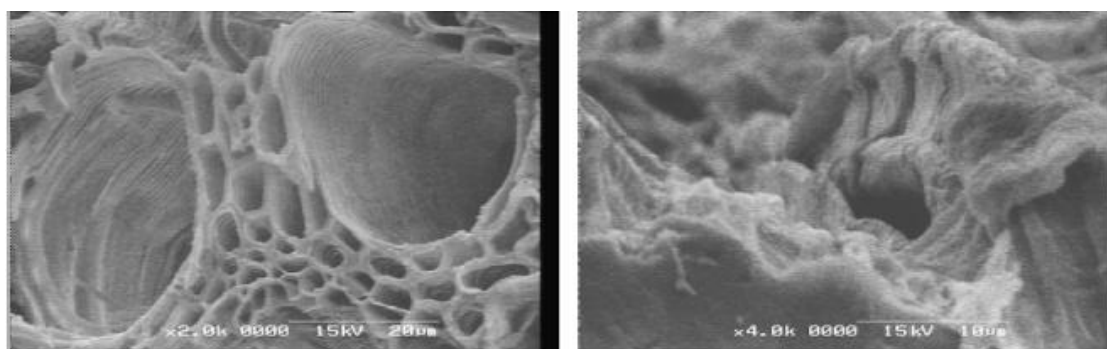


Figura 1.24 - Imagens SEM de palha de arroz antes e depois de pré-tratamento com 2,0% de NaOH (Zhang e Cai, 2008)

A fracção hemicelulósica pode ser nestes pré-tratamentos parcialmente solubilizada na presença de condições fortemente alcalinas (Balat, 2011; Modenbach e Nokes, 2012). O mecanismo alcalino assenta na saponificação das ligações ésteres intermoleculares entre a xilose e a lenhina, mas também entre a xilose e outras hemiceluloses. Este pré-tratamento provoca também a remoção dos grupos acetilo e dos ácidos urónicos nas hemiceluloses favorecendo com essa acção o acesso das enzimas às hemiceluloses (Carvalho *et al.*, 2008). Na figura 1.25 apresenta-se uma representação esquemática da quebra das ligações entre os hidratos de carbono e a lenhina, por reacção com amoníaco e por hidrólise alcalina (ex: NaOH).

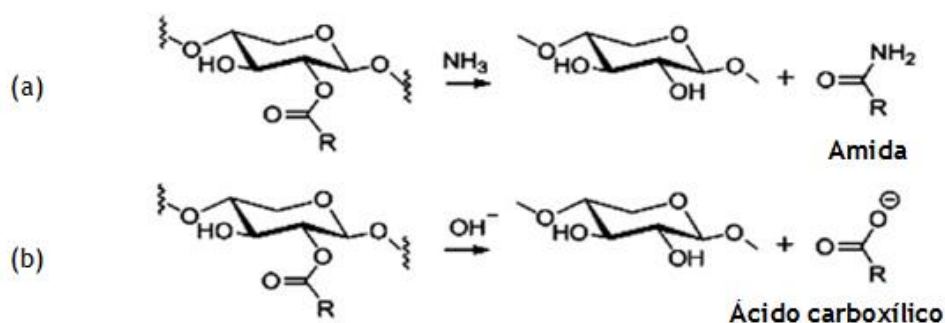


Figura 1.25 - Representação esquemática da quebra das ligações ésteres entre a lenhina e os hidratos de carbono, por reacção com amoníaco (a) e por hidrólise alcalina (b) (Chundawat *et al.*, 2010)

Os pré-tratamentos alcalinos relativamente aos pré-tratamentos ácidos são mais eficazes na remoção da lenhina apresentando uma menor solubilização da celulose e das hemiceluloses, exceptua-se desta observação o pré-tratamento ARP (Ammonia Recycling Percolation) no qual também existe uma elevada solubilização de hemiceluloses (Carvalho *et al.*, 2008). No entanto, estes pré-tratamentos podem apresentar, em soluções fortemente alcalinas, a ocorrência de “peeling” dos grupos terminais das hemiceluloses. O pré-tratamento alcalino também pode provocar uma redistribuição e condensação da lenhina, bem como modificações no estado de cristalinidade da celulose contrariando estas ocorrências o efeito positivo que a remoção da lenhina e o inchamento ou intumescimento da celulose provoca na hidrólise enzimática (Hendriks e Zeeman, 2009).

Os pré-tratamentos alcalinos apresentam algumas vantagens operativas relativamente aos pré-tratamentos ácidos tais como serem relativamente baratos, não requererem equipamento especial, uma vez que são menos corrosivos, e os reagentes poderem ser recuperados e reciclados (Mosier *et al.*, 2005).

Este tipo de pré-tratamentos provou ser eficaz para resíduos agrícolas e em madeiras de folhosas (Hardwoods), não se tendo revelado tão eficaz em madeiras de resinosas (Softwood) com teores de lenhina superiores a 26% (Mosier *et al.*, 2005; Sun e Cheng, 2002). A tabela 1.8 apresenta alguns exemplos de pré-tratamentos alcalinos realizados com NaOH e NH₃.

Tabela 1.8 - Exemplos de pré-tratamentos alcalinos realizados com NaOH e NH₃.

Material	Condições de pré-tratamento	Resultados	Referência
Betula	150°C, 2h, NaOH 8,0% (w/w)	TRL = 20%	(Lehto e Alén, 2013)
Pseudotsuga	100°C, 7h, NaOH 1,0%	TRL = 34%	(Pan <i>et al.</i> , 2005)
Choupo	120°C, 24h, NaOH 5,0%	TRL = 78%	(Gupta, 2008)
Palha de milho	120°C, 30min, NaOH 2,0% (w/v)	TRL = 74%	(Chen <i>et al.</i> , 2009)
Eucalipto		TRL = 14%	
Pinheiro	60°C, 24h, 15,0% NH ₃	TRL = 13%	(Park e Kim, 2012)
Lariço (Larix)		TRL = 9%	
Palha de cevada		TRL = 47%	
Herbácea	40°C, 24h, NH ₃ 15,0%	EH = 85%	(Pryor <i>et al.</i> , 2012)
(Switchgrass)	60°C, 8h, NH ₃ 15,0%	EH = 85%	
Palha de milho	60°C, 12h, NH ₃ 15,0%	TRL = 62%	(Kim e Lee, 2007)
Palha de arroz	130°C, 20min, NH ₃ 15,0%	TRL = 70%	(Kim <i>et al.</i> , 2011c)

TRL - Taxa de remoção de lenhina (lenhina removida/lenhina na biomassa)

HE - Rendimento da Hidrólise Enzimática

1.3.3 - Pré-tratamento com peróxido de hidrogénio em meio alcalino

O pré-tratamento com peróxido de hidrogénio em meio alcalino tem sido crescentemente utilizado nos processos de branqueamento e de remoção de lenhina na indústria da pasta e papel. A sua aplicação deve-se ao facto de reduzir os impactes ambientais negativos decorrentes da utilização de agentes com cloro no processo de branqueamento da pasta (Sun *et al.*, 2010).

A acção do peróxido de hidrogénio em meio alcalino resulta da formação do anião (HOO^-). Este anião ataca preferencialmente os grupos etilenos (CH_2 e C_2H_4) e carbonilos ($\text{C}=\text{O}$) da lenhina actuando principalmente como nucleófilo embora também possa actuar como oxidante (Geng *et al.*, 2003). Para valores mais elevados de pH o anião hidroperóxido (HOO^-) formado pode dar origem a radicais hidroxilo (HO^\cdot) e a radicais do anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), os quais para além de serem responsáveis pela oxidação da estrutura da lenhina (Chen e Dixon; Fang *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2007), são também muito reactivos com os açúcares levando a um aumento da sua solubilização (Gupta, 2009). Este efeito pode ainda ser incrementado com o aumento da temperatura (Sun *et al.*, 2010). A tabela 1.9 apresenta alguns resultados de pré-tratamentos com adição de peróxido de hidrogénio.

Tabela 1.9 - Exemplos de pré-tratamentos alcalinos com peróxido de hidrogénio

Material	Condições de pré-tratamento	Resultados	Referência
Carvalho	160°C, 60min., 3,2% (wt) H_2O_2	HE_S (72h) 97,2%	(Kim e Park, 2001)
Pseudotsuga	1 Fase - Explosão a vapor, a 195°C, 4,5 min., 4,5% (w/w) SO_2 2 Fase - 80°C, pH 11,5, 12h 1% (w/w) H_2O_2	HE_G (48h) (0% H_2O_2) = 40% (1% H_2O_2) > 90%	(Yang <i>et al.</i> , 2002)
Miscanthus	1 Fase - 24h, pH 11,5, 50°C 2 Fase - Água electrolisada em meio alcalino (ALEW), 121°C, 50min	HE_G (72h) 1% H_2O_2 = 40% 4% H_2O_2 = 90%	(Wang <i>et al.</i> , 2010)
Bagaço de cana-de açúcar	60°C, pH 11,5 1% H_2O_2 5% H_2O_2	HE_G (24h) 121,4 mg/g 309,2mg/g	(Rabelo <i>et al.</i> , 2008)
Palha de trigo	35°C, 24h, pH 11,5, 0% (v/v) H_2O_2 2% (v/v) H_2O_2	HE_G (120h) 150mg/g 300 mg/g	(Saha e Cotta, 2006)
Palha de milho	23°C, 24h, 0,125g H_2O_2 /g biomassa 0,500g H_2O_2 /g biomassa	HE_G (48h) 51% 84%	(Banerjee <i>et al.</i> , 2011)

HE_S - Rendimento de açúcares na hidrólise enzimática (tempo decorrido de hidrólise)

HE_G - Rendimento da glucose na hidrólise enzimática

1.3.4 - Outros pré-tratamentos

Os pré-tratamentos físicos definem-se como sendo aqueles que não incluem a aplicação de compostos químicos ou biológicos. Nestes, os pré-tratamentos mais utilizados são a explosão de vapor (SE) e por hidrotermia (Liquid Hot Water - LHW). Na **explosão a vapor (SE)** a biomassa é tratada com vapor saturado a alta pressão existindo posteriormente uma súbita redução da pressão, o que provoca nos materiais lenhocelulósicos uma descompressão explosiva. Neste processo as temperaturas rondam os 160 a 260°C, com uma pressão de 0,69 a 4,83MPa, oscilando o tempo de residência desde alguns segundos até alguns minutos, antes de material ser exposto à pressão atmosférica (Balat, 2011; Kumar *et al.*, 2009; Mosier *et al.*, 2005, Cara *et al.*, 2008). A adição de compostos químicos (catalisadores) como NaOH, H₂O₂, H₂SO₄, SO₂ ou CO₂ limitam a formação de compostos de inibição da hidrólise, uma vez que permitem um abaixamento da temperatura e do tempo de residência do processo (Modenbach e Nokes, 2012; Sun e Cheng, 2003).

Na explosão das fibras com amoníaco (**AFEX**) a biomassa é pré-tratada com altas pressões com amoníaco líquido, com temperaturas compreendidas entre 90 a 100°C e durante aproximadamente 5 minutos. Neste processo o amoníaco pode ser recuperado posteriormente e reciclado para novos tratamentos (Lee *et al.*, 2010; Wyman *et al.*, 2005).

O pré-tratamento com água quente (**LHW**) não requer a aplicação de compostos químicos sendo utilizadas temperaturas de 200 a 230°C durante 15 minutos aproximadamente. Neste pré-tratamento os grupos O-acetilo e os ácidos urónicos libertam-se das hemiceluloses formando-se ácido acético e outros ácidos orgânicos. A libertação destes ácidos catalisa a formação e remoção de oligossacarídeos podendo no entanto ocorrer uma degradação dos açúcares monoméricos libertados das hemiceluloses, especialmente em furfural e 5-HMF, os quais são considerados produtos de inibição para os organismos fermentativos (Mosier *et al.*, 2005; Cara *et al.*, 2007b).

Recentemente começaram-se aplicar novos pré-tratamentos físicos utilizando-se microondas e ultra-sons. A realização de pré-tratamentos com **microondas** é efectuada submergindo a biomassa numa solução com reagentes químicos, como o hidróxido de cálcio, expondo-a posteriormente à radiação por períodos entre 5 a 20 minutos (Keshwani e Cheng, 2010). A utilização de **ultra-sons** como pré-tratamento assenta num processo de libertação de ondas de choque que abrem a superfície dos sólidos ao mesmo tempo que promovem a difusão das enzimas pela superfície do substrato. Adicionalmente existe a vantagem da temperatura óptima deste tipo de pré-tratamentos (50°C) coincidir com a temperatura óptima de muitas enzimas utilizadas na hidrólise enzimática de substratos lenhocelulósicos (Yachemenov *et al.*, 2009).

A utilização de pré-tratamentos com utilização de agentes de oxidação pode ser realizada com peróxido de hidrogénio, com oxidação húmida ou com ozono. A oxidação húmida (**wet oxidation**) é um pré-tratamento oxidativo que utiliza o oxigénio ou o ar como catalisador. Este tipo de pré-tratamentos realiza-se com temperaturas próximas de 200°C, durante cerca de 10 minutos e com pressões de oxigénio em torno de 1,2MPa (Martín *et al.*, 2008). No pré-

tratamento com **ozono** utiliza-se a capacidade oxidante deste reagente para obtenção de taxas de remoção de lenhina elevadas em condições de temperatura ambiente e pressão normal. A sua utilização não conduz à formação de compostos de inibição que possam afectar as etapas de hidrólise ou fermentação. No entanto as elevadas quantidades de ozono requeridas para este tipo de pré-tratamento faz com este processo seja economicamente inviável (Alvira *et al.*, 2010).

Nos pré-tratamentos com **solventes orgânicos** normalmente mistura-se o solvente (etanol, metanol, acetona ou etileno glicol) com catalisadores ácidos (HCl ou H₂SO₄) para quebrar as ligações internas da lenhina e das hemiceluloses. Estes pré-tratamentos possuem a vantagem de solubilizar a lenhina provocando uma solubilização diminuta da celulose, no entanto, o principal obstáculo à implementação deste tipo de pré-tratamentos reside nos custos da reciclagem que deverá ser efectuada dos reagentes, uma vez que estes actuam como inibidores nas etapas de hidrólise enzimática e fermentação (Conde-Mejía *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2009).

Os pré-tratamentos **biológicos** utilizam a capacidade que certos microorganismos possuem para degradar a lenhina e hemiceluloses, conseguindo-se manter a celulose quase intacta devido à sua maior resistência face ao ataque biológico. Neste tipo de pré-tratamentos são utilizados especialmente fungos do tipo bolores brancos (white-rot-fungus). Estes pré-tratamentos apresentam como vantagens um baixo consumo de energia, a ausência de compostos químicos sendo ainda realizados em condições normais de temperatura e pressão. Como grande desvantagem são extremamente demorados sendo normalmente utilizadas 4 a 6 semanas de pré-tratamento (Tabil *et al.*, 2011; Taherzadeh e Karimi, 2008).

1.4 - Hidrólise enzimática

A estrutura e configuração da parede celular na biomassa foi concebida pela natureza de modo a tornar extremamente difícil a decomposição da celulose e hemicelulose. As diferentes arquitecturas das paredes celulares requerem a existência de uma variedade de enzimas para a sua degradação (Gupta, 2008).

A hidrólise da celulose nos materiais lenhocelulósicos requiere a aplicação de três componentes enzimáticos: as Endoglucanases, as Exoglucanases e as β -glucosidases. A hidrólise enzimática da celulose pode ser dividida em três etapas sendo cada componente enzimático responsável por uma etapa, como demonstrado na representação a seguir:

- Etapa 1

Celulose nativa \rightarrow (endoglucanase) \rightarrow Celulose activa

- Etapa 2

Celulose activa \rightarrow (exoglucanase) \rightarrow Celobiose

- Etapa 3

Celobiose \rightarrow (β -glucosidase) \rightarrow Glucose

Durante o ataque enzimático as Endoglucanases (EC 3.2.1.4), mais especificamente as endo-1,4- β -D-glucanases (EG), actuam preferencialmente nas regiões amorfas da celulose quebrando aleatoriamente as ligações β -1,4 da cadeia glicosídica formando como produto, moléculas de celulose com menor grau de polimerização (DP). Na sua actuação as Endoglucanases expõem as microfibrilas ao ataque subsequente de outras enzimas, além de aumentarem o número de oligossacarídeos com terminações susceptíveis ao ataque das exoglucanases. O peso molecular destas enzimas oscila entre 30 e 55KDa.

As exoglucanases (EC 3.2.1.91), designadas mais especificamente por exo-1,4- β -D-glucanases ou celobiohidrolases (CBH), actuam movendo-se progressivamente a partir das extremidades da cadeia de celulose libertando como produto da sua acção a celobiose. O peso molecular destas enzimas oscila entre 41 e 85KDa.

Finalmente, as β -glucosidases (EC 3.2.1.21) ou mais especificamente 1,4- β -D-glucosidases hidrolisam a celobiose e celo-oligossacarídeos nas extremidades não redutores da celobiose formando glucose como produto. As β -glucosidases possuem um peso molecular compreendido entre 41 e 170KDa (Gupta, 2008; Jørgensen *et al.*, 2007). A figura 1.26 apresenta esquematicamente o mecanismo de acção destes três tipos de enzimas.

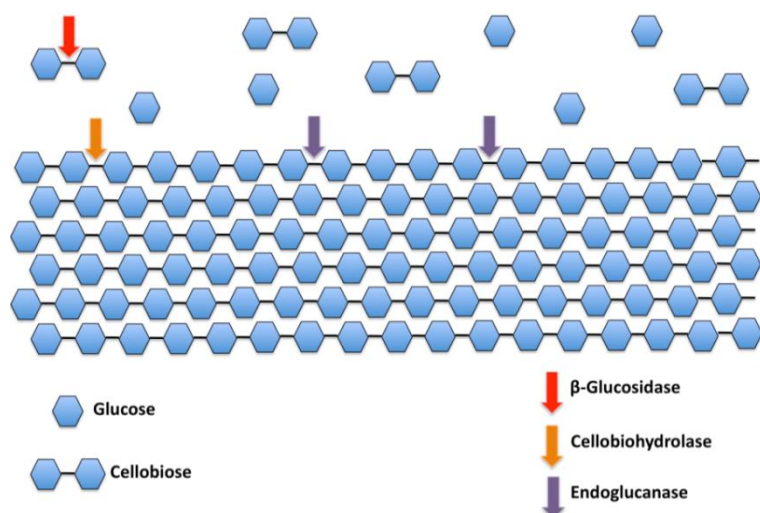


Figura 1.26 - Representação esquemática do ataque enzimática à celulose (Souza, 2013)

A hidrólise das hemiceluloses devido à sua heterogeneidade, com diferentes esqueletos e grupos laterais, requer sistemas enzimáticos ainda mais complexos. Nas hemiceluloses com um esqueleto de xilose actuam preferencialmente as endo-1,4- β -D-xylanases (EC 3.2.1.8) as quais quebram preferencialmente as ligações internas do xilano e as 4- β -D-xylosidases (EC 3.2.1.37) que atacam os xilo-oligossacarídeos a partir da extremidade não redutora libertando xilose como produto final. Para além destes complexos que actuam na cadeia principal existem também um conjunto de enzimas que actuam sobre os grupos laterais, como as acetil-xilano-esterases (EC 3.1.1.72) ou as α -l-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) (Jørgensen *et al.*, 2007).

A acção inibitória das enzimas pode ser reduzida ou atenuada através da adição de agentes de superfície (Börjesson *et al.*, 2007). Embora a utilização de um aditivo apresente um custo adicional ao processo de produção de bioetanol, a redução da ligação não produtiva da enzima à lenhina fará reduzir a carga de enzimas necessária reduzindo desse forma os custos globais do processo. Em materiais lenhocelulósicos, os primeiros ensaios de aplicação de agentes de superfície foram realizados com a aplicação de materiais tensioactivos tendo sido verificados aumentos consideráveis na eficiência da hidrólise enzimática (Eriksson *et al.*, 2002; Ballesteros *et al.*, 1998; Kumar e Wyman, 2009; Hui, 2011). No entanto, nos últimos anos surgiram novos agentes de superfície na realização de hidrólises enzimáticas, como proteínas, sendo a albumina de soro bovino (BSA) uma das mais utilizadas (Yang e Wyman, 2006; Lavenson *et al.*, 2011) ou polímeros como o polietileno glicol (PEG) (Börjesson *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009; Ouyang *et al.*, 2010; Sipos *et al.*, 2010). O mecanismo do efeito destes compostos verifica-se em 3 níveis:

1 - Na estabilidade enzimática impedindo a desactivação térmica

Wang e colaboradores utilizando BSA chegaram à conclusão que este aditivo protegia as enzimas de desactivação térmica, aumentando a sua estabilidade, especialmente em condições de temperaturas elevadas (Wang *et al.*, 2013). Este efeito resulta da redução do contacto da enzima com o interface ar-líquido criado pela aplicação do agente de superfície (Eriksson *et al.*, 2002).

2 - Na relação enzima substrato

Park e colaboradores estudaram a perda de actividade enzimática das celulasas pela adsorção à superfície da celulose. Esta adsorção faz com que a enzima fique agarrada ao substrato, não se conseguindo libertar, ficando assim impedida de continuar o seu processo de hidrólise molecular. A adição de polioxietileno glicol (POG), um composto tensioactivo, mostrou ser eficaz no impedimento da adsorção das enzimas por parte da superfície da celulose. A aplicação deste composto contrariou a redução da actividade enzimática durante o processo de hidrólise, impedindo a inactivação causada pelo substrato, desempenhando ainda um papel também fundamental na recuperação de enzimas (Park *et al.*, 1992).

3 - Na inactivação das enzimas pela lenhina

A lenhina é o principal composto responsável pela inactivação das enzimas. O mecanismo de inactivação assenta na adsorção das enzimas nas porções hidrofóbicas da lenhina. As enzimas ficam “presas” nestes locais ficando consideradas como “não produtivas”. Os compostos tensioactivos possuem uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica. A parte hidrofóbica liga-se à lenhina, a parte hidrofílica fica voltada para a solução aquosa causando uma repulsão estérica das enzimas que se aproximem da superfície da lenhina (Kristensen *et al.*, 2007).

Na figura 1.29 podemos observar o efeito da BSA na obstrução da ligação das enzimas à lenhina

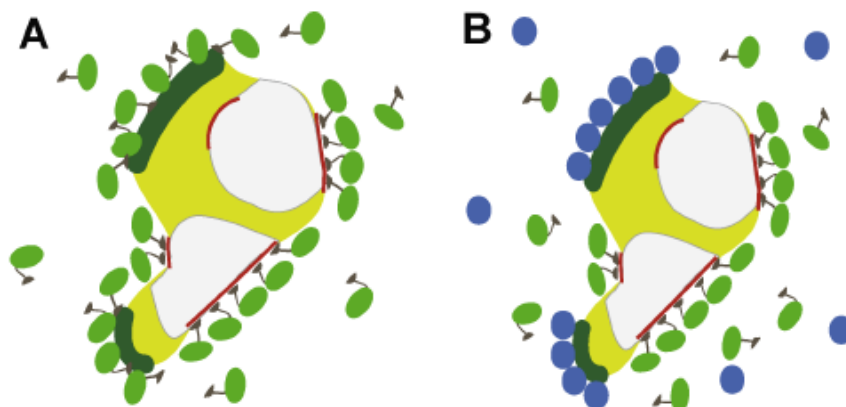


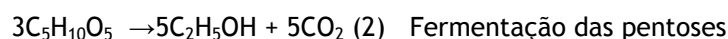
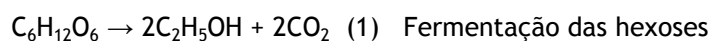
Figura 1.29 - Hidrólise enzimática sem BSA (A) e com BSA (B) (Rollin, et al., 2011)

Enzimas BSA Lenhina Hemicelulose Celulose

O grau de acção dos compostos tensioactivos também se encontra intimamente relacionado com o tipo de pré-tratamento a que a biomassa foi sujeita. Kristensen e colaboradores observaram com palha de trigo, que em pré-tratamentos com ácido, a conversão de açúcares durante a hidrólise enzimática melhorava “drasticamente” com a aplicação de compostos tensioactivos. Essa melhoria não era no entanto verificada com outros tipos de pré-tratamento, mesmo que o teor de lenhina do pré-tratado e a quantidade de composto tensioactivo aplicado durante a hidrólise enzimática fosse a mesma (Kristensen *et al.*, 2007).

1.5 - Fermentação

A fermentação pode ser realizada utilizando conjunto variado de organismos como, bactérias, leveduras ou fungos, os quais transformam os açúcares em etanol, num ambiente com ausência de oxigénio (Hamelinck *et al.*, 2005). Segundo a estequiometria das equações (1) e (2) a produção máxima teórica é de 0,51kg de etanol e 0,49kg de dióxido de carbono, por quilograma de açúcar consumido.



Um dos principais organismos utilizados no processo de fermentação alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae*. Este organismo possui uma elevada produtividade de etanol sendo muito tolerante para concentrações elevadas de etanol e de compostos de inibição. No entanto, a estirpe selvagem não possui capacidade para fermentar as pentoses, como a xilose (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). Para ultrapassar esta limitação começaram a utilizar-se microorganismos com capacidade de fermentar simultaneamente hexoses (C_6) e pentoses (C_5) como a *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolan tannophilus* (Chandel *et al.*, 2007).

Outra abordagem consiste em alterar geneticamente a *Saccharomyces cerevisiae* introduzindo-lhe a xilose reductase e a xitol desidrogenase (Tomás-pejó *et al.*, 2008). A tabela 1.10 apresenta as potencialidades e as fraquezas de alguns microorganismos utilizados no processo fermentativo.

Tabela 1.10 - Potencialidades e as fraquezas de alguns microorganismos utilizados no processo fermentativos (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007)

Microorganismo	Utilização de açúcares					Produtos		Tolerância		Meio	
	Glu	Xil	Gal	Man	Ara	EtOH	Outros	Álcool	Ácido	O ₂	pH
Bactérias anaeróbias	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Neutro
E. coli	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	Neutro
Z. mobilis	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Neutro
S. cerevisiae	+	+	+	-	-	+	-	++	++	-	Ácido
P. stipitis	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	Ácido
Fungos filamentosos	+	+	+	+	+	+	-	++	++	-	Ácido

1.6 - Conversão de biomassa em etanol: integração de processos

A hidrólise e a fermentação podem ser integradas de modo a eliminar a acumulação de açúcares que inibem as enzimas impedindo a obtenção de elevadas produções de etanol. Os processos podem ser integrados, como se pode observar na figura 1.30, sob quatro diferentes combinações: hidrólise e fermentação separadas ou sequenciais (SHF), sacarificação e fermentação simultânea (SSF), sacarificação e co-fermentação simultânea (SSCF) e bioprocessamento consolidado (CBP)

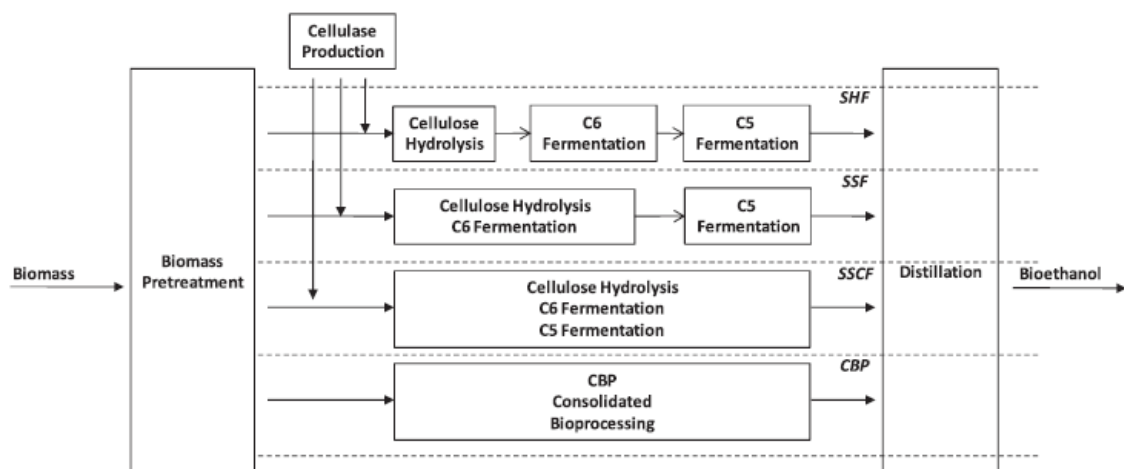


Figura 1.30 - Integração das várias etapas no processo de produção de etanol celulósico (Chiaramonti *et al.*, 2012)

Hidrólise e fermentação em separado ou sequencial (Separate Hydrolysis and Fermentation SHF) - nesta combinação os processos de hidrólise enzimática, de fermentação das hexoses e de fermentação das pentoses são realizados separadamente, com a utilização de diferentes reactores para cada uma das etapas. Consegue-se assim uma optimização das condições de operação para cada um dos processos. A hidrólise enzimática pode ser realizada num intervalo óptimo de temperatura compreendido entre 45 e 50°C e a fermentação com temperaturas em torno dos 30°C. Na combinação SHF o líquido resultante da hidrólise enzimática entra em primeiro lugar num reactor de fermentação de hexoses. Neste reactor ocorre uma primeira destilação do etanol. As pentoses não são fermentadas neste primeiro reactor sendo encaminhadas, no final da fermentação das hexoses, para um segundo reactor, no qual, organismos fermentativos das pentoses são acomodados num meio com valores ajustados de temperatura e pH. Uma das desvantagens do processo SHF reside na inibição das enzimas pelo produto da reacção, glucose e celobiose, na hidrólise enzimática. Para limitar esta inibição é necessário utilizar baixas concentrações de sólidos e altas cargas enzimáticas, conduzindo estes requisitos à obtenção de baixas concentrações de etanol. Estas condicionantes tornam o processo SHF com custos elevados no processo de fermentação e na recuperação do etanol (Hamelinck *et al.*, 2005).

Sacarificação e Fermentação Simultânea (Simultaneous Saccharification and Fermentation - SSF) nesta combinação de processos a hidrólise das hexoses e respectiva fermentação são realizadas no mesmo reactor, sendo realizada a fermentação das pentoses posteriormente e num reactor à parte. A glucose que vai sendo gerado no processo de hidrólise enzimática é consumida imediatamente pelos microorganismos que a convertem em etanol. Assim, os baixos níveis de glucose e celobiose têm como consequência uma redução substancial da inibição enzimática podendo-se nesta combinação utilizar-se uma carga enzimática mais baixa. A presença de etanol durante a hidrólise reduz também as probabilidades de contaminação reduzindo a possibilidade de invasão de microorganismos não desejáveis. Devido às diferentes temperaturas óptimas de hidrólise e fermentação é aconselhável a utilização de microorganismos termotolerantes (37-38°C). Como desvantagem nesta combinação é verificada uma taxa de conversão enzimática mais baixa, uma vez que a temperatura tem de baixar do grau óptimo 45-50°C para 38°C (Chandel *et al.*, 2007).

Sacarificação e Co- Fermentação Simultânea (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation - SSCF) nesta combinação integra-se a fermentação das pentoses no mesmo reactor que realiza a hidrólise enzimática e a fermentação das hexoses. Este processo reduz o número de reactores e a inibição pelos produtos de reacção enzimática glucose, celobiose e xilose. Esta combinação tem sido testada ultimamente em numerosos estudos que apontam uma redução de custos e uma base económica para a sustentabilidade de produção de etanol a partir de material lenhocelulósico (Hickert *et al.*, 2013; Olofsson *et al.*, 2010; Suriyachai *et al.*, 2013) mas outros investigadores identificam a baixa temperatura do processo (30°C) e a

inibição pelo etanol como os principais factores limitantes ao seu desenvolvimento (Jin *et al.*, 2012).

Conversão Microbiana Directa (Consolidated BioProcessing - **CBP**) Esta via necessita de ser realizada dentro de um organismo capaz de realizar simultaneamente os quatro processos requeridos: produção de enzimas, hidrólise, fermentação de hexoses e fermentação de pentoses. A produção de enzimas pelo microorganismo faria reduzir significativamente o custo do processo, no entanto até ao presente ainda não foi encontrado um organismo suficientemente robusto que aliasse uma elevada produção de enzimas a uma elevada produção de etanol. Neste processo os microorganismos geram uma quantidade significativa de subprodutos, não desejados, que fazem baixar ainda mais a produção de etanol. No entanto dos microorganismos que apresentam potencial para poderem ser utilizados na produção de etanol por CBP destacamos a *E. coli* MG1655 Δ fadE, a *E. coli* DH1 Δ adhE, o *Bacillus coagulans*, o *Clostridium thermocellum*, o *Trametes hirsute* (*bolores brancos*) e o *Fusarium oxysporum* (Hasunuma *et al.*, 2012).

1.7 - Processos industriais de produção de etanol celulósico

A maioria dos processos industriais de produção de etanol celulósico, como podemos ver pela observação da figura 1.31 concentra-se nos Estados Unidos da América (EUA). Neste país em 2013 estavam em operação, de acordo com o relatório da (AEC, 2013), um total de 8 unidades comerciais, estando a ser construídas ou a aguardar licenciamento outras 8 unidades. Para além destas unidades contavam-se ainda, naquele país, um total de 10 unidades experimentais, utilizadas para investigação, demonstração ou como unidades piloto. Para além dos EUA possuem unidades comerciais de produção de etanol celulósico a Itália, com uma unidade em Crescintino e o Brasil com uma unidade em São Paulo. Dos restantes países, apenas a Dinamarca e o Canada prevêm construir nos próximos anos unidades comerciais de produção de etanol celulósico.

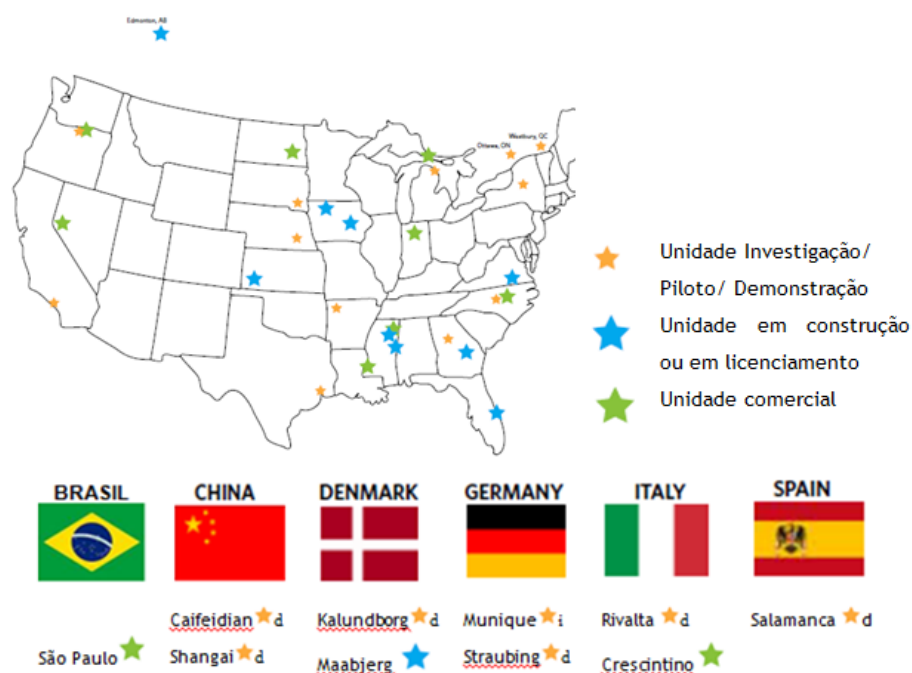


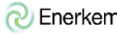









Figura 1.32 - Unidades de produção de etanol celulósico (AEC, 2013)

De acordo com os dados fornecidos pela AEC e sem contar com a produção na unidade brasileira, a produção de etanol celulósico em 2013 atingiu cerca de 296 Milhões de litros. Até 2016 espera-se, com a entrada de 10 novas unidades, que a produção atinja cerca de 1028 milhões de litros de etanol celulósico, ou seja, um aumento em 3 anos de 347%. A tabela 1.11 apresenta as empresas com unidades, construídas ou previstas de entrar em funcionamento até 2016, de produção comercial de etanol celulósico. A produção esperada de etanol celulósico em 2016 será obtida em 37,0% a partir da conversão de resíduos agrícolas (palhas e forragens) e em 35,3% a partir da conversão de resíduos florestais. A produção de etanol celulósico a partir da conversão de resíduos sólidos urbanos representará cerca de 12,9%. A utilização na mesma unidade de resíduos agrícolas e florestais no mesmo processo de conversão apenas representará cerca de 7,4%. Este peso será também o verificado para a produção de etanol celulósico a partir de culturas dedicadas.

Tabela 1.11 - Empresas com unidades construídas ou previstas de entrar em funcionamento até 2016 de produção comercial de etanol celulósico (AEC, 2013)

Empresa	Localização e produção (ML/ano)		Tipo de Biomassa	Início operação
	Hugoton (EUA)	★	95 Palha de trigo e forragem de milho	Out.2013
	Crescintino (Itália)		76 Palhas, forragem de milho, choupo e Arundo Donax	Out. 2012
	Fulton (USA)	★	72 Resíduos florestais	2014
	Edmonton (Canada)	★	38 RSU	2013
	Lawrenceville (USA)		4 Resíduos sólidos urbanos e culturas energéticas	2012
	Blairstown (USA)		23 RSU e resíduos não alimentares	2013
	McCarran (USA)	★	38 RSU	2014
	Maabjerg (DK)	★	76 Palha de trigo	Jan. 2016
	Spiritwood (USA)	★	38 Palha de trigo	2012
	Vero Beach (USA)		30 RSU e resíduos agrícolas	2012
	Piracaiba (Brasil)	★	- Bagaço de cana-de-açúcar	2012
	Columbus (USA)		49 Resíduos florestais	2012
	Natchez (USA)	★	151 Resíduos florestais	2014
	Soperton(USA)	★	15 Resíduos florestais	2014
	Kinross(USA)	★	76 Madeira florestal	2015
	Emmetsburg (USA)	★	76 Forragem de milho	Out. 2013
	Boardman (USA)	★	95 Palha de trigo e choupo	2015
BRP	Sampson (USA)	★	76 Culturas dedicadas	2012

.

Capítulo 2 - Metodologia

Metodologia

Os métodos analíticos seguidos neste trabalho encontram-se descritos de seguida. Todas as alterações aos métodos são devidamente referidos, assim como os principais equipamentos utilizados. Os métodos analíticos utilizados na caracterização química das espécies vegetais encontram-se normalizados. Todos os ensaios laboratoriais foram realizados em duplicado ou triplicado de acordo com o normalizado para o ensaio. O diagrama 2.1 apresenta sinteticamente a metodologia utilizada na análise dos pré-tratamentos.

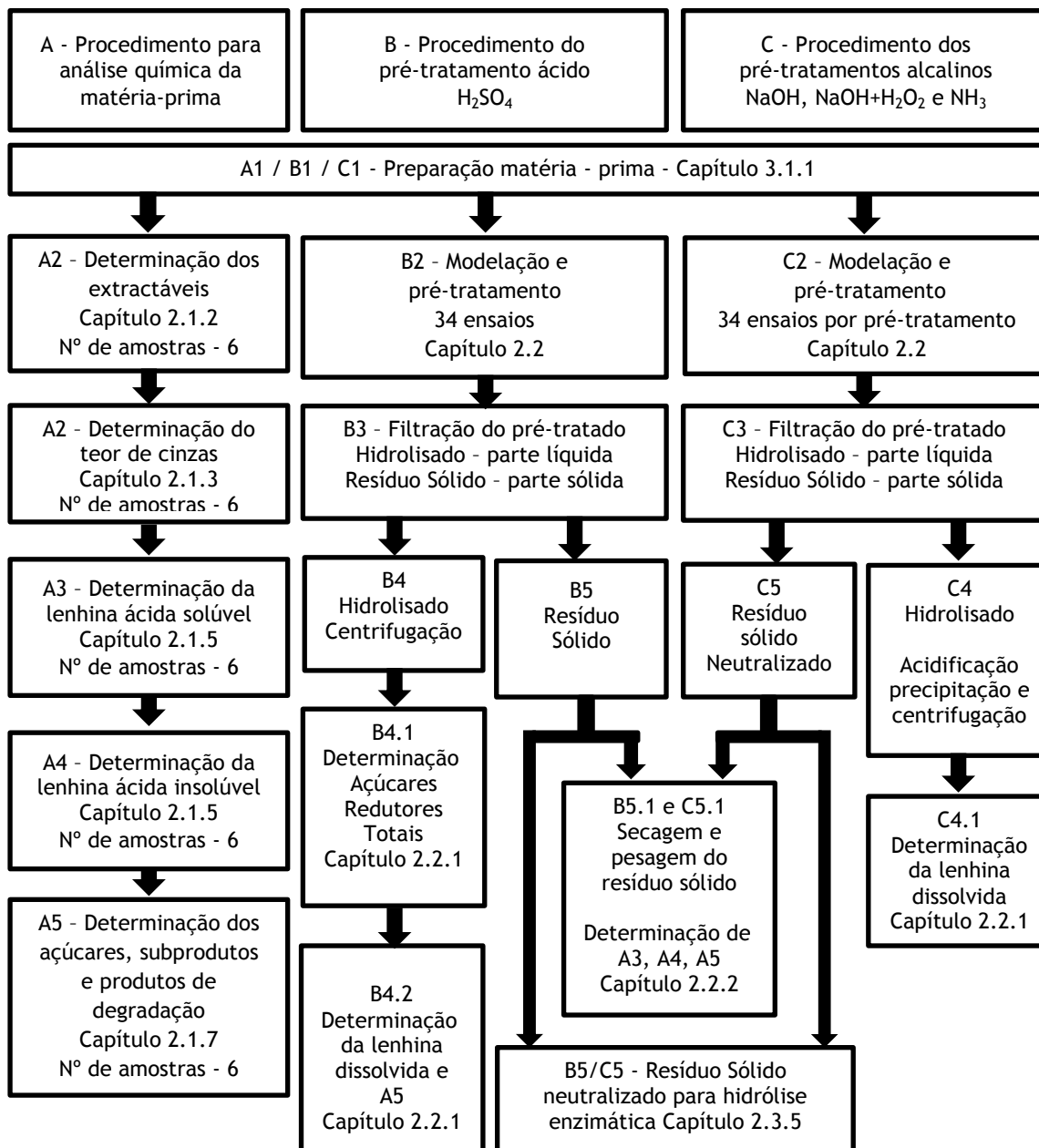


Diagrama 2.1 - Metodologia utilizada na análise dos pré-tratamentos

2.1 - Métodos analíticos

2.1.1 - Materiais e reagentes

Na realização dos ensaios experimentais utilizou-se diverso material de laboratório, desde material corrente de vidro (pipetas, provetas, copos de precipitação, tubos de ensaio, balões de fundo redondo, extractores soxhlet entre outros), bem como material eléctrico (mantas de aquecimento, placas de agitação, etc.). Os equipamentos utilizados especificamente em cada método analítico encontram-se descritos no mesmo. Os reagentes utilizados neste trabalho encontram-se descritos na Tabela 2.1 de forma a facilitar a apresentação e interpretação

Tabela 2.1 - Reagentes utilizados durante os ensaios experimentais

Reagente	Descrição
4-Nitrofenil β-D-glucopiranosido (p-NPG)	(C ₁₂ H ₁₅ NO ₈ , Merck, CAS n° 2492-87-7)
5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF)	(C ₆ H ₆ O ₃ , Sigma-Aldrich, n°67-47-0)
Ácido acético	(C ₂ H ₄ O ₂ , Panreac, n°64-19-7)
Ácido cítrico	(C ₆ H ₇ O ₇ .H ₂ O, Pronalab, CAS n° 9014-63-5)
Ácido 3,5 - dinitrossalicílico - DNS	(C ₇ H ₄ N ₂ O ₇ , Sigma-Aldrich, CAS n°: 609-99-4)
Ácido fórmico	(CH ₂ O ₂ , Sigma-Aldrich, n°64-18-6)
Ácido sulfúrico	(H ₂ SO ₄ , Sigma-Aldrich, CAS n° 7664-93-9)
Amoníaco	(NH ₄ OH, José M. Vaz Pereira, CAS n° 1336-21-6)
Carbonato de cálcio	(CaCO ₃ , José M. Vaz Pereira, CAS n°471-34-1)
B - glucosidases	NS50010 e NS22118 - Novozymes®
Celulases	NS50012 e NS22086 - Novozymes®
Citrato de sódio	(C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O, Merck, CAS n° 6132-04-3)
D(+) Galactose	(C ₆ H ₁₂ O ₆ , Merck, 59-23-4)
D(+) Glucose (Monohidratada)	(C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O, Merck, 14431-43-7)
D(+) Manose	(C ₆ H ₁₂ O ₆ , Merck, 3458-28-4)
D(+) Xilose	(C ₅ H ₁₀ O ₅ , Merck, 58-86-6)
Etanol	(CH ₃ CH ₂ OH, Sigma-Aldrich, CAS n°64-17-5)
Furfural	(C ₅ H ₄ O ₂ , Sigma-Aldrich, n°98-01-1)
Glicina	(C ₂ H ₅ NO ₂ , Merck, CAS n° 56-40-6)
Hidróxido de sódio	(NaOH, Sigma-Aldrich, CAS n° 1310-73-2)
L(+) Arabinose	(C ₅ H ₁₀ O ₅ , Merck, 87-72-9)
Azida de sódio	(NaN ₃ , Riedel, CAS n° 26628-22-8)
p-nitrofenol	(C ₆ H ₅ NO ₃ , Merck, CAS n° 100-02-7)
Peróxido de hidrogénio	(H ₂ O ₂ , Merck, CAS n° 8007-30-5)
Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado	(KNaC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O, Sigma-Aldrich, n°6381-59-5)
Polietilenoglicol4000 (PEG4000)	(HO(C ₂ H ₄ O) _n H, Merck, CAS n° 25322-68-3)
Albumina do soro bovino (BSA)	(Polipeptídeo, Sigma-Aldrich, CAS n° 9048-46-8)
Tolueno	(C ₆ H ₅ CH ₃ , Sigma-Aldrich, CAS n°: 108-88-3)
Xilanases	NS22036 e NS22083 - Novozymes®
Xilano	(C ₅ H ₁₀ O ₅ , Sigma,9014-63-5)

2.1.2 - Preparação da matéria-prima

A matéria-prima utilizada foi recolhida após a poda do olival sendo formada por pequenos ramos (diâmetro inferior a 4cm) e folhas. No terreno procedeu-se ao seu destroçamento num triturador (TUV Rheinland Viking KE-3423) de forma a diminuir o volume a transportar. Uma vez no laboratório este material foi sujeito a secagem ao ar livre.

A preparação da matéria-prima para análise da sua composição foi efectuada de acordo com a norma NREL/TP-510-42620 (Preparation of Samples for Compositional Analysis)(Hames *et al.*, 2005) que estabelece um tamanho para a fracção de material a analisar entre 0,180 e 0,500mm. Para este efeito a matéria-prima foi moída num moinho de lâminas (Retch Mühle - West Germany) e posteriormente crivada tendo-se utilizado os crivos 0,180mm (80mesh) e 0,500 (35mesh) conformes com as especificações da American Society for Testing and Materials (ASTM).

2.1.3 - Extractáveis

A determinação do teor de extractáveis foi realizada segundo a norma Tappi 204 om-88 (Sithole *et al.*, 1991). Cada amostra foi colocada num cartucho de extracção e este no respectivo soxhlet, ao qual foi acoplado um balão de fundo redondo com uma solução de etanol e tolueno numa proporção de 1:2 (v/v). A amostra foi então extraída durante pelo menos 24 ciclos de extracção. A quantidade extraída foi quantificada após evaporação do solvente e secagem do resíduo a $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$. A equação 2.1 expressa a percentagem de extractáveis relativamente ao peso da amostra completamente seca (Oven Dry Weight - ODW)

$$\text{Eq. 2.1 } \% \text{ Extractáveis} = \frac{(\text{Peso}_{\text{balão com extractáveis}} - \text{Peso}_{\text{balão}})}{\text{ODW}} \times 100$$

Em todas as amostras utilizadas para as restantes análises foram retirados previamente os extractáveis, de modo a que estes não interferissem nos processos analíticos (Sluiter *et al.*, 2005a).

2.1.4 - Cinzas

O conteúdo em cinzas é a quantificação dos sais minerais e outros materiais inorgânicos contidos numa amostra de biomassa. O teor de cinzas é dado pelo peso do resíduo que resulta da combustão completa da amostra. A determinação das cinzas foi realizada de acordo com a norma NREL/TP-510-42622 (Determination of Ash in Biomass) (Sluiter *et al.*, 2005b) sendo a incineração realizada, em Mufla, à temperatura de $525 \pm 25^{\circ}\text{C}$. O resultado, equação 2.2, é expresso em percentagem relativa ao peso da amostra completamente seca.

$$\text{Eq. 2.2 } \% \text{ Cinza} = \frac{(\text{Peso}_{\text{cadinho com cinzas}} - \text{Peso}_{\text{cadinho}})}{\text{ODW}} \times 100$$

2.1.5 - Lenhina

A determinação dos teores de lenhina insolúvel e solúvel foi efectuada segundo a norma NREL/TP-510-42618 (Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass) (Sluiter *et al.*, 2008a) sendo requerida para sua aplicação, amostras livres de extractáveis.

No seu procedimento foi realizada uma hidrólise ácida dividida em duas etapas, para fraccionar a biomassa, em formas estruturais que possam ser facilmente quantificadas. Pesou-se para cada frasco o correspondente a 300mg de amostra completamente seca. Adicionou-se depois a cada um dos frascos 3ml de ácido sulfúrico diluído a 72%. Os frascos foram em seguida incubados num banho-maria a 30±3°C durante 60±5 minutos. Após 60 minutos os frascos foram retirados do banho e adicionou-se 84±4ml de água destilada, de modo a diluir o ácido para 4%. Os frascos foram depois agitados e colocados em autoclave (Tuttnauer 2540ML) a 121°C durante 60 minutos. No final deste período foram retirados procedendo-se à filtração do seu conteúdo em cadinhos filtrantes com recurso a bomba de vácuo (Pfeiffer Balzers).

Antes deste procedimento os cadinhos filtrantes foram calcinados na mufla (Vulcan,3-550) a 575±25°C durante 4 horas e arrefecidos num excicador durante pelo menos 1 hora, de forma a determinar-se a sua tara com um erro máximo de 0,1mg.

O filtrado obtido foi guardado, em tubos de 50ml para determinação posterior da lenhina ácida solúvel, bem como de açúcares e produtos de degradação. O resíduo insolúvel ácido retido no cadinho filtrante foi seco em estufa a 105±3°C até atingir peso constante. Os cadinhos filtrantes com o resíduo insolúvel ácido foram retirados para um excicador e pesados. De seguida voltavam para a estufa durante mais 1 hora sendo no final deste período novamente retirados para o excicador e pesados. A secagem do material terminava quando o peso registado entre duas pesagens sucessivas apresentasse uma diferença inferior a 0,1mg.

Para determinação das cinzas da lenhina ácida insolúvel, os cadinhos com o resíduo sólido foram colocados na mufla a 575±25°C durante 24±6 horas tendo-se utilizado a rampa de aquecimento recomendada pela norma. No final deste período colocaram-se os cadinhos calcinados num excicador para arrefecerem tendo sido depois pesados com um erro máximo de 0,1mg.

A lenhina ácida insolúvel (Acid-Insoluble Lignin - AIL) corresponde à fracção sólida resultante deste procedimento. O resultado foi expresso em percentagem relativa à massa de amostra completamente seca conforme se apresenta na equação 2.3.

$$\text{Eq. 2.3} \quad \% \text{ AIL} = \frac{(\text{Peso}_{\text{cadinho com AIL}} - \text{Peso}_{\text{cadinho}}) - (\text{Peso}_{\text{cadinho com cinzas}} - \text{Peso}_{\text{cadinho}})}{\text{ODW}} \times 100$$

A lenhina ácida solúvel (Acid-Soluble Lignin - ASL) encontra-se presente na fracção líquida sendo a sua determinação realizada através de leituras de absorvância, no comprimento de onda apropriado (240nm), tendo-se utilizado para tal o espectrofotómetro de absorção molecular UV/Vis (THERMO (spectronic) Electron - hélios gama).

As absorvâncias foram lidas nos 240nm devido ao facto de termos considerado, para definição da constante de absorvidade ($\epsilon = 25 \text{ L/g cm}$), os resíduos das podas do olival como semelhantes aos do *Populus deltoides* NIST SRM8492, dado que são ambas folhosas, tendo em conta a tabela de absorvidade da referida norma.

A determinação da lenhina ácida solúvel foi realizada logo após a obtenção do filtrado tendo-se diluído as amostras de modo a que os valores de absorvância estivessem compreendidos entre 0,700 e 1,000. Como branco utilizou-se água destilada. Todas as amostras foram lidas em triplicado e registado o seu valor até à milésima. A determinação da lenhina ácida solúvel foi realizada de acordo com a equação 2.4.

$$\text{Eq.2.4} \quad \% \text{ ASL} = \frac{UV_{abs} \times Volume_{filtrado} \times Diluição}{\epsilon \times ODW} \times 100$$

Onde:

UV_{abs} = média de absorvância para a amostra a 240nm

ϵ = constante de absorvidade

ODW = peso da amostra completamente seca (oven-dry weight)

2.1.6 - Açúcares redutores totais

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

O reagente DNS resulta da mistura de duas soluções. Preparou-se uma solução A de 10 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) em 200 ml de uma solução de hidróxido de sódio 2mol/dm^3 . Preparou-se uma solução B de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado em 500 ml de água destilada. Dissolveu-se o DNS na solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 80°C. O tartarato de sódio e potássio foi dissolvido na água destilada à mesma temperatura (80°C). Misturaram-se as duas soluções, à temperatura referida, e homogeneizou-se imediatamente. Depois da solução fria, completou-se o volume a 1000ml, com água destilada. Guardou-se o reagente ao abrigo da luz (Bezerra, 1995; Gil, 2008). No trabalho desenvolvido aplicou-se este método na análise dos açúcares presentes no hidrolisado resultante do pré-tratamento com ácido sulfúrico e na quantificação dos açúcares libertados durante a hidrólise enzimática.

2.1.7 - Açúcares e produtos de degradação

Para a determinação dos açúcares e produtos de degradação utilizou-se um aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC). Para a sua análise utilizaram-se duas colunas distintas, a Aminex-87P (Bio-Rad, Hercules, CA) para determinação dos hidratos de carbono estruturais, como a glucose, xilose, galactose, arabinose e manose de acordo com o expresso na norma NREL/TP-510-42618 - Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass (Sluiter *et al.*, 2008a), e a coluna Aminex-

87H (Bio-Rad, Hercules, CA) para determinação de produtos de degradação, como o ácido acético, ácido fórmico, hidroximetilfurfural (HMF) e furfural seguindo o procedimento laboratorial constante na norma NREL/TP-510-42623 - Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples (Sluiter *et al.*, 2008b).

A injeção na coluna Aminex HPX-87P dos hidrolisados, resultantes da dupla hidrólise ácida contendo os açúcares, requiere previamente a correcção do pH dos hidrolisados para valores compreendidos entre 5 e 6, bem como a sua filtração a 0,22µm. O eluente utilizado foi água bi-destilada, com um caudal de 0,6ml/min, tendo sido utilizada uma temperatura na coluna de 80°C. A detecção dos compostos foi executada pelo detector de refração (Refractive index detector - RID) e pelo detector UV-Vis a 280nm.

Para determinação de açúcares e produtos de degradação na coluna Aminex HPX-87H os hidrolisados, resultantes da dupla hidrólise ácida, não necessitam de neutralização sendo contudo, também filtrados a 0,22µm antes de cada injeção. O eluente utilizado foi uma solução de ácido sulfúrico 0,005M (278µl/L), com um caudal de 0,5ml/min. A temperatura da coluna foi de 65°C tendo sido a detecção realizada pelos detectores RID e UV-Vis a 280nm.

Para a determinação dos compostos foi utilizada uma curva de calibração realizada a partir de soluções padrão de glucose, xilose, galactose, arabinose, manose, ácido acético, ácido fórmico, HMF e Furfural (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Concentrações utilizadas para calibração de açúcares e produtos de degradação

Composto	C ₁ (mg/L)	C ₂ (mg/L)	C ₃ (mg/L)	C ₄ (mg/L)	C ₅ (mg/L)	Equação de calibração	R ²
D(+)glucose	1000	2000	4000	8000	16000	y = 2,7459x	0,999
D(+)xylose	1000	2000	4000	8000	16000	y = 3,3408x	0,999
L(+)arabinose	1000	2000	4000	8000	16000	y = 3,2395x	0,999
Ácido acético	200	300	600	800	1400	y = 1,5593x	0,999
Ácido fórmico	500	1000	2000	4000	8000	y = 1,0285x	0,999
HMF	100	150	300	400	700	y = 630,9662x	0,988
Furfural	100	150	300	400	700	y = 802,0565x	0,999

Na análise química dos açúcares presentes na matéria-prima, a coluna Aminex HPX-87P não detectou a presença de galactose e manose. Assim, e tendo em conta que a coluna Aminex HPX-87H mostrou ser capaz de, para além dos produtos de degradação considerados, também detectar e quantificar a glucose, xilose e arabinose, entendemos não ser necessária a utilização da coluna Aminex HPX-87P nas análises posteriores, efectuando a separação e identificação dos compostos só com uma coluna com a consequente economia de tempo.

2.2 - Pré-Tratamentos

No trabalho desenvolvido foram testados 4 tipos de pré-tratamentos: ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, hidróxido de sódio com adição de peróxido de hidrogénio e amoníaco.

A modelação dos pré-tratamentos foi realizada com recurso ao programa informático Design Expert 7 Trial Version (Stat-Ease inc. Minneapolis), recorrendo à Metodologia de Superfície de Resposta com um Central Composite Design. Em cada pré-tratamento foram testadas um conjunto de 15 condições de ensaio, com 6 repetições no ponto central e duplicação nos restantes pontos, totalizando um total de 34 ensaios.

Os pré-tratamentos foram levados a cabo num banho termoestatizado de PEG400 [Figura 2.1(a)] no qual foram imersos mini-reactores de aço inoxidável de 200ml [Figura 2.1(b)] dentro dos quais se efectuava o pré-tratamento. O teor de matéria seca (TMS) foi previamente determinado, em balança térmica (Mettler LJ16 Moisture Analyzer), em todas as amostras sujeitas a pré-tratamento [Figura 2.1(c)] para que no reactor fossem sempre colocadas 10g de amostra completamente seca.

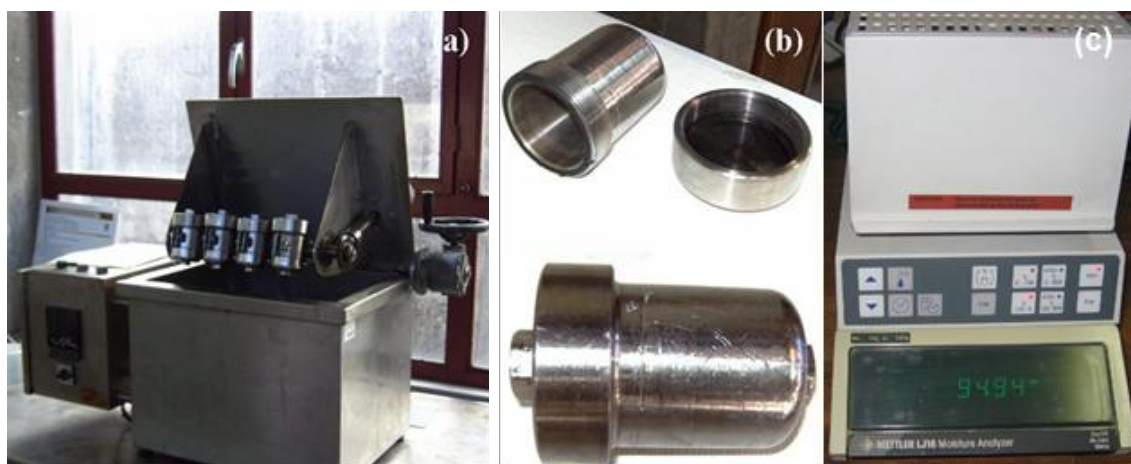


Figura 2.1 - Banho termostatzado de PEG 400 (a), reactores de aço inox de 200 mL (b) e determinação do teor de matéria seca do material (c)

A adição do reagente foi realizada através de uma solução diluída do mesmo, à qual se adicionou água destilada até perfazer o volume total de 100ml no reactor. Cada reactor continha 10g de biomassa seca e 100ml de solução de reacção, ambos à temperatura ambiente. A colocação dos reactores selados no banho termoestatizado foi realizada quando o banho atingia a temperatura prevista para o pré-tratamento. O tempo de residência foi contado a partir do instante em que, após a introdução dos reactores à temperatura ambiente, o banho termoestatizado atingia a temperatura pretendida do pré-tratamento. Após decorrer o tempo de reacção dos pré-tratamentos, os reactores foram retirados do banho e colocados em banho de água gelada para arrefecer durante sensivelmente 15 minutos. Os reactores foram de seguida abertos, sendo removido o conteúdo para um cadinho de placa porosa número 2, de forma a separar a fracção sólida da líquida. A fracção sólida foi

lavada com água morna para remover os açúcares e produtos de degradação remanescentes da sua superfície, até perfazer uma quantidade de filtrado de 500 mL. Este filtrado foi denominado de Hidrolisado sendo denominada a fracção sólida remanescente de Resíduo Sólido. Na figura 2.2 podemos observar as análises efectuadas a cada uma destas duas componentes.

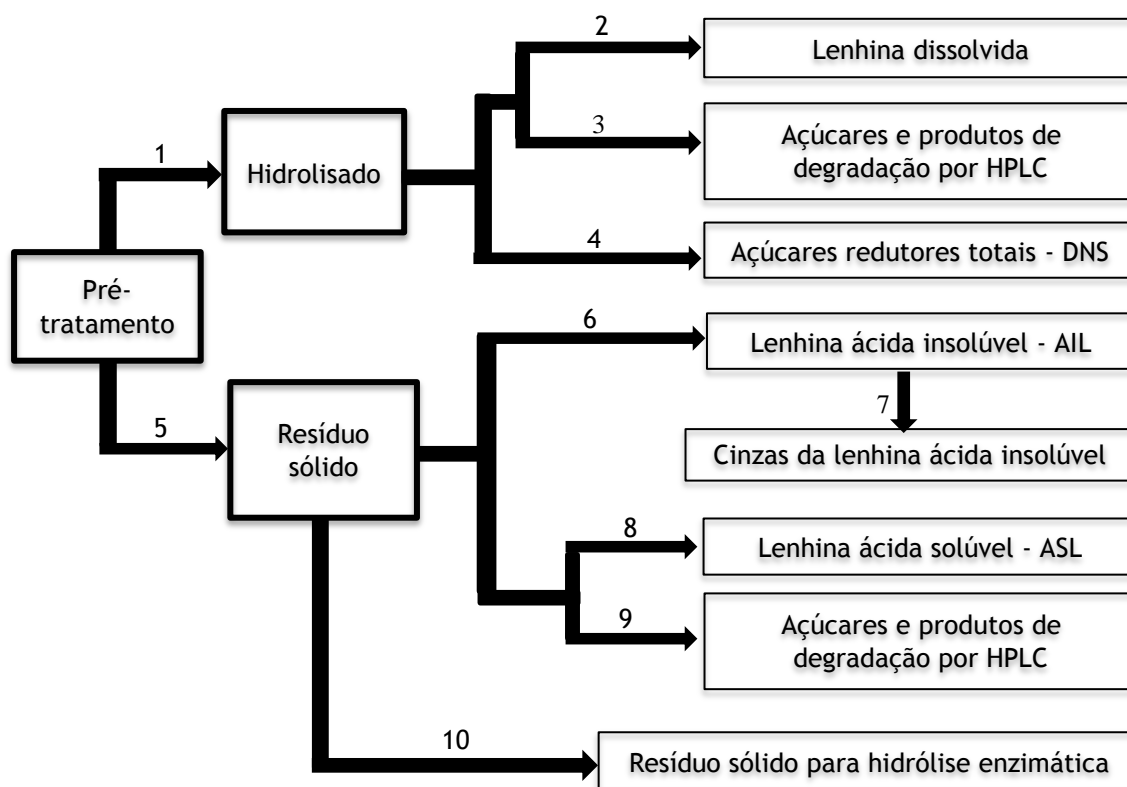


Figura 2.2 - Fluxograma das análises químicas efectuadas ao material proveniente dos pré-tratamentos

2.2.1 - Análise química dos hidrolisados resultantes do pré-tratamento

Os hidrolisados (1) dos pré-tratamentos alcalinos (NaOH , $\text{NaOH}+\text{H}_2\text{O}_2$ e NH_3) foram acidificados até $\text{pH} = 2,0$. Este valor de pH foi conseguido através da adição de H_2SO_4 seguido de uma conservação em frio (4°C) durante 24 horas. O objectivo deste procedimento foi provocar a precipitação da lenhina dissolvida por acção do pré-tratamento alcalino. Após este procedimento obteve-se lenhina precipitada (Lp), a qual foi seca e pesada, e uma lenhina ainda dissolvida (Ls) que foi quantificada por leitura no espectrofotómetro. Todas as amostras contendo lenhina dissolvida resultantes de pré-tratamentos (2) antes de serem lidas, foram centrifugadas durante 10 minutos a 4500 r.p.m. em centrífuga (Kubota KN-70). Nos pré-tratamentos alcalinos não foi realizada a determinação de açúcares e produtos de degradação no hidrolisado, uma vez que a literatura consultada apresenta como negligenciável as quantidades solubilizadas destes compostos. Assim optou-se por realizar a determinação dos açúcares por HPLC apenas na fracção sólida resultante do pré-tratamento.

A análise dos açúcares e produtos de degradação (3) nas amostras de hidrolisado resultante de pré-tratamento ácido foi realizada apenas com a utilização da coluna Aminex HPX-87H. Esta coluna serviu para proceder à separação e quantificação dos açúcares, glucose, xilose e arabinose e dos produtos de degradação, ácido acético, ácido fórmico, HMF e Furfural.

A determinação dos açúcares redutores totais pelo método do DNS (4) foi também realizada apenas para os hidrolisados provenientes de pré-tratamento com ácido sulfúrico. Para tal, adicionou-se em tubo de ensaio 1,0 mL de reagente DNS com 1 mL de amostra do hidrolisado e 2 mL de água destilada, agitando o tubo tapado com papel de alumínio, o tubo foi levado à ebulição a 100°C em banho térmico durante 10 minutos, arrefecendo de seguida em banho gelado e adicionando mais 6 mL de água destilada agitando muito bem em Vortex antes de efectuar a medição espectrofotométrica. Esta medição foi realizada utilizando como branco uma solução preparada de acordo com o referido anteriormente, mas substituindo a amostra por água destilada. Para a determinação dos açúcares redutores foram realizadas curvas de calibração para cada solução de DNS preparada, utilizando como padrão soluções de D (+)Glucose anidra em água destilada com concentrações até 5000 mg/L. Valores de concentração superiores ultrapassam a validade do método. É importante ainda referir que todas as curvas de calibração efectuadas apresentam valores de R^2 superiores a 0,999, sendo apresentado um exemplo destas curvas na figura 2.3.

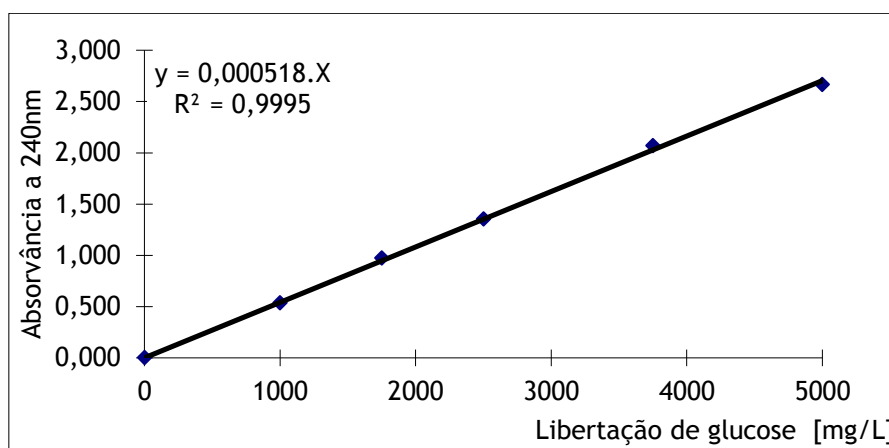


Figura 2.3 - Curva de calibração para uma solução de DNS utilizando a glucose como padrão

2.2.2 - Análise química dos resíduos sólidos resultantes do pré-tratamento

Os resíduos sólidos provenientes dos pré-tratamentos serão posteriormente usados na hidrólise enzimática pelo que não devem ser secos, uma vez que a secagem pode conduzir ao colapso dos poros reduzindo consideravelmente o rendimento da hidrólise enzimática (Hendriks e Zeeman, 2009; Zhang *et al.*, 2004). Os resíduos devem ser também bem lavados para remover todos os produtos que possam ter um papel de inactivação dos complexos enzimáticos, como o ácido fórmico na inactivação das xilanases (Panagiotou, 2007). Após a filtração e lavagem, os resíduos sólidos (5) foram pesados (peso húmido) e em seguida neutralizados, os provenientes de pré-tratamento ácido com adição de carbonato de cálcio e

hidróxido de sódio, os provenientes de pré-tratamentos alcalinos (NaOH, NaOH+H₂O₂ e NH₃) neutralizados com adição de ácido sulfúrico. De seguida dividiu-se o resíduo sólido em duas porções, a primeira destinada para a hidrólise enzimática foi congelada, a -16°C, enquanto aguardava aquele processo, a segunda porção do resíduo sólido foi pesada e seca de modo a ser possível a sua caracterização química. A determinação no resíduo sólido da lenhina ácida insolúvel (6), das respectivas cinzas (7) e da lenhina ácida solúvel (8) foi realizada como descrito no capítulo 2.1.4 e 2.1.5 A determinação dos açúcares e produtos de degradação (9) foi realizada seguindo o procedimento descrito no ponto 2.1.7 utilizando, tal como para a análise dos hidrolisados, apenas a coluna Aminex HPX-87H.

2.2.3 - Condições de pré-tratamento

Os três factores de modelação no pré-tratamento com **ácido sulfúrico** foram a temperatura (x_1 , °C), o tempo de residência (x_2 , min) e a carga de ácido (x_3 , w/w). A variação dos factores foi efectuada de acordo com a constante na bibliografia consultada (Cara *et al.*, 2007a; Ferreira *et al.*, 2011; Gil *et al.*, 2012). O ácido sulfúrico neste pré-tratamento foi adicionado a partir de uma solução com uma concentração de 5g/L preparada previamente. As variáveis dependentes estudadas no hidrolisado resultante do pré-tratamento foram a determinação de açúcares redutores totais (y_1 , mg/L), a glucose (y_2 , %), a xilose (y_3 , %), a arabinose (y_4 , %) solubilizadas e a formação produtos de degradação (y_5 , %). As variáveis dependentes analisadas no resíduo sólido do pré-tratamento foram a proporção de resíduo sólido remanescente (y_6 , %), o conteúdo em lenhina (y_7 , %), em glucose (y_8 , %), em xilose (y_9 , %) e em arabinose (y_{10} , %) A tabela 2.3 apresenta o conjunto das 15 condições de ensaio testadas no pré-tratamento ácido.

Tabela 2.3 - Condições de ensaio testadas no pré-tratamento com ácido sulfúrico

Temperatura (°C)	Tempo de residência (min.)	Carga de ácido sulfúrico (% w/w)	Ensaio realizado nº
60	75	2,75	2
84	48	1,41	2
84	102	1,41	2
84	48	4,09	2
84	102	4,09	2
120	75	0,50	2
120	30	2,75	2
120	75	2,75	6
120	120	2,75	2
120	75	5,00	2
156	48	1,41	2
156	102	1,41	2
156	48	4,09	2
156	102	4,09	2
180	75	2,75	2
Total			34

No pré-tratamento com **hidróxido de sódio** os três factores de modelação foram a temperatura (x_1 , °C), o tempo de residência (x_2 , min) e a carga de hidróxido de sódio (x_3 , w/w) tendo sido a sua amplitude de variação escolhida com base na bibliografia consultada (Gupta, 2008; Lehto e Alén, 2013; Pan *et al.*, 2005). Ao pré-tratamento inicial, modelado estatisticamente, foram adicionados um conjunto de 6 novas condições de ensaio, nas quais se aumentou em 10 vezes mais, as concentrações de reagente dos pré-tratamentos de maior severidade. Este procedimento teve como objectivo perceber a influência de um aumento considerável na concentração do reagente na constituição dos pré-tratados, especificamente nos teores de lenhina e açúcares retidos no resíduo sólido e nas taxas de conversão de açúcares obtidas na etapa de hidrólise enzimática consequente.

A remoção de lenhina (y_1 , %) foi a variável dependente estudada no hidrolisado resultante do pré-tratamento. No resíduo sólido as variáveis dependentes analisadas foram o conteúdo em lenhina (y_2 , %), em glucose (y_3 , %), em xilose (y_4 , %) e em arabinose (y_5 , %). A tabela 2.4 apresenta o conjunto das 15 condições de ensaio testadas inicialmente (1) juntamente com as 6 condições posteriormente adicionadas (2).

Tabela 2.4 - Condições de ensaio testadas no pré-tratamento com hidróxido de sódio

Temperatura	Tempo de residência	NaOH (1)	NaOH (2)	Ensaio
(°C)	(min.)	(% w/w)	(% w/w)	nº
40	70	3.25		2
60	40	1.50		2
60	100	1.50		2
60	40	5.00		2
60	100	5.00		2
90	70	0.31		2
90	20	3.25		2
90	70	3.25		6
90	120	3.25		2
90	70	6.19	61,9	2+2
120	40	1.50	15,0	2+2
120	100	1.50	15,0	2+2
120	40	5.00	50,0	2+2
120	100	5.00	50,0	2+2
140	70	3,25	32,5	2+2
				44

No pré-tratamento com **hidróxido de sódio** e **peróxido de hidrogénio** os três factores de modelação foram a temperatura (x_1 , °C), a carga de hidróxido de sódio (x_2 , w/w) e a carga de peróxido de hidrogénio (x_3 , w/w). O tempo de residência utilizado neste pré-tratamento foi de 45 minutos para todos os ensaios efectuados. Os intervalos de variação dos factores tiveram em conta os trabalhos, com este tipo de pré-tratamento, de outros autores (Banerjee *et al.*, 2011; Gupta, 2009; Kim *et al.*, 2001; Rabelo *et al.*, 2008)

O hidróxido de sódio utilizado neste pré-tratamento foi adicionado a partir de uma solução com concentração de 10g/L preparada previamente. O peróxido de hidrogénio foi adicionado a partir de uma solução a 30% com uma densidade de 1,110kg/L.

A remoção de lenhina (y_1 , %) foi a variável dependente estudada no hidrolisado resultante do pré-tratamento. As variáveis dependentes analisadas no resíduo sólido do pré-tratamento foram o conteúdo em lenhina (y_2 , %), em glucose (y_3 , %), em xilose (y_4 , %) e em arabinose (y_5 , %). A tabela 2.5 apresenta o conjunto das 15 condições de ensaio testadas no pré-tratamento com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogénio

Tabela 2.5 - Condições de ensaio testadas no pré-tratamento com NaOH e H₂O₂

Temperatura (°C)	Carga de NaOH (% w/w)	Carga de H ₂ O ₂ (% w/w)	Ensaio realizado nº
40	3,25	3,25	2
60	1,50	1,50	2
60	1,50	5,00	2
60	5,00	1,50	2
60	5,00	5,00	2
90	0,31	3,25	2
90	3,25	0,31	2
90	3,25	3,25	6
90	3,25	6,19	2
90	6,19	3,25	2
120	1,50	1,50	2
120	1,50	5,00	2
120	5,00	1,50	2
120	5,00	5,00	2
140	3,25	3,25	2
Total			34

No pré-tratamento com amoníaco os três factores de modelação foram a temperatura (x_1 , °C), o tempo de residência (x_2 , min) e a carga de amoníaco (x_3 , w/w). O amoníaco neste pré-tratamento foi adicionado a partir de uma solução com concentração de 15% (v/v) preparada previamente a partir de uma solução de NH_3 a 25% (v/v). As condições de ensaio tiveram em conta os trabalhos desenvolvidos por diversos autores (Gupta, 2009; Park e Kim, 2012; Pryor *et al.*, 2012)

A remoção de lenhina (y_1 , %) foi a variável dependente estudada no hidrolisado resultante do pré-tratamento. As variáveis dependentes analisadas no resíduo sólido do pré-tratamento foram o conteúdo em lenhina (y_2 , %), em glucose (y_3 , %), em xilose (y_4 , %) e em arabinose (y_5 , %). A tabela 2.6 apresenta o conjunto das 15 condições de ensaio testadas no pré-tratamento com amoníaco

Tabela 2.6 - Condições de ensaio testadas no pré-tratamento com NH_3

Temperatura (°C)	Tempo de residência (min.)	Carga de NH_3 (% v/v)	Ensaio realizado nº
50,0	270	8,00	2
56,5	115	2,83	2
56,5	115	13,17	2
56,5	425	2,83	2
56,5	425	13,17	2
75,0	270	1,00	2
75,0	60	8,00	2
75,0	270	8,00	6
75,0	480	8,00	2
75,0	270	15,00	2
93,5	115	2,83	2
93,5	115	13,17	2
93,5	425	2,83	2
93,5	425	13,17	2
100,0	270	8,00	2
			34

2.3 - HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Neste trabalho determinaram-se as actividades enzimáticas de seis complexos enzimáticos gentilmente cedidos pela Novozymes. A determinação da actividade foi realizada em dois complexos de celulasas (NS50012 e NS22086), dois complexos de beta-glucosidasas (NS22074 e NS22118) e dois complexos de xilanases (NS22036 e NS22083).

2.3.1 - Determinação da actividade das celulasas

Na determinação da actividade enzimática das celulasas foi seguido o procedimento analítico laboratorial proposto pelo National Renewable Energy Laboratory (NREL) no seu relatório técnico NREL/TP-510-42628 (Adney e Baker, 2008) "*Measurement of Cellulase Activities*" que se baseia nos trabalhos de medição de actividades de celulasas desenvolvidos por Ghose (Ghose, 1987) e na metodologia para determinação dos açúcares redutores através do uso do ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959).

O procedimento NREL/TP-510-42628 foi concebido para medir a actividade de celulasas em termos de "unidades de papel de filtro" (FPU) por mililitro de solução da enzima original (diluída). O objectivo consiste em encontrar a diluição de enzima que provoque a libertação de 2mg de açúcares redutores, em 60 minutos de reacção, à temperatura de 50°C. Para tal, testaram-se várias diluições analisando-se em cada uma delas a quantidade de açúcares libertada. A diluição correspondente à libertação de 2mg de açúcares redutores foi determinada por interpolação de diluições com libertação de açúcares redutores próximas daquele valor. A actividade expressa em FPU foi obtida de acordo com a fórmula expressa na norma utilizada, na qual se multiplica a diluição encontrada por 0,37 (2,0mg de glucose / (0,18016mg de glucose por micro mole x 0,5ml da diluição x 60 minutos)).

Assim efectuaram-se várias diluições enzimáticas da solução mãe colocando-se em cada tubo de ensaio 0,5 ml de cada diluição efectuada, juntamente com 1ml de tampão citrato 0,05M, com pH igual a 4,8 e uma tira de papel de filtro Whatman nº1 (1,0 x 6,0 cm). Neste procedimento são imersos dois tubos de ensaio de medição de actividade enzimática por cada concentração de enzima utilizada (enzima, substrato e tampão citrato), o controle de enzima correspondente (enzima + tampão citrato), dois controlos de substrato (substrato + tampão) e um tubo de ensaio correspondente ao branco (tampão). No final dos 60 minutos a reacção foi parada com a adição de 3ml de DNS e imersão em água a 100°C, de todos os tubos por um período de 5 minutos. No final os tubos de ensaio foram imersos num banho em água gelada. De modo a sedimentar material em suspensão que possa interferir na leitura da absorvância centrifugaram-se os tubos de reacção enzimática com o substrato a 5000rpm durante 10 minutos. Antes da leitura da absorvância no espectrofotómetro diluíram-se 0,2ml das soluções de todos os tubos utilizados, incluindo os padrões, em 2,5ml de água destilada. A leitura da absorvância efectuou-se nos 540nm. A determinação da actividade enzimática foi realizada com base na concentração de enzima responsável pela libertação de 2mg de glucose. A figura 2.4 mostra a relação entre as concentrações de enzima e a libertação de glucose.

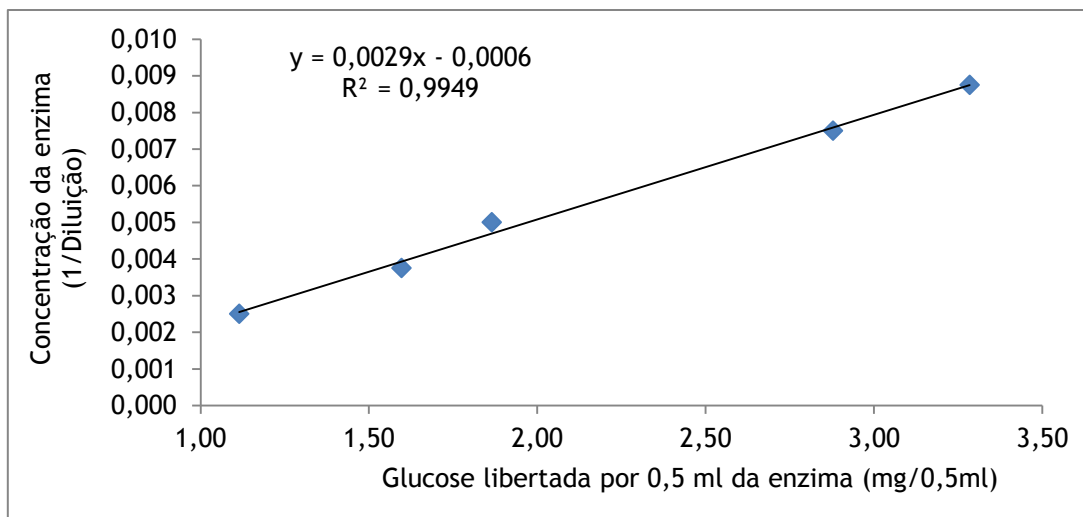


Figura 2.4 - Relação entre a libertação de glucose e a concentração de enzima NS22086

A actividade enzimática determinada foi de 70 FPU/ml para o complexo NS50012 e de 148 FPU/ml para o complexo NS22086. Nos ensaios de hidrólise enzimática subsequentes optámos por utilizar o complexo com maior actividade enzimática (NS22086).

2.3.2 - Determinação da actividade das β - glucosidases

A medição da actividade da β - glucosidase foi realizada através da medição da absorvância do p-nitrofenol libertado por acção sobre o substrato 4-Nitrofenil β -D-glucopiranosido (p-NPG) (Wood e Bhat, 1988).

Na sua preparação pipeta-se 1,0ml de uma solução 5mM de p-NPG, 200 μ l de enzima e 1,8ml de solução 0,1M de tampão acetato, com pH igual a 4,8. A solução é incubada a 50°C durante 30 minutos.

Neste banho são imersos dois tubos de ensaio de medição de actividade enzimática por cada concentração de enzima utilizada (enzima, substrato e tampão acetato), o controle de enzima correspondente (enzima + tampão acetato), dois controlos de substrato (substrato + tampão), um tubo de ensaio correspondente ao branco (tampão) e os tubos de ensaio para determinação da recta de calibração do p-nitrofenol. A reacção é parada pela adição de tampão glicina 0,4M (pH = 10,8) que faz libertar o p-nitrofenol sendo a sua absorvância medida nos 430nm. A curva de calibração previamente construída permitirá relacionar a absorvância registada com a quantidade de p-nitrofenol libertado (Figura 2.5).

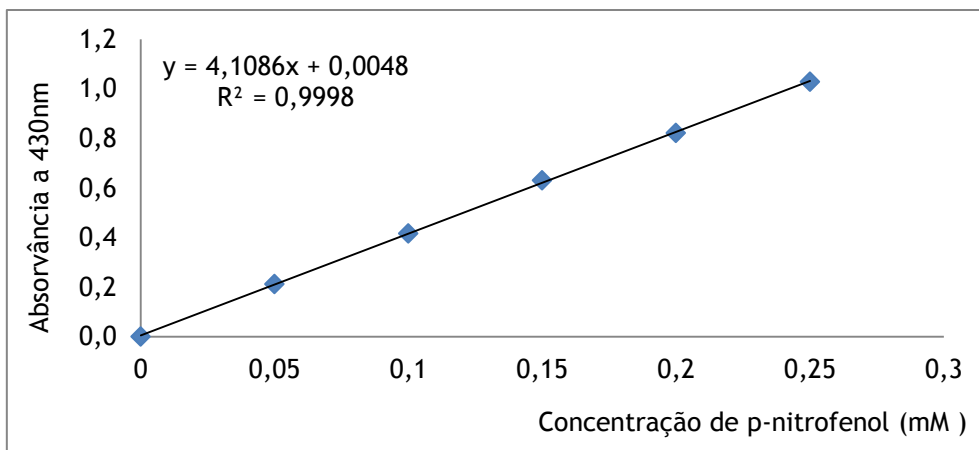


Figura 2.5 - Recta de calibração do p-nitrofenol

A unidade de actividade enzimática (p-NPGU) corresponde à quantidade de enzima necessária para libertar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto na mistura de reacção nas condições de ensaio realizadas. A determinação da actividade enzimática pode ser calculada através da equação 2.5 que a seguir se apresenta:

Eq.2.5: $((A_E - A_{CE} - A_{BS}) \times (V_S / V_E) \times D_E) / T_r$ (Wood e Baht, 1988) onde:

A_E	Absorvância da Enzima	V_E	Volume da Enzima na solução de reacção
A_{CE}	Absorvância do Controlo da Enzima	D_E	Diluição da Enzima
A_{BS}	Absorvância do Controlo substrato	T_r	Tempo de reacção (30min)
V_S	Volume da solução de reacção		

A actividade enzimática determinada foi respectivamente 19 p-NPGU/ml para o complexo NS50010 e 426 p-NPGU/ml para o complexo NS22118. Para os ensaios de hidrólise enzimática foi utilizado o complexo NS22118, uma vez que apresentava a actividade enzimática mais elevada.

2.3.3 - Determinação da actividade das xilanases

A determinação da actividade enzimática das xilanases foi determinada seguindo a metodologia da Carboxymethyl cellulase (CMCase) proposta pela IUPAC (Wood e Bhat, 1988) utilizando o xilano a 1% como substrato (Mandels, 1974; Tabka, 2006).

Na sua preparação pipetou-se 0,5ml de uma solução de xilano a 1% (w/v) adicionando-lhe 0,5ml de enzima com uma dada concentração. Nos tubos de ensaio para controlo da enzima substitui-se o substrato xilano por uma solução 0,05M de tampão citrato, com pH igual a 4,8. Adicionam-se ainda os dois tubos de controlo do substrato (0,5ml de Xilano + 0,5ml de tampão citrato) e o tubo de ensaio correspondente ao branco (1ml de tampão citrato). No banho quente foram colocados a 50°C, durante 30 minutos, os tubos de ensaio relativos às diferentes concentrações de enzima testadas (em duplicado), o tubo de ensaio de controlo da enzima

correspondente, os dois tubos de ensaio relativos ao branco substrato, o branco e os tubos de ensaio para determinação da recta de calibração da xilose. No final deste período a reacção foi parada com a adição de 3ml de DNS e imersão em água a 100°C, de todos os tubos por um período de 5 minutos. No final os tubos de ensaio foram imersos num banho em água gelada. A medição da absorvância é realizada nos 540nm. A figura 2.6 apresenta a recta de calibração da xilose.

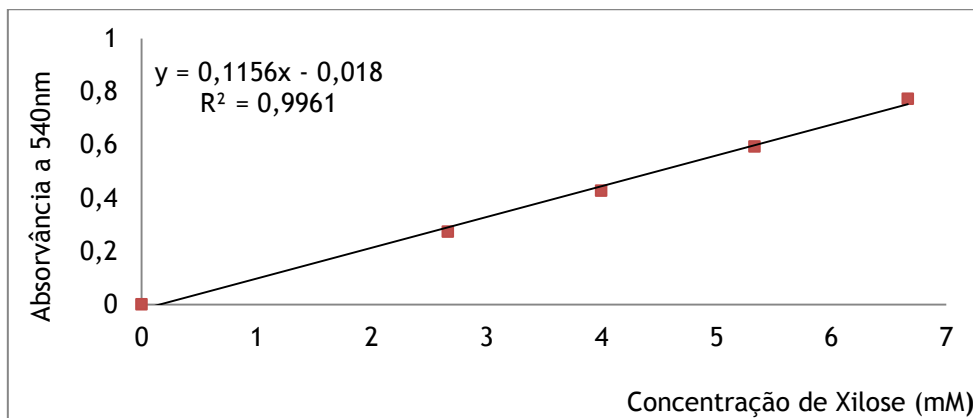


Figura 2.6 - Recta de calibração da xilose

As actividades enzimáticas foram calculadas em unidades enzimáticas (U) definindo-se 1U como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 micromole de substrato por minuto (Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry, 1978).

As actividades enzimáticas das xilanases utilizadas neste ensaio foram respectivamente 3631 U/ml para o complexo NS22036 e 7498 U/ml para o complexo NS22083. Nos ensaios de hidrólise enzimática foi escolhido o complexo NS22083 uma vez que foi aquele que apresentou maior actividade enzimática.

2.3.4 - Hidrólise Enzimática

Neste trabalho foram realizadas cinco hidrólises enzimáticas tendo-se utilizado, como substrato enzimático, os resíduos sólidos provenientes de cada um dos pré-tratamentos. Em cada pré-tratamento seleccionaram-se para hidrólise os ensaios nos quais o peso do resíduo sólido remanescente era menor, indicador de uma maior severidade no pré-tratamento. Desta forma, foi avaliada a hidrólise enzimática em 5 condições de pré-tratamento com H_2SO_4 , em 12 condições de pré-tratamento com NaOH, em 6 condições de pré-tratamento com NaOH e H_2O_2 e em 5 condições de pré-tratamento com NH_3 .

A hidrólise foi realizada com uma concentração de sólidos de 5% (2,5g de resíduo sólido seco), num tampão citrato 50mM com pH igual a 4,8 o qual continha como antibiótico 0,02% de azida de sódio. A todas as amostras adicionou-se ainda 150mg de BSA.

Para digestão enzimática foram utilizadas, em conjunto, três enzimas comerciais, uma celulase (NS22086), uma β -glucosidase (NS22118) e uma xilanase (NS22083). De modo a evitar a inibição pelo produto causada pela acumulação de celobiose utilizou-se uma carga

enzimática de β -glucosidase duas vezes superior à utilizada para o complexo de celulases. Para a xilanase utilizou-se também a mesma razão de 2:1 relativamente à carga utilizada para o complexo de celulases (Kumar e Wyman, 2009; Lloyd e Wyman, 2005; Pan *et al.*, 2005; Wyman *et al.*, 2005).

Em cada hidrólise realizada testou-se a aplicação de duas cargas enzimáticas, uma com 18FPU/36p-NPGU/36IU por grama de biomassa e outra com 6FPU/12p-NPGU/12IU por grama de biomassa.

Após a adição das enzimas, os balões Erlenmeyer de 50ml contendo a mistura reaccional, foram colocados numa incubadora orbital (New Brunswick Scientific) à temperatura constante de 50°C e com uma agitação de 150rpm (Ferreira *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2012). Cada condição de pré-tratamento foi analisada em triplicado para cada carga enzimática, juntando-se a este conjunto, 1 controle de substrato, para avaliar a possibilidade de libertação de açúcares a partir do substrato sem enzima. Para avaliar a presença de açúcares nas soluções enzimáticas utilizadas foi realizado um controle de enzima (enzima sem substrato), por cada complexo enzimático utilizado.

Para se determinarem as quantidades de açúcares libertados foram retiradas amostras de 1ml às 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 174 horas.

As amostras foram guardadas em eppendorfs a -20°C até serem analisadas. A análise dos açúcares libertados durante a hidrólise foi realizada pelo método do DNS. Neste método a primeira operação consistiu na centrifugação (Sigma 2K15) dos eppendorfs a 10 000rpm, durante 10 minutos. De seguida, foram retirados pequenos volumes das amostras de hidrólise dos eppendorfs para tubos de ensaio, aos quais foi adicionado tampão citrato, para diluir as amostras, até se perfazer um volume de 1ml por tubo. De seguida adicionou-se 3ml de DNS a cada tubo sendo a solução resultante homogeneizada com o auxílio de um vortex. Após esta operação os tubos de ensaio contendo as amostras de hidrólise, bem como os tubos contendo os padrões de calibração e o branco (1ml de tampão citrato e 3ml de DNS), foram imersos em água a 100°C, durante 5 minutos. Terminado este período os tubos de ensaio foram retirados e colocados em banho gelado sendo-lhes adicionada 5ml de água destilada. Com um volume final de 9ml por tubo de ensaio e após nova homogeneização em vortex procedeu-se às leituras espectrofotométricas nos 540nm.

Para a determinação dos açúcares redutores foram realizadas curvas de calibração para cada solução de DNS preparada, utilizando como padrão soluções de D (+)Glucose anidra em água destilada com concentrações até 1500 mg/L.

2.3.5 - Determinação das interações entre os complexos enzimáticos

Com o objectivo de se conhecer a influência e as interações entre os três complexos enzimáticos e a quantidade de sólidos a hidrolisar procedeu-se a um ensaio preliminar com a matéria-prima sem pré-tratamento. A tabela 2.7 mostra os diferentes valores que assumiram cada um dos factores utilizados.

Tabela 2.7 - Combinações testadas para determinação das interações entre os complexos enzimáticos

Ensaio nº	Complexo de celulases NS22086 (FPU/50ml)	B-glucosidase NS22118 (p-NPGU/50ml)	Xilanase NS22083 (IU/50ml)	Sólidos (%)
9	82,50	165,00	82,50	1
21	48,75	97,50	48,75	2
2	48,75	97,50	116,25	2
14	48,75	232,50	48,75	2
11	48,75	232,50	116,25	2
6	116,25	97,50	48,75	2
23	116,25	97,50	116,25	2
20	116,25	232,50	48,75	2
16	116,25	232,50	116,25	2
1	15,00	165,00	82,50	3
30	82,50	30,00	82,50	3
12	82,50	165,00	15,00	3
8	82,50	165,00	82,50	3
15	82,50	165,00	82,50	3
22	82,50	165,00	82,50	3
25	82,50	165,00	82,50	3
26	82,50	165,00	82,50	3
28	82,50	165,00	82,50	3
5	82,50	165,00	150,00	3
7	82,50	300,00	82,50	3
24	150,00	165,00	82,50	3
19	48,75	97,50	48,75	4
10	48,75	97,50	116,25	4
29	48,75	232,50	48,75	4
13	48,75	232,50	116,25	4
3	116,25	97,50	48,75	4
18	116,25	97,50	116,25	4
17	116,25	232,50	48,75	4
27	116,25	232,50	116,25	4
4	82,50	165,00	82,50	5

O delineamento experimental deste ensaio foi realizado no programa de análise estatística “Design Expert 7 Trial Version” utilizando a metodologia de superfície de resposta (Surface Response) utilizando uma análise central composta. Neste programa foram introduzidos 4 factores, as cargas enzimáticas de cada um dos três complexos enzimáticos e o teor de sólidos tendo sido escolhida como resposta a quantidade de açúcares redutores libertados.

O ensaio foi realizado sobre a biomassa sem pré-tratamento, num volume reaccional de 50ml, utilizando como suporte uma solução de tampão citrato com pH igual a 4,8 e concentração final 0,05M. A análise da libertação de açúcares redutores decorrente da hidrólise enzimática foi efectuada através do método do DNS às 42 e às 139 horas de reacção.

Capítulo 3 - Resultados e discussão

3.1 - Composição da matéria-prima

A tabela 3.1 apresenta a composição química, em base seca, da matéria - prima utilizada resultante da análise de seis amostras. A análise por HPLC dos hidratos de carbono presentes na biomassa revelou uma presença de 51,15% de açúcares, sendo estes constituídos maioritariamente por glucose (33,59%) e xilose (13,11%). A lenhina é o segundo componente mais expressivo na constituição do material utilizado representando cerca de 25% do seu peso seco.

Tabela 3.1 - Composição química da matéria - prima

Composição	Quantidades (%) \pm DP ^a
Glucose	33,59 \pm 2,25
Xilose	13,11 \pm 1,02
Arabinose	4,55 \pm 0,20
Galactose	n.d.
Manose	n.d.
Ácido acético	3,53 \pm 0,43
Lenhina ácida insolúvel	18,07 \pm 0,33
Lenhina ácida solúvel	6,89 \pm 0,06
Extractáveis	15,84 \pm 0,44
Cinzas	3,76 \pm 0,01

^a Composição expressa em base seca

n.d. - não detectado

Nas madeiras de folhosas, como a oliveira, a xilose e a arabinose são normalmente os açúcares mais representativos na constituição das hemiceluloses verificando-se um predomínio da xilose nessa constituição (Lynd *et al.*, 1999). Já nas madeiras de resinosas, árvores, como os pinheiros e os abetos (Zhou e Dai, 2012), existe um predomínio da manose na constituição das hemiceluloses. Os teores de glucose, xilose, lenhina e outros açúcares determinados encontram-se em concordância com análises efectuadas para a mesma matéria prima por outros autores, como pode ser verificado na leitura da tabela 3.2.

Como se pode observar pela análise da tabela 3.2 os valores expressos, neste trabalho, para os teores de glucose, xilose e lenhina encontram-se em consonância com os determinados por outros autores. No mesmo quadro são também apresentadas os teores de glucose, xilose e lenhina para outras fontes de material lenhocelulósico.

Tabela 3.2 - Composição em glucose, xilose e lenhina em materiais lenhocelulósicos
(% em base seca)

Material lenho celulósico	Glucose	Xilose	Outros açúcares	Lenhina	Referência
	33,8	16,6	2,0	24,7	(Requejo <i>et al.</i> , 2011)
Resíduos das podas do olival	25,0	11,1	4,7	16,6	(Manzanares <i>et al.</i> , 2011)
	32,7	13,0	5,2	19,1	(Ballesteros <i>et al.</i> , 2011)
	32,9	11,1	4,7	18,8	(Cara <i>et al.</i> , 2008a)
	34,4	16,0	4,3	20,4	(Ruiz <i>et al.</i> , 2006)
	33,6	13,1	4,5	25,0	(matéria-prima em estudo)
Palha de trigo	32,7	19,3	2,7	16,8 ^b	(Sidiras <i>et al.</i> , 2011)
Palha de milho	35,2	17,3	7,7	18,9 ^a	(Pei <i>et al.</i> , 2012)
Bagaço de Sorgo	38,7	22,6	-	15,4	(Wu <i>et al.</i> , 2011)
Bagaço de Cana-de-açúcar	40,9	20,8	1,5	24,9	(Qiu <i>et al.</i> , 2012)
Pinheiro	41,4	5,2	15,8	28,5	(Yu <i>et al.</i> , 2011)
Picea	43,9	6,7	16,9		(Monavari <i>et al.</i> , 2011)
Choupo	39,0	16,0	-	27,5	(DeMartini e Wyman, 2011)
Acácia	43,4	18,7	-	20,7	(Ferreira <i>et al.</i> , 2011)
Eucalipto	44,4	17,5	1,1	27,7	(Romaní <i>et al.</i> , 2010)

^a - Soma da lenhina ácida insolúvel e lenhina ácida solúvel

^b - Lenhina de Klason

Relativamente aos resíduos das podas do olival podemos observar com base na análise da tabela 3.2 que os teores de glucose foram inferiores à maioria dos materiais lenho celulósicos apresentados. Este facto pode ser explicado devido ao alto teor de extractáveis apresentados pelos RPO, resultantes da maior ou menor incorporação das folhas nos resíduos utilizados. No presente trabalho, o teor de extractáveis encontrado foi de 15,8%, no entanto, (Cara *et al.*, 2007), determinou um teor de extractáveis de 31,4%. O elevado teor de extractáveis faz com que a valorização desta componente se torne foco de atenção, existindo diversos estudos que defendem a aplicação dos compostos fenólicos presentes nestes extractáveis na área da saúde, nomeadamente na luta contra o cancro da mama (Bouallagui *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2009; Taamalli *et al.*, 2012) mas também na área de aditivos alimentares e da cosmética (Laguerre *et al.*, 2009).

3.2 - Pré-tratamento com ácido sulfúrico

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído é considerado um dos pré-tratamentos mais eficientes sendo utilizado há mais de 20 anos. Este pré-tratamento com custos reduzidos consegue solubilizar as hemiceluloses e embora não dissolva a lenhina esta fica inactiva permitindo a acção das enzimas sobre a celulose (Pu *et al.*, 2008; Yang e Wyman, 2008).

A formação de produtos de degradação a partir dos açúcares constitui uma das desvantagens da aplicação dos pré-tratamentos ácidos, quer pela redução nas taxas de conversão de açúcares durante o pré-tratamento, quer pelo facto, dos produtos de degradação formados nesta fase terem um impacto negativo no processo de fermentação posterior conseguindo inibir o crescimento dos microorganismos responsáveis pela conversão do açúcar em etanol (Panagiotopoulos *et al.*, 2011).

3.2.1 - Açúcares redutores totais no hidrolisado dos pré-tratamentos com H_2SO_4

A determinação dos açúcares redutores totais (ART) foi a primeira análise efectuada nos hidrolisados dos pré-tratamentos ácidos, para avaliação da influência dos factores temperatura, tempo e concentração de H_2SO_4 , na solubilização dos açúcares presentes na biomassa. A tabela 3.3 apresenta as quantidades médias de ART libertados para o hidrolisado, por grama de amostra, em função das condições de pré-tratamento utilizadas.

Tabela 3.3 - Quantidades médias de ART libertados para o hidrolisado em função das diferentes condições de pré-tratamento

Temperatura - A	Tempo - B	Conc. H_2SO_4 (% w/w) - C	ART (mg/g amostra)
60	75	2,75	60,8 ± 1,7
84	48	1,41	62,6 ± 4,4
84	101	1,41	73,2 ± 2,3
84	48	4,09	102,9 ± 2,4
84	101	4,09	120,5 ± 9,0
120	75	0,50	105,4 ± 1,7
120	30	2,75	172,1 ± 10,4
120	75	2,75	236,1 ± 6,3
120	120	2,75	244,6 ± 3,4
120	75	5,00	352,0 ± 17,2
156	48	1,41	289,8 ± 0,8
156	102	1,41	319,6 ± 7,9
156	48	4,09	450,2 ± 10,5
156	102	4,09	420,6 ± 2,0
180	75	2,75	325,1 ± 2,5

Como podemos observar pela análise da tabela 3.3 à medida que se aumentou a severidade do pré-tratamento aumentou também a libertação de ART para o hidrolisado. A maior libertação de ART (450mg/g amostra) verificou-se nos pré-tratamentos realizados a 156°C, durante 48 minutos e com uma carga de ácido de 4,09%.

Para entender em que medida as variáveis utilizadas influenciaram a libertação de ART foram analisados diversos modelos com base na análise de variância (ANOVA). Dos vários modelos testados foi seleccionado o modelo cúbico reduzido, por ser aquele que apresentou o coeficiente de determinação mais elevado, com um R^2 de 0,9826. A tabela 3.4 apresenta a análise ANOVA para o modelo cúbico reduzido, bem como a equação resultante para estimativa das quantidades médias de ART libertados para o hidrolisado.

Tabela 3.4 - Análise ANOVA, com modelo de resposta cúbico reduzido, para estimativa das quantidades médias de ART libertados para o hidrolisado, no pré-tratamento ácido

Variável	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	4,90E+05	9	54433.54	150.76	< 0.0001
A = Temperatura	69837.57	1	69837.57	193.42	< 0.0001
B=Tempo	3273.24	1	3273.24	9.07	0.0060
C = Conc. H ₂ SO ₄	60826.30	1	60826.30	168.46	< 0.0001
AB	207.87	1	207.87	0.58	0.4554
AC	7486.69	1	7486.69	20.73	0.0001
A ²	3045.74	1	3045.74	8.44	0.0078
B ²	793.55	1	793.55	2.20	0.1512
A ² C	5892.76	1	5892.76	16.32	0.0005
AB ²	25209.18	1	25209.18	69.82	< 0.0001
R ² = 0,9826	R ² _{ajustado} = 0,9761				

Eq. 3.1

$$\begin{aligned} \text{ART (mg/g)} = & -1199,14935 + 5,35761 \times A + 45,51284 \times B - 251,74163 \times C \\ & - 0,36597 \times A \times B + 4,65593 \times A \times C + 0,039432 \times A^2 - 0,29767 \times B^2 \\ & - 0,017511 \times A^2C + 0,00241462 \times A \times B^2 \end{aligned}$$

A análise da variância, através da leitura da tabela 3.4, mostra que o modelo é estatisticamente válido possuindo um p-valor < 0,0001, encontrando-se por isso ajustado. Analisando o valor de F, verificamos que os efeitos lineares da temperatura (F = 193,42) e da concentração de ácido (F = 168,46) foram os que se revelaram mais importantes na variação da resposta. A interacção dos factores temperatura e concentração de ácido (AC) também foi bastante significativa (p-valor <0,0001), assim como o efeito cúbico da temperatura com o quadrado do tempo (AB²). Foi menos relevante, mas também importante por apresentar um nível de significância (p-valor <0,0005), o factor interactivo entre o quadrado da temperatura e a concentração (A²C). Os valores elevados de R² e R²_{ajustado} mostram uma elevada proximidade entre os valores estimados pelo modelo e os resultados experimentais. A equação 3.1 apresenta a correlação entre os factores considerados na construção do modelo e as quantidades de ART removidas para o hidrolisado.

2. $\frac{1}{2} \leq \alpha \leq 1$ and $\beta \sim 1$ (see Fig. 11.60).

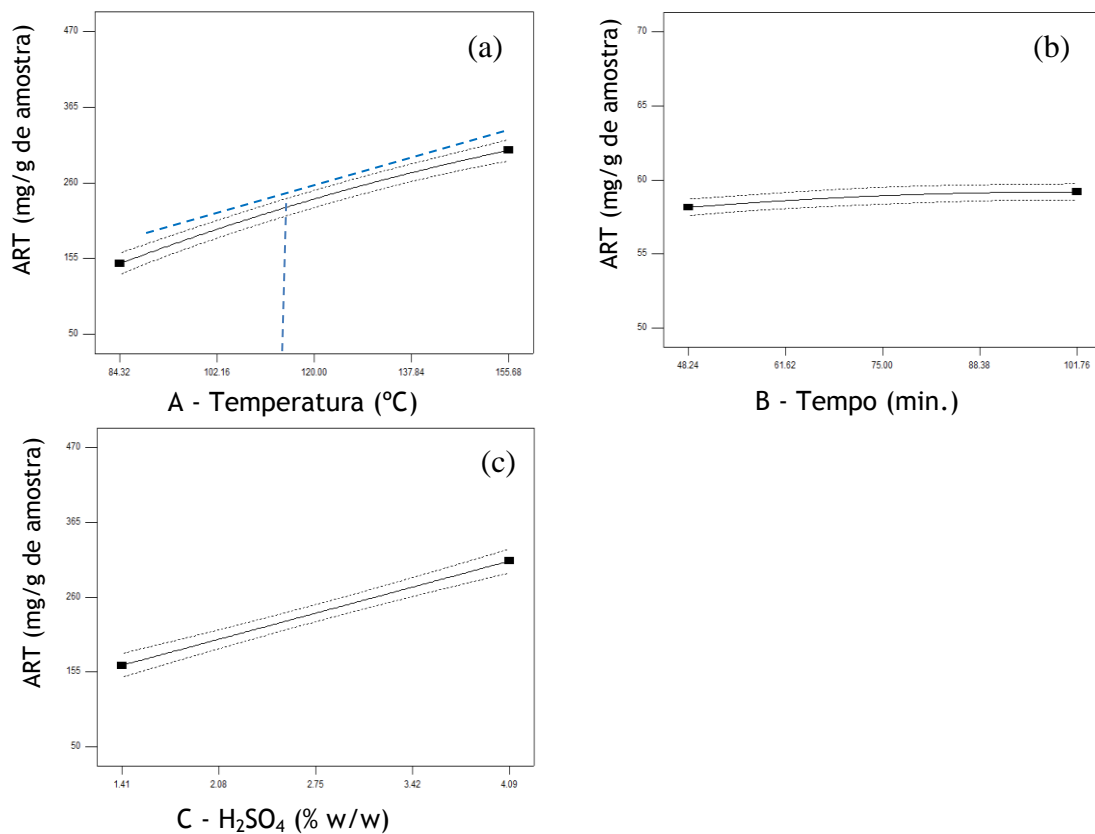


Figura 3.2 - Representação individual das variáveis (A, B, C) com as restantes condições constantes: (a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min

A análise do efeito conjugado da temperatura com a carga de ácido sulfúrico é apresentada na figura 3.3.

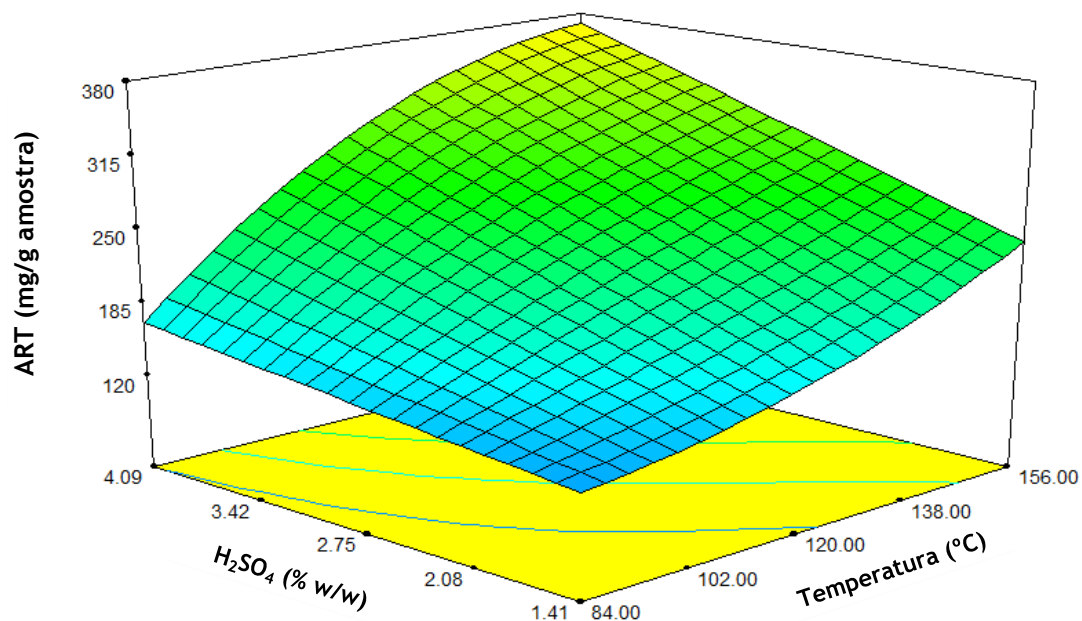


Figura 3.3 - Representação 3D do efeito conjugado da temperatura e da concentração de ácido sulfúrico nas quantidades libertadas de ART para o hidrolisado (Tempo = 75 minutos)

Podemos observar pela análise da figura 3.3 que o aumento da temperatura e da concentração de ácido sulfúrico teve como consequência um aumento nas quantidades de ART encontradas no hidrolisado. No entanto, esta figura também mostra o surgimento de uma estabilização nas quantidades de ART libertados para o hidrolisado, com um achatamento do plano, nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura superior a 120°C de temperatura e com uma concentração de ácido sulfúrico em torno dos 4,09%.

3.2.2 - Açúcares individualizados e produtos de degradação presentes no hidrolisado nos pré-tratamentos com H₂SO₄

A tabela 3.5 apresenta a constituição química dos hidrolisados, resultantes dos pré-tratamentos com ácido sulfúrico, a partir de determinações efectuados com HPLC. Como podemos observar pela sua análise a xilose e a glucose foram os açúcares com maior concentração nos hidrolisados. A maior taxa de libertação de açúcares para o hidrolisado, 29,9%, ocorreu nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 156°C, uma concentração de ácido de 4,09% e um tempo de residência de 48 minutos. Nestas condições libertaram-se para o hidrolisado 58,4% dos açúcares existentes na amostra

Tabela 3.5 - Composição química dos hidrolisados resultantes do pré-tratamento com ácido sulfúrico (em % de amostra)

Temperatura (°C)	H ₂ SO ₄ (% w/w)	Tempo (min)	Glucose	Xilose	Arabinose	Ácido Fórmico	Ácido Acético	HMF	Furfural
60	2,75	75	3,0%	4,2%	0,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
84	1,41	48	2,8%	4,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
84	1,41	101	3,4%	4,9%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
84	4,09	48	3,7%	4,9%	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%	0,0%
84	4,09	101	3,9%	5,2%	0,6%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
120	0,50	75	3,3%	4,4%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%
120	2,75	30	4,2%	4,1%	2,4%	0,0%	0,6%	0,0%	0,0%
120	2,75	75	4,3%	3,8%	3,8%	0,0%	0,4%	0,0%	0,0%
120	2,75	120	5,1%	4,3%	4,6%	0,0%	0,9%	0,1%	0,0%
120	5,00	75	6,5%	5,3%	4,6%	0,0%	0,9%	0,1%	0,0%
156	1,41	48	5,2%	5,3%	4,6%	0,0%	1,1%	0,4%	0,3%
156	1,41	102	5,7%	7,1%	4,6%	1,8%	1,7%	0,7%	0,8%
156	4,09	48	12,2%	13,1%	4,6%	0,0%	2,7%	0,8%	0,7%
156	4,09	102	11,5%	13,1%	4,6%	0,0%	3,1%	1,1%	1,3%
180	2,75	75	7,6%	8,7%	2,7%	0,8%	3,2%	2,1%	2,0%

A análise da tabela 3.5 mostra que o aumento das concentrações de ácido acético, furfural e 5-HMF se encontrou directamente relacionado com o aumento da temperatura, mas também com o aumento da concentração de ácido e com o aumento do tempo de duração dos pré-tratamentos efectuados.

O ácido acético foi o composto que surgiu a temperaturas mais baixas, tendo sido detectado por HPLC inclusive em pré-tratamentos realizados a 84°C. À medida que se aumentou a temperatura dos pré-tratamentos também aumentaram as concentrações de ácido acético, furfural e 5-HMF no hidrolisado, sendo possível observar que, dentro da mesma classe de temperatura, o aumento das concentrações destes compostos se encontrava directamente relacionado com o aumento da carga do ácido sulfúrico e com o aumento do tempo de residência.

A figura 3.4 apresenta as concentrações de glucose, xilose, arabinose, bem como as concentrações de ácido acético e produtos de degradação (ácido fórmico, HMF e Furfural) encontradas nos hidrolisados resultantes de pré-tratamentos ácidos, expressas em % da amostra.

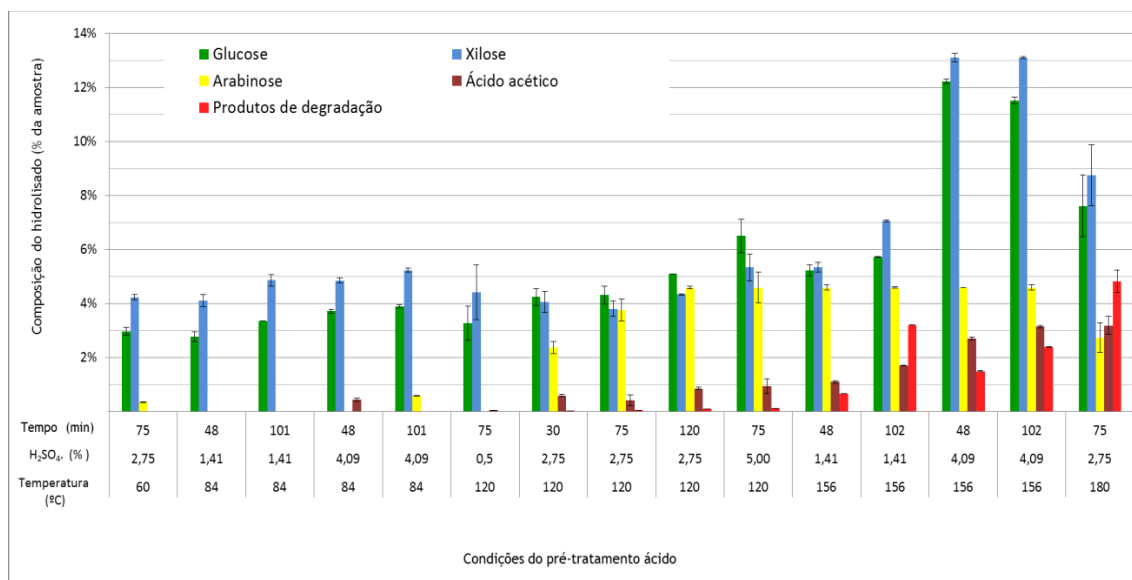


Figura 3.4 - Concentrações de açúcares, ácido acético e produtos de degradação encontradas nos hidrolisados resultantes de pré-tratamento ácido, em % da amostra

Como podemos observar não foram registadas variações de grande amplitude nas taxas de solubilização da glucose e da xilose nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura inferior a 156°C. Abaixo deste valor de temperatura, a solubilização da glucose variou entre 3,0% e 5,7%, e a solubilização da xilose entre 3,8% e 7,1%.

O maior aumento da solubilização da glucose e xilose verificou-se quando, nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 156°C, se aumentou a carga de ácido de 1,41% para 4,09%. Nesta situação a solubilização da glucose mais que duplicou passando de 5,7% para 12,2%, tendo-se verificado simultaneamente um aumento da solubilização da xilose de 7,1% para 13,1%. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Wei e

colaboradores que obtiveram um aumento da solubilização de glucose de 3% para 13% quando aumentaram a temperatura de 140°C para 170°C, em pré-tratamentos realizados com ácido sulfúrico utilizando como substrato palha de trigo (Wei *et al.*, 2012). Outros autores verificaram após a realização de pré-tratamentos com ácido sulfúrico, com temperaturas compreendidas entre 160 e 190°C, solubilizações máximas de glucose de apenas 13% concluindo que os pré-tratamentos ácidos não se apresentavam eficientes na solubilização deste açúcar. No entanto, nas mesmas condições este autor conseguiu solubilizações na ordem dos 94% para a xilose (Yat *et al.*, 2008). Também Shen e Wyman conseguiram taxas de solubilização da xilose semelhantes (93,1%) em pré-tratamentos realizados com ácido sulfúrico sobre palha de milho durante 40 minutos, a 160°C e com uma carga de ácido de 0,5% (w/w) (Shen e Wyman, 2011; Yat *et al.*, 2008).

Em quase todas as condições de pré-tratamento verificou-se que a taxa de solubilização da xilose foi superior à taxa de solubilização da glucose, com exceção dos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 120°C. Nesta classe de temperatura a solubilização da glucose foi superior à verificada para a xilose, especialmente nos pré-tratamentos realizados com carga de ácido de 5,00%. A remoção integral da xilose da biomassa foi conseguida nos pré-tratamentos realizados, durante 48 e 102 minutos, com temperatura igual a 156°C e uma carga de ácido sulfúrico de 4,09%.

O aumento da solubilização da arabinose foi verificado aos 120°C. Dentro desta classe de temperatura registou-se um aumento da solubilização da arabinose face a aumentos na duração do pré-tratamento ou a aumentos na carga de ácido sulfúrico aplicado. Este açúcar foi aquele que solubilizou em condições de menor severidade tendo sido obtida a sua remoção integral da biomassa em 7 condições de pré-tratamentos distintas, em 2 pré-tratamentos realizados a 120°C e em todos os pré-tratamentos realizados com temperatura igual ou superior a 156°C. Na classe de temperatura mais baixa (120°C), a solubilização total da arabinose foi conseguida em dois tipos de pré-tratamentos, nos realizados com um tempo de residência 120 minutos e nos realizados com uma carga de ácido de 5,00%.

O maior aumento na taxa de produtos de degradação presentes no hidrolisado foi verificado, quando se aumentou o tempo de duração dos pré-tratamentos de 48 para 102 minutos, nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 156°C e uma carga de ácido de 1,41%. Nestas condições a concentração dos produtos de degradação encontrados no hidrolisado aumentou de 0,7% para 3,2%.

Quando se aumentou a temperatura dos pré-tratamentos de 156°C para 180°C verificou-se um decréscimo nos teores de glucose, xilose e arabinose no hidrolisado, totalizando uma redução de 10,1%, registando-se paralelamente um aumento de 2,4% na taxa de produtos de degradação presentes no hidrolisado. Estes valores indicam que não existiu uma compensação, da mesma ordem de grandeza, entre o aumento na taxa de produtos de degradação com a diminuição da taxa de açúcares dissolvidos no hidrolisado. Uma hipótese provável para este desajustamento pode ser devida à volatilização de produtos de degradação

nomeadamente furfural e 5-HMF, não tendo sido possível por isso contabiliza-los na sua totalidade.

Cara, em 2007, obteve uma taxa de solubilização da xilose de 97,3% em pré-tratamentos com ácido sulfúrico realizados a 210°C, com uma carga de ácido de 1,4% (w/w) e durante 10 minutos. Contudo nestas condições a produção de subprodutos e produtos de degradação foi de 10,4% em percentagem da amostra (Cara *et al.*, 2007a).

Kim, em 2011, obteve em madeira de choupo amarelo uma taxa de remoção de xilose de 87,4% em pré-tratamentos efectuados a 160°C, com 3,7% (w/w) de ácido oxálico durante 40 minutos, nos quais a produção de 5-HMF e furfural foi respectivamente igual a 0,10g/L e 0,66g/L. No entanto, quando aumentou a temperatura dos pré-tratamentos para 187°C, ainda que com uma carga de ácido inferior 2,5% (w/w) e durante menos tempo, 30 minutos, a taxa de remoção da xilose aumentou para 96,3%, mas a produção de 5-HMF e furfural subiu para 0,87g/L e 4,15g/L respectivamente (Kim *et al.*, 2011a).

Dos resultados acima expressos podemos concluir que a conciliação entre a solubilização das hemiceluloses e uma produção mínima de produtos de degradação pode ser conseguida com temperaturas de pré-tratamento em torno dos 150-160°C, ainda que com cargas de ácido mais elevadas.

O aumento para temperaturas mais elevadas acarreta uma maior formação de produtos de degradação que terão um impacto negativo no processo fermentativo subsequente e uma consequente redução dos açúcares disponíveis para fermentação. Diversos investigadores confirmam que a máxima libertação de xilose para o hidrolisado ocorre, nos pré-tratamentos ácidos, para temperaturas em torno dos 160°C. A partir desta temperatura existe um decréscimo destes açúcares no hidrolisado devido à sua transformação em produtos de degradação (Lloyd e Wyman, 2005; Kumar e Wyman, 2008).

3.2.3 - Solubilização da glucose nos pré-tratamentos com H₂SO₄

A tabela 3.6 apresenta a análise ANOVA para estimativa da taxa de solubilização de glucose construída com base num modelo cúbico reduzido através da adição dos factores A²B, A²C e AB² na equação de estimativa. Juntamente com a ANOVA apresenta-se a equação 3.2 de estimativa da taxa de solubilização da glucose em função da temperatura, tempo e concentração de ácido sulfúrico.

Tabela 3.6 - Análise ANOVA para estimativa das taxas de solubilização da glucose no pré-tratamento com H₂SO₄

Variável	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	2092.06	13	160.93	36.12	< 0.0001
A = Temperatura	190.90	1	190.90	42.85	< 0.0001
B= Tempo	6.58	1	6.58	1.48	0.2383
C = Conc. H ₂ SO ₄	92.23	1	92.23	20.70	0.0002
AB	1.99	1	1.99	0.45	0.5120
AC	282.90	1	282.90	63.50	< 0.0001
BC	5.55	1	5.55	1.24	0.2778
A ²	67.70	1	67.70	15.20	0.0009
B ²	26.04	1	26.04	5.84	0.0253
C ²	38.24	1	38.24	8.58	0.0083
ABC	1.39	1	1.39	0.31	0.5823
A ² B	2.13	1	2.13	0.48	0.4968
A ² C	39.74	1	39.74	8.92	0.0073
AB ²	90.24	1	90.24	20.26	0.0002
R ² = 0,9591 R ² _{ajustado} = 0,9326					

Eq. 3.2

Solubilização da Glucose (em % relativa da glucose na amostra)

$$\begin{aligned}
 &= -83,9981 + 0,98795 \times A + 2,17715 \times B + 7,4215 \times C \\
 &- 0,01740 \times A \times B - 0,23969 \times A \times C + 0,011278 \times B \times C \\
 &- 0,00134 \times A^2 - 0,01584 \times B^2 + 0,72763 \times C^2 - 0,00023 \times A \times B \times C \\
 &- 0,0000167 \times A^2B + 0,001438 \times A^2C + 0,000144 \times AB^2
 \end{aligned}$$

Como podemos observar pela análise da tabela 3.6 o modelo construído encontra-se ajustado (p-valor < 0,0001) apresentando um coeficiente de determinação de 0,9591, ou seja, este modelo explica 95,91% da variação das taxas de solubilização de glucose encontradas. Apenas 3,09% das taxas de solubilização de glucose observadas podem ser devidas a outros factores que não os utilizados neste modelo. O efeito conjugado da temperatura com a concentração de ácido foi o factor mais determinante na solubilização de glucose correspondendo-lhe o maior valor de F (63,50). Em termos de influência individual a temperatura foi o factor mais determinante, com um valor de F de 42,85. A concentração de ácido sulfúrico (C), tempo ao quadrado (A²) e o efeito conjugado da temperatura com o quadrado do tempo (AB²) foram também factores significativos na explicação da solubilização da glucose. O tempo de duração dos pré-tratamentos, como factor isolado, teve uma influência reduzida nas taxas de

solubilização de glucose obtidas. Na figura 3.5 podemos observar o efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico (c) nas taxas de solubilização da glucose expressa em percentagem da glucose na amostra.

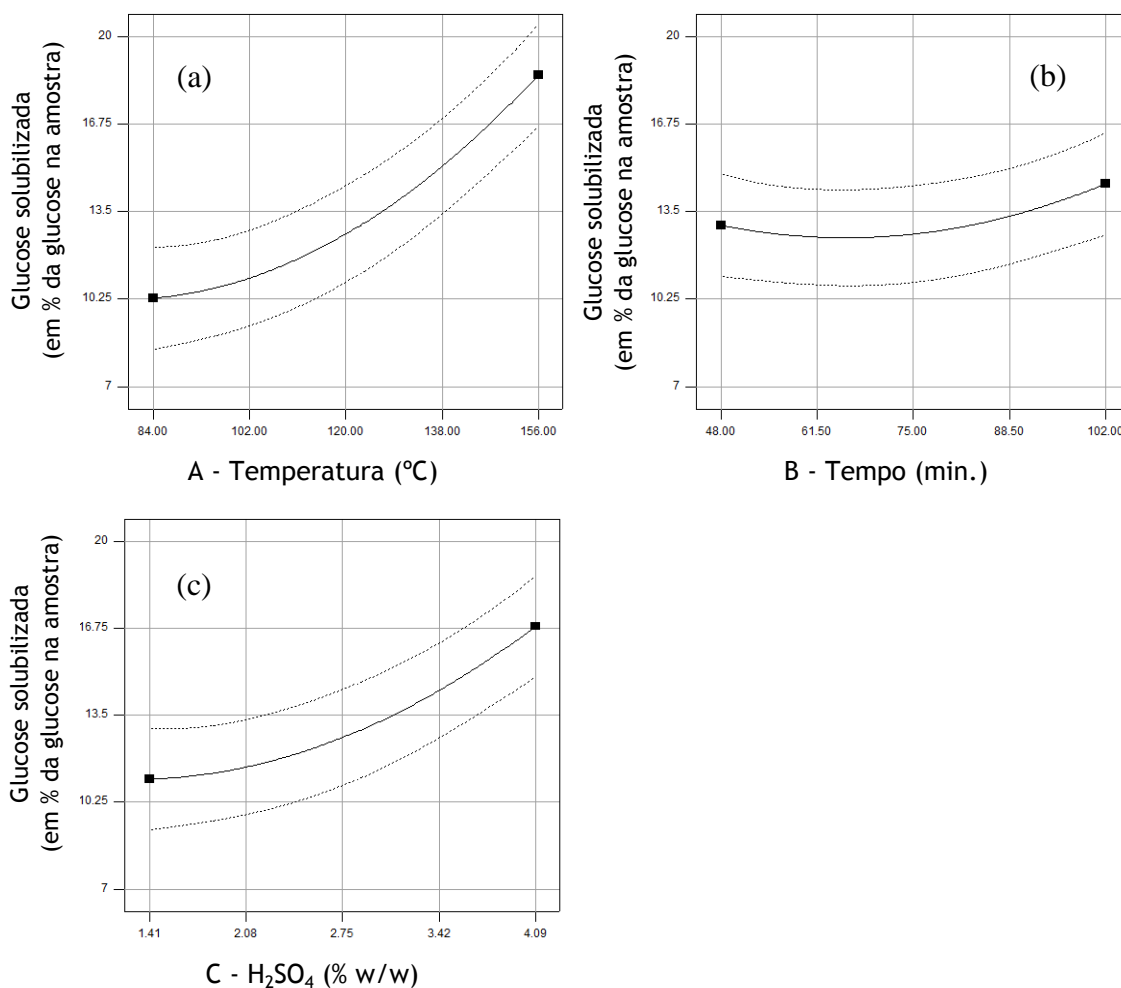


Figura 3.5 - Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico (c) nas taxas de solubilização da glucose com as restantes condições constantes:
a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min

A figura 3.5 mostra-nos que a temperatura e a concentração de ácido sulfúrico revelaram um comportamento análogo, ou seja, à medida que se aumentou estes factores a taxa de solubilização da glucose aumentou. Nas taxas de solubilização da glucose verificou-se que o aumento da temperatura provocou um acréscimo ligeiramente superior ao aumento da concentração de ácido. O factor tempo exerceu uma reduzida influência nas taxas de solubilização da glucose tendo sido observado apenas um ligeiro acréscimo nas taxas de solubilização quando a temperatura dos pré-tratamentos ultrapassou os 75 minutos.

A figura 3.6 mostra o efeito conjugado da temperatura e concentração de ácido na solubilização da glucose.

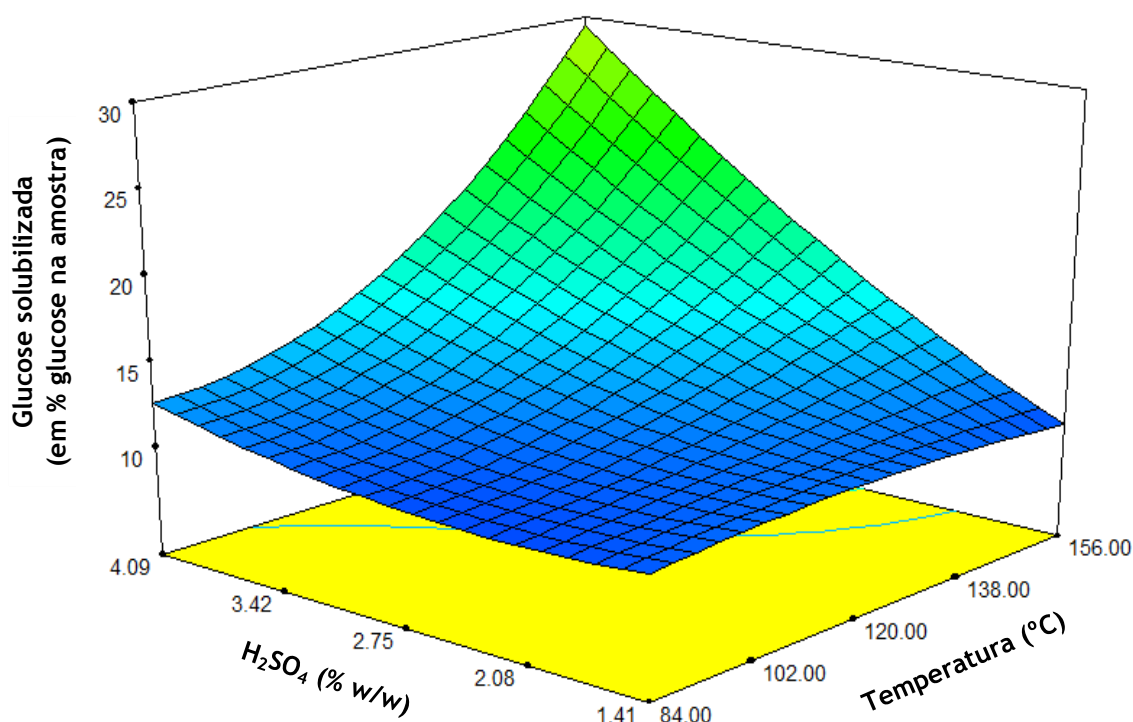


Figura 3.6 - Efeito conjugado da temperatura e da concentração de ácido sulfúrico na solubilização da glucose (Tempo constante = 75 minutos)

Como podemos constatar, pela análise da figura 3.6, o efeito conjugado da temperatura com a concentração de ácido sulfúrico revelou ter um impacto determinante nas taxas de solubilização da glucose. O aumento conjunto destes dois factores fez aumentar consideravelmente a taxa de solubilização da glucose obtendo-se nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 156°C e uma carga de ácido sulfúrico de 4,09% a solubilização de 30% da glucose existente na biomassa.

3.2.4 - Solubilização da xilose nos pré-tratamentos com H₂SO₄

A estimativa da taxa de solubilização de xilose também foi construída com base num modelo cúbico reduzido através da adição dos factores A²B, A²C e AB² na equação de estimativa. Na tabela 3.7 apresenta-se a análise ANOVA do modelo seleccionado juntamente com a equação (Eq. 3.3) de estimativa da taxa de solubilização da xilose em função da temperatura, tempo e concentração de ácido sulfúrico.

Tabela 3.7 - Análise ANOVA para estimativa das taxas de solubilização da xilose no pré-tratamento com H₂SO₄

Variável	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	15327.01	13	1179.00	14.93	< 0.0001
A-Temperatura	1183.50	1	1183.50	14.99	0.0009
B-Tempo	4.63	1	4.63	0.059	0.8111
C-Conc. ácido	49.43	1	49.43	0.63	0.4381
AB	4.93	1	4.93	0.062	0.8052
AC	2341.06	1	2341.06	29.65	< 0.0001
BC	63.84	1	63.84	0.81	0.3792
A ²	2490.81	1	2490.81	31.55	< 0.0001
B ²	422.82	1	422.82	5.36	0.0314
C ²	856.65	1	856.65	10.85	0.0036
ABC	26.10	1	26.10	0.33	0.5717
A ² B	28.67	1	28.67	0.36	0.5535
A ² C	979.45	1	979.45	12.40	0.0021
AB ²	468.82	1	468.82	5.94	0.0243
R ² = 0,9066 R ² _{ajustado} = 0,8459					

Eq. 3.3

Solubilização da Xilose (em % relativa da xilose na amostra)

$$\begin{aligned}
 &= -302,2118 + 5,02144 \times A + 5,67687 \times B + 50,1992 \times C \\
 &- 0,06072 \times A \times B - 1,38498 \times A \times C + 0,06421 \times B \times C \\
 &- 0,015956 \times A^2 - 0,033466 \times B^2 + 3,4438 \times C^2 - 0,00100 \times A \times B \times C \\
 &- 0,000061 \times A^2B + 0,00714 \times A^2C + 0,000329 \times AB^2
 \end{aligned}$$

O modelo encontrado para estimar a taxa de solubilização da xilose em função da temperatura, tempo e concentração de ácido encontra-se ajustado (p-valor < 0,0001) apresentando um coeficiente de determinação de 0,9066, ou seja, a equação estimada consegue explicar 90,66% dos resultados obtidos.

Como podemos observar pela análise da tabela 3.7 o tempo e concentração de ácido não foram factores determinantes na explicação da variação da solubilização da xilose. Esta foi determinada pelo quadrado da temperatura (F valor = 31,55) e pela conjugação entre a temperatura e a concentração de ácido (F valor = 29,65). Dos factores considerados isoladamente aquele que revelou ter maior influência na explicação do modelo foi a temperatura correspondendo-lhe um valor de F de 14,99.

O efeito decisivo da temperatura na solubilização da xilose foi também confirmado por diversos autores (Kim *et al.*, 2011c; Kim *et al.*, 2011b; Rafiquil e Sakinah, 2012). Na figura 3.7 podemos observar o efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico (c) nas taxas de solubilização da xilose

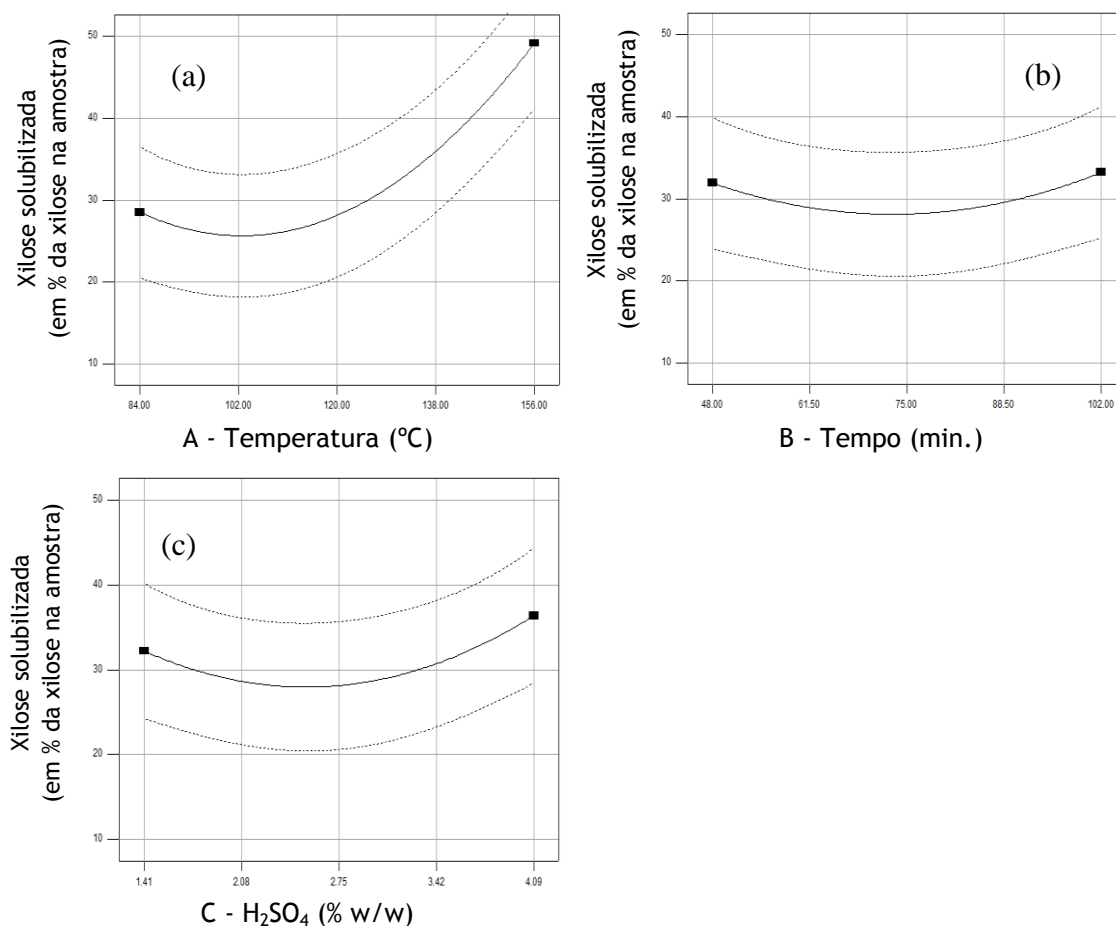


Figura 3.7 - Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico (c) nas taxas de solubilização da xilose com as restantes condições constantes:
(a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min

Na solubilização da xilose, de acordo com a leitura da figura 3.7, o tempo de duração dos pré-tratamentos, bem como, a concentração de ácido sulfúrico utilizado revelaram ter um comportamento “parabólico”. Isto é, nos valores extremos destes dois factores a taxa de solubilização da xilose aumentou contudo, nos valores intermédios a mesma taxa baixou apresentando o valor mínimo. A concavidade da parábola pareceu estar no caso do tempo próxima dos 75 minutos e no caso da concentração do ácido sulfúrico nas proximidades dos 2,75%. A variação da temperatura foi mais determinante na variação das taxas de solubilização da xilose que a variação do tempo ou da carga de ácido utilizada. Embora a curva de solubilização da xilose em função da temperatura também tenha apresentado um aspecto “parabólico”, a concavidade da parábola, correspondente ao valor mínimo, encontrava-se neste factor deslocada dos valores centrais para valores inferiores da

temperatura. Assim, a partir dos 102°C (valor mínimo) foi visível um aumento significativo nas taxas de solubilização da xilose com o aumento da temperatura, chegando-se a atingir uma taxa de solubilização de 50%, para temperaturas de pré-tratamento de 156°C. A figura 3.8 mostra o efeito conjugado da temperatura e da concentração de ácido sulfúrico nas taxas de solubilização da xilose.

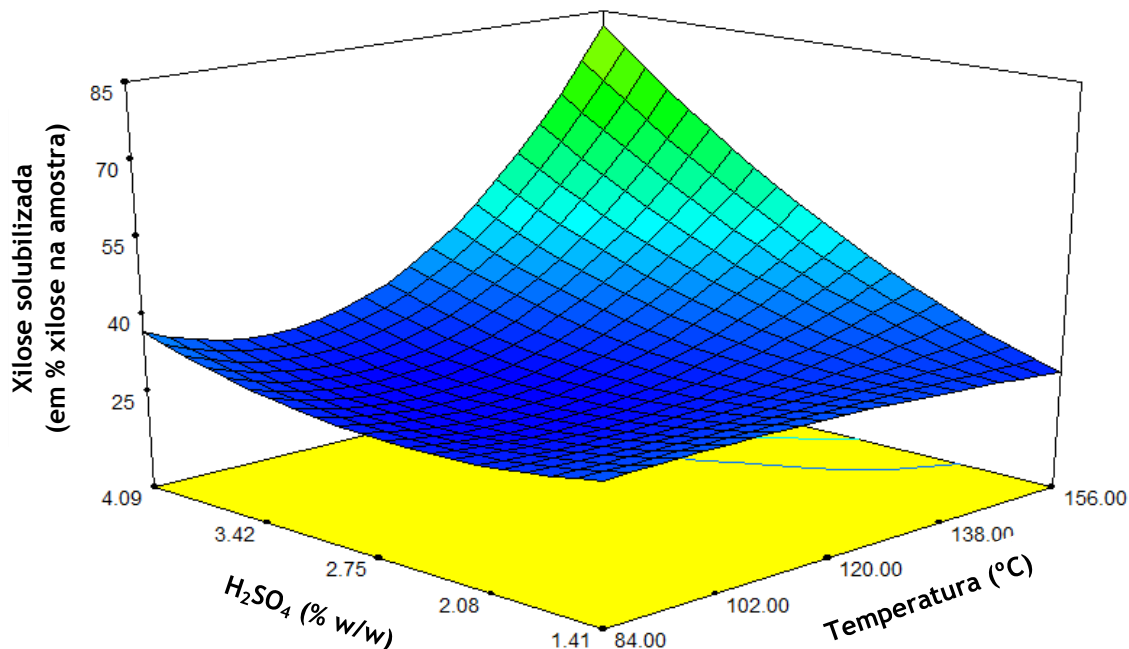


Figura 3.8 - Efeito conjugado da temperatura e da concentração de ácido sulfúrico na solubilização da xilose (Tempo constante = 75 minutos)

À semelhança do ocorrido com a solubilização da glucose, também neste caso, foi visível o efeito que os dois factores conjugados, temperatura e concentração de ácido, possuem na libertação da xilose para o hidrolisado (Figura 4.8). Este mesmo efeito também foi verificado por Canettieri e colaboradores na realização de pré-tratamentos com ácido sulfúrico em resíduos de Eucaliptos (Canettieri *et al.*, 2007; Gil *et al.*, 2012). Na análise da figura 3.8 é possível observar que as maiores taxas de solubilização de xilose foram registadas nos pré-tratamentos efectuados com temperaturas superiores a 120°C e com concentrações de ácido sulfúrico superiores a 2,75%. Assim, para se conseguir uma elevada taxa de solubilização da xilose é necessário que a temperatura e a carga de ácido sejam simultaneamente elevadas, não bastando a existência de um valor elevado para apenas um deles. Como podemos ver, pela análise da figura, foi possível obter uma taxa de solubilização da xilose próxima dos 85%, nos pré-tratamentos realizados, durante 75 minutos, com uma temperatura 156°C e uma concentração de ácido de 4,09%.

3.2.5 - Solubilização da arabinose nos pré-tratamentos com H₂SO₄

Na estimativa da taxa de solubilização arabinose utilizou-se o mesmo modelo cúbico reduzido, também com a incorporação dos factores A²B, A²C e AB², à semelhança do utilizado na estimativa das taxas de solubilização da glucose e da xilose. Na tabela 3.8 apresenta-se a análise ANOVA do modelo juntamente com a equação 3.4 de estimativa da taxa de solubilização da arabinose em função da temperatura, tempo e concentração de ácido sulfúrico.

Tabela 3.8 - Análise ANOVA para estimativa das taxas de solubilização da arabinose no pré-tratamento com H₂SO₄

Variável	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Model	60948.63	13	4688.36	168.42	< 0.0001
A-Temperatura	2751.82	1	2751.82	98.85	< 0.0001
B-Tempo	2297.52	1	2297.52	82.53	< 0.0001
C-Conc. ácido	10000.00	1	10000.00	359.23	< 0.0001
AB	41.15	1	41.15	1.48	0.2382
AC	41.15	1	41.15	1.48	0.2382
BC	41.15	1	41.15	1.48	0.2382
A ²	6683.21	1	6683.21	240.08	< 0.0001
B ²	123.37	1	123.37	4.43	0.0481
C ²	3004.40	1	3004.40	107.93	< 0.0001
ABC	41.15	1	41.15	1.48	0.2382
A ² B	1059.98	1	1059.98	38.08	< 0.0001
A ² C	5242.93	1	5242.93	188.34	< 0.0001
AB ²	7130.24	1	7130.24	256.14	< 0.0001
R ² = 0,9909 R ² _{ajustado} = 0,9851					

Eq. 3.4

Solubilização da Arabinose (em % relativa da arabinose na amostra)

$$\begin{aligned}
 &= -130,31644 - 6,71946 \times A + 18,45426 \times B - 190,78974 \times C \\
 &- 0,010173 \times A \times B + 4,02481 \times A \times C + 0,19549 \times B \times C \\
 &+ 0,05975 \times A^2 - 0,15737 \times B^2 - 6,44935 \times C^2 - 0,001256 \times A \times B \times C \\
 &- 0,00037 \times A^2 \times B - 0,01652 \times A^2 \times C + 0,001284 \times A \times B^2
 \end{aligned}$$

O modelo para estimativa da taxa de solubilização da arabinose encontra-se ajustado, como podemos observar pela leitura da tabela 3.8. O coeficiente de determinação encontrado foi de 0,9909 revelando que os factores utilizados explicam 99,09% da variação nas taxas de solubilização encontradas para a arabinose. Apenas 0,81% dos resultados obtidos podem ser devidos a outros factores que não os considerados neste modelo. O modelo também mostra que, quer os factores considerados individualmente (A, B e C) quer em combinações (A², C², A²C, A²B e AB²) foram significativos na explicação da variação das taxas de solubilização encontradas. Em todo o caso, a análise ao valor de F indica-nos que entre todos a concentração de ácido sulfúrico (F valor = 240.08) foi o factor mais determinante na justificação dos valores encontrados. Também Torget e colaboradores verificaram que a

solubilização da arabinose e da xilose se encontrava directamente relacionada com a concentração de ácido sulfúrico e o tempo de residência utilizados nos pré-tratamentos ácidos (Torget *et al.*, 1991). Na figura 3.9 expressa-se o efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico (c) nas taxas de solubilização da arabinose.

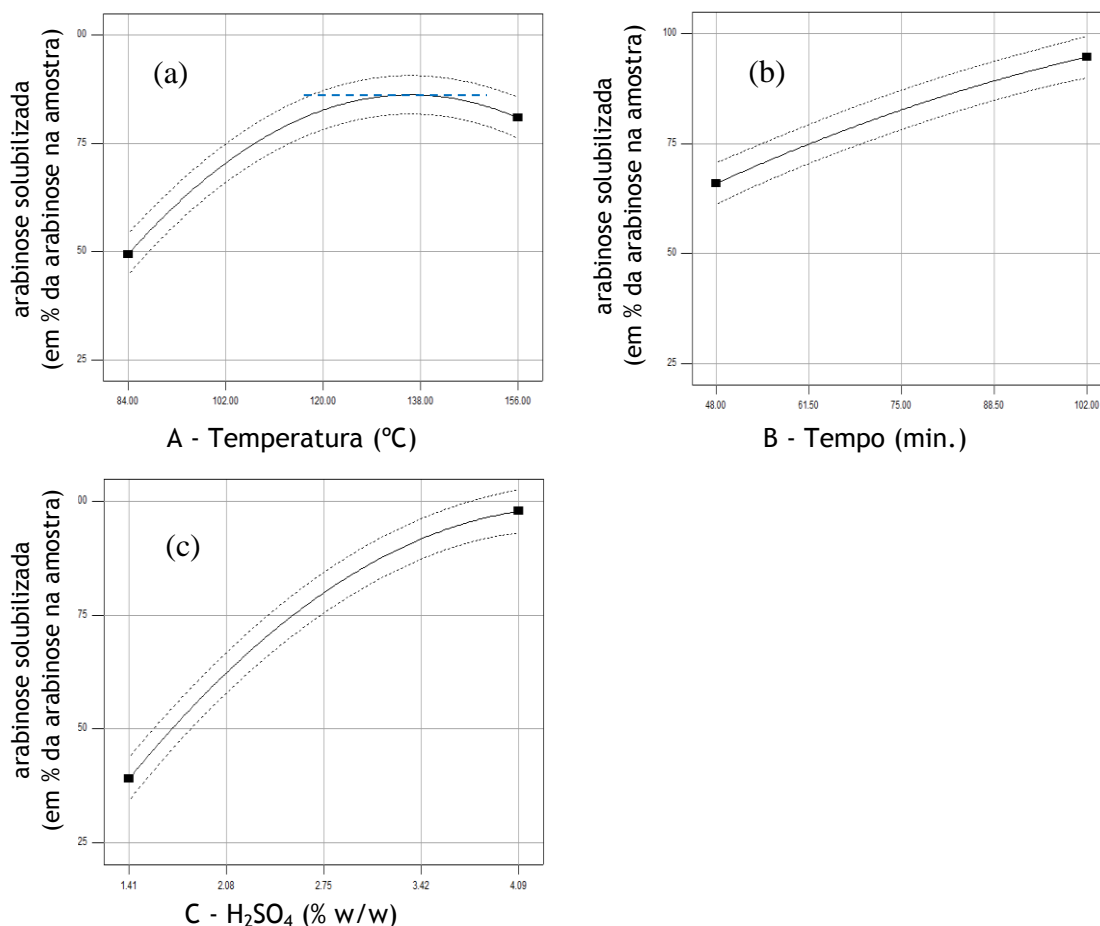


Figura 3.9 - Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico (c) nas taxas de solubilização da arabinose com as restantes condições constantes:
(a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min

A análise da figura 3.9 (a) mostra-nos que o aumento da temperatura inicialmente promoveu o aumento da taxa de solubilização da arabinose. Contudo, para pré-tratamentos realizados acima dos 138°C, os aumentos de temperatura tiveram como consequência a diminuição da taxa de solubilização da arabinose. Uma das hipóteses para este facto, já equacionada anteriormente, pode ser devida à perda das quantidades de arabinose encontradas no hidrolisado, devido à degradação deste açúcar em furfural. O aumento do tempo de duração dos pré-tratamentos e a carga de ácido aplicada influenciaram positivamente as taxas de solubilização, equivalendo o aumento destes factores ao aumento da solubilização da arabinose. A carga de ácido utilizado revelou ser um dos factores com maior impacto nas taxas de solubilização da arabinose. Note-se que, mantendo uma temperatura de 120°C e um tempo de residência de 75 minutos, quando aumentámos a concentração de ácido sulfúrico de

1,41% para 4,09% a taxa de solubilização da arabinose passou de 40% para 98%, um aumento de 58%.

3.2.6 - Formação de produtos de degradação nos hidrolisados resultantes de pré-tratamentos com H₂SO₄

O modelo cúbico reduzido foi o modelo seleccionado na estimativa das taxas de produtos de degradação presentes nos hidrolisados resultantes de pré-tratamento ácido. Na tabela 3.9 apresenta-se a análise ANOVA do modelo juntamente com a equação 3.5 de estimativa das taxas de produtos de degradação presentes nos hidrolisados, em função da temperatura, tempo e concentração de ácido sulfúrico.

Tabela 3.9 - Análise ANOVA para estimativa das taxas de produtos de degradação no pré-tratamento com H₂SO₄

Variável	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	146.03	13	11.23	80.69	< 0.0001
A-Temperatura	38.47	1	38.47	276.34	< 0.0001
B-Tempo	0.12	1	0.12	0.83	0.3725
C-Conc. ácido	1.00	1	1.00	7.17	0.0145
AB	6.08	1	6.08	43.67	< 0.0001
AC	1.73	1	1.73	12.41	0.0021
BC	1.28	1	1.28	9.19	0.0066
A ²	24.94	1	24.94	179.16	< 0.0001
B ²	1.27	1	1.27	9.15	0.0067
C ²	0.55	1	0.55	3.97	0.0601
ABC	0.47	1	0.47	3.38	0.0808
A ² B	1.08	1	1.08	7.79	0.0113
A ² C	0.13	1	0.13	0.94	0.3431
AB ²	0.17	1	0.17	1.20	0.2866
R ² = 0,9813 R ² _{ajustado} = 0,9691					

Eq. 3.5

Produtos de degradação (em % da amostra)

$$\begin{aligned}
 &= -2,73794 + 0,06160 \times A + 0,13675 \times B - 0,51182 \times C \\
 &- 0,00277 \times A \times B - 0,00288 \times A \times C + 0,00822 \times B \times C \\
 &- 0,00029 \times A^2 - 0,00041 \times B^2 + 0,08750 \times C^2 - 0,00013 \times A \times B \times C \\
 &+ 0,000012 \times A^2 \times B + 0,000083 \times A^2 \times C + 0,0000062 \times A \times B^2
 \end{aligned}$$

Pela observação da tabela 3.9 vemos que o modelo construído para estimativa dos produtos de degradação no hidrolisado é significativo apresentando um p-valor inferior a 0,0001. O coeficiente de determinação igual a 0,9813 indica que os factores utilizados explicam 98,13% da variação encontrada nas taxas produtos de degradação encontradas nos hidrolisados. O quadro da ANOVA indica-nos que o factor temperatura foi o factor mais determinante no valor de resposta obtido, com valores de F iguais a 276,34 e a 179,16. Em menor escala, o efeito

conjugado da temperatura e do tempo (F valor = 43,67) também contribuiu para a explicação da variação nas taxas de subprodutos e produtos de degradação encontradas no hidrolisado. A figura 3.10 apresenta o efeito da temperatura, do tempo e da concentração de ácido sulfúrico nas taxas produtos de degradação encontradas no hidrolisado, em % da amostra, com as restantes condições constantes.

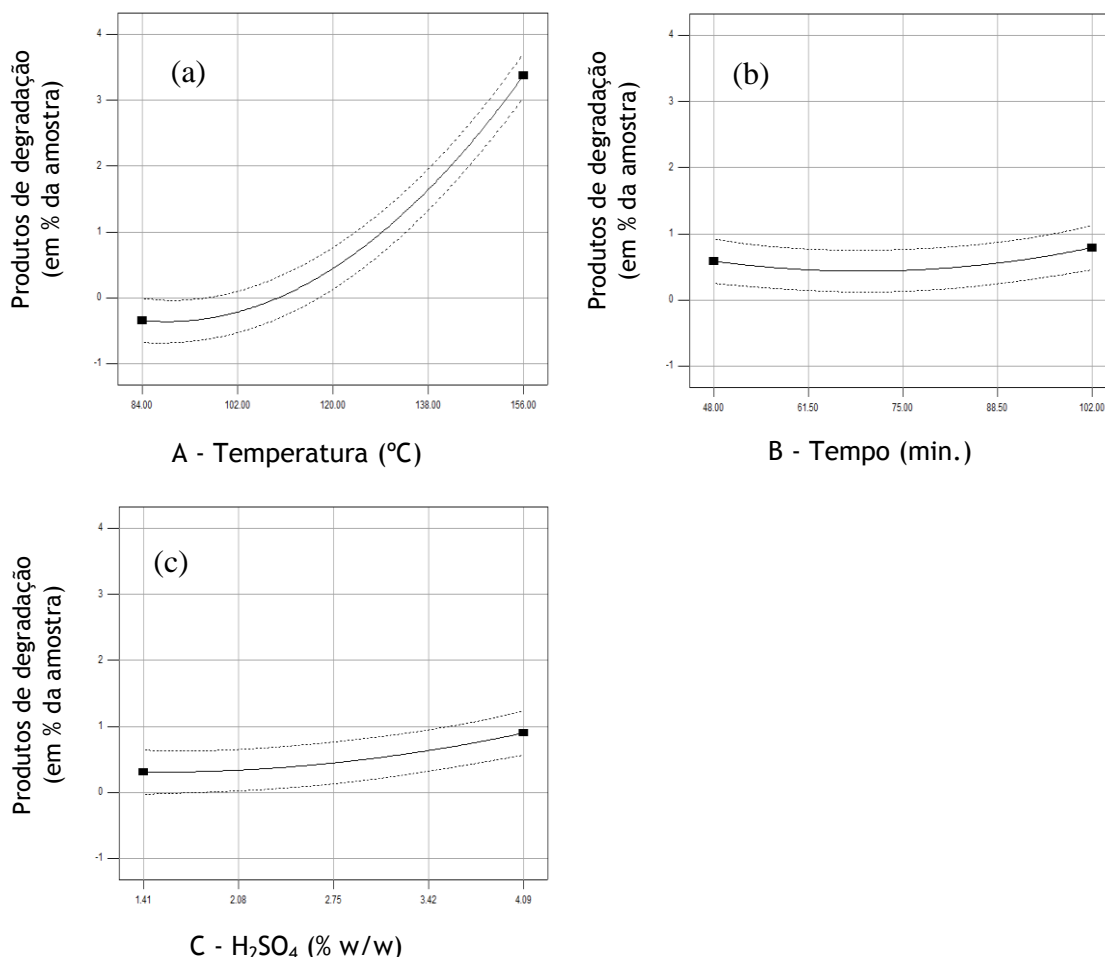


Figura 3.10 - Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico (c) nas taxas de produtos de degradação encontradas no hidrolisado, em % da amostra, com as restantes condições constantes:

(a) $B = 75\text{min}$ e $C = 2,75\%$; (b) $A = 120^\circ\text{C}$ e $C = 2,75\%$; (c) $A = 120^\circ\text{C}$ e $B = 75\text{min}$

Na figura 3.10 (a) podemos observar que o surgimento de produtos de degradação se verificou para temperaturas de pré-tratamento compreendidas entre 102 e 120°C, em torno dos 110°C. A partir desta temperatura os aumentos da temperatura provocam um aumento crescente nas concentrações de produtos de degradação encontradas nos hidrolisados.

O valor mínimo na taxa de produtos de degradação foi verificado para um valor central do factor tempo, de 75 minutos, a partir deste ponto, a diminuição ou o aumento do tempo de duração dos pré-tratamentos teve como consequência um aumento ligeiro ($< 0,5\%$) da taxa de produtos de degradação presentes nos hidrolisados.

O aumento da concentração de ácido de 1,41% para 4,09%, como podemos observar através da leitura da figura 3.10 (c), também provocou um aumento (< 1%) na taxa de produtos de degradação presente nos hidrolisados.

A leitura da tabela 3.9 mostra-nos que o efeito combinado da temperatura com o tempo foi considerado um factor significativo na explicação do modelo. Desta forma, a figura 3.11 apresenta graficamente o efeito desta conjugação sobre as taxas de produtos de degradação geradas.

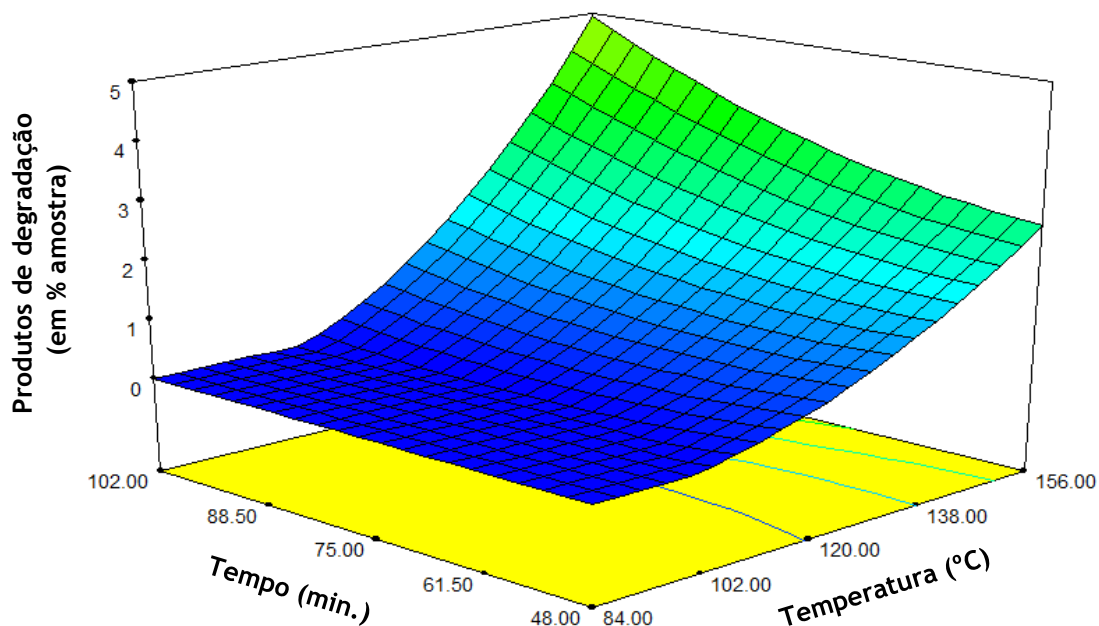


Figura 3.11 - Efeito conjugado da temperatura e do tempo nas taxas de subprodutos e produtos de degradação encontradas nos hidrolisados ($H_2SO_4 = 2,75\%$)

Como podemos observar, pela análise da figura 3.11, o aumento da duração dos pré-tratamentos realizados a temperaturas superiores a 120°C tem como efeito o aumento das taxas de produtos de degradação encontradas nos hidrolisados. Abaixo desta temperatura a produção de subprodutos e produtos de degradação mantém-se nula independentemente de aumentarmos o tempo de duração.

Ao contrário de outros autores (Heredia-Olea *et al.*, 2012) não verificámos no presente trabalho a influência do sinergismo entre a concentração de ácido e o tempo de residência (BC) no aparecimento de produtos de degradação nos pré-tratamentos ácidos.

Cassales e colaboradores obtiveram resultados similares na variação dos teores de açúcares e produtos de degradação encontrados nos hidrolisados resultantes de pré-tratamento com ácido sulfúrico utilizando com casca de soja como substrato. Os resultados dos seus modelos de resposta de superfície confirmam o decréscimo dos teores de xilose a partir dos 150°C, o decréscimo dos teores da arabinose a partir dos 120°C e o aumento gradual dos produtos de degradação a partir dos 140°C (Cassales *et al.*, 2011).

3.2.7 - Proporção de resíduo sólido nos pré-tratamentos com H₂SO₄

A primeira análise efectuada ao resíduo sólido foi a determinação do seu peso seco. Esta determinação permite saber a quantidade de matéria perdida para o hidrolisado. A figura 3.12 apresenta a proporção de resíduo sólido, em percentagem do peso da amostra.

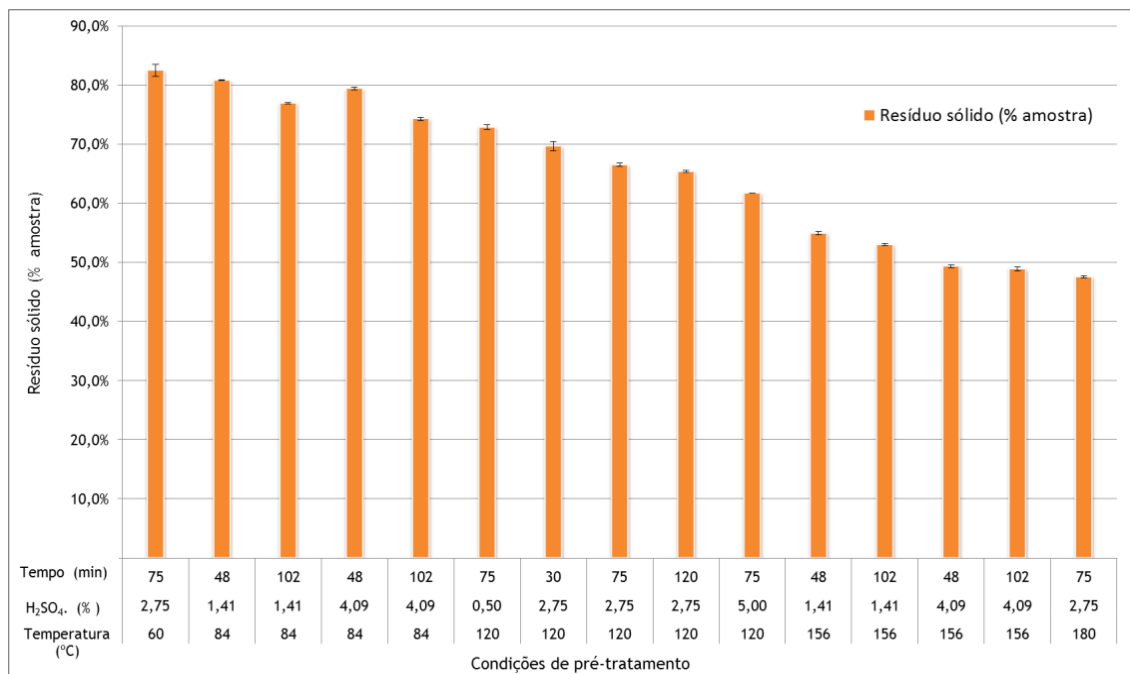


Figura 3.12 - Proporção do resíduo sólido em percentagem do peso da amostra

Como podemos observar à medida que se aumenta a severidade dos pré-tratamentos diminui o peso do resíduo sólido. A componente sólida resultante dos pré-tratamentos ácidos variou desde 82,5% a 47,5% quando se elevou a temperatura dos pré-tratamentos de 60°C para 180°C, mantendo-se a carga de ácido aplicada e a duração dos pré-tratamentos. O peso seco do resíduo sólido diminuiu consistentemente à medida que se aumentou a severidade dos pré-tratamentos. Nos três pré-tratamentos mais severos, ou seja, no realizado a 180°C e nos realizados a 156°C, com uma carga de ácido de 4,09%, o peso do resíduo sólido situou-se abaixo dos 50%, em % do peso da amostra. De forma a perceber a influência da temperatura, tempo e carga de ácido sulfúrico realizou-se o tratamento estatístico da proporção do resíduo sólido (Tabela 3.10).

Tabela 3.10 - Análise ANOVA para estimativa da proporção do resíduo sólido no pré-tratamento com H₂SO₄

Variável	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	4175.83	3	1391.94	377.18	< 0.0001
A-Temperatura	3942.54	1	3942.54	1068.33	< 0.0001
B-Tempo	27.46	1	27.46	7.44	0.0105
C-Conc. ácido	205.83	1	205.83	55.77	< 0.0001
R ² = 0,9742	R ² _{ajustado} = 0,9176				
Eq. 3.6					
Proporção do resíduo sólido (em % da amostra)					
$= +114,54857 - 0,33676 \times A - 0,037475 \times B - 2,05187 \times C$					

O modelo linear determinado encontra-se ajustado apresentando um p-valor <0,0001. O coeficiente de determinação apresenta um valor de 0,9742 significando que apenas 2,58% da variação encontrada nas respostas pode ser devido a outros factores que não os considerados neste modelo. O teste de F mostra-nos claramente que o factor temperatura é o mais determinante na explicação do modelo. Este facto era esperado, uma vez que este mesmo factor revelou-se determinante na libertação para o hidrolisado de todas as respostas anteriormente analisadas (ART, Glucose, Xilose, Subprodutos e Produtos de degradação).

A figura 3.13 apresenta a influência que a temperatura (a), o tempo (b) e a concentração de ácido sulfúrico (c) possuem na proporção do resíduo sólido.

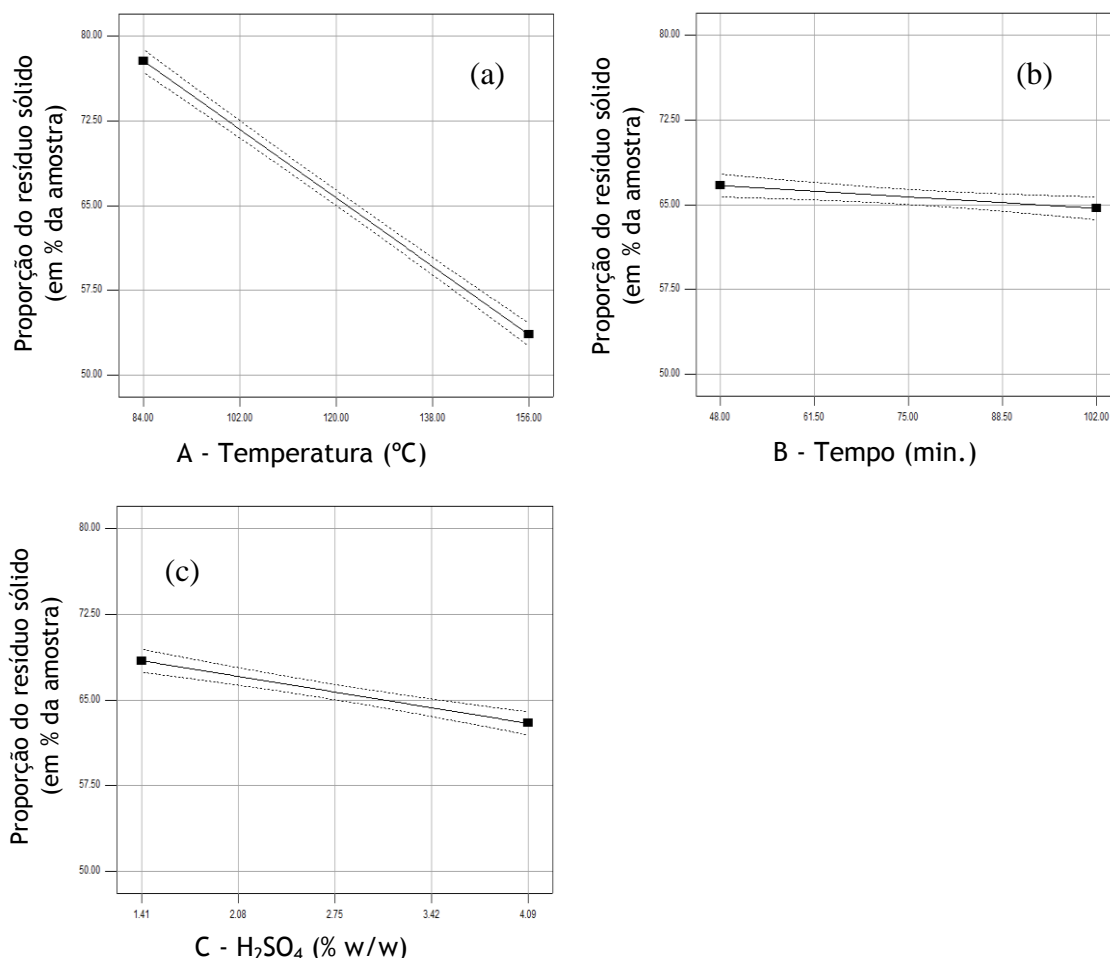


Figura 3.13 - Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico na proporção do resíduo sólido, em % da amostra, com as restantes condições constantes:

(a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min

A leitura da figura 3.13 serve para confirmar a importância do factor temperatura na proporção do resíduo sólido remanescente do pré-tratamento ácido. Como podemos visualizar na figura 3.13 (a) o aumento da temperatura fez diminuir a proporção do resíduo sólido, uma vez que, favorece como já vimos a solubilização dos açúcares presentes na biomassa.

Este efeito caracteriza-se por ser linear podendo a evolução ser definida por uma recta de declive negativo. Na figura 3.13 (b) vemos que o aumento na duração dos pré-tratamentos provoca uma redução diminuta na proporção do resíduo sólido resultante.

O aumento da concentração de ácido, de acordo com a figura 3.13 (c), provoca também uma diminuição do peso do resíduo sólido, mais acentuada que a provocada pelo tempo, mas menor que a provocada pelo aumento da temperatura.

3.2.8 - Proporção de lenhina no resíduo sólido

A figura 3.14 apresenta a constituição, em lenhina e açúcares, do resíduo sólido nas diferentes condições de pré-tratamento ensaiadas.

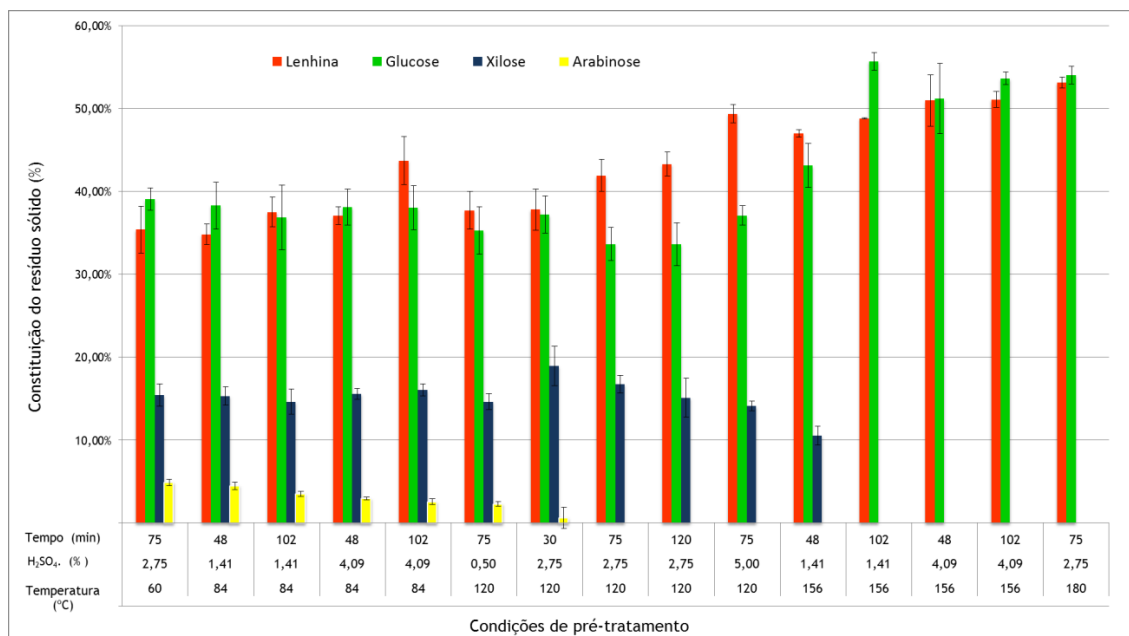


Figura 3.14 - Constituição do resíduo sólido nas diferentes condições de pré-tratamento

A observação da figura 3.14 mostra que a proporção de lenhina no resíduo sólido aumentou com a severidade dos pré-tratamentos como resultado da solubilização das hemiceluloses. Como podemos observar a saída para o hidrolisado, primeiro da arabinose, depois da xilose fez com que nos quatro pré-tratamentos realizados com maior severidade o resíduo sólido fosse constituído, quase em partes iguais, por glucose e lenhina.

A proporção de lenhina no resíduo sólido foi estimada com base num modelo cúbico reduzido. A selecção do modelo ANOVA foi realizada com base no valor do coeficiente de determinação. A tabela 3.11 apresenta a análise ANOVA para estimativa da proporção de lenhina no resíduo sólido remanescente dos pré-tratamentos ácidos.

Tabela 3.11 - Análise ANOVA para estimativa da proporção de lenhina no resíduo sólido resultante de pré-tratamento com H₂SO₄

Variável	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	1109.58	13	85.35	26.57	< 0.0001
A-Temperatura	315.35	1	315.35	98.18	< 0.0001
B-Tempo	7.62	1	7.62	2.37	0.1391
C-Conc. ácido	93.72	1	93.72	29.18	< 0.0001
AB	13.80	1	13.80	4.30	0.0513
AC	0.10	1	0.10	0.031	0.8613
BC	0.090	1	0.090	0.028	0.8687
A ²	10.50	1	10.50	3.27	0.0857
B ²	3.18	1	3.18	0.99	0.3315
C ²	13.58	1	13.58	4.23	0.0531
ABC	8.21	1	8.21	2.56	0.1255
A ² B	0.36	1	0.36	0.11	0.7430
A ² C	7.11	1	7.11	2.21	0.1525
AB ²	3.00	1	3.00	0.93	0.3452
R ² = 0,9453 R ² _{ajustado} = 0,9097					

Eq. 3.7

Proporção de lenhina no resíduo sólido (em % do resíduo sólido)

$$\begin{aligned}
 &= +28,90777 - 0,15881 \times A + 0,61897 \times B - 14,08107 \times C \\
 &- 0,00501 \times A \times B + 0,18969 \times A \times C + 0,06521 \times B \times C \\
 &+ 0,00170 \times A^2 - 0,00369 \times B^2 + 0,43356 \times C^2 - 0,00056 \times A \times B \times C \\
 &+ 0,0000068 \times A^2 \times B + 0,000608 \times A^2 \times C + 0,000026 \times A \times B^2
 \end{aligned}$$

O modelo obtido para estimativa da proporção de lenhina no resíduo sólido é estatisticamente válido. O modelo apresenta um coeficiente de determinação de 0,9453 explicando os factores utilizados na equação de regressão 94,53% da variação nos valores de lenhina encontrados. A leitura dos valores de F indica-nos que os factores lineares temperatura e concentração de ácido são os mais determinantes na explicação da variação do teor de lenhina. Esta tabela também nos indica que a influência na proporção de lenhina no resíduo sólido não se encontra relacionada com a combinação de factores, mas antes com a acção individual da temperatura e da concentração. A influência isolada destes factores pode ser observada na figura 3.15. Nesta apresenta-se o efeito da temperatura, tempo e concentração de ácido na variação dos teores de lenhina presente no resíduo sólido.

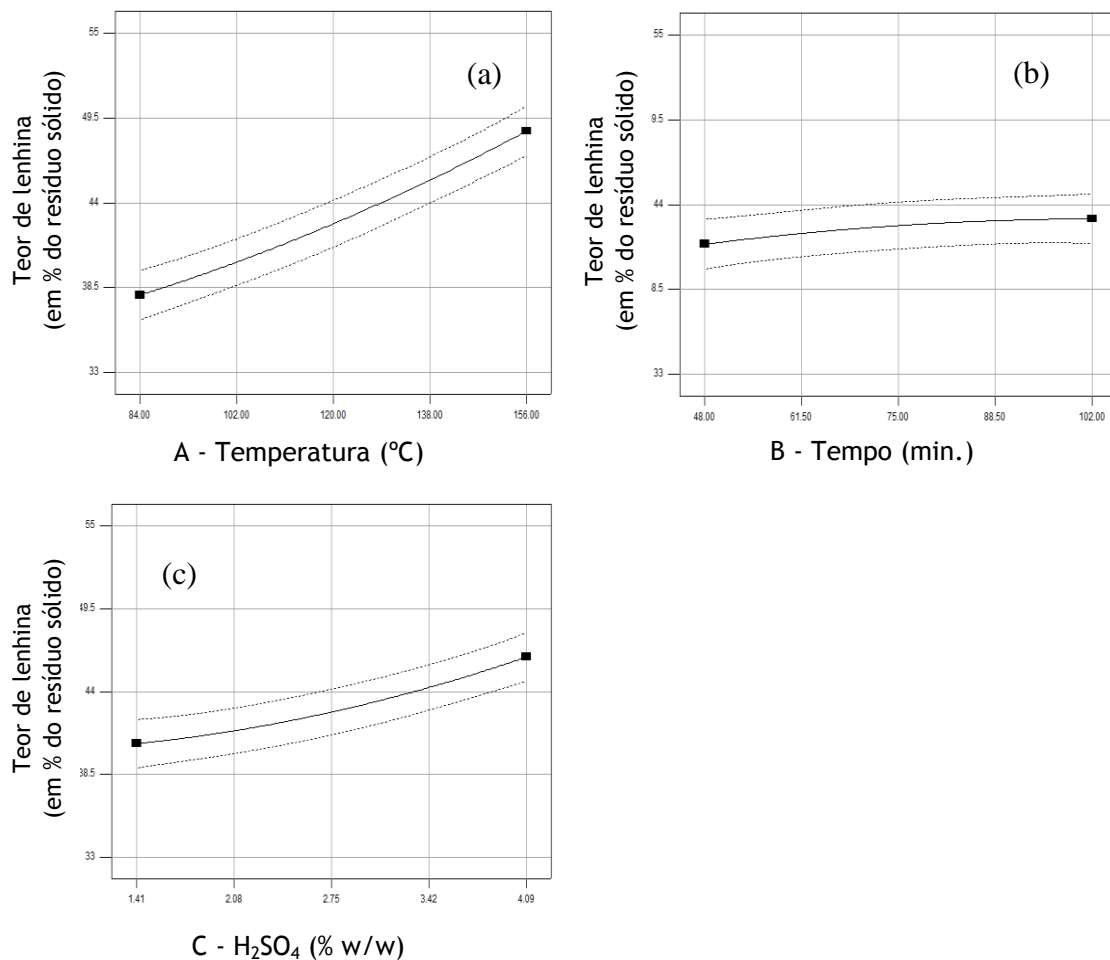


Figura 3.15 - Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico no teor de lenhina presente no resíduo sólido, em % do resíduo sólido, com as restantes condições constantes:

(a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min

Como podemos observar na figura 3.15 a temperatura e depois o ácido foram os factores que mais influenciaram as proporções de lenhina encontrada no resíduo sólido. De todos os factores considerados, o aumento da temperatura foi aquele que maior efeito teve no aumento da proporção de lenhina no resíduo sólido. A figura 4.15 (a) mostra que, mantendo o tempo e a carga de ácido constante, quando se aumentou a temperatura de 84°C para 180°C a proporção de lenhina no resíduo sólido aumentou cerca de 10,5%, passando de 38,0% para cerca de 48,5%. O aumento da concentração de ácido (Figura 4.15 c) provocou acréscimos na proporção de lenhina no resíduo sólido de menor amplitude que os provocados anteriormente pelo aumento da temperatura. O aumento na carga de ácido utilizado de 1,41% para 4,09% fez aumentar, em apenas cerca de 6%, a proporção de lenhina no resíduo sólido. O efeito do aumento do tempo de duração dos pré-tratamentos foi diminuto no aumento da proporção de lenhina presente no resíduo sólido parecendo no entanto, esse efeito ser mais considerável nas classes de tempo abaixo dos 75 minutos.

3.2.9 - Proporção de glucose no resíduo sólido

A tabela 3.12 apresenta a análise de variância, juntamente com a equação de estimativa (Eq.3.8), para as proporções de glucose encontrados no resíduo sólido, utilizando um modelo cúbico reduzido como superfície de resposta.

Tabela 3.12 - Análise ANOVA para estimativa da proporção de glucose no resíduo sólido resultante de pré-tratamento com H₂SO₄

Variável	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	1886.33	13	145.10	10.06	< 0.0001
A-Temperatura	224.22	1	224.22	15.55	0.0008
B-Tempo	30.76	1	30.76	2.13	0.1597
C-Conc. ácido	3.30	1	3.30	0.23	0.6374
AB	68.21	1	68.21	4.73	0.0418
AC	14.74	1	14.74	1.02	0.3240
BC	19.42	1	19.42	1.35	0.2595
A ²	741.85	1	741.85	51.44	< 0.0001
B ²	47.44	1	47.44	3.29	0.0848
C ²	96.86	1	96.86	6.72	0.0174
ABC	50.28	1	50.28	3.49	0.0766
A ² B	59.98	1	59.98	4.16	0.0548
A ² C	0.74	1	0.74	0.051	0.8235
AB ²	29.04	1	29.04	2.01	0.1713
R ² = 0,8674 R ² _{ajustado} = 0,7812					

Eq. 3.8

Proporção de glucose no resíduo sólido (em % do resíduo sólido)

$$\begin{aligned}
 &= +2,57552 + 0,71960 \times A + 1,74866 \times B - 15,74331 \times C \\
 &- 0,02751 \times A \times B + 0,07722 \times A \times C + 0,13579 \times B \times C \\
 &- 0,00266 \times A^2 - 0,00781 \times B^2 + 1,15803 \times C^2 - 0,00139 \times A \times B \times C \\
 &+ 0,000088 \times A^2 \times B + 0,000196 \times A^2 \times C + 0,000082 \times A \times B^2
 \end{aligned}$$

A tabela 3.12 mostra-nos que o modelo construído é significativo apresentando um p-valor < 0,0001 contudo o coeficiente de determinação encontra-se abaixo de 0,90, ou seja, os factores utilizados neste modelo apenas conseguem explicar a variação de 86,74% dos resultados obtidos. Este resultado pode ser devido ao facto da glucose ser constituinte da celulose mas também da hemicelulose tendo estes dois compostos comportamentos distintos na solubilização. Este facto tem como consequência que um mesmo modelo tenha dificuldade em traduzir cabalmente dois tipos de respostas tão distintas. A temperatura do pré-tratamento foi o factor mais preponderante na explicação da variação das proporções de glucose encontrada no resíduo sólido, tendo sido o quadrado da temperatura (A²) o factor mais determinante nessa explicação, com um valor de F igual a 51,44.

A figura 3.16 mostra o efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico no teor de glucose presente no resíduo sólido, em % do resíduo sólido, com as restantes condições constantes

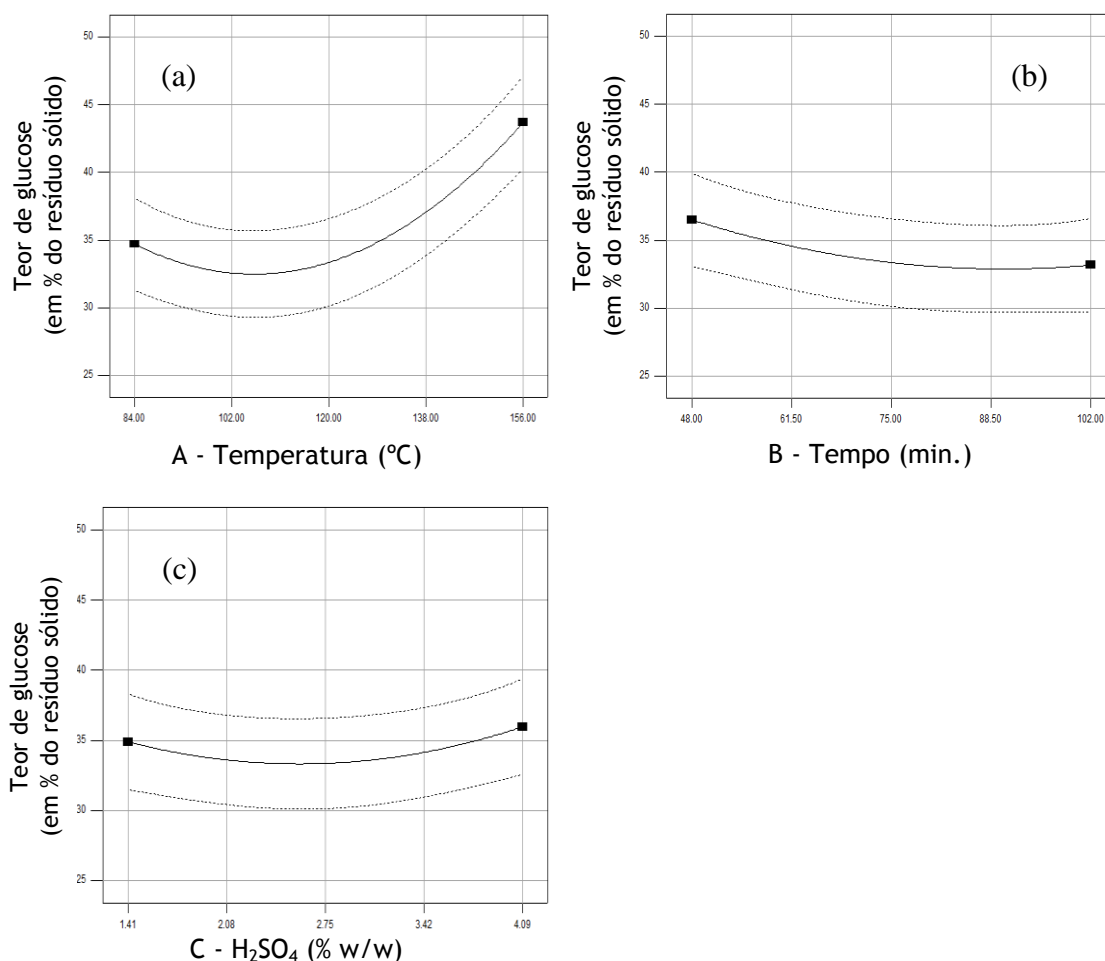


Figura 3.16 - Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico no teor de glucose presente no resíduo sólido, em % do resíduo sólido, com as restantes condições constantes:

(a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min

A análise da figura 3.16 (a) mostra que à medida que se aumentou a temperatura, desde os 84°C até uma temperatura compreendida entre os 102°C e os 120°C as proporções de glucose no resíduo sólido decrescem. Este comportamento deveu-se à permanência da lenhina e da xilose, em taxas quase constantes, no resíduo sólido até aos 120°C. A partir desta temperatura a solubilização da arabinose e da xilose provocou a perda de peso do resíduo sólido conduzindo a um aumento na proporção de glucose presente no resíduo sólido, compensando o aumento da solubilização deste açúcar com o aumento da severidade dos pré-tratamentos. Podemos confirmar este comportamento pela analogia gráfica, para a temperatura e concentração de ácido, existente entre a figura 3.16 e a figura 3.7 relativa à solubilização da xilose.

Como podemos observar na figura 3.16 (b) o aumento da duração do pré-tratamento tem como efeito uma diminuição ligeira da proporção de glucose no resíduo sólido, com tendência de estabilização acima dos 75 minutos.

A concentração de ácido teve uma variação similar à da temperatura, com um abaixamento da proporção de glucose no resíduo sólido até concentrações intermédias de ácido (em torno dos 2,75%) e posteriormente um aumento no teor de glucose, para valores acima de 2,75%.

3.2.10 - Proporção de xilose no resíduo sólido

Relativamente à proporção de xilose no resíduo sólido apresenta-se a seguir, na tabela 3.13, a análise de variância, acompanhada da equação de estimativa (Eq.3.9), utilizando-se um modelo cúbico reduzido como superfície de resposta.

Tabela 3.13 - Análise ANOVA para estimativa da proporção de xilose no resíduo sólido resultante de pré-tratamento com H₂SO₄

Variável	Soma dos quadrados	Df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	1468.64	13	112.97	19.41	< 0.0001
A-Temperatura	238.84	1	238.84	41.04	< 0.0001
B-Tempo	14.62	1	14.62	2.51	0.1287
C-Conc. ácido	0.27	1	0.27	0.047	0.8305
AB	24.37	1	24.37	4.19	0.0541
AC	34.63	1	34.63	5.95	0.0242
BC	37.25	1	37.25	6.40	0.0199
A ²	366.95	1	366.95	63.05	< 0.0001
B ²	12.19	1	12.19	2.09	0.1633
C ²	63.47	1	63.47	10.91	0.0036
ABC	19.76	1	19.76	3.39	0.0803
A ² B	0.47	1	0.47	0.081	0.7792
A ² C	6.77	1	6.77	1.16	0.2937
AB ²	22.68	1	22.68	3.90	0.0624
R ² = 0,9266	R ² _{ajustado} = 0,8788				

Eq. 3.9

Proporção de xilose no resíduo sólido (em % do resíduo sólido)

$$\begin{aligned}
 &= +23,75401 + 0,05330 \times A - 0,97953 \times B + 4,82653 \times C \\
 &+ 0,00905 \times A \times B + 0,46345 \times A \times C - 0,061784 \times B \times C \\
 &- 0,00095 \times A^2 + 0,00766 \times B^2 - 0,93742 \times C^2 + 0,00087 \times A \times B \times C \\
 &- 0,000008 \times A^2 \times B - 0,00059 \times A^2 \times C - 0,000072 \times A \times B^2
 \end{aligned}$$

A análise da variância, através da leitura da tabela 3.13, mostra que o modelo é estatisticamente válido possuindo um p-valor < 0,0001, encontrando-se por isso ajustado. Analisando o valor de F, verificamos que o quadrado da temperatura (A² - valor de F = 63,05) foi o factor que se revelou mais determinante na variação da resposta seguido pelo efeito linear do mesmo factor (A - valor de F = 41,04).

O coeficiente de determinação indica-nos que os factores utilizados conseguem explicar 92,66% da variação da xilose no resíduo sólido. A figura 3.17 mostra o efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico no teor de xilose presente no resíduo sólido, em % do resíduo sólido, com as restantes condições constantes

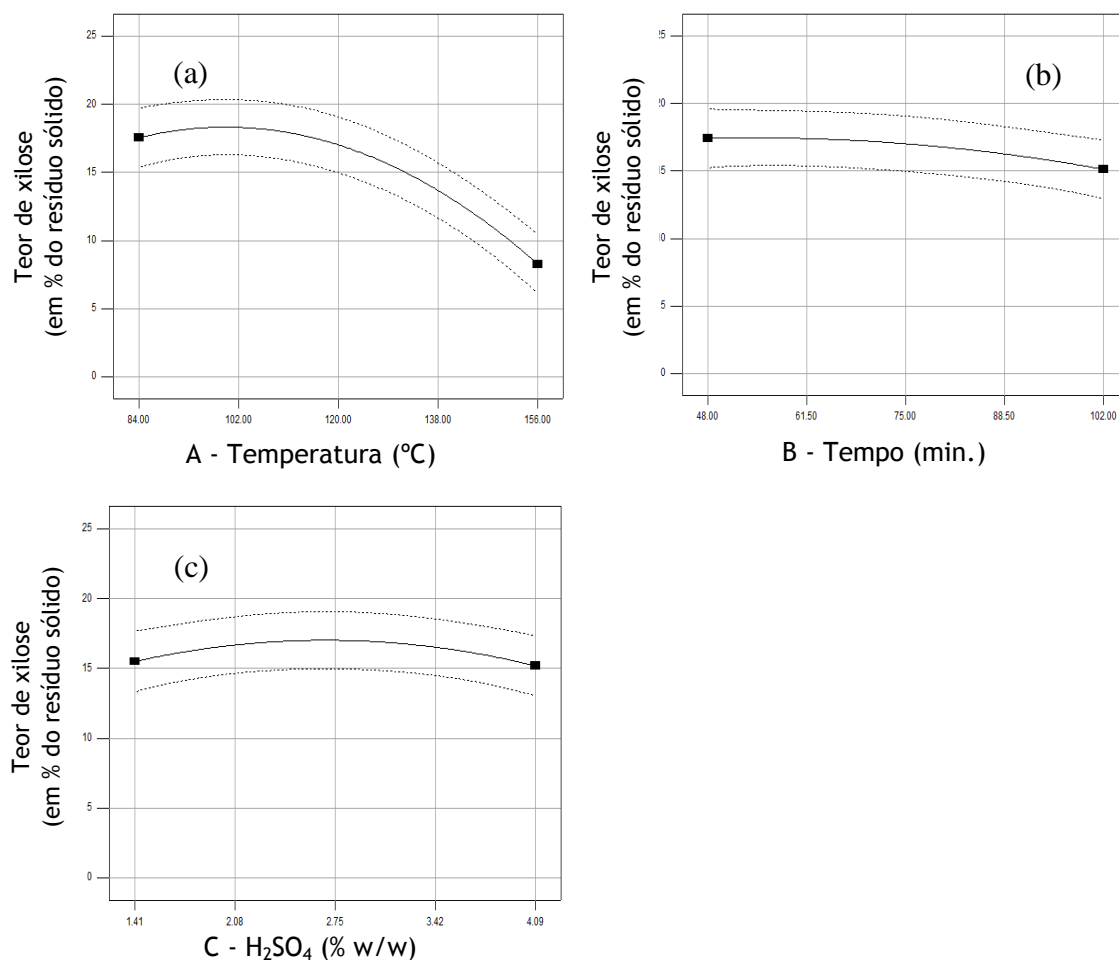


Figura 3.17 - Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico no teor de xilose presente no resíduo sólido, em % do resíduo sólido, com as restantes condições constantes:

(a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min

A observação da figura 3.17 mostra-nos que o factor temperatura foi aquele que mais influência teve na variação do teor de xilose no resíduo sólido. Como podemos observar pela análise da figura 3.17 (a) existiu um ligeiro aumento do teor de xilose no resíduo sólido quando se aumentou a temperatura de 84°C para 102°C. No entanto, acima dos 102°C o aumento da temperatura provocou a diminuição da xilose existente no resíduo sólido, obviamente devida ao aumento da solubilização daquele açúcar. O aumento da duração dos pré-tratamentos (Figura 3.17 b) teve como efeito uma redução ligeira nos teores de xilose encontrados no resíduo sólido, especialmente evidente para tempos de duração de pré-tratamentos acima dos 75 minutos. O aumento da carga de ácido (Figura 3.17 c) contribuiu,

até valores intermédios (2,75%), para o aumento do teor de xilose no resíduo sólido, acima daquele valor, mantendo a temperatura e o tempo inalterados, o aumento da carga de ácido provocou uma ligeira diminuição do teor de xilose no resíduo sólido. Se compararmos a figura 4.17 com a figura 4.16, relativa à glucose, observamos que os gráficos são simétricos. Esta simetria mostra como as proporções de glucose e xilose, no resíduo sólido, se encontram inversamente relacionados, isto é, o aumento da proporção de glucose no resíduo sólido deve-se directamente à diminuição da proporção de xilose no resíduo sólido por solubilização deste açúcar.

3.2.11 - Proporção de arabinose no resíduo sólido

A estimativa da proporção da arabinose no resíduo sólido foi realizada recorrendo à análise da variância, expressa na tabela 3.14. O modelo escolhido para estimar a concentração de arabinose recaiu sobre o modelo cúbico reduzido através da adição ao modelo quadrático de alguns factores cúbicos (A^2B , A^2C e AB^2). A equação 3.9 constante apresenta a estimativa da proporção de arabinose no resíduo sólido.

Tabela 3.14 - Análise ANOVA para estimativa da proporção de arabinose no resíduo sólido resultante de pré-tratamento com H_2SO_4

Variável	Soma dos quadrados	Df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	104.90	13	8.07	405.79	< 0.0001
A-Temperatura	24.02	1	24.02	1208.12	< 0.0001
B-Tempo	6.19	1	6.19	311.21	< 0.0001
C-Conc. ácido	5.36	1	5.36	269.67	< 0.0001
AB	0.56	1	0.56	28.25	< 0.0001
AC	1.69	1	1.69	84.79	< 0.0001
BC	0.12	1	0.12	6.12	0.0225
A^2	16.85	1	16.85	847.30	< 0.0001
B^2	4.32	1	4.32	217.28	< 0.0001
C^2	3.74	1	3.74	188.15	< 0.0001
ABC	0.12	1	0.12	6.12	0.0225
A^2B	2.02	1	2.02	101.63	< 0.0001
A^2C	0.88	1	0.88	44.12	< 0.0001
AB^2	0.41	1	0.41	20.72	0.0002
$R^2 = 0,9962$ $R^2_{ajustado} = 0,9938$					

Eq. 3.9

Proporção de arabinose no resíduo sólido (em % do resíduo sólido)

$$\begin{aligned}
 &= +10,15129 + 0,12662 \times A - 0,11439 \times B - 0,30279 \times C \\
 &- 0,00204 \times A \times B - 0,03936 \times A \times C + 0,01063 \times B \times C \\
 &- 0,00114 \times A^2 + 0,00178 \times B^2 + 0,22760 \times C^2 - 0,000068 \times A \times B \times C \\
 &+ 0,000016 \times A^2 \times B + 0,000214 \times A^2 \times C - 0,00001 \times A \times B^2
 \end{aligned}$$

A leitura da tabela 3.14 permite-nos afirmar que o modelo construído é significativo conseguindo traduzir a variação nos teores de arabinose remanescentes no resíduo sólido

resultante de pré-tratamentos com ácido sulfúrico. O coeficiente de determinação de 0,9962 indica-nos que apenas 0,38% dos resultados obtidos podem ser devidos a outros factores que não os considerados neste modelo. O teor de arabinose foi influenciado por uma série de factores, quer individuais quer em conjugações, no entanto com base no valor de F observamos que entre todos os factores, a temperatura foi o factor mais determinante ($F_A = 1208,12$; $F_A^2 = 847,30$), seguido da duração do pré-tratamento ($F_B = 311,21$; $F_B^2 = 217,28$) e da concentração de ácido ($F_C = 269,67$; $F_C^2 = 188,15$). Na figura 3.18 podemos observar a influência individual de cada um dos factores, mantendo os outros dois fixos, nos teores de arabinose encontrada no resíduo sólido.

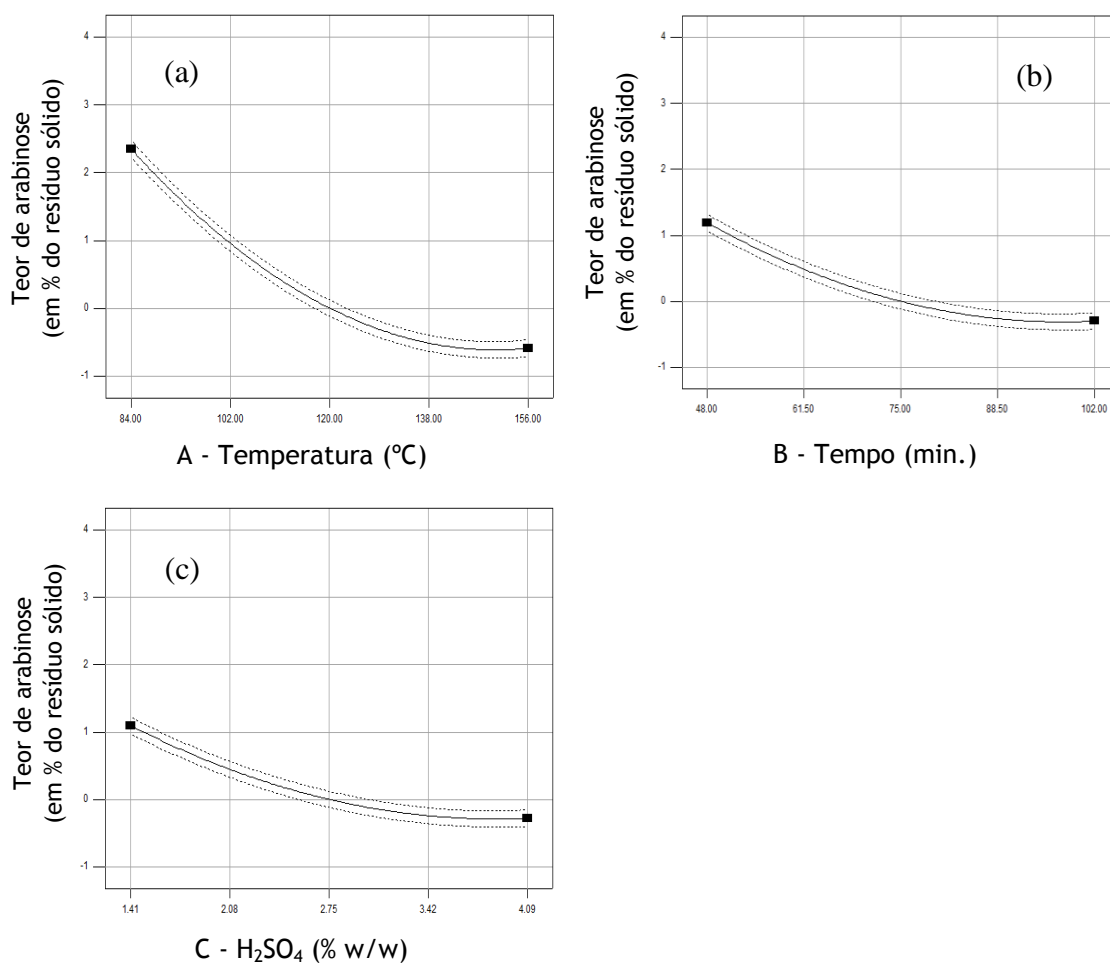


Figura 3.18 - Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de ácido sulfúrico no teor de arabinose presente no resíduo sólido, em % do resíduo sólido, com as restantes condições constantes:

(a) B = 75min e C = 2,75%; (b) A = 120°C e C = 2,75%; (c) A = 120°C e B = 75min

Em todos os três gráficos da figura 3.18 registou-se uma diminuição do teor de arabinose no resíduo sólido face a aumentos de temperatura (a), tempo (b) e concentração de ácido (c). No entanto, verificou-se que a diminuição da arabinose no resíduo sólido foi mais acentuada face a aumentos de temperatura (Figura 4.18 a), do que face a aumentos na duração dos pré-

tratamentos (Figura 3.18 b) ou a aumentos na concentração de ácido sulfúrico (Figura 3.18 c). A figura 3.18 também nos mostra, através da existência de valores negativos para a concentração da arabinose, que a partir dos 120°C de temperatura, de 75 minutos de duração de pré-tratamento e de 2,75% de carga de ácido deixou de existir arabinose no resíduo sólido. Os valores negativos resultam de não ser possível estabelecer, na equação de estimativa 4.9, um limite inferior igual a zero. A figura 3.19 mostra a influência da conjugação dos factores nos teores de arabinose encontrados no resíduo sólido.

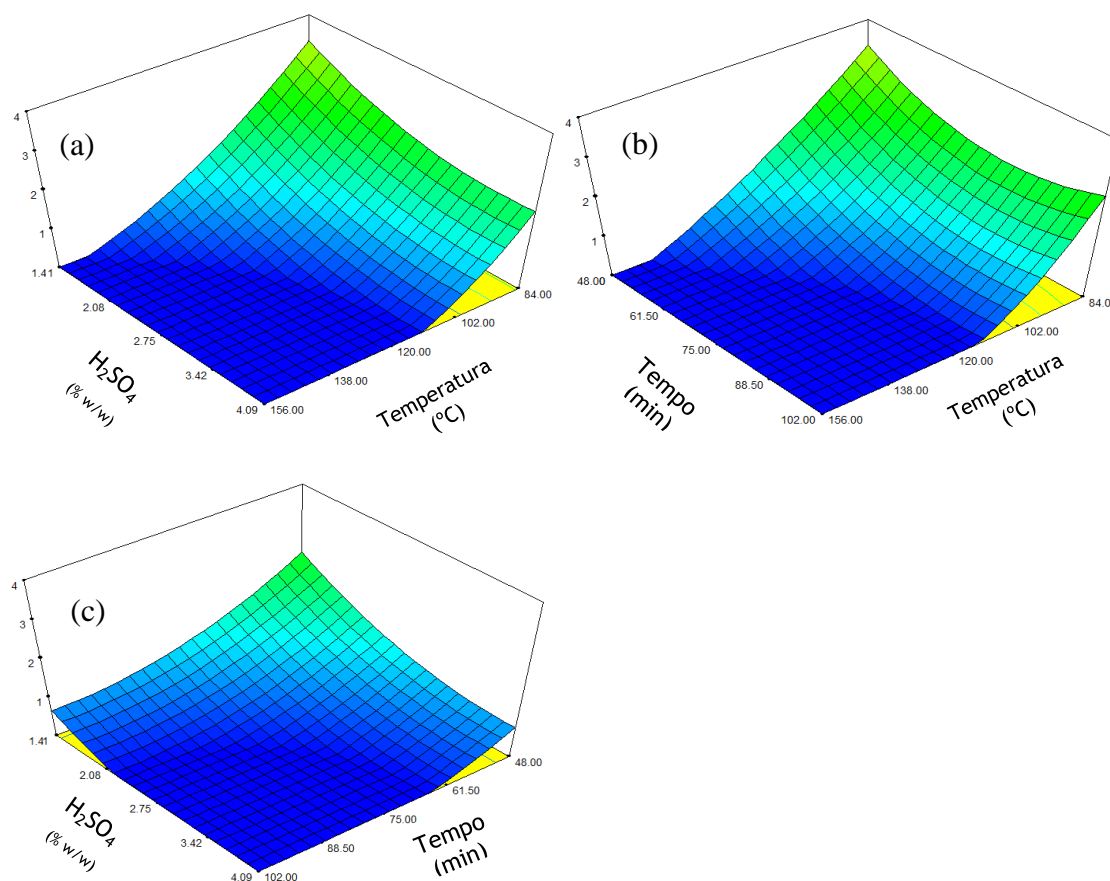


Figura 3.19 - Efeito da conjugação dos factores no teor de arabinose no resíduo sólido

- (a) Efeito conjugado da temperatura e da concentração de ácido, tempo = 75min
- (b) Efeito conjugado do tempo e da temperatura, $[H_2SO_4] = 2,75\%$
- (c) Efeito conjugado da concentração de ácido e do tempo, temperatura = 120°C

Como podemos observar as maiores variações no teor de arabinose no resíduo sólido ocorreram com os efeitos conjugados da temperatura com a concentração de ácido e da temperatura com o tempo. Em todas os gráficos observamos que a diminuição da arabinose no resíduo sólido está directamente relacionada com o aumento dos factores.

3.2.12 - Considerações finais sobre o pré-tratamento com ácido sulfúrico

1 - Os resultados mostram que no pré-tratamento ácido pode-se conseguir a solubilização das hemiceluloses com uma produção mínima de produtos de degradação utilizando temperaturas de pré-tratamento em torno dos 150-160°C, ainda que com cargas de ácido mais elevadas. O aumento para temperaturas acima de 160°C possui duas consequências ao nível da produção de etanol de 2ª geração. A primeira resulta da redução das quantidades de açúcares disponíveis para fermentação devido à transformação de açúcares em produtos de degradação, a segunda consequência advém do facto dos produtos de degradação gerados possuírem a capacidade de inibir os microorganismos utilizados no processo fermentativo, reduzindo por essa via a taxa de conversão de açúcares em álcool.

3 - Os resultados mostram que a solubilização da glucose é particularmente afectada pelo efeito conjugado da temperatura com a concentração de ácido sulfúrico (AC). Individualmente a temperatura (A) foi o factor com mais influência na solubilização da glucose sendo seguida pela concentração de ácido (C) e pelo efeito conjugado da temperatura com o tempo (AB). No trabalho realizado a solubilização máxima da glucose, 12,2% em percentagem do peso seco da amostra, foi obtida nos pré-tratamentos realizados a 156°C, durante 48 minutos e com 4,09% (w/w) de H₂SO₄

4 - Neste trabalho conseguiu-se obter a solubilização total da xilose nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 156°C e uma concentração de H₂SO₄ de 4,09%. Segundo a análise ANOVA efectuada esta solubilização é influenciada principalmente pelo quadrado da temperatura (A²). O efeito conjugado da temperatura com a concentração de ácido (AC) e o efeito linear da temperatura (A) são também factores determinantes na solubilização deste açúcar. A solubilização da xilose foi particularmente visível nos pré-tratamentos realizados com temperaturas acima de 120°C e concentrações de H₂SO₄ superiores a 2,75%. Nos pré-tratamentos realizados com temperaturas superiores a 156°C verificou-se um decréscimo dos teores de xilose no hidrolisado possivelmente devida à degradação deste açúcar.

5 - Neste pré-tratamento também se conseguiu, à semelhança da xilose, a solubilização integral da arabinose. A sua solubilização foi influenciada por ordem decrescente pela concentração de ácido, pelo efeito conjugado da temperatura com o tempo (AB²), pela temperatura (A²) e pelo efeito conjugado da temperatura com a concentração de ácido (A²C). A diminuição dos teores de arabinose no hidrolisado, possivelmente causada pela sua degradação, foi verificada para temperaturas acima dos 138°C.

6 - Neste trabalho verificámos que a formação de produtos de degradação foi principalmente influenciada pelo aumento da temperatura (A e A²). O efeito conjugado da temperatura com a duração (AB) dos pré-tratamentos também influenciou a formação destes produtos. No modelo construído a concentração de ácido não teve influência nas concentrações de produtos de degradação obtidas. Ao contrário de outros autores, não verificámos no presente trabalho a influência do sinergismo entre a concentração de ácido e o tempo de residência (BC) no aparecimento de produtos de degradação nos pré-tratamentos ácidos (Heredia-Olea *et al.*, 2012). A formação de produtos de degradação foi verificada para temperaturas acima de 110°C tendo no entanto, aumentado consideravelmente a detecção destes compostos no hidrolisado, a partir dos 156°C.

7 - O peso do resíduo sólido bem como a proporção dos seus constituintes é influenciado principalmente pela temperatura. Este facto resulta deste parâmetro ser considerado um factor determinante na solubilização de todos os açúcares. Na modelação efectuada dos vários constituintes do resíduo sólido a glucose foi aquele que apresentou um coeficiente de determinação mais baixo. Este facto deve-se possivelmente ao facto deste açúcar ser parte integrante de estruturas polimerizadas (celulose e hemiceluloses) com propriedades distintas em termos de solubilização.

3.3 - Pré-tratamento com hidróxido de sódio

O objectivo principal dos pré-tratamentos alcalinos é a remoção da lenhina. Este composto impede a hidrólise enzimática por duas vias, quer constituindo um obstáculo ao acesso por parte das celulasas à celulose e hemicelulose, quer através do estabelecimento de ligações constituídas entre a lenhina e as moléculas enzimáticas, através de interacções hidrofóbicas, levando à redução do número de moléculas livres para hidrólise (Berlin *et al.*, 2005; Eriksson *et al.*, 2002). O pré-tratamento com hidróxido de sódio (NaOH) tem sido utilizado maioritariamente em substratos herbáceos fornecendo bons resultados na remoção de lenhina, favorecendo por essa via o aumento da taxa de conversão de açúcares durante a hidrólise enzimática (Cheng, 2010; Silverstein *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2010).

3.3.1 - Lenhina no Hidrolisado alcalino (LH_{AL})

A determinação da LH_{AL} resulta da soma de duas componentes. A primeira componente foi obtida através da determinação do peso seco do precipitado alcalino resultante da acidificação dos hidrolisados e determinada por análise gravimétrica designando-se por lenhina precipitada (Lp). A segunda componente, relativa ao hidrolisado acidificado, foi definida como lenhina em solução (L_S) tendo sido determinada através das leituras de absorvância a 240nm no espectrofotómetro.

Na tabela 3.15 apre

senta-se a análise de variância para estimativa da LH_{AL} realizada a partir de um modelo linear, ao qual foi adicionada a interacção da temperatura com a concentração de NaOH (AC). A equação 3.10 apresenta a estimativa dos teores de LH_{AL} expressa em percentagem da lenhina na amostra.

Tabela 3.15 - Análise ANOVA para estimativa das taxas de LH_{AL}

Variável	Soma dos quadrados	Df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	103.22	4	25.80	117.98	< 0.0001
A-Temperatura	28.97	1	28.97	132.45	< 0.0001
B-Tempo	0.68	1	0.68	3.10	0.0889
C-Conc. NaOH	32.51	1	32.51	148.62	< 0.0001
AC	1.18	1	1.18	5.40	0.0273
R ² = 0,9421	R ² _{ajustado} = 0,9341				

Eq. 3.10

Equação de estimativa da LH_{AL} (em % da amostra)

$$= +5,6784 + 0,0175 \times A + 0,0053 \times B + 0,4643 \times C + 0,0052 \times A \times C$$

A análise da tabela 3.15 mostra-nos que o modelo construído para estimativa da LH_{AL} se encontra ajustado (p-valor <0,0001) traduzindo convenientemente este processo. O coeficiente de determinação indica-nos que os factores utilizados conseguem explicar 94,21% da variação nas taxas da LH_{AL} verificadas.

Dos factores utilizados a concentração de hidróxido de sódio e a temperatura do pré-tratamento revelaram-se os factores mais determinantes ($F_C = 148,62$ e $F_A = 132,45$) na explicação do modelo. A variação no tempo de duração dos pré-tratamentos não foi considerada um factor significativo na explicação da variação das taxas da LH_{AL} . Na figura 3.20 podemos observar a influência individual de cada um dos factores, mantendo os outros dois fixos, nas taxas de LH_{AL} encontradas.

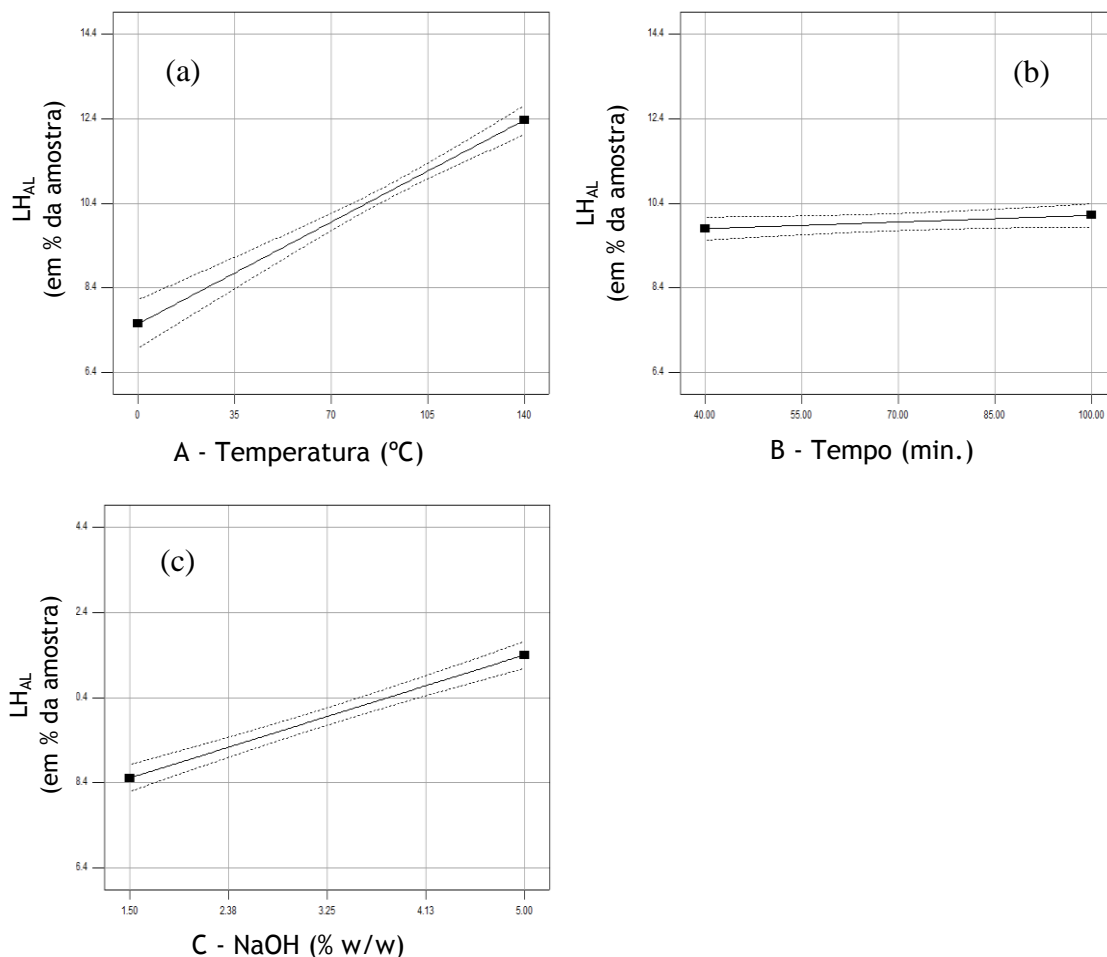


Figura 3.20 - Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de hidróxido de sódio nas quantidades de LH_{AL} , com as restantes condições constantes:

(a) $B = 70\text{min}$ e $C = 3,25\%$; (b) $A = 70^\circ\text{C}$ e $C = 3,25\%$; (c) $A = 70^\circ\text{C}$ e $B = 70\text{min}$

A figura 3.20 apresenta-nos uma relação directa entre o aumento da temperatura e da concentração de NaOH com as taxas LH_{AL} verificadas. Contrariamente, a variação do factor tempo (Fig.3.20b) parece não ter qualquer efeito na variação das taxas de LH_{AL} .

A tabela 3.16 mostra-nos a comparação entre as taxas de LH_{AL} observadas e as estimadas pelo modelo acima descrito.

Tabela 3.16 - Diferença entre as taxas de LH_{AL} observada e estimada, expressas em percentagem da amostra.

Temperatura (°C)	Tempo (min.)	NaOH (% w/w)	LH _{AL} obs. (%)	LH _{AL} est. (%)	Diferença (%)
40	70	3,25	9,18 ± 0,09	8,93	0,25
60	40	1,50	8,17 ± 0,42	8,10	0,07
60	100	1,50	8,68 ± 0,04	8,42	0,26
60	40	5,00	10,59 ± 0,13	10,81	-0,22
60	100	5,00	11,21 ± 0,04	11,13	0,09
90	70	0,31	7,31 ± 0,83	7,91	-0,60
90	20	3,25	10,04 ± 0,00	10,38	-0,35
90	70	3,25	10,74 ± 0,35	10,64	0,09
90	120	3,25	10,32 ± 0,05	10,91	-0,59
90	70	6,19	13,34 ± 0,31	13,38	-0,04
120	40	1,50	10,10 ± 0,02	9,62	0,49
120	100	1,50	10,25 ± 0,06	9,93	0,32
120	40	5,00	13,55 ± 0,19	13,42	0,13
120	100	5,00	13,94 ± 0,42	13,73	0,21
140	70	3,25	12,07 ± 0,22	12,36	-0,29
Desvio médio					0,27

A tabela 3.16 mostra-nos uma grande proximidade entre os valores observados e os estimados pela equação de regressão existindo um desvio médio na estimativa de apenas 0,27%. A preponderância da concentração de NaOH utilizada, pode ser vista na tabela, pelo facto de apenas nos ensaios realizados com uma carga de NaOH igual ou superior a 5% se verificarem taxas de LH_{AL} acima dos 13%. Entre todos os ensaios aqueles que apresentaram a taxa de LH_{AL} mais elevada (13,94 %) foram os realizados com uma concentração de NaOH de 5,00% (w/w), durante 100minutos e a uma temperatura de 120°C.

No procedimento realizado, a estimativa da LH_{AL}, de acordo com o reportado por Fengel e Wegener, poderá encontrar-se sobrestimada, quer devido à possibilidade de ocorrência de condensação de extractáveis, quer devido à formação de complexos entre a lenhina e os açúcares presentes no hidrolisado (Fengel e Wegener, 1984). Assim, das quantidades determinadas de LH_{AL} farão parte a lenhina solubilizada no pré-tratamento, os extractáveis condensados e os açúcares com ligação químicas estabelecidas com a lenhina.

3.3.2 - Constituição do resíduo sólido

A tabela 3.17 apresenta a constituição do resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com hidróxido de sódio. Ao contrário do que poderíamos prever os teores de lenhina mantiveram-se praticamente inalterados nos resíduo sólidos, nas diferentes condições de pré-tratamento previstas na modelação realizada com o auxílio do programa Design Expert. Nestes ensaios o

teor de lenhina no resíduo sólido oscilou, em percentagem do peso da amostra, entre 21,45% (90°C, 120min., 3,25% NaOH) e 25,80% (60°C, 40min., 1,50% NaOH), ou seja, o primeiro valor, expresso em percentagem da lenhina presente na amostra, equivale a uma remoção de 14,1%, o segundo valor a uma remoção de 0%.

Como hipótese equacionamos que talvez a amplitude dos factores temperatura, tempo e concentração tivesse sido demasiado pequena para provocar um efeito notório na taxa de extracção de lenhina. Assim, decidiu-se introduzir um conjunto de ensaios extra (E), mais severos, sem modelação estatística, com o objectivo de observar a evolução da lenhina remanescente no resíduo sólido.

Tabela 3.17 - Constituição do resíduo sólido (RS) resultante do pré-tratamento com NaOH

	A	B	C	RS (%)	LK (%)	TRL	Açúcares (%)	TRA
M	40	70	3,25	68,22 ± 2,43	22,80 ± 0,81	8,7	41,17 ± 1,27	80,3
M	60	40	1,50	73,25 ± 0,91	25,80 ± 0,13	0,0	40,92 ± 1,57	79,8
M	60	100	1,50	67,84 ± 1,67	24,09 ± 0,04	3,5	35,47 ± 1,51	69,2
M	60	40	5,00	67,22 ± 0,65	23,66 ± 0,45	5,2	38,34 ± 0,91	74,8
M	60	100	5,00	64,70 ± 1,21	22,00 ± 0,19	11,9	36,71 ± 2,80	71,6
M	90	70	0,31	72,86 ± 1,18	25,44 ± 1,38	0,0	43,54 ± 1,12	85,0
M	90	20	3,25	67,12 ± 0,09	22,59 ± 0,02	9,5	37,47 ± 0,22	73,1
M	90	70	3,25	68,17 ± 2,84	23,40 ± 1,13	6,3	35,92 ± 1,98	70,1
M	90	120	3,25	66,80 ± 1,27	21,45 ± 0,50	14,1	37,40 ± 1,77	73,0
M	90	70	6,19	66,84 ± 0,02	21,82 ± 1,19	12,6	42,54 ± 0,38	83,0
M	120	40	1,50	68,49 ± 1,82	24,58 ± 0,18	1,5	38,19 ± 0,25	74,5
M	120	100	1,50	63,96 ± 0,66	23,29 ± 0,46	6,7	34,32 ± 0,73	67,0
M	120	40	5,00	64,01 ± 0,40	21,86 ± 0,54	12,4	37,89 ± 0,81	73,9
M	120	100	5,00	63,49 ± 0,74	22,50 ± 0,45	9,8	39,21 ± 1,14	76,5
M	140	70	3,25	60,28 ± 0,96	21,62 ± 0,77	13,4	38,68 ± 0,85	75,5
E	90	70	61,9	50,23 ± 1,06	18,99 ± 0,53	23,9	31,24 ± 0,49	61,0
E	120	40	15,0	47,66 ± 1,02	19,27 ± 0,36	22,8	28,39 ± 0,77	55,4
E	120	100	15,0	43,98 ± 1,07	16,79 ± 0,39	32,7	27,19 ± 0,74	53,1
E	120	40	50,0	45,85 ± 1,15	17,49 ± 0,49	29,9	28,36 ± 0,27	55,3
E	120	100	50,0	40,90 ± 0,88	13,00 ± 0,52	47,9	27,90 ± 0,15	54,4
E	140	70	32,5	47,80 ± 0,86	15,48 ± 0,46	37,8	32,32 ± 0,66	63,1

M - Ensaio modelado E - Ensaio extra

A - Temperatura B - Tempo C - Concentração de NaOH (% w/w)

LK (%) - Lenhina de Klason no RS expressa em % da amostra

TRL - Taxa de remoção de lenhina expressa em % da lenhina presente na amostra

Açúcares (%) - Açúcares no RS em % da amostra

TRA - Taxa de retenção de açúcares no RS expressa em % dos açúcares presente na amostra

A análise da tabela 3.17 mostra-nos uma clara diferença no peso do resíduo sólido entre os ensaios modelados e os ensaios extra. Nos primeiros, o peso seco do resíduo sólido (RS), oscilou entre 60,28% (140°C, 70min., 3,25% NaOH) e 73,25% (60°C, 40min, 1,50% NaOH) correspondendo esta variação a uma oscilação máxima nos conteúdos solubilizados de 12,97%. Nos ensaios extra a variação do peso seco do resíduo sólido oscilou entre 40,9% (120°C, 100min., 50,0% NaOH) e 50,23% (90°C, 70min., 61,9% NaOH). A figura 3.21 apresenta a variação do peso seco do resíduo sólido (RS) em função das condições ensaiadas.

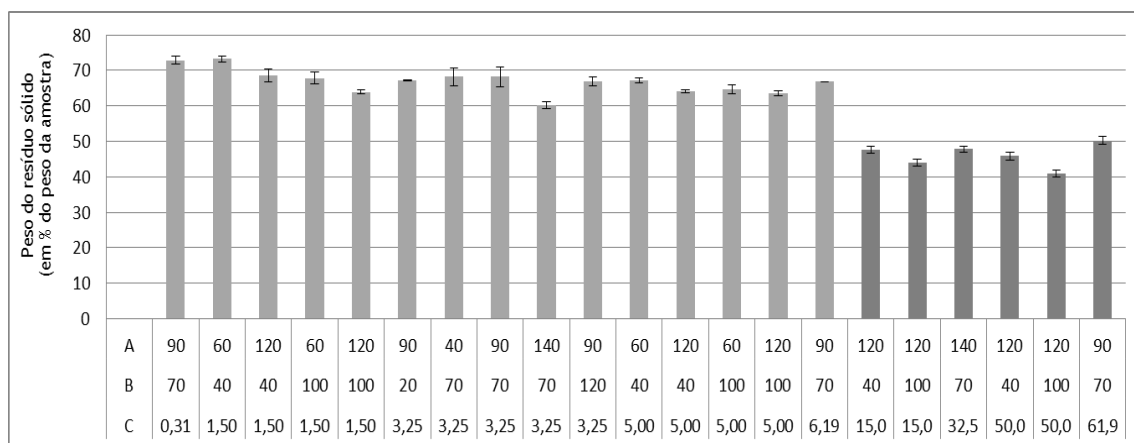


Figura 3.21 - Peso do resíduo sólido (RS) resultante do pré-tratamento alcalino com NaOH (expresso em percentagem do peso da amostra seca)

A - Temperatura (°C), B - Tempo (min.), C - Concentração de NaOH (% w/w)

A diminuição do peso seco do RS nos ensaios extra resulta de uma maior solubilização para o hidrolisado dos seus compostos. Assim é natural que tal redução tenha reflexo nas concentrações de lenhina e de açúcares remanescentes. Da análise estatística do peso seco, realizada nos pré-tratamentos modelados, resultou um modelo significativo com um p-valor < 0,0005, não apresentando porém como significativos nenhum dos factores utilizados. Como consequência a equação de regressão estimada apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,7755. Como tal, consideramos que a análise estatística não consegue traduzir com a precisão necessária a variação do peso seco em função das condições ensaiadas. Na figura 3.22 apresentam-se as concentrações de lenhina nos resíduos sólidos.

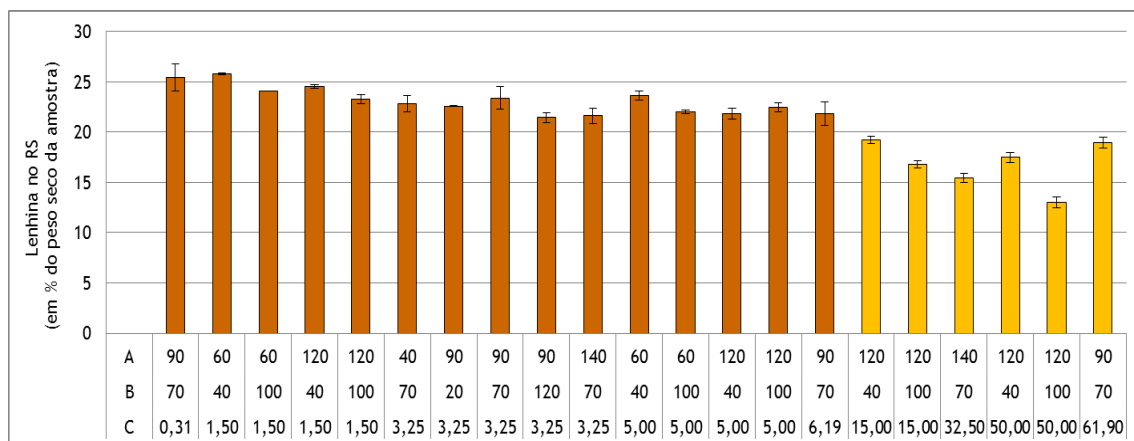


Figura 3.22 - Lenhina presente nos resíduos sólidos resultantes dos pré-tratamentos alcalinos com NaOH, expressa em percentagem do peso seco da amostra
A - Temperatura (°C), B - Tempo (min.), C - Concentração de NaOH (% w/w)

A leitura da figura 3.22 permite-nos observar, nos ensaios extra, uma oscilação das concentrações de lenhina presente no resíduo sólido entre 13,00% (120°C, 100min., 50% NaOH) e 19,27% (90°C, 70min., 61,9% NaOH) correspondendo estes valores a taxas de remoção de lenhina (TRL) de 52,8% e 22,80%, respectivamente. Nestes ensaios podemos observar a uma clara redução da lenhina quando, mantendo a mesma temperatura e concentração de NaOH, elevamos a duração dos pré-tratamentos de 40 para 100 minutos. Observe-se que a máxima TRL não foi obtida nos pré-tratamentos realizados com a temperatura mais alta (140°C) nem com a maior concentração de NaOH (61,9%), o que nos sugere que o prolongamento do tempo poderá induzir a TRL mais elevadas que o aumento daqueles dois factores. A influência determinante do tempo de duração dos pré-tratamentos nas taxas de remoção de lenhina (TRL) é também confirmada pelos resultados obtidos por diversos autores. Pan e colaboradores obtiveram TRL de 34% quando aplicaram uma carga de NaOH de 1%, durante 7 horas a uma temperatura de 100°C a madeira de pseudotsuga resultante de um processo de explosão a vapor (steam explosion) (Pan *et al.*, 2005). Já Gupta, utilizando como substrato madeira de choupo, obteve uma TRL de 78% em pré-tratamentos realizados durante 24h, com uma carga de NaOH de 5% e a 120°C (Gupta, 2008). Na análise estatística da variação da lenhina em função das condições de ensaio modeladas resultou um modelo significativo, no entanto, nenhum dos factores utilizados foi considerado significativo. A equação de estimativa ($R^2 = 0,7029$) resultante não consegue dessa forma traduzir, com o nível de precisão desejado, a variação do teor de lenhina em função das variáveis utilizadas. À semelhança do ocorrido com as taxas de remoção de lenhina também as taxas de retenção de açúcares (TRA) verificadas no resíduo sólido se apresentam muito distintas entre os ensaios modelados e os ensaios extra. A figura 3.23 apresenta-nos as taxas de retenção de açúcares (TRA) no resíduo sólido resultante do pré-tratamento alcalino com NaOH.

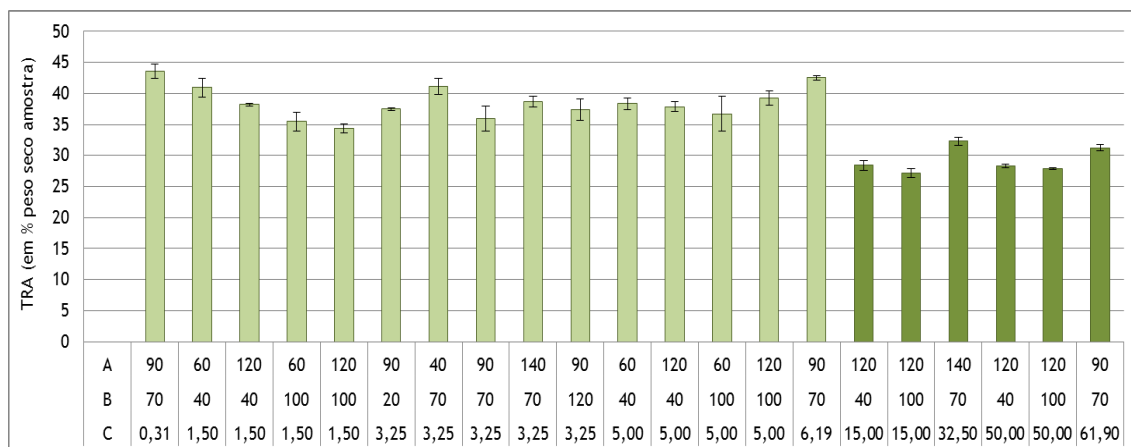


Figura 3.23 - Taxas de retenção de açúcares (TRA) nos resíduos sólidos resultantes do pré-tratamento alcalino com NaOH, expressas em percentagem do peso seco da amostra
A - Temperatura (°C), B - Tempo (min.), C - Concentração de NaOH (% w/w)

Como podemos observar pela leitura da figura 3.23 nos ensaios modelados a TRA variou entre 34,32% (120°C, 100min., 1,50% NaOH) e 43,54% (90°C, 70min., 0,31% NaOH). Nos ensaios extra as TRA foram muito menores oscilando entre 27,19% (120°C, 100min., 15% NaOH) e 32,32% (140°C, 70min., 32,5% NaOH). Em ambas as situações não é clara a associação entre a variação dos factores utilizados e as TRA obtidas, ou seja, obtemos TRA com valores próximos em condições de ensaio muito diferentes. Por exemplo, nos ensaios realizados a 90°C durante 70 minutos obtiveram-se TRA de 43,54% e 42,54% para concentrações de NaOH de 0,31% e 6,19% respectivamente. Nesta comparação, o acréscimo de 5,88% de NaOH reflectiu-se num aumento de apenas 1% na TRA. Outro exemplo, a TRA obtida nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 140°C, durante 70 minutos e com uma concentração de NaOH de 3,25% foi inferior em 0,34% à TRA obtida nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 60°C, durante 40 minutos e com uma concentração de NaOH igual a 5,00%. Esta falta de associação entre as condições de ensaio e as TRA obtidas mantem-se também nos ensaios extra realizados. Nestes verificou-se um decréscimo da TRA em 0,03% quando se se aumentou a concentração de NaOH de 15,00% para 50,00%, nos pré-tratamentos realizados com temperatura igual a 120°C e durante 40 minutos. A tabela 3.18 apresenta os teores de glucose, xilose e arabinose presentes no resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos alcalino com hidróxido de sódio.

Tabela 3.18 - Teores de glucose, xilose e arabinose presentes no resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos alcalino com NaOH

A	B	C	Glucose ¹	R.G.	Xilose ¹	R.X.	Arabinose ¹	R.A.
40	70	3.25	26,14 ± 0,65	77,8	11,07 ± 0,22	84,4	3,96 ± 0,40	87,0
60	40	1.50	26,66 ± 0,73	79,4	11,40 ± 0,60	87,0	3,58 ± 0,23	78,7
60	100	1.50	22,79 ± 1,07	67,8	9,51 ± 0,24	72,5	3,23 ± 0,21	71,0
60	40	5.00	24,64 ± 0,75	73,4	10,42 ± 0,15	79,5	3,28 ± 0,01	72,1
60	100	5.00	22,45 ± 1,23	66,8	9,47 ± 1,13	72,2	3,23 ± 0,44	71,0
90	70	0.31	27,94 ± 0,72	83,2	11,75 ± 0,27	89,6	3,85 ± 0,13	84,6
90	20	3.25	23,99 ± 0,06	71,4	10,21 ± 0,08	77,9	3,27 ± 0,08	71,9
90	70	3.25	23,46 ± 0,84	69,8	9,93 ± 0,88	75,7	3,20 ± 0,26	70,3
90	120	3.25	24,05 ± 0,96	71,6	10,29 ± 0,48	78,5	3,05 ± 0,33	67,0
90	70	6.19	27,36 ± 0,26	81,5	11,48 ± 0,06	87,6	3,69 ± 0,06	81,1
120	40	1.50	25,26 ± 0,04	75,2	9,93 ± 0,06	75,7	3,03 ± 0,15	66,6
120	100	1.50	22,51 ± 0,41	67,0	9,27 ± 0,19	70,7	2,55 ± 0,13	56,0
120	40	5.00	24,83 ± 0,07	73,9	10,05 ± 0,60	76,7	3,05 ± 0,14	67,0
120	100	5.00	25,81 ± 0,48	76,8	10,50 ± 0,57	80,1	2,95 ± 0,09	64,8
140	70	3.25	26,00 ± 0,43	77,4	10,63 ± 0,24	81,1	2,07 ± 0,17	45,5
90	70	61.90	24,36 ± 2,13	72,5	6,02 ± 0,11	45,9	0,53 ± 0,26	11,6
100	270	15.00	22,73 ± 0,51	67,7	4,97 ± 0,18	37,9	0,46 ± 0,08	10,1
120	40	15.00	22,93 ± 0,10	68,3	4,86 ± 0,45	37,1	0,40 ± 0,06	8,8
120	100	15.00	19,97 ± 0,11	59,5	4,15 ± 0,01	31,7	0,36 ± 0,00	7,9
120	40	50.00	21,01 ± 0,99	62,5	4,34 ± 0,17	33,1	0,39 ± 0,01	8,6
120	100	50.00	18,38 ± 0,72	54,7	4,81 ± 0,19	36,7	0,49 ± 0,05	10,8
140	70	32.50	24,71 ± 0,81	73,6	6,25 ± 0,27	47,7	0,52 ± 0,01	11,4

A - Temperatura B - Tempo C - Concentração de NaOH (% w/w)

1 - Teores expressos em % da amostra

R.G. - Teor de retenção de glucose no RS expressa em % da glucose na amostra

R.X. - Taxa de retenção de xilose no RS expressa em % da xilose na amostra

R.A. - Taxa de retenção de arabinose no RS expressa em % da arabinose na amostra

A análise da tabela 3.18 mostra-nos que nos ensaios modelados a permanência dos açúcares no resíduo sólido variou, em percentagem da amostra, entre 22,45 e 27,94% para a glucose, 9,27 e 11,75% para a xilose e 2,07 e 3,96% para a arabinose. Nos pré-tratamentos extra realizados o aumento da severidade traduziu-se numa redução de todos os açúcares retidos no resíduo sólido, em especial da xilose e da arabinose. As taxas de retenção, em percentagem da amostra, variaram nestes ensaios entre 19,97% e 24,71% para a glucose, 4,15% e 6,25% para a xilose e 0,36% e 0,56% para a arabinose. A figura 3.24 apresenta os teores de glucose, xilose e arabinose presente nos resíduos sólidos do pré-tratamento alcalino com NaOH, expressos em % da amostra.

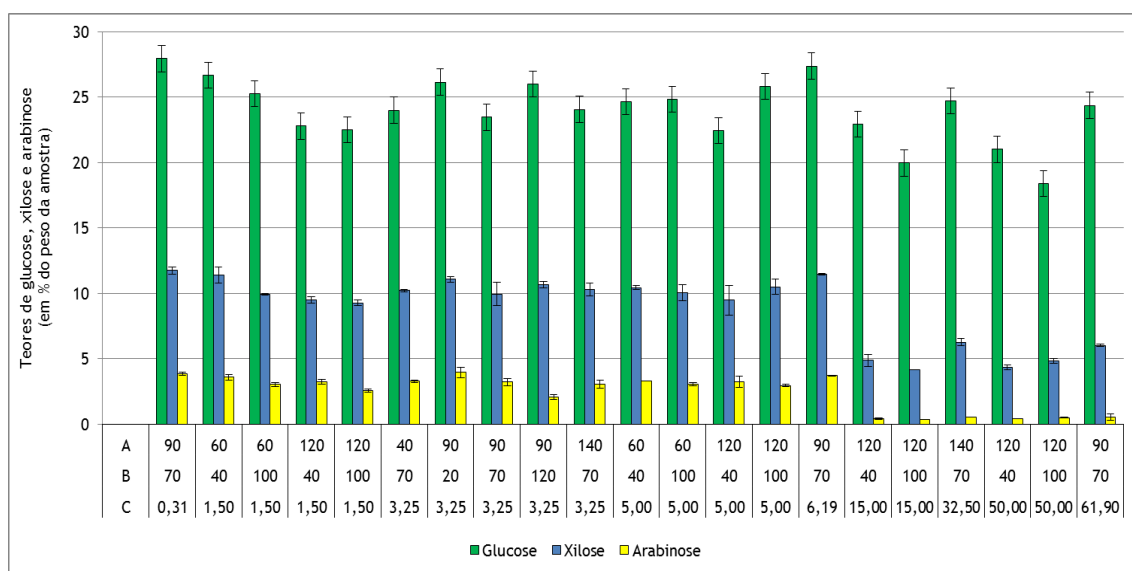


Figura 3.24 - Teores de glucose, xilose e arabinose presente nos resíduos sólidos do pré-tratamento alcalino com NaOH, expressos em % da amostra

A - Temperatura (°C), B - Tempo (min.), C - Concentração de NaOH (% w/w)

A análise da figura 3.24 mostra-nos uma clara redução nos teores de xilose e arabinose presente no resíduo sólido quando passamos dos ensaios modelados para os ensaios extra. O teor de xilose médio presente no resíduo sólido foi, nos ensaios modelados, igual a $10,39 \pm 0,73$ enquanto nos ensaios extra este valor baixou para metade sendo igual a $5,06 \pm 0,74$. O decréscimo nos teores médios de arabinose presente no resíduo sólido foi ainda de maior intensidade, passando este açúcar nos ensaios modelados de um valor de $3,20 \pm 0,46$ para um valor nos ensaios extra, quase residual, de $0,45 \pm 0,06$. A retenção de xilose no resíduo sólido oscilou, em percentagem da xilose presente na amostra, entre 70,7 e 89,6% nos ensaios modelados e entre 31,7 e 47,7% nos ensaios extra. A retenção de arabinose no resíduo sólido oscilou, em percentagem da arabinose presente na amostra, entre 45,5 e 87,0% nos ensaios modelados e entre 7,9 e 11,6% nos ensaios extra.

As taxas de retenção de xilose determinadas no presente trabalho encontram-se de acordo com as constantes na bibliografia consultada para o mesmo tipo de pré-tratamentos. Sills e Gossett obtiveram uma taxa de retenção de 81,5% da xilose no resíduo sólido em pré-tratamentos alcalinos com NaOH realizados com herbáceas utilizando uma concentração de NaOH de 5,6% (w/w), uma temperatura de 25°C e um tempo de residência de 24h (Sills e Gossett, 2011). Observe-se que para concentrações similares foram obtidas neste trabalho taxas de retenção de xilose de 79,5% (60°C, 40min, 5,00% NaOH) e 87,6% (90°C, 70min, 6,19% NaOH). Este facto pode explicar a razão pela qual não se conseguiu determinar um modelo estatístico de estimativa dos teores de xilose solubilizada em função da variação dos factores utilizados.

Gupta e Lee também observaram para herbáceas retenções de 44% para a xilose e 41% para a arabinose em pré-tratamentos realizados com uma carga de NaOH de 50% (w/w), durante 24 horas à temperatura de 60°C (Gupta e Lee, 2010). As retenções determinadas neste trabalho para a mesma concentração de NaOH (120°C, 100min, 50% NaOH) foram de 36,7% para a xilose e de apenas 10,8% para a arabinose. O valor de retenção encontrado para a xilose é ligeiramente inferior, no entanto esta diferença agudiza-se quando comparamos a taxa de retenção da arabinose. A maior solubilização de arabinose encontrada no trabalho desenvolvido pode ser devida possivelmente à maior temperatura de pré-tratamento utilizada (120°C) favorecendo-se por essa via uma maior solubilização daquele açúcar. A influência da temperatura como factor significativo no aumento da solubilização da arabinose foi confirmada na análise estatística efectuada nos pré-tratamentos modelados. No modelo determinado a análise de variância revelou um p-valor <0,0001 para a temperatura. A equação de regressão obtida com um R^2 igual a 0,7512 não consegue, em nosso entender, traduzir a variação da solubilização da arabinose em função da variação dos factores utilizados com a precisão desejada.

Relativamente aos teores de glucose verificou-se uma grande variação em todos os ensaios realizados. O teor máximo de glucose retida no resíduo sólido foi verificado nos pré-tratamentos realizados com a concentração mais baixa de NaOH (0,31%). Nestes pré-tratamentos o resíduo sólido apresentou um teor de glucose de 27,94% correspondendo este valor a uma taxa de retenção de 83,2% em percentagem da glucose presente na amostra. Nos ensaios modelados, o menor teor de glucose encontrado no resíduo sólido, com um valor de 22,45%, foi verificado nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 60°C, durante 100min e com uma concentração de NaOH de 5,00%. O teor de glucose variou nos resíduos sólidos de forma dissociada da severidade dos factores utilizados. Assim, foram detectados valores de retenção de glucose de 22,79% e 22,51% em pré-tratamentos realizados respectivamente a 60°C e 120°C, com tempos de duração de 100minutos e concentrações de NaOH de 1,50%. Também se detectaram teores de glucose mais elevados em pré-tratamentos supostamente mais severos, como os realizados a 140°C (26,00% - 140°C, 70min, 3,25% NaOH) ou os realizados com concentrações de 6,19% de NaOH (27,36% - 90°C, 70min, 6,19% NaOH). Esta aparente dissociação entre a severidade dos factores utilizados e as taxas de retenção de glucose obtida conduziram à obtenção de modelos não significativos na análise de variância. Desta forma, não foi possível obter uma equação de regressão que estimasse a retenção de glucose em função dos factores (temperatura, duração e carga de ácido sulfúrico) utilizados nos ensaios.

Nos ensaios extra, o teor mais baixo de glucose presente no resíduo sólido, com um valor de 18,38%, foi obtido nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 120°C, durante 100min e com uma concentração de NaOH de 50,00%. Nestas condições apenas se reteve no resíduo sólido 54,7% da glucose presente na amostra. A taxa de glucose retida no resíduo sólido encontra-se em conformidade com a taxa de 66,8% encontrada por Wang e colaboradores em pré-tratamentos realizados a uma temperatura de 121°C, durante 60

minutos e com uma concentração de NaOH de 26,70 %(w/w) (Wang *et al.*, 2012). Note-se que no presente trabalho foi obtida uma taxa de retenção de glucose de 68,3% nos pré-tratamentos realizados a 120°C, durante 40 minutos e com uma concentração de NaOH de 15% (w/w) e uma taxa de retenção de glucose de 62,5% nos pré-tratamentos realizados a 120°C, durante 40 minutos e uma concentração de NaOH de 50,00% (w/w).

A figura 3.25 compara os resultados obtidos entre os pré-tratamentos modelados e os pré-tratamentos extra realizados com os mesmos valores de temperatura e tempo, apenas variando a carga de base aplicada.

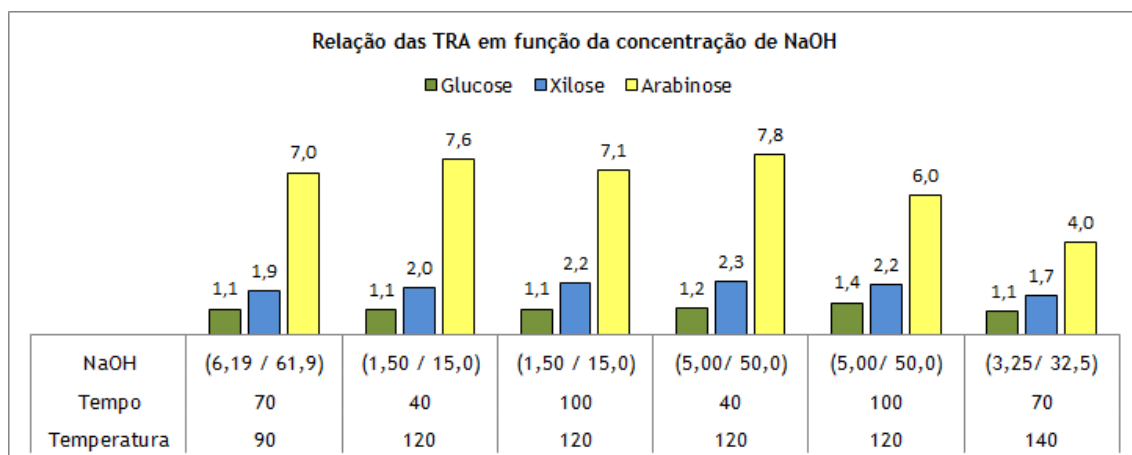


Figura 3.25 - Comparação das TRA entre os pré-tratamentos modelados e os pré-tratamentos extra

A figura 3.25 mostra-nos que parece existir uma constância na redução dos açúcares no resíduo sólido, especialmente da glucose e da xilose, quando mantendo as mesmas condições de temperatura e duração dos pré-tratamentos elevamos a concentração de NaOH para um valor dez vezes superior. Assim observamos pela análise da figura que ao aumentarmos em 10 vezes a carga de NaOH a redução média de glucose é de apenas 1,2, a redução média da xilose é de 2,1 e a redução média da arabinose é igual a 6,6. Este açúcar é aquele que revela a maior heterogeneidade na razão determinada (desvio padrão = 1,3).

Com estes resultados podemos dizer que os teores de glucose retidos no resíduo sólido não são afectados de forma significativa pelo aumento da concentração de NaOH. No caso da xilose, o aumento em dez vezes da carga alcalina tem como reflexo uma redução para metade nos teores de xilose retida no resíduo sólido. O açúcar que sofre maior solubilização com o aumento da carga de NaOH é sem dúvida a arabinose que vê reduzida a sua retenção no resíduo sólido em cerca de 6,6 vezes.

3.3.3 - Considerações finais sobre o pré-tratamento com hidróxido de sódio

1 - Da análise da lenhina no hidrolisado resultante dos pré-tratamentos modelados estatisticamente com hidróxido de sódio (LH_{AL}) resultou um modelo significativo, com um coeficiente de determinação para a equação de regressão estimada de 0,9431. Segundo a análise de variância do modelo os factores mais significativos na solubilização da lenhina foram a concentração de hidróxido de sódio e a temperatura. A variação do tempo de duração dos pré-tratamentos não foi considerada factor significativo no modelo estatístico analisado.

2 - A quantificação da lenhina no hidrolisado pelo método utilizado parece sobrestimar a determinação dos teores de lenhina solubilizada. Este facto, pode resultar da quantificação como lenhina de outros compostos, nomeadamente parte dos extractáveis que possam ter sofrido condensação ou de açúcares que tenham permanecidos ligados quimicamente à lenhina solubilizada.

3 - Não se conseguiram traduzir de forma estatisticamente significativa os teores de glucose e xilose presentes no resíduo sólido em função da variação dos factores utilizados. Para a variação do peso seco do resíduo sólido e da lenhina foram encontrados modelos significativos com p-valor $<0,0005$. Contudo, nestes modelos, nenhum dos factores analisados foi considerado significativo na variação do peso e do teor de lenhina, levando ao estabelecimento de equações de regressão com valores de R^2 abaixo do desejado para este estudo. Da análise estatística dos teores de arabinose encontrados no resíduo sólido resultou um modelo significativo, com um p-valor de 0,0011, no qual a temperatura foi considerada o factor mais determinante (p-valor $<0,0001$).

4 - A taxa máxima de remoção de lenhina foi de 14,1% nos pré-tratamentos modelados efectuados com uma temperatura de 90°C, durante 120 minutos e com uma concentração de NaOH de 3,25%. Nestas condições o resíduo sólido reteve 71,6% da glucose, 78,5% da xilose e 67,0% da arabinose relativamente às quantidades destes açúcares presentes na amostra. Nos ensaios extra conseguiram-se taxas de remoção de lenhina mais elevadas que nos pré-tratamentos modelados. Nestes obteve-se uma taxa máxima de remoção de lenhina de 54,7% nos pré-tratamentos efectuados com uma temperatura de 120°C, durante 100 minutos e com uma concentração de NaOH de 50,00%. Contudo nestas condições o resíduo sólido reteve apenas 54,7% da glucose, 36,7% da xilose e 10,8% da arabinose relativamente às quantidades destes açúcares presentes na amostra.

5 - O aumento da concentração de NaOH nos ensaios extra revelou, relativamente aos ensaios modelados, uma diminuição dos açúcares, apresentando no entanto essa diminuição uma razão aparentemente constante, isto é, verificou-se que o aumento em dez vezes da concentração de NaOH provocou, em relação aos ensaios modelados realizados com a mesma

temperatura e duração, uma redução média de glucose de apenas $1,2 \pm 0,1$, uma redução média de xilose de $2,1 \pm 0,2$ e uma redução média da arabinose de $6,6 \pm 1,3$.

3.4 - Pré-tratamento com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio, em condições alcalinas, reage como agente de remoção de lenhina solubilizando simultaneamente as hemiceluloses presentes nos materiais lenhocelulósicos (Sun *et al.*, 2002).

3.4.1 - Lenhina no Hidrolisado alcalino com adição de peróxido (LH_{ALP})

A determinação da LH_{ALP} resulta, à semelhança do pré-tratamento anterior, da soma da lenhina precipitada (L_p) com a lenhina em solução (L_s). A tabela 3.19 apresenta a estimativa LH_{ALP} estimada com base na análise do hidrolisado. O modelo de estimativa foi realizado com base num modelo cúbico reduzido devido à introdução de 3 factores cúbicos (A^2B , A^2C e AB^2) tendo em vista o aumento do valor do coeficiente de determinação (R^2).

Tabela 3.19 - Análise ANOVA para estimativa de LH_{ALP}

Variável	Soma dos quadrados	Df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	138.92	13	10.69	78.95	< 0.0001
A-Temperatura	20.67	1	20.67	152.72	< 0.0001
B-Conc. NaOH	35.71	1	35.71	263.81	< 0.0001
C-Conc. H_2O_2	0.96	1	0.96	7.06	0.0151
AB	2.09	1	2.09	15.42	0.0008
AC	3.86	1	3.86	28.52	< 0.0001
BC	0.80	1	0.80	5.92	0.0245
A^2	8.35	1	8.35	61.65	< 0.0001
B^2	1.226E-003	1	1.226E-003	9.061E-003	0.9251
C^2	0.56	1	0.56	4.15	0.0550
ABC	0.046	1	0.046	0.34	0.5648
A^2B	0.45	1	0.45	3.29	0.0846
A^2C	0.72	1	0.72	5.30	0.0323
AB^2	0.18	1	0.18	1.31	0.2668
$R^2 = 0,9809$	$R^2_{ajustado} = 0,9685$				

Eq. 3.11

Equação de estimativa da LH_{ALP} (em % da amostra)

$$\begin{aligned}
 &= +18,0549 - 0,2996 \times A - 1,5528 \times B - 0,9419 \times C + 0,0462 \times A \times B \\
 &+ 0,0263 \times A \times C - 0,1258 \times B \times C + 0,0019 \times A^2 + 0,1575 \times B^2 + 0,0516 \\
 &\times C^2 + 0,00059 \times A \times B \times C - 0,00016 \times A^2 \times B - 0,00021 \times A^2 \times C \\
 &- 0,00178 \times A \times B^2
 \end{aligned}$$

Como podemos verificar pela análise da tabela 3.19 o modelo construído encontra-se ajustado explicando 98,09% da variação de LH_{ALP} . Os factores mais determinantes na explicação do modelo são por ordem decrescente a concentração de NaOH ($F_B = 263,81$), a temperatura quer em termos lineares ($F_A = 152,72$) quer pelo seu quadrado ($F_A^2 = 61,65$). A variação nas taxas de LH_{ALP} encontra-se ainda influenciada pela acção conjugada da temperatura com a concentração de H_2O_2 ($F_{AC} = 28,52$).

A figura 3.26 apresenta a influência individual da temperatura (A), da concentração de NaOH (B) e da concentração de H_2O_2 (C) na estimativa da LH_{ALP} quantificada a partir do hidrolisado, mantendo os restantes factores constantes.

Figura 3.26 - Influência da temperatura, concentração de NaOH e concentração de H_2O_2 na estimativa da LH_{ALP}

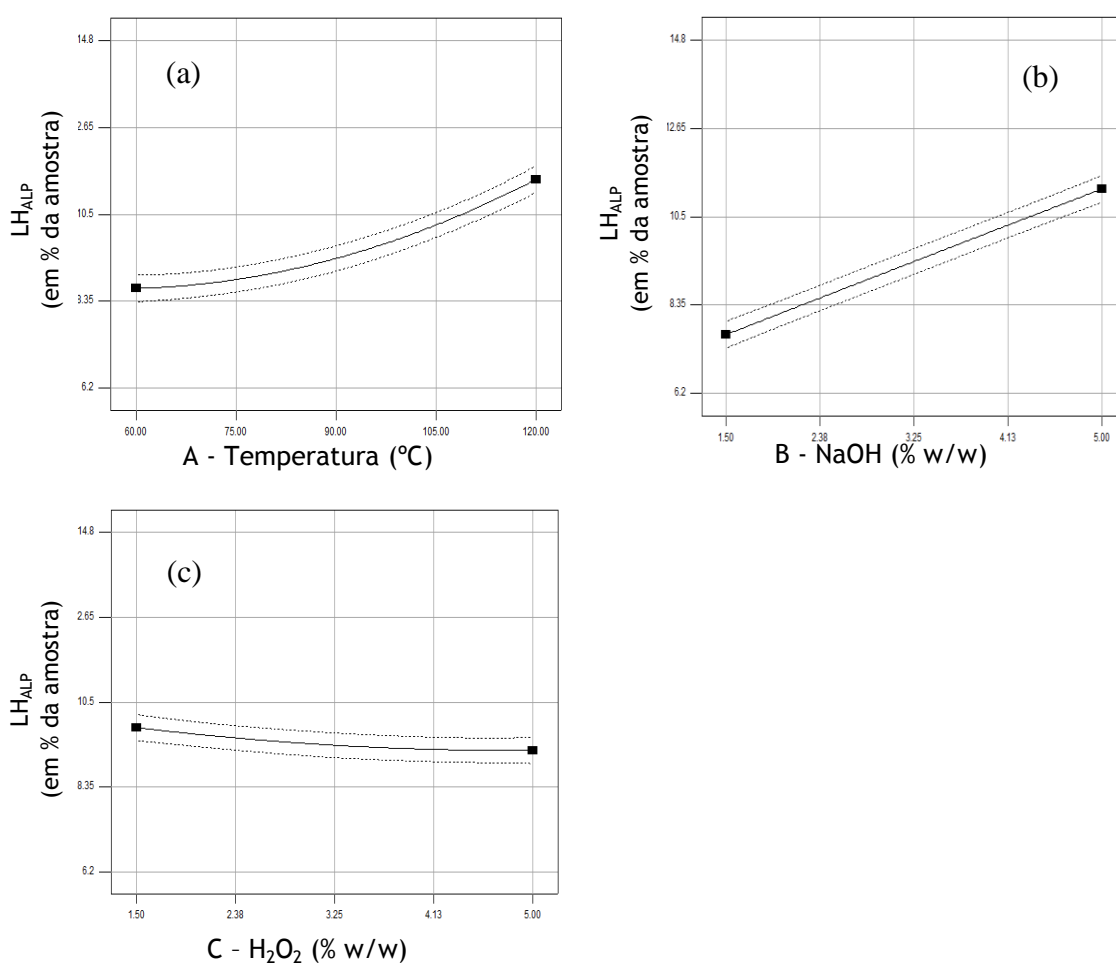


Figura 3.26 - Efeito da temperatura (a), da concentração de NaOH (b) e da concentração de H_2O_2 (c) na estimativa da LH_{ALP} , com as restantes condições constantes:

(a) $B = 3,25\%$ e $C = 3,25\%$; (b) $A = 90^\circ C$ e $C = 3,25\%$; (c) $A = 90^\circ C$ e $B = 3,25\%$

Como podemos observar pela observação da figura 4.26 o aumento da temperatura e da concentração de NaOH tem como consequência um aumento da LH_{ALP} . O aumento da temperatura parece provocar um aumento significativo LH_{ALP} , nomeadamente a partir dos

90°C, enquanto o aumento da concentração de NaOH tem como consequência aumentos lineares da LH_{ALP} . O aumento da concentração de H_2O_2 possui um efeito, de menor dimensão e em sentido contrário aos dos dois factores anteriores. Neste caso, o aumento da carga de H_2O_2 conduz a uma diminuição ligeira LH_{ALP} .

A tabela 3.20 apresenta, nas 15 condições de pré-tratamento testadas, a diferença entre as taxas de LH_{ALP} observada e estimada.

Tabela 3.20 - Diferença entre as taxas de LH_{ALP} observada e estimada, expressas em percentagem da amostra

Temperatura (°C)	NaOH (% w/w)	H_2O_2 (% w/w)	LH_{ALP} obs. (%)	LH_{ALP} est. (%)	Diferença (%)
40	3,25	3,25	8,71 ± 0,15	8,88	-0,18
60	1,50	1,50	7,78 ± 0,19	7,73	0,05
60	1,50	5,00	8,08 ± 0,01	8,01	0,07
60	5,00	1,50	10,64 ± 0,15	10,66	-0,02
60	5,00	5,00	9,83 ± 0,08	9,83	0,00
90	0,31	3,25	6,25 ± 0,02	6,46	-0,21
90	3,25	0,31	10,19 ± 0,28	10,55	-0,36
90	3,25	3,25	9,42 ± 0,37	9,59	-0,16
90	3,25	6,19	9,22 ± 0,18	9,51	-0,30
90	6,19	3,25	12,23 ± 0,19	12,67	-0,44
120	1,50	1,50	10,52 ± 0,11	10,64	-0,12
120	1,50	5,00	8,64 ± 0,35	8,70	-0,06
120	5,00	1,50	14,62 ± 0,15	14,99	-0,37
120	5,00	5,00	12,06 ± 0,56	12,36	-0,30
140	3,25	3,25	13,25 ± 0,16	13,78	-0,53
Desvio médio					0,21

A tabela 3.20 mostra-nos que o máximo teor de LH_{ALP} foi obtida nos pré-tratamentos efectuados a 120°C, com uma concentração de NaOH de 5,00% e uma concentração de H_2O_2 de 1,50%. Nestas condições o teor de LH_{ALP} observado (14,62%) corresponde a 58,57% do teor de lenhina presente na amostra. Tal como na análise do hidrolisado do pré-tratamento anterior, estes valores poderão estar sobrestimados devido à contabilização como lenhina no hidrolisado, de produtos resultantes da condensação de extractáveis e de açúcares presentes em complexos formados com a lenhina (Fengel e Wegener, 1984)

Relativamente à equação de regressão verificamos que os valores estimados encontram-se bastante próximos dos valores observados existindo um desvio médio entre os dois de apenas 0,21%.

Através da análise da tabela também é possível observar a relação directa entre o aumento da temperatura e o aumento da LH_{ALP} . Mantendo as concentrações dos dois reagentes constantes em 3,25% verificamos que o aumento da temperatura dos pré-tratamentos de 40 para 90°C e de 90°C para 140°C provoca um aumento na taxa de LH_{ALP} de 0,71% (9,42-8,71) e

de 3,83% (13,25-9,41), respectivamente. O mesmo se verifica relativamente à influência da concentração de NaOH. Nos pré-tratamentos efectuados a 90°C com uma carga de H₂O₂ igual a 3,25% verificamos que ao aumentar a concentração de NaOH de 0,31% para 3,25% e de 3,25% para 6,19%, a taxa de LH_{ALP} aumenta respectivamente 3,17% (9,42 - 6,25) e 2,81% (12,23-9,42). O aumento da concentração de H₂O₂ provoca uma redução nas taxas de LH_{ALP} sendo essa redução tanto maior quanto mais elevada for a temperatura. Nos pré-tratamentos efectuados a 60°C com uma concentração de NaOH igual a 5,00%, o aumento de 1,50% para 5,00% na concentração de H₂O₂ provoca uma diminuição de 0,81% (9,83-10,64), mas ao aumentar a temperatura para 120°C mantendo a mesma carga de NaOH, o mesmo aumento na concentração de H₂O₂ já provoca uma diminuição na taxa de LH_{ALP} de 2,56% (12,06-14,62).

3.4.2 - Constituição do resíduo sólido

A tabela 3.23 apresenta a constituição do resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NaOH e H₂O₂. Comparativamente com os pré-tratamentos efectuados apenas com NaOH, podemos observar que nestes pré-tratamentos, a adição de H₂O₂ provocou o aumento das taxas de remoção de lenhina conseguidas, mas por outro lado provocou uma diminuição no teor de açúcares mantidos no resíduo sólido.

Tabela 3.21 - Constituição do resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NaOH e H₂O₂

A	B	C	RS (%)	LK (%)	TRL	Açúcares (%)	TRA
40	3,25	3,25	69,91 ± 0,20	23,27 ± 0,223	6,8	39,09 ± 0,284	76,3
60	1,50	1,50	71,72 ± 1,22	24,56 ± 0,633	1,6	38,28 ± 4,791	74,7
60	1,50	5,00	70,83 ± 0,21	24,02 ± 0,375	3,8	35,95 ± 2,224	70,2
60	5,00	1,50	68,85 ± 0,42	22,54 ± 0,221	9,7	41,86 ± 0,455	81,7
60	5,00	5,00	67,39 ± 0,89	22,45 ± 0,357	10,1	43,59 ± 0,974	85,1
90	0,31	3,25	66,84 ± 0,93	24,20 ± 0,338	3,1	42,52 ± 2,382	83,0
90	3,25	0,31	65,64 ± 0,48	22,13 ± 0,168	11,4	41,23 ± 1,369	80,4
90	3,25	3,25	66,65 ± 1,06	22,42 ± 0,388	10,2	40,88 ± 2,008	79,8
90	3,25	6,19	59,97 ± 0,47	21,22 ± 0,311	15,0	40,13 ± 0,89	78,3
90	6,19	3,25	65,29 ± 0,90	21,61 ± 0,593	13,4	41,85 ± 0,988	81,7
120	1,50	1,50	69,41 ± 3,11	24,66 ± 0,707	1,2	41,88 ± 0,172	81,7
120	1,50	5,00	58,15 ± 2,75	21,44 ± 0,268	14,1	31,08 ± 2,512	60,6
120	5,00	1,50	61,05 ± 1,63	20,50 ± 0,783	17,9	39,03 ± 0,482	76,2
120	5,00	5,00	60,11 ± 1,69	19,86 ± 0,697	20,4	38,64 ± 1,795	75,4
140	3,25	3,25	56,08 ± 1,65	19,32 ± 0,755	22,6	35,77 ± 0,959	69,8

Tempo: Duração do pré-tratamento - 45 min.

A - Temperatura **B** - Concentração de NaOH (% w/w) **C** - Concentração de H₂O₂ (% w/w)

LK (%) - Lenhina de Klason no RS expressa em % da amostra

TRL - Taxa de remoção de lenhina expressa em % da lenhina presente na amostra

Açúcares (%) - Açúcares no RS em % da amostra

TRA - Taxa de retenção de açúcares no RS expressa em % dos açúcares presente na amostra

A análise da tabela 3.21 mostra-nos, nos ensaios realizados, uma variação no peso seco do resíduo sólido compreendida entre um valor mínimo de 56,08% e um valor máximo de 71,72%. A figura 3.27 apresenta a variação do peso seco do resíduo sólido em função das condições ensaiadas

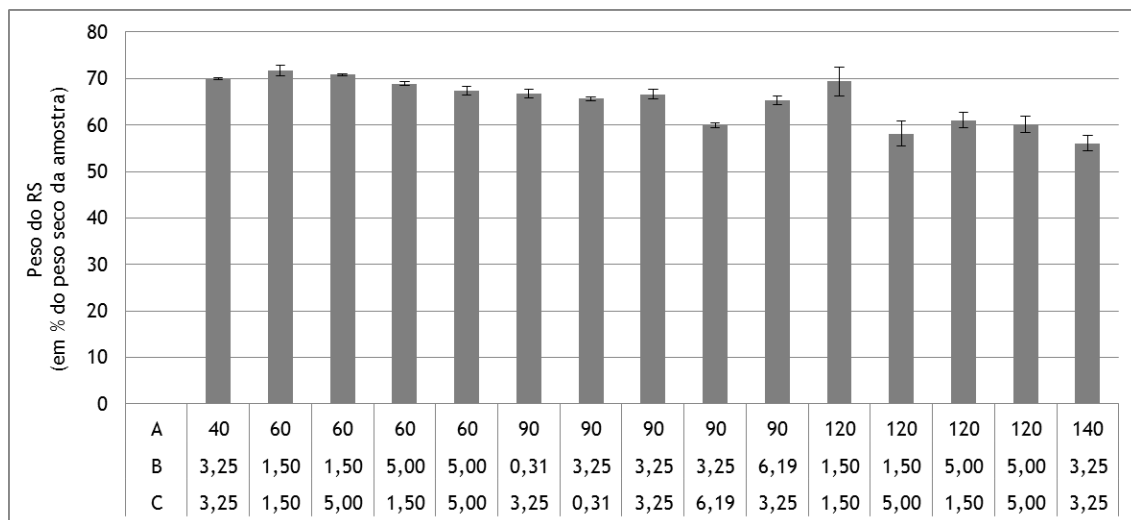


Figura 3.27 - Peso do resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NaOH e H₂O₂ (expresso em percentagem do peso da amostra seca)

A - Temperatura B - Concentração de NaOH (% w/w) C - Concentração de H₂O₂ (% w/w)

O valor mínimo foi verificado nos ensaios realizados com a temperatura mais elevada e o valor máximo detectado nos ensaios realizados com temperatura igual a 60°C e com concentrações de NaOH e H₂O₂ de 1,50%. Na análise da tabela também é evidente a influência que a adição de H₂O₂ possui na perda de peso do resíduo sólido, por via do aumento de solubilização dos compostos presentes na amostra. Nos ensaios realizados a 90°C com uma concentração de NaOH de 3,25% observamos uma redução do peso do resíduo sólido de 6,87% (66,84-59,97) quando aumentamos a concentração de H₂O₂ de 0,31 para 6,19%. Para temperaturas mais elevadas (120°C) a influência da adição de H₂O₂ na redução do peso seco do resíduo sólido foi particularmente evidente nos ensaios realizados com concentrações de NaOH mais baixas (1,50%). Nestes ensaios o aumento da concentração de H₂O₂ de 1,50 para 5,00% teve como efeito a perda de 11,26% (69,41-59,15) do peso do resíduo sólido. Este facto sugere que o aumento da concentração de NaOH pode travar o aumento da solubilização dos compostos presentes na amostra, promovida pelo aumento da carga de H₂O₂ aplicada. Note-se que nos ensaios realizados a 120°C com uma concentração de H₂O₂ de 5,00%, quando se aumentou a concentração de NaOH de 1,50 para 5,00% verificou-se um aumento do peso seco do resíduo de 60,11% para 61,05%.

O modelo de estimativa para a variação do peso do resíduo sólido (Tabela 3.22) foi realizado com base num modelo cúbico reduzido devido à introdução de 3 factores cúbicos (A²B, A²C e AB²) tendo em vista o aumento do valor do coeficiente de determinação (R²).

Tabela 3.22 - Análise ANOVA para estimativa do peso seco do resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NaOH e H₂O₂

Variável	Soma dos quadrados	Df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	659.11	13	50.70	10.52	< 0.0001
A-Temperatura	191.38	1	191.38	39.72	< 0.0001
B-Conc. NaOH	2.42	1	2.42	0.50	0.4867
C-Conc. H ₂ O ₂	32.15	1	32.15	6.67	0.0178
AB	1.541E-003	1	1.541E-003	3.197E-004	0.9859
AC	24.16	1	24.16	5.01	0.0367
BC	23.73	1	23.73	4.92	0.0382
A ²	14.95	1	14.95	3.10	0.0934
B ²	1.64	1	1.64	0.34	0.5666
C ²	17.52	1	17.52	3.64	0.0710
ABC	29.64	1	29.64	6.15	0.0222
A ² B	8.40	1	8.40	1.74	0.2016
A ² C	0.12	1	0.12	0.025	0.8766
AB ²	0.84	1	0.84	0.17	0.6815
R ² = 08724	R ² _{ajustado} = 07595				

Eq. 3.12

Equação de estimativa do peso do resíduo sólido (em % da amostra)

$$\begin{aligned}
 = & +79,3994 - 0,1682 \times A - 1,3077 \times B + 5,3658 \times C + 0,0552 \times A \times B \\
 & - 0,0562 \times A \times C - 0,9356 \times B \times C + 0,0017 \times A^2 - 0,2599 \times B^2 - 0,2879 \\
 & \times C^2 + 0,0148 \times A \times B \times C - 0,00071 \times A^2 \times B - 0,00009 \times A^2 \times C \\
 & + 0,0039 \times A \times B^2
 \end{aligned}$$

Como podemos verificar pela análise da tabela 3.22 o modelo construído encontra-se ajustado explicando 87,24% da variação do peso do resíduo sólido. O factor mais determinante na explicação do modelo é a temperatura ($F_A = 39,72$).

Através da análise da tabela 3.21 podemos observar que a maior taxa de remoção de lenhina (TRL) obtida, correspondente à remoção de 22,6% da lenhina presente na amostra, foi conseguida nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 140°C e com concentrações de NaOH e H₂O₂ iguais a 3,25%. Sun e colaboradores utilizando madeira de choupo obtiveram uma TRL de 24,9%, em pré-tratamentos realizados durante 16 horas, a uma temperatura de 45°C, com uma concentração de H₂O₂ de 2% e com um pH de 11,6 (Sun *et al.*, 2007). Estes resultados encontram-se bastante próximos dos obtidos no presente estudo revelando que o aumento da temperatura, de 45 para 140°C, pode compensar o efeito da duração mais longa dos pré-tratamentos (45 minutos face a 16 horas). Outros autores utilizando espécies arbustivas, *Haloxylon ammodendron* e *Elaeagnus angustifolia*, obtiveram respectivamente TRL iguais a 40,7% e a 41,4%, em pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 45°C, com 2,0% H₂O₂, com pH de 11.5 e durante 16 horas (Sun *et al.*, 2010). As taxas de remoção de lenhina obtidas para material herbáceo em condições de pré-tratamento semelhantes costumam ser superiores. Outros trabalhos revelaram, com palha de

cevada, TRL de 85,3% em pré-tratamentos efectuados com uma temperatura de 45°C, uma carga de H₂O₂ de 1,5%, com pH de 12.0 e durante 16 horas (Sun *et al.*, 2002).

Convém realçar que nos pré-tratamentos efectuados à mesma temperatura apenas com NaOH e com um tempo de residência mais elevado obteve-se uma TRL de apenas 13,4%. Tal facto sugere que a adição de 3,25% de H₂O₂ promoveu um aumento de 9,2% na TRL obtida. A figura 3.28 apresenta os teores de lenhina de Klason determinada nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos com NaOH e H₂O₂, aos quais juntamos os teores de lenhina de Klason obtida nos 4 ensaios realizados apenas com NaOH com duração idêntica (40min.).

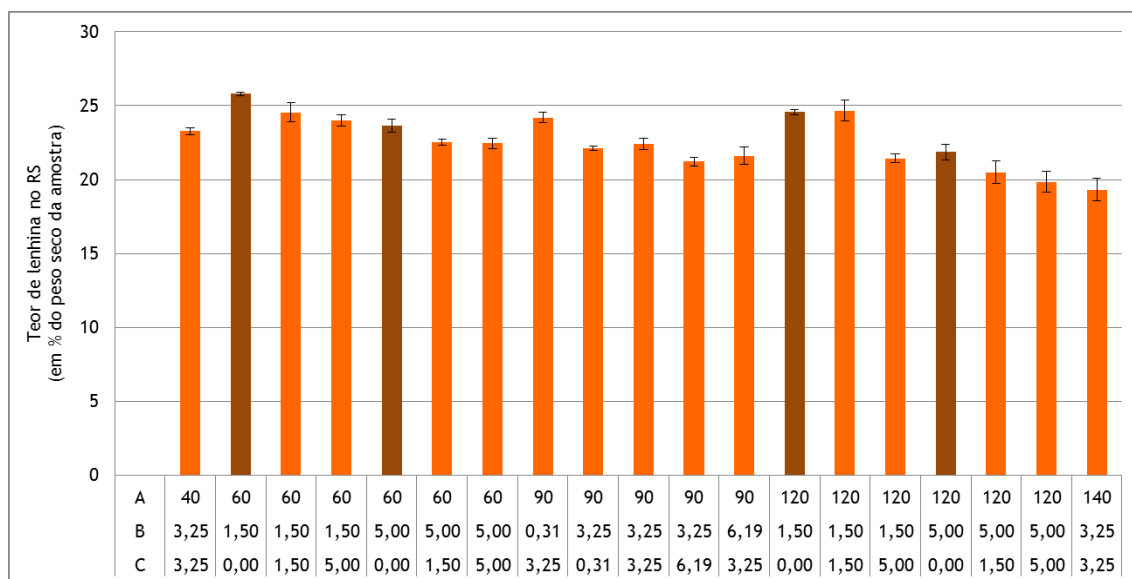


Figura 3.28 - Teores de lenhina, em % do peso da amostra, determinada nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos com NaOH e H₂O₂

A - Temperatura B - Concentração de NaOH (% w/w) C - Concentração de H₂O₂ (% w/w)

Como podemos observar pela análise da figura 4.28 apenas em duas condições de ensaio os teores de lenhina de Klason encontrados nos resíduos sólidos foram inferiores a 20% do peso da amostra (120°C, 5,00% NaOH, 5,00% H₂O₂ e 140°C, 3,25% NaOH, 3,25% H₂O₂), correspondendo estes valores a TRL superiores a 20%. A figura 4.28 também nos mostra que o aumento da concentração de H₂O₂ promove, com excepção dos ensaios realizados com uma temperatura de 90°C, a diminuição da lenhina presente no resíduo sólido.

O tratamento estatístico da estimativa da lenhina presente no resíduo sólido do pré-tratamento com NaOH e H₂O₂ foi realizada utilizando o programa Design Expert 7.1. Com base na análise dos coeficientes de determinação foi seleccionado o modelo cúbico reduzido como sendo o melhor no ajustamento da equação de regressão aos valores observados. A tabela 3.23 apresenta a análise ANOVA para os teores de lenhina presente nos resíduos sólidos, em % da amostra.

Tabela 3.23 - Análise ANOVA para estimativa dos teores de lenhina presente nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos com NaOH e H₂O₂

Variável	Soma dos quadrados	Df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	75.53	13	5.81	11.39	< 0.0001
A-Temperatura	15.65	1	15.65	30.67	< 0.0001
B-Conc. NaOH	6.69	1	6.69	13.11	0.0017
C-Conc. H ₂ O ₂	0.83	1	0.83	1.63	0.2170
AB	1.17	1	1.17	2.30	0.1448
AC	2.61	1	2.61	5.11	0.0351
BC	2.29	1	2.29	4.48	0.0470
A ²	1.63	1	1.63	3.19	0.0891
B ²	2.04	1	2.04	3.99	0.0595
C ²	0.42	1	0.42	0.82	0.3768
ABC	1.13	1	1.13	2.22	0.1515
A ² B	1.05	1	1.05	2.05	0.1673
A ² C	0.56	1	0.56	1.10	0.3063
AB ²	0.55	1	0.55	1.08	0.3108
R ² = 0,8810	R ² _{ajustado} = 0,8036				

Eq. 3.13: Equação de estimativa do teor de lenhina presente no resíduo sólido (em % amostra)

$$\begin{aligned}
 = & +29,3051 - 0,1358 \times A - 0,3739 \times B - 0,2257 \times C + 0,0105 \times A \times B + 0,0162 \times A \times C \\
 & - 0,1374 \times B \times C + 0,0011 \times A^2 - 0,1845 \times B^2 - 0,0444 \times C^2 + 0,0029 \times A \times B \\
 & \times C - 0,00025 \times A^2 \times B - 0,00018 \times A^2 \times C + 0,0031 \times A \times B^2
 \end{aligned}$$

Como podemos observar pela análise da tabela o modelo construído é significativo conseguindo explicar 88,10% da variação nos teores de lenhina encontrados no resíduo sólido. Os teores de lenhina encontrados no resíduo sólido são principalmente influenciados pelo factor temperatura. A figura 3.29 apresenta o efeito da temperatura (a), da concentração de NaOH (b) e da concentração de H₂O₂ (c) nos teores de lenhina presente no RS, com as restantes condições constantes

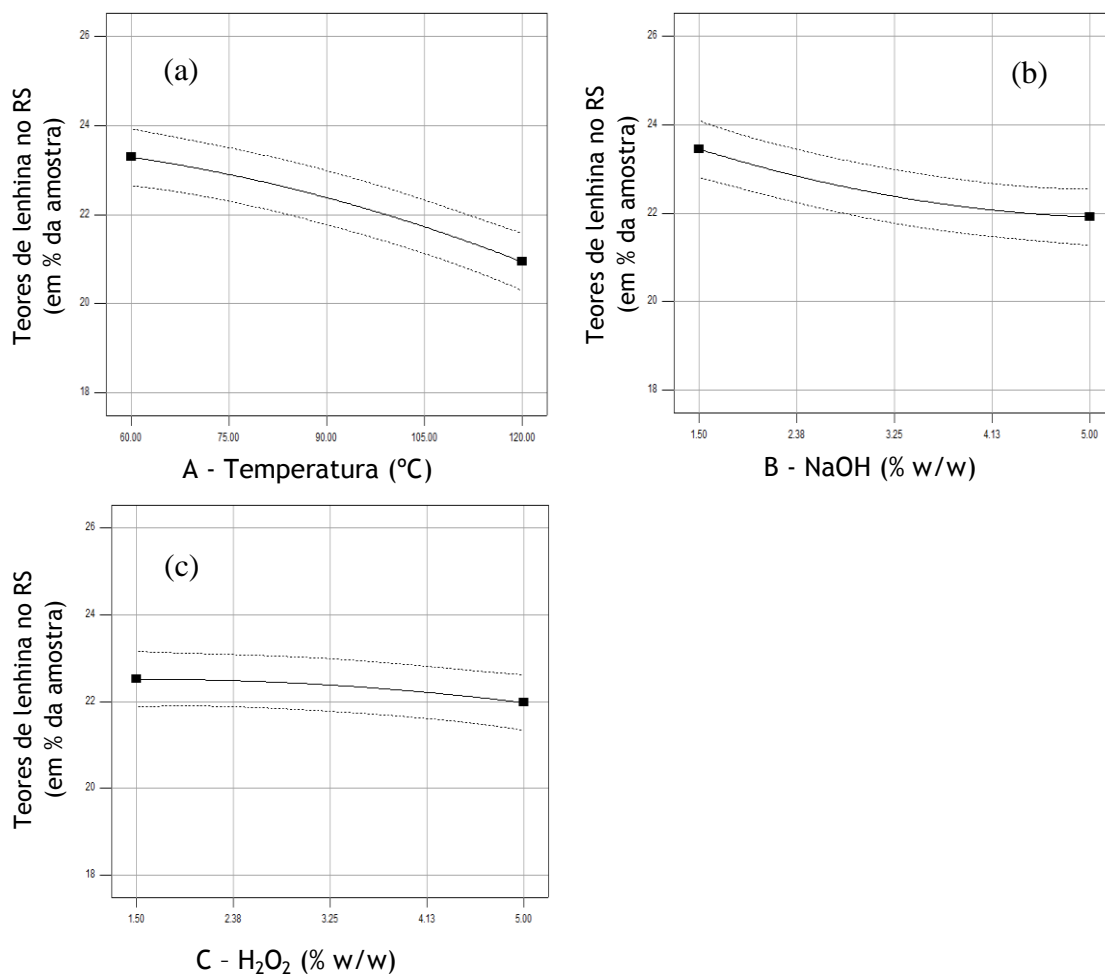


Figura 3.29 - Efeito da temperatura (a), da concentração de NaOH (b) e da concentração de H₂O₂ (c) nos teores de lenhina presente no RS, em % da amostra, com as restantes condições constantes:

(a) B = 3,25 % e C = 3,25%; (b) A = 90°C e C = 3,25%; (c) A = 90°C e B = 3,25%

A observação da figura 3.29 permite-nos observar que o aumento da temperatura nos pré-tratamentos, mantendo a concentração dos reagentes em 3,25%, possui como efeito uma diminuição da lenhina presente no resíduo sólido. Assim, um aumento de 60°C no valor da temperatura (60°C para 120°C) provoca uma diminuição em torno dos 2% (23% para 21%) no teor de lenhina presente no resíduo sólido. O efeito da concentração de hidróxido de sódio ainda foi de menor intensidade provocando o aumento da concentração de NaOH de 1,50% para 5,00% uma diminuição em torno de 1% no teor de lenhina. O efeito do aumento da concentração de NaOH parece estabilizar para concentrações mais elevadas de NaOH. O aumento da concentração de H₂O₂, para valores de temperatura de 90°C e concentrações de NaOH de 3,25%, possui um efeito diminuto na variação dos teores de lenhina presente no resíduo sólido, no entanto, esta reduzida influência do H₂O₂ nos teores de lenhina é contrariada quando se realiza uma análise de maior amplitude em termos de concentração de NaOH (Figura 3.30).

A figura 3.30 pretende mostrar a influência da adição de peróxido de hidrogénio na variação dos teores de lenhina encontrados no resíduo sólido.

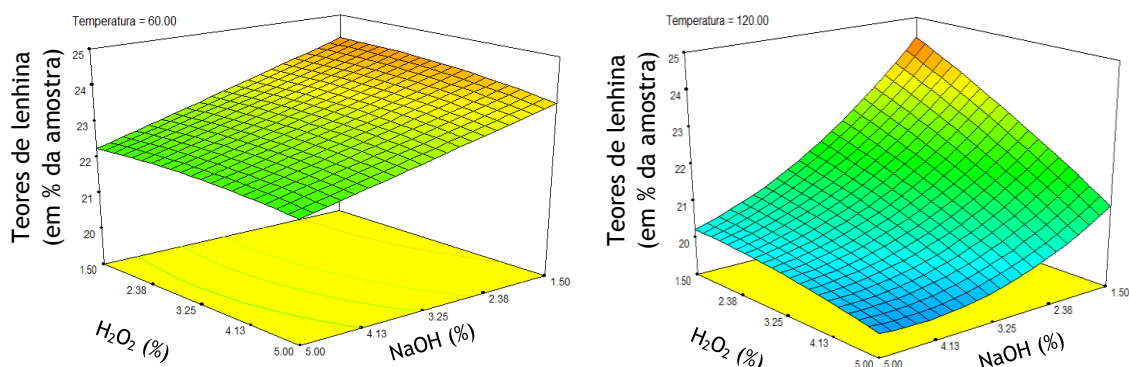


Figura 3.30 - Influência da adição de peróxido de hidrogénio na variação dos teores de lenhina no resíduo sólido

A figura 3.30 permite-nos observar que a baixas temperaturas (60°C) a adição de H₂O₂ parece não possuir qualquer influência nos teores de lenhina remanescente no resíduo sólido. A redução da lenhina, para este valor de temperatura, encontra-se dependente apenas do aumento de concentração de NaOH. No entanto, quando analisamos o mesmo efeito a uma temperatura superior vemos claramente um efeito gerado pela adição de H₂O₂, que se revela crescente à medida que se diminui a concentração de NaOH. Com uma concentração de NaOH de 5,00% verifica-se que os acréscimos de concentração de H₂O₂ influenciam de forma diminuta a redução do teor de lenhina, contudo para concentrações de NaOH de 1,50% observamos uma clara redução nos teores de lenhina no resíduo sólido face a aumentos da concentração de H₂O₂.

A figura 3.31 apresenta as TRA determinadas nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos com NaOH e H₂O₂, aos quais juntamos as TRA obtidas nos 4 ensaios realizados apenas com NaOH e com duração idêntica (40min.).

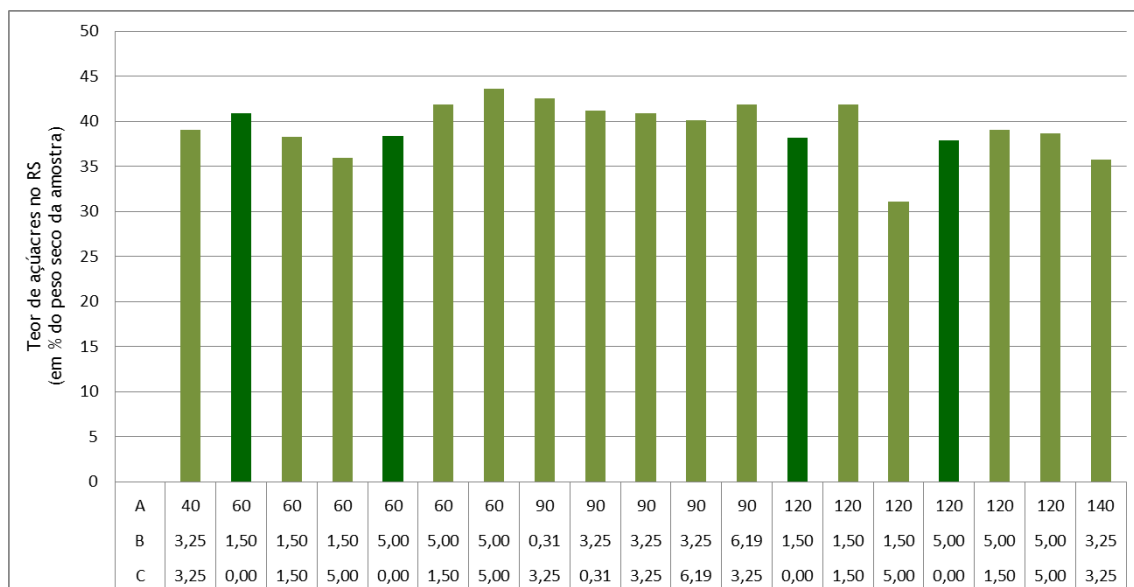


Figura 3.31 - TRA determinadas nos resíduos sólidos nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos com NaOH e H₂O₂

A - Temperatura B - Concentração de NaOH (% w/w) C - Concentração de H₂O₂ (% w/w)

A evolução da taxa de retenção de açúcares (TRA) no resíduo sólido, segundo a leitura da figura 3.31, apresentou dois comportamentos distintos face a aumentos das concentrações de H₂O₂. Nos ensaios realizados com concentrações de NaOH iguais a 1,50% os aumentos da concentração de H₂O₂ provocaram uma diminuição da TRA no resíduo sólido verificando-se tal ocorrência quer nos ensaios realizados a 60°C quer nos ensaios realizados a 120°C. Nos ensaios realizados a 60°C o aumento da concentração de H₂O₂ de 0,00% para 5,00% tem como consequência uma diminuição da TRA de 4,97% (40,92-35,95). Nos ensaios realizados a 120°C o mesmo aumento da concentração de H₂O₂ provoca um a diminuição da TRA de 7,11% (38,19-31,08). Pelo contrário para concentrações de NaOH iguais a 5,00%, os aumentos das concentrações de H₂O₂ provocaram um acréscimo das TRA no resíduo sólido. Nos ensaios realizados a 60°C o aumento da concentração de H₂O₂ de 0,00 para 5,00% provoca um aumento de 5,25% (43,59-38,34). Nos ensaios realizados a 120°C o acréscimo induzido pelo aumento das concentrações de H₂O₂ de 0,00 para 5,00% foi menor, tendo sido detectado um aumento da TRA de apenas 0,75% (38,64.37,89). A tabela 3.24 apresenta a seguir os teores de glucose, xilose e arabinose presentes no resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NaOH e H₂O₂

Tabela 3.24 - Teores de glucose, xilose e arabinose presentes no resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NaOH e H₂O₂

A	B	C	Glucose ¹	R.G.	Xilose ¹	R.X.	Arabinose ¹	R.A.
40	3,25	3,25	24,52 ± 0,24	73,0	10,30 ± 0,05	78,5	4,28 ± 0,57	94,1
60	1,50	1,50	24,65 ± 3,06	73,4	10,10 ± 1,27	77,0	3,53 ± 0,45	77,7
60	1,50	5,00	23,04 ± 1,43	68,6	9,61 ± 0,62	73,3	3,30 ± 0,18	72,6
60	5,00	1,50	26,66 ± 0,30	79,4	10,90 ± 0,19	83,2	4,30 ± 0,34	94,5
60	5,00	5,00	28,69 ± 0,76	85,4	11,16 ± 0,07	85,1	3,75 ± 0,15	82,4
90	0,31	3,25	28,60 ± 1,43	85,2	11,34 ± 0,47	86,5	2,58 ± 0,48	56,7
90	3,25	0,31	26,85 ± 1,51	79,9	10,81 ± 0,13	82,5	3,56 ± 0,27	78,3
90	3,25	3,25	26,48 ± 1,69	78,8	10,90 ± 0,37	83,1	3,51 ± 0,23	77,0
90	3,25	6,19	26,61 ± 0,59	79,2	10,91 ± 0,17	83,2	2,61 ± 0,13	57,4
90	6,19	3,25	26,52 ± 0,63	78,9	11,01 ± 0,43	84,0	4,32 ± 0,07	94,9
120	1,50	1,50	27,23 ± 0,46	81,1	11,32 ± 0,16	86,3	3,33 ± 0,13	73,2
120	1,50	5,00	20,77 ± 1,69	61,8	8,88 ± 0,75	67,7	1,43 ± 0,08	31,4
120	5,00	1,50	25,09 ± 0,05	74,7	10,64 ± 0,17	81,2	3,30 ± 0,26	72,5
120	5,00	5,00	25,52 ± 1,20	76,0	10,80 ± 0,65	82,3	2,32 ± 0,06	51,1
140	3,25	3,25	23,63 ± 0,23	70,4	10,17 ± 0,36	77,6	1,97 ± 0,37	43,2

A - Temperatura B - Concentração de NaOH (% w/w) C - Concentração de H₂O₂ (% w/w)

1 - Teores expressos em % da amostra

R.G. - Taxa de retenção de glucose no RS expressa em % da glucose na amostra

R.X. - Taxa de retenção de xilose no RS expressa em % da xilose na amostra

R.A. - Taxa de retenção de arabinose no RS expressa em % da arabinose na amostra

A tabela 4.23 mostra-nos que nos pré-tratamentos efectuados com NaOH e H₂O₂ a fracção sólida dos pré-tratamentos consegue reter entre 60,7 e 84,0% da glucose, entre 66,5 e 85% da xilose e entre 31,0 e 93,4% da arabinose. A maior taxa de solubilização de açúcares foi verificada nos pré-tratamentos realizados a 120°C, nos quais a concentração de H₂O₂ (5,00%) foi muito superior à concentração do NaOH (1,50%). Nestas condições solubiliza-se 38,2% de glucose, 32,3% da xilose e 68,6% da arabinose. A figura 3.32 apresenta a evolução das taxas de retenção de glucose, xilose e arabinose em função da variação da concentração de H₂O₂ aplicada.

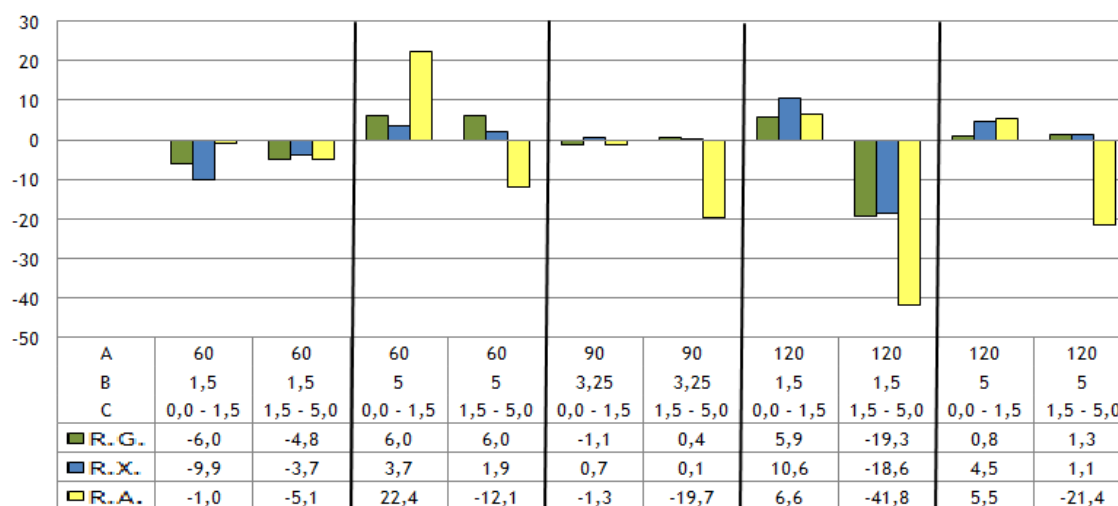


Figura 3.32 - Evolução das taxas de retenção de glucose, xilose e arabinose em função da variação da concentração de H_2O_2 aplicada

A - Temperatura B - Concentração de NaOH (% w/w) C - Concentração de H_2O_2 (% w/w)

A figura 3.32 pretende analisar o efeito que o aumento da concentração de H_2O_2 provocou nas taxas de retenção dos três açúcares analisados.

Nos pré-tratamentos efectuados a 60°C com uma concentração de NaOH de 1,50% o aumento da concentração de H_2O_2 de 0,0 para 1,5% e de 1,5 para 5,0% provocou uma diminuição nas taxas de retenção de todos os açúcares, tendo sido verificada uma diminuição mais evidente na taxa de retenção da arabinose quando se aumentou a concentração de H_2O_2 de 1,5 para 5,0%. Este aumento de concentração de H_2O_2 provocou uma diminuição das taxas de retenção da arabinose também nas restantes classes de temperatura e concentração de NaOH.

Nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 120°C e com uma concentração de NaOH de 1,5%, o aumento da adição de H_2O_2 possui dois comportamentos distintos. Até 1,5%, os aumentos da concentração de H_2O_2 favorecem a fixação da glucose e xilose no resíduo sólido. A partir de 1,5%, o aumento da concentração de H_2O_2 de 1,5 para 5,0% conduz a uma perda muito significativa nas taxas de retenção de todos os açúcares registando-se uma diminuição no resíduo sólido de 19,3% no teor de glucose, de 18,6% no teor de xilose e de 41,8% no teor de arabinose.

Quando se aumentou a concentração de NaOH para 5,0% verificou-se, nos pré-tratamentos realizados a 60°C, uma inversão na evolução das taxas de retenção da glucose e xilose passando estas a aumentar face a aumentos da concentração de H_2O_2 . Este aumento das taxas de retenção de glucose e xilose, também foi verificado nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 120°C, no entanto com menor intensidade.

Nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 90°C e uma concentração de NaOH de 3,25% não se observaram variações consideráveis nas taxas de retenção da glucose e da xilose face a aumentos da concentração de H_2O_2 .

Na bibliografia consultada a maioria dos autores quantifica os açúcares sob a forma de hemiceluloses totais. Dessa forma não é possível comparar directamente as taxas de

solubilização dos açúcares individualmente com a constante na literatura. No entanto refira-se que se obtiveram taxas de solubilização de hemiceluloses em pré-tratamentos com material herbáceo de 87,3% para caules de milho, 85,7% para palha de trigo (Sun *et al.*, 2007), 85,3% para palha de cevada (Sun *et al.*, 2002), 71,9% para palha de centeio (Fang *et al.*, 2000). Já para material arbustivo outros autores obtiveram taxas de solubilização de hemiceluloses de 24,7% e 27,4%, respectivamente para *Haloxylon ammodendron* e *Elaeagnus angustifolia* (Sun *et al.*, 2010). Também Geng e colaboradores determinaram taxas de solubilização de hemiceluloses semelhantes para material arbustivo tendo obtido valores de solubilização de 26,2% e 26,5% das hemiceluloses presentes em *Caligonum monogoliacum* e *Tamarix spp* respectivamente (Geng *et al.*, 2003). Em pré-tratamentos realizados com madeira de choupo, Sun e outros investigadores determinaram taxas de solubilização de hemiceluloses de 49,5% (Sun *et al.*, 2007).

Na modelação estatística realizada não se conseguiu construir um modelo significativo para a estimativa do teor de glucose e xilose no resíduo sólido. Desta forma, não foi possível estabelecer uma relação entre a variação dos factores (Temperatura, NaOH, H₂O₂) e os teores de glucose e xilose encontrados.

O teor de arabinose retida no resíduo sólido após pré-tratamento foi modelado com base num modelo cúbico reduzido apresentando-se na tabela 3.25 a análise da sua variância.

Tabela 3.25 - Análise ANOVA para estimativa dos teores de arabinose presente nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos com NaOH e H₂O₂

Variável	Soma dos quadrados	Df	Média dos Quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	21.10	12	1.76	12.60	< 0.0001
A-Temperatura	10.30	1	10.30	73.85	< 0.0001
B-Conc. NaOH	3.03	1	3.03	21.70	0.0001
C-Conc. H ₂ O ₂	0.90	1	0.90	6.49	0.0188
AB	0.030	1	0.030	0.22	0.6467
AC	1.09	1	1.09	7.83	0.0108
BC	0.093	1	0.093	0.67	0.4237
A ²	0.47	1	0.47	3.39	0.0800
B ²	0.020	1	0.020	0.14	0.7115
C ²	0.56	1	0.56	4.03	0.0578
ABC	0.39	1	0.39	2.78	0.1105
A ² B	0.44	1	0.44	3.17	0.0893
A ² C	0.20	1	0.20	1.45	0.2426
R ² = 0,8781		R ² _{ajustado} = 0,8084			
Eq. 3.14 Equação de estimativa do teor de arabinose presente no resíduo sólido (em % amostra)					
$\begin{aligned} &= +7,1585 - 0,1156 \times A - 0,4824 \times B + 0,1386 \times C + 0,0232 \times A \times B + 0,0095 \times A \times C \\ &\quad - 0,1275 \times B \times C + 0,0007 \times A^2 - 0,0096 \times B^2 - 0,0515 \times C^2 + \\ &\quad + 0,0017 \times A \times B \times C - 0,00016 \times A^2 \times B - 0,00011 \times A^2 \times C \end{aligned}$					

A análise da tabela 3.25 permite observar que o modelo é significativo permitindo a variação dos factores utilizados explicar 87,81% da variação dos teores de arabinose encontrada nos resíduos sólidos. O efeito linear da temperatura ($F_A = 73,85$) apresenta-se como o factor mais determinante na variação da retenção de lenhina no resíduo sólido seguido da concentração de NaOH ($F_B = 21,70$). Relativamente à adição de H_2O_2 a maior influência deste reagente nos teores de arabinose encontrados deve-se mais ao efeito conjugado que o H_2O_2 possui com a temperatura ($F_{AC} = 7,83$) do que à sua acção individual ($F_C = 6,49$). A figura 3.33 apresenta a influência individual dos factores temperatura, concentração de NaOH e concentração de H_2O_2 nos teores de arabinose presente no resíduo sólido.

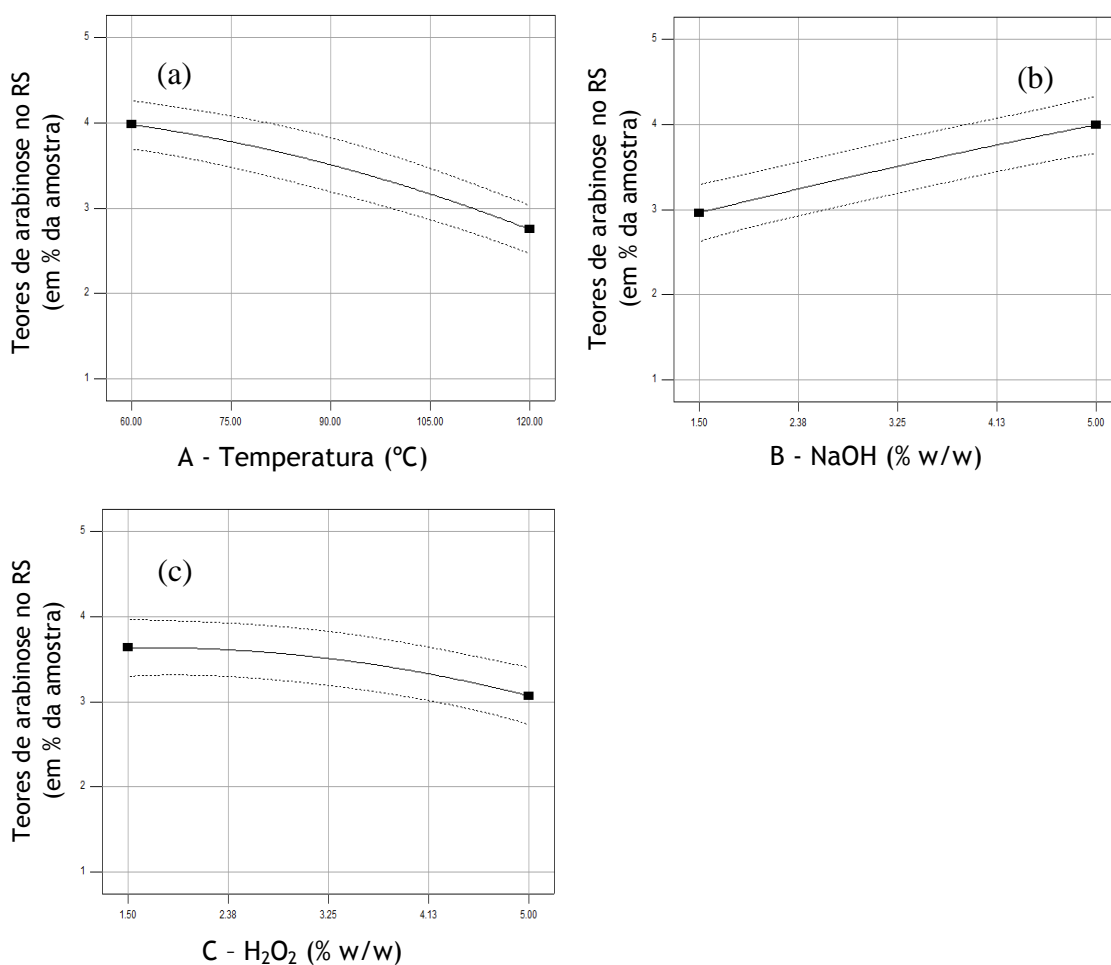


Figura 3.33 - Efeito da temperatura (a), da concentração de NaOH (b) e da concentração de H_2O_2 (c) e (d) nos teores de arabinose presente no resíduo sólido, em % da amostra, com as restantes condições constantes:

(a) B = 3,25 % e C = 3,25%; (b) A = 90°C e C = 3,25%; (c) A = 90°C e B = 3,25%;

Como podemos observar pela leitura da figura 3.33 o aumento da temperatura e da concentração de H_2O_2 provocam uma redução do teor de arabinose presente no resíduo sólido. O aumento da H_2O_2 parece ser mais expressivo na redução dos teores de arabinose no resíduo sólido em especial a partir de concentrações acima de 3.25%. Curiosamente, segundo

o modelo construído o aumento da carga de NaOH parece provocar um aumento da retenção da arabinose no resíduo sólido impedindo a sua solubilização.

A figura 3.34 apresenta o efeito da conjugação entre a temperatura e a concentração de H_2O_2 nos teores de arabinose retida no resíduo sólido mantendo a concentração de NaOH igual a 1,50%.

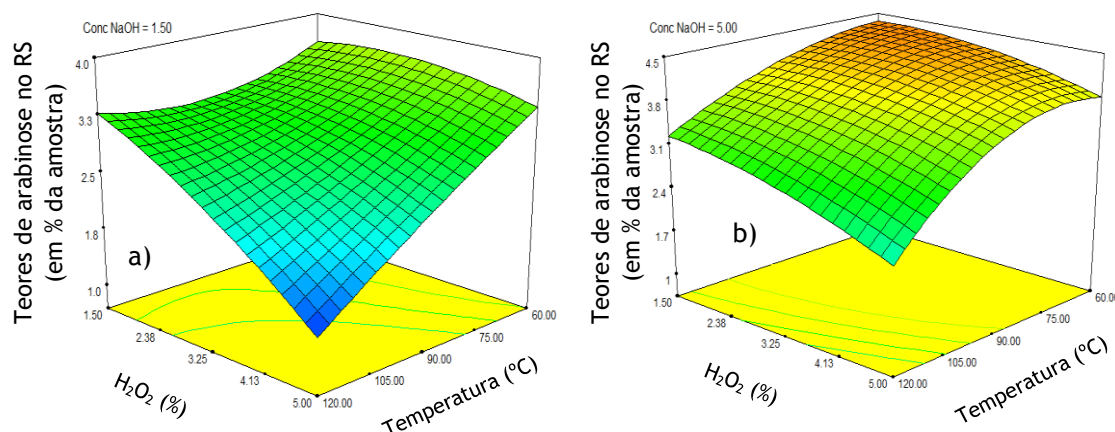


Figura 3.34 - Efeito da conjugação entre a temperatura e a concentração de H_2O_2 nos teores de arabinose retida no resíduo sólido para concentrações de NaOH iguais a 1,50% e 5,00%

A figura 3.34 mostra-nos que a redução nos teores de arabinose do resíduo sólido diminui consideravelmente nos pré-tratamentos realizados com temperatura acima dos 90°C, com altas concentrações de H_2O_2 (>3,25%) e baixas concentrações de NaOH (1,50%). Na figura 4.32a) podemos observar, mantendo a carga de NaOH em 1,50%, uma diminuição acentuada no teor de arabinose quando a 120°C elevamos a concentração de H_2O_2 de 1,50% para 5,00%. Pelo contrário, na figura 4.32b), com uma concentração de NaOH de 5,00%, verificamos que o mesmo aumento na concentração de H_2O_2 à mesma temperatura (120°C) provoca apenas uma ténue redução no teor de arabinose no resíduo sólido.

3.4.3 - Considerações finais sobre o pré-tratamento com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogénio

1 - Da análise da lenhina no hidrolisado resultante dos pré-tratamentos modelados estatisticamente com hidróxido de sódio e peróxido de hidrogénio (LH_{ALP}) resultou um modelo significativo, com um coeficiente de determinação para a equação de regressão estimada de 0,9809. Segundo a análise de variância do modelo, os factores mais significativos na solubilização da lenhina foram a concentração de hidróxido de sódio, a temperatura e a conjugação do efeito da temperatura com a concentração de peróxido de hidrogénio. Tal como no pré-tratamento com hidróxido de sódio suspeitamos de um sobre estimativa dos teores de lenhina determinada pelas mesmas razões enunciadas anteriormente

2 - Não se conseguiram traduzir de forma estatisticamente significativa os teores de glucose e xilose presentes no resíduo sólido em função da variação dos factores utilizados.

Foram encontrados modelos significativos para a variação do peso do resíduo sólido, da lenhina e da arabinose. As equações de regressão estimadas apresentaram respectivamente para cada uma destas variáveis valores de R^2 de 0,8724 (RS), 0,8810 (lenhina) e 0,8781 (arabinose).

A temperatura foi considerada o factor mais significativo na variação do valor daquelas variáveis tendo sido também considerado significativo, no caso da lenhina e da arabinose, a carga de hidróxido de sódio utilizada nos pré-tratamentos.

3 - A adição de peróxido aumenta as taxas de remoção de lenhina mas também aumenta a solubilização dos açúcares, contudo neste último ponto o efeito não é uniforme. Assim foi verificado que para concentrações baixas de NaOH (1,50%) o aumento de H_2O_2 diminuiu a taxa de retenção de açúcares no resíduo sólido, no entanto, para concentrações mais elevadas de NaOH (5,00%) foi verificado um efeito oposto, aumentando a retenção de açúcares no resíduo sólido, especialmente da glucose e da xilose, com o aumento da carga de H_2O_2 . Este aumento foi mais considerável com a aplicação de temperaturas mais baixas.

3 - Obteve-se uma taxa máxima de remoção de lenhina de 22,6% nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 140°C e com concentrações de NaOH e de H_2O_2 de 3,25%. Nestas condições o resíduo sólido reteve 70,4% da glucose, 77,6% da xilose e 43,2% da arabinose relativamente às quantidades destes açúcares presentes na amostra.

3.5 - Pré-tratamento com amoníaco por imersão

A realização de pré-tratamentos com amoníaco pode ser realizada por imersão em solução (Soaked Aqueous Ammonia -SAA)(Li e Kim, 2011; Pryor *et al.*, 2012; Rollin *et al.*, 2011; Yoo *et al.*, 2011), por percolação do reagente a altas temperaturas (Ammonia Recycle Percolation - ARP)(Kim e Lee, 2005) e por explosão (Ammonia Fiber Explosion - AFEX) (Bals *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2012; Lau *et al.*, 2008).

O pré-tratamento com amoníaco por imersão provoca a quebra das ligações C-O-C da lenhina, bem como a quebra das ligações éter e éster no complexo formado entre a lenhina e os hidratos de carbono (Lignin-Carbohydrate Complex - LCC) (Kim, 2004).

3.5.1 - Lenhina no Hidrolisado de NH_3 (LH_{NH_3})

O tratamento estatístico da lenhina presente no hidrolisado resultante de pré-tratamento com amoníaco (LH_{NH_3}) revelou, para um modelo cúbico reduzido, um R^2 de 0,8003 considerando como único factor significativo a concentração de NH_3 , com um p-valor inferior a 0,0001. O valor de R^2 encontrado revela uma baixa relação entre a variação dos factores considerados e variação de LH_{NH_3} não se efectuando por isso qualquer leitura do modelo estatístico construído. A tabela 3.26 apresenta, nas 15 condições de pré-tratamento testadas, as taxas de LH_{NH_3} observadas.

Tabela 3.26 - Taxas de LH_{NH_3} observadas, expressas em percentagem da amostra

Temperatura (°C)	Tempo (horas)	NH_3 (% w/w)	LH_{NH_3} (%)		
50,0	4,50	8,00	17,61	±	0,05
56,5	1,91	2,83	22,19	±	0,07
56,5	1,91	13,17	29,97	±	2,71
56,5	7,09	2,83	22,61	±	1,26
56,5	7,09	13,17	28,74	±	0,46
75,0	1,00	8,00	20,57	±	0,16
75,0	4,50	1,00	13,47	±	0,03
75,0	4,50	8,00	23,24	±	1,57
75,0	4,50	15,00	25,02	±	0,46
75,0	8,00	8,00	21,15	±	0,23
93,5	1,91	2,83	17,41	±	1,27
93,5	1,91	13,17	27,60	±	2,18
93,5	7,09	2,83	17,14	±	0,38
93,5	7,09	13,17	25,97	±	0,09
100,0	4,50	8,00	23,61	±	0,60

A tabela 3.26 mostra-nos uma clara relação entre os teores de LH_{NH_3} e a concentração de NH_3 utilizada nos ensaios. Como podemos observar pela observação da tabela, as taxas de LH_{NH_3} mais elevadas, superiores a 25%, foram obtidas com concentrações de NH_3 de 13,17%,

independentemente dos valores de temperatura e de tempo utilizados. A variação destes dois factores parece não ter qualquer relação com as taxas de LH_{NH_3} verificadas.

Tal como na análise do hidrolisado dos pré-tratamentos anteriores, os valores de LH_{NH_3} poderão estar sobrestimados devido à contabilização como lenhina no hidrolisado, de produtos resultantes da condensação de extractáveis e de açúcares presentes em complexos formados com a lenhina.

3.5.2 - Constituição do resíduo sólido

A tabela 3.27 apresenta a constituição do resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NH_3 . Nos ensaios realizados verificou-se uma variação do resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos entre 56,03% (93,5°C, 7,09h, 13,17% NH_3) e 70,08% (56,5°C, 1,91h, 2,83% NH_3). Como seria de esperar o aumento da severidade dos pré-tratamentos conduz a uma maior solubilização dos compostos presentes na amostra diminuindo por essa via o peso do resíduo sólido remanescente.

Tabela 3.27 - Constituição do resíduo sólido (RS) resultante do pré-tratamento com NH_3

A	B	C	RS (%)	LK (%)	TRL	Açúcares (%)	TRA
50,0	4,50	8,00	69,23 ± 0,55	21,26 ± 0,14	14,8	40,82 ± 0,61	79,6
56,5	1,91	2,83	70,08 ± 0,47	25,19 ± 0,46	0,0	38,83 ± 0,18	75,8
56,5	1,91	13,17	67,23 ± 0,07	23,91 ± 0,11	4,2	37,33 ± 1,28	72,8
56,5	7,09	2,83	68,84 ± 0,52	23,38 ± 0,51	6,3	38,85 ± 0,66	75,8
56,5	7,09	13,17	64,89 ± 0,82	22,22 ± 0,30	11,0	36,83 ± 0,18	71,9
75,0	4,50	1,00	67,96 ± 0,48	24,34 ± 0,07	2,5	38,30 ± 0,48	74,7
75,0	1,00	8,00	65,45 ± 0,37	21,58 ± 0,03	13,6	38,58 ± 0,50	75,3
75,0	4,50	8,00	63,69 ± 1,15	21,64 ± 0,88	13,3	37,05 ± 1,74	72,3
75,0	4,50	15,00	64,00 ± 0,59	21,14 ± 0,04	15,3	37,95 ± 1,98	74,0
75,0	8,00	8,00	61,56 ± 0,18	20,11 ± 0,15	19,4	36,86 ± 2,71	71,9
93,5	1,91	2,83	64,26 ± 0,14	22,13 ± 0,09	11,4	37,58 ± 0,53	73,3
93,5	1,91	13,17	57,89 ± 0,64	20,69 ± 0,75	17,1	37,79 ± 0,20	73,7
93,5	7,09	2,83	61,79 ± 0,81	21,88 ± 0,65	12,3	36,27 ± 1,73	70,8
93,5	7,09	13,17	56,03 ± 0,81	18,02 ± 0,27	27,8	33,71 ± 0,32	65,8
100,0	4,50	8,00	57,81 ± 0,16	18,44 ± 0,46	26,1	35,26 ± 0,63	68,8

A - Temperatura (°C)

B - Tempo (h)

C - Concentração de NH_3 (% w/w)

LK (%) - Lenhina de Klason no RS expressa em % da amostra

TRL - Taxa de remoção de lenhina expressa em % da lenhina presente na amostra

Açúcares (%) - Açúcares no RS em % da amostra

TRA - Taxa de retenção de açúcares no RS expressa em % dos açúcares presente na amostra

Na tabela 3.28 apresenta-se a análise de variância para estimativa do peso seco do resíduo sólido expresso em percentagem do peso seco da amostra construída com base num modelo quadrático modificado.

Tabela 3.28 - Análise ANOVA para estimativa do peso seco do resíduo sólido resultante de pré-tratamento com NH_3

Variável	Soma dos quadrados	Df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	532.04	13	40.93	45.23	< 0.0001
A-Temperatura	130.47	1	130.47	144.19	< 0.0001
B-Tempo	15.06	1	15.06	16.65	0.0006
C- NH_3	15.71	1	15.71	17.36	0.0005
AB	0.15	1	0.15	0.16	0.6909
AC	7.08	1	7.08	7.83	0.0111
BC	0.058	1	0.058	0.064	0.8024
A^2	2.34	1	2.34	2.59	0.1232
B^2	2.43	1	2.43	2.69	0.1168
C^2	11.50	1	11.50	12.71	0.0019
ABC	0.74	1	0.74	0.81	0.3774
A^2B	1.00	1	1.00	1.11	0.3046
A^2C	4.08	1	4.08	4.51	0.0464
AB^2	0.57	1	0.57	0.63	0.4367
$R^2 = 0,9671$ $R^2_{\text{ajustado}} = 0,9457$					
Eq. 3.15 Equação de estimativa do peso seco do resíduo sólido (em % do peso seco da amostra)					
$= +78,5263 - 0,1642 \times A + 5,4141 \times B - 2,8721 \times C - 0,1094 \times A \times B + 0,0657 \times A \times C$ $- 0,0696 \times B \times C + 0,0006 \times A^2 - 0,2680 \times B^2 + 0,0346 \times C^2 +$ $+ 0,0009 \times A \times B \times C + 0,0005 \times A^2 \times B - 0,0005 \times A^2 \times C + 0,0027 \times A \times B^2$					

A análise da variância, através da leitura da tabela 3.28, mostra que o modelo é estatisticamente válido possuindo um p-valor < 0,0001, encontrando-se por isso ajustado. O modelo construído consegue explicar 96,71% da variação do peso seco do resíduo sólido. Analisando o valor de F, verificamos que os efeitos lineares da temperatura ($F_A = 144,19$) foram os que se revelaram mais importantes na variação da resposta. A variação do peso seco do resíduo sólido encontra-se ainda influenciada, em menor escala, pela concentração de NH_3 ($F_C = 17,36$ e $F_{C^2} = 12,71$), pelo tempo de duração dos pré-tratamentos ($F_B = 16,65$) e pela interacção entre a temperatura e a concentração de NH_3 ($F_{AC} = 7,83$). A figura 3.35 apresenta a influência individual da temperatura, tempo e concentração de NH_3 na variação do peso seco do resíduo sólido.

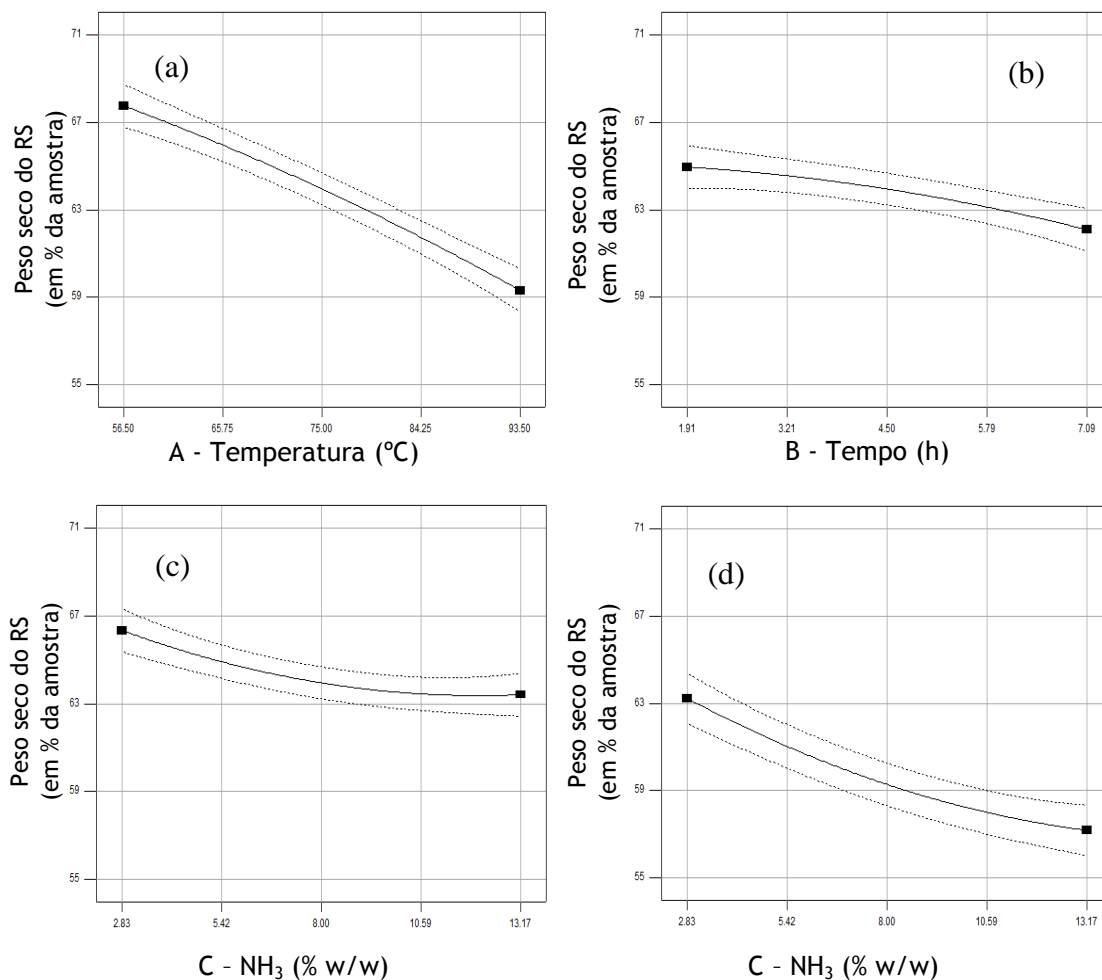


Figura 3.35 - Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de NH₃ (c) e (d) no peso seco resíduo sólido, com as restantes condições constantes:

(a) B = 4,5h e C = 8,00%; (b) A = 75°C e C = 8,00%;

(c) A = 75°C e B = 4,5h; (d) A = 93,5°C e B = 4,5h

A figura 3.35 mostra-nos a temperatura como o factor mais determinante na diminuição do peso seco do resíduo sólido. O aumento do tempo e da concentração de NH₃ também influenciam a perda de peso do resíduo sólido mas de uma forma mais gradual.

Na figura 3.35 (c) podemos observar que, para temperaturas de 75°C, os acréscimos de concentração de NH₃ acima de 10,59% parecem não provocar diminuições no peso do resíduo sólido, ficando este estabilizado acima dos 63%. Contudo, se aumentarmos a temperatura para 93,5°C, fig. 3.35 (d), verificamos o desaparecimento da estabilização da solubilização para concentrações de NH₃ acima de 10,59%. A forma parabólica da curva na figura 3.35 (d) sugere-nos que essa estabilização deverá ocorrer para valores de concentração de NH₃ mais elevados. Assim, podemos concluir que o aumento da temperatura permite o prolongamento da acção de solubilização, dos compostos presentes no resíduo sólido, para valores mais elevados de concentração de NH₃.

De acordo com a tabela 3.27 as maiores TRL foram verificadas nos pré-tratamentos realizados com temperatura, tempos de duração e concentração de NH_3 mais elevadas (TRL = 27,8 - 93,5°C, 7,09h, 13,17% NH_3 e TRL = 26,1 - 100,0°C, 4,50h, 8,00% NH_3). Nestas condições de maior severidade também se encontram associadas as menores TRA no resíduo sólido com valores iguais a 33,71% e a 35,26%, respectivamente.

Na tabela 3.29 apresenta-se a análise de variância para estimativa da lenhina presente no resíduo sólido, construída com base num modelo quadrático modificado através da introdução no modelo quadrático dos factores ABC e A^2B .

Tabela 3.29 - Análise ANOVA para estimativa dos teores de lenhina presente no resíduo sólido resultante de pré-tratamento com NH_3

Variável	Soma dos quadrados	Df	Média dos quadrados	Valor F	p-valor Prob > F
Modelo	104.71	11	9.52	13.04	< 0.0001
A-Temperatura	42.75	1	42.75	58.55	< 0.0001
B-Tempo	0.68	1	0.68	0.93	0.3462
C- NH_3	17.84	1	17.84	24.43	< 0.0001
AB	0.086	1	0.086	0.12	0.7353
AC	2.04	1	2.04	2.80	0.1084
BC	1.35	1	1.35	1.84	0.1883
A^2	6.22	1	6.22	8.52	0.0080
B^2	0.018	1	0.018	0.025	0.8760
C^2	21.82	1	21.82	29.88	< 0.0001
ABC	1.62	1	1.62	2.22	0.1508
A^2B	1.25	1	1.25	1.71	0.2048
$R^2 = 0,8670$ $R^2_{\text{ajustado}} = 0,8005$					
Eq. 3.16 Equação de estimativa da lenhina no resíduo sólido (em % do peso seco da amostra)					
$= +35,9687 - 0,1782 \times A - 4,0538 \times B - 0,9878 \times C + 0,0964 \times A \times B + 0,0020 \times A \times C$ $+ 0,0748 \times B \times C + 0,0005 \times A^2 + 0,0055 \times B^2 + 0,0477 \times C^2 +$ $- 0,0013 \times A \times B \times C - 0,0006 \times A^2 \times B$					

A análise de variância mostra-nos que o modelo para estimativa da lenhina no resíduo sólido é estatisticamente válido conseguindo os factores utilizados explicar 86,7% da variação desta componente. A temperatura e a concentração de NH_3 são factores considerados significativos na explicação do modelo, quer em termos lineares ($F_A = 58,55$ e $F_C = 17,84$), quer pelo quadrado do seu valor ($F_{A^2} = 8,52$ e $F_{C^2} = 21,82$). No modelo construído o factor tempo parece não influenciar os teores de lenhina presente no resíduo sólido. A figura 3.36 apresenta a influência individual da temperatura, tempo e concentração de NH_3 na variação de lenhina presente no resíduo sólido.

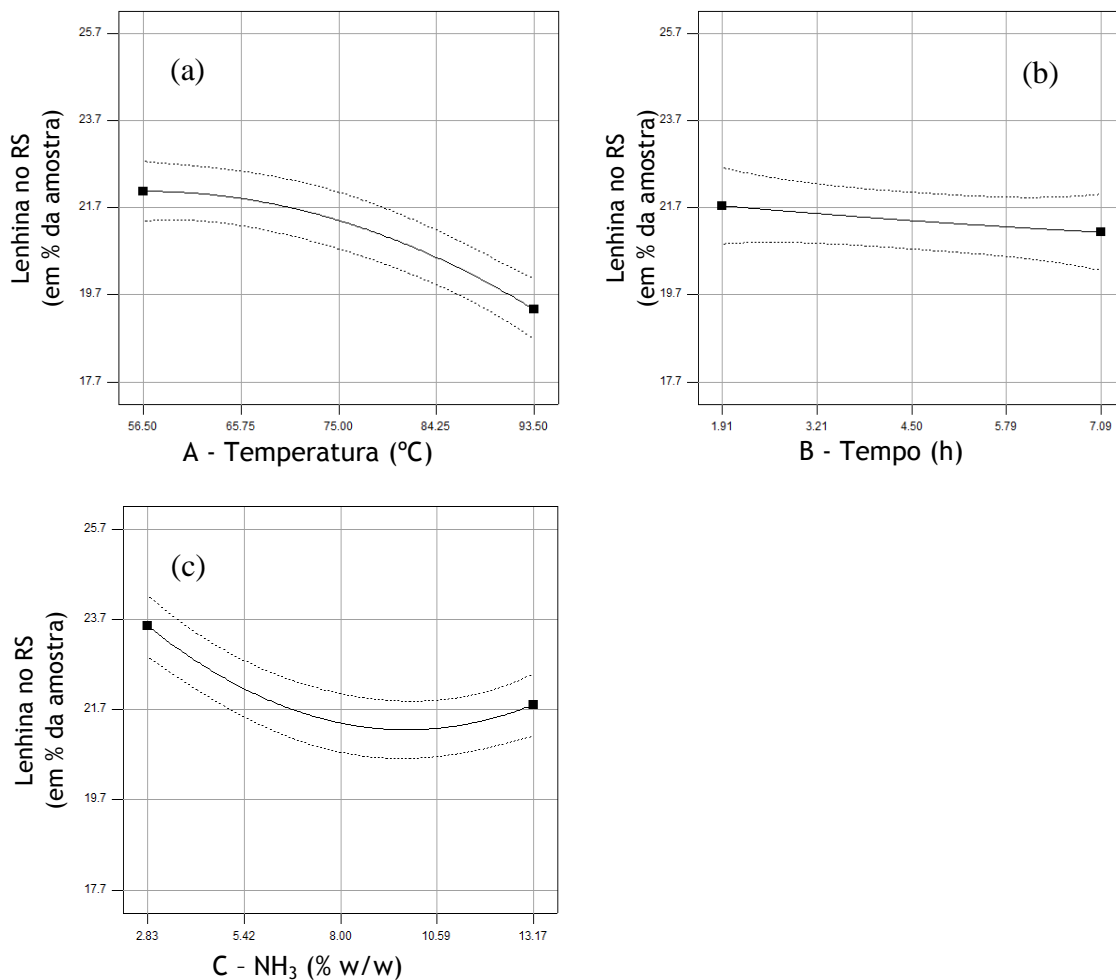


Figura 3.36 - Efeito da temperatura (a), do tempo (b) e da concentração de NH₃ (c) no teor de lenhina presente no resíduo sólido, com as restantes condições constantes:
(a) B = 4,5h e C = 8,00%; (b) A = 75°C e C = 8,00%; (c) A = 75°C e B = 4,5h;

Segundo a observação da figura 3.36 a diminuição da lenhina no resíduo sólido é afectada principalmente pela temperatura e pela concentração de NH₃. Estes dois factores parecem no entanto influenciar a redução de lenhina de forma distinta. Enquanto a temperatura provoca diminuições da LK cada vez maiores à medida que o seu valor aumenta, o aumento concentração de NH₃ tende a deixar de provocar reduções na lenhina a partir de uma concentração próxima dos 8,00%. O aumento do tempo de duração dos pré-tratamentos provoca apenas uma redução ligeira nos teores de lenhina. A figura 3.37 mostra os teores de lenhina e de açúcares presentes no resíduo sólido dos pré-tratamentos com amoníaco.

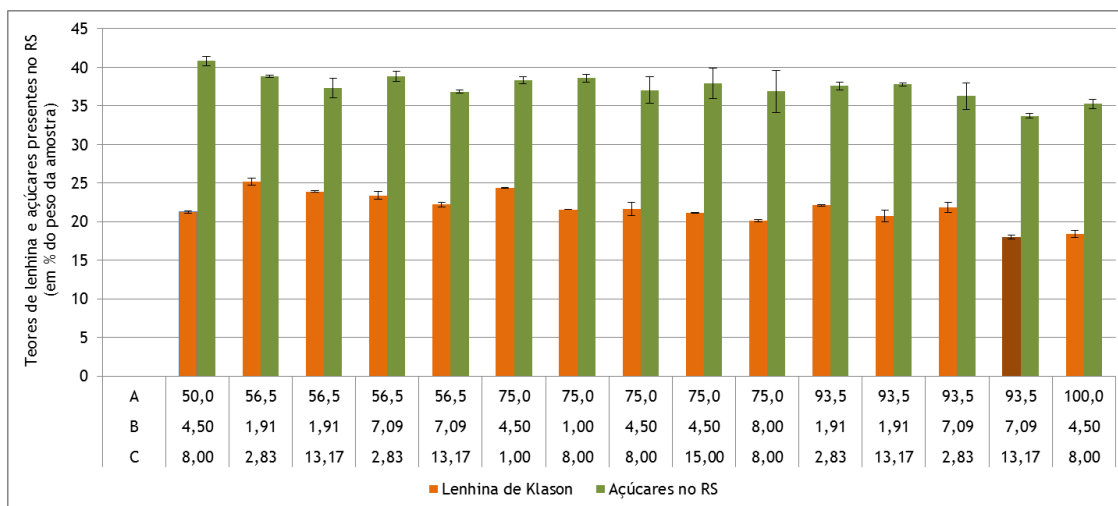


Figura 3.37 - Teores de lenhina e açúcares presentes no resíduo sólido dos pré-tratamentos com NH_3 , expressos em % da amostra
A - Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), B - Tempo (min.), C - Concentração de NH_3 (% w/w)

A figura 3.37 mostra-nos nos pré-tratamentos realizados a $56,5^{\circ}\text{C}$ que o teor de lenhina no resíduo sólido decresce quando se aumenta a concentração de NH_3 ou o tempo de duração do pré-tratamento. Com uma temperatura de $56,5^{\circ}\text{C}$ a diminuição da lenhina no resíduo sólido induzida pelo aumento da duração do pré-tratamento de 1,91h para 7,09h foi de 1,81% (23,38-25,19) para uma concentração de NH_3 de 2,83% e de 1,69% (22,22-23,91) para uma concentração de NH_3 de 13,17%. Nestas condições o aumento do tempo manteve praticamente inalterada a taxa de retenção de açúcares no resíduo sólido. Nesta classe de temperatura, o aumento da concentração do reagente mantendo o tempo de duração dos pré-tratamentos constante possui um efeito distinto na TRA. Assim, quando se aumentam as concentrações de NH_3 de 2,83% para 13,17% verifica-se, quer nos pré-tratamentos realizados durante 1,91h quer nos realizados durante 7,09h, uma redução nos teores de lenhina e dos açúcares presentes no resíduo sólido. Ao contrário do aumento do tempo, o aumento da concentração de NH_3 provocou uma perda de açúcares retidos no resíduo sólido. Estes factos sugerem que nos pré-tratamentos realizados a baixa temperatura será possível aumentar as TRL sem prejudicar os teores de açúcares retidos no resíduo sólido através do aumento da duração dos pré-tratamentos.

Para temperaturas mais elevadas ($93,5^{\circ}\text{C}$) a acção da duração do pré-tratamento parece estar associada à concentração do reagente. O aumento da duração do tempo dos pré-tratamentos de 1,91h para 7,09h provocou uma diminuição do teor de lenhina no resíduo sólido de 0,25% (21,88-22,13) e de 2,67% (18,02-20,69) nos pré-tratamentos realizados respectivamente com concentrações de NH_3 iguais a 2,83% e a 13,17%. A capacidade de retenção de açúcares com esta temperatura foi afectada quer pelo tempo de duração dos pré-tratamentos quer pelas concentrações de NH_3 utilizadas. O aumento do tempo de duração dos pré-tratamentos de 1,91h para 7,09h provocou, para uma temperatura de $93,5^{\circ}\text{C}$, uma diminuição no teor de açúcares no resíduo sólido de 1,31% (36,27-37,58) para concentrações de NH_3 de 2,83% e de

4,08% (33,71-37,79) para concentrações de NH_3 de 13,17%. Nesta classe de temperatura foi possível no entanto verificar que, para tempos de duração de pré-tratamentos mais curtos (1,91h), o aumento da concentração de NH_3 de 2,83% para 13,17%, provocou um decréscimo no teor de lenhina no resíduo sólido de 1,44% mantendo-se o teor de açúcares praticamente inalterado. Este facto poderá indicar, nas classes de temperatura mais elevada, que a aplicação de tempos de residência mais curtos aliada a concentrações de NH_3 mais elevadas, poderá facultar uma maior remoção da lenhina do resíduo sólido sem a consequente perda de açúcares normalmente associada.

Gupta utilizando madeira de choupo, com 29,1% de lenhina e 59,7% de açúcares na sua composição, obteve em pré-tratamentos realizados a 120°C, durante 24h e com uma concentração de NH_3 de 15%, uma taxa de remoção de lenhina de apenas 16% mantendo praticamente inalterados os teores de açúcares presentes no resíduo sólido (Gupta, 2009). Os resultados obtidos na presente modelação apresentam taxas de remoção de lenhina superiores (27,8%) verificando-se, no entanto no presente trabalho, uma perda de açúcares muito superior (44,2%).

A taxa de retenção de açúcares foi por norma muito inferior às taxas constantes na bibliografia consultada. Nesta, e tendo em conta a amplitude dos valores de temperatura utilizados, a taxa de retenção de açúcares encontra-se normalmente acima dos 84%, enquanto no presente trabalho foi atingida uma taxa de retenção mínima de 65,8%. Tal poderá ser explicado devido ao facto dos teores de remoção de lenhina e de retenção de açúcares no resíduo sólido variarem em função do material utilizado. Gupta e Lee utilizando uma herbácea (*Panicum virgatum*) com 26,4% de lenhina e 65,0% de açúcares na sua composição obtiveram, em pré-tratamentos realizados a 120°C, durante 24h e com uma concentração de NH_3 de 15%, uma TRL de 67% tendo conseguido manter 84% dos açúcares no resíduo sólido (Gupta e Lee, 2010). Já Kim e Lee com forragem de milho obtiveram, em pré-tratamentos realizados à temperatura ambiente, ao longo de 60 dias e com uma concentração de 29,5% de NH_3 , uma TRL de 76% mantendo-se a TRA no resíduo sólido em 94% (Kim e Lee, 2005). Chen e colaboradores com o mesmo material obtiveram uma TRL de 41% e uma TRA de 86%, em pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 26°C, durante 24h e com uma carga de 10% de NH_3 (Chen *et al.*, 2009).

O aumento da temperatura dos pré-tratamentos conduz a um aumento nas taxas de remoção de lenhina, mas provoca uma diminuição nas taxas de retenção de açúcares no resíduo sólido, em particular das hemiceluloses. Kim e outros investigadores obtiveram em pré-tratamentos com palha de arroz realizados a 100°C, durante 20min e com uma concentração de NH_3 de 15% uma taxa de remoção de lenhina de 44,7% acompanhada da retenção de 84,4% das hemiceluloses e 99,2% da celulose no resíduo sólido. Ao aumentar a temperatura dos pré-tratamentos para 190°C verificou um aumento da taxa de remoção de lenhina para 84,9% diminuindo simultaneamente em 60,2% as hemiceluloses presentes no resíduo sólido (Kim *et al.*, 2011d).

A tabela 3.30 apresenta os teores de glucose, xilose e arabinose presente no resíduo sólido.

Tabela 3.30 - Teores de glucose, xilose e arabinose presentes no resíduo sólido resultante dos pré-tratamentos com NH₃

A	B	C	Glucose ¹	R.G.	Xilose ¹	R.X.	Arabinose ¹	R.A.
50,0	4,50	8,00	27,14 ± 0,46	80,8	11,66 ± 0,24	88,9	2,02 ± 0,39	44,4
56,5	1,91	2,83	26,66 ± 0,23	79,4	10,35 ± 0,00	79,0	1,82 ± 0,05	40,0
56,5	1,91	13,17	25,63 ± 0,86	76,3	9,98 ± 0,28	76,1	1,73 ± 0,14	38,0
56,5	7,09	2,83	27,31 ± 0,08	81,3	10,12 ± 0,21	77,2	1,41 ± 0,53	31,0
56,5	7,09	13,17	25,07 ± 0,03	74,6	9,96 ± 0,05	76,0	1,80 ± 0,10	39,6
75,0	4,50	1,00	26,18 ± 0,49	77,9	10,50 ± 0,06	80,1	1,62 ± 0,07	35,7
75,0	1,00	8,00	25,76 ± 0,72	76,7	10,63 ± 0,02	81,1	2,18 ± 0,24	47,9
75,0	4,50	8,00	25,02 ± 1,05	74,5	10,42 ± 0,59	79,5	1,61 ± 0,19	35,3
75,0	4,50	15,00	25,79 ± 1,69	76,8	10,50 ± 0,34	80,1	1,66 ± 0,05	36,6
75,0	8,00	8,00	24,53 ± 0,75	73,0	10,89 ± 1,75	83,1	1,44 ± 0,21	31,6
93,5	1,91	2,83	25,79 ± 0,07	76,8	10,23 ± 0,40	78,0	1,56 ± 0,06	34,2
93,5	1,91	13,17	25,69 ± 0,03	76,5	10,72 ± 0,13	81,8	1,37 ± 0,05	30,1
93,5	7,09	2,83	24,32 ± 0,21	72,4	10,50 ± 1,09	80,1	1,46 ± 0,43	32,0
93,5	7,09	13,17	23,10 ± 0,29	68,8	9,54 ± 0,39	72,8	1,06 ± 0,22	23,4
100,0	4,50	8,00	24,40 ± 0,33	72,6	9,84 ± 0,16	75,0	1,02 ± 0,13	22,4

A - Temperatura B - Tempo C - Concentração de NH₃ (% w/w)

1 - Teores expressos em % da amostra

R.G. - Teor de retenção de glucose no RS expressa em % da glucose na amostra

R.X. - Taxa de retenção de xilose no RS expressa em % da xilose na amostra

R.A. - Taxa de retenção de arabinose no RS expressa em % da arabinose na amostra

A tabela 3.30 mostra-nos a variação nas taxas de retenção da glucose, xilose e arabinose, no resíduo sólido, em função das condições de pré-tratamento. Da sua análise retiramos a existência de uma variação máxima nos ensaios modelados de 4,04% para a glucose, de 2,12% para a xilose e de 1,16% para a arabinose.

A variação da taxa de retenção da glucose e da xilose possuem comportamentos similares. Ambos os açúcares apresentam um valor máximo de retenção nos pré-tratamentos efectuados com a temperatura mais baixa (50°C) e um valor mínimo de retenção nos pré-tratamentos efectuados a 93,5°C durante 7,09h e com uma concentração de 13,17%. A arabinose já possui um comportamento distinto destes dois açúcares tendo sido registado o valor de retenção mais elevado nos pré-tratamentos efectuados durante o menor tempo de residência (1h) e o valor mínimo nos pré-tratamentos efectuados com a temperatura mais elevada (100°C).

A análise da tabela mostra-nos que o aumento do factor temperatura foi determinante na redução das taxas de retenção dos 3 açúcares no resíduo sólido. Assim, mantendo o tempo de reacção em 4,5h e a concentração de NH₃ em 8,00%, observaram-se no aumento da temperatura de 50°C para 75°C, reduções nas taxas de retenção de 6,30% (74,5- 80,8) para a

glucose, de 9,4% (79,5-88,9) para a xilose e de 9,1% (35,3-44,4) para a arabinose. No aumento da temperatura de 75°C para 100°C, as taxas de retenção diminuíram de forma menos acentuada para a glucose e xilose, baixando em 1,9% (72,6-74,5) para a glucose, em 4,5% (75,0-79,5) para a xilose e em 12,3% (22,4-35,3) para a arabinose. Estes valores sugerem uma estabilização nas taxas de retenção da glucose à medida que se aumenta a temperatura. A figura 3.38 apresenta os teores de glucose, xilose e arabinose presente nos resíduos sólidos do pré-tratamento alcalino com NH_3 , expressos em % da amostra.

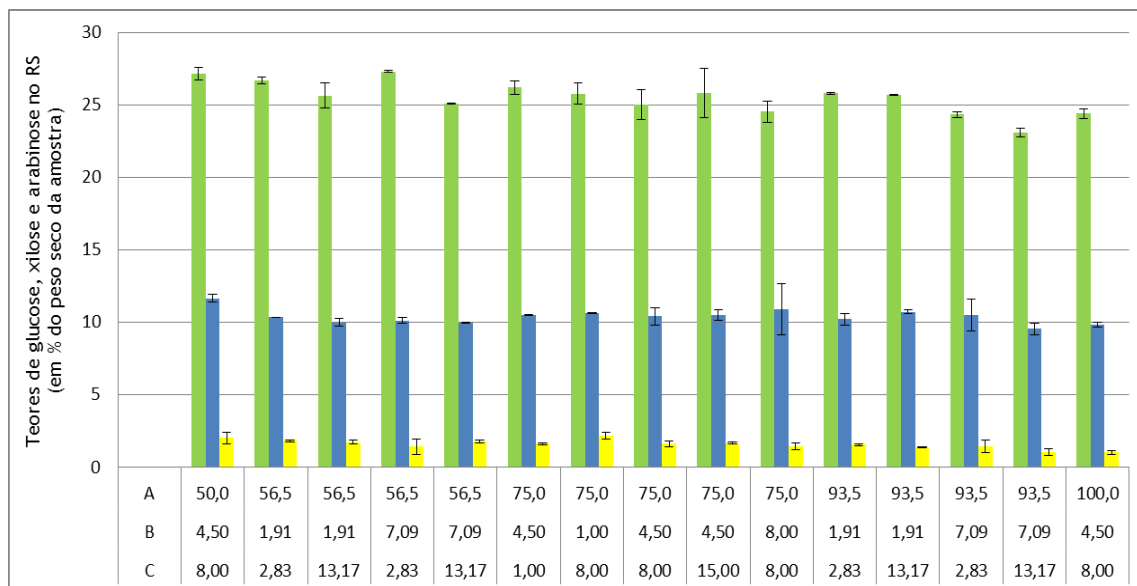


Figura 3.38 - Teores de glucose, xilose e arabinose presente nos resíduos sólidos do pré-tratamento alcalino com NH_3 , expressos em % da amostra

A - Temperatura (°C), B - Tempo (min.), C - Concentração de NH_3 (% w/w)

A influência do tempo de duração dos pré-tratamentos na redução da taxa de retenção dos açúcares no resíduo sólido foi particularmente evidente, para temperaturas acima dos 75°C, no caso da glucose e da xilose. Nos pré-tratamentos realizados a 56,5°C, para a mesma concentração de NH_3 , verificou-se que o aumento do tempo de 1,91h para 7,09h não teve reflexo nos teores de glucose e xilose encontrados no resíduo sólido. Nos pré-tratamentos efectuados a 93,5°C o aumento da duração do pré-tratamento provoca uma diminuição no teor da glucose e da arabinose no resíduo sólido. No caso da xilose essa diminuição foi verificada apenas nos pré-tratamentos realizados com concentrações de NH_3 de 13,17%.

A influência do aumento da concentração de NH_3 provocou nos pré-tratamentos efectuados a 56,5°C uma redução principalmente nos teores de glucose e xilose no resíduo sólido. Nos pré-tratamentos realizados a esta temperatura o aumento da concentração do reagente de 2,83% para 13,17% foi particularmente sentido nas taxas de retenção da glucose. O aumento da concentração de NH_3 provocou uma diminuição na taxa de retenção da glucose de 3,1% (76,3-79,4) e 6,7% (74,6-81,3), para os pré-tratamentos realizados durante 1,91h e 7,09h respectivamente. Nos pré-tratamentos efectuados a 75,0°C não se detectaram reduções consideráveis nos teores dos três açúcares quando se aumentou a concentração de NH_3 de

1,00% para 15,00%. Nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 93,5°C as maiores reduções nos teores dos três açúcares foram verificadas quando se aumentou a concentração de NH_3 nos pré-tratamentos com maior duração (7,09h). Nestes, o aumento da carga de NH_3 de 2,83% para 13,17% provocou uma diminuição na taxa de retenção de 3,6% (68,8-72,4) para a glucose, de 7,3% (72,8-80,1) para a xilose e de 8,6% (23,4-32,0) para a arabinose.

A estimativa do teor de glucose no resíduo sólido embora com um modelo considerado significativo revelou um coeficiente de determinação baixo ($R^2 = 0,6579$) não permitindo dessa forma relacionar a variação dos factores utilizados com a variação do teor de glucose encontrada no resíduo sólido. A variação do teor de xilose e arabinose no resíduo sólido originou modelos não significativos.

3.5.3 - Considerações finais sobre o pré-tratamento com amoníaco

1 - Os resultados mostraram uma relação entre os teores de LH_{NH_3} e a concentração de NH_3 utilizada nos ensaios independentemente dos valores de temperatura e de tempo utilizados. A variação destes dois factores parece não ter tido qualquer relação com as taxas de LH_{NH_3} verificadas. O modelo estatístico construído revelou este facto considerando a concentração do reagente como único factor significativo. A equação de regressão estimada apresentou um R^2 de apenas 0,8003 não se efectuando por isso qualquer leitura do modelo estatístico construído.

2- A diminuição do peso do resíduo sólido é particularmente afectada pelo aumento da temperatura, mas também pela concentração de NH_3 e pelo tempo de duração dos pré-tratamentos ($R^2 = 0,9671$). O efeito da solubilização dos compostos do resíduo sólido, pela acção da concentração de NH_3 , parece ser amplificado pelo aumento da temperatura.

3 - A taxa de remoção da lenhina do resíduo sólido, com base no modelo estatístico construído ($R^2 = 0,8670$), é influenciada principalmente pela temperatura e pela concentração de NH_3 .

4 - O aumento da temperatura e da concentração de NH_3 nos pré-tratamentos provocou para além de uma maior taxa de remoção de lenhina, uma maior solubilização dos açúcares presentes no resíduo sólido. O aumento da extracção da lenhina com preservação dos açúcares no resíduo sólido parece-nos que poderá ser atingida utilizando temperaturas e concentrações de NH_3 mais baixas (56,5°C, 2,83% NH_3) mas com tempos de duração de pré-tratamento muito mais longos.

3.6 - Hidrólise enzimática dos pré-tratados

3.6.1 - Hidrólise enzimática dos pré-tratados com H₂SO₄

A tabela 3.31 sumariza os resultados dos rendimentos da hidrólise enzimática (HE) dos pré-tratados submetidos à acção dos complexos enzimáticos NS22086 (celulases), NS22118 (beta-glucosidases) e NS22083 (xilanases). As taxas de libertação de açúcares (TLA) durante a HE encontram-se expressas em percentagem dos açúcares presentes nos resíduos sólidos dos pré-tratados.

Tabela 3.31 - TLA na HE expressas em função da quantidade de açúcares presente nos resíduos sólidos dos pré-tratados com H₂SO₄

Condições de pré-tratamento				Hidrólise enzimática (h)				
A	B	C	Carga enzimática ¹	12	24	48	72	174
156	48	1,41	6-12-12	11,7	18,5	19,5	21,5	25,3
156	48	1,41	18-36-36	19,4	25,0	28,5	32,6	40,8
156	102	1,41	6-12-12	11,6	17,6	20,3	21,8	26,4
156	102	1,41	18-36-36	19,9	29,8	30,8	36,2	46,9
156	48	4,09	6-12-12	9,9	17,8	22,4	24,3	34,8
156	48	4,09	18-36-36	18,5	31,5	38,7	51,6	70,9
156	102	4,09	6-12-12	9,8	19,0	25,0	30,9	44,8
156	102	4,09	18-36-36	23,4	33,1	46,9	64,3	85,0
180	75	2,75	6-12-12	12,8	22,5	30,4	38,9	57,1
180	75	2,75	18-36-36	28,8	42,2	54,5	71,4	83,6

A - Temperatura (°C); B - Tempo (minutos); C - Concentração de H₂SO₄ (% w/w)

¹ - Carga enzimática: FPU/g substrato - p-NPGU/g substrato - IU/g substrato

Como podemos verificar, para a mesma concentração enzimática o aumento de qualquer um dos factores utilizados, temperatura, concentração e tempo de duração do pré-tratamento, possui um efeito positivo nos rendimentos de HE obtidos. Após 72h de reacção, os maiores rendimentos de HE foram verificados nos pré-tratamentos realizados com a temperatura mais elevada (180°C) tendo-se atingido uma taxa de libertação de açúcares (TLA) de 71,4% nos ensaios realizados com 18FPU, 36 p-NPGU e 36 IU por grama de substrato. Cara e colaboradores com resíduos de poda do olival obtiveram, ao fim de 72h, rendimentos na HE de 67,0% com 15FPU/(grama de substrato) em resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos realizados a 180°C, durante 10 minutos e com uma concentração de H₂SO₄ de 1,4% (Cara et

al., 2007a). Han e outros investigadores obtiveram com ramos de mandioca, ao fim de 60h, rendimentos de 70% na HE realizada com 20FPU de celulase /(grama de substrato) e 30CbU de beta glucosidase /(grama de substrato), em resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos realizados a 177°C, durante 10 minutos e com ácido sulfúrico (Han *et al.*, 2011).

Na observação da figura 3.39 podemos verificar que as taxas de libertação não estabilizaram após 72h de reacção, continuando a aumentar em todos os ensaios realizados. Nos resíduos sólidos provenientes de pré-tratamentos realizados a 156°C, durante 102 minutos e com uma concentração de H₂SO₄ de 4,09% verificamos, entre as 72h e as 174h de reacção enzimática, um aumento de 20,7%, de 64,3% para 85,0%, na TLA nos ensaios realizados com maior concentração enzimática (18PFU por grama de substrato, 36 p-NPGU por grama de substrato e 36 IU por grama de substrato). A figura 3.39 apresenta a evolução das TCA na HE dos ensaios realizados com menor carga enzimática (6PFU/g de substrato, 12 p-NPGU/g de substrato e 12 IU/g de substrato).

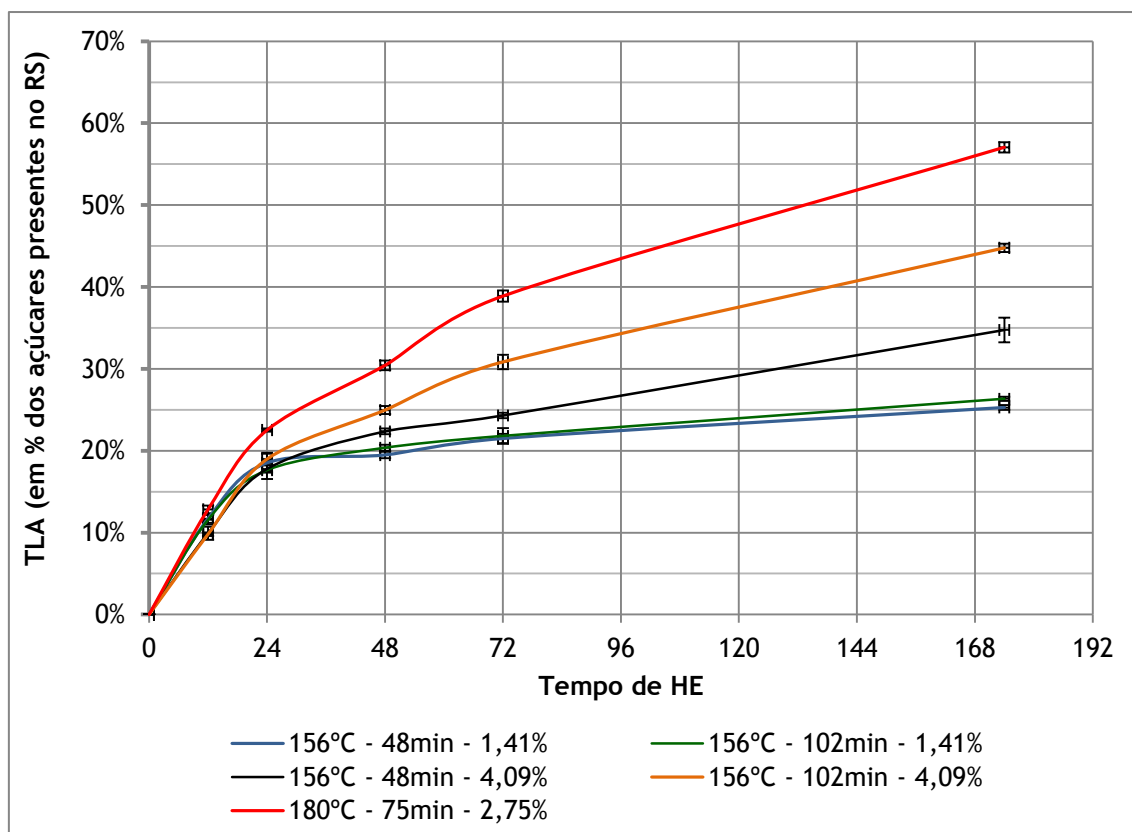


Figura 3.39 - Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com H₂SO₄, com aplicação de uma carga enzimática de 6PFU, 12 p-NPGU e 12 IU por grama de substrato

Com a menor concentração enzimática as TLA variaram, após 174h de HE, entre 25,3%, para os pré-tratamentos realizados a 156°C, durante 48 minutos e com uma concentração de 1,41% de H₂SO₄, e 57,1% para os pré-tratamentos realizados a 180°C, durante 75 minutos e com uma concentração de H₂SO₄ igual a 2,75%. A figura 3.39 mostra-nos que o aumento do tempo de duração dos pré-tratamentos de 48 para 102 minutos, nos pré-tratamentos realizados a 156°C

e com uma concentração de H_2SO_4 de 1,41%, praticamente não teve influência no aumento das TLA na HE parecendo as representações gráficas coincidentes ao longo de todo o período considerado. No entanto, nos pré-tratamentos efectuados a 156°C e com uma concentração de H_2SO_4 de 4,09%, o aumento de tempo, de 48 para 102 minutos, já se reflecte num aumento de 10,0% (44,8% - 34,8%) nas TLA, após de 174h de HE.

O aumento da temperatura dos pré-tratamentos, de 156°C para 180°C, provoca um aumento nas TLA obtidas na HE, mesmo sendo reduzida a carga de ácido sulfúrico e o tempo de duração. O acréscimo nas TLA na HE nos resíduos sólidos provenientes de pré-tratamentos realizados a 180°C, com uma concentração de ácido de 2,75% e durante 75 minutos foi, ao fim de 174h de reacção enzimática, superior em 12,3% à TLA obtida na HE nos resíduos sólidos provenientes de pré-tratamentos efectuados a 156°C, durante 102 minutos e com uma concentração de H_2SO_4 de 4,09%. A figura 3.40 apresenta a evolução das TLA na HE dos ensaios realizados com maior carga enzimática (18PFU/g de substrato, 36 p-NPGU/g de substrato e 36 IU/g de substrato).

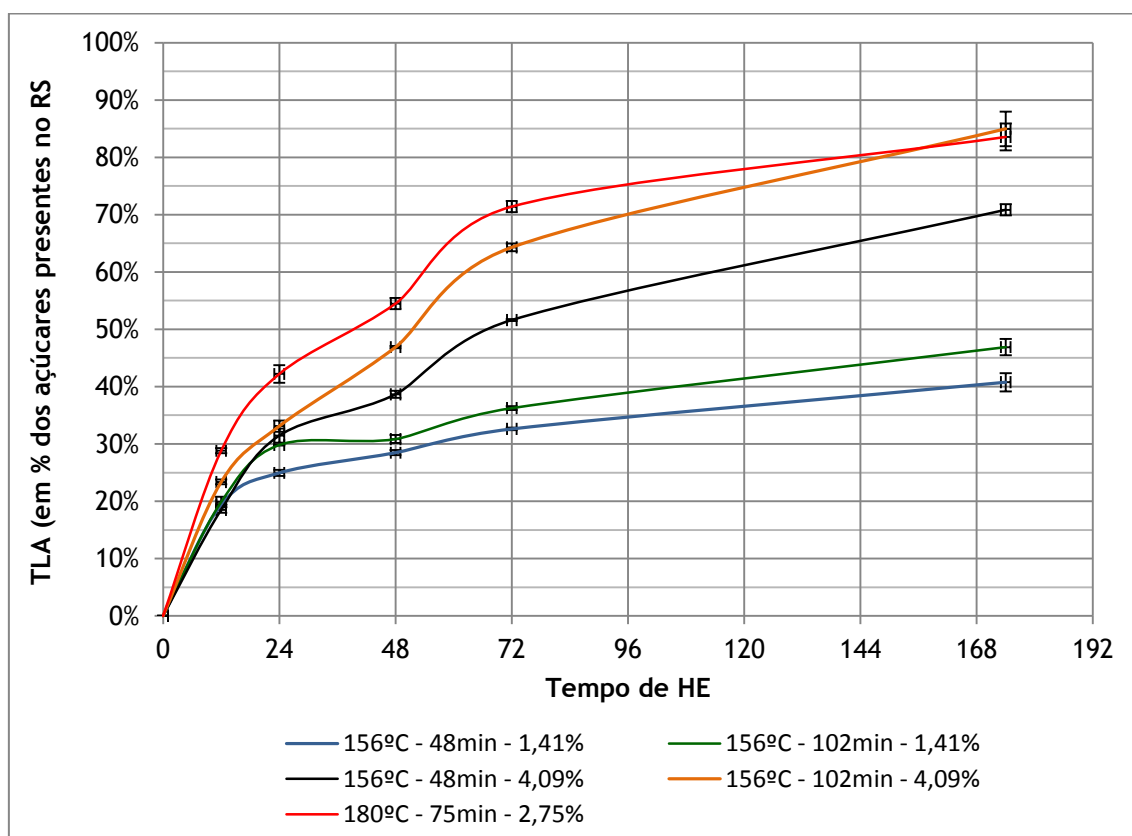


Figura 3.40 - Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com H_2SO_4 , com aplicação de uma carga enzimática de 18PFU, 36 p-NPGU e 36 IU por grama de substrato

O aumento da carga enzimática traduz-se como podemos observar na figura 3.40 num aumento global das TLA durante a HE. Esse aumento, ao fim de 174h, variou entre 15,5% (40,8-25,3), para os pré-tratamentos realizados a 156°C, durante 48 minutos e com uma carga de H_2SO_4 de 1,41%, e os 40,2% (85,0-44,8), para os pré-tratamentos realizados a 156°C,

durante 102 minutos e uma concentração de ácido sulfúrico de 4,09%. Nestes últimos pré-tratamentos conseguimos duplicar a TLA durante a HE quando triplicamos a concentração dos complexos enzimáticos.

Na HE realizada com 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama de substrato, a máxima TLA foi obtida, ao fim de 174h, nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 156°C, durante 102 minutos e com uma concentração de ácido sulfúrico de 4,09%, ultrapassando-se quase no final do período de HE, a TLA obtida nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos realizados a 180°C. Este facto poderá indicar-nos que, com cargas enzimáticas mais elevadas, o aumento da concentração de H₂SO₄ e do tempo de duração dos pré-tratamentos, ao contrário do aumento da temperatura, permitirão manter TLA elevadas para períodos mais longos de HE. Na figura 3.41 apresentamos a soma dos açúcares libertados no hidrolisado dos pré-tratamentos com H₂SO₄ e na hidrólise enzimática com 18FPU, 36 p-NPGU e 36 IU por grama substrato, expressos em percentagem dos açúcares presentes na amostra.

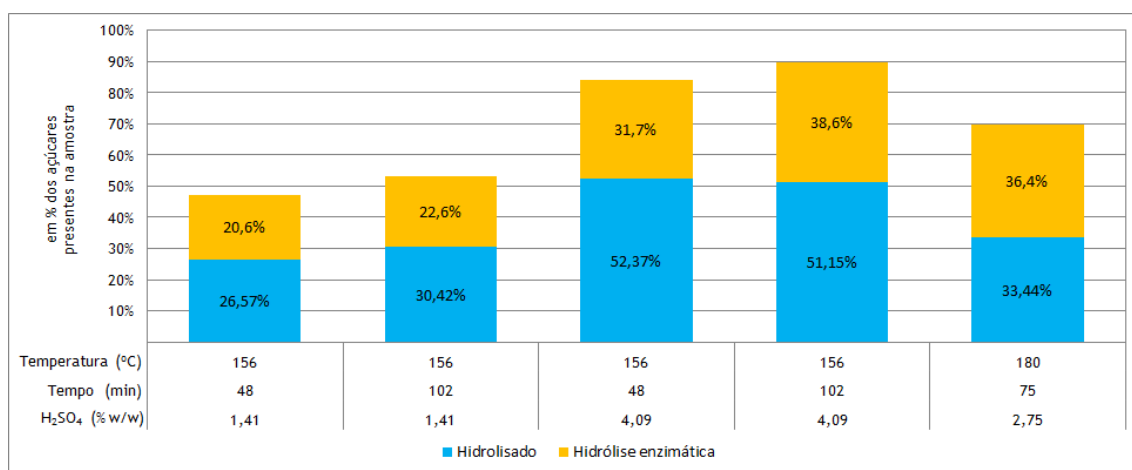


Figura 3.41 - Soma dos açúcares libertados no hidrolisado dos pré-tratamentos com ácido sulfúrico e na hidrólise enzimática com 18FPU, 36 p-NPGU e 36 IU por grama de substrato, expressos em percentagem dos açúcares presentes na amostra

Como podemos observar pela análise da figura 3.41 a maior TLA da amostra, somando as quantidades de açúcares libertados para o hidrolisado durante o pré-tratamento e as quantidades libertadas durante o processo de hidrólise enzimática, foi verificada nos pré-tratamentos efectuados a 156°C, durante 102 minutos e com uma concentração de H₂SO₄ de 4,09%. Nestas condições foi possível hidrolisar cerca de 90% dos açúcares contidos na amostra. Também podemos verificar que nos pré-tratamentos efectuados a 180°C, durante 75 minutos e com uma concentração de H₂SO₄ de 2,75% apenas se libertaram, na soma das duas etapas, cerca de 70% dos açúcares presentes na amostra. O diferencial de cerca de 20% relativamente aos resultados obtidos no pré-tratamento anteriormente descrito não se deveu ao rendimento da hidrólise enzimática, uma vez que as taxas de conversão obtidas pelas duas condições de pré-tratamento são relativamente próximas (38,6% e 36,4%), mas sim à menor libertação de açúcares para o hidrolisado nos pré-tratamentos efectuados a 180°C. Nesta classe de

temperatura (180°C), a menor quantidade de açúcares libertados para o hidrolisado foi devida, como descrito no capítulo 3.2.2., à ocorrência de uma maior degradação de açúcares.

3.6.2 - Hidrólise enzimática dos pré-tratados alcalinos

A tabela 3.32 apresenta os resultados da HE levada a cabo com a aplicação dos 3 complexos enzimáticos sobre os pré-tratados resultantes dos pré-tratamentos com NaOH. Os rendimentos da HE encontram-se expressos em função da quantidade de açúcares presentes nos resíduos sólidos dos pré-tratados.

Tabela 3.32 - TLA na HE expressas em função da quantidade de açúcares presente nos resíduos sólidos dos pré-tratados com NaOH

Condições de pré-tratamento			Carga enzimática ¹	Hidrólise enzimática (h)				
A	B	C		12	24	48	72	174
90	70	6,19	6-12-12	7,1	11,7	15,1	20,0	22,1
90	70	6,19	18-36-36	15,9	19,8	25,4	31,6	29,4
90	70	61,90	6-12-12	23,2	26,0	25,5	28,5	33,2
90	70	61,90	18-36-36	29,0	33,7	32,7	35,1	48,9
120	40	1,50	6-12-12	12,5	11,1	17,8	21,4	20,2
120	40	1,50	18-36-36	15,0	16,1	24,3	25,1	26,3
120	40	15,00	6-12-12	23,1	25,5	26,8	31,5	33,8
120	40	15,00	18-36-36	33,8	36,6	36,4	37,6	64,7
120	100	1,50	6-12-12	8,9	12,0	18,8	22,9	17,4
120	100	1,50	18-36-36	15,1	17,6	24,7	26,1	25,9
120	100	15,00	6-12-12	23,9	29,0	28,6	33,0	36,7
120	100	15,00	18-36-36	38,3	40,3	39,6	55,7	57,5
120	40	5,00	6-12-12	2,9	10,2	13,4	17,6	22,2
120	40	5,00	18-36-36	6,2	16,7	24,6	28,1	34,2
120	40	50,00	6-12-12	24,8	26,8	27,4	44,4	35,9
120	40	50,00	18-36-36	34,8	38,1	37,7	36,7	55,6
120	100	5,00	6-12-12	3,1	8,9	12,8	14,3	19,8
120	100	5,00	18-36-36	8,0	13,2	19,6	23,9	29,7
120	100	50,00	6-12-12	19,4	18,4	20,1	23,1	35,1
120	100	50,00	18-36-36	34,3	32,6	31,0	35,1	51,2
140	70	3,25	6-12-12	5,1	7,6	12,3	9,5	17,0
140	70	3,25	18-36-36	7,4	15,0	20,1	23,3	23,0
140	70	32,50	6-12-12	15,8	18,1	19,7	24,0	28,9
140	70	32,50	18-36-36	27,5	33,8	34,0	37,4	50,9

A - Temperatura (°C); B - Tempo (minutos); C - Concentração de NaOH (% w/w)

¹- Carga enzimática: FPU/g substrato - p-NPGU/g substrato - IU/g substrato

²- Codificação das condições de pré-tratamentos com as cargas enzimáticas

A tabela 3.32 mostra-nos que as TLA na HE aumentam com a carga enzimática utilizada e com a concentração de NaOH aplicada, existindo uma clara distinção no rendimento da HE entre os pré-tratamentos modelados (S) e os pré-tratamentos extra (Se). Nos pré-tratamentos extra (Se), com aplicação de cargas enzimáticas mais elevadas, as TLA aumentaram rapidamente, tendo-se atingido valores de 40,3% nas primeiras 24h de HE. Depois deste período, verificou-se uma estabilização das TLA, na maioria dos resíduos sólidos, entre as 24 e as 72h de HE voltando as TLA a crescer novamente a partir das 72h da HE.

Nos pré-tratamentos modelados (S) obteve-se, após 174h de HE e com a carga mais elevada de enzimas, uma TLA máxima de 34,2% na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados com uma temperatura de 120°C, durante 40 minutos e com uma concentração de NaOH de 5%. Nos povoamentos extra (Se), após 174h de HE e também com a carga mais elevada de enzimas aplicada, obteve-se uma TLA máxima de 64,7% na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 120°C, durante 40 minutos e com uma concentração de NaOH igual a 15,00%. Ou seja, mantendo a temperatura e o tempo de duração dos pré-tratamentos, o aumento da concentração de NaOH de 5,00% para 15,00% quase faz duplicar (34,2% para 64,7%) as TLA na HE.

Os resultados da tabela 3.32 também mostram que os valores máximos nas TLA não foram atingidos face a valores máximos de temperatura (140°C), tempo (100min.) ou concentração de NaOH (61,90%).

Mirahmadi e colaboradores utilizando madeira de abeto em pré-tratamentos efectuados a 5°C, durante 2h e com uma concentração de 7,00% de NaOH, obtiveram um rendimento na HE, ao fim de 96h, de 35,7% com aplicação de uma carga enzimática de 20FPU e 50 IU por grama de substrato (Mirahmadi *et al.*, 2010). No presente estudo foi obtido um rendimento na HE ao fim de 174h de 34,2% nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a 120°C, durante 40 minutos e com uma concentração de NaOH de 5,00%.

Mohsenzadeh e outros investigadores utilizando madeira de abeto conseguiram ao fim de 72h, aplicando uma carga enzimática de 20FPU e 50 IU por grama de substrato, um rendimento na HE de 40%, em resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a 80°C, durante 16h e com concentrações de 10% de NaOH e 1,4% de PEG por grama de biomassa (Mohsenzadeh *et al.*, 2012). Nos ensaios realizados conseguimos um rendimento na HE, às 72h, de 55,7% nos pré-tratados resultantes de pré-tratamentos efectuados a 120°C, durante 100 minutos e com uma concentração de 15,00% de NaOH.

A figura 3.42 apresenta a evolução da HE nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos modelados com a aplicação de uma concentração enzimática de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU por grama substrato. Nestes pré-tratamentos a alteração da representação gráfica da evolução da HE deveu-se ao facto dos resíduos sólidos apresentarem valores semelhantes de TLA para o mesmo tempo decorrido de hidrólise. Não se conseguia assim distinguir convenientemente, com a representação anteriormente realizada, os resultados na HE em função das diferentes condições de ensaio dos pré-tratamentos.

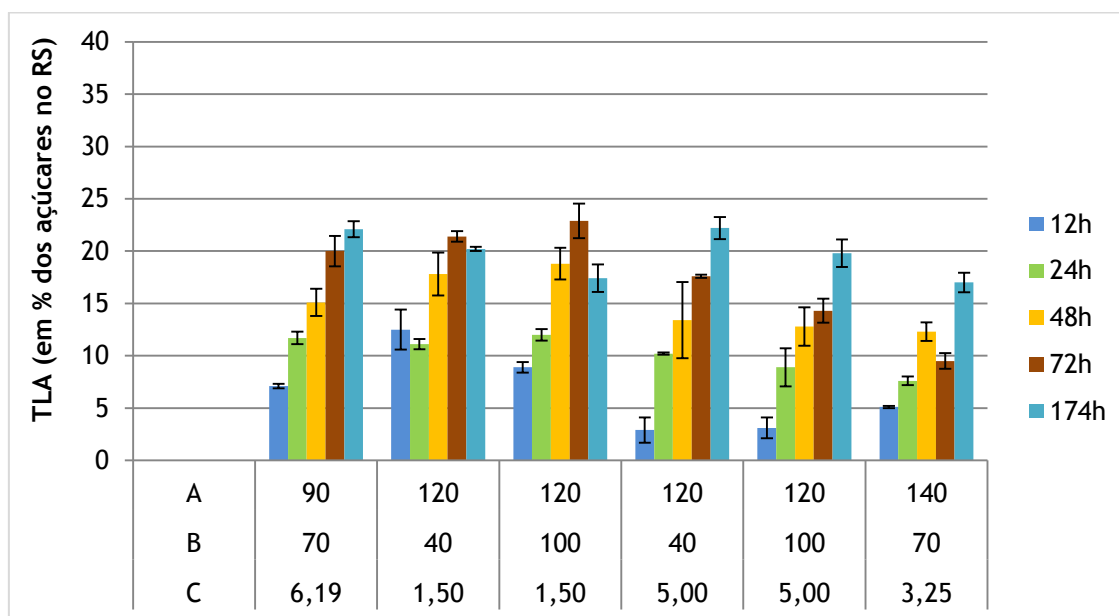


Figura 3.42 - Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com NaOH (modelados), com a aplicação de uma carga enzimática de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU por grama substrato

A - Temperatura (°C), B - Tempo (min.) e C - Concentração de NaOH (% w/w)

Na HE dos resíduos sólidos dos pré-tratados modelados com aplicação de concentrações mais baixas de enzima conseguiu-se atingir uma TLA máxima de 22,9%, após 72h do início da hidrólise, nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a 120°C, durante 100 minutos e com uma concentração de NaOH de 1,50%.

Após 174h de HE, os valores mais elevados nas TLA, com 22,2 e 22,1%, foram obtidos nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados respectivamente a 120°C, durante 40 minutos e com 5,00% de NaOH e a 90°C, durante 70 minutos e com 6,19% de NaOH.

A figura 3.42 também nos mostra que, após 174h de HE, o aumento do tempo de duração dos pré-tratamentos, de 40 para 100 minutos, provocou uma redução nas TLA de 2,8% e 2,4% concentrações respectivamente de 1,50% e 5,00%.

Os resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a 140°C, durante 70 minutos e com uma concentração de 3,25% de NaOH apresentaram os valores mais baixos na TLA em todos os períodos analisados durante a HE. Tal como na análise anterior este facto poderá

indicar alguma limitação do aumento da temperatura acima dos 120°C nas TLA nos resíduos sólidos dos pré-tratados com NaOH.

A figura 3.43 mostra a evolução da HE nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos modelados com a aplicação de uma concentração enzimática de 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato.

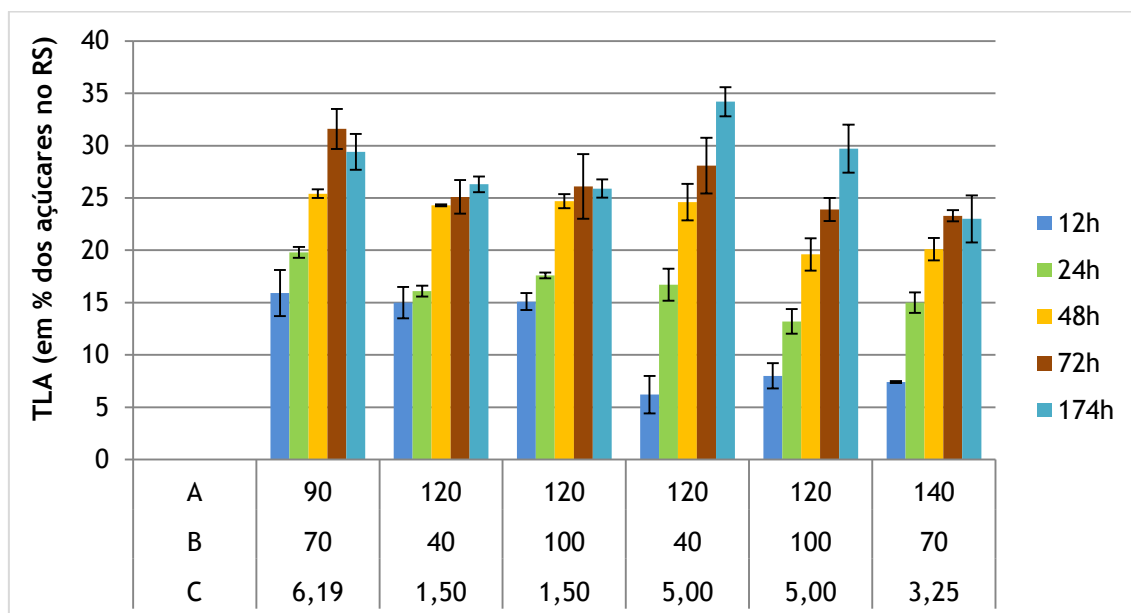


Figura 3.43 - Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com NaOH (modelados), com a aplicação de uma carga enzimática de 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato

A - Temperatura (°C), B - Tempo (min.) e C - Concentração de NaOH (% w/w)

A leitura da figura 3.43 mostra-nos, após 174h de HE, que a TLA máxima, com valor igual a 34,2%, foi atingida nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a 120°C, durante 40 minutos e com uma concentração de NaOH de 5,00%. Após 174h, a menor TLA, com valor igual a 23,0%, foi obtida nos resíduos sólidos resultantes dos pré-tratamentos efectuados com a temperatura mais elevada. Note-se que os resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos realizados a 140°C, durante 70 minutos e com concentrações de NaOH de 3,25% possuem TLA inferiores às determinadas em resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a 120°C, durante 40 minutos e com concentrações de NaOH de apenas 1,50%. Este facto poderá indicar alguma limitação do aumento da temperatura acima dos 120°C nas TLA nos resíduos sólidos dos pré-tratados com NaOH.

Também é possível observar a partir da leitura da figura 3.43 que, a partir das 72h de HE, apenas se verificaram aumentos na TLA para os resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a 120°C e com concentrações de NaOH iguais a 5,00%. Nos restantes resíduos sólidos a libertação de açúcares do resíduo sólido tende a parar após 72h do início da HE.

O aumento da duração dos pré-tratamentos parece provocar uma redução nas TLA obtidas durante a HE. Essa constatação é mais evidente, nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos realizados a 120°C e com uma concentração de 5,00%. Nestes, o aumento do tempo de duração dos pré-tratamentos de 40 para 100 minutos, provocou uma redução de 4,5% nas TLA obtidas após 174h de HE.

A figura 3.44 mostra a evolução da HE nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos extra com a aplicação de uma concentração enzimática de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU por grama substrato.

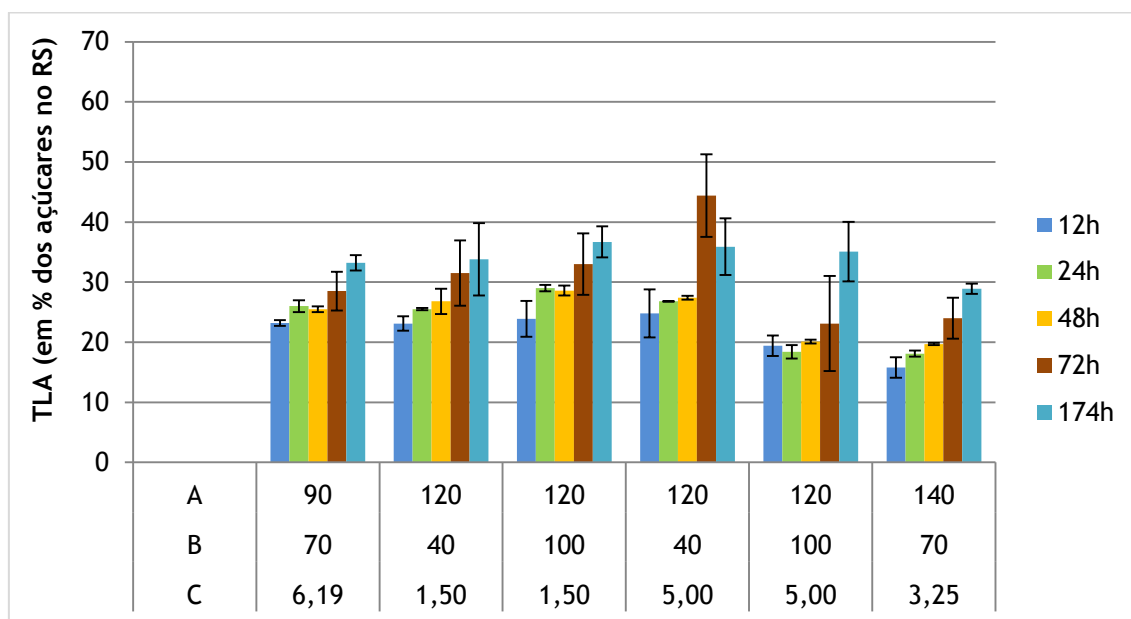


Figura 3.44 - Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com NaOH (extra), com a aplicação de uma carga enzimática de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU por grama substrato

A - Temperatura (°C), B - Tempo (min.) e C - Concentração de NaOH (% w/w)

A leitura da figura 3.44 mostra-nos que os menores rendimentos da HE, ao fim de 174h, foram verificados nos resíduos sólidos resultantes dos pré-tratamentos efectuados com temperatura mais elevada (140°C) tendo-se libertado nestas condições menos de 30% dos açúcares presentes no resíduo sólido. Os restantes resíduos sólidos possuem ao fim de 174h de HE taxas de libertação de açúcares semelhantes variando estas, desde 33,2% (90°C - 61,9% NaOH - 70 min.) até 36,7% (120°C - 15,0% NaOH - 100 min.).

O maior valor na TLA, com 44,4%, foi obtido após 72h do início da HE nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a 120°C, durante 40 minutos e com uma concentração de NaOH de 50,00%.

Ao contrário do ocorrido com cargas enzimáticas elevadas, neste tipo de ensaios não se verificou uma redução nas taxas de libertação de açúcares face a aumento de duração dos pré-tratamentos. Nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos realizados a 120°C e com 15,0% de NaOH, o aumento da duração de 40 para 100 minutos induziu um aumento de 2,9% da taxa de libertação de açúcares após 174h de HE. O aumento do tempo, para

concentração de NaOH de 50,0% possui um efeito oposto tendo sido verificada uma redução de 0,8% na TLA ao fim de 174h de HE.

A figura 3.45 mostra a evolução da HE nos resíduos sólidos resultantes dos pré-tratamentos extra, com a aplicação de uma concentração enzimática de 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato.

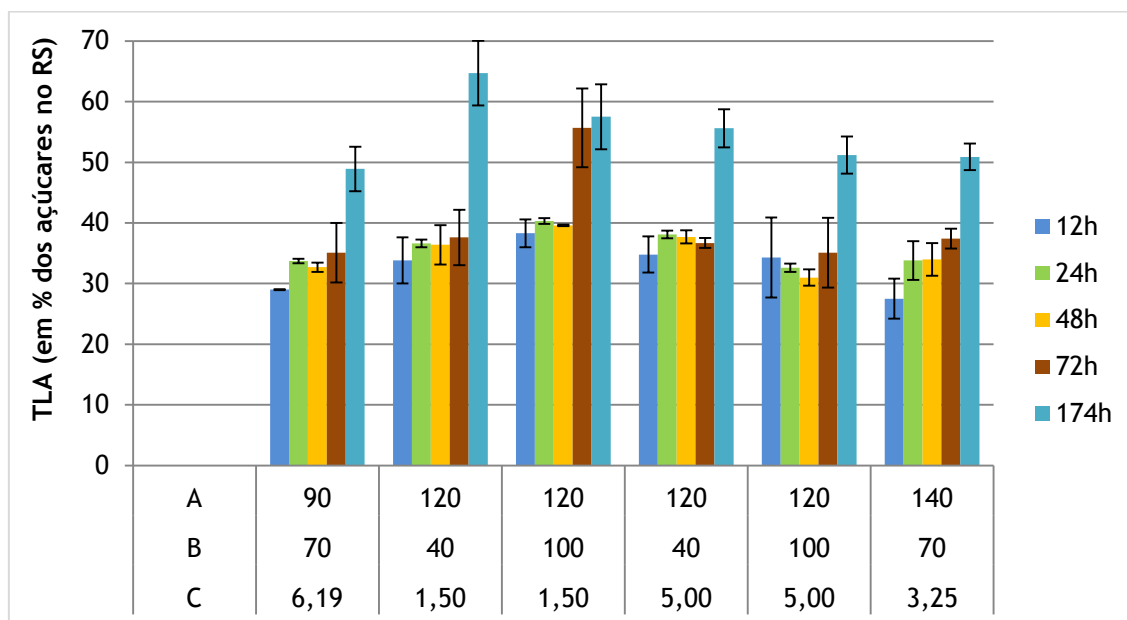


Figura 3.45 - Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com NaOH (extra), com a aplicação de uma carga enzimática de 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato

A - Temperatura (°C), B - Tempo (min.) e C - Concentração de NaOH (% w/w)

A figura 3.45 mostra-nos que os resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a 120°C, durante 40 minutos e com uma concentração de 15,00% de NaOH foram aqueles que apresentaram, ao fim de 174h de HE, a TLA mais elevada (64,7%).

Também observamos que o aumento do tempo de duração dos pré-tratamentos provoca um decréscimo nas TLA obtidas na HE. A TLA determinada nos resíduos sólidos de pré-tratamentos efectuados a 120°C, com 15,0% e 50,0% de NaOH, decresce ao fim de 174h de HE, respectivamente 7,2% e 4,4% quando aumentamos o tempo de duração do pré-tratamento de 40 para 100 minutos.

A concentração de NaOH utilizada nos pré-tratamentos parece não ter influência na percentagem de açúcares libertados. Ao fim de 174h de HE, os resíduos sólidos resultantes dos pré-tratamentos realizados com a concentração mais elevada de NaOH (61,90%) apresentaram a TLA mais baixa, com um valor de 48,9%. Nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a 120°C, quando se aumentou a concentração de NaOH de 15,0% para 50,0%, verificou-se um decréscimo de 9,1% e 6,3% na libertação de açúcares na HE para tempos de duração de 40 e 100 minutos, respectivamente.

O aumento da temperatura dos pré-tratamentos de 120 para 140°C parece não influenciar um aumento nas TLA verificadas na HE. Note-se que, após 174h de HE, as TLA mais elevadas foram observadas em resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a temperatura mais baixa (120°C), com menos tempo (40min.) e com menor concentração de NaOH (15,0%).

3.6.3 - Hidrólise enzimática dos pré-tratados alcalinos com adição de H₂O₂

Na tabela 3.33 apresentam-se os resultados das TLA durante a HE dos pré-tratados com NaOH e H₂O₂, depois de submetidos à acção de três complexos enzimáticos, NS22086 (celulases), NS22118 (beta-glucosidases) e NS22083 (xilanases). As taxas de libertação de açúcares (TLA) durante a HE encontram-se expressas em percentagem dos açúcares presentes nos resíduos sólidos dos pré-tratados. Para melhor se observar a influência da acção do H₂O₂ na HE, realçamos com fundo cinzento os resultados da HE realizada apenas com NaOH, resultantes de pré-tratamentos com duração de 40 minutos.

Tabela 3.33 - TLA na HE expressas em função da quantidade de açúcares presente nos resíduos sólidos dos pré-tratados alcalinos com adição de H₂O₂

Condições de pré-tratamento				Hidrólise enzimática (h)				
Temperatura (°C)	NaOH (% w/w)	H ₂ O ₂ (% w/w)	Carga enzimática ¹	12	24	48	72	174
90	6,19	3,25	6-12-12	10,3	8,2	12,7	13,4	14,5
90	6,19	3,25	18-36-36	15,3	12,5	18,4	19,1	26,7
120	1,50	0,00	6-12-12	12,5	11,1	17,8	21,4	20,2
120	1,50	0,00	18-36-36	15,0	16,1	24,3	25,1	26,3
120	1,50	1,50	6-12-12	13,0	8,8	13,3	13,5	22,3
120	1,50	1,50	18-36-36	17,7	13,4	18,0	13,6	32,6
120	1,50	5,00	6-12-12	10,7	8,9	12,6	10,6	13,9
120	1,50	5,00	18-36-36	19,8	12,9	17,1	14,5	19,8
120	5,00	0,00	6-12-12	2,9	10,2	13,4	17,6	22,2
120	5,00	0,00	18-36-36	6,2	16,7	24,6	28,1	34,2
120	5,00	1,50	6-12-12	14,7	12,0	16,6	16,7	23,3
120	5,00	1,50	18-36-36	23,3	16,4	21,6	19,5	30,6
120	5,00	5,00	6-12-12	9,6	10,9	13,9	11,6	22,9
120	5,00	5,00	18-36-36	14,4	13,6	18,0	18,1	24,6
140	3,25	3,25	6-12-12	15,0	11,7	16,9	12,3	27,1
140	3,25	3,25	18-36-36	17,3	16,3	22,0	19,5	33,2

¹- Carga enzimática: FPU/g substrato - p-NPGU/g substrato - IU/g substrato

A análise da tabela 3.33 permite-nos observar que a HE nos pré-tratados alcalinos, com adição de H₂O₂ variou, após 174h, entre 14,5% (90°C - 6,19% NaOH - 3,25% de H₂O₂) e 27,1%

(140°C - 3,25% NaOH - 3,25% de H₂O₂) na HE realizada com 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU por grama substrato e entre 19,8% (120°C - 1,50% NaOH - 5,00% de H₂O₂) e 33,2% (140°C - 3,25% NaOH - 3,25% de H₂O₂) na HE realizada com 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato.

A figura 3.46 apresenta a evolução da HE nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos alcalinos com adição de H₂O₂, com concentração enzimática igual a 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU por grama substrato.

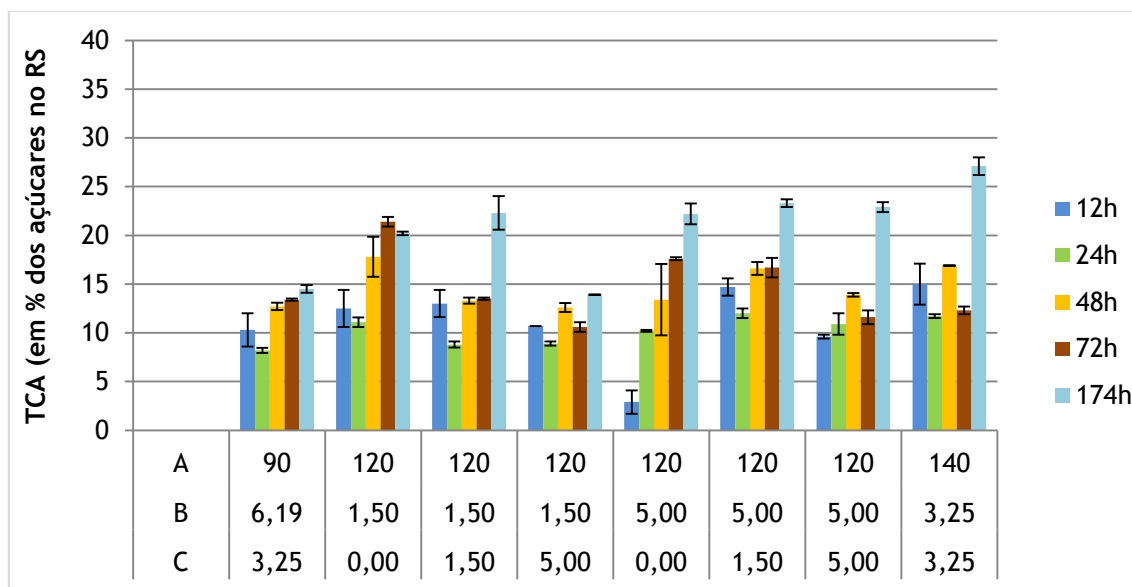


Figura 3.46 - Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com NaOH e H₂O₂, com a aplicação de uma carga enzimática de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU por grama substrato

A - Temperatura (°C), B - Concentração de NaOH (% w/w) e C - Concentração de H₂O₂ (% w/w)

Na HE realizada com a menor carga enzimática (6-12-12) sobre os resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a 120°C e com uma carga de NaOH de 5,00% não foram observadas diferenças consideráveis na TLA em função da concentração de H₂O₂ aplicada nos pré-tratamentos. A diferença na TLA entre a não aplicação de H₂O₂ e a aplicação de 5,00% foi de apenas 0,1%. Para a mesma temperatura, mas para concentrações de NaOH de 1,50%, podemos observar que adições de H₂O₂ até 1,50% promoveram um aumento na TLA de 2,1% (22,3-20,2). Quando a concentração de H₂O₂ ultrapassou a concentração de NaOH verificamos que a TLA dos resíduos sólidos decresce 8,4% (13,9-22,3).

Também podemos observar na figura 3.46 a diminuição causada na TLA nos resíduos sólidos provenientes de pré-tratamentos realizados a 90°C pela adição de H₂O₂. Nestes a HE não chega a libertar 15% dos açúcares presentes no resíduo sólido. Note-se que a esta temperatura e com a mesma carga enzimática obteve-se uma TLA de 22,1% nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos realizados durante 70 minutos e com 6,19% de NaOH. Pelo contrário, na HE dos resíduos sólidos provenientes de pré-tratamentos efectuados a 140°C, a adição de H₂O₂ parece favorecer o aumento da TLA conseguindo-se aumentar em

cerca de 10%, as TLA obtidas nos pré-tratamentos realizados apenas com NaOH e com duração de pré-tratamento de 70 minutos em vez dos 45 minutos.

A figura 3.47 apresenta a evolução da HE nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos alcalinos com adição de H₂O₂ com concentração enzimática igual a 12FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato.

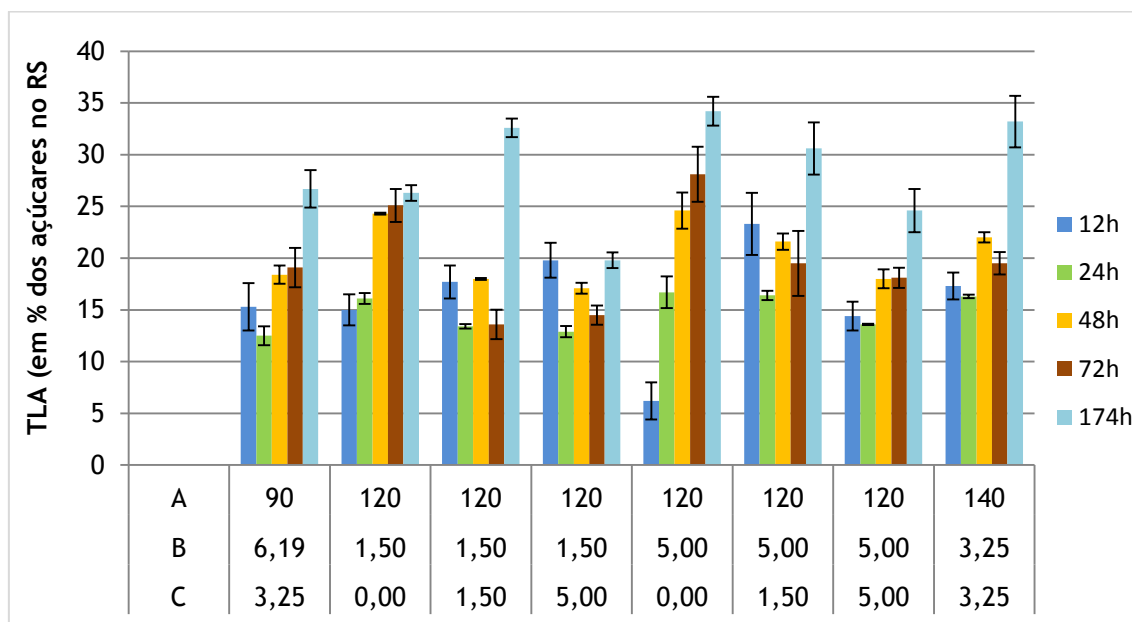


Figura 3.47 - Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com NaOH e H₂O₂, com a aplicação de uma carga enzimática de 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato

A - Temperatura (°C), B - Concentração de NaOH (% w/w) e C - Concentração de H₂O₂ (% w/w)

A leitura do gráfico 3.47 mostra-nos que, nos pré-tratamentos realizados a 120°C com concentrações de NaOH de 5,00%, a adição de H₂O₂ prejudica a libertação de açúcares no processo de HE. Para concentrações enzimáticas de 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato verificou-se uma redução na TLA de 9,2% (24,6-34,2) quando se aumentou a concentração de H₂O₂ de 0,00% para 5,00% na realização dos pré-tratamentos.

Já nos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos realizados a 120°C com 1,50% de NaOH, a adição de H₂O₂ até concentrações de 1,50% fez aumentar a TLA do resíduo sólido, subindo esta taxa 6,3% (32,6-26,3). Quando aumentamos a adição de H₂O₂ de 1,50% para 5,00%, a tendência de aumento inverteu-se, tendo-se verificado diminuição de 12,8% (19,8-32,6) na TLA.

A adição de H₂O₂ dependendo da temperatura de realização dos pré-tratamentos influenciou positivamente ou negativamente as TLA obtidas na HE. Para temperaturas de pré-tratamento elevadas (140°C) a adição de H₂O₂ promoveu a libertação de açúcares do resíduo sólido durante a HE. A adição de H₂O₂ aos pré-tratados resultantes de pré-tratamentos a 140°C fez aumentar em 10,2% (33,2-23,0) a TLA relativamente à obtida nos pré-tratados sem adição de H₂O₂. Já para temperaturas de pré-tratamentos mais baixas (90°C) a adição de H₂O₂

prejudicou a libertação de açúcares fazendo baixar em 2,7% (29,4-26,7) a TLA dos resíduos sólidos durante a HE.

3.6.4 - Hidrólise enzimática dos pré-tratados com NH₃

A tabela 3.34 apresenta os resultados da HE levada a cabo com a aplicação de 3 complexos enzimáticos sobre os pré-tratados resultantes dos pré-tratamentos com NH₃. As TLA durante a HE encontram-se expressas em função da quantidade de açúcares presentes nos resíduos sólidos dos pré-tratados.

Tabela 3.34 - TLA na HE expressas em função da quantidade de açúcares presente nos resíduos sólidos dos pré-tratados com NH₃

Condições de pré-tratamento				Hidrólise enzimática (h)				
Temperatura (°C)	Tempo (h)	NH ₃ (% w/w)	Carga enzimática ¹	12	24	48	72	174
93,5	1,91	2,83	6-12-12	12,5	11,1	17,8	21,4	20,2
93,5	1,91	2,83	18-36-36	15,0	16,1	24,3	25,1	26,3
93,5	7,09	2,83	6-12-12	8,2	18,0	26,3	31,4	32,0
93,5	7,09	2,83	18-36-36	15,9	25,5	32,0	38,3	40,5
93,5	1,91	13,17	6-12-12	12,1	14,7	25,2	33,6	27,6
93,5	1,91	13,17	18-36-36	16,6	25,8	39,0	49,1	40,0
93,5	7,09	13,17	6-12-12	6,1	17,4	24,3	30,1	28,4
93,5	7,09	13,17	18-36-36	19,3	26,3	40,1	45,8	37,9
100,0	4,50	8,00	6-12-12	2,9	10,2	13,4	17,6	22,2
100,0	4,50	8,00	18-36-36	6,2	16,7	24,6	28,1	34,2

¹ - Carga enzimática: FPU/g substrato - p-NPGU/g substrato - IU/g substrato

A tabela 3.34 mostra-nos que, após 174h de HE, as TLA variaram, para a carga enzimática mais baixa, entre 20,2% (93,5°C - 2,83% NH₃ - 1,91h) e 32,0% (93,5°C - 2,83% NH₃ - 7,09h). Para os ensaios realizados com a carga enzimática mais elevada (18-36-36) a variação da TLA, ao fim de 174h de HE, variou entre 26,3% (93,5°C - 2,83% NH₃ - 1,91h) e 40,5% (93,5°C - 2,83% NH₃ - 7,09h). No entanto, as máximas TLA no decorrer da HE foram atingidas, em ambas as cargas enzimáticas utilizadas, após 72h, pelos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a 93,5°C, durante 1,91 horas e com concentrações de NH₃ de 13,17%. Nestas condições atingiram-se TLA de 33,6% e 49,1% com a utilização respectivamente de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU por grama substrato e de 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato. Nos resíduos sólidos dos pré-tratados com concentrações de NH₃ de 13,17% verificou-se uma redução nos açúcares quantificados das 72 para as 174h de HE, tendo sido essa diminuição mais elevada com a aplicação de carga enzimáticas mais altas.

A figura 3.48 apresenta a evolução da TLA durante a HE nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos com NH_3 aplicando uma concentração enzimática de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU por grama substrato

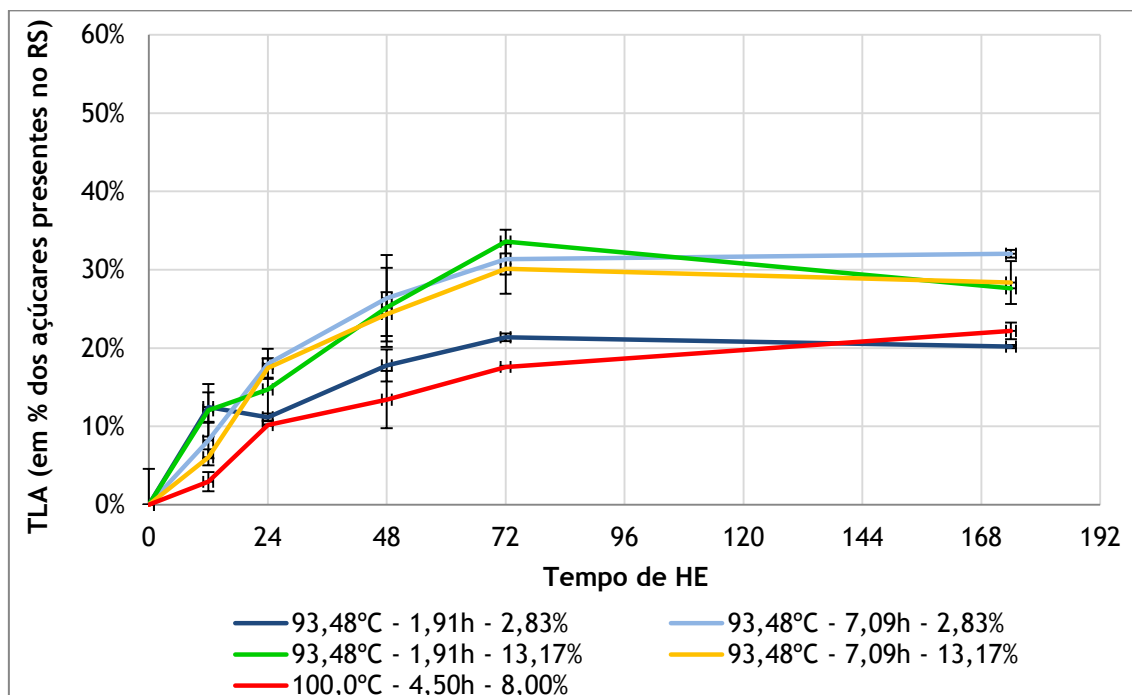


Figura 3.48 - Evolução da TLA na HE dos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamento com NH_3 , com a aplicação de uma carga enzimática de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU por grama substrato.

A figura 3.48 mostra-nos que as maiores TLA na HE foram obtidas pelos resíduos sólidos resultantes dos pré-tratamentos realizados com a maior concentração de NH_3 (13,17%) e com os resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos realizados com 2,83% de NH_3 e durante 7,09h. Estes resíduos sólidos possuem TLA bastante próximas ao longo da HE sendo possível verificar, às 24h, 48h e 174h de HE, que os resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos com menor carga de NH_3 e realizados durante 7,09h obtiveram TLA superiores aos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos com concentrações de NH_3 muito superiores (13,17%), mesmo para os realizados com a mesma duração. Este facto mostra que nos ensaios realizados com menor concentração de NH_3 (2,83%) o aumento do tempo de duração dos pré-tratamentos, de 1,91h para 7,09h, compensou a menor concentração de reagente utilizada nos pré-tratamentos, sendo por isso um factor determinante no aumento das TLA durante a HE. Pelo contrário, para concentrações mais elevadas de NH_3 (13,17%), o aumento do tempo de duração dos pré-tratamentos não teve reflexo no aumento das TLA durante a HE.

Na análise da figura 3.48 também observamos que os resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a 100°C, durante 4,5h e com uma concentração de NH_3 de 8,00% apresentaram TLA bastante baixas. Este facto, pode indicar que a libertação de açúcares durante a HE possa ser condicionada por um valor mínimo de concentração de NH_3 (por

comparação com 93,48°C, 1,91h, 13,17% NH₃) ou por um tempo de duração mínimo (por comparação com 93,48°C, 7,09h, 2,83% NH₃).

A figura 3.49 apresenta a evolução da TLA durante a HE nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos com NH₃ aplicando uma concentração enzimática de 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato

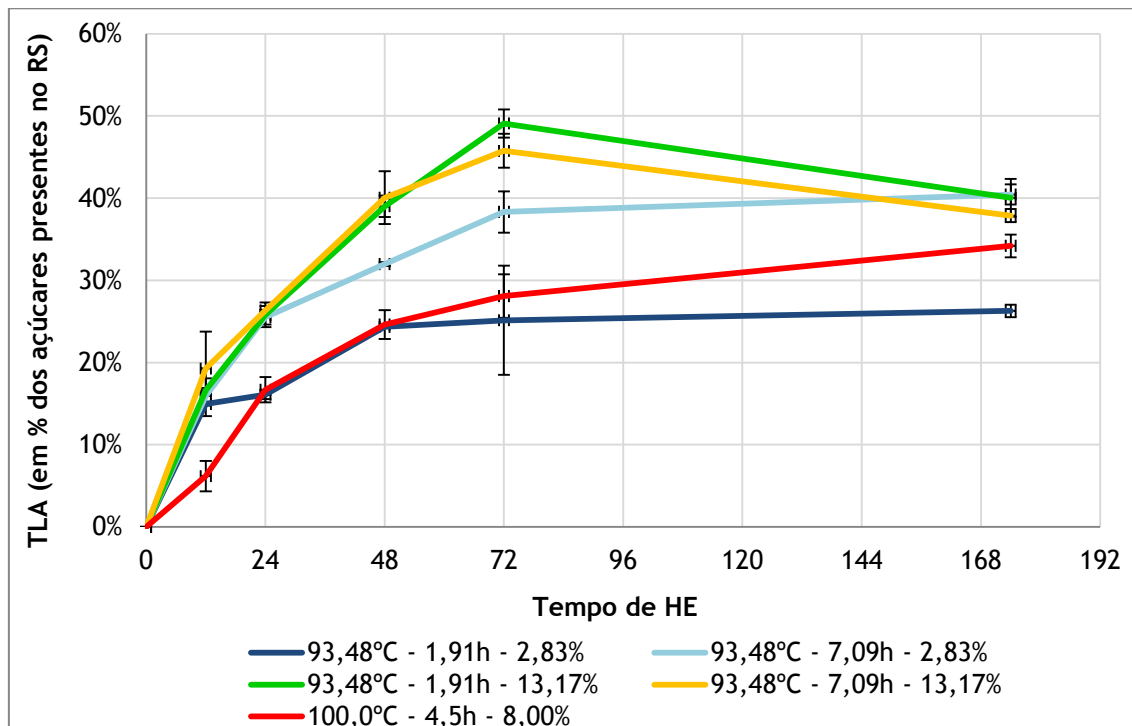


Figura 3.49 - Evolução da TLA durante a HE nos resíduos sólidos dos pré-tratamentos com NH₃ aplicando uma concentração enzimática de 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato

A observação da figura 3.49 mostra-nos que a aplicação de uma carga enzimática mais elevada aumentou consideravelmente os valores nas TLA obtidas em todos os resíduos sólidos. À semelhança do ocorrido na HE enzimática com carga enzimática mais baixa, continua a verificar-se um decréscimo nas quantidades de açúcares quantificados nos resíduos sólidos, resultantes dos pré-tratamentos realizados com uma concentração de NH₃ de 13,17%, após as 72h de HE. Estes resíduos obtiveram após 72h de HE os valores mais elevados nas TLA verificadas, sendo curiosamente os resíduos sólidos sujeitos a menor tempo de pré-tratamento (93,48°C, 1,91h, 13,17% NH₃) aqueles que apresentaram a TLA mais elevada neste período. A redução da TLA após as 72h de HE não pode ser devida à entrada de microorganismos no volume reaccional uma vez que os Erlenmeyer se encontravam fechados, uma hipótese para esta ocorrência pode ser justificada pela presença de compostos na solução que tenham influenciado a absorvância determinada, como sugerido por Miller (Miller, 1959).

No final da HE, após 174h, o valor mais elevado na TLA foi obtido pelos resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos efectuados a 93,5°C, durante 7,09h e com uma concentração de 2,83% de NH₃. Estes resíduos sólidos foram os únicos que apresentaram, juntamente com

os resíduos sólidos resultantes de pré-tratamentos realizados a 100°C, durante 4,5h e com uma concentração de NH₃ de 8,00%, um aumento na quantificação dos açúcares após as 72h de HE. Nos resíduos sólidos resultantes dos pré-tratamentos menos severos (93,5°C - 2,83% NH₃ - 1,91h) a TLA estabiliza após as 48h de HE, deixando por isso de existir, após este período, libertação de açúcares por acção enzimática.

3.6.5 - Determinação das interações entre os complexos enzimáticos

O sinergismo entre as componentes individuais de um sistema de enzimas, isto é, a acção de uma mistura de dois ou mais tipos de enzimas é superior à soma das acções individuais. No entanto, na sua acção existem diferentes velocidades de hidrólise podendo tal facto levar a acumulação de produto. Interessa assim conhecer a proporção entre os vários complexos que permita à máxima eficiência no processo de obtenção de açúcares simples (glucose, xilose e arabinose). A análise da libertação de açúcares redutores decorrente da hidrólise enzimática foi efectuada através do método do DNS às 42 e às 139 horas. A tabela 3.35 apresenta, no volume reaccional, a quantidade de açúcares redutores libertados e o rendimento da hidrólise enzimática, a partir da biomassa sem qualquer pré-tratamento, às 42 e às 139 horas, em função dos valores mínimos, médios e máximos de cada um dos factores analisados.

Tabela 3.35 - Libertação de açúcares redutores e rendimento da hidrólise, às 42 e 139 horas, em função dos valores mínimo, médio e máximo de cada um dos factores utilizados

NS22086 (FPU/50ml)	NS22118 (p-NPGU/50ml)	NS22083 (IU/50ml)	Sólidos (%)	Açúcares libertados em mg/50ml (42/139 horas)	Rendimento da hidrólise (%) (43/139 horas)
82,50	165,00	82,50	1	32,3 / 43,3	6,5 / 8,7
15,00	165,00	82,50	3	40,0 / 34,3	2,7 / 2,3
82,50	30,00	82,50	3	62,0 / 89,2	4,1 / 6,0
82,50	165,00	15,00	3	62,9 / 95,6	4,2 / 6,4
82,50	165,00	82,50	3	65,8 / 87,3	4,4 / 5,8
82,50	165,00	150,00	3	63,5 / 78,4	4,2 / 5,2
82,50	300,00	82,50	3	65,0 / 88,8	4,3 / 5,9
150,00	165,00	82,50	3	91,2 / 138,6	6,1 / 9,2
82,50	165,00	82,50	5	83,8 / 105,6	3,4 / 4,2

Como podemos observar pela análise da tabela 3.35 a carga de celulase (NS22086) e o teor de sólidos parecem ser os factores mais determinantes na libertação de açúcares no processo de hidrólise enzimática. Como seria de esperar, um baixo teor de sólidos tem como consequência uma menor libertação de açúcares, uma vez que existe menos substrato para se transformar em produto. Contudo, o rendimento associado é elevado devido ao facto de um maior número

de enzimas actuar por unidade de substrato. A maior libertação de açúcares e os rendimentos mais elevados são conseguidos com as maiores cargas de celulase (150FPU/ml), no entanto, a utilização de concentrações tão elevadas pode ter impacto na viabilidade de projectos devido ao elevado custo de aquisição de enzima. Facto curioso é o verificado quando mantemos a carga de celulasas em 82,5 FPU e a percentagem de sólidos em 3%. Nessas condições observamos às 139h de HE os rendimentos são independentes das cargas de beta-glucosidades e de xilanase aplicada.

Os modelos estatísticos de estimativa de libertação de açúcares a partir dos 4 factores acima mencionados resultou significativo ($p\text{-value} < 0,0001$) para os dois períodos considerados (42 e 139 horas). Os modelos construídos apresentaram para a estimativa de libertação de açúcares R^2 iguais 0,9552 e a 0,9823, respectivamente para as 42 e 139 horas de hidrólise enzimática. A tabela 3.36 mostra resumidamente a análise de variância para os modelos estatísticos construídos às 42h e 139h.

Tabela 3.36 - Estimativa da libertação de açúcares, para as 42 e 139h, em função dos teores de celulase (A), beta-glucosidase (B), xilanase (C) e sólidos (D) utilizados

Variável	Valor F	p-valor Prob > F	Valor F	p-valor Prob > F
	42h		139h	
Modelo	22.84	< 0.0001	17.66	0.0004
A-Celulase	21.11	0.0004	62.24	< 0.0001
B-Beta-glucosidase	0.88	0.3619	1.21	0.3084
C-Xilanase	3.38	0.0858	3.89	0.0892
D-Carga Sólidos	16.41	0.0010	14.12	0.0071
AB	0.53	0.4776	7.18	0.0316
AC	1.13	0.3054	8.42	0.0230
AD	0.53	0.4776	0.78	0.4072
BC	0.031	0.8620	1.40	0.2751
BD	2.34	0.1470	0.085	0.7790
CD	2.706E-003	0.9592	0.41	0.5441
A ²	1.24	0.2827	1.77	0.2252
B ²	2.89	0.1097	0.93	0.3674
C ²	3.13	0.0973	2.07	0.1930
D ²	10.14	0.0061	14.63	0.0065
ABC			7.39	0.0298
ABD			1.523E-003	0.9700
ACD			0.34	0.5767
BCD			0.59	0.4679
A ² B			7.85	0.0265
A ² C			2.66	0.1472
A ² D			0.76	0.4133
AB ²			6.87	0.0344
	R ² = 0,9552	R ² _{adj} = 0,9134	R ² = 0,9823	R ² _{adj} = 0,9267

Os valores de R^2 obtidos mostram que existe um bom ajuste entre os valores estimados a partir das equações de regressão geradas e os valores observados. Em ambas as equações os factores mais determinantes na libertação de açúcares da amostra foram a concentração de celulase, com p-valores iguais a 0,0004 e inferiores a 0,0001, respectivamente para o modelo das 42h e das 139h, e a concentração de sólidos com p-valores iguais a 0,0010 e 0,0071 respectivamente para o modelo das 42h e das 139h.

As equações 3.17 e 3.18 que a seguir se apresentam estimam a libertação de açúcares após 42 e 139 horas de hidrólise enzimática, em função das cargas dos três complexos enzimáticos e do teor de sólidos utilizados.

(3.17) Açúcares redutores após 42h

$$\begin{aligned} &= -626,4685 + 7,4100 \times A + 1,8151 \times B + 2,3537 \times C + 475,0444 \times D \\ &- 0,0077 \times A \times B + 0,0224 \times A \times C + 0,5185 \times A \times D + 0,0019 \times B \times C \\ &+ 0,5444 \times B \times D - 0,0370 \times C \times D - 0,0180 \times A^2 - 0,0069 \times B^2 - 0,0285 \times C^2 \\ &- 58,4500 \times D^2 \end{aligned}$$

(3.18) Açúcares redutores após 139h

$$\begin{aligned} &= +377,6904 + 40,5181 \times A - 21,7780 \times B - 12,7393 \times C + 262,9751 \times D \\ &+ 0,0689 \times A \times B - 0,0753 \times A \times C + 7,9339 \times A \times D + 0,1170 \times B \times C \\ &+ 1,4675 \times B \times D + 4,0109 \times C \times D - 0,4646 \times A^2 + 0,0780 \times B^2 - 0,0331 \times C^2 \\ &- 100,2530 \times D^2 - 0,0012 \times A \times B \times C + 0,0006 \times A \times B \times D \\ &- 0,0176 \times A \times C \times D - 0,0116 \times B \times C \times D + 0,0025 \times A^2 \times B \\ &+ 0,0025 \times A^2 \times C - 0,0454 \times A^2 \times D - 0,0010 \times A \times B^2 \end{aligned}$$

A figura 3.50 apresenta a influência da concentração da celulase e do teor de sólidos na libertação de açúcares redutores às 42h (a) e às 139h (b). As concentrações de enzima são expressas no volume de reacção (50ml).

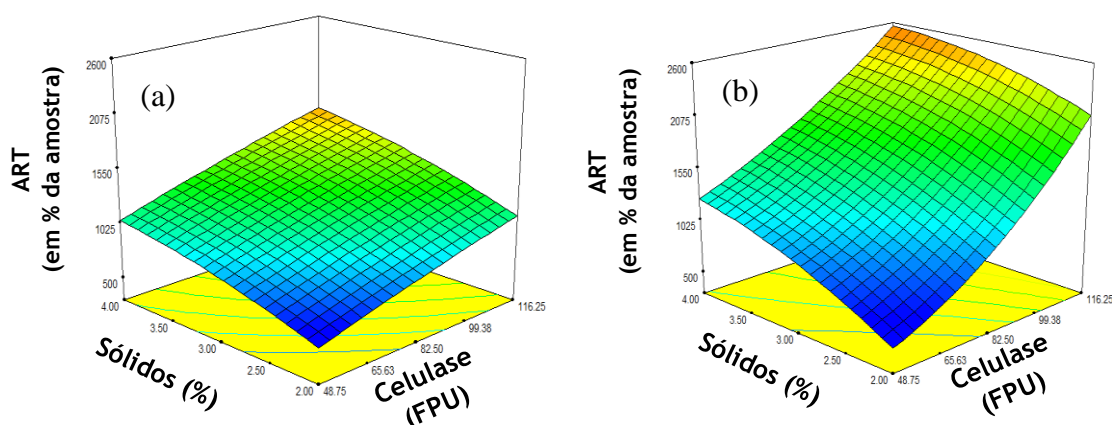


Figura 3.50 - Influência da concentração da celulase e do teor de sólidos na libertação de açúcares redutores, às 42h (a) e às 139h (b) com as restantes condições constantes:

Beta-glucosidase = 165 p-NPGU; Xilanase = 82,5 IU

De acordo com a análise da figura 3.50 o aumento da concentração da celulase e do teor de sólidos (TS) favoreceu o aumento da libertação de açúcares da amostra. Como seria de esperar uma maior concentração de sólidos implica uma maior quantidade de material passível de ser hidrolisado, o qual, na presença de uma maior quantidade de enzimas provoca uma maior intensidade do processo hidrolítico. Podemos no entanto observar, comparando a figura 3.50 a) e b) que para concentrações mais baixas de enzima a libertação de açúcares tende a estabilizar nos dois períodos temporais (42h e 139h). Veja-se que para uma concentração de 48,75 PFU e uma concentração de sólidos de 4,00% a quantidade de açúcares libertados foi bastante idêntica, cerca de 1025mg/L, em ambos os períodos. Para concentrações mais elevadas de celulase verificou-se um comportamento distinto sendo observado um claro aumento dos açúcares libertados com o aumento do tempo de hidrólise de 42 para 139h. Tal facto, pode indicar para concentrações mais baixas de enzima, a ocorrência de uma inactivação das enzimas através do estabelecimento de ligações não produtivas, podendo estas ser resultantes da ligação da enzima a produtos da reacção ou à lenhina presente na amostra.

3.6.6 - Açúcares libertados na HE em função do tipo de pré-tratamento

A figura 3.51 compara os 3 melhores resultados na HE de cada um dos pré-tratamentos realizados expressando-se a quantidade de açúcares libertada após 174h de HE em função das quantidades de açúcares que se encontravam disponíveis no RS, tendo em conta os açúcares existentes em 100g de biomassa.

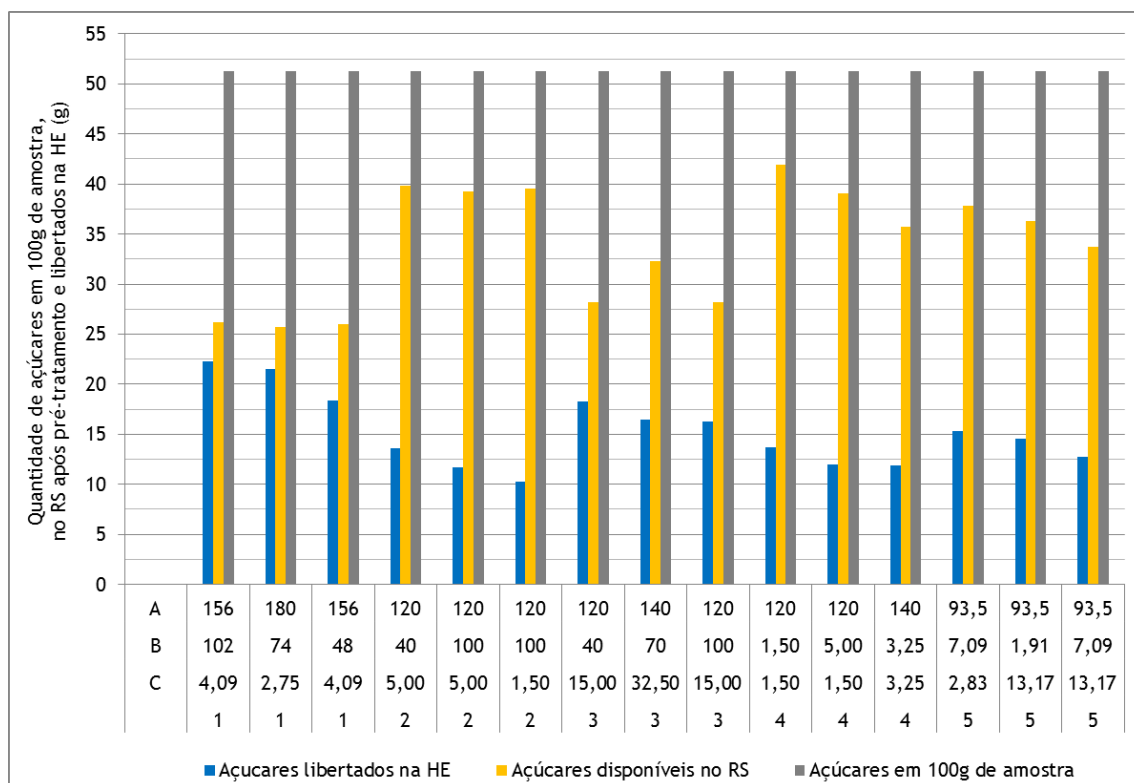


Figura 3.51 - Quantidade de açúcares libertados nos 3 melhores resultados na HE, de cada pré-tratamento, após 174h de HE, em função da quantidade de açúcares existentes no RS, tendo em conta os açúcares existentes em 100g de biomassa

- 1 - Pré-tratamento com H_2SO_4 [A - temperatura ($^{\circ}C$), B - tempo (min), C - concentração (%)]
- 2 - Pré-tratamento com NaOH [A - temperatura ($^{\circ}C$), B - tempo (min), C - concentração (%)]
- 3 - Pré-tratamento com NaOH extra [A - temperatura ($^{\circ}C$), B - tempo (min), C - concentração (%)]
- 4 - Pré-tratamento com NaOH e H_2O_2 [A - temperatura ($^{\circ}C$), B - NaOH (%), C - H_2O_2 (%)]
- 5 - Pré-tratamento com NH_3 [A - temperatura ($^{\circ}C$), B - tempo (h), C - concentração (%)]

Pela sua análise podemos observar que apesar do pré-tratamento ácido gerar uma elevada solubilização dos açúcares presentes no RS, consegue durante a HE, ser o pré-tratamento que promove a maior quantidade de açúcares libertados, atingindo-se uma libertação máxima de 22,3g em 26,3g de açúcares disponíveis. Depois deste surge o pré-tratamento realizado com concentrações elevadas de NaOH, nos quais se atingiram se libertaram 18,3g de açúcares das 28,2g de açúcares existentes no RS. Com menor solubilização de açúcares, o pré-tratamento efectuado com NH_3 consegue, apenas com uma concentração de 2,83%, promover a libertação, após 174h de HE, de 15,3g dos 37,8g dos açúcares que ainda se encontravam retidos no RS.

Capítulo 4 - Considerações finais

O trabalho realizado mostra que os resíduos das podas do olival, com um teor de açúcares na sua constituição de 51,15% do seu peso seco, podem adquirir um papel relevante na produção de etanol de 2ª geração, transformando um desperdício da manutenção do olival numa matéria-prima susceptível de gerar riqueza e emprego. A viabilidade prática dos projectos de produção de etanol a partir dos resíduos das podas do olival pode ainda ser melhorada se, para além do etanol, existir o aproveitamento dos compostos intermédios que são gerados na sua produção aplicando um conceito de biorrefinaria. A utilização deste material como matéria-prima para produção de etanol de 2ª geração poderá ainda, relativamente aos combustíveis fósseis usualmente utilizados (gasóleo e gasolina) e de acordo com a bibliografia consultada, permitir uma redução nas emissões de CO₂ e um aumento no balanço energético, tornando mais sustentável do ponto de vista ambiental e energético a produção e utilização deste combustível.

De todos os pré-tratamentos efectuados, o pré-tratamento com ácido sulfúrico foi aquele que apresentou melhores resultados. Neste pré-tratamento obteve-se um rendimento de 84% na hidrólise enzimática, realizada com 18FPU/g de substrato, 36 p-NPGU/g de substrato e 36 IU/g de substrato, dos pré-tratados provenientes de pré-tratamentos efectuados com uma concentração de 4,09% (w/w), durante 102 minutos e com uma temperatura de 156°C. Nestas condições atingiu-se a maior taxa de açúcares disponíveis para fermentação, correspondendo a soma dos açúcares libertados para o hidrolisado durante o pré-tratamento, com os açúcares libertados durante a hidrólise enzimática, a 90% dos açúcares existentes na biomassa.

Os resultados mostram que no pré-tratamento ácido pode-se conseguir a solubilização das hemiceluloses com uma produção mínima de produtos de degradação utilizando temperaturas de pré-tratamento em torno dos 150-160°C, ainda que com cargas de ácido mais elevadas. O aumento para temperaturas acima de 160°C possui duas consequências ao nível da produção de etanol de 2ª geração. A primeira resulta da redução das quantidades de açúcares disponíveis para fermentação devido à transformação de açúcares em produtos de degradação, a segunda consequência advém do facto dos produtos de degradação gerados possuírem a capacidade de inibir os microorganismos utilizados no processo fermentativo, reduzindo por essa via a taxa de conversão de açúcares em álcool.

No trabalho realizado verificou-se que a solubilização dos vários açúcares presentes no material foi afectada de forma distinta pelos factores utilizados no pré-tratamento. A solubilização da glucose foi particularmente influenciada pelo efeito conjugado da temperatura com a concentração de ácido sulfúrico (AC), enquanto que a solubilização da xilose foi influenciada em primeiro lugar pelo efeito da temperatura (A^2 e A) e só depois, como a glucose, pelo efeito conjugado da temperatura com a concentração de ácido sulfúrico (AC). Já a solubilização da arabinose foi influenciada por ordem decrescente pela concentração de ácido, pelo efeito conjugado da temperatura com o tempo (AB^2), pela temperatura (A^2) e pelo efeito conjugado da temperatura com a concentração de ácido (A^2C).

Em termos de teores de açúcares solubilizados, a glucose foi o açúcar que apresentou a menor taxa de solubilização. Este açúcar obteve uma solubilização máxima de 36,3%, em percentagem da glucose presente na amostra, nos pré-tratamentos realizados a 156°C, durante 48 minutos e com 4,09% (w/w) de H₂SO₄. Neste trabalho conseguiu-se atingir a solubilização integral da xilose e da arabinose em diversos pré-tratamentos. A solubilização integral da xilose foi verificada nos pré-tratamentos realizados com temperatura de 156°C e concentrações de H₂SO₄ de 4,09%. A solubilização integral da arabinose ocorreu em condições de menor severidade tendo sido observada inclusivamente em pré-tratamentos efectuados a 120°C. Nos pré-tratamentos realizados com temperaturas superiores a 156°C verificou-se um decréscimo dos teores de glucose e xilose no hidrolisado possivelmente devida à degradação destes açúcares. A diminuição dos teores de arabinose no hidrolisado, possivelmente causada pela sua degradação, foi verificada para temperaturas acima dos 138°C.

A formação de produtos de degradação foi principalmente influenciada pelo aumento da temperatura (A e A²). O efeito conjugado da temperatura com a duração (AB) dos pré-tratamentos também influenciou a formação destes produtos. No modelo construído a concentração de ácido não teve influência nas concentrações de produtos de degradação obtidas. Ao contrário de outros autores não verificámos no presente trabalho a influência do sinergismo entre a concentração de ácido e o tempo de residência (BC) no aparecimento de produtos de degradação nos pré-tratamentos ácidos (Heredia-Olea *et al.*, 2012). A formação de produtos de degradação foi verificada para temperaturas acima de 110°C tendo no entanto, aumentado consideravelmente a detecção destes compostos no hidrolisado, a partir dos 156°C.

Na hidrólise enzimática subsequente verificou-se, em todos os pré-tratados com ácido sulfúrico, um aumento dos rendimentos com o aumento das concentrações de enzima utilizadas. Assim, quando triplicámos a quantidade de enzimas de 6PFU, 12 p-NPGU e 12 IU por grama de substrato para 18PFU, 36 p-NPGU e 36 IU por grama de substrato, verificou-se um aumento médio de 75%, ao fim de 174h, no rendimento da hidrólise enzimática. Ao contrário do indicado por diversos autores, não verificámos na hidrólise enzimática uma estabilização na quantificação dos açúcares libertados após as 72h. Neste trabalho observou-se em todos os pré-tratados, em especial nos realizados a 180°C e a 156°C com uma concentração de ácido de 4,09%, um aumento da taxa de açúcares libertados até ao término do período de hidrólise (174h). Este facto mostra, em particular para concentrações de enzima mais baixas, que estas continuam a actuar sobre o substrato, especialmente se este se encontrar mais acessível pelo pré-tratamento. Ao aumentarmos a carga enzimática observou-se, após as 72h de hidrólise enzimática, que os aumentos nas taxas de libertação de açúcares foram especialmente induzidos pela carga de ácido aplicada, em detrimento da temperatura ou da duração do pré-tratamento.

Nos pré-tratamentos alcalinos a quantificação da lenhina no hidrolisado pelo método utilizado parece sobrestimar a determinação dos teores de lenhina solubilizada. Este facto, pode resultar da quantificação como lenhina de outros compostos, nomeadamente parte dos extractáveis que possam ter sofrido condensação ou de açúcares que tenham permanecidos ligados quimicamente à lenhina solubilizada.

Nos pré-tratamentos com NaOH as taxas de remoção de lenhina foram manifestamente diferentes entre os pré-tratamentos modelados e os pré-tratamentos extra. Estes últimos foram realizados com as mesmas condições de temperatura e duração, mas com uma concentração da base dez vezes superior. Assim obteve-se uma taxa máxima de remoção de lenhina de 14,1% nos pré-tratamentos modelados efectuados com uma temperatura de 90°C, durante 120 minutos e com uma concentração de hidróxido de sódio de 3,25%. Nestas condições o resíduo sólido reteve 71,6% da glucose, 78,5% da xilose e 67,0% da arabinose relativamente às quantidades destes açúcares presentes na amostra. A taxa máxima de remoção de lenhina subiu para 54,7% nos pré-tratamentos extra efectuados com uma temperatura de 120°C, durante 100 minutos e com uma concentração de NaOH de 50,00%. Contudo, nestas condições o resíduo sólido reteve apenas 54,7% da glucose, 36,7% da xilose e 10,8% da arabinose, relativamente às quantidades destes açúcares presentes na amostra. O aumento em dez vezes da concentração de hidróxido de sódio provocou, em relação aos ensaios modelados realizados com a mesma temperatura e duração, uma redução média de açúcares no resíduo sólido de $1,2 \pm 0,1$ para a glucose, de $2,1 \pm 0,2$ para a xilose e de $6,6 \pm 1,3$ para a arabinose.

Durante a hidrólise enzimática, os pré-tratamentos realizados com concentrações mais elevadas de NaOH (15,0 a 61,9%) conseguiram libertar uma maior quantidade de açúcares, comparativamente com os realizados com menor carga de NaOH (1,50 a 6,10%), apesar de possuírem uma menor quantidade de açúcares retidos no resíduo sólido. Nos pré-tratamentos com NaOH atingiu-se, na hidrólise enzimática, um valor máximo de 64,7% na taxa de libertação de açúcares, após 174h, nos pré-tratados resultantes de pré-tratamentos realizados com temperatura de 120°C, durante 40 minutos e com uma concentração de NaOH de 15,0%. Os pré-tratados alcalinos onde se verificaram as maiores taxas de libertação de açúcares durante a hidrólise enzimática não foram aqueles que sofreram as maiores taxas de remoção de lenhina (120°C, 100min, NaOH = 50%), o que nos leva a equacionar que no pré-tratamento alcalino, o sucesso da hidrólise enzimática possa não se encontrar somente dependente das taxas de remoção de lenhina obtidas.

Nos pré-tratamentos com NaOH e H₂O₂ obteve-se uma taxa máxima de remoção de lenhina de 22,6% nos pré-tratamentos realizados com uma temperatura de 140°C e com concentrações de NaOH e de H₂O₂ de 3,25%. Nestas condições o resíduo sólido reteve 70,4% da glucose, 77,6% da xilose e 43,2% da arabinose relativamente às quantidades destes açúcares presentes na amostra. A adição de peróxido de hidrogénio fez aumentar as taxas de remoção de lenhina mas também aumentou a solubilização dos açúcares, não sendo este efeito no entanto uniforme. Assim foi verificado que para concentrações baixas de NaOH (1,50%) o aumento de H₂O₂ diminuiu a taxa de retenção de açúcares no resíduo sólido. Para concentrações mais elevadas de NaOH (5,00%) foi verificado um efeito oposto, aumentando a retenção de açúcares no resíduo sólido, especialmente da glucose e da xilose, com o aumento da carga de H₂O₂, sendo este efeito mais notório nos pré-tratamentos efectuados com temperaturas mais baixas.

Na hidrólise enzimática o aumento da carga enzimática, de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU para 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato, promoveu acréscimos médios na taxa de libertação de açúcares de 39% dos pré-tratados. Não se provaram neste trabalho acréscimos significativos nas taxas de libertação de açúcares, durante a hidrólise enzimática, dos pré-tratados que sofreram adição de H₂O₂ relativamente aos pré-tratados resultantes de pré-tratamentos realizados apenas com NaOH.

No pré-tratamento com NH₃ obteve-se uma taxa de remoção de lenhina de 27,8% nos pré-tratamentos efectuados com temperatura de 93,5°C, durante 7,09h e com uma concentração de NH₃ de 13,17%. Nestas condições o resíduo sólido conseguiu reter 68,8% da glucose, 72,8% da xilose e 23,4% da arabinose relativamente às quantidades destes açúcares presentes na amostra. No pré-tratamento com NH₃ o aumento da temperatura e da concentração de NH₃ provocou para além de uma maior taxa de remoção de lenhina, uma maior solubilização dos açúcares presentes no resíduo sólido.

Na hidrólise enzimática o aumento da carga enzimática, de 6FPU, 12 p-NPGU e 12IU para 18FPU, 36 p-NPGU e 36IU por grama substrato, promoveu acréscimos médios na taxa de libertação de açúcares de 38% nos pré-tratados com NH₃.

Neste pré-tratamento foi conseguida uma taxa de libertação de açúcares de 40,5%, após 174h de hidrólise enzimática, em pré-tratados com apenas 2,83% de concentração de NH₃. Este facto leva-nos a equacionar, em trabalhos futuros, a possibilidade de realizarmos pré-tratamentos alcalinos com menores valores de temperatura e concentração de base, mas com tempos de duração mais elevados.

A relação entre os vários complexos enzimáticos foi estudada utilizando a matéria-prima, sem qualquer pré-tratamento, de modo a avaliar a possibilidade de eventuais interacções entre as enzimas utilizadas.

Nos resultados da determinação das interacções entre os complexos enzimáticos, a concentração de celulases foi considerada o principal factor limitante no desenvolvimento da hidrólise enzimática, tendo sido observada para baixas concentrações de celulases uma estabilização na libertação de açúcares mesmo aumentando a quantidade de substrato disponível.

Na determinação das interacções entre os complexos enzimáticos podemos observar que a aplicação de baixas concentrações de beta-glucosidade e xilanase não limitou o rendimento da hidrólise enzimática. Uma explicação para esta constatação, resulta das beta-glucosidades e xilanas actuarem respectivamente sobre substratos solúveis ou amorfos, possuindo como tal, velocidades de hidrólise mais elevadas que as das celulases que actuam sobre substratos com regiões cristalinas. Neste trabalho, ao contrário do que é sugerido pela bibliografia consultada, pensamos que a relação entre celulases e estes complexos enzimáticos (beta-glucosidade e xilanase) pode ser de 3 para 1, em vez de 1:2. A redução nas quantidades de beta-glucosidade e xilanase utilizadas na realização do processo de hidrólise enzimática poderá assim representar uma poupança económica.

Em trabalhos futuros pretendemos realizar o processo na sua totalidade, com a etapa de fermentação incluída, de modo a completarmos o processo de produção de etanol a partir de materiais lenhocelulósicos. Na fermentação gostaríamos de comparar o rendimento global entre a fermentação conjunta e a fermentação separada das pentoses, utilizando neste último processo diferentes microorganismos (*Pichia stipitis* para as pentoses e *Saccharomyces cerevisiae* para as hexoses).

Também gostaríamos de efectuar uma análise comparativa entre diferentes materiais lenhocelulósicos, ou seja, analisar o efeito do mesmo pré-tratamento em diferentes materiais, de modo a conseguir perceber pela diferente composição e estrutura dos materiais, os resultados obtidos.

Os materiais lenhocelulósicos que se nos afiguram mais interessantes para este tipo de estudo podem ser divididos em 3 classes. Na primeira classe de materiais, gostaríamos de analisar a produção de etanol a partir de outros resíduos, como resíduos florestais, sarmentos das podas da vinha, matos e a fracção orgânica dos resíduos sólidos urbanos. Numa segunda classe consideramos interessante a avaliação de culturas florestais de curta rotação, como o choupo, o salgueiro, a paulownia e o eucalipto. Na última classe gostaríamos de avaliar a fracção lenhocelulósica de materiais utilizados na produção de biocombustíveis de 1ª geração como, a *Jatropha curcas*, os caules do milho e o bagaço de cana-de-açúcar.

Bibliografia

- AAE. (2013). La biomasa en Andaluzia. [consultado 14-06-2013]. Disponível em: <http://www.agenciaandaluzadelaenergia.es/documentacion/informes-y-estudios/la-biomasa-en-andalucia>
- Aatola, H., Larmi, M., Sarjovaara, T., e Mikkonen, S. (2008). Hydrotreated Vegetable Oil (HVO) as a Renewable Diesel Fuel: Trade-off between NO_x, Particulate Emission, and Fuel Consumption of a Heavy Duty Engine. [consultado 12-06-2013]. Disponível em: <http://www.biofuelstp.eu/biodiesel.html>.
- Adney, B. e Baker, J. (2008). Measurement of Cellulase Activities. In Technical Report NREL/TP-510-42628. (NREL, ed.).
- AEC (2013). Cellulosic biofuels: Industry Progress Report 2012-2013 (Advanced Ethanol Council, ed.).
- Altarejos, J., Salido, S., Pérez-Bonilla, M., Linares-Palomino, P.J., van Beek, T.A., Nogueras, M., e Sánchez, A. (2005). Preliminary assay on the radical scavenging activity of olive wood extracts. *Fitoterapia* 76, 348-351.
- Alves, A.M. (2010). Caracterização do teor e composição estrutural da lenhina por espectroscopia de infravermelho próximo e pirólise analítica. Tese de Doutoramento Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa - Portugal.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., e Negro, M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* 101, 4851-4861.
- APPB (2013). Associação Portuguesa de Produtores de Biocombustíveis. [consultado 12-06-2013]. Disponível em: http://www.appb.pt/index.php?text_id=3.
- Avci, A., Saha, B.C., Dien, B.S., Kennedy, G.J., e Cotta, M.A. (2012). Response surface optimization of corn stover pretreatment using dilute phosphoric acid for enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Bioresource Technology* 130, 603-612.
- Bak, J.S., Ko, J.K., Han, Y.H., Lee, B.C., Choi, I.-G., e Kim, K.H. (2009). Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment. *Bioresource Technology* 100, 1285-1290.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management* 52, 858-875.
- Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cara, C., Sáez, F., Castro, E., Manzanares, P., Negro, M.J., e Oliva, J.M. (2011). Effect of water extraction on sugars recovery from steam exploded olive tree pruning. *Bioresource Technology* 102, 6611-6616.

- Ballesteros, I., Oliva, J.M., Carrasco, J., Cabañas, A., Navarro, A.A., e Ballesteros, M. (1998). Effect of surfactants and zeolites on simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded poplar biomass to ethanol. *Applied biochemistry and biotechnology* 70-72, 369.
- Bals, B., Wedding, C., Balan, V., Sendich, E., e Dale, B. (2012). Evaluating the impact of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment conditions on the cost of ethanol production. *Bioresource. Technol.* 102, 1277-1283.
- Banerjee, G., Car, S., Scott-craig, J.S., Hodge, D.B., Walton, J.D. e Scott-Craig, J.S. (2011). Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. *Biotechnology for Biofuels* 4, 4-16.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., e Del Rio, J.A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry* 68, 457-462.
- Berlin, A., Gilkes, N., Kurabi, A., Bura, R., Tu, M., Kilburn, D. e Saddler, J. (2005). Weak lignin-binding enzymes. Part A: *Enzyme Engineering and Biotechnology* 121, 163-170.
- Bezerra, R. M. F. (1995). Cinética enzimática da hidrólise de celulose. Tese de Doutorado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real - Portugal.
- Binod, P., Satyanagalakshmi, K., Sindhu, R., Janu, K.U., Sukumaran, R.K., e Pandey, A. (2012). Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. *Renew. Energy* 37, 109-116.
- Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H., e Sayadi, S. (2011). Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 49, 179-184.
- BP (2013). BP Statistical Review of World Energy June 2013. [consultado 12-06-2013]. Disponível em: <http://www.bp.com/en/global/corporate/about-bp/statistical-review-of-world-energy-2013.html>.
- Bridgwater, A.V. (2001). *Progress in Thermochemical Biomass Conversion* (UK). ISBN 0-632-05533-2.
- Buranov, A.U., e Mazza, G. (2012). Fractionation of flax shives with pressurized aqueous ethanol. *Industrial Crops & Products* 35, 77.
- Börjesson, J., Engqvist, M., Sipos, B., e Tjerneld, F. (2007). Effect of poly(ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* 41, 186-195.

- Canettieri, E.V., Rocha, G.J.d.M., Carvalho, J.A. e de Almeida e Silva, J.B. (2007). Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. *Bioresource Technology* 98, 422-428.
- Caputo, A.C., Scacchia, F. e Pelagagge, P.M. (2003). Disposal of by-products in olive oil industry: waste-to-energy solutions. *Applied Thermal Engineering* 23, 197-214.
- Cara, C., Romero, I., Oliva, J.M., Saez, F., e Castro, E. (2007b). Liquid hot water pretreatment of olive tree pruning residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 137, 379-394.
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M.J., e Castro, E. (2008). Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. *Fuel* 87, 692-700.
- Cara, C., Ruiz, E., Oliva, J.M., Sáez, F., e Castro, E. (2007a). Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology* 99, 1869-1876.
- Cardona, C.A., Quintero, J.A., e Paz, I.C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology* 101, 4754-4766.
- Carvalho, F., Duarte, L.C., e Gírio, F.M. (2008). Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Bioresource Technology* 101, 4775-4800.
- Cassales, A., de Souza-Cruz, P.B., Rech, R., e Záchia Ayub, M.A. (2011). Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. *Biomass and Bioenergy* 35, 4675-4683.
- Castro, E., Díaz, M.J., Cara, C., Ruiz, E., Romero, I., e Moya, M. (2011). Dilute acid pretreatment of rapeseed straw for fermentable sugar generation. *Bioresource Technology* 102, 1270-1276.
- Centi, G., Lanzafame, P. e Perathoner, S. (2011). Analysis of the alternative routes in the catalytic transformation of lignocellulosic materials. *Catalysis Today* 167, 14-30.
- Chandel, A.K., Chan, E.S., Rudravaram, R., Narasu, N.L., Rao, V., e Ravindra, P. (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2, 014-032.
- Chang, V.S., e Holtzapple, M.T. (2000). Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-6, 5-37.
- Chen, F. e Dixon, R.A. (2007). Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology* 25, 759-761.

- Chen, M., Zhao, J., e Xia, L. (2009). Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Biomass and Bioenergy* 33, 1381-1385.
- Chen, W.S, Tu, Y.J. e Sheen, H.K. (2011). Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. *Applied Energy* 88, 2726-2734
- Cheng, Y.S. (2010). Evaluation of High Solids Alkaline Pretreatment of Rice Straw. (*Applied Biochemistry and Biotechnology*). pp. 1768-1784.
- Cherubini, F., Bird, N.D., Cowie, A., Jungmeier, G., Schlamadinger, B. e Woess-Gallasch, S. (2009). Energy- and greenhouse gas-based LCA of biofuel and bioenergy systems: Key issues, ranges and recommendations. *Resources, Conservation & Recycling* 53, 434-447.
- Chiaromonti, D., Prussi, M., Ferrero, S., Oriani, L., Ottonello, P., Torre, P. e Cherchi, F. (2012). Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy* 46, 25-35.
- Chundawat, S.P.S., Vismeh, R., Sharma, L.N., Humpala, J.F., da Costa Sousa, L., Chambliss, C.K., Jones, A.D., Balan, V. e Dale, B.E. (2010). Multifaceted characterization of cell wall decomposition products formed during ammonia fiber expansion (AFEX) and dilute acid based pretreatments. *Bioresource Technology* 101, 8429-8438.
- CNN (2008). U.N. expert: Food crisis 'a silent tsunami'. [consultado 17-06-2013]. Disponível em: <http://edition.cnn.com/2008/TECH/science/04/22/food.biofuels/>
- Conde-Mejía, C., Jiménez-Gutiérrez, A. e El-Halwagi, M. (2012). A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. *Process Safety and Environmental Protection* 90, 189-202.
- DeMartini, J.D. e Wyman, C.E. (2011). Changes in composition and sugar release across the annual rings of *Populus* wood and implications on recalcitrance. *Bioresource Technology* 102, 1352-1358.
- DGEG (2013a). Consumo de energia final por sector em 2011 (%). [consultado 18-06-2013]. Disponível em: <http://www.dgeg.pt/>.
- DGEG (2013b). Preço máximo de biocombustíveis. (%). [consultado 18-06-2013]. Disponível em: <http://www.dgeg.pt/>
- Dias, J. (2002). Utilização da biomassa: avaliação dos resíduos e utilização de pellets em caldeiras domésticas. Tese de Mestrado. Instituto Superior Técnico, Lisboa - Portugal.

EBTP (2013). Fuel production - second generation. European Biofuels Technology Platform. [consultado 18-06-2013]. Disponível em: <http://www.biofuelstp.eu/fuelproduction.html#second>.

Erbay, Z. e Icier, F. (2010). The Importance and Potential Uses of Olive Leaves. Food Reviews International 26, 319-334.

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

Fang, J., Sun, R., Tomkinson, J., Sun, M., Tomkinson, R. e Tomkinson, C. (2000). Isolation and characterization of hemicelluloses and cellulose from rye straw by alkaline peroxide extraction. Cellulose 7, 87-107.

FAO (2011). FAO - Production Crops. [consultado 19-06-2013]. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>.

Fengel, D. e Wegener G. (1984). Wood: Chemistry ultrastructure reactions. Walter de Gruyter, Berlin-New York. ISBN: 0-89925-593-0

Ferreira, D.J. (2010). O olival em modo de produção biológico: Custos e Rentabilidade na região de Moura, Alentejo. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa - Portugal.

Ferreira, S., Duarte, A.P., Ribeiro, M.H.L., Queiroz, J.A. e Domingues, F.C. (2009). Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. Biochem. Eng. J. 45, 192-200.

Ferreira, S., Gil, N., Queiroz, J.A., Duarte, A.P. e Domingues, F.C. (2011). An evaluation of the potential of *Acacia dealbata* as raw material for bioethanol production. Bioresource Technology 102, 4766-4773.

Ferreira, S., Gil, N., Queiroz, J.A., Duarte, A.P. e Domingues, F.C. (2010). Bioethanol from the Portuguese forest residue *Pterospartum tridentatum* - An evaluation of pretreatment strategy for enzymatic saccharification and sugars fermentation. Bioresource Technology 101, 7797-7803.

Fu, S., Arráez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Menéndez, J., Menéndez-Gutiérrez, M., Micol, V., Fernández-Gutiérrez, A., Menéndez-Gutiérrez, A., Micol, M. e Fernández-Gutiérrez, P. (2009). Qualitative screening of phenolic compounds in olive leaf extracts by hyphenated liquid chromatography and preliminary evaluation of cytotoxic activity against human breast cancer cells. Analytical and Bioanalytical Chemistry 397, 643-654.

- Geng, Z.C., Sun, R.C., Sun, X.F., e Lu, Q. (2003). Comparative study of hemicelluloses released during two-stage treatments with acidic organosolv and alkaline peroxide from *Caligonum monogoliacum* and *Tamarix* spp. *Polymer Degradation and Stability* 80, 315-325.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and applied chemistry* 59, 257-268.
- Gil, N.R.S. (2008). Pré-tratamento de materiais lenhocelulósicos para produção de bioetanol. Tese de Mestrado. Universidade da Beira Interior, Covilhã - Portugal.
- Grethlein, H.E. (1985). The Effect of Pore Size Distribution on the Rate of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Substrates. *Nature Biotechnology* 3.
- Gupta, R. (2008). Alkaline pretreatment of biomass for ethanol production and understanding the factores influencing the cellulose hydrolysis. Tese de Doutorado. Auburn University.
- Gupta, R. e Lee, Y.Y. (2010). Investigation of biomass degradation mechanism in pretreatment of switchgrass by aqueous ammonia and sodium hydroxide. *Bioresour. Technol.* 101, 8185-8191.
- Gupta, R. e Lee Y. Y. (2009). Pretreatment of Hybrid Poplar by Aqueous Ammonia. *Biotechnology Progress*, 25 (2), 357-364.
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carneiro, F., Duarte, L.C., Marques, S. e Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* 101, 4775-4800.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. e Gorwa-Grauslund, M. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 937-953.
- Hamelinck, C.N., Hooijdonk, G.v., e Faaij, A.P.C. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy* 28, 384-410.
- Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, A., Sluiter, J. e Templeton, D. (2005). Preparation of Samples for Compositional Analysis. In Technical Report NREL/TP-510-42619 (NREL, ed.).
- Han, M., Kim, Y., Chung, B. e Choi, G.W. (2011). Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem. *Korean J. Chem. Eng.* 28, 119-125.
- Harmsen, P., Huijgen, W., Bermudez, L. e Bakker, R. (2010). Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. *Biosynergy report* 1184.
- Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K.Y., Ishii, J. e Kondo, A. (2012). A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource Technology* 135, 513-522.

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

Heredia-Olea, E., Pérez-Carrillo, E. e Serna-Saldívar, S.O. (2012). Effects of different acid hydrolyses on the conversion of sweet sorghum bagasse into C5 and C6 sugars and yeast inhibitors using response surface methodology. *Bioresource Technology* 119, 216-223.

Herrera, J. (2012). Instalación de gasificación de restos de poda de olivar integrada en una almazara. [consultado 19-06-2013]. Disponível em:

<http://www.interempresas.net/Produccion-Aceite/Articulos/103875-Instalacion-de-gasificacion-de-restos-de-poda-de-olivar-integrada-en-una-almazara.html>

Herrero, M., Temirzoda, T.N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M. e Ibañez, E. (2011). New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *Journal of Chromatography A* 1218, 7511-7520.

Hickert, L.R., Souza-Cruz, P.B.D., Rosa, C.A. e Ayub, M.A.Z. (2013). Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* CV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. *Bioresource Technology*.

Hsu, T.A., Ladish, M.R. e Tsao, G.T. (1980). Alcohol from cellulose. *Chem. Technol.*, 315-319.

Hui, T. (2011). The effect of chemical activator on the cellulase hydrolysis in the high-solid substrate. *International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering (RSETE)*.

IEA. (2012). Key world energy statistics. International Energy Agency.

<http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/kwes.pdf>

INE (2012a). Azeite produzido (hl) por Localização geográfica (Região agrícola), Tipo de lagar de azeite, Grau de acidez e Sistema de extracção utilizado. [consultado 24-06-2013]. Disponível em:

http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000709&contexto=bd&selTab=tab2.

INE (2012b). Produção de azeitona (t) por Local de proveniência da azeitona. [consultado 24-06-2013]. Disponível em:

http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000705&contexto=bd&selTab=tab2.

INE (2011). Recenseamento agrícola 2009. Destaque - comunicação à comunicação social. Instituto Nacional de Estatística.

- INE (2013). Superfície das principais culturas agrícolas (ha) por Localização geográfica. [consultado 24-06-2013]. Disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000018&contexto=bd&selTab=tab2.
- Ivetić, D.Ž., Šćiban, M.B. e Antov, M.G. (2012). Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar beet shreds: Statistical modeling of the experimental results. *Biomass and Bioenergy* 47, 387-394.
- Jeffries, T.W. (1987). Physical, chemical and biochemical considerations in the biological degradation of wood. In *Wood and cellulose: industrial utilisation, biotechnology, structure and properties*. Kennedy, J.F., Phillips, G.O. and William, P.A. eds. (Chichester, West Sussex, England: Ellis Horwood Ltd).
- Jin, M.J., Gunawan, C., Balan, V. e Dale, B.E. (2012). Consolidated bioprocessing (CBP) of AFEX (TM)-pretreated corn stover for ethanol production using *Clostridium phytofermentans* at a high solids loading. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 1929-1936.
- Jorge, M.N. (2012). Continua a valer a pena investir em Olival em Portugal ? 2ª Edição de conferências VidaRural - Olival e azeite: Os novos desafios do Mercado. Agro.ges sociedade de estudos e projectos.
- Jørgensen, H., Kristensen, J.B. e Felby, C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1- 2, 119-134.
- Keshwani, D.R. e Cheng, J.J. (2010). Microwave-based alkali pretreatment of switchgrass and coastal bermudagrass for bioethanol production. *Biotechnology Progress* 26, 644-652.
- Kim, H.Y., Lee, J.W., Jeffries, T.W. e Choi, I.G. (2011a). Response surface optimization of oxalic acid pretreatment of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*) for production of glucose and xylose monosaccharides. *Bioresource Technology* 102, 1440-1446.
- Kim, S., Lee, J., Oh, K., Lee, S., Lee, J. e Kim, J. (2011b). Dilute acid pretreatment of barley straw and its saccharification and fermentation. *Biotechnol Bioproc E* 16, 725-732.
- Kim, S.B., Um, B.H. e Park, S.C. (2001c). Effect of pretreatment reagent and hydrogen peroxide on enzymatic hydrolysis of oak in percolation process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91-3, 81-94.
- Kim, J.W., Kim, K.S., Lee, J.S., Park, S.M., Cho, H.Y., Park, J.C. e Kim, J.S. (2011d). Two-stage pretreatment of rice straw using aqueous ammonia and dilute acid. *Bioresource Technology* 102, 8992-8999.
- Kim, S.B. e Park, S.C. (2001). Effect of pretreatment reagent and hydrogen peroxide on enzymatic hydrolysis of oak in percolation process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91-3, 81-94.

Kim, T.H. (2004). Bioconversion of lignocellulosic material into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, and ethanol fermentation, Auburn University, Auburn University.

Kim, T.H. e Lee, Y.Y. (2005). Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process. *Bioresour. Technol.* 96, 2007-2013.

Kim, T.H. e Lee, Y.Y. (2007). Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 137, 81-92.

Klinke, H.B., Ahring, B.K., Schmidt, A.S., e Thomsen, A.B. (2002). Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology* 82, 15-26.

Klock, U., Muñiz, G., Hernandez, J., e Andrade, A. (2005). Química da Madeira (3ª edição). Universidade Federal do Paraná, Sector de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal. Brasil.

Kogel- knabner, I. (2002). The Macromolecular Organic Composition of Plant and Microbial Residues as Inputs to Soil Organic Matter. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 139-162.

Kristensen, J.B., Börjesson, J., Bruun, M.H., Tjerneld, F. e Jørgensen, H. (2007). Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 888-895.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. e Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. In *Ind. Eng. Chem. Res.* pp. 3713-3729.

Kumar, R. e Wyman, C.E. (2009). Effect of additives on the digestibility of corn stover solids following pretreatment by leading technologies. *Biotechnology and bioengineering* 102, 1544.

Kumar, R. e Wyman, C.E. (2008). The impact of dilute sulfuric acid on the selectivity of xylooligomer depolymerization to monomers. *Carbohydr. Res.* 343, 290-300.

Laguerre, M., López Giraldo, L., Piombo, G., Figueroa-Espinoza, M., Pina, M., Benaissa, M., Combe, A., Rossignol Castera, A., Lecomte, J. e Villeneuve, P. (2009). Characterization of Olive-Leaf Phenolics by ESI-MS and Evaluation of their Antioxidant Capacities by the CAT Assay. *J Am Oil Chem Soc* 86, 1215-1225.

Lapoint, R.E. (2000). Précis de chimie de la cellulose (CCDMD). ISBN13 : 9782980053863

Lau, M.W., Dale, B.E. e Balan, V. (2008). Ethanol fermentation of hydrolysates from ammonia fiber expansion (AFEX) treated corn stover and distillers grain without detoxification and external nutrient supplementation. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 529-539.

- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H. e Dale, B.E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121, 1081-1099.
- Lavenson, D., Tozzi, E., McCarthy, M., Powell, R., Jeoh, T., Tozzi, M., McCarthy, E., Powell, J. e Jeoh, M. (2011). Investigating adsorption of bovine serum albumin on cellulosic substrates using magnetic resonance imaging. *Cellulose* 18, 1543-1554.
- Lebo, S.E., Gargulak, J.D. e McNally, T.J. (2002). Lignin. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. DOI: 10.1002/0471440264.pst179
- Lee, J.M., Jameel, H. e Venditti, R.A. (2010). A comparison of the autohydrolysis and ammonia fiber explosion (AFEX) pretreatments on the subsequent enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. *Bioresource Technology* 101, 5449-5458.
- Lehto, J. e Alén, R. (2013). Alkaline Pre-treatment of Hardwood Chips Prior to Delignification. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 33, 77-91.
- Levy, J.Q., e Cabeças, A.J. (2006). Resíduos sólidos urbanos princípios e processos. AEPISA - Associação das Empresas Portuguesas do Sector do Ambiente. ISBN: 989-95059-0-0
- Li, C., Sun, L., Simmons, B., Singh, S. e Singh, A. (2013). Comparing the Recalcitrance of Eucalyptus, Pine, and Switchgrass Using Ionic Liquid and Dilute Acid Pretreatments. *Bioenerg. Res.* 6, 14-23.
- Li, X.A. e Kim, T.H. (2011). Low-liquid pretreatment of corn stover with aqueous ammonia. *Bioresour. Technol.* 102, 4779-4786.
- Limayem, A. e Ricke, S.C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science* 38, 449-467.
- Liu, C. e Wyman, C.E. (2006). The enhancement of xylose monomer and xylotriose degradation by inorganic salts in aqueous solutions at 180 °C. *Carbohydrate Research* 341, 2550-2556.
- Lloyd, T.A. e Wyman, C.E. (2005). Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technology* 96, 1967-1977.
- Lynd, L.R., Wyman, C.E. e Gerncross, T.U. (1999). Biocommodity Engineering. *Biotechnology Progress*. pp. 777-793.
- Mandels, M., Hontz, L. e Nystrom, J. (1974). Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechnol Bioeng* 16, 1471-1493.

- Manzanares, P., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cara, C., Castro, E. e Ruiz, E. (2011). Different process configurations for bioethanol production from pretreated olive pruning biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 881-887.
- Martín, C., Thomsen, M.H., Hauggaard-Nielsen, H. e Belinda Thomsen, A. (2008). Wet oxidation pretreatment, enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of clover-ryegrass mixtures. *Bioresource Technology* 99, 8777-8782.
- Mendes, D.M. (2011). Portugal Biofuels Standing Report. In *GAIN Report - Global Agricultural Information Network* (U.F.A. Service, ed.).
- Mikkonen, K.S. e Tenkanen, M. (2012). Sustainable food-packaging materials based on future biorefinery products: Xylans and mannans. *Trends in Food Science & Technology* 28, 90-102.
- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* Vol.31(3), pp.426-428.
- Mirahmadi, K., Kabir, M.M., Jeihanipour, A., Karimi, K. e Taherzadeh, M.J. (2010). Alkaline pretreatment of spruce and birch to improve bioethanol and biogas production. *BioResources* 5, 928-938.
- Modenbach, A.A. e Nokes, S.E. (2012). The use of high-solids loadings in biomass pretreatment—a review. (Hoboken). pp. 1430-1442.
- Mohsenzadeh, A., Jeihanipour, A., Karimi, K. e Taherzadeh, M.J. (2012). Alkali pretreatment of softwood spruce and hardwood birch by NaOH/thiourea, NaOH/urea, NaOH/urea/thiourea, and NaOH/PEG to improve ethanol and biogas production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 87, 1209-1214.
- Monavari, S., Bennato, A., Galbe, M. e Zacchi, G. (2010). Improved One-Step Steam Pretreatment of SO₂-Impregnated Softwood with Time-Dependent Temperature Profile for Ethanol Production. *Biotechnol. Prog.* 26, 1054-1060.
- Monavari, S., Galbe, M. e Zacchi, G. (2011). Influence of impregnation with lactic acid on sugar yields from steam pretreatment of sugarcane bagasse and spruce, for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy* 35, 3115-3122.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. e Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96, 673-686.
- Muhammad, I., Muhammad, G., Sajjad, A., Quratualain, S., Muhammad, N. e Shahjahan, B. (2011). Effect of various pretreatment conditions on enzymatic saccharification. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 33, 397.

Netto, J. (2008). Potencial da biomassa florestal residual para fins energéticos de três concelhos do distrito de Santarém. Tese de Mestrado. Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Lisboa - Portugal.

Nikolic, S., Mojovic, L., Rakin, M., Pejin, D. e Pejin, J. (2010). Ultrasound-assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal. Food Chem. 122, 216-222.

Nomenclature Committee of International Union of Biochemistry (1978). Units of Enzyme Activity. Recommendations 1978. Eur. J. Biochem 97, 319-320.

OCDE (2011). Relatórios de desempenho ambiental de Portugal pela OCDE. [consultado 25-06-2013]. Disponível em: www.oecd.org/env/countryreviews/Portugal.

OECD-FAO (2011). Agricultural Outlook 2011-2020, OECD-FAO, ed., pp. 77-93.

Ogeda, T.L. e Petri, D.F. (2010). Hidrólise Enzimática de Biomassa. In Química Nova. pp. 1549-1558.

Olint (2013). Sistema olival superintensivo. [consultado 24-06-2013]. Disponível em: <http://www.olint.com/es/es/Sistema%20superintensivo>

Olofsson, K., Palmqvist, B. e Liden, G. (2010). Improving simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated wheat straw using both enzyme and substrate feeding. Research Report. Biotechnology for Biofuels 3, 17.

Ouyang, J., Dong, Z., Song, X., Lee, X., Chen, M. e Yong, Q. (2010). Improved enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose (Avicel PH101) by polyethylene glycol addition. Bioresource Technology 101, 6685-6691.

Pan, X., Xie, D., Gilkes, N., Gregg, D.J. e Saddler, J.N. (2005). Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. Applied Biochemistry and Biotechnology 122, 1069.

Panagiotou, G.L.O. (2007). Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. Biotechnology and bioengineering Vol.96(2), 250-258.

Panagiotopoulos, I.A., Bakker, R.R., de Vrije, T. e Koukios, E.G. (2011). Effect of pretreatment severity on the conversion of barley straw to fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. Bioresource Technology 102, 11204-11211.

Park, J.W., Takahata, Y., Kajiuchi, T. e Akehata, T. (1992). Effects of nonionic surfactant on enzymatic hydrolysis of used newspaper. Biotechnology and Bioengineering 39, 117-120.

Park, Y.C. e Kim, J.S. (2012). Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass. *Energy* 47, 31-35.

Pei, H., Liu, L., Zhang, X. e Sun, J. (2012). Flow-through pretreatment with strongly acidic electrolyzed water for hemicellulose removal and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology* 110, 292-296.

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

Pryor, S.W., Karki, B. e Nahar, N. (2012). Effect of hemicellulase addition during enzymatic hydrolysis of switchgrass pretreated by soaking in aqueous ammonia. *Bioresour. Technol.* 123, 620-626.

Pu, Y.Q., Zhang, D.C., Singh, P.M. e Ragauskas, A.J. (2008). The new forestry biofuels sector. In *Biofuels Bioprod. Biorefining*. pp. 58-73.

Pérez-Bonilla, M., Salido, S., van Beek, T.A., Linares-Palomino, P.J., Altarejos, J., Nogueras, M. e Sánchez, A. (2006). Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europaea*) wood. *Journal of Chromatography A* 1112, 311-318.

Qiu, Z., Aita, G.M. e Walker, M.S. (2012). Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. *Bioresource Technology* 117, 251-256.

Rabelo, S., Filho, R. e Costa, A. (2008). A Comparison Between Lime and Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreatments of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production. Part A: *Enzyme Engineering and Biotechnology* 144, 87-100.

Rafiqul, I.S.M. e Sakinah, A.M.M. (2012). Design of process parameters for the production of xylose from wood sawdust. *Chemical Engineering Research and Design* 90, 1307-1312.

Rajvanshi, A.K. (1986). Biomass Gasification In *Alternative Energy in Agriculture*, D.Y. Goswami, ed. (CRC Press), pp. 83-102.

Ramos, L., Breuil, C., Saddler, J., Breuil, P., Saddler, C. e Saddler, N. (1992). Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. Part A: *Enzyme Engineering and Biotechnology* 34, 37-48.

Requejo, A., Peleteiro, S., Rodriguez, A., Garrote, G. e Parajo, J.C. (2011). Second-Generation Bioethanol from Residual Woody Biomass. *Energy Fuels* 25, 4803-4810.

Rodríguez-Chong, A., Alberto Ramírez, J., Garrote, G. e Vázquez, M. (2004). Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *Journal of Food Engineering* 61, 143-152.

Rollin, J.A., Zhu, Z.G., Sathitsuksanoh, N. e Zhang, Y.H.P. (2011). Increasing Cellulose Accessibility Is More Important Than Removing Lignin: A Comparison of Cellulose Solvent-Based Lignocellulose Fractionation and Soaking in Aqueous Ammonia. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 22-30.

Romaní, A., Garrote, G., Alonso, J.L. e Parajó, J.C. (2010). Bioethanol production from hydrothermally pretreated *Eucalyptus globulus* wood. *Bioresource Technology* 101, 8706-8712.

Ruiz, E., Cara, C., Ballesteros, M., Manzanares, P., Ballesteros, I. e Castro, E. (2006). Ethanol production from pretreated olive tree wood and sunflower stalks by an SSF process. *Applied biochemistry and biotechnology* 129-132, 631.

Saha, B.C. (2000). α -l-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 403-423.

Saha, B.C. e Cotta, M.A. (2006). Ethanol Production from Alkaline Peroxide Pretreated Enzymatically Saccharified Wheat Straw. *Biotechnology Progress* 22, 449-453.

Salvachua, D., Prieto, A., Lopez-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martinez, A.T. e Martinez, M.J. (2011). Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresour. Technol.* 102, 7500-7506.

Sannigrahi, P., Hu, F., Pu, Y. e Ragauskas, A. (2012). A Novel Oxidative Pretreatment of Loblolly Pine, Sweetgum, and Miscanthus by Ozone. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 32, 361-375.

Sathitsuksanoh, N., Zhu, Z.G. e Zhang, Y.H.P. (2012). Cellulose solvent- and organic solvent-based lignocellulose fractionation enabled efficient sugar release from a variety of lignocellulosic feedstocks. *Bioresour. Technol.* 117, 228-233.

Schwarze, F.W.M.R. (2007). Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews* 21, 133-170.

Shen, J. e Wyman, C.E. (2011). A novel mechanism and kinetic model to explain enhanced xylose yields from dilute sulfuric acid compared to hydrothermal pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology* 102, 9111-9120.

Shuai, L., Yang, Q., Zhu, J.Y., Lu, F.C., Weimer, P.J., Ralph, J. e Pan, X.J. (2010). Comparative study of SPORL and dilute- acid pretreatments of spruce for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology* 101, 3106-3114.

Sidiras, D., Batzias, F., Ranjan, R. e Tsapatsis, M. (2011). Simulation and optimization of batch autohydrolysis of wheat straw to monosaccharides and oligosaccharides. *Bioresource Technology* 102, 10486-10492.

Sills, D.L. e Gossett, J.M. (2011). Assessment of commercial hemicellulases for saccharification of alkaline pretreated perennial biomass. *Bioresour. Technol.* 102, 1389-1398.

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

Sims, R., Taylor, R., Saddler, J. e Mabee, W. (2008). From 1st to 2st Generation Biofuels Technologies - An overview of current industries and RD&D activities (OECD/IEA).

Sipos, B., Dienes, D., Schleicher, A., Perazzini, R., Crestini, C., Siika - Aho, M. e Reczey, K. (2010). Hydrolysis efficiency and enzyme adsorption on steam-pretreated spruce in the presence of poly(ethylene glycol).(Report). *Enzyme and Microbial Technology* 47, 84.

Sithole, B.B., Vollstaedt, P. e Allen L.H. (1991). Comparison of Soxtec and Soxhlet systems for determining extractives content. *Tappi Journal*, 187-191.

Sjostrom, E. (1993). *Wood chemistry. Fundamentals and Applications.* (Academic Press, Inc.).ISBN: 0-12-647481-8

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. e Templeton, D. (2005a). Determination of Extractives in Biomass. In Technical Report NREL/TP-510-42619. (NREL, ed.).

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. e Templeton, D. (2005b). Determination of Ash in Biomass. In Technical Report NREL/TP-510-42622 (NREL, ed.).

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. e D. Crocker (2008a). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. In Technical Report NREL/TP-510-42618 (NREL, ed.).

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. e Templeton, D. (2008b). Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. In Technical Report NREL/TP-510-42623 (NREL, ed.).

Sodean (2004). Potencial y aprovechamiento energético de la biomasa del olivar en andalucía. [consultado 24-06-2013]. Disponível em:

http://www.madrimasd.org/citme/Biblioteca/Energias-Renovables/Downloads_GetFile.aspx?id=5475.

Souza, W.R. (2013). Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. In *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization.* Ed. Anuj K. Chandel e Silvio Silvério da Silva. ISBN 978-953-51-1119-1

- Spinelli, R., Magagnotti, N., Nati, C., Cantini, C., Sani, G., Picchi, G. e Biocca, M. (2011). Integrating olive grove maintenance and energy biomass recovery with a single-pass pruning and harvesting machine. *Biomass and Bioenergy* 35, 808-813.
- Srinivasan, N. e Ju, L.K. (2011). Pretreatment of guayule biomass using supercritical carbon dioxide-based method. *Bioresour. Technol.* 101, 9785-9791.
- Stewart, J.J., Akiyama, T., Chapple, C., Ralph, J. e Mansfield, S.D. (2009). The Effects on Lignin Structure of Overexpression of Ferulate 5-Hydroxylase in Hybrid Poplar. *Plant Physiology* 150, 621-635.
- Sun, J.X., Mao, F.C., Sun, X.F. e Sun, R.C. (2007). Comparative study of hemicelluloses isolated with alkaline peroxide from lignocellulosic materials. *J. Wood Chem. Technol.* 24, 239-262.
- Sun, R.C. (2010). Cereal straw as resource for sustainable biomaterials and biofuels. *Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose*. ISBN: 978-0-444-53234-3. Elsevier
- Sun, R.-c., Sun, R.-C., Sun, X.-F. e Lu, Q. (2010). Analysis of Lignins Solubilized in Two-Stage Organosolv and Alkaline Peroxide Treatments from *Haloxylon ammodendron* and *Elaeagnus angustifolia*. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* 7, 244-262.
- Sun, R.C., Sun, X.F., Fowler, P. e Tomkinson, J. (2002). Structural and physico-chemical characterization of lignins solubilized during alkaline peroxide treatment of barley straw. *European Polymer Journal* 38, 1399-1407.
- Sun, Y. e Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83, 1-11.
- Sun, Y. e Cheng, J. (2003). Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. *ChemInform* 34.
- Suriyachai, N., Weerasaia, K., Laosiripojana, N., Champreda, V. e Unrean, P. (2013). Optimized simultaneous saccharification and co-fermentation of rice straw for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitisco*-culture using design of experiments. *Bioresource Technology* 142, 171-178.
- Taamalli, A., Arráez-Román, D., Barraón-Catalán, E., Ruiz-Torres, V., Pérez-Sánchez, A., Herrero, M., Ibañez, E., Micol, V., Zarrouk, M. e Segura-Carretero, A. (2012). Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 50, 1817-1825.

Tabil, L., Adapa, P. e Kashaninejad, M. (2011). Biomass Feedstock Pre Processing - Part 1: Pre-Treatment. In *Biofuel's Engineering Process Technology*, I. Ed. Intechopen Europe. ISBN 978-953-307-480-1

Tabka, M.G., Herpoel-Gimbert, I., Monod, F., Asther, M. e Sigoillot, J. C. (2006). Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 897-902.

Taherzadeh, M.J. e Karimi, K. (2008). Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 9, 1621-1651

Tomás-pejó, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M. e Olsson, L. (2008). Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and Bioengineering* 100, 1122-1131.

Torget, R., Walter, P., Himmel, M. e Grohmann, K. (1991). Dilute- Acid Pretreatment of Corn Residues and Short-Rotation Woody Crops. Part A: *Enzyme Engineering and Biotechnology* 28, 75-86.

UE (2006). Estrat gia da União Europeia no dom nio dos biocombustíveis (UE). *Jornal Oficial da União Europeia*.

Wan, C.X., Zhou, Y.G. e Li, Y.B. (2011). Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. *Bioresour. Technol.* 102, 6254-6259.

Wang, B., Wang, X. e Feng, H. (2010). Deconstructing recalcitrant *Miscanthus* with alkaline peroxide and electrolyzed water. *Bioresource Technology* 101, 752-760.

Wang, H., Mochizuki, K., Kobayashi, S., Hiraide, H., Wang, X. e Cui, Z. (2013). Effect of Bovine Serum Albumin (BSA) on Enzymatic Cellulose Hydrolysis. Part A: *Enzyme Engineering and Biotechnology* 170, 541-551.

Wang, Z., Li, R., Xu, J., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Qu, R. e Cheng, J.J. (2012). Sodium hydroxide pretreatment of genetically modified switchgrass for improved enzymatic release of sugars. *Bioresource Technology* 110, 364-370.

Wei, W., Wu, S. e Liu, L. (2012). Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated eucalyptus chips for fermentable sugar production. *Bioresource Technology* 110, 302-307.

Wood, T.M. e Bhat, K.M. (1988). "Measurement for measuring cellulase activities." In *Methods in Enzymology: Biomass cellulose and hemicellulose Part A*. Ed. Wood W.A. e Kellogg S.T., Volume 160, pp 87-113, Academic Press, New York. ISBN: 0-12-182061-0

World Bank (2013). Crude oil average. [consultado 26-06-2013]. Disponível em: <http://www.mongabay.com/commodities/prices/>.

Wu, L., Arakane, M., Ike, M., Wada, M., Takai, T., Gau, M. e Tokuyasu, K. (2011). Low temperature alkali pretreatment for improving enzymatic digestibility of sweet sorghum bagasse for ethanol production. *Bioresource Technology* 102, 4793-4799.

Wyman, C.E. (2007). What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. In *Trends Biotechnol.* pp. 153-157.

Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R. e Lee, Y.Y. (2005). Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology* 96, 1959-1966.

Xu, J., Cheng, J., Sharma-Shivappa, R. e Burns, J. (2010). Sodium Hydroxide Pretreatment of Switchgrass for Ethanol Production. *Energy Fuels*, 24 (3), 2113-2119

Yachemenev, V., Condon, B., Klasson, T. e Lambert, A. (2009). Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse celluloses by low intensity uniform ultrasound. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 3, 25-31.

Yang, B., Boussaid, A., Mansfield, S.D., Gregg, D.J. e Saddler, J.N. (2002). Fast and efficient alkaline peroxide treatment to enhance the enzymatic digestibility of steam-exploded softwood substrates. *Biotechnology and Bioengineering* 77, 678-684.

Yang, B. e Wyman, C.E. (2006). BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnology and bioengineering* 94, 611.

Yang, B. e Wyman, C.E. (2008). Pretreatment: the key to unlocking low- cost cellulosic ethanol. *Bioprod. Bioref.* 2, 26-40

Yat, S.C., Berger, A. e Shonnard, D.R. (2008). Kinetic characterization for dilute sulfuric acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass. *Bioresource Technology* 99, 3855-3863.

Yoo, C.G., Lee, C.W. e Kim, T.H. (2011). Two-Stage Fractionation of Corn Stover Using Aqueous Ammonia and Hot Water. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 729-740.

Yu, Z., Jameel, H., Chang, H.M. e Park, S. (2011). The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology* 102, 9083-9089.

Zbidi, H., Salido, S., Altarejos, J., Perez-Bonilla, M., Bartegi, A., Rosado, J.A. e Salido, G.M. (2009). Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 42, 279-285.

Zhang, Q.Z. e Cai, W.M. (2008). Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3. *Biomass and Bioenergy* 32, 1130-1135

- Zhang, R., Lu, X.B., Sun, Y.S., Wang, X.Y. e Zhang, S.T. (2011). Modeling and optimization of dilute nitric acid hydrolysis on corn stover. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 306-314.
- Zhang, Y. e Chen, H. (2012). Multiscale modeling of biomass pretreatment for optimization of steam explosion conditions. *Chemical Engineering Science* 75, 177-182.
- Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R. e Zhang, Y.-H.P. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering* 88, 797.
- Zheng, Y., Pan, Z. e Zhang, R. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int J Agri & Biol Eng* 2 (3), 51-67
- Zhou, L.W. e Dai, Y.-C. (2012). Recognizing ecological patterns of wood-decaying polypores on gymnosperm and angiosperm trees in northeast China. *Fungal Ecology* 5, 230-235.
- Zhu, J.Y. e Pan, X.J. (2010). Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. *Bioresource Technology* 101, 4992-5002.
- Zhu, J.Y., Pan, X.J., Wang, G.S. e Gleisner, R. (2009). Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. *Bioresource Technology* 100, 2411-2418.