



**CLORETO DE (2-CLOROETIL) TRIMETILAMÓNIO**

**GLICEROL**

**CELLIC CTEC2**

**BIORREFINARIA**

**INTEGRADA**

**CARBONATO DE POTÁSSIO**

**ÁCIDO LÁCTICO**

**SACCHAROMYCES CEREVISAE ATCC 26602**



Ana Raquel Raimundo Fernandes

# Valorização de uma espécie arbórea infestante por extração de lenhina com solventes de baixo impacte ambiental

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, apresentada ao

Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Ana Raquel Raimundo Fernandes

# Valorização de uma espécie arbórea infestante por extração de lenhina com solventes de baixo impacte ambiental

Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

## **SUPERVISORES:**

Professora Doutora Maria da Graça Videira Sousa Carvalho

Professor Doutor Jorge Manuel dos Santos Rocha

## **INSTITUIÇÕES:**

Dep. Eng. Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

CIEPQPF – Centro de Investigação em Eng. Processos Químicos e dos Produtos da Floresta

Coimbra, 2016



*“ (...) Também eu vou  
Em busca da luz  
Saio daqui  
Onde a sombra seduz*

*Também eu estou  
À espera de mim  
Algo me diz  
Que a tormenta passará*

*É preciso perder  
Para depois se ganhar  
E mesmo sem ver  
Acreditar! (...)”*

*Melhor de Mim, Mariza  
Compositor: Ângelo César Firmino*



## **AGRADECIMENTOS**

O trabalho desenvolvido ao longo dos últimos meses só foi possível graças ao apoio que recebi por algumas pessoas, porque não existe um trabalho individual, e às quais não podia de deixar aqui o meu profundo agradecimento.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Graça Carvalho pelo tempo dedicado à supervisão do trabalho realizado, na transmissão de conhecimentos e na análise de todos os detalhes e pelas palavras de encorajamento que se revelaram num grande apoio nesta etapa académica.

Um grande agradecimento ao Professor Doutor Jorge Rocha e ao Professor Doutor Abel Ferreira pela sua orientação e ajuda ao longo da investigação.

À Engenheira Mestre Ana Moura pela disponibilidade e partilhar de informação fundamentais em todo o trabalho, além do carinho e incentivo que sempre me demonstrou.

Também à Engenheira Mestre Cátia Mendes pelos ensinamentos que se revelaram fundamentais e pela amabilidade com que sempre me recebeu para interpretar resultados/problemas ao longo da investigação.

Aos meus pais, que me deram asas para voar. Obrigada por estarem sempre presentes, por me ouvirem, encorajarem e acreditarem nas minhas capacidades. Sem vocês, nada teria sido possível.

Ao Carlos, por tudo o que és para mim. Obrigada pelo carinho, força e incentivo que me deste todos os dias para alcançar os meus objetivos ao longo destes anos.

Aos meus amigos, em especial à Cátia Alves e ao João Baeta pelos momentos de descontração que me proporcionaram para ganhar forças. À Diana Travassos e ao João Miguel pelas palavras de incentivo na hora certa. À Marta Batista, pela sua amizade, companheirismo e pelos momentos que partilhámos. Ao Tiago Tomás e ao David Gomes por todos os momentos partilhados nesta aventura académica. Ao Pedro Bento e ao João Lapo por se terem tornado parte da família.

A todos o meu sincero agradecimento.





## RESUMO

Um dos objetivos que permitem alcançar a sustentabilidade é a diminuição das necessidades energéticas baseadas em recursos fósseis privilegiando-se a utilização de recursos renováveis. A obtenção de biocombustíveis, como o bioetanol, a partir de biomassa lenhocelulósica é uma das soluções possíveis, que tem como premissa a biorrefinaria integrada.

A obtenção de etanol é conseguida em quatro etapas: o pré-tratamento da biomassa, a hidrólise (ou sacarificação) dos polissacarídeos em açúcares, a fermentação dos açúcares em etanol e a sua purificação. O pré-tratamento da biomassa com líquidos de baixa temperatura transição vítrea ou de baixa temperatura eutéctica (líquidos LTTM) é ainda recente, permitindo a extração seletiva da lenhina da matriz lenhocelulósica, sem que ocorra degradação dos polissacarídeos de interesse para as etapas seguintes. Uma vez que a lenhina extraída se encontra numa forma bastante próxima à lenhina no seu estado natural, o seu potencial de valorização é elevado. Os líquidos LTTM são formados a partir de um dador e um aceitador de ligações de hidrogénio que, por norma, são reagentes de baixo impacto ambiental, ao contrário dos reagentes comumente utilizados.

O estudo efetuado nesta dissertação focou-se no pré-tratamento de madeira de *Acacia dealbata* (Mimosa, com 27,4% de lenhina) com dois líquidos LTTM diferentes: (a) líquido GCP formado por glicerol e carbonato de potássio, tendo sido testadas quatro proporções molares distintas – 20:1, 50:1, 100:1 e 200:1; (b) líquido LCCETMA formado por ácido láctico e cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio, onde as proporções 5:1 e 100:1 foram testadas. Procedeu-se depois à hidrólise enzimática do material pré-tratado com a Cellic CTec2 e subsequente fermentação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 266002.

Relativamente ao pré-tratamento com o líquido GCP, verificou-se que o maior rendimento de dissolução (17,7% da madeira) foi alcançado pela proporção 50:1, permitindo a extração de 7,9% da lenhina (base madeira). Realizaram-se dois ciclos de pré-tratamento com o objetivo de aumentar a dissolução. Contudo, o seu efeito no aumento de dissolução da lenhina não se revelou significativo face ao consumo energético e de reagentes necessários. Procedeu-se ainda ao estudo da cinética de dissolução da lenhina usando o líquido [GCP 50:1]. Apesar de um aumento contínuo da dissolução da madeira com o tempo, verificou-se que após 10h de pré-tratamento a seletividade de dissolução da lenhina diminuía.

Na etapa da hidrólise enzimática da madeira pré-tratada atingiu-se uma concentração de açúcares nos hidrolisados após 24h de hidrólise 50% maior que a obtida na hidrólise da madeira

*in natura* com a mesma carga enzimática. Este resultado permitiu alcançar um rendimento em etanol de 43,1% após 6h de fermentação e uma produtividade em etanol de 0,58 g.(L.h)<sup>-1</sup>.

O rendimento de dissolução após o pré-tratamento com o líquido LCCETMA foi inferior ao alcançado com o pré-tratamento com o GCP, mas mais seletivo, dado que até 88% da madeira dissolvida correspondia a lenhina. Estudou-se ainda a influência do aumento da severidade das condições operatórias – um e dois ciclos a 80 °C – sendo este acompanhado pelo aumento do rendimento de dissolução atingido bem como da lenhina dissolvida. Contudo, verificou-se que a seletividade é potenciada por condições de operação menos severas. A hidrólise e fermentação do material pré-tratado com LCCETMA levou à obtenção de rendimentos inferiores aos da madeira *in natura*, o que pode dever-se à presença de compostos inibidores na matriz lenhocelulósica, como o ácido láctico proveniente do líquido de dissolução.

Na tentativa de precipitar a lenhina dissolvida nos líquidos LTTM obtiveram-se dois comportamentos distintos, verificando-se rendimentos de precipitação relativamente baixos para um ciclo de pré-tratamento com GCP, quer usando uma solução de água e acetona como anti-solvente, quer usando ácido sulfúrico. Pelo contrário, a precipitação de lenhina dissolvida no líquido LCCETMA, levou à obtenção de rendimentos bastante superiores independentemente do anti-solvente, variando entre 72 e 95%.

**Palavras-chave:** líquidos LTTM, biomassa lenhocelulósica, biorrefinaria, pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação.

## ABSTRACT

One of the objectives that enable achieving sustainability is the reduction of energy needs based on fossil resources favoring the use of renewable resources. The production of biofuels, such as bioethanol, from lignocellulosic biomass is one possible solution, which has its premise on the integrated biorefinery.

The production of ethanol is achieved in four stages: pretreatment of lignocellulosic biomass, hydrolysis (or saccharification) of the polysaccharides into sugars, fermentation of sugars into ethanol and its purification. The pretreatment of biomass with low-transition-temperature mixture or deep eutectic solvents (LTTM liquid) is recent, allowing selective extraction of lignin from the lignocellulosic matrix, without the occurrence of degradation of polysaccharides of interest for the following steps. Since the extracted lignin is similar to the lignin in its natural state, its growth potential is high. The LTTM liquids are formed from a donor and an acceptor of hydrogen bonds, that normally are of low environmental impact reagents, unlike the commonly used reagents.

The study made in this work is focused on the pretreatment of *Acacia dealbata* wood (Mimosa, with 27.4% lignin) with two different LTTM liquids: (a) GCP liquid formed by glycerol and potassium carbonate, that was tested with four different molar ratios – 20:1, 50:1, 100:1 and 200:1; (b) LCCETMA liquid formed by lactic acid and (2-chloroethyl)trimethylammonium chloride, where the proportions 5:1 and 10:1 were tested. The enzymatic hydrolysis of the pretreated material with Cellic CTec2 and the subsequent fermentation with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 266002 were also performed.

In relation to the pretreatment with GCP liquid, it was found that the highest yield of dissolution (17.7% of the wood) has been reached by the liquid with molar ratio 50:1, allowing the extraction of lignin 7.9% (wood based). Two cycles of pretreatment were performed with the aim of increasing the dissolution rate. However, its effect in increasing the lignin dissolution was not significant compared to the energy consumption and the amount of reagents that will be needed. The study of the kinetics of lignin dissolution using [GCP 50:1] liquid was accomplished. Although a continuous increase of wood dissolution was observed over time, it was found that after 10 h of pretreatment the selectivity of lignin dissolution decreased.

When carrying out the enzymatic hydrolysis of pretreated wood, a concentration of sugars in the hydrolysates was 50% higher than that obtained in the hydrolysis of non-treated wood, with

the same enzyme loading, after 24 hours of hydrolysis. This result allowed achieving an ethanol yield of 43.1% and an ethanol productivity of  $0.58 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  after 6 hours of fermentation.

When the pretreatment with LCCETMA liquid was performed, it was found that the yield of dissolution was lower than that achieved by pretreatment with GCP, yet more selective, since up to 88% of the dissolved wood corresponded to lignin.

The influence of the increased severity of operating conditions - one and two cycles at  $80^\circ \text{C}$  - was also studied. Increased severity was accompanied by increased dissolution yield as well as the amount of dissolved lignin. However, it was concluded that the selectivity is enhanced for less severe operating conditions.

The next step was the hydrolysis and fermentation of pretreated material with LCCETMA verifying that the obtained yields were below the non-treated wood, which may be due to the presence of inhibitory compounds in the lignocellulosic matrix, such as lactic acid from the dissolving liquid.

In attempt to precipitate the dissolved lignin in LTTM liquids two different behaviors were observed. The amount of precipitated lignin in GCP liquids was very low, whether a solution of water and acetone as anti-solvent was used, or using sulfuric acid. In contrast, the precipitation of lignin dissolved in LCCETMA liquids led to higher yields quite independently of the anti-solvent used ranging between 72 and 95%.

**Key-words:** LTTM liquids, lignocellulosic biomass, biorrefinery, pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation.

# ÍNDICE

Agradecimentos .....	vii
Resumo .....	ix
Abstract.....	xi
Índice de Figuras .....	xvii
Índice de Tabelas .....	xxi
Nomenclatura.....	xxv
1. Introdução.....	1
1.1. Âmbito e Motivação .....	1
1.2. Objetivos .....	3
1.3. Organização da dissertação.....	3
2. Revisão Bibliográfica.....	5
2.1. Composição Química e Estrutura da Biomassa Lenhocelulósica.....	5
2.1.1. Celulose .....	5
2.1.2. Hemiceluloses.....	6
2.1.3. Lenhina .....	8
2.1.4. Substâncias de Baixo Peso Molecular .....	10
2.1.5. Estrutura .....	10
2.1.6. Matéria-Prima: Acacia dealbata .....	13
2.2. Bioetanol – Combustível do Futuro.....	14
2.3. Biorrefinaria Integrada – Conversão de Biomassa Lenhocelulósica em Etanol.....	17
2.3.1. Tecnologias de Pré-Tratamento.....	17
2.3.2. Pré-tratamento com Líquidos Iônicos/Solventes de Baixo Ponto Eutético .....	27
2.3.3. Hidrólise e Fermentação de Materiais Lenhocelulósicos Pré-Tratados .....	32
3. Materiais e Métodos .....	39
3.1. Materiais e Equipamentos.....	39
3.1.1. Madeira de Acacia dealbata.....	39
3.1.2. Reagentes.....	40
3.1.3. Equipamentos e Outros Materiais de Laboratório.....	41

3.2.	Procedimento Experimental.....	42
3.2.1.	Preparação dos Líquidos LTTM.....	44
3.2.2.	Dissolução da Madeira .....	44
3.2.3.	Determinação de Lenhina e dos Monossacarídeos no Material Não Dissolvido.....	46
3.2.4.	Precipitação de Lenhina no Material Dissolvido.....	46
3.2.5.	Hidrólise Enzimática do Material Não Dissolvido e Fermentação .....	47
4.	Análise e Discussão de Resultados .....	51
4.1.	Pré-tratamento de <i>Acacia dealbata</i> com GCP .....	51
4.1.1.	Um Ciclo de Pré-Tratamento.....	51
4.1.2.	Dois Ciclos de Pré-Tratamento.....	54
4.1.3.	Estudo da Cinética de Dissolução do [GCP 50:1].....	57
4.1.4.	Precipitação da Lenhina Dissolvida .....	58
4.2.	Pré-tratamento de <i>Acacia dealbata</i> com LCCETMA.....	59
4.2.1.	Um Ciclo de Pré-Tratamento.....	60
4.2.2.	Estudo do Efeito das Condições de Operação no Pré-tratamento com [LCCETMA 10:1] .....	61
4.2.3.	Precipitação da Lenhina Dissolvida .....	63
4.3.	Hidrólise e Fermentação de Materiais Lenhocelulósicos .....	64
4.3.1.	Hidrólise e Fermentação de <i>Acacia dealbata</i> .....	64
4.3.2.	Hidrólise e fermentação do Material Não Dissolvido Resultante de Um Ciclo de Pré-tratamento com GCP .....	66
4.3.3.	Hidrólise e fermentação do Material Não Dissolvido Resultante do Pré-tratamento com [GCP 50:1] em Dois Ciclos de Extração.....	69
4.3.4.	Hidrólise e fermentação do Material Não Dissolvido Resultante de Um Ciclo de Pré-tratamento com LCCETMA .....	71
4.3.5.	Hidrólise do Material Não Dissolvido Resultante do Pré-tratamento com [LCCETMA 10:1] em Dois Ciclos de Extração .....	73

5. Conclusões .....	75
6. Bibliografia.....	79
Anexos .....	85
Anexo I – Metodologias Experimentais .....	87
Anexo II – Ensaio Preliminares .....	94
Anexo III – Resultados Completos da Determinação da Lenhina e Monossacarídeos .....	96
Anexo IV – Ensaio de Hidrólise e Fermentação dos Materiais Lenhocelulósicos: Análises Realizadas em HPLC .....	99





## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema geral da composição da madeira (Carvalho 1999, Fengel e Wegener 1984). .....	5
<b>Figura 2.</b> Estrutura da celulose (adaptado de Sjöström 1993).....	6
<b>Figura 3.</b> Estrutura principal da galactoglucomana, com representação da proporção molar das suas unidades, onde, Glcp: glucopirranose, Manp: manopirose, Galp: galactopirranose e Ac: grupo acetilo (adaptado de Ek et al., 2009). ....	7
<b>Figura 4.</b> Estrutura principal da glucuronoxilana, com representação da proporção molar das suas unidades, onde, Xlyp: $\beta$ -D-xilopirranose, Me-GlcpA: ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucopirranose-urónico e Ac: grupo acetilo (Ek et al., 2009).....	8
<b>Figura 5.</b> Fragmento de lenhina com diversas ligações C-O e C-C tipicamente presentes na lenhina nativa (Brandt et al., 2013). ....	8
<b>Figura 6.</b> Os três monómeros a partir da qual a lenhina é sintetizada, e as respetivas subunidades após a síntese (adaptado de Brandt et al., 2013).....	9
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática da anatomia de um pinheiro (adaptado de Ek et al., 2009).....	11
<b>Figura 8. a)</b> Estrutura simplificada de uma célula, sendo perceptível a lamela média (ML), a parede primária (P), as paredes secundárias (S1, S3 e S3) e lúmen (W); <b>b)</b> secção transversal de um traqueído (adaptado de Sjöström 1993).....	12
<b>Figura 9.</b> Conversão da matéria-prima de primeira e segunda geração em etanol pela via fermentativa (adaptado de Brandt et al., 2013). ....	16
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática do papel do pré-tratamento na conversão da biomassa em combustível (adaptado de Kumar et al., 2009).....	18
<b>Figura 11.</b> Estrutura típica de HBAs e HBDs usados na síntese de DES (Zhang et al., 2012). .....	28
<b>Figura 12.</b> Visão simplificada dos fatores que afetam a hidrólise eficiente da celulose. 1. Inibição da $\beta$ -glucosidase e celobiohidrolase pela glucose e celobiose, respetivamente; 2. Ligação improdutiva da celobiohidrolase à cadeia de celulose; 3 – 4. Hemiceluloses e lenhina associadas às microfibrilas impedindo a o acesso das celulasas à superfície da celulose; 5. Enzimas adsorvidas na superfície da lenhina; 6. Desnaturação ou perda de atividade enzimática	

devido a forças de cisalhamento, atividade proteolítica ou baixa termoestabilidade (adaptado de Jørgensen et al., 2007). .....	34
<b>Figura 13. a)</b> Acacia dealbata em formato de estilha; <b>b)</b> Fração de Acacia dealbata moída. .	40
<b>Figura 14.</b> Equipamento necessário: <b>a)</b> dissolução da madeira; <b>b)</b> hidrólise do material não dissolvido; <b>c)</b> fermentação do hidrolisado obtido. ....	42
<b>Figura 15.</b> Esquema do procedimento experimental. ....	43
<b>Figura 16.</b> Líquidos LTTM obtidos e usados nos ensaios de dissolução. ....	44
<b>Figura 17.</b> Ensaio E30: <b>a)</b> mistura madeira e [GCP 20:1] inicial; <b>b)</b> mistura madeira e [GCP 20:1] após o pré-tratamento. ....	51
<b>Figura 18.</b> Rendimento de dissolução e lenhina dissolvida com o pré-tratamento de Acacia dealbata com diferentes composições de GCP. ....	53
<b>Figura 19.</b> Ensaio E26: <b>a)</b> mistura madeira e [GCP 20:1] após um ciclo de pré-tratamento; <b>b)</b> mistura material não dissolvido e [GCP 20:1] após o segundo ciclo de pré-tratamento. ....	54
<b>Figura 20.</b> Rendimento de dissolução e lenhina dissolvida com dois ciclos de pré-tratamento de Acacia dealbata com diferentes composições de GCP. ....	56
<b>Figura 21.</b> Resultados da dissolução obtidos com o pré-tratamento de [GCP 50:1] a 80 °C e a 700 rpm, com diferentes tempos de operação. ....	58
<b>Figura 22.</b> Lenhina dissolvida com o pré-tratamento de [GCP 50:1] a 80 °C e a 700 rpm, com diferentes tempos de operação. ....	58
<b>Figura 23.</b> Ensaio E32: mistura de madeira e [LCCETMA 5:1] após um ciclo de pré-tratamento. ....	61
<b>Figura 24.</b> Rendimento de dissolução e lenhina dissolvida com um ciclo de pré-tratamento de Acacia dealbata com diferentes composições de LCCETMA. ....	61
<b>Figura 25.</b> Lenhina dissolvida com o pré-tratamento com [LCCETMA 10:1] sob diferentes condições operatórias. ....	63
<b>Figura 26. a)</b> Ensaio de hidrólise; <b>b)</b> Ensaio de fermentação. ....	64
<b>Figura 27.</b> Composição percentual dos hidrolisados em açúcares, ao longo do tempo de hidrólise da Acacia dealbata: celobiose, glucose e outros açúcares (xilose, galactose, manose e arabinose). ....	65

<b>Figura 28.</b> Concentração de açúcares do caldo de fermentação ao longo do tempo de fermentação de Ad1 e Ad2. ....	66
<b>Figura 29. a)</b> Concentração de celobiose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido resultante de um ciclo de pré-tratamento com diferentes composições de GCP; <b>b)</b> Concentração de glucose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido resultante de um ciclo de pré-tratamento com diferentes composições de GCP. ....	68
<b>Figura 30.</b> Concentração do açúcares no caldo de fermentação ao longo do tempo referente aos hidrolisados do material pré-tratado com [GCP 20:1], [GCP 50:1], [GCP 100:1] e [GCP 200:1]. ....	68
<b>Figura 31. a)</b> Concentração de celobiose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido pré-tratado com [GCP 50:1]; <b>b)</b> Concentração de glucose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido pré-tratado com [GCP 50:1]. ....	70
<b>Figura 32.</b> Concentração de açúcares no caldo de fermentação ao longo do tempo referente aos hidrolisados do material não dissolvido pré-tratado sob um e dois ciclos com [GCP 50:1]. ....	70
<b>Figura 33. a)</b> Concentração de celobiose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido resultante de um ciclo de pré-tratamento com diferentes composições de LCCETMA; <b>b)</b> Concentração de glucose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido resultante de um ciclo de pré-tratamento com diferentes composições de LCCETMA. ....	72
<b>Figura 34. a)</b> Concentração de celobiose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido pré-tratado sob diferentes condições operatórias com [LCCETMA 10:1]; <b>b)</b> Concentração de glucose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido pré-tratado sob diferentes condições operatórias com [LCCETMA 10:1]. ....	74
<b>Figura 35.</b> Inclinação do Erlenmeyer para sedimentação da lenhina insolúvel. ....	89
<b>Figura 36. a)</b> Hélice de metal; <b>b)</b> hélice de vidro; <b>c)</b> magnete. ....	94



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais tipos de células e respectivas funções presentes em softwood e hardwood (adaptado de Ek et al., 2009).....	12
<b>Tabela 2.</b> Lista das espécies de Acacia com potencial invasivo na Europa (adaptado de Lorenzo et al., 2009).....	13
<b>Tabela 3.</b> Dador e aceitador de ligação de hidrogénio (Marques 2015).....	31
<b>Tabela 4.</b> Comparação dos métodos de hidrólise ácida (Tahezadeh e Karimi 2007). ....	33
<b>Tabela 5.</b> Composição química de Acacia dealbata, expressa em percentagem mássica de matéria seca. ....	39
<b>Tabela 6.</b> Condições de preparação dos líquidos LTTM (Marques 2015; Naser et al., 2013). ....	44
<b>Tabela 7.</b> Resultados da dissolução obtidos com um ciclo de pré-tratamento de 16h a 80 °C e a 700 rpm com diferentes composições de GCP. ....	52
<b>Tabela 8.</b> Resultados da dissolução obtidos com dois ciclos de pré-tratamento de 16h a 80 °C e a 700 rpm com diferentes composições de GCP. ....	55
<b>Tabela 9.</b> Resultados da dissolução global obtida com dois ciclos de pré-tratamento de 16h a 80 °C e a 700 rpm com diferentes composições de GCP. ....	56
<b>Tabela 10.</b> Resultados da dissolução obtidos com o pré-tratamento de [GCP 50:1] a 80°C e a 700 rpm, com diferentes tempos de operação. ....	57
<b>Tabela 11.</b> Rendimentos de precipitação obtidos na precipitação da lenhina dissolvida resultante de um ciclo pré-tratamento com diferentes composições de GCP com uma solução de água:acetona (1:1 m/m). ....	59
<b>Tabela 12.</b> Rendimento de precipitação obtidos na precipitação da lenhina dissolvida resultante do primeiro ciclo pré-tratamento com diferentes composições de GCP com ácido sulfúrico (0,05M).....	59
<b>Tabela 13.</b> Rendimento de precipitação obtido na precipitação da lenhina dissolvida resultante do segundo ciclo pré-tratamento com diferentes composições de GCP com ácido sulfúrico (0,05M).....	59
<b>Tabela 14.</b> Resultados da dissolução obtidos com um ciclo de pré-tratamento de 16h a 65 °C e a 700 rpm com diferentes composições de LCCETMA.....	60

<b>Tabela 15.</b> Resultados da dissolução obtidos com diferentes condições operatórias – temperatura e número de ciclos de pré-tratamento – no pré-tratamento de Acacia dealbata com [LCCETMA 10:1] a 700 rpm. ....	62
<b>Tabela 16.</b> Resultados da dissolução global obtidos com diferentes condições operatórias – temperatura e número de ciclos de pré-tratamento – no pré-tratamento de Acacia dealbata com [LCCETMA 10:1] a 700 rpm. ....	62
<b>Tabela 17.</b> Rendimento de precipitação obtido na precipitação da lenhina dissolvida resultante do pré-tratamento com diferentes composições de LCCETMA. ....	63
<b>Tabela 18.</b> Concentração de açúcares no hidrolisado obtido ao longo do tempo da hidrólise enzimática a 50°C da Acacia dealbata com diferentes cargas enzimáticas 25 FPU.g <sup>-1</sup> (Ad1) e 35 FPU.g <sup>-1</sup> (Ad2) e rendimento da hidrólise. ....	65
<b>Tabela 19.</b> Rendimento e produtividade em etanol após 6h de fermentação a 30°C dos hidrolisados das amostras Ad1 e Ad2. ....	66
<b>Tabela 20.</b> Concentração de açúcares no hidrolisado obtido ao longo do tempo da hidrólise enzimática a 50°C do material não dissolvido resultante de um ciclo de pré-tratamento com diferentes composições de GCP. ....	67
<b>Tabela 21.</b> Rendimento e produtividade em etanol após 6h de fermentação a 30°C dos hidrolisados do material pré-tratado com [GCP 20:1], [GCP 50:1], [GCP 100:1] e [GCP 200:1]. ....	69
<b>Tabela 22.</b> Concentração de açúcares no hidrolisado obtido ao longo do tempo da hidrólise enzimática a 50°C do material não dissolvido pré-tratado sob um e dois ciclos com [GCP 50:1]. ....	69
<b>Tabela 23.</b> Rendimento e produtividade em etanol após 6h de fermentação a 30°C dos hidrolisados do material não dissolvido pré-tratado sob um e dois ciclos com [GCP 50:1]. ....	71
<b>Tabela 24.</b> Concentração do hidrolisado obtido ao longo do tempo da hidrólise enzimática a 50°C do material não dissolvido resultante do pré-tratamento com diferentes composições de LCCETMA. ....	71
<b>Tabela 25.</b> Rendimento e produtividade em etanol após 6h de fermentação a 30°C dos hidrolisados do material não dissolvido resultante do pré-tratamento com diferentes composições de LCCETMA. ....	72

<b>Tabela 26.</b> Concentração do hidrolisado obtido ao longo do tempo da hidrólise enzimática a 50°C do material não dissolvido pré-tratado sob diferentes condições operatórias com [LCCETMA 10:1]. .....	73
<b>Tabela 27.</b> Especificações para análise das amostras em HPLC. ....	90
<b>Tabela 28.</b> Preparação dos ensaios de hidrólise dos materiais lenhocelulósicos.....	91
<b>Tabela 29.</b> Meio de cultura universal. ....	92
<b>Tabela 30.</b> Rendimento de dissolução em função do tipo de agitação e da composição do GCP. ....	94
<b>Tabela 31.</b> Concentração de celobiose, glucose, xilose e glicerol obtida pela análise em HPLC do hidrolisado do material não dissolvido resultante do pré-tratamento com diferentes composições de GCP. ....	95
<b>Tabela 32.</b> Determinação da lenhina na madeira de <i>Acacia dealbata</i> e no material não dissolvido resultante do pré-tratamento com os diferentes LTTMs. ....	96
<b>Tabela 33.</b> Determinação de monossacarídeos e por sua vez, polissacarídeos da madeira e do material não dissolvido resultante do pré-tratamento. ....	97
<b>Tabela 34.</b> Concentração de açúcares nohidrolisado após 6h de hidrólise enzimática obtida por análise em HPLC. ....	99
<b>Tabela 35.</b> Composição percentual dos hidrolisados em açúcares após 6h de hidrólise enzimática obtida por análise em HPLC. ....	99
<b>Tabela 36.</b> Concentração de açúcares no hidrolisado após 24h de hidrólise enzimática obtida por análise em HPLC.....	100
<b>Tabela 37.</b> Composição percentual dos hidrolisados em açúcares após 24h de hidrólise enzimática obtida por análise em HPLC. ....	100
<b>Tabela 38.</b> Cálculo do rendimento de hidrólise em glucose após 6 e 24h de hidrólise enzimática. ....	101
<b>Tabela 39.</b> Concentração de açúcares no caldo de fermentação após 6h de fermentação etanólica obtida por análise em HPLC. ....	102
<b>Tabela 40.</b> Concentração de açúcares no caldo de fermentação após 12h de fermentação etanólica obtida por análise em HPLC. ....	102

<b>Tabela 41.</b> Concentração de açúcares no caldo de fermentação após 24h de fermentação etanólica obtida por análise em HPLC. ....	103
<b>Tabela 42.</b> Rendimento e produtividade em etanol após 6h de fermentação etanólica. ....	104



## NOMENCLATURA

ABS – Absorvância

Ad1 – hidrólise enzimática de *Acacia dealbata* com 25 FPU.g<sup>-1</sup>

Ad2 – hidrólise enzimática de *Acacia dealbata* com 35 FPU.g<sup>-1</sup>

AFEX – *Ammonia fibre explosion* (Explosão de fibras com amoníaco)

CBP – *Consolidated Bioprocessing* (Bioprocessamento consolidado)

DES – *Deep Eutetic Solvent* (Solventes de Baixo Eutético)

dSSF – *simultaneous processes with delayed inoculation* (processo simultâneo com inoculação tardia)

FD – fator de diluição

EU – União Europeia

EUA – Estados Unidos da América

GEE – gás de efeito de estufa

GHG – greenhouse gas

HBA – *hydrogen-bond acceptor* (aceitador de ligação de hidrogénio)

HBD – *hydrogen-bond donor* (dador de ligação de hidrogénio)

HMF – 5-hidroximetilfurfural

HPLC – *High performance liquid chromatographic* (Cromatografia líquida de alta eficiência)

MND – material não dissolvido

SHF – Separate Hydrolysis and Fermentation (Hidrólise e Fermentação Separadas)

SSF – Simultaneous Saccharification and Fermentation (Hidrólise e Fermentação Simultâneas)

LHW – *Liquid Hot Water* (Água líquida sobreaquecida)

LI – Líquido iónico

Líquido GCP – líquido composto por glicerol e carbonato de potássio

Líquido [GCP 20:1] – líquido composto por glicerol e carbonato de potássio com a razão molar de 20:1

Líquido [GCP 50:1] – líquido composto por glicerol e carbonato de potássio com a razão molar de 50:1

Líquido [GCP 100:1] – líquido composto por glicerol e carbonato de potássio com a razão molar de 100:1

Líquido [GCP 200:1] – líquido composto por glicerol e carbonato de potássio com a razão molar de 200:1

Líquido LCCETMA – líquido composto por ácido láctico e cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio

Líquido [LCCETMA 5:1] – líquido composto por ácido láctico e cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio com a razão molar de 5:1

Líquido [LCCETMA 10:1] – líquido composto por ácido láctico e cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio com a razão molar de 10:1

LTTM – *Low-Transition-Temperature Mixture* (Líquido de baixa temperatura de transição vítrea)

$m_{ms}$  – massa de madeira seca

$m_{mh}$  – massa de madeira húmida

NADESs – *natural deep-eutetic solvents* (solvente de baixo eutético natural)

PA – *proton affinity* (afinidade do protão)

$pK_a$  – constante de acidez

rpm – rotações por minuto

RTILs – *Room Temperature Ionic Liquids* (Líquidos de Baixa Temperatura de Fusão)

(% m/m) – percentagem massa/massa

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ÂMBITO E MOTIVAÇÃO

Desde que o termo “desenvolvimento sustentável” foi dado a conhecer no Relatório de Brundtland a ideia de sustentabilidade tem sido desenvolvida e adquiriu um significado universal, com maior presença nas políticas a nível pessoal, privado, governamental e internacional. O desenvolvimento sustentável é baseado em três pilares interligados de desenvolvimento económico, responsabilidade social e proteção ambiental, a todas as escalas. Para uma mudança tecnológica com um quadro sustentável adequado são três os aspetos fundamentais a alcançar: (a) uso eficiente, reduzindo significativamente a quantidade de matéria-prima requerida por unidade de produto; (b) recursos renováveis, respeitando o fluxo e ciclos naturais, e preservando o capital natural; (c) ecologia industrial, implementando a eliminação de resíduos através da reutilização, reciclagem e reprocessamento, bem como com o aumento da vida útil dos produtos (Sun et al., 2011).

Durante o século XX, a geração de energia e a produção de bens de consumo centrava-se no uso de matéria orgânica fossilizada como carvão, petróleo e gás natural. Presentemente, é reconhecido que o dióxido de carbono libertado durante a combustão destas fontes fósseis é uma das principais causas das alterações climáticas. Tal tem despertado um interesse crescente em tecnologias renováveis para substituir os recursos fósseis. Uma dessas tecnologias, é a conversão de biomassa em combustíveis e químicos através do conceito de “Biorrefinaria Integrada” (Brandt et al., 2013; Duarte et al., 2013).

Em 2010, a dependência externa de energia da União Europeia era de 58,5% e as previsões apontavam para um aumento até aos 67,1% em 2020. Esta dependência tem tido consequências económico-financeiras evidentes, por exemplo, aquando do forte aumento dos preços do petróleo, em finais do ano 2000. Em Portugal, a dependência externa de energia era de 80,9% em 2009, segundo dados da CE. O valor da dependência inverteu a tendência de crescimento no ano de 2006, tendo desde então diminuído cerca de 8%. Mesmo assim, o país é muito dependente do exterior para o fornecimento de energia. Esta forte dependência energética face ao exterior deve-se a: uma produção de energia nacional deficiente, um elevado valor do consumo energético por pessoa e uma elevada intensidade energética (consumo de energia por unidade de PIB) (Vieira e Barreira s.d.).

De acordo com a Diretiva Energia Renovável da EU 2009/28/EC 20% da energia da EU em 2020 será de origem renovável (espera-se que cerca de 50% desta seja bioenergia), permitindo salvaguardas ambientais e sociais: (a) poupança nos gases de efeito de estufa (GEE): diminuição do seu ciclo de vida (relativamente ao combustível fóssil substituído) para biocombustíveis; (b) salvaguardas de matéria-prima: os incentivos apenas serão concedidos se a matéria-prima não for proveniente de áreas ricas em carbono e biodiversidade.

Dado este despertar de consciências, a procura por fontes de combustível renováveis e alternativas aumentou, como o biodiesel e o bioetanol. O biodiesel é obtido por conversão de óleos vegetais, podendo ser usado simples ou misturado com outros combustíveis, como o gasóleo. O bioetanol pode ser produzido através da fermentação microbiana dos açúcares ou amido derivados de produtos alimentares (milho e trigo) e nesse caso é considerado bioetanol de 1ª geração. Contudo, este compete com culturas alimentares, não permitindo alcançar a produção desejada, nem a redução de GEE será a desejada. Sendo o recurso renovável mais abundante no mundo, a biomassa lenhocelulósica como resíduos florestais (madeira de *hardwood* e *softwood* e arbustos) e resíduos agrícolas (palha de trigo e milho, e bagaço de cana-de-açúcar) é conhecida pelo seu potencial uso na produção de compostos químicos e de biomateriais (Watkins et al., 2014). No entanto, a rede forte e recalcitrante que a caracteriza necessita do desenvolvimento de tecnologias de pré-tratamento eficazes e processos rentáveis capazes de converter a biomassa em bioetanol de 2 e 3ª geração, permitindo a substituição do gasóleo e da gasolina (Balat et al., 2008; Brandt et al., 2013; Duarte et al., 2013).

O uso de resíduos florestais pode representar para Portugal uma economia anual nas importações de petróleo de 4 500 a 6 000 milhões de euros, permitindo fazer frente a dois dos maiores problemas com que o país se debate – a dependência do petróleo e os incêndios florestais (BLC3 s.d.). De facto, é visto como uma vantagem adicional no combate aos grandes incêndios florestais e na minimização dos graves impactes ambientais económicos e sociais originados por este paradigma, que resultam, segundo um estudo realizado pela BLC3, numa perda económica, a nível nacional, de 800 a 1 000 milhões de euros.

A *Acacia dealbata*, vulgarmente designada de Mimosa, é uma das espécies que invade as florestas portuguesas, sem valor comercial, que tem sido alvo de elevadas ações de controlo, o que se traduz em custos avultados. Assim, dada a sua composição química, i.e. elevado teor de polissacarídeos, um dos usos possíveis desta espécie invasora é como matéria-prima na produção de bioetanol (Ferreira et al., 2011).

A produção de bioetanol a partir da biomassa lenhocelulósica é conseguida através de quatro operações unitárias: pré-tratamento, hidrólise (ou sacarificação) dos polissacarídeos em açúcares, fermentação dos açúcares em etanol e a purificação do produto final – etanol (Balat et al., 2008; Jørgensen et al., 2007).

O pré-tratamento é uma etapa vital na viabilidade da biorrefinaria, devido à estrutura recalcitrante da biomassa que devido à barreira natural criada pela lenhina, impede o acesso dos microrganismos e inviabiliza a produção de bioetanol. A primeira etapa (pré-tratamento) é uma das mais relevantes, quer em termos do custo operacional quer na eficácia dos processos posteriores (Duarte et al., 2013).

Assim, é necessário um pré-tratamento adequado, eficiente e economicamente viável, permitindo o fracionamento seletivo da biomassa, capaz de separar os componentes sem a sua degradação, permitindo a sua valorização. Em estudos recentes (Francisco et al., 2013; Marques 2015) o pré-tratamento com líquidos com baixa temperatura de transição vítrea (LTTM) e solventes de baixo ponto eutético (DES) têm-se relevado promissores no fracionamento seletivo da biomassa lenhocelulósica, uma vez que estes apresentam uma insignificante solubilidade para com os polissacarídeos de interesse (celulose e hemicelulose) mas elevada solubilidade para com a lenhina.

## **1.2. OBJETIVOS**

O trabalho desenvolvido nesta dissertação teve como principal objetivo a valorização de uma espécie arbórea infestante, a *Acacia dealbata*, por extração de lenhina com solventes de baixo impacto ambiental.

Desta forma, foi estudada a influência do pré-tratamento com líquidos com baixa temperatura de transição vítrea na deslenhificação da *Acacia dealbata* através da utilização de diferentes LTTMs e diferentes condições de pré-tratamento (tempo e temperatura de operação e o número de ciclos de pré-tratamento) e assim analisar o comportamento da madeira pré-tratada no processo de produção de bioetanol através da hidrólise enzimática e fermentação separadas.

## **1.3. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO**

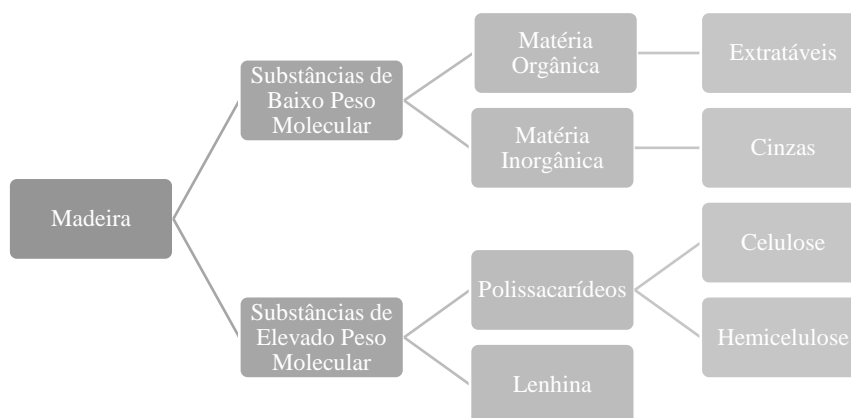
A presente dissertação encontra-se dividida em cinco capítulos. Neste primeiro capítulo encontra-se uma breve introdução referenciado o âmbito, a motivação e os objetivos para a realização deste trabalho experimental. Em seguida, no segundo capítulo, encontra-se a revisão bibliográfica onde é abordada as características da biomassa lenhocelulósica, bem como as

tecnologias de pré-tratamento existentes com especial foco no pré-tratamento com líquidos iônicos e solventes de baixo ponto eutético, e uma abordagem aos processos de hidrólise e fermentação de materiais lenhocelulósicos, permitindo enquadrar o conceito de “Biorrefinaria Integrada”. No terceiro capítulo são apresentados os materiais e reagentes utilizados, e o procedimento experimental adotado. O quarto capítulo é dedicado à apresentação, análise e discussão dos resultados obtidos. No quinto e último capítulo encontram-se sintetizadas as principais conclusões desta dissertação e as sugestões para trabalhos futuros.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURA DA BIOMASSA LENHOCELULÓSICA

A biomassa lenhocelulósica é um material compósito sintetizado pelas células vegetais, consistindo, maioritariamente, em hidratos de carbono na forma polimérica (celulose e hemiceluloses) e polímeros de natureza aromática (lenhina) (Brandt et al., 2013), sendo que estes são considerados os compostos de elevado peso molecular. Possui também, em pequenas quantidades, compostos de baixo peso molecular, quer de origem orgânica (extratáveis) quer de origem inorgânica (cinzas) (Brandt, et al. 2013, Carvalho 1999). A composição exata e a forma como estes polímeros lineares e heterogéneos se combinam entre si depende da espécie, da sua localização na parede celular e das condições de crescimento (Brandt et al., 2013; Dios 2013). A Figura 1 mostra uma representação esquemática da composição da madeira.

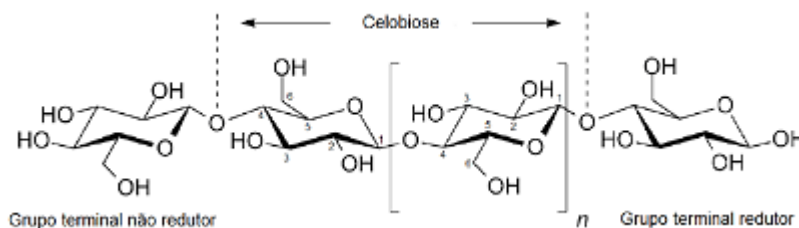


**Figura 1.** Esquema geral da composição da madeira (Carvalho 1999, Fengel e Wegener 1984).

#### 2.1.1. CELULOSE

A celulose é o principal componente individual do material lenhocelulósico, embora o seu teor varie significativamente, consoante a fonte de biomassa, encontrando-se, tipicamente, na gama de 35 a 50% (w/w) (Brandt et al., 2013). A sua forma geral é  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , onde  $n$  representa o grau de polimerização médio, que pode atingir 10 000 na madeira, variando com a espécie e a sua localização na parede celular (Sjöström 1993). Trata-se de um homopolissacarídeo linear composto por unidades de  $\beta$ -D-glucopirranose (Sjöström 1993). Devido às ligações glicosídicas do tipo  $(1 \rightarrow 4)$ , a unidade estrutural que se repete ao longo da cadeia é, na realidade, a celobiose, i.e. duas unidades de  $\beta$ -D-glucopirranose, como passível de observação da Figura 2. Os dois grupos terminais presentes na cadeia polimérica diferem na sua reatividade química. O grupo terminal redutor possui um grupo aldeído numa estrutura hemiacetal cíclica na posição do

carbono C-1, ao passo que, o grupo terminal não redutor possui um grupo hidroxilo alcoólico na posição do carbono C-4 (Sjöström 1993).



**Figura 2.** Estrutura da celulose (adaptado de Sjöström 1993).

Por cada unidade de  $\beta$ -D-glucopiranosose existem três grupos hidroxilo, que funcionam como locais de ligação através de pontes de hidrogénio, entre as moléculas de  $\beta$ -D-glucopiranosose no interior da cadeia de celulose (intramoleculares) e entre diferentes cadeias de celulose (intermoleculares), o que culmina numa associação lateral forte entre as diferentes moléculas de celulose (Sjöström 1993).

Os feixes de moléculas de celulose encontram-se agregadas formando microfibrilas, onde zonas com elevado nível de ordenação, formam a região cristalina, alternadas com regiões menos ordenadas, região amorfa. As microfibrilas dão origem às fibrilas, e, finalmente, às fibras de celulose. Como consequência desta estrutura fibrilar e fortes ligações de hidrogénio, a celulose possui uma elevada resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes (Sjöström 1993).

### 2.1.2. HEMICELULOSES

As hemiceluloses são um grupo de polissacarídeos cuja proporção na biomassa é cerca de 25% (Brandt et al., 2013), sendo, ao contrário da celulose, heteropolissacarídeos (Sjöström 1993). Similarmente à celulose, estes polissacarídeos são também um dos materiais de suporte da parede as células mas são caracterizáveis por um peso molecular mais baixo: o seu grau de polimerização varia entre 100 a 200 (Brandt et al., 2013; Yang et al., 2013). Além disso, apresentam uma estrutura amorfa e cadeias mais curtas, geralmente, ramificadas.

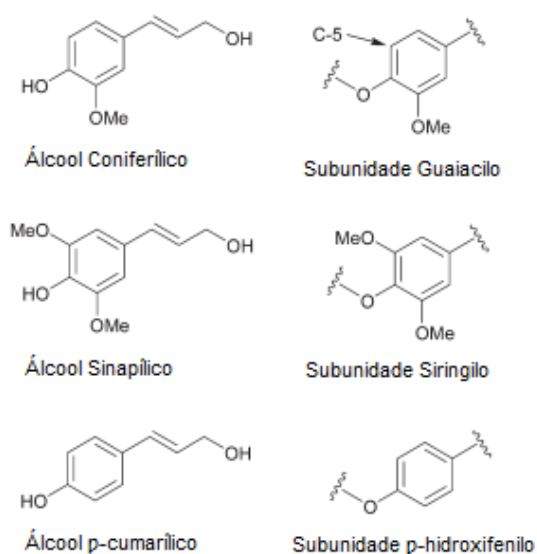
As hemiceluloses podem ser compostas por hexoses ou pentoses, sendo as respetivas formas poliméricas denominadas hexosanas e pentosanas, respetivamente (Brandt et al., 2013). As *softwoods* (e.g. pinheiro e cipreste) possuem um maior teor de hexoses como D-glucose, D-manose e D-galactose, ao passo que, as pentoses como a D-xilose ou a L-arabinose são mais comuns em *hardwood* (e.g. eucalipto e acácia) (Brandt et al., 2013; Sjöström 1993). Além destes açúcares, as hemiceluloses, possuem na sua constituição pequenas quantidades de L-







Através de reações de oxidação e subsequentes reações de polimerização é sintetizada a lenhina a partir de três monómeros: os álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico (Sjöström 1993). As subunidades que os incorporam são identificadas pela estrutura aromática do anel e, a partir daí, são designadas de guaiacilo (G), siringilo (S) e *p*-hidroxifenilo (H), respectivamente (Figura 6) (Brandt et al., 2013). Estas unidades encontram-se ligadas covalentemente entre si de uma forma complexa e, aparentemente, aleatória, aparecendo em diferentes proporções consoante a espécie, o tipo e idade das células, bem como a sua localização na parede celular (Carvalho 1999).



**Figura 6.** Os três monómeros a partir da qual a lenhina é sintetizada, e as respectivas subunidades após a síntese (adaptado de Brandt et al., 2013).

Assim, a lenhina de *softwood* consiste quase exclusivamente em lenhina do tipo guaiacilo (G), podendo conter pequenas quantidades de *p*-hidroxifenilo (H) (principalmente, em madeira de compressão). No caso de lenhina de *hardwood* verifica-se a presença de dois tipos, guaiacilo (G) e siringilo (S), numa proporção 1:1 ou em que existe três vezes mais lenhina do tipo S. No caso das gramíneas (e.g. relva e arbustos) é possível encontrar os três tipos de lenhina, G, S e H, sendo que existe uma maior proporção de lenhina do tipo H, quando comparada com as restantes. É de notar que o teor de lenhina das *softwoods* é superior à das *hardwoods*, que por sua vez é superior à das gramíneas (Ek et al., 2009).

As ligações prováveis entre as diferentes subunidades apresentam uma elevada heterogeneidade, sendo do tipo alquilo-alquilo ou alquilo-arilo, quer na posição  $\alpha$ , quer na posição  $\beta$ , dando origem a ligações éter, tais como  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4, e a ligações carbono-carbono, nomeadamente,  $\beta$ - $\beta$ ,  $\beta$ -5,  $\beta$ -1 ou do tipo arilo-arilo, como as ligações 4-O-5 e 5-5 (Carvalho

1999, Sjöström 1993). No entanto, algumas destas ligações são predominantes em relações a outras, sendo a ligação  $\beta$ -O-4 a mais frequente da lenhina na madeira, em cerca de 50% (Brandt et al., 2013), Tal facto influencia de forma decisiva a reatividade química da lenhina. Como consequência da heterogeneidade das ligações entre as subunidades e as suas possíveis combinações, a lenhina apresenta uma estrutura tridimensional e amorfa, como mencionado anteriormente, que não pode ser descrita por uma fórmula estereoquímica simples, como no caso da celulose e da hemicelulose (Carvalho 1999).

#### **2.1.4. SUBSTÂNCIAS DE BAIXO PESO MOLECULAR**

Em contraste aos polímeros estruturais da madeira, i.e. celulose, hemiceluloses e lenhina, existem outras substâncias, cuja proporção varia consideravelmente entre famílias e géneros de madeira, sendo comumente designados de substâncias de baixo peso molecular. Estes podem ser de origem orgânica e são designados de extratáveis, ou de origem inorgânica (mineral) e são designados de cinzas (Ek et al., 2009).

Os extratáveis são definidos como compostos químicos que são extraídos da madeira com diversos solventes neutros (e.g. acetona) (Ek et al., 2009), representando cerca de 5% da madeira. Estes compostos apresentam uma enorme variabilidade, como triterpenos, esteróis, ácidos gordos esterificados com glicerol, ceras, ácidos e álcoois gordos livres, compostos polifenólicos, aminoácidos, pectinas, amidos e açúcares simples (Sjöström 1993).

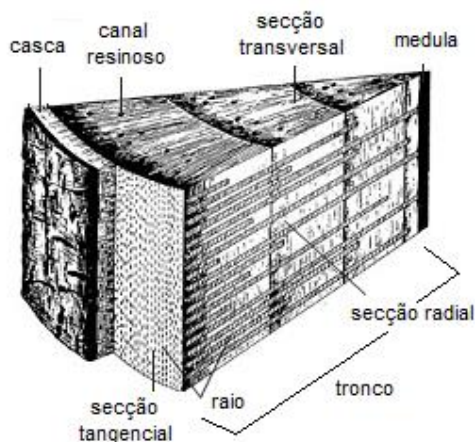
Relativamente os compostos de origem inorgânica, i.e. as cinzas, estes encontram-se na madeira em quantidades inferiores a 1%. São constituídos, essencialmente, por sulfatos, fosfatos, oxalatos, carbonatos e silicatos de cálcio, potássio ou magnésio, depositados nas paredes e no lúmen das células (Carvalho 1999, Sjöström 1993).

#### **2.1.5. ESTRUTURA**

As árvores pertencem à unidade taxonómica das plantas que produzem sementes, i.e. espermatófitas, que se encontram subdivididas em gimnospérmicas e angiospérmicas. A madeira conífera ou *softwood* pertence à primeira categoria mencionada, enquanto a madeira proveniente de espécies de folha perene ou *hardwood* pertence à segunda (Sjöström 1993). A madeira é uma complexa estrutura hierárquica que é, em parte, responsável por determinadas propriedades químicas e mecânicas nos produtos em que é aplicada, e.g. pasta. Estas

propriedades são regidas pela estrutura particular da madeira, quer na sua organização anatómica quer pela ultra-estrutura da parede da célula (Ek et al., 2009).

Detalhadamente, cada árvore pode ser dividida em várias partes, comumente referidas como a coroa, o tronco e o sistema radicular, sendo que, cada uma é composta por diferentes tecidos, que por sua vez são constituídos por células de individuais. O tronco pode ser dividido em a) casca – constituída por células mortas que fornece proteção de ataques físicos, químicos ou biológicos; b) floema – que é *vivo* e permite o transporte de nutrientes e o armazenamento de produtos; c) câmbio vascular – pequena camada de células que por divisão repetitiva produz as células do floema para o exterior e do xilema



**Figura 7.** Representação esquemática da anatomia de um pinheiro (adaptado de Ek et al., 2009).

(secundário) para o interior; d) xilema secundário – constitui a maior parte do material lenhoso, sendo, normalmente, dividido no borne e cerne. Por fim, a medula encontra-se, normalmente, presente no centro do tronco, representando os tecidos que se desenvolveram durante primeiros anos de crescimento da árvore (Figura 7). Cada tecido é composto por uma variedade de diferentes tipos de células que desempenham diferentes papéis na árvore (i.e. suporte, transporte, armazenamento) - Tabela 1. Estas diferenças surgem devido aos diferentes tipos de células bem como as diferenças individuais na organização da parede da célula (i.e. microestrutura e organização supra-molecular) e composição química (Ek et al., 2009; Sjöström 1993).

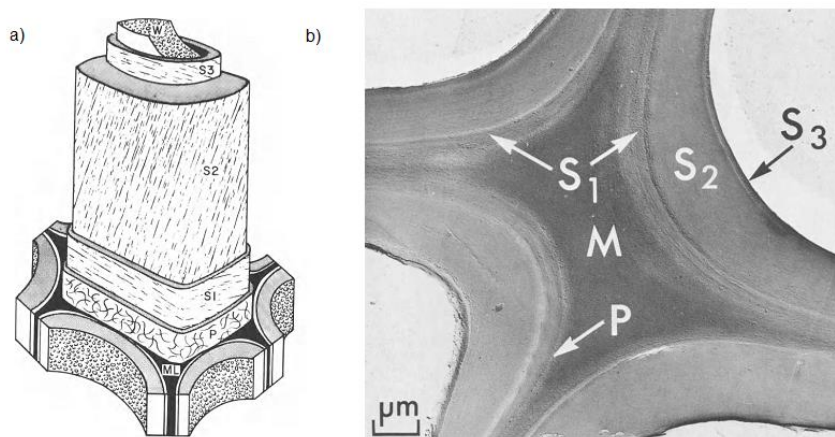
A madeira é composta por sistemas de células altamente ordenados axial e radialmente. O sistema axial é composto por células primárias alongadas orientadas na direção longitudinal do tronco, estas variam quer no tamanho quer na forma de acordo com a sua função, cuja parede celular é espessa promovendo o suporte mecânico e força à árvore e às células primárias promovendo o transporte e o armazenamento de nutrientes. O sistema radial é orientado perpendicularmente à árvore, dando origem aos anéis que formam filas horizontais de células que se estendem desde da casca até à medula (anéis primários) até aos anéis anuais específicos (anéis secundários). A principal função dos anéis é o armazenamento e redistribuição dos materiais armazenados (e.g. amido), contribuindo para 5 – 11% do volume total, no caso de *softwood*, e acima de 30% no caso de *hardwood* (Ek et al., 2009)

É considerado que a estrutura das *softwood* é muito mais simples que a estrutura das *hardwoods*, dado que possuem um número limitado e mais uniforme de tipos de células, normalmente, 3 axiais e 2 radiais. Em contraste, as *hardwoods* possuem um maior número de células axiais (5 a 6 axiais e 2 radiais) fruto da própria evolução das espécies (Ek et al., 2009).

**Tabela 1.** Principais tipos de células e respetivas funções presentes em *softwood* e *hardwood* (adaptado de Ek et al., 2009).

	TIPO DE CÉLULA	FUNÇÃO
<i>Softwood</i>	Traqueídeos longitudinais	Condução e suporte
	Parênquima	Armazenamento e secreção de resinas
	Traqueídeos radiais	Condução
<i>Hardwood</i>	Elementos de vaso	Condução
	Fibras	Suporte
	Traqueídeos	Condução
	Parênquima	Armazenamento

As células da madeira são compostas por um número de camadas de paredes celulares que formam a parede primária (uma camada) e as paredes secundárias (2 a 3 camadas). A Figura 8a representa um modelo típico da organização celular. As células individuais encontram-se ligadas através da região intercelular da lamela média, rica em lenhina (Sjöström 1993). A proporção de lenhina aí presente é bastante elevada, uma vez que representa 25 a 29% da lenhina total.



**Figura 8.** a) Estrutura simplificada de uma célula, sendo perceptível a lamela média (ML), a parede primária (P), as paredes secundárias (S1, S2 e S3) e lúmen (W); b) secção transversal de um traqueído (adaptado de Sjöström 1993).

A parede primária forma a camada exterior da célula, sendo constituída por microfibrilas de celulose aleatoriamente orientadas. A parede secundária é composta por 2 a 3 camadas, S1, S2 e S3 (Figura 8b), onde a S1 e a S3 são bastante ténues comparativamente à camada S2, formando a maior parte da parede da célula quer em *soft* quer em *hardwood* (Ek et al., 2009).

### 2.1.6. MATÉRIA-PRIMA: ACACIA DEALBATA

O género *Acacia* pertence à família Mimosaceae, existindo quase 1380 espécies em todo mundo, sendo que perto de 1000 foram encontradas na Austrália, bem como 144 espécies em África (incluindo Madagáscar), 89 espécies na Ásia, e cerca de 185 na América do Norte e do Sul. A atual classificação reconhece cinco grandes grupos, sendo eles *Acacia*, *Aculeiferum*, *Phyllodinae* (à qual a *Acacia dealbata* pertence), *Filicinae* e “*Acacia coulteri*” (Lorenzo et al., 2009).

Na Europa, seria suposto que o clima fosse um fator restritivo para o crescimento de *Acacia*, mas tem sido verificado que a sua propagação tem alcançado valores elevados, sendo já considerada uma “praga” (Lorenzo et al., 2009). De facto, já foram identificadas oito espécies no sul da Europa, como registado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Lista das espécies de *Acacia* com potencial invasivo na Europa (adaptado de Lorenzo et al., 2009).

França	Itália	Portugal	Espanha
<i>A. dealbata</i> Link	<i>A. dealbata</i> Link	<i>A. dealbata</i> Link	<i>A. dealbata</i> Link
<i>A. melanoxylon</i> R. Br.	<i>A. melanoxylon</i> R. Br.	<i>A. melanoxylon</i> R. Br.	<i>A. melanoxylon</i> R. Br.
<i>A. longifolia</i> (Andrews) Willd.	<i>A. longifolia</i> (Andrews) Willd.	<i>A. longifolia</i> (Andrews) Willd.	<i>A. longifolia</i> (Andrews) Willd.
<i>A. retinodes</i> Schlecht.	<i>A. retinodes</i> Schlecht.	<i>A. retinodes</i> Schlecht.	<i>A. retinodes</i> Schlecht.
<i>A. saligna</i> (Labill) Wendl. fil.	<i>A. saligna</i> (Labill) Wendl. fil.	<i>A. saligna</i> (Labill) Wendl. fil.	<i>A. saligna</i> (Labill) Wendl. fil.
<i>A. mearnsii</i> De Wild	<i>A. mearnsii</i> De Wild	<i>A. mearnsii</i> De Wild	<i>A. mearnsii</i> De Wild
	<i>A. pycantha</i> Bentham	<i>A. pycantha</i> Bentham	
		<i>A. karroo</i> Hayne	

A presença destas espécies ameaça os *habitats* nativos, competindo com a vegetação endógena, substituindo comunidades arbóreas, reduzindo a biodiversidade nativa e aumentando a perda de água de zonas ribeirinhas. Em adição a esta capacidade de colonização que, tipicamente, domina o local colonizado, com espécies de sub-bosque, i.e. vegetação de baixa estrutura, e com baixa capacidade de cobertura. Presentemente, as espécies *Acacia dealbata*, *A. melanoxylon* e *A. longifolia* são as principais invasoras em França, Itália, Portugal e Espanha, especialmente, em áreas protegidas, sendo a *A. dealbata* é considerada a espécie mais disseminada e que se encontra amplamente estabelecida na Europa meridional (Lorenzo et al., 2009).

As espécies invasoras têm um impacte bastante negativo na diminuição da produtividade das florestas, pelo que têm sido levadas a cabo inúmeras ações de controlo em diversas áreas, o que acarreta custos elevados. Não tendo valor comercial para as indústrias do mobiliário ou da pasta para papel, uma das formas de controlo da distribuição desta espécie invasora é o seu uso como

matéria-prima, por exemplo, para a produção de produtos de valor acrescentado e.g. indústria química, alimentar e farmacêutica (Ferreira et al., 2011). A *Acacia dealbata* apresenta a seguinte composição média expressa em percentagem mássica de matéria seca: celulose, 43,1; xilana 18,7; lenhina Klason, 20,7; lenhina solúvel, 5,2; extratáveis, 8,3; ácido acético, 4,8; ácido fórmico, 1,6 e cinzas, 1,1 (Ferreira et al., 2011). Sendo um material lenhocelulósico abundante, que não compete diretamente com a produção alimentar e cresce facilmente sem a necessidade de um terreno cultivável fértil, é visto como uma opção promissora de produção de bioetanol.

## 2.2. BIOETANOL – COMBUSTÍVEL DO FUTURO

No decorrer do século 20, a sociedade apercebeu-se da dependência existente na matéria orgânica fossilizada como o carvão, gás natural e o petróleo para a geração de energia e produção de produtos químicos. É reconhecido o dióxido de carbono produzido durante a combustão dos recursos fósseis causou e, continua a causar, severas alterações climáticas dada a sua capacidade como gás com efeito de estufa (GHG – *greenhouse gas*), tratando-se do gás com efeitos mais significativos (Balat et al., 2013; Brandt et al., 2013).

Além disso, a necessidade crescente para satisfação das necessidades humanas levou a um ponto onde cerca de metade das reservas acessíveis de recursos fósseis estejam esgotadas num futuro próximo, o que remete para a depleção deste recurso. Tal, deve-se à incapacidade de renovação face à sua extração e consequente consumo (Brandt et al., 2013; Yang e Wyman 2007).

Estas considerações levaram à consciencialização e ao aumento do interesse em tecnologias renováveis para substituir as fontes fósseis de carbono. Os dados existentes mostram que a maior fração destes recursos é usado como petróleo, sendo cerca de dois terços usado em transportes. Assim, existem três opções: conduzir menos, usar veículos mais eficientes ou trocar por combustíveis não derivados do petróleo (Balat et al., 2013; Brandt et al., 2013 Yang e Wyman 2007).

Ao examinar o espectro dos recursos sustentáveis e dos combustíveis que deles podem derivar, a biomassa representa claramente o único recurso sustentável e de baixo custo que pode ser convertido em combustíveis líquidos que podem ser usados em larga escala. A conversão simultânea da biomassa em combustíveis e produtos químicos é designada de “Biorrefinaria Integrada” (Balat et al., 2013; Brandt et al., 2013 Yang e Wyman 2007).

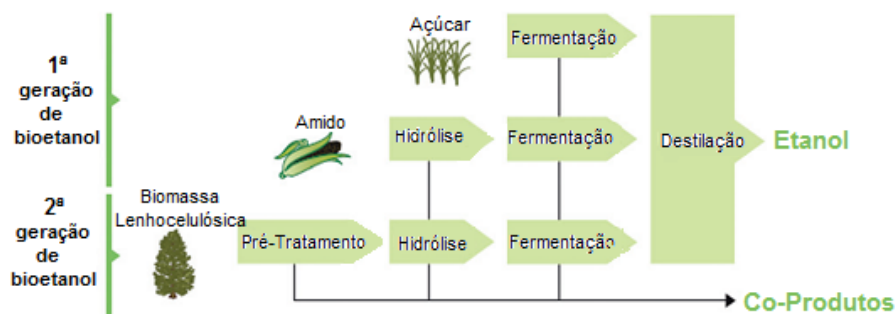


O bioetanol (álcool etílico, EtOH ou CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) é um biocombustível líquido que pode ser produzido a partir de várias fontes de biomassa e tecnologias de conversão. Devido ao seu baixo índice de cetano e o seu maior calor de vaporização, impedindo a sua autoignição, não é apropriado para se misturar com gásóleo. Por sua vez, o bioetanol possui um maior número de octanas, limites de inflamabilidade mais amplos, velocidade de chama superior e um calor de vaporização mais elevado que a gasolina permitindo uma taxa de compressão mais elevada. No entanto, possui uma densidade energética inferior à da gasolina, é corrosivo, possui baixa luminosidade de chama e baixa pressão de vapor, o que provoca dificuldades no arranque, é miscível com a água, e é tóxico para os ecossistemas. O etanol é um combustível oxigenado que contém 35% de oxigénio, o que reduz as emissões de partículas de óxidos de azoto (i.e. NO<sub>x</sub>) (Mendes 2009; Quilhó 2011; Yang e Wyman 2007).

Este biocombustível já é amplamente utilizado no Brasil e nos EUA, onde é facilmente aplicado em veículos com motores de combustão interna de ciclo de Otto, dado que é possível a sua mistura com gasolina em diferentes proporções volumétricas. Diversas frações volumétricas podem ser estabelecidas, sem que seja necessária a modificação do motor do veículo, sendo elas a E10, E20 e E22, onde é incorporado, respetivamente, 10, 20 e 22% (v/v) de etanol. Numa mistura E10 ocorre uma diminuição de 3 a 6% das emissões de dióxido de carbono (Mendes 2009; Quilhó 2011). Para a utilização de misturas com 85 e 95% (v/v) de etanol, o veículo deve-se encontrar preparado para o efeito.

Os biocombustíveis são produzidos a partir de óleos vegetais, beterraba sacarina, cereais, fração orgânica dos resíduos e do processamento da biomassa. Matéria-prima biológica que contenha uma quantidade apreciável de açúcares simples, ou materiais que possam ser convertidos em açúcares, como o amido e a celulose, pode ser fermentada para produzir bioetanol. Convencionalmente, a matéria-prima para a produção do bioetanol pode ser classificada em três tipos:

- i. Matéria-prima com elevado conteúdo de sacarose (e.g. beterraba sacarina, sorgo sacarino e cana de açúcar);
- ii. Matéria-prima com elevado conteúdo de amido (e.g. trigo, milho e cevada);
- iii. Biomassa lenhocelulósica (e.g. madeira, palha e erva).



**Figura 9.** Conversão da matéria-prima de primeira e segunda geração em etanol pela via fermentativa (adaptado de Brandt et al., 2013).

O bioetanol produzido a partir de matérias-primas derivadas de culturas alimentares, como é o caso das culturas sacarinas e amiláceas, é considerado bioetanol de primeira geração (Figura 9). Este é produzido, essencialmente, à escala mundial, a partir da sacarose da cana-de-açúcar no Brasil e do amido de milho nos EUA. A utilização do bioetanol de primeira geração diminui as emissões de CO<sub>2</sub> em 20 a 70% quando comparado à utilização de gasolina. Contudo, a sua produção inflaciona os preços dos alimentos, uma vez que competem diretamente com a sua utilização humana e animal. Além disso, conduz à necessidade de aumento de áreas de cultivo, o que pode, conseqüentemente, conduzir à desflorestação para obtenção de terrenos agrícolas, colocando desta forma em risco a biodiversidade e a sustentabilidade dos ecossistemas (Mendes 2009; Quilhó 2011; Yang e Wyman 2007).

Assim, a investigação tem-se centrado na produção de bioetanol através de outras matérias-primas, o que conduziu à produção de bioetanol a partir de biomassa lenhocelulósica. Este é então considerado bioetanol de segunda geração (Figura 9), sendo esta classificação derivada do facto de a produção de biomassa lenhocelulósica não competir com a alimentação humana e animal. É expectável que o bioetanol de segunda geração reduza as emissões de dióxido de carbono em 90%, comparativamente à combustão da gasolina (Mendes 2009; Quilhó 2011; Yang e Wyman 2007; Yang et al., 2013).

Apesar da biomassa lenhocelulósica se caracterizar por polímeros de monossacarídeos, e portanto, se traduzirem numa potencial fonte de açúcares simples para o processo de fermentação, o custo estimado de produção varia consoante o método de produção aplicado, não o tornando, ainda, economicamente viável (Mendes 2009). Quando todos hidratos de carbono presentes na biomassa forem fermentados com rendimentos e produtividade elevados, a produção industrial de bioetanol será rentável (Mendes 2009; Yang e Wyman 2007).

### **2.3. BIORREFINARIA INTEGRADA – CONVERSÃO DE BIOMASSA LENHOCELULÓSICA EM ETANOL**

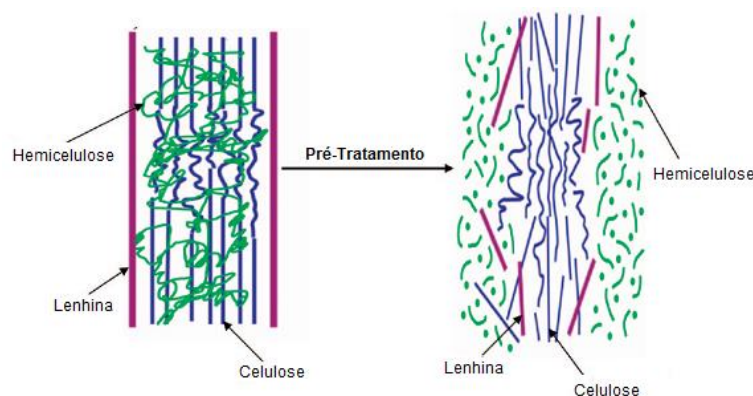
O processamento da biomassa lenhocelulósica em etanol consiste em quatro grandes operações unitárias: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e a separação/purificação do produto final. O pré-tratamento é requerido por forma a alterar a biomassa macro e microscopicamente, por via física e química, modificando desta forma o seu tamanho, forma, estrutura e composição química, para que a hidrólise dos hidratos de carbono a açúcares monoméricos seja atingida rápida e eficazmente, i.e. com elevados rendimentos (Wyman 1999).

Através do corte das ligações glicosídicas, a celulose pode ser hidrolisada por ação enzimática das celulasas ou por ação química (e.g. ácido sulfúrico), dando origem à glucose. O mesmo acontece às hemiceluloses, mas neste caso por ação das hemicelulasas (libertando glucose, galactose e manose). As hexoses resultantes são facilmente fermentáveis em etanol por ação natural dos microrganismos (e.g. leveduras), mas as pentoses (xilose e arabionose) são fermentáveis em etanol apenas por poucas espécies nativas e, usualmente, com rendimentos baixos (Wright 1988).

O etanol é recuperado da fermentação através da destilação ou de um processo combinado de destilação e adsorção. A lenhina residual, a celulose e hemiceluloses não hidrolisadas, as cinzas, as enzimas, os microrganismos e outros componentes que terminam no fundo da coluna de destilação podem ser concentrados e queimados como combustível para fornecer a energia necessária ao processo, ou convertidos em produtos de valor acrescentado (Moiser et al., 2005).

#### **2.3.1. TECNOLOGIAS DE PRÉ-TRATAMENTO**

Devido à estrutura robusta da biomassa lenhocelulósica, o pré-tratamento é um pré-requisito para a hidrólise enzimática eficiente e para que fermentação dos açúcares seja completa numa fração de tempo aceitável na indústria (Jørgensen et al., 2007). Desta forma, o principal objetivo do pré-tratamento é alteração e/ou remoção dos impedimentos estruturais à subsequente conversão da matéria-prima no(s) produto(s) pretendido(s), i.e. transformar a estrutura recalcitrante e inacessível da biomassa lenhocelulósica numa estrutura acessível aos microrganismos, como passível de observação na Figura 10 (Afonso 2013; Balat et al., 2008; Marques 2015).



**Figura 10.** Representação esquemática do papel do pré-tratamento na conversão da biomassa em combustível (adaptado de Kumar et al., 2009).

Ao longo dos anos, inúmeras tecnologias têm sido desenvolvidas para o pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica, usando diversas estratégias para aumentar a conversão enzimática, por ação biológica, física e/ou química. O foco principal é alterar ou remover hemiceluloses e/ou lenhina, aumentar a área superficial e diminuir a cristalinidade da celulose, sendo que, a remoção da lenhina, com pouca remoção de hemiceluloses, tem possibilitado um aumento significativo da hidrólise da celulose (Jørgensen et al., 2007).

Contudo, a escolha da tecnologia adequada de pré-tratamento não é trivial, dado o seu significativo impacto na economia do processo, e os seguintes atributos chave devem ser tidos em conta, em conjunto com a concentração de sólidos, matéria-prima, enzimas e microrganismos a serem aplicados (Balat et al., 2008; Galbe e Zacchi 2007; Jørgensen et al., 2007; Yang e Wyman 2007):

- Maximizar a conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentáveis, a partir da celulose e hemiceluloses, aquando da hidrólise enzimática;
- Minimizar/evitar a perda e degradação dos açúcares;
- Minimizar/evitar a produção de produtos inibidores da hidrólise e fermentação;
- Maximizar a produção de bio-produtos de valor acrescentado, e.g. lenhina;
- Não exigir a adição de químicos tóxicos para as enzimas e para os microrganismos;
- Minimizar o uso energético e material, e.g. equipamentos;
- Apresentar uma boa relação custo – benefício;
- Ser possível o seu *scale-up* industrial.

A maioria das tecnologias de pré-tratamento atualmente utilizadas derivam das metodologias aplicadas nas indústrias celulósicas, onde é recorrente o uso de ácidos ou bases diluídos(as),

com recurso a elevadas pressões e temperaturas, o que potencia o uso de materiais de construção nobres e elevados consumos energéticos. Além disso, os solventes utilizados são, na maioria das vezes, poluentes e necessitam de ser recuperados (Afonso 2013). Assim, o foco da investigação centra-se agora na (re)definição de tecnologias de pré-tratamento mais eficazes, com menor consumo energético e uso de substâncias amigas do ambiente, i.e. aplicação direta do conceito de *engenharia verde*.

Em seguida, será feita uma breve referência às tecnologias de pré-tratamento já existentes, com respetiva descrição do modo de funcionamento, apresentando ainda as vantagens e desvantagens.

#### ▪ PRÉ-TRATAMENTO BIOLÓGICO

O pré-tratamento biológico recorre a diversos tipos de fungos filamentosos, como os fungos de podridão castanha (*brown-rot fungi*), branca (*white-rot fungi*) e suave (*soft-rot fungi*), sendo que esta técnica já foi previamente explorada para utilizar a biomassa lenhocelulósica em aplicações alimentares e papeleiras (Alvira et al., 2010; Harmsen et al., 2010; Taherzadeh e Karimi 2008). Os fungos de podridão castanha atacam a celulose, enquanto os fungos de podridão branca e suave são usados para degradar a lenhina e as hemiceluloses. A degradação da lenhina pelos fungos de podridão branca ocorre pela ação de enzimas, como as peroxidases e as lacases, transformando-a em CO<sub>2</sub>, sendo os fungos mais eficientes no pré-tratamento (Kumar et al., 2009).

Trata-se de uma tecnologia amiga do ambiente que tem atraído as atenções por forma a aumentar o potencial enzimático para a sacarificação da biomassa nos processos de produção de etanol, uma vez que não requer compostos químicos nem equipamentos, ocorre as condições de operação moderadas (temperatura e pressão ambiente), com baixo consumo energético e baixo custo de capital. No entanto, devido ao baixo ritmo de processamento da biomassa lenhocelulósica, requerendo elevados tempos de residência, torna-se pouco atrativo para a sua implementação industrial (Alvira et al., 2010; Taherzadeh e Karimi 2008).

#### ▪ PRÉ-TRATAMENTO FÍSICO

O pré-tratamento físico permite aumentar a área de superfície e o volume dos poros, acompanhado da diminuição do grau de cristalinidade e de polimerização da celulose, apenas por ação mecânica sem adição de componentes químicos ou biológicos. Diferentes tipos de processos químicos como a fragmentação mecânica, a irradiação ou a extrusão, podem ser

usados por forma a promover a hidrólise enzimática da biomassa lenhocelulósica (Taherzadeh e Karimi 2008).

A **fragmentação mecânica** tem como objetivo a redução de tamanho das partículas da biomassa, e consiste na combinação de fragmentação, i.e. redução a estilha (10 a 30 mm), moagem e/ou trituração (0,2 a 2 mm). A redução de tamanho é conseguida através da utilização combinada de diferentes tensões mecânicas, como o impacto, a compressão, a fricção e o cisalhamento (Alvira et al., 2010; Harmsen et al., 2010). A energia requerida é relativamente elevada, dependendo do tamanho final de partícula desejado e também das características da biomassa, o que torna o processo não atrativo economicamente. Além disso, este tipo de pré-tratamento não permite a remoção da lenhina, o que dificulta o a hidrólise enzimática da matéria-prima (Alvira et al., 2010; Quilhó 2011).

A **irradiação** consiste, tal como o próprio nome indica, na irradiação da biomassa lenhocelulósica com, por exemplo, raios gama, micro-ondas ou feixe de eletrões que quebram as ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ , permitindo, desta forma, o aumento da área superficial das partículas e diminuição da cristalinidade da celulose, o que, por sua vez, leva a um aumento da eficiência do processo enzimático subsequente (Galbe e Zacchi 2007; Taherzadeh e Karimi 2008). No entanto, os elevados níveis energéticos requeridos para a prática deste pré-tratamento são demasiado elevados para a sua implementação industrial (Quilhó 2011).

Por fim, a **extrusão**, é um novo e promissor pré-tratamento físico pra a conversão da biomassa em etanol. Neste método os materiais são sujeitos ao aquecimento, mistura e cisalhamento, resultando em modificações físicas e químicas durante a passagem pela extrusora (Alvira et al., 2010). Estas modificações levam a melhorias significativas no processo de hidrólise que se segue. Dado que se trata de um processo contínuo é fácil o seu *scale-up*, permite um acompanhamento de todas as variáveis do processo, não ocorre degradação dos açúcares. Como não é produzida nenhuma fração líquida não existe necessidade de tratamento de efluentes e consequente descarga, e é uma tecnologia de baixo custo. Desta forma, é dos pré-tratamentos físicos o mais promissor a nível industrial (Alvira et al., 2010; Quilhó 2011; Zheng e Rehmann 2014).

### ▪ PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO

A estrutura reticulada formada pelas cadeias de celulose forma uma barreira eficiente contra a penetração das enzimas nas fibras. Através de um pré-tratamento baseado, essencialmente, em reações químicas é possível a rutura da estrutura da biomassa lenhocelulósica, através da solubilização da maior fração da lenhina em conjunto com algumas hemiceluloses, e assim, ser possível a hidrólise enzimática (Galbe e Zacchi 2007; Harmsen et al., 2010). O pré-tratamento químico inclui o uso de ácidos, bases, ozono, solventes orgânicos e líquidos iônicos.

O principal objetivo do **pré-tratamento ácido** é a solubilização da fração hemicelulósica da biomassa e torna-la acessível às enzimas. Este tipo de pré-tratamento pode ser realizado com ácido concentrado ou diluído, sendo que a utilização de ácido concentrado não é atrativa para a produção de bioetanol, uma vez que leva à produção de compostos inibidores (Alvira et al., 2010). É comumente utilizado ácido sulfúrico,  $H_2SO_4$ , mas também outros ácidos podem ser usados, como ácido clorídrico,  $HCl$ , ou ácido nítrico,  $HNO_3$  (Taherzadeh e Karimi 2008).

O pré-tratamento com ácido concentrado ocorre a temperaturas moderadamente baixas, e.g. 40 °C, e elevadas concentrações de ácido, e.g. 30 a 70%, o que torna o processo extremamente perigoso e corrosivo, sendo necessário equipamentos não metálicos especiais. A recuperação do ácido é uma premissa necessária para a viabilidade económica do processo, o que acarreta elevados custos energéticos, além de necessária a neutralização de elevadas quantidades de material. O elevado investimento e elevados custos de manutenção igualmente elevados reduzem o interesse comercial neste processo (Taherzadeh e Karimi 2008).

O pré-tratamento com ácido diluído é, provavelmente, o pré-tratamento químico mais comumente aplicado. Pode ser aplicado em dois cenários distintos:

- i. A elevada temperatura, e.g. 180 °C, durante um curto espaço de tempo, e.g. 5 min;
- ii. A temperatura moderada, e.g. 120 °C, durante um longo tempo de retenção, 30 a 90 min.

O primeiro cenário é indicado para processos contínuos com baixas razões sólido/líquido, i.e. 5 a 10%, enquanto o segundo se torna mais indicado para processos descontínuos com razões sólido/líquido mais elevadas, i.e. 10 a 40% (Harmsen et al., 2010; Taherzadeh e Karimi 2008). Este pré-tratamento permite a solubilização quase completa das hemiceluloses, principalmente, da xilana, mas também permite a sua conversão em açúcares fermentáveis. Contudo, dependendo da temperatura processual alguns compostos inibidores podem ser formados, como

o furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e compostos aromáticos, derivados da degradação da lenhina podem ser formados, o que afeta negativamente o metabolismo dos microrganismos fermentativos. Ainda assim, o pré-tratamento com ácido diluído é capaz de gerar menos produtos de degradação comparativamente ao pré-tratamento com ácido concentrado (Alvira et al., 2010; Taherzadeh e Karimi 2008).

O **pré-tratamento alcalino** permite a remoção da lenhina, aumentando a digestibilidade da celulose, por diminuição da sua cristalinidade e grau de polimerização (Alvira et al., 2010). Podem ser usados diversas bases, nomeadamente, hidróxidos de sódio, NaOH, potássio, KOH, cálcio,  $\text{Ca(OH)}_2$  e amónio,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , sendo o hidróxido de sódio o mais usado, embora o hidróxido de cálcio se tenha mostrado um agente de pré-tratamento eficaz e o com o menor custo de aquisição (Kumar et al., 2009).

Este pré-tratamento é processado a temperaturas e pressões mais baixas que as restantes tecnologias, podendo assim ser efetuada às condições normais de pressão e temperatura. No entanto, este pré-tratamento requer tempos de residência elevados, que podem ir desde horas a dias, em vez de segundos a minutos (Alvira et al., 2010; Moiser et al., 2005).

Durante o pré-tratamento alcalino as primeiras reações a terem lugar são as de solvatação e saponificação, permitindo o intumescimento da biomassa tornando-a, posteriormente, mais acessível às enzimas. Em meio alcalino ocorre ainda o *peeling* dos grupos terminais das cadeias e a dissolução de alguns polissacarídeos, o que leva a uma pequena perda de açúcares fermentáveis e à produção de compostos inibidores, dependendo da escolha e/ou otimização das condições operatórias (Hendriks e Zeeman 2008; Moiser et al., 2005). Pelo facto de não sere necessário equipamentos especiais e por ser possível a recirculação dos reagentes, este pré-tratamento é considerado aliciente para a sua implementação industrial (Marques 2015).

No processo **organosolv**, um solvente orgânico ou uma mistura aquosa orgânica com um catalisador ácido (HCl ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) são usados para quebrar as ligações moleculares entre os componentes da biomassa. A celulose é parcialmente hidrolisada em pequenos fragmentos que permanecem insolúveis no licor, as hemiceluloses são hidrolisadas em componentes solúveis como oligossacarídeos, monossacarídeos e ácido acético. A presença de ácido acético no licor faz diminuir o pH do mesmo, o que, por um lado, catalisa a hidrólise, e, por outro, leva à produção de compostos inibidores, e.g. fufural, dos processos biológicos subsequentes (Kumar et al., 2009).



É usual a utilização de metanol, etanol, acetona, etilenoglicol, trietilenoglicol e álcool tetradidrofurfurílico como solventes. Também os ácidos orgânicos como o ácido oxálico, acetilsalicílico e salicílico podem ser usados como catalisadores no processo organosolv. As condições operatórias dependem da natureza da matéria-prima a ser processada, a temperatura pode variar entre 180 e 195 °C, o tempo de operação entre 30 a 90 min, e a concentração de etanol entre 35 a 70% (m/m) e a razão líquido/sólido de 4:2 a 10:1 (m/m). Além disso, o pH pode variar entre 2.0 a 3.8 (Kumar et al., 2009).

Além de tornar a estrutura recalcitrante da biomassa acessível para as etapas seguintes (hidrólise enzimática e fermentação), o processo organosolv permite ainda a obtenção de lenhina de alta qualidade que pode ser utilizada como produto de valor acrescentado, e.g. adesivos e geração de eletricidade. Após o pré-tratamento, o solvente necessita de ser removido do reator, evaporado, condensado e reciclado para reduzir os custos operacionais e para remover os compostos inibidores dos microrganismos (Kumar et al., 2009; Taherzadeh e Karimi 2008).

O pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica pode ser realizado com recurso ao ozono, sendo assim referido como **ozonólise**. Este método é capaz de degradar eficazmente a lenhina e parte da hemicelulose, deixando a celulose intacta. A ozonólise ocorre à temperatura ambiente e não leva à produção de compostos inibidores, mas requer, contudo, elevadas quantidades de ozono, o que torna o processo dispendioso. A humidade da biomassa (valor ótimo de 30%, dado que corresponde ao ponto de saturação das fibras), o tamanho das partículas e a concentração de ozono na corrente gasosa são variáveis cruciais à eficiência do pré-tratamento (Alvira et al., 2010; Kumar et al., 2009; Taherzadeh e Karimi 2008).

#### ▪ PRÉ-TRATAMENTO FÍSICO-QUÍMICO

Tal como o próprio nome indica, um pré-tratamento físico-químico é aquele que combina processos físicos e químicos. Os mais importantes são a explosão a vapor, explosão a vapor com catalisador, água líquida sobreaquecida e explosão de fibras com amoníaco (Taherzadeh e Karimi 2008).

A **explosão a vapor** (não catalisada ou catalisada) é uma das tecnologias de pré-tratamento mais aplicadas industrialmente e.g. produção de pasta, devido ao seu baixo consumo energético e baixo consumo de produtos químicos (Harmsen et al., 2010; Jørgensen et al., 2007).

Na explosão a vapor não catalisada, a biomassa é aquecida rapidamente com vapor até 160 – 260 °C, o que corresponde a uma pressão de 0,69 – 4,83 MPa, durante um curto espaço de

tempo, que varia entre alguns segundos até vários minutos, tipicamente, 1 a 10 min, e subitamente, é despressurizada até à pressão atmosférica. A água, por si só, atua como um ácido a temperaturas elevadas. A mistura biomassa/vapor é aquecida durante um período de tempo para promover a hidrólise das hemiceluloses e termina numa descompressão explosiva. As hemiceluloses tendem a ser hidrolisadas em ácido acético e outros ácidos libertados durante a explosão de vapor, pelo que este processo combina efeitos químicos com forças mecânicas. A remoção da lenhina da matriz celulósica é feita numa extensão limitada, acontecendo, maioritariamente, a sua redistribuição na superfície das fibras devido a reações de polimerização/despolimerização. A remoção de hemiceluloses e de lenhina tende a aumentar a área de superfície o que, conseqüentemente, promove a acessibilidade das enzimas (Galbe e Zacchi 2007; Jørgensen et al., 2007; Kumar et al., 2009; Mosier et al., 2005; Taherzadeh e Karimi 2008).

Este pré-tratamento torna-se vantajoso dado que é caracterizado por baixos consumos energéticos, comparativamente, à fragmentação mecânica, e não acarreta custos de reciclagem de reagentes nem custos ambientais, e.g. tratamento de efluentes. Contudo, durante explosão a vapor ocorre a formação de alguns compostos derivados da degradação das hemiceluloses que podem inibir os processos subsequentes, i.e. furfural, HMF, ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico (Alvira et al., 2010; Galbe e Zacchi 2007; Kumar et al., 2009).

A explosão a vapor pode ser melhorada através da adição de um ácido catalisador, como o  $H_2SO_4$  ou  $SO_2$ . A presença do ácido aumenta a recuperação dos açúcares hemicelulósicos e promove a hidrólise enzimática do resíduo sólido, além de diminuir o tempo e temperatura de operação. O uso de um qualquer ácido catalisador na explosão a vapor é similar ao pré-tratamento ácido diluído, mas com uma menor quantidade de líquido envolvida (Galbe e Zacchi 2007).

Contrariamente à explosão a vapor não catalisada, neste pré-tratamento são necessários equipamentos de materiais nobres por forma a serem resistentes à corrosão. Além disso, são necessários tratamentos de recuperação do catalisador e de efluentes (Alvira et al., 2010; Quilhó 2011).

Tal como a explosão a vapor, também a **água líquida sobreaquecida** (LHW – *Liquid Hot Water*) é um tratamento hidrotérmico. No entanto, este não requer uma rápida descompressão nem a necessidade de empregar um catalisador. Na LHW a pressão é aplicada para manter a

água no estado líquido a elevadas temperaturas (160 – 240 °C), durante cerca de 15 min, e provocar alteração na estrutura da biomassa. Consegue-se assim, a dissolução de 40 a 60% da biomassa, com remoção de 4 a 22% de celulose, 35 a 60% de lenhina e a maioria das hemiceluloses (Alvira et al., 2010; Moiser et al., 2005).

O objetivo da LHW é solubilizar a maioria das hemiceluloses para tornar a celulose mais acessível e evitar a formação de compostos inibidores. A “pasta” formada depois do pré-tratamento deve ser filtrada, formando-se duas frações: uma fração sólida enriquecida em celulose e uma fração líquida rica em açúcares derivados das hemiceluloses (Alvira et al., 2010). Este pré-tratamento promove a quebra da ligação dos grupos acetilo e dos ácidos urónicos das hemiceluloses, gerando ácido acético e outros ácidos orgânicos. Esta libertação catalisa a remoção e formação de oligossacarídeos, podendo ocorrer a formação de inibidores, em especial o furfural e o HMF (Mosier et al., 2005). Por forma a evitar a formação de inibidores, o pH deve ser mantido entre 4 e 5 durante o pré-tratamento, uma vez que a este pH os açúcares hemicelulósicos são retidos na forma oligomérica e a formação de monómeros é minimizada. Assim, a formação de produtos de degradação também é minimizada (Alvira et al., 2010).

Em geral, o pré-tratamento com água líquida sobreaquecida é bastante atrativo devido ao seu potencial de redução de custos, dado que não requer catalisadores nem equipamentos de elevados custos devido ao baixo potencial de corrosão. No entanto, requer elevados consumos de água e energia (Alvira et al., 2010).

Na **explosão de fibras com amoníaco** (AFEX – *Ammonia fiber explosion*) a biomassa é exposta a amoníaco líquido (NH<sub>3</sub>) a temperaturas entre 60 a 100 °C, a pressão elevada (acima de 3 MPa) durante um período de tempo variável (14 a 30 min) onde, findo esse tempo, ocorre uma despressurização do meio reacional, resultando numa rápida expansão do gás amoníaco, o que causa o intumescimento e rutura das fibras e a descristalização parcial da celulose (Alvira et al., 2010; Galbe e Zacchi 2007; Mosier et al., 2005; Kumar et al., 2009). O processo pode também ocorrer à temperatura e pressão ambiente durante 10 a 60 dias (Hendriks e Zeeman 2008). É usual a utilização de um a dois quilogramas de amoníaco por cada quilograma de biomassa seca (Kumar et al., 2009). Ao contrário da maioria dos pré-tratamentos que produz uma “pasta” que pode ser separada em duas frações, uma líquida e outra sólida, o proceso AFEX produz apenas material sólido pré-tratado (Alvira et al., 2010; Taherzadeh e Karimi 2008).

O pré-tratamento AFEX permite a modificação e/ou redução efetiva da fração da lenhina na biomassa lenhocelulósica, enquanto a celulose e hemiceluloses permanecem intactas, o que promove significativamente a hidrólise enzimática. Contudo, as condições operatórias ótimas do processo dependem da biomassa a ser tratada (Tahezadeh e Karimi 2008). Uma das maiores vantagens desta tecnologia é facto de não ocorrer formação de nenhum inibidor para as etapas seguintes do processo, ao contrário da maioria das restantes tecnologias de pré-tratamento. Contudo, parte dos fragmentos fenólicos da lenhina e de outros extratáveis da parede da célula podem permanecer na superfície das fibras, pelo que pode ser necessária a lavagem para remoção destes componentes, o que aumenta a corrente de efluentes a tratar. Além disso, o amoníaco deve ser reciclado no final do pré-tratamento para reduzir os custos e para não causar danos ambientais (Tahezadeh e Karimi 2008).

A **explosão com dióxido de carbono** é um pré-tratamento que se baseia na utilização de dióxido de carbono supercrítico, i.e. um fluido que resulta da compressão do CO<sub>2</sub> acima da temperatura crítica. As condições supercríticas a que a biomassa é exposta permite remover a lenhina e aumentar a digestibilidade do substrato. A adição de co-solventes como o etanol ou ácido acético pode potenciar a deslenhificação. Em solução aquosa o CO<sub>2</sub> forma ácido carbónico, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, o que favorece a hidrólise dos polímeros. O tamanho das moléculas de CO<sub>2</sub> é similar às moléculas de água e de amoníaco, pelo que pode penetrar da mesma forma nos pequenos poros da biomassa lenhocelulósica, o que é facilitado pela elevada pressão do meio reacional. Depois da explosão de CO<sub>2</sub>, ocorre a descompressão do meio, e a rutura da estrutura das hemiceluloses e celulose, aumentando, conseqüentemente, a área de superfície acessível ao ataque enzimático aumenta (Alvira et al., 2010; Kumar et al., 2009; Tahezadeh e Karimi 2008).

Comparativamente a outros métodos, o facto de operar a baixas temperaturas previne a degradação dos monossacarídeos e conseqüente formação de compostos inibidores, mas o rendimento da fermentação dos açúcares é menor que os obtidos pela explosão a vapor ou com amoníaco. A utilização da explosão de CO<sub>2</sub> é vantajosa na medida em que o seu reagente não é tóxico, não é inflamável e é de fácil recuperação (Alvira et al., 2010).

Em suma, existe uma vasta variedade de pré-tratamentos que podem ser aplicados na biomassa lenhocelulósica. Contudo, devido à diversidade de biomassa e da variabilidade em cada tipo, i.e. *hardwood*, *softwood* e espécies herbáceas, por exemplo, um pré-tratamento pode ser eficiente em palha de trigo e não o ser em choupo, pelo que, a escolha de um pré-tratamento deve ser tomada com base nas características da biomassa a tratar, no efeito pretendido e nas

características do próprio pré-tratamento. Além disso, as tecnologias supra apresentadas são apenas exemplos, sendo que outras não foram aqui descritas como é o caso da pirólise, gaseificação, aplicação de ultrassons, oxidação húmida e deslenhificação oxidativa.

Nos últimos anos, a investigação tem-se centrado no pré-tratamento com líquidos iónicos/solventes de baixo ponto eutéctico, mas dada a imensidade de líquidos iónicos possíveis esta temática ainda não se encontra totalmente desenvolvida, sendo um dos motes principais desta dissertação. Desta forma, surge a necessidade de dedicar a próxima secção exclusivamente a este pré-tratamento.

### **2.3.2. PRÉ-TRATAMENTO COM LÍQUIDOS IÓNICOS/SOLVENTES DE BAIXO PONTO EUTÉCTICO**

Os solventes/reagentes químicos comumente utilizados na indústria são considerados nefastos para o ambiente, dada a utilização massiva e conseqüente contaminação da atmosfera devido à sua natureza volátil ou acidez/basicidade elevada. Desta forma, a investigação tem-se centrado no princípio da engenharia “química verde” promovendo o uso de novos solventes, de onde se destacam os Líquidos Iónicos e os Solventes de Baixo ponto Eutéctico (*Deep Eutetic Solvent – DES*) (Dios 2013).

Os líquidos iónicos (LIs) são eletrólitos que em fase líquida são compostos apenas por iões, com aspeto semelhante a uma simples solução iónica, mas do ponto de vista estrutural, são completamente diferentes dado que não contêm moléculas de solvente. Os LIs são obtidos pela fusão de sais a temperaturas inferiores a 100 °C pelo que são designados por RTILs, i.e. *Room Temperature Ionic Liquids – Líquidos de Baixa Temperatura de Fusão* (Costa 2012; Dios 2013).

Uma das primeiras referências a LIs remete para 1880 quando Gabriel e Weiner reportam o uso de nitrato de etanol-amónio. No entanto, a síntese de nitrato de etilamónio por Walden em 1914 é considerado por muitos o nascimento do primeiro LI respeitando a sua definição. Até 1990 a investigação direcionada para os LIs era escassa, mas neste ano Wilkes e Zaworotko despertam o interesse com a demonstração da estabilidade dos LIs criados pela substituição de cloreto de alumínio com outros aniões, como tetrafluoroborato ou hexafluorofosfato. A partir desta data, o número de publicações científicas tem vindo a aumentar exponencialmente ao longo dos anos (Costa 2012; Dios 2013).

A baixa temperatura de fusão dos LIs deve-se ao baixo número de coordenação de cátions e aniões que os constituem, sendo formados a partir da fraca coordenação do anião, e da grande assimetria do catião orgânico. Estas características tendem a diminuir o empacotamento, reduzindo a energia reticular da forma cristalina do sal. Devido à elevada variedade de aniões e cátions presentes na Natureza, a liberdade para “desenhar” o catião orgânico (pela variação do tamanho da cadeia lateral ou pela variedade de substituintes do anel e/ou da cadeia) e as diferentes possibilidades de combinação entre catião e anião, pode-se potencialmente criar milhões de LIs diferentes (Dios 2013).

Em 2003, Abbott e os seus colaboradores apresentaram um novo tipo de solvente, formado a partir de dois materiais sólidos com elevados pontos de fusão, a ureia ( $T_f=134\text{ °C}$ ) e cloreto de colina ( $T_f=302\text{ °C}$ ), na razão molar de 1:2, produzindo um líquido incolor que funde a  $12\text{ °C}$ , introduzindo assim o termo *deep-eutetic solvent* (DES).

Um DES é, geralmente, composto por dois ou três componentes baratos e seguros que são capazes de se associar entre si, através de ligações de hidrogénio, formando uma mistura eutéctica. Resulta da correta combinação entre um dador de ligação de hidrogénio (HBD – *hydrogen-bond donor*) e um aceitador de ligação de hidrogénio (HBA – *hydrogen-bond acceptor*). Os mais comumente utilizados encontram-se na Figura 11. O DES resultante é caracterizado pelo baixo ponto de fusão relativamente aos seus componentes originais, com uma elevada depressão do seu ponto de congelação, tornando-se líquidos a temperaturas inferiores a  $150\text{ °C}$ , estando a maioria no estado líquido a temperaturas inferiores a  $70\text{ °C}$ . Na maioria dos casos, os DESs baseiam-se na mistura de um sal quaternário de amónio, normalmente o cloreto de colina – ( $\text{HOC}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$ ) com outros componentes incluindo sais metálicos (Costa 2012; Francisco et al., 2013; Zhang et al., 2012).

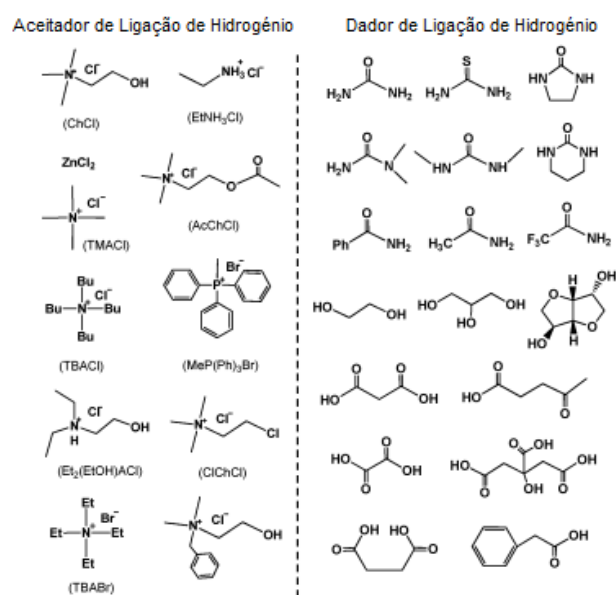


Figura 11. Estrutura típica de HBAs e HBDs usados na síntese de DES (Zhang et al., 2012).

Estes solventes podem ser representados por uma fórmula geral do tipo:  $R_1R_2R_3R_4N^+X^- \cdot zY$ , em que  $R_1R_2R_3R_4N^+$  corresponde a um catião quaternário de amónio, e  $z$  refere-se à quantidade  $Y$  que complexa com  $X^-$ , existindo quatro tipos de DES (Costa 2012; Zhang et al., 2012):

**Tipo I:**  $Y=MCl_x$  onde,  $M=Zn, Sn, Fe, Al$  ou  $Ga$

**Tipo II:**  $Y=MCl_x \cdot yH_2O$  onde,  $M=Cr, Co, Cu, Ni$  ou  $Fe$

**Tipo III:**  $Y=R_5Z$  onde,  $Z= -CONH_2, -COOH, -OH$

**Tipo IV:**  $Y=RZ$  onde,  $R=ZnCl_2$  e  $Z=(NH_2)_2CO, C_2H_4(OH)_2, C_2H_5NO$  ou  $HO((CH)_2)_6OH$

Em 2011, Choi et al., apresentaram a descoberta de 30 combinações com cloreto de colina, ácidos carboxílicos, diferentes açúcares e até mesmo água, que formavam um líquido viscoso, designado “solvente natural de baixo ponto eutéctico” (NADESs – *natural deep-eutetic solvents*). Outros autores (Francisco et al., 2012) também prepararam novos solventes verdes seguindo esta linha de investigação, nomeadamente combinando cloreto de colina, aminoácidos, ácidos carboxílicos e outros reagentes amigos do ambiente, designando-os “líquidos de baixa temperatura de transição vítrea” (LTTM – *Low-Transition-Temperature Mixture*).

A diversidade de combinações possíveis de matérias-primas é uma ferramenta poderosa no controlo das propriedades físicas e no comportamento das fases dos LTTMs, bem como a capacidade de dissolução de inúmeros solutos de diferentes naturezas. A maioria dos LTTMs tem vantajosas qualidades como solventes, nomeadamente:

- Fase líquida numa larga gama de temperaturas;
- Baixa pressão de vapor;
- Compatibilidade com a água;
- Não inflamabilidade;
- Biocompatibilidade;
- Biodegradabilidade.

A maior das vantagens é a sua fácil preparação, uma vez que os LTTMs podem ser formados pela simples mistura das matérias-primas a temperaturas moderadas sem necessidade de uma etapa de purificação. A maioria pode ser preparada a partir de materiais baratos, facilmente disponíveis e toxicologicamente bem caracterizados, o que permite a obtenção de um solvente de baixo custo. Desta forma, os DES são alternativas versáteis aos líquidos iónicos

convencionais, dado que partilham as suas vantagens e ultrapassam as suas limitações e.g. serem geralmente difíceis de sintetizar, serem caros e feitos a partir de recursos petroquímicos e serem não biodegradáveis nem renováveis. Além disso, as matérias-primas dos LTTMs são facilmente recuperáveis pela rutura ou alteração da matriz estrutural (Francisco et al., 2012; Kroon et al., 2013).

Dada a sua versatilidade, os LTTMs já foram aplicados com sucesso em diversas áreas, nomeadamente, na eletroquímica, processos de separação, catálise, síntese e preparação de materiais, e bioaplicações. Dada as últimas publicações, os LTTMs têm um papel promissor na dissolução da biomassa lenhocelulósica (Francisco et al., 2012; Kroon et al., 2013).

Como já referido, um LTTM é formado a partir de um dador e um aceitador de ligação de hidrogénio, pelo que, a seleção dos materiais de partida é realizada tendo em conta os seus grupos funcionais e a possibilidade de existirem interações que permitem a rutura da estrutura recalcitrante da biomassa lenhocelulósica. Por exemplo, um LTTM pode resultar de sais com ácidos orgânicos ou aminoácidos (e.g. cloreto de colina + ácido málico), ácidos orgânicos com aminoácidos (e.g. prolina + ácido málico), sais com álcoois ou aldeídos (e.g. cloreto de colina + glicerol) ou ácidos orgânicos com álcoois, hidratos de carbono ou aldeídos (e.g. frutose + glucose + ácido málico), etc. (Kroon et al., 2013).

A afinidade do protão (PA – *proton affinity*) desempenha um papel crucial no vínculo da ligação de hidrogénio, pelo que, o  $pK_a$  é um fator de seleção na partilha de ligações-H. A acidez do protão é também responsável pela formação de um LTTM em vez de um LI. Para que um líquido iónico seja formado, é necessário a combinação de uma base forte com elevado  $pK_a$  com um dador de ligações-H ou de um ácido forte com um aceitador de ligações-H (Francisco et al., 2012; Kroon et al., 2013).

De acordo com Naser e os seus colaboradores, a preparação dos LTTM é realizada através da mistura do dador e o aceitador de hidrogénio a uma determinada temperatura, dependendo da estabilidade e do ponto de fusão dos diferentes materiais iniciais, com agitação mecânica de 400 rpm. Na Tabela 3 é possível observar a combinação dos diferentes aceitadores e dadores de ligação de hidrogénio utilizados no desenvolvimento da presente dissertação.



**Tabela 3.** Dador e aceitador de ligação de hidrogénio (Marques 2015).

<b>DADOR DE LIGAÇÃO-H</b>	<b>ACEITADOR DE LIGAÇÃO-H</b>	<b>TEMPERATURA DE PREPARAÇÃO</b>	<b>RAZÃO MOLAR</b>	<b>NOMENCLATURA</b>
Glicerol	Carbonato de Potássio	80 °C	200:1	[GCP 200:1]
			100:1	[GCP 100:1]
			50:1	[GCP 50:1]
			20:1	[GCP 20:1]
Ácido Láctico	Cloreto de (2-cloroetil) trimetilamónio	65 °C	5:1	[LCCETMA 5:1]
			10:1	[LCCETMA 10:1]

Os solventes usados para dissolver a lenhina da biomassa são bastante seletivos a temperaturas moderadas (cerca de 60 °C ou, numa segunda gama de temperatura, de 60 a 100 °C), enquanto a celulose e as hemiceluloses não se dissolvem. Esta gama de temperaturas é a aconselhável, dado que, a baixas temperaturas a viscosidade do LTTM é demasiado elevada, tornando a cinética de dissolução lenta, e a elevadas temperaturas o risco de decomposição do LTTM é elevado.

Um solvente seletivo é capaz de separar a lenhina da celulose de uma forma energeticamente eficiente sem a ocorrência de degradação dos polissacarídeos. A mistura constituída pela lenhina dissolvida e pelo LTTM pode ser separada do resíduo sólido através de uma separação líquido/sólido – filtração, sedimentação ou centrifugação. Além disso, a celulose e as hemiceluloses excedentes podem ser hidrolisadas no solvente a elevadas temperaturas (cerca de 120 °C), sendo vantajoso devido à atividade catalítica do LTTM e da tolerância das enzimas ao solvente. A lenhina dissolvida pode ser recuperada do LTTM pela adição de água por forma a precipitar a lenhina. A mistura (LTTM ou DES)/água pode ser encaminhada para os efluentes líquidos, mas, de modo a que o processo seja economicamente viável, o solvente deve ser reciclado. Existem inúmeras possibilidades, nomeadamente, a evaporação de água, caso se trate de uma pequena quantidade, ou pode ser adicionado um solvente que não forme ligações de hidrogénio, e.g. acetona, recuperando o LTTM na forma sólida. Após um aquecimento, o LTTM torna à sua forma líquida podendo ser novamente utilizado. A única exigência energética é a separação da acetona da água por destilação, permitindo a reutilização de ambos (Dai et al., 2013; Kroon et al., 2013).

Esta tecnologia de pré-tratamento tem-se revelado bastante vantajosa sobre as tecnologias anteriores, nomeadamente devido a (Kroon et al., 2013):

- Os LTTMs ou DESs são solventes de baixo custo, renováveis e/ou ingredientes alimentares não tóxicos;

- Os LTTMs ou DESs dissolvem de forma seletiva a lenhina da biomassa;
- Uma elevada eficiência ( $\geq 90\%$ ) na recuperação da lenhina pode ser alcançada;
- A lenhina recuperada é de máxima qualidade quando comparada à lenhina recuperada convencionalmente, podendo ser valorizada;
- A celulose remanescente é de elevada qualidade (menor degradação e fibras mais longas devido às condições de processamento moderadas) comparativamente à celulose obtida pelos processos convencionais;
- Uma menor quantidade de água é necessária em comparação aos processos convencionais, o que se significa que a energia requerida no processo de recuperação é consideravelmente menor.

### 2.3.3. HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DE MATERIAIS LENHOCELULÓSICOS PRÉ-TRATADOS

A hidrólise ou sacarificação permite a quebra das ligações de hidrogénio e glicosídicas nas frações remanescentes das hemiceluloses e da celulose após o pré-tratamento a que foram sujeitos os materiais lenhocelulósicos, reduzindo-as aos seus monómeros constituintes: pentoses e hexoses. Desta forma, os açúcares simples podem ser fermentados em (bio)etanol, com recurso a leveduras ou bactérias, enquanto a lenhina, subproduto do processo, pode ser valorizada (Devarapalli e Atiyed 2015; Quilhó 2011).

Os processos mais comuns são a hidrólise enzimática e a hidrólise química. Os métodos referidos anteriormente, i.e. irradiação com raios gama, ou com feixe de eletrões ou com micro-ondas, não são usuais devido ao elevado custo e inviabilidade económica que ainda apresentam (Quilhó 2011). Na presente dissertação apenas será abordada a hidrólise química e a hidrólise enzimática, com ênfase na última.

A **hidrólise química** é efetuada em condições semelhantes às descritas anteriormente para os materiais lenhocelulósicos sem pré-tratamento, sendo predominante o uso da hidrólise ácida, com ácido concentrado ou com ácido diluído. Na Tabela 4 encontra-se uma comparação entre estes dois métodos (Taherzadeh e Karimi 2007).

**Tabela 4.** Comparação dos métodos de hidrólise ácida (Tahezadeh e Karimi 2007).

<b>MÉTODO DE HIDRÓLISE ÁCIDA</b>	<b>VANTAGENS</b>	<b>DESVANTAGENS</b>
Hidrólise com Ácido Concentrado	Operação a baixa temperatura; Elevado rendimento de hidrólise.	Elevado consumo de ácido; Corrosão do equipamento; Elevado consumo energético na recuperação de ácido.
Hidrólise com Ácido Diluído	Baixo consumo de ácido; Curto tempo de operação.	Operação a elevadas temperaturas; Baixo rendimento de hidrólise; Corrosão do equipamento; Formação de inibidores.

Tal como o próprio nome indica, a **hidrólise enzimática** é realizada com recurso a enzimas, que são proteínas naturais que catalisam determinadas reações químicas. Para que estas funcionem correta e eficientemente devem ter acesso às moléculas a hidrolisar, pelo que é crucial o pré-tratamento do material lenhocelulósico por forma a, pela remoção de lenhina, expor a celulose e as hemiceluloses e, simultaneamente, destruir a cristalinidade da celulose (Sun e Cheng 2002).

O custo dos equipamentos necessários são inferiores quando comparados com a hidrólise química, dado que a hidrólise enzimática ocorre a operações menos exigentes, e.g. pH = 4,8 e T = 45 – 50 °C, e não apresenta problemas de corrosão (Sun e Cheng 2002).

Uma eficiente hidrólise enzimática da celulose requer a utilização de enzimas designadas celulasas, que são normalmente uma mistura de diversas enzimas. Estas podem ser obtidas através de diversos microrganismos (bactérias e fungos) que podem ser aeróbios ou anaeróbios, mesófilos ou termófilos (Sun e Cheng 2002). As bactérias pertencentes aos géneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwina*, *Acetovibrio*, *Microbispora* e *Streptomyces* produzem eficientemente celulasas. Similarmente, também as espécies de fungos *Sclerotium rolfisii* e *P. chrysosporium* e os géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicilium* são utilizadas para produzir celulasas (Sun e Cheng 2002).

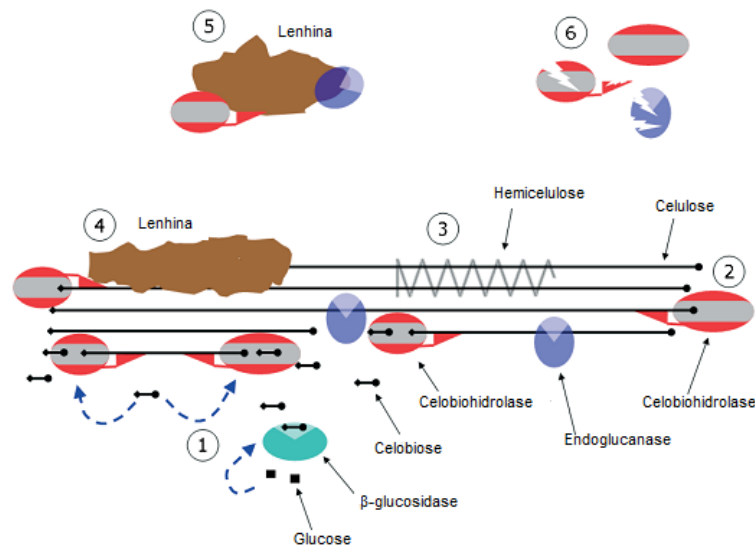
De acordo com o sistema de classificação, as enzimas celulolíticas são divididas em três classes:

- i. Exo-1,4-β-D-glucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) – movem-se progressivamente ao longo da cadeia de celulose e quebram as unidades de celulose a partir do seu fim;

- ii. Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases (EC 3.2.1.4) – hidrolisa aleatoriamente as ligações internas  $\beta$ -1,4-glucosídicas na cadeia de celulose;
- iii. 1,4- $\beta$ -D-glucosidases (EC 3.2.1.21) – hidrolisam a celobiose em glucose e quebram as unidades de glucose de celo-oligossacarídeos.

Todas estas enzimas trabalham sinergicamente para hidrolisar a celulose criando zonas acessíveis para outras enzimas (Jørgensen et al., 2007; Sun e Cheng 2002).

São diversos os factores que afetam a hidrólise enzimática da celulose, nomeadamente, o substrato, a atividade enzimática e as condições operatorias (temperatura, pH, entre outros) (Sun e Cheng 2002). Na Figura 12 encontram-se representados alguns factores que diminuem o desempenho das enzimas.



**Figura 12.** Visão simplificada dos fatores que afetam a hidrólise eficiente da celulose. 1. Inibição da  $\beta$ -glucosidase e celobiohidrolase pela glucose e celobiose, respetivamente; 2. Ligação improdutiva da celobiohidrolase à cadeia de celulose; 3 – 4. Hemiceluloses e lenhina associadas às microfibrilas impedindo o acesso das celulases à superfície da celulose; 5. Enzimas adsorvidas na superfície da lenhina; 6. Desnaturação ou perda de atividade enzimática devido a forças de cisalhamento, atividade proteolítica ou baixa termoestabilidade (adaptado de Jørgensen et al., 2007).

Por sua vez, a hidrólise das hemiceluloses presentes no material lenhocelulósico é conseguida através de hemicelulases. Contudo, devido à variabilidade de hemiceluloses entre espécies, a mistura ótima de enzimas tem de ser testada e/ou ajustada para cada material (Jørgensen et al., 2007).

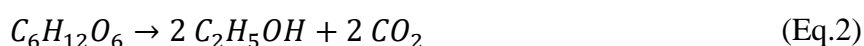
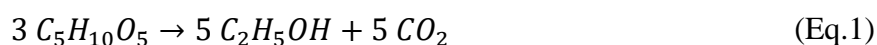
As hemicelulases são mais heterogêneas que as celulases, com mais grupos laterais, pelo que o sistema hemicelulolítico é mais complexo. Tal como as celulases, as hemicelulases podem ser

obtidas através de fungos e bactérias como *Trichodera* spp., *Aspergillus* spp. e *Bacillus* spp (Jørgensen et al., 2007; Quilhó 2011).

O sistema hemicelulolítico é constituído por (Jørgensen et al., 2007):

- i. Endo-1,4-β-D-xilanases (EC 3.2.1.8) – hidrolisam as ligações internas na cadeia de xilana;
- ii. 1,4-β-D-xilosidases (EC 3.2.1.37) – atacam os xilo-oligossacarídeos a partir de grupos terminais não redutores e libertam xilose;
- iii. Endo-1,4-β-D-manases (EC 3.2.1.78) – quebram as ligações internas da manose;
- iv. 1,4-β-D-manosidases (EC 3.2.1.25) – hidrolisam mano-oligossacarídeos em manose;
- v. α-D-galactosidases (EC 3.2.1.22), α-L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), α-glucuronidases (EC 3.2.1.139), acetil xilano esterase (EC 3.1.1.72), ácido ferúlico e p-cumárico esterase (EC 3.1.1.73) – quebram os grupos laterais.

Tal como referido anteriormente, na fermentação etanólica, os microrganismos utilizam os açúcares simples como substrato, produzindo etanol e outros subprodutos. De acordo com a estequiometria das reações de fermentação de pentoses e hexoses em etanol, equação 1 e 2, respetivamente, a produção teórica máxima é de 0,51 kg de etanol e de 0,49 kg de dióxido de carbono por quilograma de açúcar fermentado (Quilhó 2011).



O desempenho dos diversos microrganismos na fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos, nomeadamente os que possuem a capacidade de fermentar a xilose depende de diversos fatores, entre os quais a estirpe do microrganismo selecionado e as condições de fermentação. Também a matéria-prima e os processos antecedentes à fermentação influenciam fortemente a composição dos hidrolisados e conseqüentemente a sua fermentabilidade. Contrariamente ao bioetanol de 1ª geração, cuja tecnologia se encontra bem estabelecida, o processo de conversão de biomassa lenhocelulósica é mais complexa devido à mistura de diversos tipos de açúcares e à presença de compostos inibidores, libertados durante o pré-tratamento e/ou a hidrólise química da matéria-prima (Devarapalli e Atiyed 2015; Hahn-Hägerdal et al., 2006; Mendes 2009).

É usual a utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, dada a sua significativa robustez, sendo adequada à fermentação do hidrolisado de materiais lenhocelulósicos. Esta levedura fermenta facilmente as hexoses, não sendo capaz de fermentar a xilose. Contrariamente, leveduras como a *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e a *Candida parapsilosis*, são capazes de metabolizar a xilose. Assim, a fermentação de etanólica dos hidrolisados lenhocelulósicos pode ser eficientemente conseguida pela *S. cerevisiae* recombinante, i.e. transportando os genes da *P. stipitis* (Hahn-Hägerdal et al., 2006; Mendes 2009).

Além de leveduras, podem ser utilizados outros microrganismos fermentativos, como bactérias e fungos. As bactérias das espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* e *Zymomonas mobilis* têm suscitado interesse na prática industrial devido à sua elevada velocidade de fermentação (Die et al., 2003; Hamelinck et al., 2005).

Tradicionalmente, a hidrólise enzimática pode ocorrer separada da fermentação, conhecida por Hidrólise e Fermentação Separadas – SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation) ou na presença de microrganismos fermentativos tratando-se de Hidrólise e Fermentação Simultâneas – SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation). Mais recentemente são referidos ainda o processo simultâneo com inoculação tardia (dSSF – *simultaneous processes with delayed inoculation*) e o processo designado bioprocessamento consolidado (CBP – *consolidated bioprocessing*) (Paulova et al., 2015; Mosier et al., 2005).

A estratégia de **hidrólise e fermentação separadas** consiste em duas operações consecutivas. Primeiramente, os hidratos de carbono contidos na fase sólida do material pré-tratado são hidrolisados usando um complexo enzimático (celulases e hemicelulases). A mistura de açúcares libertados (hexoses e pentoses), é convertida em etanol por ação de uma estirpe microbiana na etapa fermentativa. Ambos os processos podem ocorrer sob as condições ótimas para o seu desempenho (temperatura, pH, composição nutricional, teor de sólidos), sendo esta a maior vantagem deste processo SHF, dado que a temperatura ótima para cada etapa varia significativamente. No caso da maioria das enzimas celulolíticas a temperatura ótima ronda os 50 °C, enquanto para a maioria das estirpes microbianas (usualmente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Zymomonas mobilis*) produzem etanol de forma eficiente entre 28 a 37 °C. Além disso, o desempenho das enzimas não é influenciada pela presença de etanol, ao contrário do que acontece nos processos em simultâneo, e a viscosidade do meio é consideravelmente reduzida antes da fermentação, o que influencia positivamente a viabilidade das estirpes microbianas, permitindo uma eficiente mistura e transferência de nutrientes e calor.

Contudo, a inibição da atividade enzimática pelo aumento da concentração de glucose (ou celobiose) libertada diminui a taxa de hidrólise (Paulova et al., 2015; Srivastava et al., 2015).

O processo de **sacarificação e fermentação simultâneas** é mais atrativo que o SHF, devido ao maior rendimento de etanol obtido e ao menor consumo energético. Neste processo, as enzimas celulolíticas e os microrganismos fermentativos são adicionados no mesmo reator, permitindo que os açúcares libertados sejam imediatamente consumidos pela estirpe microbiana produzindo etanol. Desta forma, não existe acumulação no meio de cultura do produto final (açúcares) que inibe a atividade enzimática, melhorando a conversão enzimática e diminuindo o tempo de processamento. A redução de custos e o baixo risco de contaminação são frequentemente apontados como um dos fatores positivos deste processo SSF (Paulova et al., 2015; Srivastava et al., 2015).

A maior desvantagem do processo SSF é a necessidade de otimização iterativa da temperatura de operação, dado que as temperaturas ótimas para a atividade enzimática e para a atividade fermentativa são significativamente diferentes. Esta discrepância é usualmente ultrapassada diminuindo a temperatura de hidrólise para que seja compatível com a temperatura ótima da estirpe microbiana, sendo, usualmente, aplicada uma temperatura de 37 °C, ou através da utilização de uma estirpe microbiana termo-tolerante (Paulova et al., 2015).

Alguns dos problemas do SSF podem ser eliminados, ou pelo menos reduzidos, pela integração de uma etapa de pré-hidrólise, dando origem ao **processo simultâneo com inoculação tardia**. Os hidratos de carbono são primeiramente hidrolisados com celulases à sua temperatura ótima, e depois o meio reacional é arrefecido até à temperatura de operação do SSF e, imediatamente, inoculado. A duração da pré-hidrólise é um fator que afeta o rendimento, a produtividade e a concentração final de etanol, o que conseqüentemente afeta o processo global (Paulova et al., 2015).

O **bioprocessamento consolidado** pode ser definido como um processo de uma única etapa onde a biomassa é diretamente convertida no produto desejado por um microrganismo especial ou um consórcio microbiano sem que o seu pré-tratamento seja requerido. O maior desafio do CBP é a seleção ou *design* do microrganismo/consórcio microbiano adequado que expresse apropriadamente a ligação entre as enzimas hidrolíticas e a matéria-prima lenhocelulósica para que ocorra a produção eficiente de etanol (Paulova et al., 2015).

Os microrganismos que podem ser utilizados no CBP de materiais lenhocelulósicos podem ser categorizados em dois grupos (Paulova et al., 2015):

- i. Produtores de celulasas (Categoria I de produtores de CBP) – incluem bactérias celulolíticas termofilias como a *Clostridium thermocellum*, *Geobacillus thermoglucosidans*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* ou *Thermoanaerobacter mathranii* e fungos celulolíticos como *Trichoderma reesei* ou *Paecilomyces variotti*;
- ii. Produtores de etanol (Categoria II de produtores de CBP) – consistem em produtores tradicionais de etanol desenvolvidos como a *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* e *Kluyveromyces marxianus*.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

##### 3.1.1. MADEIRA DE ACACIA DEALBATA

Uma amostra de um tronco de madeira de *Acacia dealbata* (vulgarmente designada por Mimosa), foi a matéria-prima usada neste trabalho, cuja composição química se encontra na Tabela 5. Foram determinados os teores de lenhina Klason e solúvel, de acordo com as normas TAPPI T222 e TAPPI UM 250, respetivamente, e de extratáveis, em consonância com a norma TAPPI 204 cm. Estes procedimentos encontram-se no Anexo I.

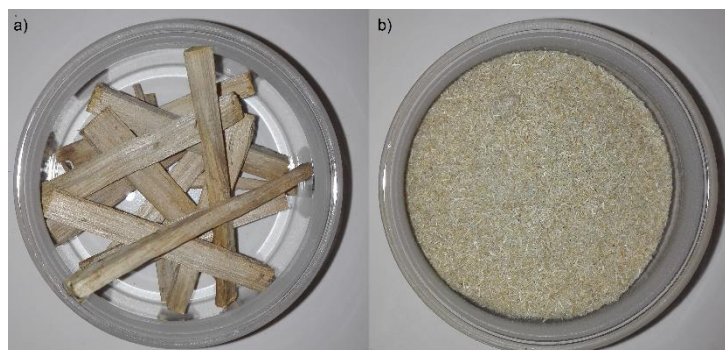
**Tabela 5.** Composição química de *Acacia dealbata*, expressa em percentagem mássica de matéria seca.

AMOSTRA	COMPONENTE	PERCENTAGEM MÁSSICA (%)	OBSERVAÇÕES
Madeira do tronco	Lenhina		Determinação Experimental neste trabalho
	▪ Klason	22,8	
	▪ Solúvel	4,6	
	Extratáveis	3,4	
Mistura de caules e folhas	Celulose	43,1	Ferreira et al., 2011
	Xilana	18,7	
	Lenhina		
	▪ Klason	20,7	
	▪ Solúvel	5,2	
	Ácido acético	4,8	
	Ácido fórmico	1,6	
	Extratáveis	8,3	
	Cinzas	1,1	
	Madeira do tronco	Celulose	
Xilana		15,6	
Lenhina			
▪ Klason		22,4	
▪ Solúvel		n.d.	
Grupos acetilo		3,3	
Extratáveis		5,1	
Cinzas	0,6		

Os valores obtidos são comparáveis aos reportados na literatura para esta espécie, apesar da variabilidade natural da madeira. As diferenças que se observam no teor de extratáveis devem-se ainda, por um lado, à utilização de solventes diferentes (acetona em vez da mistura etanol:tolueno, como em Yanez et al., 2013) e à inclusão de ramos e folhas na amostra (como em Ferreira et al., 2011) (maior teor de extratáveis).

A madeira foi previamente cortada num formato similar ao de estilha (Figura 13a), por forma a facilitar a sua moagem, e moída num moinho Retsch (Modelo 5657) até ficar praticamente

em serradura (Figura 13b). Posteriormente foi crivada e selecionada a gama de tamanhos de partícula pretendida, i.e. 0,250 – 0,500 mm.



**Figura 13. a)** *Acacia dealbata* em formato de estilha; **b)** Fração de *Acacia dealbata* moída.

A fração selecionada foi extraída em acetona num extrator Soxhlet (TAPPI 204 cm-97) para evitar que os extratáveis afetassem as metodologias usadas para determinação da composição química da madeira original e da madeira pré-tratada com os líquidos LTTM.

### 3.1.2. REAGENTES

Para a concretização deste trabalho experimental foram necessários diversos reagentes usados i) na preparação e caracterização da matéria-prima, ii) na preparação dos LTTMs, para o pré-tratamento, iii) na caracterização dos materiais lenhocelulósicos obtidos, iv) nos processos de hidrólise e fermentação destes. Listam-se os principais:

- Ácido láctico-L (+) (80%) da Sigma Aldrich;
- Cloreto de (2-cloroetil) trimetilamónio ( $\geq 98\%$ ) da Sigma Aldrich;
- Carbonato de potássio ( $\geq 99\%$ ) da Panreac;
- Glicerol ( $\geq 99,5\%$ ) da VWR Chemicals;
- Extrato de levedura da Himedia;
- Extrato de malte da Sigma Aldrich;
- Peptona da Himedia;
- Glucose pura da Sigma Aldrich ;
- Etanol (99%) da VWR Chemicals;
- Ácido sulfúrico (95 – 97%) da Sigma Aldrich;
- Acetona ( $\geq 99,5\%$ ) da Fischer Scientific UK;
- Extrato enzimático Cellic CTec2 (gentilmente oferecida pela Novozymes), cuja atividade enzimática era, aproximadamente,  $142 \text{ FPU} \cdot \text{mL}_{\text{enzima}}^{-1}$ ;

- Levedura *Saccharomyces Cerevisae* ATCC 26 602 da American Type Culture Collection (Virginia, EUA).

Além destes, foi ainda necessário usar água destilada, água ultrapura e etilenoglicol (99%) da Panreac como fluido de aquecimento, dado que apresenta um elevado ponto de ebulição, ~197 °C.

### 3.1.3. EQUIPAMENTOS E OUTROS MATERIAIS DE LABORATÓRIO

Para a preparação dos líquidos LTTM, para os ensaios de dissolução da madeira, para a caracterização dos materiais obtidos e para a hidrólise e fermentação da madeira pré-tratada, foram necessários os seguintes equipamentos e materiais:

- Moinho Retsch (Modelo 5657);
- Duas placas de aquecimento com agitação mecânica e controlo de temperatura (Ovan MCG15E e P Selecta Agimactic-N);
- Um agitador mecânico (Heidolph RZR1);
- Magnetes;
- Dois copos para o líquido de aquecimento e dois copos para a dissolução da madeira;
- Garras, nozes e suportes para segurar os copos com o líquido de aquecimento e as sondas de controlo de temperatura deste;
- Espectrofotómetro UV/VIS (PGInstruments T60);
- Centrífuga (Universal 32 Hettich);
- Incubadora orbital (Stuart 5150);
- Autoclave (Raypa, Reagente 5);
- Frascos de plástico com tampa e Erlenmeyers para a hidrólise e fermentação da madeira pré-tratada;
- Coluna Aminex HPX-87P, Biorad e pré-coluna PL HI-PLEX ca.



**Figura 14.** Equipamento necessário: **a)** dissolução da madeira; **b)** hidrólise do material não dissolvido; **c)** fermentação do hidrolisado obtido.

Na Figura 14a é possível observar a montagem devidamente organizada de todos os equipamentos necessários para a dissolução da madeira no líquido LTTM, sendo que esta montagem foi efetuada em duplicado com intuito de otimizar o tempo disponível uma vez que a maioria dos ensaios demorava 16 horas. Na Figura 14b e 14c é possível observar um pormenor dos ensaios de hidrólise e fermentação.

### **3.2.PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

O procedimento experimental utilizado encontra-se esquematizado na Figura 15, tendo sido baseado em estudos já descritos na literatura (Ferreira et al., 2013; Marques 2015; Yáñez et al., 2013). Serão em seguida explicadas cada uma das etapas deste procedimento experimental.

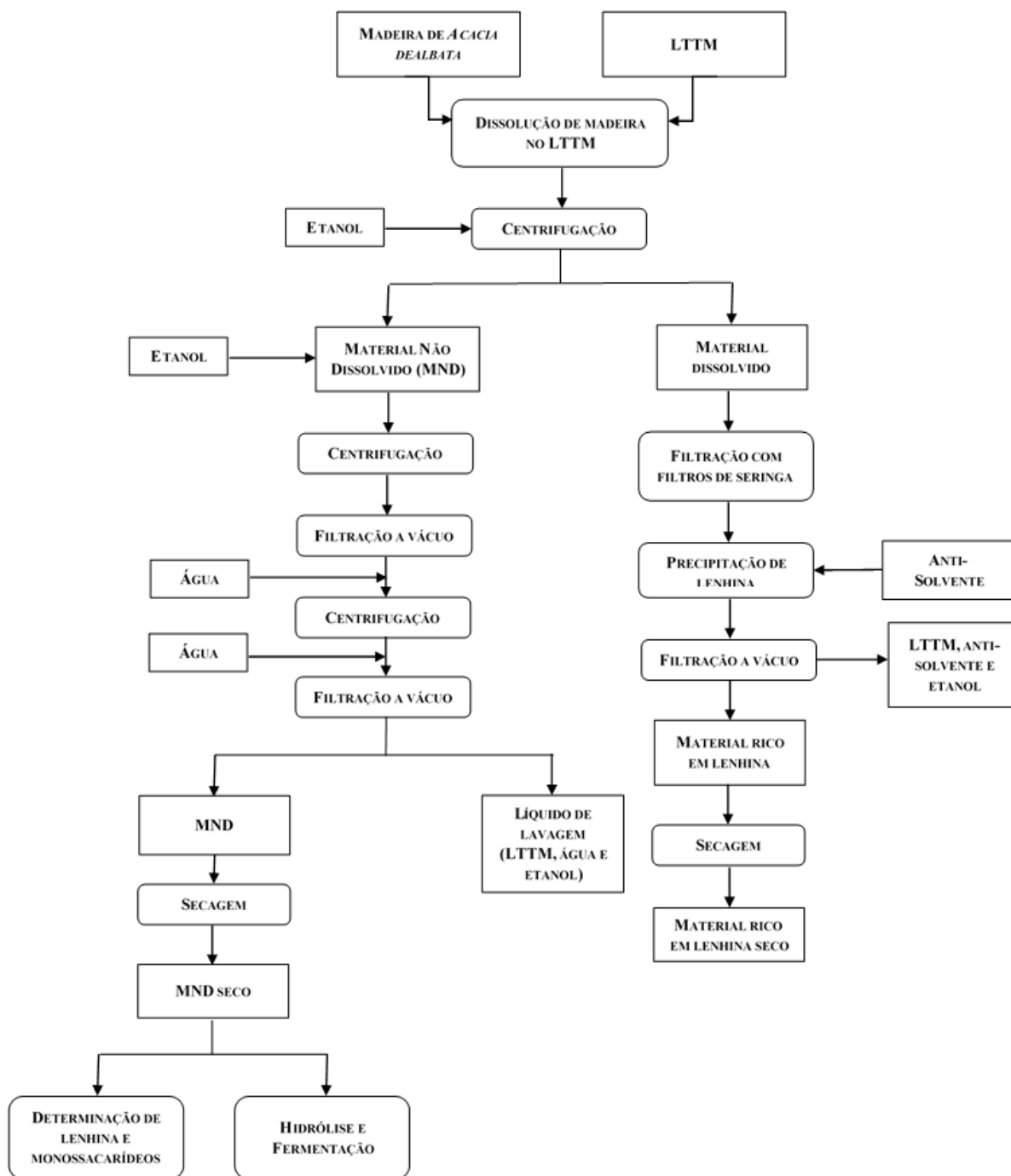


Figura 15. Esquema do procedimento experimental.

Como através dos resultados da fermentação do material lenhocelulósico se verificou que a etapa de lavagem do material não dissolvido não estava a ser eficiente, procedeu-se ao desenvolvimento e otimização desta etapa como apresentado no Anexo II.

O esquema da Figura 15 corresponde a 1 ciclo de tratamento. Para algumas condições operatórias foram efetuados 2 ciclos de tratamento, isto é, à madeira pré-tratada no final do 1º ciclo foi adicionado novamente LTTM fresco e seguiu-se a mesma metodologia.

### 3.2.1. PREPARAÇÃO DOS LÍQUIDOS LTTM

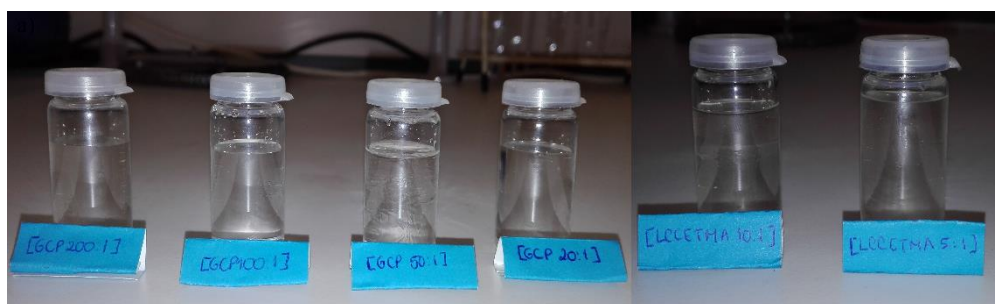
Usando gobelés de 50 mL foi efetuada a pesagem das quantidades necessárias de cada reagente. O gobelé foi colocado num banho de aquecimento com etilenoglicol, cuja temperatura variou consoante o LTTM a preparar – Tabela 6. Ligou-se o agitador mecânico, munido de uma hélice, com uma velocidade de rotação de 400 rpm.

**Tabela 6.** Condições de preparação dos líquidos LTTM (Marques 2015; Naser et al., 2013).

REAGENTES		RAZÃO MOLAR	LTTM	TEMPERATURA DE PREPARAÇÃO	TEMPO
Glicerol (≥99,5%)	Carbonato de Potássio (≥99%)	200:1	[GCP 200:1]	80 °C	2h
		100:1	[GCP 100:1]		
		50:1	[GCP 50:1]		
		20:1	[GCP 20:1]		
Ácido Láctico (95%)*	Cloreto de (2-cloroetil) trimetilamónio (≥98%)	5:1	[LC CETMA 5:1]	65 °C	4h
		10:1	[LC CETMA 10:1]		

\*Ácido láctico (95%) – obtido a partir de ácido láctico a 80%, após evaporação de ~15% de água.

Na Figura 16 é possível observar os líquidos LTTM usados nos ensaios de dissolução da madeira de *Acacia dealbata*, obtidos conforme supra descrito.



**Figura 16.** Líquidos LTTM obtidos e usados nos ensaios de dissolução.

### 3.2.2. DISSOLUÇÃO DA MADEIRA

Usando uma relação madeira/líquido de 1/22, foram pesadas as quantidades de madeira (com tamanho de partícula na gama selecionada, [0,250 – 0,500] mm), e de LTTM necessárias para os ensaios de dissolução. Na maioria dos ensaios, pesou-se cerca de 0,50 g de madeira (base húmida). Como a madeira apresentava uma humidade de 11% o correspondente valor em base seca é cerca de 0,45 g. A dissolução efetuou-se num gobelé de 25 mL colocado num banho de aquecimento com etilenoglicol. A agitação magnética da mistura foi mantida constante e igual

a 700 rpm para todos os ensaios realizados. As restantes condições operatórias foram as seguintes:

- Temperaturas – 65 a 80 °C consoante o LTTM a ser usado e/ou o estudo das condições de operação;
- Tempos de dissolução – 1 ciclo (16h) a 2 ciclos (16h + 16h) ou 2 a 10 h para estudo da cinética de dissolução.

Findo o tempo de tratamento de dissolução da madeira, retirou-se o gobelé do banho e deixou-se arrefecer (10 a 15 min). Seguidamente, transferiu-se a mistura do gobelé para um tubo adequado à centrifugação, lavando-se o gobelé com 10 mL de etanol por forma a remover todo o material presente neste. Posteriormente, efetuou-se a centrifugação da mistura durante 20 minutos a 3000 rpm. No final da centrifugação retirou-se o clarificado (material dissolvido – “rico em lenhina”), com auxílio de uma pipeta de Pasteur, para um frasco apropriado. Este processo foi repetido 3 vezes, com adição de 10 mL de etanol de cada vez, com o objetivo de remover quaisquer substâncias dissolvidas que tenham ficado adsorvidas ou aprisionadas no interior da textura sólida.

Ao material não dissolvido (MND) foi adicionado 30 mL de etanol e procedeu-se à centrifugação do mesmo a alta velocidade (6500 rpm) durante 10 minutos. O clarificado restante foi filtrado a vácuo, tendo sido vertido para um cadinho de placa porosa contendo um filtro de porosidade 0,7 µm, previamente seco e tarado (cadinho + filtro) e filtrado a vácuo. Adicionou-se em seguida 30 mL de água destilada ao material sólido (MND) que sofreu uma última centrifugação durante 10 minutos a 6500 rpm. Findo o tempo de centrifugação, o material foi filtrado a vácuo onde já anteriormente se tinha realizado esta operação, e adicionado 30 mL de água para remover qualquer material que se encontra no tubo de centrifugação. O material sólido lavado foi seco a 105 °C, durante 6 a 16h, e posteriormente, pesado (cadinho + filtro + MND).

Desta forma, foi possível calcular o rendimento de dissolução (RD), ou seja, a quantidade de madeira dissolvida como percentagem da madeira inicial – Eq. 3:

$$\text{Rendimento de dissolução, RD (\%)} = \frac{m_{\text{madeira}}(g) - m_{\text{material não dissolvido}}(g)}{m_{\text{madeira}}(g)} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

### 3.2.3. DETERMINAÇÃO DE LENHINA E DOS MONOSSACARÍDEOS NO MATERIAL NÃO DISSOLVIDO

Para quantificar o nível de deslenhificação alcançado com o pré-tratamento da madeira em líquidos LTTM foram determinadas as percentagens de lenhina presente na madeira e no material não dissolvido (MND). Esta determinação foi efetuada segundo os métodos TAPPI T222 e TAPPI UM 250, que permitem determinar a lenhina insolúvel (Klason) e a lenhina solúvel, respetivamente (Anexo I), sendo o teor de lenhina a soma destes dois valores. O resultado é expresso como percentagem em base de amostra sólida.

Conhecida a percentagem de lenhina total presente na madeira ou no MND é possível determinar a massa de lenhina existente na amostra pela Eq. 4 e assim, conhecer o teor de deslenhificação alcançado (LD) através da Eq. 5.

$$m_{lenhina} (g) = \frac{Lenhina (\%)}{100} \times m_{madeira/MND} (g) \quad (Eq. 4)$$

$$Lenhina\ dissolvida, LD (\%) = \frac{m_{lenhina\ da\ Acacia\ dealbata} (g) - m_{lenhina\ no\ MND} (g)}{m_{madeira} (g)} \times 100 \quad (Eq. 5)$$

Ao aplicar o método de determinação da lenhina tanto na madeira original como na madeira pré-tratada (MND), obtêm-se fases líquidas designadas “hidrolisados” onde estão dissolvidos os hidratos de carbono na forma monomérica, como consequência da hidrólise química catalisada pelo ácido sulfúrico utilizado. A quantificação destes monossacarídeos foi efetuada por HPLC. O procedimento utilizado também se encontra no Anexo I.

### 3.2.4. PRECIPITAÇÃO DE LENHINA NO MATERIAL DISSOLVIDO

Para potenciar a precipitação da lenhina que se encontra na fase líquida contendo o material dissolvido juntamente com o LTTM utilizado é necessária a adição de um anti-solvente. Para o efeito, foram utilizados dois: uma solução de acetona/água (1:1 m/m) e ácido sulfúrico (0,05 M). É de notar que o ácido sulfúrico inviabiliza a recuperação do LTTM, mas a sua utilização foi necessária para efeitos comparativos.

Em primeiro lugar, o material dissolvido foi filtrado com filtros de seringa de porosidade 0,22  $\mu\text{m}$ , uma vez que, ao fazer a transferência da fase líquida com a pipeta de Pasteur, tal como descrito na secção 3.2.2., é possível a passagem de fibras o que inflaciona o valor do rendimento



de precipitação obtido. Em seguida, ao frasco que continha o material dissolvido foram adicionadas:

- 10 g de acetona e 10 g de água ao material dissolvido após o tratamento com qualquer um dos LTTM utilizados;
- 10 g de ácido sulfúrico ao material dissolvido com LCCETMA;
- 122, 48, 25 e 13 g de ácido sulfúrico ao material dissolvido com [GCP 20:1], [GCP 50:1], [GCP 100:1] e [GCP 200:1], respetivamente. A determinação destas quantidades encontra-se descrita no Anexo I e está relacionada com a neutralização do carbonato de potássio.

Após a adição do anti-solvente, agitou-se a mistura para homogeneização da mesma, e deixou-se em repouso uma hora. Em seguida, filtrou-se a vácuo a lenhina precipitada, num cadinho de placa porosa com um filtro de porosidade 0,22 µm previamente seco e tarado (cadinho + filtro). A lenhina obtida foi seca a 105 °C, no mínimo durante 4h e no máximo 24h, e, posteriormente, foi pesada a lenhina obtida (cadinho + filtro + lenhina). O rendimento de precipitação de lenhina que tinha sido previamente dissolvida na fase líquida por ação do LTTM foi calculada segundo a Eq. 6.

$$\text{Rendimento de precipitação (\%)} = \frac{m_{\text{lenhina precipitada}} (g)}{m_{\text{material dissolvido}} (g)} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

### 3.2.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO MATERIAL NÃO DISSOLVIDO E FERMENTAÇÃO

Para averiguar a digestibilidade da madeira pré-tratada (já com menor teor de lenhina), recorreu-se ao extrato enzimático Cellic CTec2 para efetuar a hidrólise enzimática do material não dissolvido. Devido à pequena quantidade de MND, obtido após o pré-tratamento, estabeleceu-se um volume total de 10 mL nesta etapa.

Após secagem e pesagem do material pré-tratado, deixou-se este a intumescer durante a noite em 5 mL de tampão citrato 0,05 M no recipiente onde ia decorrer a hidrólise. Preparou-se uma suspensão enzimática diluída devido à elevada concentração de enzima no extrato e às baixas quantidades necessárias nos ensaios. Os cálculos realizados para os ensaios de hidrólise enzimática encontram-se no Anexo I.

Colocou-se o material intumescido e a solução de enzima diluída na incubadora orbital a 50 °C para estabilização térmica, após o que se misturou as duas quantidades, deixando-se a incubar a 50 °C com agitação orbital de 150 rpm, durante 24 h. As amostras de 1 mL recolhidas após 6 e 24 h de hidrólise foram colocadas em gelo durante cerca de 5 min para parar a reação enzimática e filtraram-se com filtros de seringa de porosidade 0,22 µm para um tubo de Eppendorf. A concentração de glucose libertada foi determinada por HPLC, sendo possível determinar a massa de glucose (massa molar =180) existente no hidrolisado enzimático (Eq. 7), e consequentemente determinar a massa de glucana equivalente (Eq. 8) e, por fim, determinar o rendimento da hidrólise enzimática, RHE, pela Eq. 9.

$$m_{glucose} (g) = \frac{[Glucose] \left(\frac{mg}{mL}\right) \times V_{hidrolisado} (mL)}{1000} \quad (\text{Eq. 7})$$

$$m_{glucana} (g) = \frac{(180 - 18) \times m_{glucose}}{180} \quad (\text{Eq. 8})$$

$$\text{Rendimento da hidrólise, RHE (\%)} = \frac{m_{glucana} (g)}{m_{madeira/material\ não\ dissolvido} (g)} \times 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

Findo o tempo de hidrólise, colocou-se o recipiente em gelo para parar a reação (5 min). Filtrou-se o hidrolisado a vácuo num cadinho de placa porosa com um filtro de porosidade 0,22 µm. Transferiu-se o hidrolisado para um Erlenmeyer (tapado com algodão hidrófobo) previamente esterilizado (autoclave, 121 °C, 15 min) e reservou-se no frio até utilização.

Para o ensaio de fermentação etanólica preparou-se previamente o inóculo de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602) como apresentado no Anexo I. Também para este ensaio é usado um volume total de 10 mL, onde se supõe que o volume de hidrolisado disponível (após 24h de hidrólise enzimática) é de 7 mL. Retirou-se o hidrolisado do frio, e colocou-se na incubadora orbital a 30 °C (onde já se encontrava o inóculo de levedura), para estabilização térmica.

Ao hidrolisado foi adicionado 1 mL de inóculo de levedura, sob a ação da chama de um bico de Bunsen, para garantir a assepsia, e 2mL de solução de nutrientes necessários ao crescimento celular da levedura. Colocou-se o Erlenmeyer na incubadora orbital a 30 °C e 150 rpm e deixou-se a incubar 48h, retirando-se amostras às 6, 24 e 48h para análise por HPLC, que à semelhança

do que acontecia anteriormente, foram previamente filtradas com filtros de seringa para um tubo de Eppendorf.

Através da Eq. 10 é possível determinar o rendimento em etanol com base nos açúcares fermentáveis disponíveis no fim da hidrólise enzimática. A produtividade de etanol é calculada segundo a Eq. 11.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{[\text{Etanol}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \times V (\text{mL})}{0,51 \times m_{\text{equivalentes de glucose}} (\text{g})} \times 100 \quad (\text{Eq. 10})$$

$$\text{Produtividade (g. (Lh)}^{-1}) = \frac{[\text{Etanol}] \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)}{t (\text{h})} \quad (\text{Eq. 11})$$



## 4. ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

A apresentação, e respetiva discussão dos resultados obtidos, encontra-se subdividida em três subcapítulos. O primeiro é dedicado ao pré-tratamento de *Acacia dealbata* com LTTM formado a partir de glicerol e carbonato de potássio – GCP; o segundo aborda o pré-tratamento com o LTTM constituído por ácido láctico e cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio – LCCETMA; o último é dedicado à hidrólise e fermentação, quer da matéria-prima original (madeira de *Acacia dealbata*), quer dos materiais sólidos obtidos após os pré-tratamentos (MND – material não dissolvido).

### 4.1. PRÉ-TRATAMENTO DE *ACACIA DEALBATA* COM GCP

Por forma a avaliar a capacidade de dissolução da madeira de *Acacia dealbata* com o LTTM constituído por glicerol e carbonato de potássio (GCP) foram utilizadas quatro composições diferentes deste LTTM, onde a proporção molar de glicerol na mistura foi aumentando, 20:1, 50:1, 100:1 e 200:1.

#### 4.1.1. UM CICLO DE PRÉ-TRATAMENTO

Numa primeira fase foram realizados ensaios com uma relação madeira/ líquido LTTM de 1/22, durante 16 horas a 80 °C e com agitação magnética a uma velocidade de 700 rpm – Figura 17.



**Figura 17.** Ensaio E30: **a)** mistura madeira e [GCP 20:1] inicial; **b)** mistura madeira e [GCP 20:1] após o pré-tratamento.

Dada a variabilidade inerente ao processo foram realizadas pelo menos duas réplicas do mesmo ensaio de pré-tratamento, i.e. mesmo líquido de dissolução, tempo, temperatura e agitação magnética. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 7.

**Tabela 7.** Resultados da dissolução obtidos com um ciclo de pré-tratamento de 16h a 80 °C e a 700 rpm com diferentes composições de GCP.

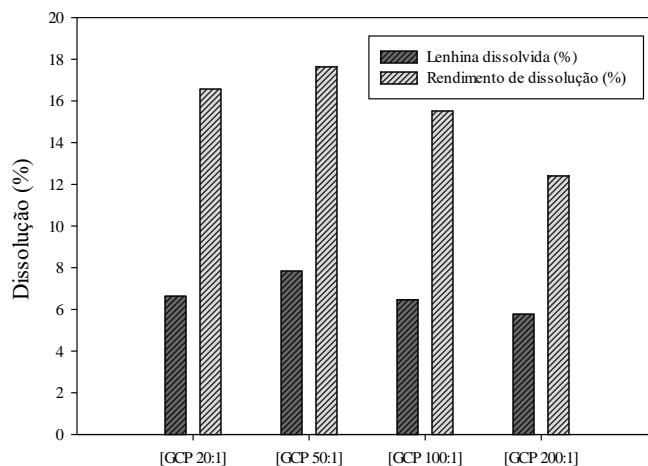
LTTM	ENSAIO	$m_{\text{madeira}}$ (g)	$m_{\text{LTTM}}$ (g)	$m_{\text{material não}}dissolvido$ (g)	$m_{\text{material}}dissolvido$ (g)	RENDIMENTO DE DISSOLUÇÃO (%)	
[GCP 20:1]	E12	0,4490	10,0058	0,3929	0,0561	12,50	
	E19	0,4467	10,1115	0,3576	0,0891	19,95	16,58 ±3,77*
	E30	0,4498	10,0336	0,3721	0,0777	17,28	
[GCP 50:1]	E9	0,4496	10,1567	0,3796	0,0700	15,56	
	E49	0,4487	10,0349	0,3678	0,0809	18,03	17,66±1,95*
	E50	0,4478	10,0972	0,3609	0,0869	19,40	
[GCP 100:1]	E11	0,4468	10,0195	0,3781	0,0687	15,38	
	E16	0,4498	10,0217	0,3924	0,0574	12,77	14,54±1,53*
	E18	0,4522	10,0194	0,3823	0,0699	15,47	
[GCP 200:1]	E10	0,4472	10,1356	0,3862	0,0610	13,63	
	E17	0,4465	10,0698	0,3964	0,0501	11,23	12,43±1,70*

\*Rendimento de dissolução médio = média ± desvio padrão

Apesar da variabilidade de resultados observada na Tabela 7 para as composições estudadas, verifica-se que os líquidos [GCP 20:1] e [GCP 50:1] permitem obter um maior rendimento de dissolução, 16,6 e 17,7%, respetivamente. O aumento subsequente da proporção de glicerol na composição do GCP (100:1 e 200:1) prejudica o processo de dissolução alcançada. Ao aumentar a concentração de glicerol, ocorre um aumento da viscosidade do meio, mesmo à temperatura 80 °C, sendo este um fator impeditivo à impregnação das fibras. De facto, no [GCP 20:1] e [GCP 50:1] verificava-se que nos primeiros minutos de operação a agitação era facilmente conseguida, ao passo que, com os restantes líquidos, uma correta homogeneização era mais demorada, sendo necessário um aumento progressivo da agitação magnética, i.e. 200 – 300 – 400 – 500 – 600 – 700 rpm.

Comparativamente ao estudo previamente efetuado com este LTTM e com *Acacia dealbata* por Marques (2015) verifica-se que um aumento de temperatura, de 75 para 80 °C, se traduziu num aumento de rendimento de dissolução para os líquidos [GCP 20:1], [GCP 50:1] e [GCP 100:1] que apresentavam uma dissolução de 16,20; 10,32 e 8,38%, respetivamente. Contudo, o líquido [GCP 200:1] apresenta uma tendência contrária, dado que o rendimento de dissolução alcançado por Marques (2015) para uma temperatura de 75 °C foi de 14,1%.

Ao observar o aspeto da dissolução da madeira na Figura 17b, verifica-se que, após um ciclo de pré-tratamento, neste caso com [GCP 20:1], a mistura obtida apresenta uma cor acastanhada, o que dá indicação da provável dissolução de lenhina. Tal aconteceu com todos os ensaios realizados com líquidos usando as diferentes proporções de GCP. Para comprovar essa dissolução, tornou-se imprescindível a determinação do teor de lenhina existente no material não dissolvido (MND, ou madeira após o tratamento), permitindo assim, conhecer o grau de deslenhificação alcançado com o pré-tratamento, através da comparação com a lenhina existente na madeira original (27,4% - Tabela 5). Conclui-se que a lenhina dissolvida nos líquidos corresponde a 6,7; 7,9; 6,5 e 5,8% da madeira original, para as proporções 20:1, 50:1, 100:1 e 200:1, respetivamente. Os cálculos realizados encontram-se no Anexo III de forma pormenorizada.



**Figura 18.** Rendimento de dissolução e lenhina dissolvida com o pré-tratamento de *Acacia dealbata* com diferentes composições de GCP.

Com a análise simultânea da Figura 18 e da Tabela 7 verifica-se que a lenhina dissolvida acompanha a mesma tendência que o rendimento de dissolução observado para cada uma das composições de GCP, i.e. [GCP 50:1] > [GCP 20:1] > [GCP 100:1] > [GCP 200:1]. Além disso, é possível verificar que a lenhina dissolvida corresponde a cerca de 40, 45, 42 e 47%, do rendimento de dissolução alcançado com o pré-tratamento para as proporções 20:1, 50:1, 100:1 e 200:1. Conclui-se que apesar de um menor rendimento de dissolução alcançado para o [GCP 200:1], o seu efeito na matriz lenhocelulósica é mais seletivo para a lenhina. Contudo, é a mistura [GCP 50:1] que permite, em simultâneo, uma maior dissolução absoluta de madeira e da lenhina.

Também no Anexo III se encontram os valores de dissolução de glucana e xilana obtidos através da análise por HPLC de alguns dos hidrolisados resultantes da determinação da lenhina existente no material sólido (madeira ou madeira tratada).

#### 4.1.2. DOIS CICLOS DE PRÉ-TRATAMENTO

Tendo em conta os valores de dissolução de lenhina alcançados nos ensaios apresentados na secção anterior, considerou-se a possibilidade de realizar dois ciclos de pré-tratamento com o objetivo de aumentar o grau de deslenhificação da madeira. Assim, após a secagem do material sólido não dissolvido obtido no 1º ciclo, aplicou-se um novo ciclo de pré-tratamento durante 16 horas a 80 °C e a 700 rpm, com a mesma relação sólido/líquido (Figura 19). Nestes ensaios usou-se uma quantidade superior de madeira no 1º ciclo para garantir quantidade de sólido suficiente para prosseguir o 2º ciclo.



**Figura 19.** Ensaio E26: **a)** mistura madeira e [GCP 20:1] após um ciclo de pré-tratamento; **b)** mistura material não dissolvido e [GCP 20:1] após o segundo ciclo de pré-tratamento.

Nas Tabela 8 e 9 estão apresentados os rendimentos de dissolução obtidos para o primeiro e segundo ciclos de pré-tratamento e o rendimento global, respetivamente. Relativamente, ao primeiro ciclo de pré-tratamento, verificam-se algumas diferenças nos resultados do rendimento de dissolução comparativamente aos apresentados na Tabela 7, o que poderá dever-se a condições diferentes de agitação em virtude de terem sido usados maiores quantidades de madeira e de líquido GCP.

Após a aplicação de um segundo ciclo de tratamento ao material sólido resultante do 1º ciclo (material não dissolvido) verifica-se que os rendimentos de dissolução no 2º ciclo são menores, o que já era expectável tendo em conta a cor menos acentuada que o líquido apresentava após o término do ensaio (Figura 19): no final do 1º ciclo, a mistura apresentava um tom castanho-escuro, enquanto após o 2º ciclo se obteve uma mistura com um tom castanho-mel.

Em comparação com o 1º ciclo, o rendimento global de dissolução aumentou 7,2; 4,6; 7,1 e 3,0 pontos percentuais para o [GCP 20:1], [GCP 50:1], [GCP 100:1] e [GCP 200:1], respetivamente.



**Tabela 8.** Resultados da dissolução obtidos com dois ciclos de pré-tratamento de 16h a 80 °C e a 700 rpm com diferentes composições de GCP.

LTTM	ENSAIO	PRIMEIRO CICLO DE PRÉ-TRATAMENTO				SEGUNDO CICLO DE PRÉ-TRATAMENTO					
		m <sub>madeira</sub> (g)	m <sub>LTTM</sub> (g)	m <sub>material não dissolvido</sub> (g)	m <sub>material dissolvido,1</sub> (g)	RENDIMENTO DE DISSOLUÇÃO,1 (%)	m <sub>material não dissolvido,1</sub> (g)	m <sub>LTTM</sub> (g)	m <sub>material não dissolvido,2</sub> (g)	m <sub>material dissolvido,2</sub> (g)	RENDIMENTO DE DISSOLUÇÃO,2 (%)
[GCP 20:1]	E26	0,6462	15,0135	0,5438	0,1024	15,85	0,5014	10,1531	0,4444	0,0570	11,37
	E31	0,6465	15,0640	0,5408	0,1057	16,35	0,5078	10,0198	0,4726	0,0352	6,93
[GCP 50:1]	E24	0,6463	15,0932	0,5495	0,0968	14,98	0,5065	10,0675	0,4646	0,0419	8,27
	E45	0,6461	15,0588	0,5501	0,0960	14,86	0,5013	10,0541	0,4566	0,0447	8,92
[GCP 100:1]	E28	0,6459	15,0679	0,5370	0,1089	16,86	0,5022	10,0968	0,4681	0,0341	6,79
	E29	0,6457	15,0252	0,5395	0,1062	16,45	0,5009	10,0301	0,4515	0,0494	9,36
[GCP 200:1]	E20	0,6464	15,0775	0,5944	0,0520	8,04	0,5009	10,0275	0,4590	0,0419	8,86
	E21	0,6457	15,0349	0,6125	0,0332	5,14	0,5083	10,0279	0,4554	0,0529	10,41

**Tabela 9.** Resultados da dissolução global obtida com dois ciclos de pré-tratamento de 16h a 80 °C e a 700 rpm com diferentes composições de GCP.

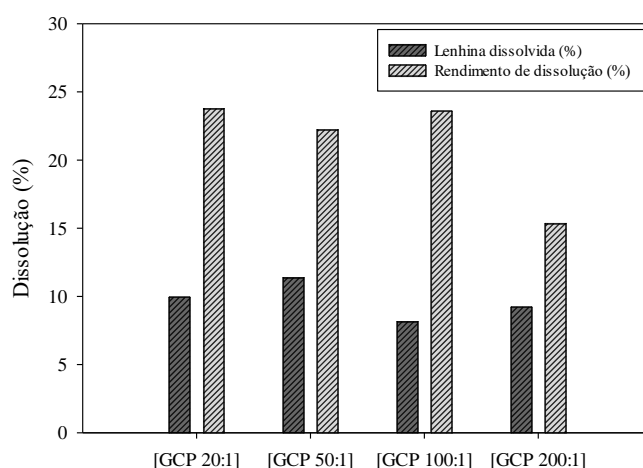
LTTM	ENSAIO	$m_{\text{madeira}}$ (g)	$m_{\text{material}}$ dissolvido,2 teórico (g)*	$m_{\text{material}}$ dissolvido total (g)**	RENDIMENTO DE DISSOLUÇÃO GLOBAL (%)	
[GCP 20:1]	E26	0,6462	0,0618	0,1642	25,42	23,79±2,31***
	E31	0,6465	0,0375	0,1432	22,15	
[GCP 50:1]	E24	0,6463	0,0455	0,1423	22,01	22,33±0,31***
	E45	0,6461	0,0491	0,1451	22,45	
[GCP 100:1]	E28	0,6459	0,0365	0,1453	22,50	23,60±1,55***
	E29	0,6457	0,0532	0,1594	24,69	
[GCP 200:1]	E20	0,6464	0,0497	0,1017	15,74	15,38±0,52***
	E21	0,6457	0,0637	0,0969	15,01	

\*  $m_{\text{material}} \text{ dissolvido,2 teórico} = (\text{Rendimento de dissolução}_2 * m_{\text{material}} \text{ não dissolvido})/100$

\*\*  $m_{\text{material}} \text{ dissolvido total} = m_{\text{material}} \text{ dissolvido,1} + m_{\text{material}} \text{ dissolvido,2 teórico}$

\*\*\*Rendimento de dissolução médio = média ± desvio padrão

Após o pré-tratamento foi determinada a lenhina residual no material sólido não dissolvido em cada ciclo de forma a quantificar a remoção de lenhina alcançada com dois ciclos de pré-tratamento. Os cálculos realizados encontram-se no Anexo III, assim como alguns valores obtidos para a dissolução dos polissacarídeos através da análise em HPLC do hidrolisado. A lenhina dissolvida foi de 9,9; 11,4; 8,2 e 9,3% da madeira original, respetivamente para o pré-tratamento com [GCP 20:1], [GCP 50:1], [GCP 100:1] e [GCP 200:1] – Figura 20.

**Figura 20.** Rendimento de dissolução e lenhina dissolvida com dois ciclos de pré-tratamento de *Acacia dealbata* com diferentes composições de GCP.

O pré-tratamento com [GCP 50:1] foi o que, uma vez mais, alcançou o maior grau de deslenhificação, tendo o teor de lenhina dissolvida aumentado 3,5 pontos percentuais relativamente ao 1º ciclo. A quantidade de lenhina dissolvida com os dois ciclos de tratamento corresponde a 42, 51, 35 e 60%, do rendimento global de dissolução, respetivamente para as

proporções 20:1, 50:1, 100:1 e 200:1. Comparativamente a um único ciclo, a aplicação de um segundo ciclo de pré-tratamento com [GCP 20:1] e [GCP 50:1] leva a um ligeiro aumento na seletividade do processo de extração da lenhina (42 vs 40% e 51 vs 45%). No caso do [GCP 200:1] aumentou de 47 para 60%, enquanto no [GCP 100:1] diminuiu de 42 para 35%.

Tendo em consideração o aumento no consumo de reagentes e energia face ao pequeno aumento de lenhina dissolvida (p.e. 7,9 para 11,4% no caso do [GCP 50:1]), não parece ser justificável a aplicação de um 2º ciclo de tratamento.

#### 4.1.3. ESTUDO DA CINÉTICA DE DISSOLUÇÃO DO [GCP 50:1]

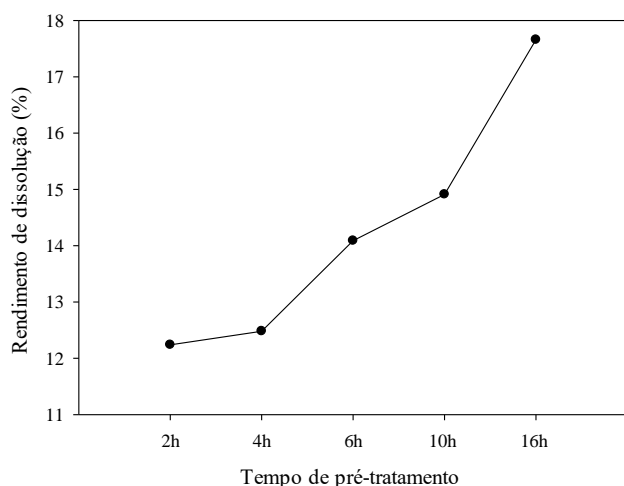
O pré-tratamento com [GCP 50:1], como verificado nas secções anteriores, revelou ser o líquido que permitia uma dissolução mais otimizada, pelo que o estudo da cinética de dissolução se revelou a mais interessante de obter. Para tal, foram realizados ensaios com diferentes tempos de operação que se encontram na Tabela 10.

**Tabela 10.** Resultados da dissolução obtidos com o pré-tratamento de [GCP 50:1] a 80°C e a 700 rpm, com diferentes tempos de operação.

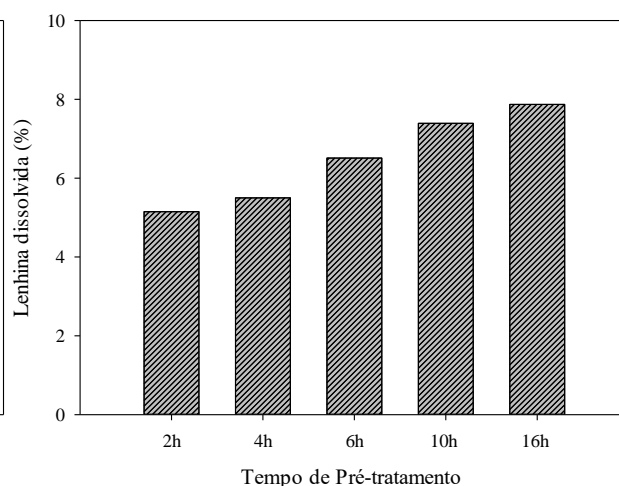
TEMPO DE OPERAÇÃO	ENSAIO	m <sub>madeira</sub> (g)	m <sub>LTM</sub> (g)	m <sub>material não dissolvido</sub> (g)	m <sub>material dissolvido</sub> (g)	RENDIMENTO DE DISSOLUÇÃO (%)	
2h	E36	0,4510	10,0061	0,3958	0,0552	12,24	
4h	E38	0,4488	10,0403	0,3909	0,0579	12,90	12,48±0,59*
	E45	0,4473	10,0569	0,3934	0,0539	12,06	
6h	E41	0,4520	10,0948	0,3958	0,0562	12,43	14,09±2,34*
	E48	0,4496	10,1069	0,3788	0,0708	15,74	
10h	E42	0,4463	10,1093	0,3841	0,0622	13,93	14,91±1,49*
	E43	0,4479	10,0332	0,3767	0,0712	15,89	
16h	E9	0,4496	10,1567	0,3796	0,0700	15,56	17,7±2,0*
	E49	0,4487	10,0349	0,3678	0,0809	18,03	
	E50	0,4478	10,0972	0,3609	0,0869	19,40	

\*Rendimento de dissolução médio = média ± desvio padrão

Na Figura 21 encontra-se representado o rendimento de dissolução médio de *Acacia dealbata* obtido para os diferentes tempos de operação. Observa-se uma função crescente mas que o aumento de dissolução no tempo é mais significativo depois de decorridas 4h.



**Figura 21.** Resultados da dissolução obtidos com o pré-tratamento de [GCP 50:1] a 80 °C e a 700 rpm, com diferentes tempos de operação.



**Figura 22.** Lenhina dissolvida com o pré-tratamento de [GCP 50:1] a 80 °C e a 700 rpm, com diferentes tempos de operação.

De igual forma ao anteriormente realizado, foi avaliado o teor de lenhina presente no material não dissolvido, permitindo determinar o teor de lenhina dissolvida (Figura 22): 5,2; 5,5; 6,5; 7,4 e 7,9%, para 2, 4, 6, 10 e 16h de pré-tratamento, respetivamente. Como é possível observar na Figura 22, o grau de deslenhificação alcançado aumentou com o aumento do tempo de operação, seguindo a tendência verificada no rendimento de dissolução. Comparando os valores dos rendimentos de dissolução com os valores dos teores de lenhina dissolvida, conclui-se que a quantidade de lenhina dissolvida representa cerca de 42, 44, 51 e 45% do material total dissolvido, respetivamente. Um pré-tratamento com a duração de 10h permite obter uma maior seletividade na remoção de lenhina mas conseguindo apenas dissolver 14,9% da madeira original.

#### 4.1.4. PRECIPITAÇÃO DA LENHINA DISSOLVIDA

À fração líquida remanescente do pré-tratamento foi adicionado um anti-solvente por forma a potenciar a precipitação da lenhina nesta dissolvida. Na Tabela 11 encontram-se os resultados obtidos para a precipitação com água e acetona na proporção de 1:1 (m/m). À exceção do ensaio com [GCP 20:1], os valores obtidos são bastante baixos, variando entre 0,69 e 3,13%, pelo que esta metodologia não foi eficaz. Na Tabela 12 e 13 encontram-se os resultados obtidos para a precipitação com ácido sulfúrico a 0,05 M da fração líquida remanescente do primeiro e segundo ciclo de pré-tratamento, respetivamente. Para o primeiro ciclo de pré-tratamento os valores são mais homogêneo, mas o valor máximo obtido foi 10,23% para o [GCP 50:1]. Usando água:acetona tinha-se obtido 0,69% (Tabela 11). Também é para este LTTM que se

verifica o valor máximo de rendimento de precipitação na fração líquida proveniente do segundo ciclo de pré-tratamento. Apesar da diminuição do pH potencializar a precipitação da lenhina dissolvida, mesmo assim os rendimentos de precipitação são relativamente baixos, para além do uso de ácido sulfúrico impossibilitar a reutilização do LTTM.

**Tabela 11.** Rendimentos de precipitação obtidos na precipitação da lenhina dissolvida resultante de um ciclo pré-tratamento com diferentes composições de GCP com uma solução de água:acetona (1:1 m/m).

LTTM	ENSAIO	m <sub>água</sub> (g)	m <sub>acetona</sub> (g)	m <sub>lenhina precipitada</sub> (g)	RENDIMENTO DE PRECIPITAÇÃO (%)
[GCP 20:1]	E19	10,0809	10,1760	0,0116	13,02
[GCP 50:1]	E50	10,0494	10,4700	0,0006	0,69
[GCP 100:1]	E16	10,0655	10,3060	0,0018	3,13
[GCP 200:1]	E10	10,0512	10,8650	0,0014	2,30

**Tabela 12.** Rendimento de precipitação obtidos na precipitação da lenhina dissolvida resultante do primeiro ciclo pré-tratamento com diferentes composições de GCP com ácido sulfúrico (0,05M).

LTTM	ENSAIO	m <sub>ácido sulfúrico, 0,05 M</sub> (g)	m <sub>lenhina precipitada</sub> (g)	RENDIMENTO DE PRECIPITAÇÃO (%)
[GCP 20:1]	E26	122,9400	0,0072	7,03
[GCP 50:1]	E24	49,0305	0,0099	10,23
[GCP 100:1]	E28	25,0181	0,0053	4,87
[GCP 200:1]	E20	14,4372	0,0052	10,00

**Tabela 13.** Rendimento de precipitação obtido na precipitação da lenhina dissolvida resultante do segundo ciclo pré-tratamento com diferentes composições de GCP com ácido sulfúrico (0,05M).

LTTM	ENSAIO	m <sub>ácido sulfúrico, 0,05 M</sub> (g)	m <sub>lenhina precipitada</sub> (g)	RENDIMENTO DE PRECIPITAÇÃO (%)
[GCP 20:1]	E26	122,60	0,0099	17,37
[GCP 50:1]	E24	50,7093	0,0091	21,72
[GCP 100:1]	E28	25,3936	0,0042	12,32
[GCP 200:1]	E20	14,2628	0,0031	7,40

#### 4.2. PRÉ-TRATAMENTO DE ACACIA DEALBATA COM LCCETMA

Tendo como objetivo a avaliação da capacidade de dissolução da madeira de *Acacia dealbata* com o LTTM constituído por ácido láctico e cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio foram testadas duas composições diferentes, onde a proporção de ácido láctico na mistura foi de 5:1 e 10:1.

#### 4.2.1. UM CICLO DE PRÉ-TRATAMENTO

À semelhança do subcapítulo 4.1.1. foram realizados pelo menos dois ensaios com as mesmas condições operatórias devido à variabilidade inerente aos mesmos. Assim, os ensaios foram conduzidos com uma relação madeira/líquido LCCETMA de 1/22, durante 16 horas, a 65 °C e com agitação magnética a uma velocidade de 700 rpm. Na Tabela 14 encontram-se os resultados de dissolução obtidos.

**Tabela 14.** Resultados da dissolução obtidos com um ciclo de pré-tratamento de 16h a 65 °C e a 700 rpm com diferentes composições de LCCETMA.

LTTM	ENSAIO	m <sub>madeira</sub> (g)	m <sub>LTTM</sub> (g)	m <sub>material</sub> não dissolvido (g)	m <sub>material</sub> dissolvido (g)	RENDIMENTO DE DISSOLUÇÃO (%)
[LCCETMA 5:1]	E32	0,4519	10,0877	0,4256	0,0263	5,82
	E33	0,4475	10,0572	0,4258	0,0217	4,85
	E47	0,4533	10,0040	0,4245	0,0288	6,36
[LCCETMA 10:1]	E34	0,4460	10,0407	0,4150	0,0310	6,95
	E35	0,4479	10,0371	0,4161	0,0318	7,10

\*Rendimento de dissolução médio = média ± desvio padrão

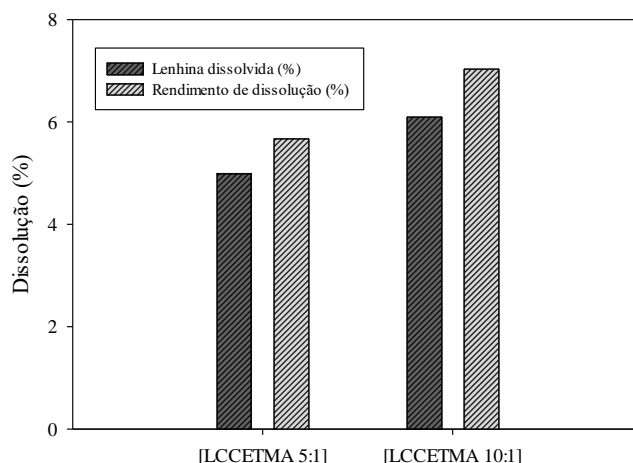
Ao analisar pormenorizadamente a Tabela 14, verifica-se que ao aumentar a razão molar de ácido láctico na constituição do LCCETMA ocorre um aumento do rendimento de dissolução alcançado. Tal já era expectável, pois na literatura é frequente o relato do aumento da dissolução de lenhina com o aumento da proporção de ácido láctico. Contudo, os valores de dissolução são muitos baixos comparativamente aos alcançados com o GCP. O maior rendimento de dissolução médio é alcançado pelo [LCCETMA 10:1] de 7,03%, sendo este inferior ao menor valor obtido com o [GCP 200:1], que foi de 12,43 %.

Comparativamente aos estudos anteriormente realizados por Marques (2015) e ao contrário do que sucedeu com o líquido GCP, o aumento da temperatura de 60 para 65 °C, levou a uma diminuição do rendimento de dissolução obtido, embora se observe a mesma tendência crescente do rendimento de dissolução com o aumento da proporção de ácido láctico.

Findo o tempo de pré-tratamento, a mistura de madeira e LCCETMA apresentavam um aspeto semelhante ao observável na Figura 24: cor castanho rosado. Tal como anteriormente, foi determinada a lenhina presente no material não dissolvido (descrição e cálculos no Anexo III).



**Figura 23.** Ensaio E32: mistura de madeira e [LCCETMA 5:1] após um ciclo de pré-tratamento.



**Figura 24.** Rendimento de dissolução e lenhina dissolvida com um ciclo de pré-tratamento de *Acacia dealbata* com diferentes composições de LCCETMA.

No pré-tratamento com [LCCETMA 5:1] a lenhina dissolvida foi de 5% da madeira original, enquanto para o pré-tratamento com [LCCETMA 10:1] foi de 6,1%, tal como representado na Figura 23. Considerando a quantidade total de material dissolvido apresentada na Tabela 14, a lenhina dissolvida representa 88 e 87 % desse material dissolvido resultante do pré-tratamento com a proporção 5:1 e 10:1, respetivamente, embora os rendimentos de dissolução sejam baixos. Estes valores permitem concluir que o LCCETMA, apesar dos elevados custos económicos dos seus reagentes, é um LTTM promissor, com elevada seletividade para com a lenhina.

#### 4.2.2. ESTUDO DO EFEITO DAS CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO NO PRÉ-TRATAMENTO COM [LCCETMA 10:1]

Face aos resultados supra apresentados, considerou-se pertinente o estudo do efeito das condições operatórias – temperatura e número de ciclos de pré-tratamento – quando o LTTM selecionado era o [LCCETMA 10:1]. O aumento de temperatura permitiu aumentar o rendimento de dissolução como mostrado na Tabela 15, face aos resultados apresentados na Tabela 14.

**Tabela 15.** Resultados da dissolução obtidos com diferentes condições operatórias – temperatura e número de ciclos de pré-tratamento – no pré-tratamento de *Acacia dealbata* com [LCETMA 10:1] a 700 rpm.

CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO	ENSAIO	$m_{\text{madeira/material não dissolvido}}$ (g)	$m_{\text{LTTM}}$ (g)	$m_{\text{material não dissolvido}}$ (g)	$m_{\text{material dissolvido}}$ (g)	RENDIMENTO DE DISSOLUÇÃO (%)
1 Ciclo 80°C	E36	0,4514	10,0785	0,4160	0,0350	7,74
	E37	0,4490	10,0211	0,4061	0,0429	9,56
2 Ciclos 80°C	Primeiro Ciclo	E39	15,0371	0,5737	0,0724	11,21
		E40	15,0755	0,5917	0,0543	8,41
		E44	15,1217	0,5873	0,0589	9,12
	Segundo Ciclo	E39	10,0076	0,4654	0,0429	8,44
		E40	10,0785	0,3928	0,1132	22,37
		E44	10,1115	0,4678	0,0346	6,89

\*Rendimento de dissolução médio = média  $\pm$  desvio padrão

**Tabela 16.** Resultados da dissolução global obtidos com diferentes condições operatórias – temperatura e número de ciclos de pré-tratamento – no pré-tratamento de *Acacia dealbata* com [LCETMA 10:1] a 700 rpm.

LTTM	ENSAIO	$m_{\text{madeira}}$ (g)	$m_{\text{material dissolvido,2 teórico}}$ (g)*	$m_{\text{material dissolvido total}}$ (g)**	RENDIMENTO DE DISSOLUÇÃO GLOBAL (%)
[LCETMA 10:1]	E39	0,6461	0,0484	0,1208	18,70
	E40	0,6460	0,1324	0,1867	28,90
	E44	0,6462	0,0404	0,0994	15,38

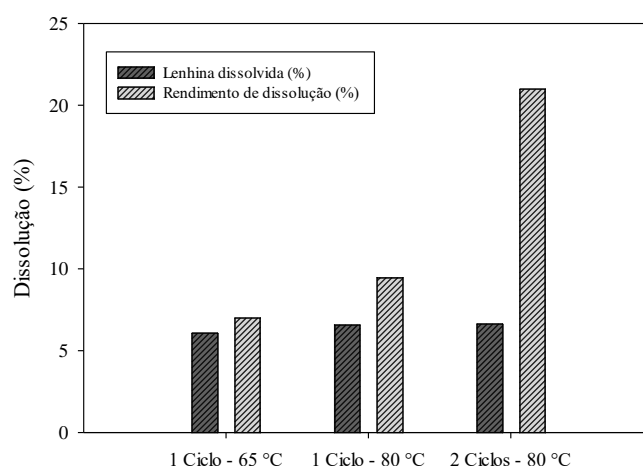
\*  $m_{\text{material dissolvido,2 teórico}} = (\text{Rendimento de dissolução}_{2^{\text{o}}\text{Ciclo}} * m_{\text{material não dissolvido}})/100$

\*\*  $m_{\text{material dissolvido total}} = m_{\text{material dissolvido,1}} + m_{\text{material dissolvido,2 teórico}}$

\*\*\*Rendimento de dissolução médio = média  $\pm$  desvio padrão

Realizado o pré-tratamento, o material não dissolvido foi caracterizado para se determinar o teor de deslenhificação alcançado (Anexo III). Como mostra a Figura 25 o aumento da severidade das condições operatórias do pré-tratamento (aumento da temperatura de 65 para 80 °C) traduziu-se num aumento da lenhina dissolvida (6,1 vs 6,6%, respetivamente). Os dois ciclos de pré-tratamento a 80 °C permitiram dissolver 6,7% da lenhina, praticamente o mesmo que o obtido apenas para um ciclo. Porém, a seletividade do tratamento diminuiu com o aumento da severidade das condições operatórias dado que 87, 70 e 32% do rendimento de dissolução corresponde a lenhina dissolvida para um ciclo de pré-tratamento a 65 °C, a 80 °C e dois ciclos de pré-tratamento a 80 °C, respetivamente.





**Figura 25.** Lenhina dissolvida com o pré-tratamento com [LCCETMA 10:1] sob diferentes condições operatórias.

#### 4.2.3. PRECIPITAÇÃO DA LENHINA DISSOLVIDA

À semelhança do realizado com a fração líquida remanescente do pré-tratamento com GCP, também à fração líquida remanescente do pré-tratamento com LCCETMA foi adicionado um anti-solvente por forma a potenciar a precipitação de lenhina. Os resultados apresentados na Tabela 17 são contraditórios, na medida em que a adição de ácido sulfúrico (0,05 M) à fração líquida resultante do pré-tratamento com [LCCETMA 5:1] permite uma maior precipitação da lenhina, quando comparado à adição de água e acetona, enquanto no pré-tratamento com [LCCETMA 10:1], ocorre o inverso.

**Tabela 17.** Rendimento de precipitação obtido na precipitação da lenhina dissolvida resultante do pré-tratamento com diferentes composições de LCCETMA.

LTTM	ENSAIO	m <sub>água</sub> (g)	m <sub>acetona</sub> (g)	m <sub>ácido sulfúrico, 0,05 M</sub> (g)	m <sub>lenhina precipitada</sub> (g)	RENDIMENTO DE PRECIPITAÇÃO (%)
[LCCETMA 5:1]	E33	10,0978	10,4000	n.a.	0,0157	72,26
	E47	n.a.	n.a.	10,6128	0,0263	91,27
[LCCETMA 10:1]	E35	10,1478	10,2500	n.a.	0,0302	95,02
	E36	n.a.	n.a.	10,0445	0,0198	56,64

n.a. – não aplicável

Comparativamente aos resultados obtidos com o GCP, a precipitação da fração líquida remanescente do LCCETMA é mais eficaz, alcançando-se resultados bastante satisfatórios com a utilização da solução de água e acetona, o que não coloca em causa a reutilização do LTTM.

### 4.3. HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DE MATERIAIS LENHOCELULÓSICOS

Após o pré-tratamento realizado com os LTTMs selecionados, era necessário conhecer o comportamento do material sólido não dissolvido quando submetido a um processo de hidrólise e fermentação separados, por forma a averiguar a sua viabilidade enquanto matéria-prima para a produção de bioetanol. Contudo, era necessário ter como comparação a hidrólise da madeira na forma de serradura e a subsequente fermentação dos açúcares libertados. Na Figura 26 é possível observar um conjunto de equipamentos usados nos ensaios de hidrólise e fermentação. No Anexo IV encontram-se os dados obtidos com a análise de amostras por HPLC, bem como os cálculos realizados para a caracterização dos hidrolisados e dos caldos de fermentação.

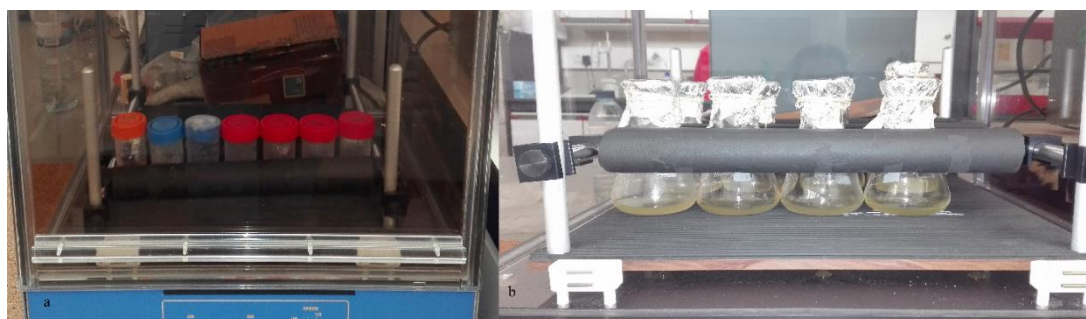


Figura 26. a) Ensaio de hidrólise; b) Ensaio de fermentação.

#### 4.3.1. HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DE *ACACIA DEALBATA*

Tal como supra referido, procedeu-se à hidrólise e fermentação da madeira tal e qual, sem qualquer pré-tratamento químico. Além de se obter uma base de comparação para os resultados obtidos do material não dissolvido submetido a uma carga enzimática de 25 FPU.g<sup>-1</sup>, analisou-se também o comportamento da madeira com uma carga enzimática superior, 35 FPU.g<sup>-1</sup>. A nomenclatura associada à hidrólise enzimática de *Acacia dealbata* com 25 e 35 FPU.g<sup>-1</sup> é, Ad1 e Ad2, respetivamente.

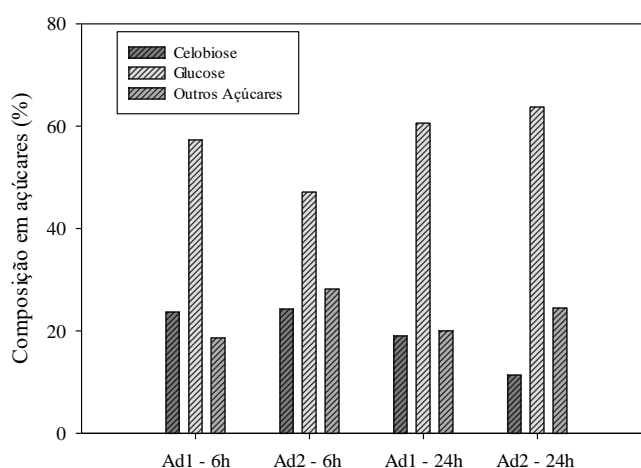
Tal como mostrado na Tabela 18, a concentração de açúcares nos hidrolisados aumenta ao longo do tempo, embora, ao contrário do expectável, a concentração seja ligeiramente menor na amostra onde se usou maior carga enzimática – Ad2.

**Tabela 18.** Concentração de açúcares no hidrolisado obtido ao longo do tempo da hidrólise enzimática a 50°C da *Acacia dealbata* com diferentes cargas enzimáticas 25 FPU.g<sup>-1</sup> (Ad1) e 35 FPU.g<sup>-1</sup> (Ad2) e rendimento da hidrólise.

TEMPO DE HIDRÓLISE, h	AÇÚCARES* (mg.mL <sup>-1</sup> )		RENDIMENTO DA HIDRÓLISE (%)	
	Ad1	Ad2	Ad1	Ad2
6	20,9	18,9	75,7	49,8
24	22,3	20,1	76,3	67,9

\*Açúcares – soma de glucose, manose, galactose, arabinose e celobiose

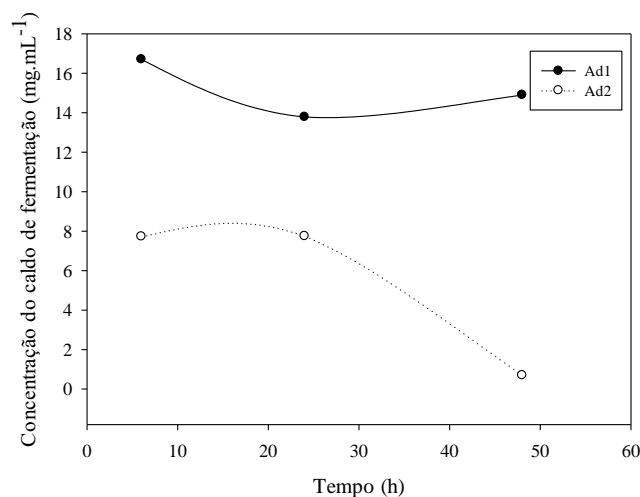
Na Figura 27 é possível observar a composição em açúcares dos hidrolisados ao longo do tempo da *Acacia dealbata* onde os dados são representados em percentagem em relação à totalidade dos açúcares contabilizados, para uma melhor comparação entre as amostras Ad1 e Ad2. O rendimento da hidrólise enzimática, relativamente à glucose, ao longo do tempo encontra-se na Tabela 18.

**Figura 27.** Composição percentual dos hidrolisados em açúcares, ao longo do tempo de hidrólise da *Acacia dealbata*: celobiose, glucose e outros açúcares (xilose, galactose, manose e arabinose).

Relativamente à amostra Ad1, verifica-se que esta apresenta uma concentração em açúcares e consequentemente um rendimento de hidrólise enzimática superior à amostra Ad2, em qualquer um dos tempos de amostragem. Contudo, a sua variação de 6 para 24h é pouco significativa (mantendo-se em ~76%), ao passo que para a amostra Ad2 se verifica um aumento de ~50 para ~68% entre as 6 e as 24h de hidrólise. É de salientar que cerca de 76% da madeira nesta forma de serradura, sem qualquer tratamento, é digerível pelos complexos enzimáticos usados.

O teor de celobiose apresenta a mesma tendência nas duas amostras, i.e. ocorre uma diminuição ao longo do tempo, acompanhada do aumento da glucose, sendo um indicador da eficiência da hidrólise enzimática. Por outro lado, a concentração de outros açúcares na Ad1 sofre um ligeiro aumento (1,4%), ao passo que, na Ad2 ocorre uma diminuição, também ela pouco significativa (3,7%).

Finda a hidrólise enzimática, procedeu-se à fermentação do hidrolisado (obtido após 24h de hidrólise enzimática), tendo sido analisadas amostras ao longo do tempo, por HPLC, que permitiram a obtenção do perfil de concentração representado na Figura 28.



**Figura 28.** Concentração de açúcares do caldo de fermentação ao longo do tempo de fermentação de Ad1 e Ad2.

Com o decorrer da fermentação, a concentração de açúcares no caldo de fermentação dos hidrolisados diminui devido à diminuição da fonte de carbono disponível. Como a concentração máxima de etanol foi obtida ao fim de 6h de fermentação, usou-se este tempo para determinar o rendimento e a produtividade em etanol, como apresentado na Tabela 19. Embora a concentração de açúcares ao fim de 6h de fermentação fosse maior para a amostra Ad1, obteve-se uma concentração de etanol ligeiramente inferior à da amostra Ad2. Consequentemente, o rendimento e a produtividade em etanol após 6h segue a mesma tendência – Ad2 > Ad1.

**Tabela 19.** Rendimento e produtividade em etanol após 6h de fermentação a 30°C dos hidrolisados das amostras Ad1 e Ad2.

AMOSTRA	RENDIMENTO EM ETANOL APÓS 6h (%)	PRODUTIVIDADE (g.(Lh) <sup>-1</sup> )
Ad1	17,9	0,20
Ad2	23,9	0,27

#### 4.3.2. HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DO MATERIAL NÃO DISSOLVIDO RESULTANTE DE UM CICLO DE PRÉ-TRATAMENTO COM GCP

O material sólido não dissolvido resultante de um ciclo de pré-tratamento com GCP foi submetido à hidrólise enzimática com uma carga de 25 FPU.g<sup>-1</sup>. As amostras retiradas ao longo do tempo foram analisadas por HPLC para determinar a concentração de açúcares (Tabela 20), bem como o rendimento da hidrólise, ao longo do tempo (Figura 29 e Tabela 21).

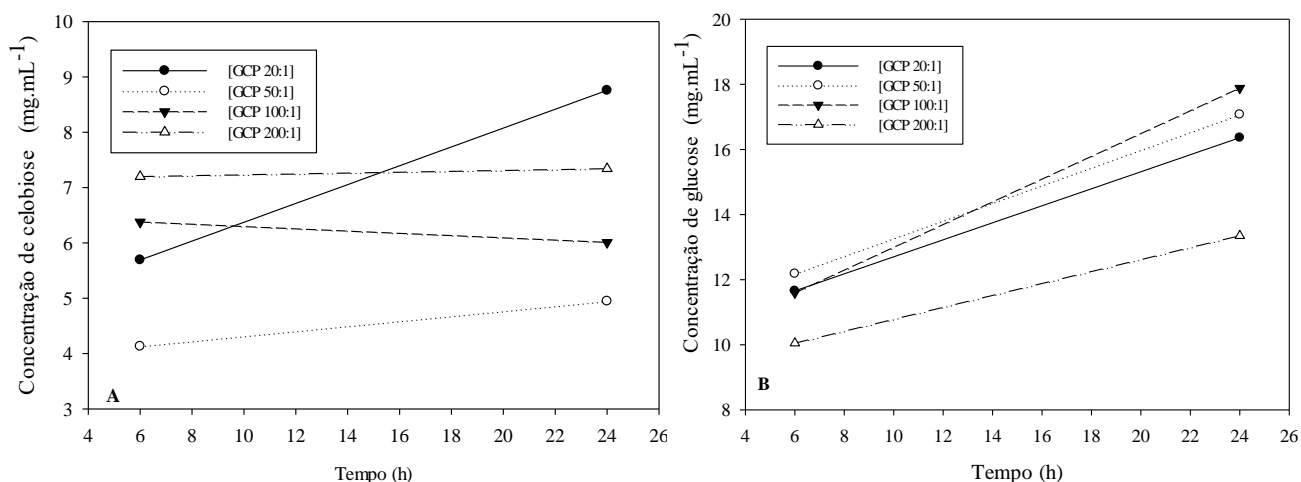
**Tabela 20.** Concentração de açúcares no hidrolisado obtido ao longo do tempo da hidrólise enzimática a 50°C do material não dissolvido resultante de um ciclo de pré-tratamento com diferentes composições de GCP.

LÍQUIDO DE PRÉ- TRATAMENTO	AÇÚCARES* (mg.mL <sup>-1</sup> )		RENDIMENTO DA HIDRÓLISE (%)	
	t <sub>hidrólise</sub> = 6h	t <sub>hidrólise</sub> = 24h	t <sub>hidrólise</sub> = 6h	t <sub>hidrólise</sub> = 24h
[GPC 20:1]	22,9	27,9	66,6	83,5
[GCP 50:1]	19,3	30,9	72,1	90,2
[GCP 100:1]	25,1	32,1	63,5	86,1
[GCP 200:1]	22,2	25,6	54,8	65,1

\*Açúcares – soma de glucose, manose, galactose, arabinose e celobiose

Após 6h de hidrólise enzimática, verifica-se uma concentração em açúcares superior para o material pré-tratado com [GCP 100:1]. Para qualquer uma das amostras, e como expectável, a concentração aumenta quando o tempo passa de 6 para 24h de hidrólise enzimática, especialmente devido ao aumento da concentração de glucose como se pode visualizar na Figura 29. Observa-se ainda que a concentração de açúcares nos hidrolisados obtidos após 24h de ação enzimática usando madeira pré-tratada (26 a 32 mg/mL) é superior à da madeira original apresentada na secção anterior (22 mg/mL). A hidrólise enzimática da madeira tratada com [GCP 50:1] chega a apresentar um rendimento de 90%, muito superior ao obtido para a madeira original (76%), sendo um fator de indicativo de um melhor acesso à matriz celulósica por parte das enzimas. Este resultado revela que a remoção de apenas 7% da lenhina na madeira facilitou a sua digestibilidade.

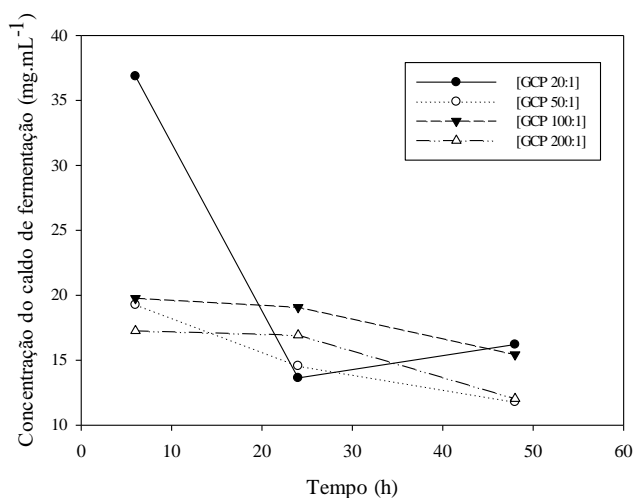
No material tratado com [GCP 200:1] obteve-se o menor rendimento de hidrólise enzimática. Face aos resultados obtidos no pré-tratamento, este comportamento já era esperado pois a matriz lenhocelulósica não sofreu uma dissolução tão elevada quanto a dos restantes e a lenhina dissolvida não foi suficiente para potenciar a acessibilidade das enzimas.



**Figura 29. a)** Concentração de celobiose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido resultante de um ciclo de pré-tratamento com diferentes composições de GCP; **b)** Concentração de glucose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido resultante de um ciclo de pré-tratamento com diferentes composições de GCP.

Finda a hidrólise enzimática procedeu-se à fermentação etanólica do hidrolisado obtido após 24h, e procedeu-se à análise das amostras retiradas ao longo do tempo com recurso ao HPLC. Como passível de observação na Figura 30, verifica-se que com o decorrer do tempo de fermentação a concentração em açúcares não fermentados no caldo de fermentação diminui ao longo do tempo.

Em comparação com os ensaios na madeira não tratada, obteve-se uma concentração de etanol cerca do dobro, às 6h de fermentação. Consequentemente, o rendimento e a produtividade em etanol são bem superiores – Tabela 21 – atingindo-se valores de 43% (vs 18%) e 0,58 g.(Lh)<sup>-1</sup> (vs 0,20 g.(Lh)<sup>-1</sup>), respetivamente, quando o líquido usado no pré-tratamento foi o [GCP 50:1].



**Figura 30.** Concentração do açúcares no caldo de fermentação ao longo do tempo referente aos hidrolisados do material pré-tratado com [GCP 20:1], [GCP 50:1], [GCP 100:1] e [GCP 200:1].

**Tabela 21.** Rendimento e produtividade em etanol após 6h de fermentação a 30°C dos hidrolisados do material pré-tratado com [GCP 20:1], [GCP 50:1], [GCP 100:1] e [GCP 200:1].

LÍQUIDO DE PRÉ-TRATAMENTO	RENDIMENTO EM ETANOL APÓS 6h (%)	PRODUTIVIDADE (g.(Lh) <sup>-1</sup> )
[GCP 20:1]	23,8	0,31
[GCP 50:1]	43,1	0,58
[GCP 100:1]	29,3	0,42
[GCP 200:1]	33,4	0,35

#### 4.3.3. HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DO MATERIAL NÃO DISSOLVIDO RESULTANTE DO PRÉ-TRATAMENTO COM [GCP 50:1] EM DOIS CICLOS DE EXTRAÇÃO

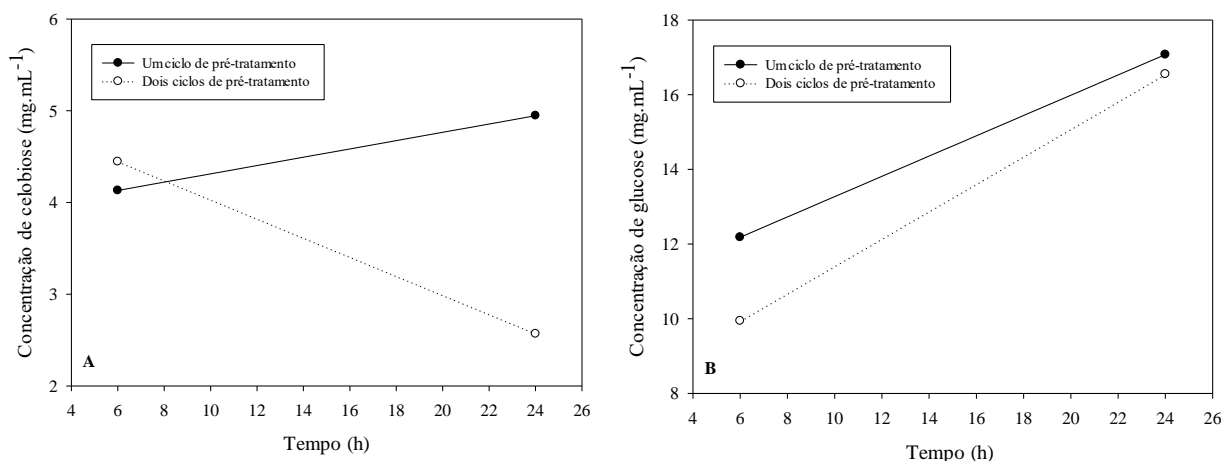
Tendo em conta que o uso de 2 ciclos de extração levou a um aumento de dissolução de lenhina de 7,9 para 11,4% (base madeira), usando o líquido [GCP 50:1], procedeu-se à realização de um ensaio de hidrólise enzimática (carga de 25 FPU.g<sup>-1</sup>) do material não dissolvido resultante de dois ciclos de pré-tratamento e assim comparar com os resultados supra obtidos apenas para 1 ciclo.

Os resultados obtidos para a concentração de açúcares libertados encontram-se na Tabela 22. Como se pode verificar, a maior extensão do grau de deslenhificação da madeira ocorrida com 2 ciclos não melhorou o desempenho do complexo enzimático na produção de açúcares fermentáveis pois, de um modo geral, a concentração de celobiose ou de glucose é menor nos hidrolisados provenientes de 2 ciclos de extração – Figura 31. Como consequência, o rendimento de hidrólise piorou em relação ao caso do material ter sido pré-tratado apenas com um ciclo de extração (Tabela 22).

**Tabela 22.** Concentração de açúcares no hidrolisado obtido ao longo do tempo da hidrólise enzimática a 50°C do material não dissolvido pré-tratado sob um e dois ciclos com [GCP 50:1].

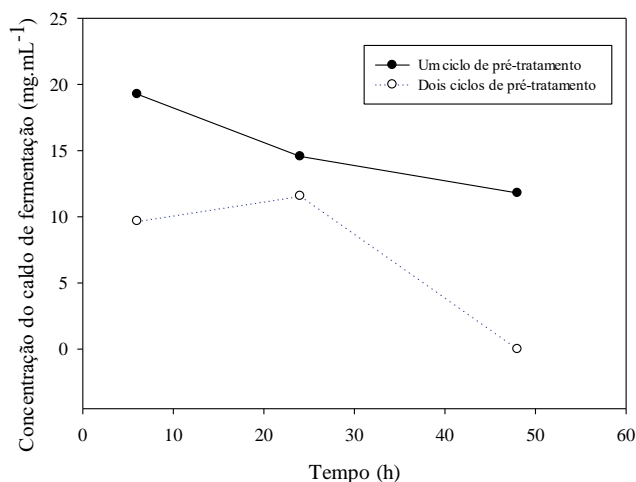
AMOSTRA	Açúcares (mg.mL <sup>-1</sup> )		RENDIMENTO DA HIDRÓLISE (%)	
	t = 6h	t = 24h	t = 6h	t = 24h
1 Ciclo de pré-tratamento	19,3	30,9	72,1	90,2
2 Ciclos de pré-tratamento	23,1	28,1	51,6	57,6

\*Açúcares – soma de glucose, manose, galactose, arabinose e celobiose



**Figura 31.** Concentração de celobiose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido pré-tratado com [GCP 50:1]; **b)** Concentração de glicose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido pré-tratado com [GCP 50:1].

A fermentação etanólica, ao longo de 48h, dos hidrolisados obtidos após a hidrólise enzimática mostrou que a concentração de açúcares no caldo diminuiu, seguindo a mesma tendência que nos casos anteriores – Figura 32. Como era previsível face aos resultados obtidos na etapa da hidrólise enzimática, a concentração de etanol apresentou-se mais baixa, após 6h de fermentação do hidrolisado resultante do tratamento em dois ciclos. O mesmo aconteceu com o rendimento e a produtividade em etanol obtidos após 6h de fermentação quando se usaram 2 ciclos (Tabela 23).



**Figura 32.** Concentração de açúcares no caldo de fermentação ao longo do tempo referente aos hidrolisados do material não dissolvido pré-tratado sob um e dois ciclos com [GCP 50:1].



**Tabela 23.** Rendimento e produtividade em etanol após 6h de fermentação a 30°C dos hidrolisados do material não dissolvido pré-tratado sob um e dois ciclos com [GCP 50:1].

AMOSTRA	RENDIMENTO EM ETANOL APÓS 6h (%)	PRODUTIVIDADE (g.(Lh) <sup>-1</sup> )
1 Ciclo de pré-tratamento	43,1	0,58
2 Ciclos de pré-tratamento	37,2	0,39

Este ensaio permitiu, uma vez mais, concluir que dois ciclos de pré-tratamento não se tornam vantajosos em relação a um ciclo de pré-tratamento. Tendo como especial relevância o líquido [GCP 50:1], dado que este tinha apresentado os melhores resultados para um ciclo de pré-tratamento comparativamente às restantes composições, após dois ciclos de pré-tratamento, o material não dissolvido apresenta características que invalidam a sua hidrólise e fermentação.

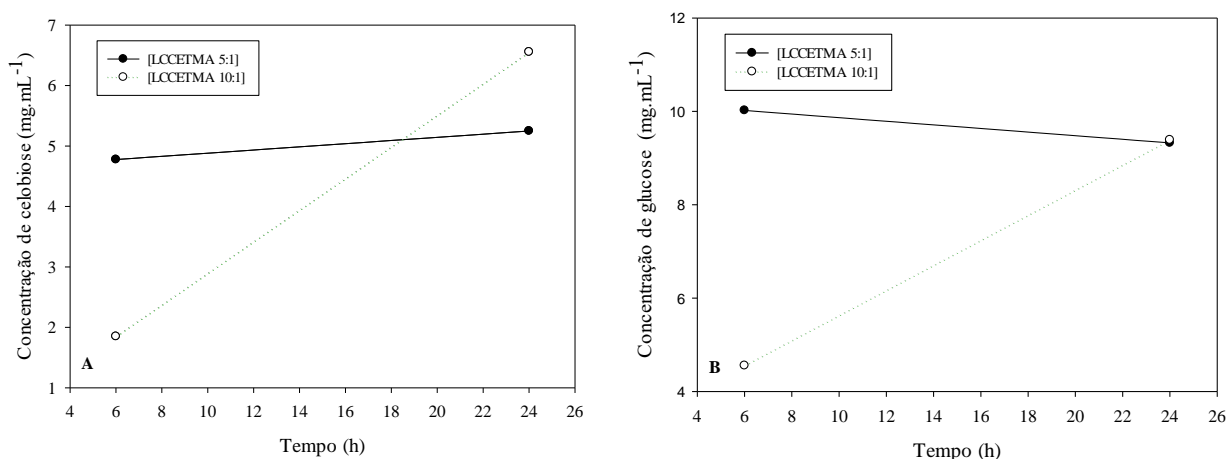
#### 4.3.4. HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DO MATERIAL NÃO DISSOLVIDO RESULTANTE DE UM CICLO DE PRÉ-TRATAMENTO COM LCCETMA

Analogamente ao realizado para o material pré-tratado com GCP, também o material pré-tratado com LCCETMA foi sujeito à hidrólise enzimática sob as mesmas condições, i.e. carga enzimática e tempo de hidrólise. A concentração de açúcares no hidrolisado obtido aumentou com o decorrer da hidrólise enzimática como mostra a Tabela 24. Para a amostra de madeira que foi tratada com o líquido [LCCETMA 5:1], só após 24h é que se verifica o aparecimento de outros açúcares no hidrolisado enzimático, acompanhado da diminuição de celobiose e glucose – Figura 33. Para a amostra de madeira que foi tratada com o líquido [LCCETMA 10:1], ocorreu um aumento de conversão em celobiose e glucose quando se aumentou o tempo de hidrólise para 24h – Figura 33.

**Tabela 24.** Concentração do hidrolisado obtido ao longo do tempo da hidrólise enzimática a 50°C do material não dissolvido resultante do pré-tratamento com diferentes composições de LCCETMA.

LÍQUIDO DE PRÉ-TRATAMENTO	AÇÚCARES* (mg.mL <sup>-1</sup> )		RENDIMENTO DA HIDRÓLISE (%)	
	t <sub>hidrólise</sub> = 6h	t <sub>hidrólise</sub> = 24h	t <sub>hidrólise</sub> = 6h	t <sub>hidrólise</sub> = 24h
[LCCETMA 5:1]	14,8	20,2	59,8	50,1
[LCCETMA 10:1]	13,6	22,2	26,1	48,4

\*Açúcares – soma de glucose, manose, galactose, arabinose e celobiose



**Figura 33.** a) Concentração de celbiose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido resultante de um ciclo de pré-tratamento com diferentes composições de LCCETMA; b) Concentração de glucose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido resultante de um ciclo de pré-tratamento com diferentes composições de LCCETMA.

No pré-tratamento com LCCETMA, verificou-se que a lenhina dissolvida para o [LCCETMA 10:1] era superior à do [LCCETMA 5:1], permitindo, aparentemente, um melhor acesso das enzimas ao material não dissolvido. Contudo, estes resultados mostram que os rendimentos de hidrólise são superiores para as amostras de madeira tratada com [LCCETMA 5:1].

Comparando com os resultados obtidos para os ensaios com madeira sem qualquer tipo de pré-tratamento ou tratada com GCP verifica-se que são inferiores. Estes resultados poderão dever-se ao facto de o LCCETMA ter na sua constituição ácido láctico, que de acordo com o apresentado na literatura (Jørgensen et al., 2007) é um composto inibidor para as enzimas.

Ainda assim os hidrolisados foram submetidos a um ensaio de fermentação, tendo-se obtido um rendimento e uma produtividade em etanol baixíssimos como mostra a Tabela 25. Estes resultados já eram espectáveis perante os resultados obtidos na hidrólise, dado que a fermentação necessita de fonte de carbono obtida na etapa anterior.

**Tabela 25.** Rendimento e produtividade em etanol após 6h de fermentação a 30°C dos hidrolisados do material não dissolvido resultante do pré-tratamento com diferentes composições de LCCETMA.

LÍQUIDO DE PRÉ-TRATAMENTO	RENDIMENTO EM ETANOL APÓS 6h (%)	PRODUTIVIDADE (g.(Lh) <sup>-1</sup> )
[LCCETMA 5:1]	17,9	0,14
[LCCETMA 10:1]	7,0	0,06

#### 4.3.5. HIDRÓLISE DO MATERIAL NÃO DISSOLVIDO RESULTANTE DO PRÉ-TRATAMENTO COM [LCCETMA 10:1] EM DOIS CICLOS DE EXTRAÇÃO

Com o estudo supra apresentado foi possível conhecer a forma como o pré-tratamento com LCCETMA influencia a subsequente hidrólise e fermentação do material não dissolvido. Além disso, também se quis entender como é que a severidade das condições operatórias podia influenciar a hidrólise e a fermentação do material não dissolvido obtido no fim do pré-tratamento. Assim, realizou-se a hidrólise enzimática do material não dissolvido resultante de um ciclo pré-tratamento com [LCCETMA 10:1] a 65 e a 80 °C e de dois ciclos de pré-tratamento a 80 °C, obtendo-se as concentrações de açúcares no hidrolisado e os rendimentos de hidrólise apresentados na Tabela 26.

**Tabela 26.** Concentração do hidrolisado obtido ao longo do tempo da hidrólise enzimática a 50°C do material não dissolvido pré-tratado sob diferentes condições operatórias com [LCCETMA 10:1].

AMOSTRA	AÇÚCARES* (mg.mL <sup>-1</sup> )		RENDIMENTO DA HIDRÓLISE (%)	
	t <sub>hidrólise</sub> = 6h	t <sub>hidrólise</sub> = 24h	t <sub>hidrólise</sub> = 6h	t <sub>hidrólise</sub> = 24h
1 Ciclo de pré-tratamento a 65°C	13,6	22,2	26,1	48,4
1 Ciclo de pré-tratamento a 80 °C	14,8	20,3	42,2	45,7
2 Ciclos de pré-tratamento a 80 °C	0,16	18,5	0,7	37,3

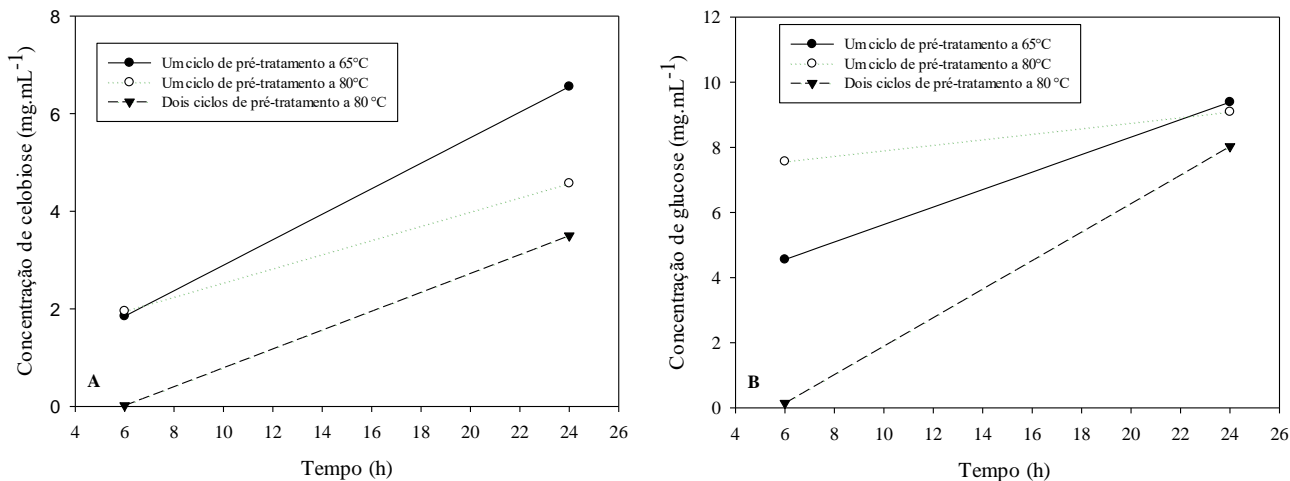
\*Açúcares – soma de glucose, manose, galactose, arabinose e celobiose

Independentemente do grau de severidade com o qual foi obtido o material não dissolvido, a concentração de hidrolisado aumentou ao longo do tempo, tal como em ensaios anteriores já discutidos. Contudo, o aumento de temperatura de 65 para 80°C na etapa de extração não fez melhorar a quantidade de açúcares fermentáveis nos hidrolisados, provavelmente por o teor de lenhina no material sólido tratado ser ainda demasiado elevado (só foram removidos 6,1 e 6,6% de lenhina, em base madeira, para essas duas condições operatórias – secção 4.2.2).

Acresce ainda que o uso de 2 ciclos de extração tiveram um efeito negativo na atividade enzimática já que, após 6h, não se observavam efeitos dessa atividade. A concentração de açúcares de 18,5 mg/mL foi obtida só na análise ao fim de 24h.

É ainda de salientar que a maioria destes resultados são inferiores aos apresentados para a hidrólise da madeira não tratada de *Acacia dealbata* (secção 4.3.1) e do material pré-tratado com GCP (secção 4.3.2). O facto da madeira *in natura* ser mais fácil de hidrolisar é um fator

indicativo da presença de compostos inibidores na matriz lenhocelulósica resultantes do pré-tratamento, como o ácido láctico derivado do LCCETMA.



**Figura 34.** a) Concentração de celobiose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido pré-tratado sob diferentes condições operatórias com [LCCETMA 10:1]; b) Concentração de glicose ao longo do tempo de hidrólise do material não dissolvido pré-tratado sob diferentes condições operatórias com [LCCETMA 10:1].

## 5. CONCLUSÕES

Para a realização deste trabalho experimental foi necessária a preparação dos líquidos LTTM – GCP e LCCETMA – para serem usados no pré-tratamento de *Acacia dealbata* a temperaturas de 80 e 65 °C, respetivamente, sendo estas superiores às experimentadas num trabalho anterior, com o objetivo de potenciar uma maior extração de lenhina.

Verificou-se que, para o pré-tratamento com GCP (mistura de glicerol com carbonato de potássio, em diferentes proporções molares), o rendimento de dissolução aumentou com o aumento da temperatura. O pré-tratamento com [GCP 50:1] revelou-se o mais promissor alcançando uma maior dissolução de lenhina de 7,9% em relação à madeira original.

Com o objetivo de extrair uma maior quantidade de lenhina, realizaram-se dois ciclos de pré-tratamento o que permitiu um aumento da dissolução de material e de lenhina. Contudo, o aumento na dissolução da lenhina, face à aos resultados obtidos para um ciclo de pré-tratamento, foram pouco promissores: apenas aumentou 3,3; 3,5; 1,7 e 3,5 g/100 g de madeira para a proporção 20:1, 50:1, 100:1 e 200:1, respetivamente. Infere-se que os custos associados aos reagentes e energéticos não compensará a realização de um segundo ciclo de pré-tratamento.

Estudou-se ainda a cinética de dissolução do pré-tratamento com [GCP 50:1] verificando-se que o aumento do tempo de operação levava a um aumento do rendimento de dissolução, bem como da lenhina dissolvida. Com este estudo foi possível concluir que 10h de pré-tratamento eram suficientes uma vez a proporção de lenhina no material dissolvido (ou seja, a seletividade do processo) era superior para este tempo, em comparação com os resultados obtidos para 16h de pré-tratamento.

O pré-tratamento com LCCETMA (mistura de ácido láctico com cloreto de (2-cloroetil)trimetilamónio) revelou-se mais seletivo, dado que, apesar de se ter obtido um menor rendimento de dissolução comparativamente ao alcançado com o GCP, o material dissolvido era maioritariamente constituído por lenhina. Assim, procedeu-se ao estudo da influência das condições operatórias no pré-tratamento com [LCCETMA 10:1] dado que o rendimento de dissolução alcançado era superior ao do [LCCETMA 5:1], tendo-se realizado um ciclo e dois ciclos de pré-tratamento a 80 °C. Obteve-se um maior rendimento de dissolução com o aumento da severidade do pré-tratamento. Contudo, apesar da lenhina dissolvida também aumentar, a quantidade de madeira dissolvida aumenta significativamente, pelo que se conclui que o pré-

tratamento com [LCCETMA 10:1] é mais seletivo para condições de menor severidade (1 ciclo a 65°C).

A lenhina dissolvida nos líquidos LTTM foi precipitada através da adição de um anti-solvente, com uma solução de água:acetona (1:1 m/m) ou com ácido sulfúrico a 0,05 M, obtendo-se um maior rendimento de precipitação no caso em que o LTTM usado foi o LCCETMA, independentemente do anti-solvente (55 a 97% do material dissolvido foi precipitado). Quando o GCP foi utilizado como líquido de dissolução, obtiveram-se melhores resultados para a precipitação com ácido sulfúrico. Contudo, o uso de ácido sulfúrico impossibilita a recuperação do LTTM.

Findo o pré-tratamento, realizou-se a hidrólise enzimática dos materiais não dissolvidos (madeira pré-tratada) e a fermentação etanólica dos açúcares produzidos. Repetiu-se este procedimento para a madeira não tratada de *Acacia dealbata*, como base de comparação.

Verificou-se que o material não dissolvido resultante do pré-tratamento com GCP alcançava melhores rendimentos de hidrólise em glucose, superiores aos obtidos apenas com a madeira *in natura*, à exceção do material pré-tratado com [GCP 200:1]. P.e. obteve-se um rendimento de hidrólise de 90,2% para o material pré-tratado com [GCP 50:1]. Os materiais pré-tratados com LCCETMA apresentaram um rendimento de hidrólise inferior ao da madeira *in natura*, o que pode dever-se à presença de compostos inibidores no material não dissolvido, nomeadamente, ácido láctico proveniente do LCCETMA.

Os melhores valores alcançados para o rendimento e a produtividade em etanol após 6h de fermentação (43,1% e 0,58 g.(Lh)<sup>-1</sup>, respetivamente) foram obtidos com os hidrolisados do material pré-tratado com [GCP 50:1]. Foi também verificado, uma vez mais, que a realização de um segundo ciclo de pré-tratamento não é uma mais-valia, dado que o material resultante desse pré-tratamento apresentou um rendimento e uma produtividade em etanol inferiores aos reportados acima.

Resumindo, o pré-tratamento com líquidos LTTM apresenta inúmeras vantagens face a outros pré-tratamentos, sendo possível a remoção seletiva de lenhina e permitindo a sua valorização numa fase posterior. Este pré-tratamento torna a matriz lenhocelulósica da *Acacia dealbata* mais acessível à hidrólise enzimática para alcançar melhores produções de bioetanol.

Sugestões para trabalhos futuros:

- Compreender de que forma o pré-tratamento influencia a matriz lenhocelulósica, nomeadamente, de que forma é que a cristalinidade da celulose e a estrutura da lenhina são afetadas;
- Estudar novos métodos para recuperar a lenhina dissolvida no LTTM;
- Recuperar o LTTMM e estudar a influência dos ciclos de reciclagem no pré-tratamento;
- Realizar novos ensaios de hidrólise e fermentação através da utilização de outros microrganismos e de outras técnicas processuais, nomeadamente, SSF;
- Realizar o pré-tratamento numa escala superior para avaliação da sua viabilidade;
- Estudar novos líquidos LTTM para a dissolução seletiva da madeira de *Acacia dealbata*.





## 6. BIBLIOGRAFIA

Afonso, F. “Dissolução de Madeira de Eucalipto em Líquidos Iónicos.” Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, (2013).

Aguilera, N., Becerra, J., Villaseñor-Parada, C., Lorenzo, P., González, L., Hernández, V. “Effects and identification of chemical compounds released from the invasive *Acacia dealbata* Link .” *Chemistry and Ecology*, 31, 479-493 (2015).

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M. “Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review.” *Bioresource Technology*, 101, 4851-4861 (2010).

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

BLC3 Campus de Tecnologia e Inovação. s.d. <http://www.blc3.pt/projects.php> (acedido em 14 de Maio de 2016).

Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J., Welton, T . “Desconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids.” *Green Chemistry*, 15 (3), 537-848 (2013).

Carvalho, M. G.V.S. “Efeito das Variáveis de Cozimento nas Características Químicas de Pastas Kraft de *Eucalyptus globulus* .” Tese de Doutoramento, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, Coimbra (1999).

Costa, R. “Influência da Estrutura dos Iões de Líquidos Iónicos na Dupla Camada Elétrica das Interfaces Eléctrodo/Líquido Iónico.” Tese de Doutoramento, Departamento de Química e Bioquímica, Universidade do Porto, Porto (2012).

Dai, Y., Spronsen, J., Witkamp, G., Verpoorte, R., Choi, Y. “Ionic Liquids and Deep Eutetic Solvents in Natural Products Research: Mixtures of Solids as Extraction Solvents.” *Journal of Natural Products*, 76 (11), 2162-2173 (2013).

Devarapalli, M., Atiyeh, H. “A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation.” *Biofuel Research Journal*, 2(3), 268-280 (2015).

Dien, B., Cotta, M., Jeffries, T. “Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status.” *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 258-266 (2003).

Dios, S. “Phase Equilibria for Extraction Processes with Designer Solvents.” Department of Chemical Engineering, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (2013).

Duarte, G., Moura, A., Moreira, R., Nunes, J., Figueiredo, M., Carvalho, M. “Evaluation of Several Forest Residues as Potential Raw Material for Bioethanol Production in Portugal.” *Bioprocess Engineering and Biorefinery*, 2(1), 1-6 (2013).

Ek, M., Gellerstedt, G., Henriksson, G. "Pulp and Paper Chemistry and Technology, Wood Chemistry and Wood Biotechnology", Vol. 1. Stockholm: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG (2009).

Fengel, D., Wegener, G., "Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions" Walter de Gruyter, Berlin (1984).

Ferreira, S., Gil, N., Queiroz, J. A., Duarte, A. P., Domingues, F. C. “An evaluation of the potential of *Acacia dealbata* as raw material for bioethanol production.” *Bioresource Technology*, 102 (7), 4766-4773 (2011).

Francisco, M., Bruinhorst, A., Kroon, M. “Low-Transition-Temperature Mixtures (LTTMs): A New Generation of Designer Solvents.” *Green Solvents*, 52, 3074-3085 (2013).

Galbe, M., Zacchi, G. “Pretreatment of Lignocellulosic Materials of Efficient Bioethanol Production.” *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108, 41-65 (2007).

Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M., Lidén, G., Zacchi, G. “Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today.” *Trends in Biotechnology*, 24(12), 549-556 (2006).

Hamelinck, C., Hooijdonk, G., Faaij, A. “Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term.” *Biomass & Bioenergy*, 28, 384-410 (2005)

Harmsen, P., Huijgen, W., López, L., Bakker, R. “Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass.” Energy research centre of the

Netherlands (2010), s.d. <http://www.ecn.nl/docs/library/report/2010/e10013.pdf> (acedido em 10 de Maio de 2016).

Hendriks, A., Zeeman, G. "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass." *Bioresource Technology*, 100, 10-18 (2009).

Jørgensen, H., Kristensen, J., Felby, C. "Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and oportunities." *Biofuels, Bioproducts & Biorrefining*, 1, 119-134 (2007).

Kroon, C., Casal, M., Brunhrost, A. "Pretreatment of lignocellulosic biomass and recovery of substituents using natural deep eutetic solvents/compound mixtures with low transition temperatures." International Application Published Under The Patent Cooperation Treaty (PCT), WO 2013/153203 A1 (2013).

Kumar, P., Barrett, D., Delwiche, M., Stroeve, P. "Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production." *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48, 3713-3729 (2009).

Lorenzo, P., González, L., Reigosa, M. "The genus *Acacia* as invader: the characteristic case of *Acacia dealbata* Link in Europe." *Annals of Florest Science*, 67, 101 (2009).

Madhavan, A., Srivastava, A., Kondo, A., Bisaria, V. "Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*." *Critical Reviews in Biotechnonology*, 32(1), 22-48 (2012).

Marques, T. "Dissolução selectiva da biomassa lenhocelulósica com misturas de baixa temperatura de transição vítrea ou eutética." Tese de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra (2015).

Mendes, C. "Avaliação do potencial das hemiceluloses, previamente extraídas da madeira de eucalipto, para fermentação etanólica." Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra, Coimbra, (2009).

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

Naser, J., Mjalli, F., Jibril, B., Al-Hatmi, S., Gano, Z. "Potassium Carbonate as a Salt for Deep Eutectic Solvents." *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 4, 114-118 (2013).

Paulova, L., Patakova, P., Branska, B., Rychtera, M., Melzoch, K. "Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency." *Biotechnology Advances*, 33, 1091-1107 (2015).

Pinkert, A. "Investigations on the use of ionic liquids for superior biomass processing." Tese de Doutorado, Department of Chemical and Process Engineering, University of Canterbury (2011).

Quilhó, L. "Produção de Bioetanol a partir de Materiais Lenho-Celulósicos de Sorgo Sacarino: Revisão Bibliográfica." Tese de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa (2011).

Sjöström, E. "Wood Chemistry - Fundamentals and Applications." San Diego: Academic Press, 2<sup>nd</sup> Edition (1993).

Srivastava, N., Rawat, R., Oberoi, H., Ramteke, P. "A review on Fuel Ethanol Production From Lignocellulosic Biomass." *International Journal of Green Energy*, 12, 949-960 (2015).

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

Sun, N., Rodríguez, H., Rahman, M., Rogers, R. "Where are ionic liquids strategies most suited in the pursuit of chemicals and energy from lignocellulosic biomass?" *Chem Commun (Camb)*, 47, 1405-1421 (2011).

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

Taherzadeh, M., Karimi, K.. "Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A review." *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 1621-1651 (2008).

Vieira, R., Barreira, R. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas. s.d. <http://www.icnf.pt/portal/florestas/fileiras/resource/docs/biom/rel-energ-flor-ib> (acedido em 14 de Maio de 2016).

Watkins, D., Nuruddin, M., Hosur, M., Tcherbi-Narteh, A., Jeelani, S. "Extraction and characterization of lignin from different biomass resources." *Journal of Materials Research and Technology*, 4(1), 26-32 (2014).

Wright, J. "Ethanol from lignocellulosic biomass: an overview." *Energy Progress*, 18(2) (1988).

Wyman, C. "Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges." *Annual Review of Energy and the Environment*, 24, 189-226 (1999).

Yáñez, R., Gómez, B., Martínez, M., Gullón, M., Alonso, J. "Valorization of an invasive woody species, *Acacia dealbata*, by means of Ionic liquid pretreatment and enzymatic hydrolysis ." *Journal Chemical Technology Biotechnology*, 89, 1337-1343 (2013).

Yang, B., Wyman, C. "Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol." *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 2, 26-40 (2007).

Yang, S., El-Enshasy, H., Thongchul, N. "Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers." New Jersey: John Wiley & Sons (2013).

Zhang, Q., Vigier, K., Royer, S., Jérôme, F. "Deep eutetic solvents: syntheses, properties and applications." *Chem. Soc. Rev.*, 41, 7108-7146 (2012).

Zheng, J., Rehmann, L. "Extrusion Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review." *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 18 967 - 18 984 (2014).



**| ANEXOS |**





## ANEXO I – METODOLOGIAS EXPERIMENTAIS

No presente anexo encontram-se descritas as metodologias utilizadas no decorrer do trabalho experimental, nomeadamente a determinação dos teores de secura, de extratáveis, de lenhina, tanto na madeira de *Acacia dealbata* como nos materiais não dissolvidos obtidos, a preparação dos materiais para a hidrólise e fermentação, e a determinação das quantidades de ácido sulfúrico necessárias à precipitação do material dissolvido resultante do pré-tratamento com GCP.

### ➤ TEOR DE SECURA

1. Colocar numa caixa de pesagem na balança (ANALÍTICA, precisão <1mg) e tarar (levar a zero). Pesar ~1g (base seca) de uma amostra de madeira, numa caixa de pesagem. Registrar a massa da amostra e a identificação da caixa e da amostra na folha de registro.
2. Colocar a caixa destapada (e a tampa) na estufa à temperatura de 105°C±1°C, durante um tempo superior a 4h e inferior a 24h (geralmente, durante a noite). Após a secagem, colocar a caixa, tapada, dentro de um exsiccador (no qual se abre temporariamente a torneira da tampa); colocar a tampa no exsiccador e fechar a torneira deste após ~1min de ter colocado a tampa; deixar arrefecer as caixas durante 20 a 30min à temperatura ambiente.
3. Após arrefecimento, abre-se a torneira e remove-se a tampa do exsiccador, destapa-se a caixa de pesagem e pesa-se a caixa com a amostra da madeira numa balança analítica previamente levada a zero. Retira-se a madeira, vertendo o conteúdo para o lixo e pesa-se novamente a caixa vazia (se necessário, retirar os vestígios da madeira com um pouco de papel higiénico sem esfregar demasiado). Em alternativa, pode-se tarar a caixa com madeira (levando o visor da balança a zero), retirar o conteúdo e pesar novamente – o valor visualizado corresponde à massa de fibra seca, evitando assim o cálculo da diferença das pesagens descritas acima.
4. O teor de secura (decimal) é obtido pela razão entre a massa de madeira seca ( $m_{ms}$ ) e a massa de madeira húmida ( $m_{mh}$ ):

$$\text{teor de secura} = \frac{m_{ms} (g)}{m_{mh} (g)}$$

5. Efetuar o ensaio em duplicado e determinar a média dos valores obtidos. A humidade, em percentagem, é  $100 \times (1 - \text{teor de secura decimal})$ .

➤ **EXTRATÁVEIS - TAPPI 204 CM-97**

1. Encher um cartucho de extração, previamente tarado, com madeira AD moída (entre 40 a 60 mesh) e seca ao ar, com humidade conhecida, até ~1cm do topo do cartucho (~10g -12g de madeira). Utilizar Soxhlets com uma capacidade de 125 mL. Colocar algodão dentro do cartucho para que a madeira não seja arrastada. Colocar o cartucho dentro do Soxhlet.
2. Na manta de aquecimento, coloca-se um balão de destilação de 250 mL. Medir 150 mL de acetona: colocar parte da acetona no Soxhlet, com cuidado, de modo a não ir para dentro do cartucho e deitar o resto da acetona no balão. Encaixar o Soxhlet (na posição vertical) no balão de destilação. Ligar ao Soxhlet um condensador. Ajustar a temperatura na manta de aquecimento de modo a que sejam feitos 6 ciclos por hora, durante 5 horas.
3. Retirar o cartucho com a madeira extraída e evaporar o solvente existente no balão até se obter um volume de 20 a 25 mL. Transferir o extrato para um copo previamente tarado, lavando bem as paredes do balão com um pouco de acetona. Colocar os extratos na estufa, a 105°C, durante 1 hora, deixar arrefecer ~20min no exsiccador e pesar.
4. Cálculo da percentagem de extratáveis:

$$\text{Extratáveis (\%)} = \frac{m_{\text{extratáveis}} (g)}{m_{\text{madeira seca}} (g)} \times 100$$

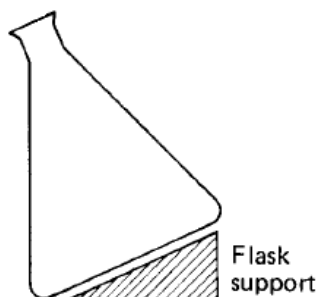
➤ **DETERMINAÇÃO DE LENHINA E MONOSSACARÍDEOS - TAPPI UM 250 E TAPPI T222**

Determinação da lenhina Klason e lenhina solúvel – neste método procede-se à hidrólise da amostra de madeira moída ou do material não dissolvido de modo semelhante à determinação da lenhina Klason pelo método TAPPI T222, com a exceção da hidrólise secundária (HS) ocorrer com ácido sulfúrico a 4% em vez de 3%. É assim possível a quantificação da lenhina Klason e solúvel após esta hidrólise.

A. *Procedimento Lenhina Klason Modificado para 4%:*

1. Pesar uma quantidade predefinida de madeira extraída moída/material não dissolvido (entre 20 a 60 mesh), para um copo de 50 mL.
2. Adicionar 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (densidade 1,63) e homogeneizar bem a mistura com uma vareta de vidro. Deixar hidrolisar durante duas horas a 20 °C, mexendo de 15 em 15 minutos.

3. Aquecer ~500mL de água destilada (por excesso), num balão de Erlenmeyer de 1L (com uma marca nos 440 mL), até cerca de 90 °C durante a última hora da hidrólise primária – HP (passo 2). No final, retirar cerca de 150 mL de água quente do Erlenmeyer para um copo para ser usada com água de lavagem.
4. No fim das duas horas de HP, transferir a mistura DEVAGAR para o Erlenmeyer contendo água quente. Uma vez que a água está próxima do ponto de ebulição, a diluição do ácido de 72 para 4% (densidade 1,025) pode provocar uma ebulição descontrolada e perda de material. Utilizar a água retirada do Erlenmeyer para lavagem do copo de modo a garantir que todo o material foi transferido e perfazer o volume de 440 mL.
5. Deixar em ebulição durante 4h, adicionando água quente (95 – 100 °C) de modo a manter o volume constante. Caso a ebulição esteja muito forte, pode ser adicionado um pouco de água mais fria.
6. Após as 4h de ebulição, retirar o Erlenmeyer da placa, aferir o volume até à marca de 440 mL e deixar em repouso durante a noite (de preferência inclinado entre 20 e 40°, como mostra a seguinte Figura 35) para sedimentação da lenhina.



**Figura 35.** Inclinação do Erlenmeyer para sedimentação da lenhina insolúvel.

7. No dia seguinte, filtrar a vácuo, o sedimento (lenhina insolúvel) num cadinho de placa porosa com papel de filtro (Macherey-Nagel, 25 Rundfilter MN GF-1 (que é necessário cortar à medida do cadinho)) previamente seco e tarado.
8. Antes de lavar o Erlenmeyer com água destilada, medir o volume do filtrado e recolher uma amostra para um frasco (com o filtrado recolhido é possível determinar a lenhina solúvel, por espectrofotometria UV a 205 nm e a quantidade de hidratos de carbono existentes na madeira, por HPLC).
9. Lavar o Erlenmeyer, bem lavado, com água destilada, recolhendo todo o material insolúvel para o cadinho.
10. O cadinho com a lenhina é seco a 105 °C até peso constante (>4h, máximo durante a noite).

11. Determinar a lenhina Klason do seguinte modo:

$$\text{Lenhina Klason (\%)} = \frac{m_{\text{lenhina}}}{m_{\text{madeira / material não dissolvido}}} \times 100$$

#### B. Procedimento de Lenhina Solúvel

1. Diluir o hidrolisado obtido anteriormente de modo a que sua absorvância (Abs) a 205 nm se encontre entre 0,2 e 0,8. Proceder ao seguinte cálculo tendo em conta o volume total ( $V_{\text{total}}$ ) de hidrolisado obtido (ponto A. 8), do fator de diluição (FD) utilizado, da massa de madeira inicial/material não dissolvido e do coeficiente específico de extinção da lenhina (110):

$$\text{Lenhina Solúvel (\%)} = \frac{\text{Abs} \times \text{FD} \times V_{\text{total}}}{110 \times m_{\text{madeira / material não dissolvido}}} \times 100$$

#### C. Procedimento para determinação dos monossacarídeos via HPLC

1. Transferir 10 mL de hidrolisado para um copo e adicionar carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) sólido até a neutralização completa (medir pH com uma sonda). Utilizar uma vareta de vidro para garantir homogeneidade da mistura.
2. Transferir a mistura para um tubo de ensaio e centrifugar a 2500 rpm durante 3 minutos.
3. Filtrar a solução com o pH ajustado (5 – 6) usando um filtro de seringa com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$  e proceder à injeção no HPLC.
4. Calcular a percentagem de cada monossacarídeo na madeira/material não dissolvido tendo em conta o volume de hidrolisado (mL), a massa de madeira/material não dissolvido (mg) e a concentração de monossacarídeo no hidrolisado dado pelo HPLC (mg/mL):

$$\text{Monossacarídeo (\%)} = \frac{[\text{monossacarídeo}] \times V_{\text{hidrolisado}}}{m_{\text{madeira / material não dissolvido}}} \times 100$$

onde,

[monossacarídeo] – concentração de glucose ou de xilose obtida por HPLC.

**Tabela 27.** Especificações para análise das amostras em HPLC.

Coluna	Aminex HPX-87P, BioRad
Pré-coluna	PL HI-PLEX ca
Temperatura do forno	80 – 85 °C
Eluente	Água ultra-pura filtrada a vácuo (filtro 0,45 $\mu\text{m}$ ) e colocada nos ultrassons (15 min)
Caudal	0,6 mL.min <sup>-1</sup>

#### D. Calibração do HPLC e determinação da linha de base

Previamente aos ensaios procede-se à injeção de soluções de açúcares individuais (glucose, manose, xilose, arabinose, galactose) para determinação do tempo de retenção e à injeção de misturas de açúcares em diferentes concentrações para registo da curva de calibração. Neste trabalho, procedeu-se às injeções de amostras dos hidrolisados e à determinação da linha de base dos cromatogramas, tendo-se recorrido à identificação dos tempos de retenção e às curvas de calibração registadas preliminarmente no HPLC pela Engenheira Cátia Mendes.

#### ➤ ENSAIO DE HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DE MATERIAIS LENHOCELULÓSICOS E FERMENTAÇÃO DOS AÇÚCARES PRODUZIDOS

Para preparar a solução de enzima diluída estabelece-se uma carga enzimática  $\text{FPU} \cdot \text{g}_{\text{material}}^{-1}$  – dose de enzima por cada grama de material lenhocelulósico, neste caso,  $25 \text{ FPU} \cdot \text{g}_{\text{material}}^{-1}$  para todos os ensaios, à exceção de um ensaio com madeira de *Acacia dealbata* com uma carga enzimática de  $35 \text{ FPU} \cdot \text{g}_{\text{material}}^{-1}$ . Conhecido o valor da atividade enzimática para  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  de, aproximadamente,  $142 \text{ FPU} \cdot \text{mL}_{\text{enzima}}^{-1}$ , determina-se o volume de solução de enzima original que será necessário para hidrolisar o material lenhocelulósico:

$$V_{\text{enzima}} (\text{mL}) = m_{\text{material lenhocelulósico}} (\text{g}) \times \frac{\text{FPU}}{g_{\text{material}}} \times \frac{\text{mL}_{\text{enzima}}}{\text{FPU}}$$

$$V_{\text{solução de enzima diluída}} (\text{mL}) = 5 = V_{\text{enzima}} + V_{\text{tampão}}$$

$$V_{\text{tampão}} (\text{mL}) = 5 - V_{\text{enzima}}$$

**Tabela 28.** Preparação dos ensaios de hidrólise dos materiais lenhocelulósicos.

ENSAIO	LTTM	CONDIÇÕES OPERATÓRIAS	m <sub>MND</sub> (g)	V <sub>enzima</sub> (mL)	V <sub>enzima</sub> (μL)	V <sub>tampão</sub> (mL)
E17	[GCP 200:1]	1 Ciclo	0,3915	0,0689	69	4,93
E16	[GCP 100:1]	1 Ciclo	0,3963	0,0698	70	4,93
E13	[GCP 50:1]	1 Ciclo	0,3612	0,0636	64	4,94
E12	[GCP 20:1]	1 Ciclo	0,3741	0,0659	66	4,93
E25	[GCP 50:1]	2 Ciclos	0,4375	0,0716	72	4,93
E35	[LCCETMA 10:1]	1 Ciclo	0,387	0,0681	68	4,93
E36	[LCCETMA 10:1]	1 Ciclo (80°C)	0,4072	0,0717	72	4,93
E44	[LCCETMA 10:1]	2 Ciclos (80°C)	0,4400	0,0775	77	4,92
E47	[LCCETMA 5:1]	1 Ciclo	0,3806	0,0670	67	4,93
	<i>Acacia dealbata</i> (25 $\text{FPU} \cdot \text{g}_{\text{material}}^{-1}$ )		0,338	0,0595	60	4,94
	<i>Acacia dealbata</i> (35 $\text{FPU} \cdot \text{g}_{\text{material}}^{-1}$ )		0,4068	0,1003	100	4,90

Para o ensaio de fermentação é necessária a preparação prévia do inóculo de levedura, para tal é necessário preparar o meio de cultura universal de leveduras composto de acordo com a Tabela 29.

Pesa-se a glucose num balão de Erlenmeyer de 100 mL e adicionam-se 25 mL de água destilada. Tapa-se o balão com algodão hidrófobo e cobre-se com papel e folha de alumínio. A peptona e os extratos pesam-se num frasco de tampa azul de 100 mL e adicionam-se 25 mL de água destilada. Esterilizam-se o balão tapado e o frasco (não totalmente fechado) na autoclave a 121 °C durante 15 min. Findo o tempo de esterilização, retiram-se da autoclave, fechando o frasco de tampa azul. Deixa-se arrefecer e adiciona-se a solução de peptona e extratos ao balão de Erlenmeyer. Este passo deve ser feito junto à chama (bico de Bunsen) para garantir a assepsia da transferência. Agita-se o balão e inocula-se, também à chama, o meio de cultura com células de levedura retiradas, com a ajuda de uma ansa, de um meio de cultura sólido. Coloca-se o balão tapado apenas com o algodão hidrófobo a incubar a 30 °C e 150 rpm durante a noite.

Ao hidrolisado é também adicionada uma solução de nutrientes para impulsionar o crescimento celular da levedura, sendo esta constituída pelos componentes da Tabela III, com as concentrações indicadas, mas para um volume total de 10 mL.

**Tabela 29.** Meio de cultura universal.

Composto	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Para V = 50 mL de inóculo	
		m (g)	V (mL)
Substrato:			
Glucose	10	0.5	25
Nutrientes:			
Peptona	5	0.25	
Extracto de malte	3	0.15	25
Extracto de levedura	3	0.15	

Para preparar tampão citrato a 1 M de pH 4.5, pesam-se 210 g de ácido cítrico monohidratado e adicionam-se 750 mL de água destilada. Adiciona-se hidróxido de sódio até se atingir um pH 4.3 (≈ 50-60 g). Dilui-se até 1000 mL e mede-se o pH. Se necessário adiciona-se hidróxido de sódio até pH 4.5. Dilui-se por fim para obter uma solução de tampão citrato 0.05 M.

#### ➤ PRECIPITAÇÃO DA LENHINA NO MATERIAL DISSOLVIDO COM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Aquando da precipitação com ácido sulfúrico a 0,05 M do material dissolvido resultante do pré-tratamento com GCP verificou-se que 10 g deste eram insuficientes, dado que, não ocorria precipitação da lenhina. A não formação de bolhas de dióxido de carbono no líquido ao ser adicionado ácido permitiu perceber que poderia não ocorrer a neutralização do carbonato de

potássio presente no meio e, conseqüentemente, a quantidade de ácido sulfúrico era insuficiente. Desta forma, seguiu-se a seguinte metodologia para todos os GCP.

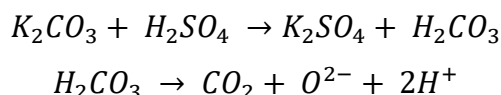
1. Determinar a proporção da quantidade de carbonato de potássio no GCP:

$$\frac{m_{K_2CO_3}}{m_{K_2CO_3} + m_{glicerol}} = x \frac{g_{K_2CO_3}}{g_{GCP}}$$

2. Multiplicar a quantidade de carbonato de potássio por cada grama de GCP pela quantidade de GCP usada em cada ensaio, por norma, aproximadamente, 10 g, e dividir pela massa molar do carbonato de potássio:

$$x \frac{g_{K_2CO_3}}{g_{GCP}} \times 10g_{GCP} = \frac{yg_{K_2CO_3}}{138,21 \frac{g_{K_2CO_3}}{mol_{K_2CO_3}}} = z \text{ mol}_{K_2CO_3}$$

3. Pela estequiometria da reação de neutralização, que é de 1 para 1, sabe-se que é necessário o mesmo nº de moles, sendo a massa de ácido = z mol de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> X 98 g/mol.



4. Determinar a massa de ácido sulfúrico a 0,05 M adicionar para perfazer a quantidade determinada no ponto anterior.

$$[H_2SO_4] = 0,05M = 0,05 \frac{mol}{L} \times 98,079 \frac{g}{mol} = 4,90 \frac{g}{L}$$

- 4.1. Supondo que previamente foi feita uma adição de 10 g de ácido sulfúrico:

$$\rho = 1,84 \frac{g}{cm^3}$$

$$V = \frac{10g}{1,84 \frac{g}{cm^3}} = 5,44 \text{ cm}^3 = 5,44 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$$

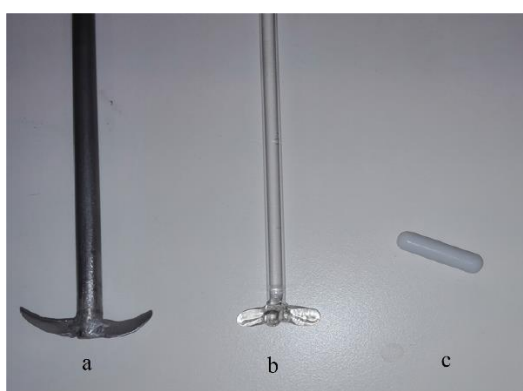
$$m_{H_2SO_4} = 4,90 \times 5,44 \times 10^{-3} = 0,027 \text{ g}$$

- 4.2. Ao saber a quantidade de ácido sulfúrico existente em 10g (já adicionada) é possível determinar a massa adicional correspondente à quantidade molar z necessária para cada um dos GCP.

## ANEXO II – ENSAIOS PRELIMINARES

Inicialmente, foram realizados alguns ensaios com o intuito de avaliar a forma que permitia uma dissolução mais homogênea, tendo-se testado para tal três formas de agitação: agitação mecânica com hélice de metal (a), agitação mecânica com hélice de vidro (b) e agitação magnética (c), a 700 rpm – Figura 36. Alguns problemas encontrados:

- A agitação mecânica conduzia a zonas mortas no copo de dissolução, capazes de serem distinguíveis a olho nu; a 700 rpm era necessário o ajuste da vareta no copo de dissolução (de fundo redondo) pois, caso contrário, girava o copo (que se encontrava mergulhado num banho de etilenoglicol) e não a mistura madeira e LTTM; por outro lado, existia apenas uma hélice de metal disponível (construída no DEQ).
- Devido à sua reduzida dimensão, a hélice de vidro apresentava uma elevada fragilidade, quebrando facilmente, inviabilizando o ensaio.



**Figura 36.** a) Hélice de metal; b) hélice de vidro; c) magnete.

**Tabela 30.** Rendimento de dissolução em função do tipo de agitação e da composição do GCP.

Agitação	Rendimento de dissolução (%)			
	[GCP 200:1]	[GCP 100:1]	[GCP 50:1]	[GCP 20:1]
Agitação mecânica – hélice de metal	14,29	25,51	16,38	13,47
Agitação mecânica – hélice de vidro	20,46	9,94	12,14	17,76
Agitação magnética	13,64	15,39	15,56	12,50

Estes testes tiveram também o intuito de permitir conhecer a reprodutibilidade dos ensaios – Tabela IV. Com a análise da Tabela IV é possível verificar que os rendimentos de dissolução obtidos para as diferentes composições de GCP com agitação magnética possuem a mesma ordem de grandeza que os obtidos com agitação mecânica com hélice de metal, à exceção do



[GCP 100:1]. Com a agitação mecânica com hélice de vidro os valores obtidos não são similares aos restantes. Optou-se então pela agitação magnética como forma de homogeneização da mistura madeira e LTTM.

Após a otimização do ensaio de dissolução da madeira de *Acacia dealbata*, foi realizado um ensaio preliminar de hidrólise e fermentação do material não dissolvido resultante do pré-tratamento com diferentes composições de GCP. Assumindo que a massa de material não dissolvido lavado era aproximadamente 0,5 g, optou-se por adicionar 50  $\mu\text{L}$  da solução enzimática. Sendo a atividade enzimática para 50 °C de, aproximadamente, 217,6  $\text{FPU}\cdot\text{mL}_{\text{enzima}}^{-1}$ , este ensaio correspondeu a usar uma carga enzimática de 15  $\text{FPU}\cdot\text{g}_{\text{material}}^{-1}$ .

Após 24 h de hidrólise foram retiradas amostras, tal como referenciado no Anexo I, e analisadas em HPLC, tendo sido obtidos os valores apresentados na Tabela V.

**Tabela 31.** Concentração de celobiose, glucose, xilose e glicerol obtida pela análise em HPLC do hidrolisado do material não dissolvido resultante do pré-tratamento com diferentes composições de GCP.

Composto ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	[GCP 200:1]	[GCP 100:1]	[GCP 50:1]	[GCP 20:1]
Celobiose	3,512	3,518	3,466	3,500
Glucose	17,100	16,017	17,069	18,193
Xilose	6,164	6,602	7,020	6,491
Glicerol	<b>11,223</b>	<b>4,355</b>	<b>5,137</b>	<b>10,822</b>

Através da análise da Tabela V, verifica-se que os hidrolisados apresentavam elevadas concentrações de glicerol, o que não é comum como produto de uma hidrólise enzimática a um material lenhocelulósico, pelo que foi necessária a otimização do processo de lavagem do material não dissolvido para remover o glicerol com origem no LTTM que fica aprisionado na textura sólida.

## ANEXO III – RESULTADOS COMPLETOS DA DETERMINAÇÃO DA LENHINA E MONOSSACARÍDEOS

Tabela 32. Determinação da lenhina na madeira de *Acacia dealbata* e no material não dissolvido resultante do pré-tratamento com os diferentes LTTMs.

Ensaio	m <sub>madeira</sub> seca/material não dissolvido seco (g)	m <sub>lenhina</sub> (g)	Lenhina Klason (%)* <sup>1</sup>	ABS* <sup>2</sup>	FD* <sup>3</sup>	V <sub>hidrolisado</sub> (mL)	Lenhina Solúvel (%)* <sup>4</sup>	Lenhina Total (%)* <sup>4</sup>	m <sub>lenhina,base</sub> madeira (g) * <sup>6</sup>	m <sub>MND</sub> original (g) * <sup>7</sup>	m <sub>lenhina no</sub> MND original (g) * <sup>8</sup>	Lenhina Dissolvida (%)* <sup>9</sup>
A1*	0,4120	0,0938	22,77	0,3780	13	422	4,58	27,34	0,1127	n.a.	n.a.	n.a.
E9	0,3277	0,0582	17,76	0,3475	7	385	2,60	20,36	0,0667	0,3796	0,0773	7,87
E10	0,3595	0,0707	19,67	0,4260	7	370	2,79	22,46	0,0807	0,3862	0,0867	5,80
E11	0,365	0,0717	19,64	0,3925	7	360	2,46	22,11	0,0807	0,3781	0,0836	6,50
E30	0,3384	0,0653	19,30	0,6975	4	390	2,92	22,22	0,0752	0,3721	0,0827	6,66
E20	0,4368	0,0784	17,95	0,7460	3	370	1,72	19,67	0,0859	0,4590	0,0903	9,26
E24	0,3941	0,0708	17,96	0,5690	3	350	1,38	19,34	0,0762	0,4646	0,0899	11,40
E26	0,4102	0,0758	18,48	0,3385	7	390	2,05	20,53	0,0842	0,4444	0,0912	9,98
E29	0,4176	0,0851	20,38	0,3365	7	420	2,15	22,53	0,0941	0,4515	0,1017	8,19
E41	0,382	0,0728	19,06	0,4520	6	390	2,52	21,57	0,0824	0,3858	0,0832	6,51
E42	0,367	0,0658	17,93	0,4740	6	400	2,82	20,75	0,0761	0,3841	0,0797	7,39
E45	0,369	0,0725	19,65	0,4990	6	370	2,73	22,38	0,0826	0,3934	0,0880	5,50
E46	0,374	0,0730	19,52	0,5780	6	365	3,08	22,60	0,0845	0,3958	0,0894	5,15
E32	0,4058	0,0756	18,63	0,4380	7	375	2,58	21,21	0,0861	0,4258	0,0903	5,00
E34	0,4103	0,0764	18,62	0,3665	6	405	1,97	20,59	0,0845	0,4150	0,0855	6,10
E37	0,3674	0,0676	18,40	0,3745	6	365	2,03	20,43	0,0751	0,4061	0,0830	6,61
E40	0,4162	0,0659	15,83	0,3655	6	390	1,87	17,70	0,0737	0,3928	0,0695	6,67

n.a. – não aplicável  
\*<sup>1</sup> – amostra de *Acacia dealbata*  
\*<sup>1</sup> – Lenhina Klason = (m<sub>lenhina</sub>/m<sub>madeira seca/material não dissolvido seco</sub>) x 100  
\*<sup>2</sup> – ABS: absorvância a 205 nm  
\*<sup>3</sup> – FD: fator de diluição  
\*<sup>4</sup> – Lenhina Solúvel = [(ABS x FD x V<sub>hidrolisado</sub> x 10<sup>-3</sup>)/(110 x m<sub>madeira seca/material não dissolvido seco</sub>)] x 100  
\*<sup>5</sup> – Lenhina Total = Lenhina Klason + Lenhina Solúvel  
\*<sup>6</sup> – m<sub>lenhina,base madeira</sub> = (m<sub>lenhina</sub>/100) x m<sub>madeira seca/material não dissolvido seco</sub>  
\*<sup>7</sup> – m<sub>MND original</sub>: massa de material não dissolvido obtido  
\*<sup>8</sup> – m<sub>lenhina no MND original</sub> = (m<sub>lenhina base madeira</sub> x m<sub>MND original</sub>)/ m<sub>madeira seca/material não dissolvido seco</sub>  
\*<sup>9</sup> – Lenhina Dissolvida = [(m<sub>lenhina na Acacia dealbata</sub> - m<sub>lenhina no MND original</sub>)/ m<sub>madeira seca/material não dissolvido seco</sub>] x 100

**Tabela 33.** Determinação de monossacarídeos e por sua vez, polissacarídeos da madeira e do material não dissolvido resultante do pré-tratamento.

Ensaio	Polissacarídeos Dissolvidos* (%)	m (mg)	[Glucose] (mg/mL)* <sup>1</sup>	[Xilose] (mg/mL)* <sup>2</sup>	[Celulose] (mg/mL)* <sup>3</sup>	[Hemicelulose] (mg/mL)* <sup>4</sup>	V <sub>hidrolisado</sub> (mL)	Celulose (%)* <sup>5</sup>	Hemicelulose (%)* <sup>6</sup>	Polissacarídeos Totais (%)* <sup>7</sup>	Polissacarídeos Dissolvidos (%)* <sup>8</sup>
A1	n.a.	462,6	0,44	0,196	0,396	0,1725	422	36,12	15,73	51,86	n.a.
E11	9,04	365	0,351	0,216	0,3159	0,1901	360	31,16	18,75	49,90	1,95
E30	9,92	338,4	0,337	0,104	0,3033	0,0915	390	34,95	10,55	45,50	6,36
E26	9,97	410,2	0,416	0,128	0,3744	0,1126	390	35,60	10,71	46,31	5,55
E29	11,74	417,6	0,248	0,063	0,2232	0,0554	420	22,45	5,58	28,02	23,83
E42	7,12	367	0,375	0,072	0,3375	0,0634	400	36,78	6,91	43,69	8,17
E46	7,06	374	0,332	0,091	0,2988	0,0801	365	29,16	7,82	36,98	14,88
E34	0,93	410,3	0,332	0,215	0,2988	0,1892	405	29,49	18,68	48,17	3,69

n.a. – não aplicável  
A1 – amostra de *Acacia dealbata*  
\*<sup>1</sup> – [Glucose]: concentração de glucose obtida por HPLC  
\*<sup>2</sup> – [Xilose]: concentração de glucose obtida por HPLC  
\*<sup>3</sup> – [Celulose] = [(180-18)/180] x [Glucose]  
\*<sup>4</sup> – [Hemicelulose] = [(150-18)/150] x [Xilose]  
\*<sup>5</sup> – Celulose = ([Celulose]x V<sub>hidrolisado</sub>)/ m<sub>madeira seca/material não dissolvido seco</sub>) x 100  
\*<sup>6</sup> – Hemicelulose = ([Hemicelulose]x V<sub>hidrolisado</sub>)/ m<sub>madeira seca/material não dissolvido seco</sub>) x 100  
\*<sup>7</sup> – Polissacarídeos Totais = Celulose + Hemicelulose  
\*<sup>8</sup> – Polissacarídeos Dissolvidos = Polissacarídeos Totais<sub>Acacia dealbata</sub> - Polissacarídeos Totais<sub>Ensaio</sub>  
\* - Polissacarídeos Dissolvidos = Rendimento de Dissolução – Lenhina Dissolvida

Pela análise da Tabela 33 é possível verificar que em qualquer um dos casos os polissacarídeos dissolvidos determinados pela diferença entre o rendimento de dissolução e os obtidos após o tratamento de dados obtidos por HPLC não são idênticos, sendo que na maioria dos casos, o valor obtido é superior ao rendimento de dissolução, o que é fisicamente impossível. Desta forma, não é possível obter uma conclusão válida e reprodutível dos polissacarídeos dissolvidos no material não dissolvido.

## ANEXO IV – ENSAIOS DE HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO DOS MATERIAIS LENHOCELULÓSICOS: ANÁLISES REALIZADAS EM HPLC

**Tabela 34.** Concentração de açúcares nohidrolisado após 6h de hidrólise enzimática obtida por análise em HPLC.

Composto	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )										
	[GCP 20:1]	[GCP 50:1]	[GCP 100:1]	[GCP 200:1]	[GCP 50:1] 2 Ciclos	[LCCETMA 5:1]	[LCCETMA 10:1]	[LCCETMA 10:1] 80 °C – 1 Ciclo	[LCCETMA 10:1] 80 °C – 2 Ciclos	Acacia dealbata (25 FPU.gmaterial <sup>-1</sup> )	Acacia dealbata (35 FPU.gmaterial <sup>-1</sup> )
Celobiose	5,692	4,131	6,376	7,198	4,445	4,776	1,849	1,955	0,019	4,962	4,618
Glucose	11,656	12,182	11,593	10,046	9,940	10,020	4,555	7,565	0,143	11,982	8,920
Xilose	3,646	0	4,350	3,533	8,696	0	7,194	5,317	0	0	5,352
Galactose	0	0	0	1,120	0	0	0	0	0	0	0
Arabinose	0,336	0	0	0,330	0	0	0	0	0	0,650	0
Manose	1,550	3,003	2,824	0	0	0	0	0	0	3,284	0
Total	22,880	19,316	25,143	22,227	23,081	14,796	13,599	14,838	0,162	20,878	18,890

**Tabela 35.** Composição percentual dos hidrolisados em açúcares após 6h de hidrólise enzimática obtida por análise em HPLC.

Composto	Composição em açúcares (%)										
	[GCP 20:1]	[GCP 50:1]	[GCP 100:1]	[GCP 200:1]	[GCP 50:1] 2 Ciclos	[LCCETMA 5:1]	[LCCETMA 10:1]	[LCCETMA 10:1] 80 °C – 1 Ciclo	[LCCETMA 10:1] 80 °C – 2 Ciclos	Acacia dealbata (25 FPU.gmaterial <sup>-1</sup> )	Acacia dealbata (35 FPU.gmaterial <sup>-1</sup> )
Celobiose	24,9	21,4	25,4	32,3	19,3	32,3	13,6	13,2	11,7	23,8	24,4
Glucose	50,9	63,1	46,1	45,2	43,1	67,7	33,5	51,0	88,3	57,4	47,2
Xilose	15,9	0	17,3	15,9	37,7	0	52,9	35,8	0	0	28,3
Galactose	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
Arabinose	1,5	0	0	1,5	0	0	0	0	0	3,1	0
Manose	6,8	15,5	11,2	0	0	0	0	0	0	15,7	0

**Tabela 36.** Concentração de açúcares no hidrolisado após 24h de hidrólise enzimática obtida por análise em HPLC.

Composto	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )										
	[GCP 20:1]	[GCP 50:1]	[GCP 100:1]	[GCP 200:1]	[GCP 50:1] 2 Ciclos	[LCCETMA 5:1]	[LCCETMA 10:1]	[LCCETMA 10:1] 80 °C – 1 Ciclo	[LCCETMA 10:1] 80 °C – 2 Ciclos	Acacia dealbata (25 FPU.g <sup>-1</sup> material <sup>-1</sup> )	Acacia dealbata (35 FPU.g <sup>-1</sup> material <sup>-1</sup> )
Celobiose	8,757	4,964	6,008	7,340	2,569	5,248	6,553	4,571	3,498	4,288	2,318
Glucose	16,360	17,073	17,883	13,348	16,550	9,325	9,388	9,088	8,024	13,508	12,318
Xilose	2,575	5,357	4,395	0	8,957	5,664	6,278	6,662	7,020	0	4,954
Galactose	0	0	0	2,787	0	0	0	0	0	3,136	0
Arabinose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,359	0
Manose	0	3,517	3,852	3,852	0	0	0	0	0	0	0
Total	27,875	30,893	32,138	25,630	28,075	20,237	22,219	20,321	18,542	22,290	20,107

**Tabela 37.** Composição percentual dos hidrolisados em açúcares após 24h de hidrólise enzimática obtida por análise em HPLC.

Composto	Composição em açúcares (%)										
	[GCP 20:1]	[GCP 50:1]	[GCP 100:1]	[GCP 200:1]	[GCP 50:1] 2 Ciclos	[LCCETMA 5:1]	[LCCETMA 10:1]	[LCCETMA 10:1] 80 °C – 1 Ciclo	[LCCETMA 10:1] 80 °C – 2 Ciclos	Acacia dealbata (25 FPU.g <sup>-1</sup> material <sup>-1</sup> )	Acacia dealbata (35 FPU.g <sup>-1</sup> material <sup>-1</sup> )
Celobiose	31,4	16,0	18,7	28,6	9,1	25,9	29,5	22,5	18,9	19,2	11,5
Glucose	58,7	55,3	55,6	52,1	58,9	46,1	42,3	44,7	43,3	60,6	58,9
Xilose	9,9	17,3	13,7	0	31,9	28,0	28,3	32,8	37,9	0	31,9
Galactose	0	0	0	10,9	0	0	0	0	0	14,1	0
Arabinose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,1	0
Manose	0	11,4	12,0	8,4	0	0	0	0	0	0	0

Através dos resultados representados nas Tabelas 34 e 36 é possível determinar o rendimento da hidrólise relativamente à glucose, tal como apresentado na Tabela 38.

**Tabela 38.** Cálculo do rendimento de hidrólise em glucose após 6 e 24h de hidrólise enzimática.

Amostra	m <sub>material não dissolvido</sub> (g)	m <sub>celulose</sub> (g)	Tempo de hidrólise = 6h				Tempo de hidrólise = 24h			
			[glucose] (mg/mL)	m <sub>glucose</sub> (g)	m <sub>glucana</sub> (g)	$\eta$ <sub>hidrólise</sub> (%)	[glucose] (mg/mL)	m <sub>glucose</sub> (g)	m <sub>glucana</sub> (g)	$\eta$ <sub>hidrólise</sub> (%)
[GCP 20:1]	0,3741	0,1481	11,656	0,1096	0,0986	66,6	16,36	0,1374	0,1237	83,5
[GCP 50:1]	0,3612	0,1430	12,182	0,1145	0,1031	72,1	17,073	0,1434	0,1291	90,2
[GCP 100:1]	0,3963	0,1569	11,593	0,1090	0,0981	62,5	17,883	0,1502	0,1352	86,1
[GCP 200:1]	0,3915	0,1550	10,046	0,0944	0,0850	54,8	13,348	0,1121	0,1009	65,1
[GCP 50:1] 2 Ciclos	0,4375	0,1733	9,94	0,0994	0,0895	51,6	12,318	0,1109	0,0998	57,6
[LCCETMA 5:1]	0,3806	0,1507	10,02	0,1002	0,0902	59,8	9,325	0,0839	0,0755	50,1
[LCCETMA 10:1]	0,3970	0,1572	4,555	0,0456	0,0410	26,1	9,388	0,0845	0,0760	48,4
[LCCETMA 10:1] 80 °C – 1 Ciclo	0,4072	0,1613	7,565	0,0757	0,0681	42,2	9,088	0,0818	0,0736	45,7
[LCCETMA 10:1] 80 °C – 2 Ciclos	0,4400	0,1742	0,143	0,0014	0,0013	0,7	8,024	0,0722	0,0650	37,3
Acacia dealbata (25 FPU.g <sub>material</sub> <sup>-1</sup> )	0,3380	0,1338	11,9832	0,1126	0,1014	75,7	13,5080	0,1135	0,1021	76,3
Acacia dealbata (35 FPU.g <sub>material</sub> <sup>-1</sup> )	0,4068	0,1611	8,9200	0,0892	0,0803	49,8	13,5080	0,1216	0,1094	67,9

**Tabela 39.** Concentração de açúcares no caldo de fermentação após 6h de fermentação etanólica obtida por análise em HPLC.

Composto	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )										
	[GCP 20:1]	[GCP 50:1]	[GCP 100:1]	[GCP 200:1]	[GCP 50:1] 2 Ciclos	[LCCETMA 5:1]	[LCCETMA 10:1]	[LCCETMA 10:1] 80 °C – 1 Ciclo	[LCCETMA 10:1] 80 °C – 2 Ciclos	Acacia dealbata (25 FPU.g <sup>-1</sup> material <sup>-1</sup> )	Acacia dealbata (35 FPU.g <sup>-1</sup> material <sup>-1</sup> )
Celobiose	16,418	8,376	15,690	0	2,505	1,683	1,674	1,001	1,712	9,178	1,556
Glucose	17,750	9,284	2,571	14,863	2,762	2,843	2,897	6,066	6,349	5,425	4,668
Xilose	1,398	1,609	1,464	1,153	3,128	0,479	0	0,714	0,311	3,988	0,577
Glicerol	1,300	0	0	2,121	1,277	0	0	0	0,268	0,921	0,950
Etanol	1,851	3,502	2,486	0,098	2,339	0,853	0,344	1,312	1,728	1,172	1,647
Xilitol	0	0	0,042	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	38,718	22,771	22,262	19,385	12,011	5,858	4,906	9,093	10,367	17,876	9,377

**Tabela 40.** Concentração de açúcares no caldo de fermentação após 12h de fermentação etanólica obtida por análise em HPLC.

Composto	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )										
	[GCP 20:1]	[GCP 50:1]	[GCP 100:1]	[GCP 200:1]	[GCP 50:1] 2 Ciclos	[LCCETMA 5:1]	[LCCETMA 10:1]	[LCCETMA 10:1] 80 °C – 1 Ciclo	[LCCETMA 10:1] 80 °C – 2 Ciclos	Acacia dealbata (25 FPU.g <sup>-1</sup> material <sup>-1</sup> )	Acacia dealbata (35 FPU.g <sup>-1</sup> material <sup>-1</sup> )
Celobiose	0	0	0	0	5,674	2,033	1,414	3,103	3,190	0	7,444
Glucose	12,215	12,579	13,845	15,707	3,053	5,484	4,383	0,632	5,924	14,412	0
Xilose	0,624	0,911	1,565	0,577	1,559	0	0	0	0	0,233	0,283
Glicerol	0	0,383	0,476	0	0,112	0	0	0	0,152	0	0,026
Etanol	0,330	0,187	0,081	0,132	0	0,096	0	0	0,173	0,282	0
Xilitol	0,799	0,686	1,026	0,644	1,191	0	0	0	0,618	0,126	0
Total	13,969	14,748	19,156	17,060	11,570	7,614	5,797	3,735	9,608	14,072	7,753



**Tabela 41.** Concentração de açúcares no caldo de fermentação após 24h de fermentação etanólica obtida por análise em HPLC.

Composto	Concentração (mg.mL <sup>-1</sup> )										
	[GCP 20:1]	[GCP 50:1]	[GCP 100:1]	[GCP 200:1]	[GCP 50:1] – 2 Ciclos	[LCCETMA 5:1]	[LCCETMA 10:1]	[LCCETMA 10:1] 80 °C – 1 Ciclo	[LCCETMA 10:1] 80 °C – 2 Ciclos	Acacia dealbata (25 FPU.g <sup>material</sup> <sup>-1</sup> )	Acacia dealbata (35 FPU.g <sup>material</sup> <sup>-1</sup> )
Celobiose	0	0	0	0	0	1,864	0	2,226	2,588	0	0,642
Glucose	14,239	11,081	12,432	12,057	0	0	0	0	0,430	14,295	0
Xilose	0,704	0,714	1,149	0	0	0	0	0	0	0,500	0
Glicerol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Etanol	0,229	0,266	0,595	0	0,170	0	0	0	0	0,025	0,034
Xilitol	1,264	0	1,851	1,104	0	0	0	0	0	0,105	0,059
Total	16,436	12,601	16,026	13,162	0,170	1,864	0	2,226	3,153	14,926	0,735

Com os resultados obtidos foi possível determinar o rendimento e produtividade em etanol após 6h de fermentação, tendo em conta a glucose disponível após 24h de hidrólise enzimática – Tabela 42.

**Tabela 42.** Rendimento e produtividade em etanol após 6h de fermentação etanólica.

Amostra	m <sub>glucose</sub> (g)	[etanol] (mg/mL)	m <sub>metanol</sub> (g)	$\eta_{\text{fermentação}}$ (%)	Produtividade (g/(Lh))
[GCP 20:1]	0,1374	1,851	0,0167	23,8	0,31
[GCP 50:1]	0,1434	3,502	0,0315	43,1	0,58
[GCP 100:1]	0,1502	2,496	0,0225	29,3	0,42
[GCP 200:1]	0,1121	2,121	0,0191	33,4	0,35
[GCP 50:1] 2 Ciclos	0,0839	0,853	0,0077	17,9	0,14
[LCCETMA 5:1]	0,1109	2,339	0,0211	37,2	0,39
[LCCETMA 10:1]	0,0845	0,334	0,0030	7,0	0,06
[LCCETMA 10:1] 80 °C – 1 Ciclo	0,0818	1,312	0,0118	28,3	0,22
[LCCETMA 10:1] 80 °C – 2 Ciclos	0,0722	1,728	0,0156	42,2	0,29
<i>Acacia dealbata</i> (25 FPU.g <sub>material</sub> <sup>-1</sup> )	0,1135	1,172	0,0105	18,2	0,20
<i>Acacia dealbata</i> (35 FPU.g <sub>material</sub> <sup>-1</sup> )	0,1216	1,647	0,0148	23,9	0,27