Rodrigo João Oliveira Travassos Pimenta

PRODUÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTÁVEIS A PARTIR DE FIBRAS RESIDUAIS DE UMA FÁBRICA DE PAPEL *KRAFT*

UNIVERSIDADE D COIMBRA

1 2 9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Rodrigo João Oliveira Travassos Pimenta

PRODUÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTÁVEIS A PARTIR DE FIBRAS RESIDUAIS DE UMA FÁBRICA DE PAPEL *KRAFT*

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química, área de especialização Processo, Ambiente e Energia, orientada pelo Professor Doutor Jorge Manuel dos Santos Rocha e pela Professora Doutora Maria da Graça Carvalho e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Fevereiro de 2020

Departamento de Engenharia Química
Faculdade de Ciências e Tecnologias

1 2 9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

PRODUÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTÁVEIS A PARTIR DE FIBRAS RESIDUAIS DE UMA FÁBRICA DE PAPEL *KRAFT*

Rodrigo João Oliveira Travassos Pimenta

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química, área de especialização Processo, Ambiente e Energia, orientada pelo Professor Doutor Jorge Manuel dos Santos Rocha e pela Professora Doutora Maria da Graça Carvalho e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Fevereiro de 2020

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores, Professor Doutor Jorge Rocha e Professora Doutora Maria Graça Carvalho, pela disponibilidade, paciência e motivação que demonstraram ao longo deste trabalho.

Em segundo lugar, quero agradecer à Engenheira Cátia Mendes, pela supervisão e ajuda que deu durante todo o processo laboratorial, e à Engenheira Beatriz Banaco, companheira de laboratório, que me apoiou na realização desta dissertação.

À fábrica Europac™ Kraft Viana, S.A, de Viana do Castelo, pelo fornecimento da matérias-primas usadas neste trabalho e à empresa Novozymes™, pelo fornecimento do extrato enzimático Cellic CTec 2™.

Quero aqui agradecer à minha família, destacando os meus pais, Fernando Pimenta e Maria de Lurdes Cravo, pela motivação, apoio e carinho incondicional que me deram desde os inícios dos meus tempos.

Gostaria ainda de deixar uma palavra de apreço aos grupos que me têm acompanhado nesta maratona, ao Grupo Etnográfico Danças e Cantares do Mondego e à banda Rádio de Pilhas, por me permitiram crescer em áreas que não Engenharia Química.

Para finalizar, quero ainda agradecer aos meus amigos, destacando Ana Margarida, Raquel Ferreira, Ruben Henriques e Ricardo Nunes, pelos inúmeros momentos de descontração e companheirismo.

Este trabalho insere-se no âmbito do Projecto “MultiBiorefinery” (POCI-01-0145-FEDER-016403= - “Multi-purpose strategies for broadboard agro-forest and fisheries by-products valorization: a step forward a truly integrated biorefinery”.

Resumo

O estudo de novos tipos de energia e seus processos de produção tem sido encorajada devido ao elevado consumo energético global. A biomassa lenhocelulósica, devido à sua ubiquidade, tem sido alvo de extensos estudos com vista à produção de açúcares fermentáveis, produtos intermédios em diversos processos industriais, ou etanol. Adicionalmente, a nível industrial, são produzidas quantidades elevadas de lamas primárias que ainda podem ser reaproveitadas para a obtenção de produtos com valor acrescentado.

Os processos biotecnológicos são processos de baixo custo energético e manutenção, o que os torna especialmente interessantes para aplicações e processos industriais. Dentro desses processos, encontra-se a hidrólise enzimática, um processo que recorre a enzimas, como a celulase, para transformar celulose em glucose, um açúcar fermentável, e a sacarificação e fermentação simultâneas, ou SSF, um processo que se foca na produção de bioetanol com recurso a leveduras, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que consomem os açúcares simples na sua atividade metabólica.

O principal objetivo deste trabalho foi estudar a viabilidade das lamas primárias, provenientes de uma fábrica de papel *kraft*, às quais foram adicionadas fibras recicladas, para a produção direta de açúcares fermentáveis, através do processo de hidrólise enzimática e para a produção de bioetanol, através da metodologia SSF.

Observou-se que a partir do processo de hidrólise enzimática, a concentração máxima de glucose obtida para as lamas primárias foi de 15,2 g L^{-1}, resultando num rendimento teórico de hidrólise de 64,6%. Posteriormente estudou-se a aplicação de um tratamento alcalino com fosfato monopotássico, um agente que permite remover tintas, onde se obteve uma concentração de açúcares de 19,6 g L^{-1} ao fim de 24 h de reação.

Na metodologia SSF obtiveram-se concentrações máximas de etanol de 6,2 g L^{-1} para as lamas primárias sem tratamento e de 6,9 g L^{-1} para as lamas primárias com tratamento alcalino, para uma consistência de 3% de massa de suspensão. No entanto, para as lamas com o tratamento mencionado anteriormente, e para uma consistência superior, 6%, obteve-se uma concentração máxima de etanol de 11,8 g L^{-1}.

PALAVRAS-CHAVE: Açúcares fermentáveis, hidrólise enzimática, lamas primárias, matéria lenhocelulósica, etanol.

Abstract

The study of new types of energy and their production processes has been encouraged due to the high global energy consumption. Lignocellulosic biomass, due to its ubiquity, has been the subject of extensive studies considering the production of fermentable sugars, intermediate compounds in various chemical processes, and ethanol production. Additionally, at an industrial level, high quantities of sludge are produced that can still be used to generate products with greater value.

Biotechnological processes are processes with a low energy and maintenance cost, which make them especially valued for industrial applications and processes. Within these processes, enzymatic hydrolysis is a process that uses enzymes, like cellulose, to transform cellulose into glucose, a fermentable sugar, and simultaneous saccharification and fermentation (SSF) is a process that produces bioethanol with the utilization of yeasts, like *Saccharomyces cerevisiae*, who consume simple sugars for their metabolism to produce ethanol.

The primary objective of this work was to study the viability of the primary sludge, given by a *kraft* paper facility, to which were added recycled fibres, for the direct production of fermentable sugars, by the use of the enzymatic hydrolysis process, and for bioethanol production, by the use of the SSF methodology.

The maximum sugar concentration observed in the enzymatic hydrolysis, for the primary non-treated sludge was 15,2 g L^{-1}, which represents a theoretical hydrolysis yield of 64,6%. Meanwhile, by applying an alkaline treatment with the aid of monopotassium phosphate, an additive that allows ink removal, a maximum sugar concentration of 19,6 g L^{-1} was obtained, after 24 h.

In the SSF methodology, the maximum ethanol concentration was 6,2 g L^{-1} for the non-treated primary sludge and 6,6 g L^{-1} for the treated sludge, both for a mass concentration of 3%. However, for a higher consistency, 6%, a maximum ethanol concentration of 11,8 g L^{-1} was obtained for the treated primary sludge.

***KEYWORDS**: Fermentable sugars, Enzymatic Hydrolysis, primary sludge, lignocellulosic biomass, ethanol.*

Índice Remissivo

Agradecimentos....iii
Resumo....v
Abstract....vii
Índice Remissivo....ix
Índice de Figuras....xi
Índice de Tabelas....xiii
1 Introdução....1
2 Revisão Bibliográfica....3
2.1 Biomassa lenhocelulósica....3
2.1.1 Celulose....3
2.1.2 Hemicelulose....4
2.1.3 Lenhina....5
2.2 Preparação da biomassa....7
2.2.1 Tipos de pré-tratamentos....7
2.2.1.1 Pré-tratamentos mecânicos....8
2.2.1.2 Pré-tratamentos físico-químicos....8
2.2.1.3 Pré-tratamentos biológicos....9
2.2.2 Complexidade da biomassa lenhocelulósica....10
2.3 Hidrólise Enzimática....11
2.3.1 Enzimas....12
2.4 Fermentação....13
2.4.1 Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF)....14
3 Materiais e métodos....15
3.1 Materiais....15
3.1.1 Material Lenhocelulósico....15
3.1.2 Celulase Cellic CTec 2™....16
3.1.3 Levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602™....16
3.2 Caracterização das matérias-primas....17
3.2.1 Índice Kappa....19
3.2.2 Fibra virgem lavada e extraída....20
3.2.3 Tratamentos às lamas compostas....20
3.2.4 Atividade Enzimática....21

3.3 Hidrólise Enzimática 22
3.4 Sacarificação e Fermentação Simultâneas 24
4 Resultados e Discussão 27
4.1 Caracterização dos Materiais 27
4.1.1 Lamas Compostas e Fibra Virgem 27
4.1.2 Fibra Virgem Lavada e Extraída 31
4.1.3 Tratamento das Lamas Compostas 33
4.2 Hidrólise Enzimática 35
4.2.1 Influência do tipo de agitação: orbital, mecânica e magnética 35
4.2.2 Tratamento das Lamas Compostas 41
4.2.3 Consistência de 6% de massa de suspensão 43
4.3 Sacarificação e Fermentação Simultâneas 45
4.3.1 SSF com consistência de 3% e carga enzimática de 15 FPU/g_{HC} 45
4.3.2 SSF com consistência de 3% e carga enzimática de 10 FPU/g_{HC} 47
4.3.3 SSF com consistência de 6% e carga enzimática de 15 FPU/g_{HC} 49
4.3.4 SSF com consistência de 6% e carga enzimática de 10 FPU/g_{HC} 50
5 Conclusão e propostas de trabalhos futuros 533
6 Bibliografia 55

Índice de Figuras

Figura 1 – Saco feito de papel *kraft* 1
Figura 2 – Molécula de etanol 2
Figura 3 – Ilustração da molécula de celulose, cujo monómero é a celobiose, que por sua vez, é constituída por moléculas de glucose ($C_6H_{12}O_6$) (adaptado de Chen, 2014). 4
Figura 4 – Monómeros principais da lenhina (adaptado de Mu *et al.*, 2018) 5
Figura 5 – Representação ilustrativa da estrutura da lenhina de resinosas, com os grupos metoxilo (-OMe) (adaptado de Chen, 2014) 6
Figura 6 – Ilustração de um moinho de martelos 8
Figura 7 – *White rot fungi* no tronco de uma árvore 9
Figura 8 – Microestrutura da biomassa lenhocelulósica 10
Figura 9 – Levedura *Saccharomyces cerevisiae* 16
Figura 10 – Cromatograma obtido do hidrolisado da fibra virgem (FV) utilizando a coluna REZEX™ ROA-Organic Acid (H^+) 29
Figura 11 – Cromatograma obtido do hidrolisado da fibra virgem (FV) utilizando a coluna REZEX™ RPM-Monosaccharide (Pb^{2+}) 29
Figura 12 – Cromatograma obtido do hidrolisado das lamas compostas (LC) utilizando a coluna REZEX™ ROA-Organic Acid (H^+) 30
Figura 13 – Cromatograma obtido do hidrolisado das lamas compostas (LC) utilizando a coluna REZEX™ RPM-Monosaccharide (Pb^{2+}) 30
Figura 14 – Cromatograma obtido do hidrolisado da Fibra Virgem Extraída (FV_E) utilizando a coluna REZEX™ ROA-Organic Acid (H^+) 32
Figura 15 – Cromatograma obtido do hidrolisado da Fibra Virgem Extraída (FV_E) utilizando a coluna REZEX™ RPM-Monosaccharide (Pb^{2+}) 32
Figura 16 – Cromatograma obtido do hidrolisado das lamas compostas tratadas (LC_K) utilizando a coluna REZEX™ ROA-Organic Acid (H^+) 34
Figura 17 – Cromatograma obtido do hidrolisado da Fibra Virgem Extraída (FV_E) utilizando a coluna REZEX™ RPM-Monosaccharide (Pb^{2+}) 34
Figura 18 – Perfis médios da hidrólise enzimática de lamas compostas e fibra virgem com recurso a agitação orbital 36
Figura 19 – Ilustração do resultado final do ensaio realizado com agitação orbital. Os dois Erlenmeyers à esquerda continham fibra virgem (FV) e os dois Erlenmeyers à direita continham lamas compostas (LC). 36
Figura 20 – Perfis da hidrólise enzimática da vibra virgem (FV) e das lamas compostas (LC) usando agitação mecânica 37
Figura 21 – Ilustração do ensaio realizado com agitação mecânica. À esquerda, a fibra virgem (FV) e à direita, as lamas compostas originais (LC). 38
Figura 22 – Perfis da hidrólise enzimática da vibra virgem (FV) e das lamas compostas (LC) usando agitação magnética 39

Figura 23 – Ilustração do ensaio realizado com agitação magnética. À esquerda, fibra virgem (FV) e à direita, as lamas compostas originais (LC) 40
Figura 24 – Perfis da hidrólise enzimática das lamas compostas usando agitação orbital, mecânica e magnética 40
Figura 25 – Perfis da hidrólise enzimática da fibra virgem usando agitação orbital, mecânica e magnética 41
Figura 26 – Perfis de hidrólise enzimática das lamas compostas tratadas: Extração com Diclorometano (DCM); Extração com Acetona (ACE); Destintagem com Fosfato de Sódio (Na_2HPO_4); Destintagem com Fosfato de Potássio (KH_2PO_4). Ensaios realizados com uma carga de hidratos de carbono de 2,5% e com carga enzimática de 15 FPU por grama de hidratos de carbono.....42
Figura 27 – Perfis de hidrólise enzimática das lamas compostas originais (LC) e com tratamento com fosfato de potássio (LC K) para uma carga inicial de hidratos de carbono de 2,5%.....43
Figura 28 – Perfil de hidrólise enzimática da fibra virgem para uma consistência de 6%.....44
Figura 29 – Perfis de concentração de etanol obtidos com fibra virgem (FV) e lamas compostas (LC) a 15 FPU/g de hidrato de carbono, a consistência de 3% e com uma massa de suspensão de 250 g 46
Figura 30 – Perfil de concentração de etanol obtido com lamas tratadas com fosfato de potássio a 15 FPU/g de hidratos de carbono, consistência de 3% e com uma massa de suspensão de 100 g.....46
Figura 31 – Perfis de concentração de etanol obtidos com fibra virgem (FV) e lamas compostas (LC) a 10 FPU/g de hidrato de carbono, a consistência de 3% e com uma massa de suspensão de 250 g 47
Figura 32 – Perfil de concentração de etanol obtido com lamas tratadas com fosfato de potássio a 10 FPU/g de hidratos carbono, consistência de 3% e com uma massa de suspensão de 100 g 48
Figura 33 – Perfis de concentração de etanol obtidos da fibra virgem (FV) e lamas com tratamento com fosfato de potássio (LC K) a 15 FPU/g e consistência de 6%.....49
Figura 34 – Perfis de concentração de etanol obtidos da fibra virgem (FV) e lamas com tratamento com fosfato de potássio (LC K) a 10 FPU/g e consistência de 6%.....50

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Valores de secura para ambas as matérias-primas.....27
Tabela 2 – Teores de Lenhina, Cinzas e Hidratos de Carbono para as lamas compostas (LC) e fibra virgem (FV).....28
Tabela 3 – Teores de Celulose e Hemicelulose nas matérias-primas obtidas pelo método HPLC.30
Tabela 4 – Teores de Lenhina, Cinzas e Hidratos de Carbono na fibra virgem lavada e extraída. 31
Tabela 5 – Teores de Celulose e Hemicelulose na fibra virgem lavada e extraída pelo método HPLC 32
Tabela 6 – Valores de secura para cada ensaio de tratamento alcalino.....33
Tabela 7 – Teores de Lenhina e Hidratos de Carbono nas lamas compostas sujeitas ao processo de destintagem com tratamento alcalino e fosfato monopotássico. 33
Tabela 8 – Teores de Celulose e Hemicelulose nas lamas compostas sujeitas ao processo de destintagem com tratamento alcalino e fosfato monopotássico pelo método HPLC. 34
Tabela 9 – Concentração de açúcares simples e respetivos rendimentos às 24 h de reação para o ensaio de hidrólise enzimática com agitação orbital 37
Tabela 10 – Concentração de açúcares simples e respetivos rendimentos, às 24 h de reação, para o ensaio de hidrólise enzimática com agitação mecânica.....38
Tabela 11 – Concentração de açúcares simples e respetivos rendimentos teóricos, às 24 h de reação, para o ensaio de hidrólise enzimática com agitação magnética 40
Tabela 12 – Concentrações de etanol obtidas, às 24h de reação, para os ensaios de SSF para ambas as cargas enzimáticas e para uma consistência de 3%.....48
Tabela 13 – Concentrações de etanol obtidas, às 24h de reação, para os ensaios de SSF para ambas as cargas enzimáticas e para uma consistência de 6%.....51
Tabela 14 – Concentrações de etanol obtidas, às 24h de reação, para as lamas compostas tratadas (LC K) e não tratadas (LC), para ambas as consistências e cargas enzimáticas (se aplicável) 53

1. Introdução

O sector energético é de elevada importância para o desenvolvimento humano. Estatísticas acerca do consumo energético, apresentadas pela *British Petroleum* (BP), em 2018, relativo a 2017, mostram os Estados Unidos da América e a China como os dois maiores consumidores de energia global a nível mundial, com quotas de 16,5% e 23,2%, respetivamente. A Portugal, por sua vez, é atribuída a quota mundial de 0,2% (BP, 2018). O desenvolvimento tecnológico tem aumentado lentamente, e, com ele, a necessidade energética também. Por isso, novas fontes de energia têm sido exploradas com ênfase em fontes renováveis e pouco poluentes.

A biomassa lenhocelulósica apresenta-se como uma dessas fontes promissoras devido à sua ubiquidade e abundância. O seu interesse advém das longas cadeias de açúcares dos seus compostos, celulose e hemicelulose, que são intermediários em muitas reações tanto químicas como biológicas (Jiang *et al.*, 2016).

A biomassa lenhocelulósica dirigida à produção de biocombustíveis pode ser dividida em três categorias distintas: resíduos agrícolas, culturas energéticas e resíduos florestais. Os resíduos agrícolas são "sub-produtos" obtidos de atividades agrícolas como, por exemplo, o carolo do milho e a palha de arroz. As culturas energéticas são culturas anuais ou perenes cuja biomassa é aplicada em processos de produção de biocombustíveis. Por sua vez, os resíduos florestais são "sub-produtos", obtidos do processamento de árvores, em grande parte ligados a indústrias de processamento de pasta e papel (Loow *et al.*, 2016).

O processo *kraft*, muito utilizado na indústria de pasta e papel, recorre ao uso de hidróxido de sódio (NaOH), sulfureto de sódio (Na_2S), bem como a pH, temperaturas e pressões elevadas com o objetivo de dissolver grande parte da lenhina presente na biomassa florestal (Bajpai, 2018). Após o processamento, as fibras (compostas maioritariamente por celulose e hemicelulose) formam uma pasta que pode ser utilizada no fabrico de papel de impressão e escrita e cartão para embalamento de produtos (Figura 1). No entanto, cerca de metade da biomassa é dissolvida na fase líquida, sendo utilizada na produção de calor e na regeneração de compostos químicos através da sua queima (Przybysz Buzała *et al.*, 2017). Durante o processamento da fibra, geram-se efluentes, nomeadamente provenientes das lavagens, que contêm fibras. No tratamento primário destes efluentes, estas sedimentam,

Figura 1 – Saco feito de papel *kraft*.

sendo removidas e espessadas, e aplicadas em compostagem, depositadas em aterro ou incineradas. O reaproveitamento destas lamas primárias (LP) pode ser um ponto crucial para fomentar o conceito da economia circular, uma vez que podem ser diretamente utilizadas noutros processos. O problema que se coloca, no entanto, deriva da inconsistência dos parâmetros físicos a elas associados, como o teor de matéria inorgânica, e a presença de compostos contaminantes como metais, tintas e resinas. Por essas razões, a implementação da valorização das lamas primárias requer estudos intensivos sobre a sua composição, e eventuais variações, de modo a se poderem aplicar pré-tratamentos económicos, flexíveis e de fácil adaptação, para a obtenção de produtos de valor acrescentado (Pelaez-Samaniego e Englund, 2016).

A utilização de combustíveis fósseis e o seu impacto ambiental tem sido um tópico de debate a nível global. O recurso a biocombustíveis pode diminuir grande parte dos seus efeitos nocivos. O bioetanol (Figura 2), etanol obtido por processos fermentativos, é um desses biocombustíveis e pode ser utilizado em conjunto com a gasolina, na forma anidra, como um aditivo. Por ser um composto oxigenado, a sua adição a combustíveis tradicionais possibilita uma combustão mais completa, baixando as emissões de monóxido de carbono (CO) (Demirbas e Demirbas, 2010).

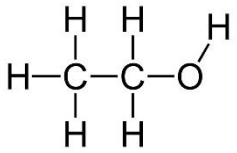


Figura 2 – Molécula de etanol (C_2H_5OH)

A obtenção do bioetanol pode ser feita através da fermentação, quer de produtos alimentares como o milho (bioetanol de primeira geração), quer de biomassa lenhocelulósica (bioetanol de segunda geração), em ambos os casos após um adequado pré-tratamento das matérias-primas (Maitan-Alfenas *et al.*, 2015).

Este trabalho pretende dar um contributo para a valorização das LP provenientes de uma fábrica de produção de papel *kraft*, tendo como primeiro objetivo obter açúcares fermentáveis por hidrólise enzimática. Pretende-se ainda avaliar o potencial do método de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) com o intuito de se obter diretamente etanol, quantificando os açúcares simples que não chegaram a ser fermentados neste processo integrado.

2. Revisão Bibliográfica

De entre os recursos naturais que o planeta Terra contém, a biomassa celulósica é o mais abundante e a possibilidade de se tornar uma fonte de energia renovável em larga escala incentivou o estudo da utilização deste recurso natural.

2.1 Biomassa lenhocelulósica

A biomassa lenhocelulósica é uma estrutura orgânica complexa que aglomera cadeias de celulose e hemicelulose, lenhina e outros componentes como as cinzas e os extratáveis. Esta estrutura evoluiu ao longo do tempo como um elemento de suporte estrutural das árvores de médio e grande porte e, por essa razão, não se encontra prontamente acessível como uma fonte de carbono e energia à maioria dos microrganismos.

A composição e a estrutura da biomassa lenhocelulósica apresentam grandes variações que dependem da origem desta matéria-prima. Material obtido a partir da palha de arroz e outros cereais têm composição e estrutura diferentes do que o material proveniente, por exemplo, de lixos municipais. Para além disso, também o material da mesma espécie mas proveniente de locais diferentes contém alterações na sua estrutura e composição devido a fatores externos, como as condições meteorológicas e a composição do solo.

2.1.1 Celulose

A celulose (Figura 3) é o composto mais abundante da biomassa lenhocelulósica, correspondente a 33 – 55% deste material. É um polímero longo, homogéneo e linear cuja unidade de repetição é a celobiose, um dissacarídeo formado a partir de duas moléculas de glucose ligadas entre si por uma ligação glicosídica β(1→4) (Volynets *et al*, 2017).

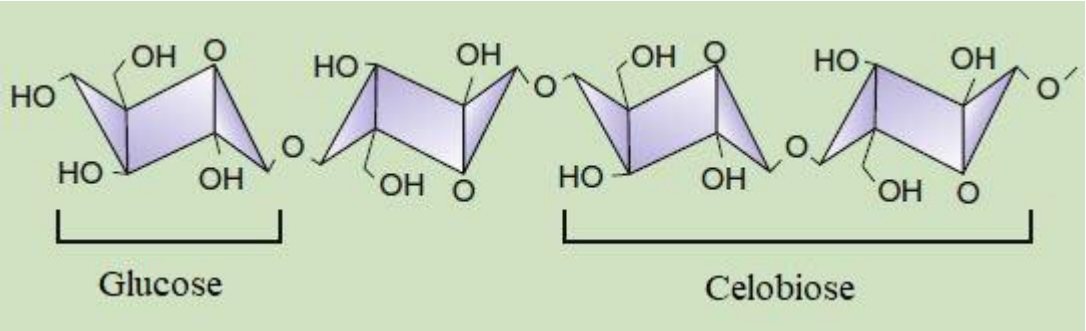


Figura 3 – Ilustração da molécula de celulose, cujo monómero é a celobiose, que por sua vez, é constituída por moléculas de glucose ($C_6H_{12}O_6$) (adaptado de Chen, 2014).

Os constituintes celulósicos (holocelulose, soma da celulose e das hemiceluloses), incluem três tipos de estrutura de acordo com o grau de polimerização da cadeia e consequente solubilização em soluções. Na α-celulose, as cadeias contêm entre várias centenas até milhares de unidades de repetição de glucose. Devido à sua extensão, estas cadeias não só são insolúveis em água como também dificilmente se solubilizam em soluções alcalinas e ácidas diluídas. Os outros dois tipos são a β-celulose e γ-celulose, também denominados na linguagem industrial por hemicelulose industrial. As cadeias de β-celulose apresentam um grau de polimerização inferior a 200 unidades e conseguem ser solubilizadas em soluções ácidas diluídas, enquanto as cadeias de γ-celulose contém menos de 10 unidades de glucose e facilmente são solúveis em água (Chen, 2014).

A linearidade das cadeias celulósicas expõe os grupos hidroxilo da cadeia o que favorece a interligação de cadeias celulósicas por pontes de hidrogénio. A estrutura supramolecular da celulose contém duas zonas distintas: a zona amorfa e a zona cristalina, a qual provém da compactação das fibras de celulose que formam pontes de hidrogénio entre grupos hidroxilo de cadeias celulósicas distintas (Chen, 2014).

2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é outro constituinte da biomassa lenhocelulósica e encontra-se ligada a agregados de cadeias de celulose (fibrilas) por pontes de hidrogénio. A sua estrutura amorfa advém de serem polímeros de baixo grau de polimerização e ramificados.

Os polímeros que constituem as hemiceluloses são cadeias que contêm pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose e galactose) e ácidos urónicos. A xilose é o monómero em maior quantidade na xilana – polímero de xilose, funcionando como o esqueleto desta hemicelulose, à qual se ligam lateralmente ácidos urónicos, grupos acetilo, entre outros. Os restantes

monómeros podem ainda interligar-se entre si formando as glucomananas (ligação entre unidades de glucose e manose) e as galactomananas (ligação entre unidades de galactose e manose) (Chen, 2014). Dependendo do tipo de biomassa lenhocelulósica, a constituição monomérica das hemiceluloses apresenta algumas variações. Tipicamente, as hemiceluloses de *hardwoods*, árvores folhosas, são ricas em xilanas e as hemiceluloses de *softwoods*, árvores resinosas, contém predominantemente galactoglucomananas (Olofsson *et al.*, 2008).

As cadeias das hemiceluloses são significativamente mais curtas que as da celulose contendo um máximo de 200 monómeros em cada cadeia. Este número reduzido de monómeros está associado à complexidade deste polímero, sendo um fator determinante na solubilização destes componentes em meios ácidos (Chen, 2014).

As hemiceluloses são parcialmente responsáveis pelo aumento da resistência à degradação enzimática devido ao entrelaçamento com a lenhina e as fibrilas de celulose. No entanto, é geralmente aceite que a função primária da hemicelulose é a de contribuir para a estrutura da parede celular e a de regular o desenvolvimento das células vegetais.

2.1.3 Lenhina

Sendo o segundo componente mais abundante da madeira, a lenhina destaca-se pela sua complexidade. A lenhina (Figura 5) é um polímero orgânico não linear constituído maioritariamente por três monómeros, derivados do álcool cumarílico, do álcool coniferílico e do álcool sinapílico. Todos os monómeros são constituídos por um grupo fenólico ligado a um álcool propílico, sendo a lenhina um polímero de fenilpropano. No entanto, o álcool coníferílico contém um grupo metoxilo (-OCH_3) enquanto o álcool sinapílico contém dois (Mu *et al.*, 2018) (Figura 4).

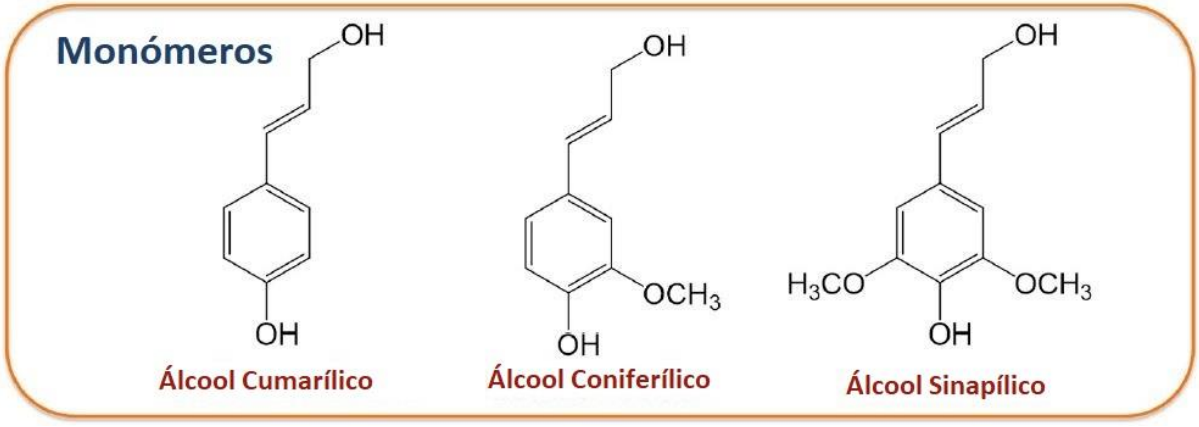


Figura 4 – Monómeros principais da lenhina (adaptado de Mu *et al.*, 2018).

Tal como nas hemiceluloses a proporção destes três monómeros permite distinguir o tipo de biomassa lenhocelulósica. A madeira de *softwoods* apresenta uma maior quantidade de álcool coniferílico, enquanto a madeira de *hardwoods* contém uma mistura de álcool coniferílico e álcool sinalípico e a biomassa das outras plantas contém uma mistura mais equilibrada dos três monómeros (Mu *et al.*, 2018).

A principal função biológica da lenhina é a da proteção dos restantes componentes da biomassa lenhocelulósica, principalmente dificultar a atividade enzimática de certos microrganismos, envolvendo a celulose e as hemicelulases e conferindo rigidez à estrutura lenhocelulósica. Por essa razão, ao nível de processos biotecnológicos que envolvem o uso de enzimas, a biomassa lenhocelulósica tem que ser previamente tratada de modo a reduzir o impacto da lenhina no processo enzimático (Chen, 2014).

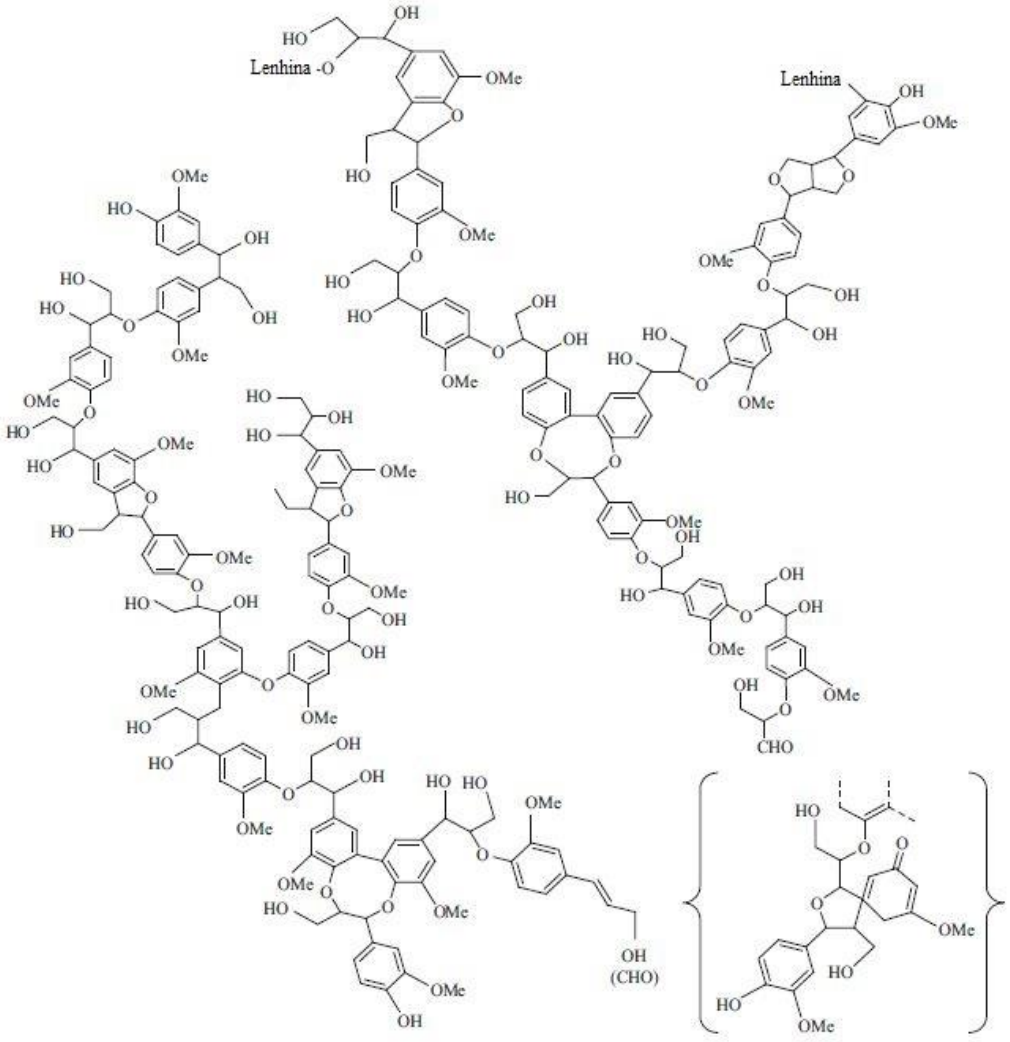


Figura 5 – Representação ilustrativa da microestrutura da lenhina de resinosas com os grupos metoxilo (-OMe) (adaptado de Chen, 2014).

2.2 Preparação da biomassa

Se se pretende produzir açúcares e/ou outros produtos de valor acrescentado a partir da biomassa lenhocelulósica, é necessário começar por prepará-la. Ao contrário do amido nos produtos alimentares, e.g. cereais, os próprios compostos da biomassa lenhocelulósica constituem obstáculos para a sua degradação por via biológica.

De modo a tornar o processo de hidrólise enzimática mais eficaz, é necessário introduzir um processo, denominado de pré-tratamento, cujo propósito é alterar a estrutura da biomassa lenhocelulósica a fim de facilitar a digestão da celulose (Olofsson *et al.*, 2008).

O estudo de vários mecanismos, metodologias e processos de pré-tratamento é muito extenso e, a nível industrial, necessário pois o pré-tratamento chega a contribuir com mais de 40% dos custos totais do processo (Bhutto *et al.*, 2017). Contudo, o estudo de métodos de pré-tratamento é feito considerando que a matéria-prima a utilizar é a original, p.e., quando é utilizada a madeira proveniente diretamente das árvores. No caso do aproveitamento de lamas primárias, a madeira já passou por um ou mais tipos de transformações (química, física ou biológica). Por essa razão, em estudos sobre reciclagem de fibras considera-se que as fibras já se encontram disponíveis a serem utilizadas (Azevedo *et al.*, 2019).

Apesar disso, é de grande interesse fazer uma breve revisão teórica sobre quais os tipos de pré-tratamentos mais relevantes, bem como quais os obstáculos que a própria matéria-prima obriga a contornar.

2.2.1 Tipos de pré-tratamentos

Como já foi referido na secção 2.1, a biomassa lenhocelulósica é constituída maioritariamente por celulose, lenhina e hemicelulose. No entanto, a composição da biomassa varia não só consoante a espécie, como também depende das próprias condições de crescimento e maturação que a árvore teve (Sindhu *et al*, 2016). É por esta razão que o estudo dos pré-tratamentos é tão extenso, pois não existe um pré-tratamento que produza sempre os melhores resultados para todas as espécies de biomassa lenhocelulósica. No entanto, quando acompanhados por estudos de caracterização do material, permitem retirar várias conclusões logísticas, económicas e energéticas. Os pré-tratamentos encontram-se divididos em três grandes grupos: os pré-tratamentos mecânicos, os físico-químicos e os biológicos.

2.2.1.1 Pré-tratamentos mecânicos

Os métodos mecânicos focam-se na quebra da ultraestrutura da biomassa, focando-se no aumento da área de superfície livre e volume dos poros, bem como na diminuição da zona cristalina da celulose e do seu grau de polimerização.

A moagem (Figura 6) é um método mecânico que é utilizado com relativa facilidade como pré-tratamento antes da hidrólise enzimática, e é frequentemente associado com outros tratamentos físico-químicos. O material é moído, reduzindo o seu tamanho, aumentando significativamente a área de superfície livre e diminuindo o grau de polimerização da celulose (Taherzadeh e Karimi, 2008).

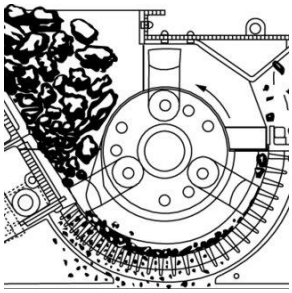


Figura 6 – Ilustração de um moinho de martelos.

Outro método bastante estudado é o da irradiação. A biomassa é exposta a raios gama ou feixes de eletrões que provocam a quebra de ligações internas, principalmente afetando a estrutura cristalina da celulose, facilitando o processo de hidrólise. Salienta-se que, quanto maior for a energia incidida na biomassa menor será o nível de cristalinidade da celulose resultante (Taherzadeh and Karimi, 2008).

Apesar destes métodos serem eficazes, são métodos que requerem elevadas quantidades de energia e não são capazes de remover a lenhina da biomassa lenhocelulósica.

2.2.1.2 Pré-tratamentos físico-químicos

Os pré-tratamentos físico-químicos são os mais utilizados (a seguir à redução de tamanho) devido à sua eficiência e rapidez no tratamento da biomassa lenhocelulósica. Estes focam-se mais na separação da lenhina e da hemicelulose, embora alguns sejam capazes de remover também parte da celulose.

O tratamento por *steam explosion* passa por submeter a biomassa a pressão e a temperatura elevadas (entre 160 e 260ºC) seguindo-se uma descompressão rápida. Este processo solubiliza os monómeros da hemicelulose e altera a estrutura da lenhina, separando estes componentes da celulose. Este processo pode ser ainda catalisado recorrendo a dióxido de enxofre (SO_2) ou ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Volynets *et al*, 2017).

Outro processo muito utilizado é o tratamento com recurso a ácido diluído. A utilização de ácido sulfúrico, ácido fosfórico (H_3PO_4) ou outros ácidos orgânicos, solubiliza a hemicelulose, separando-a dos restantes compostos. No entanto, devido à ação do meio ácido alguns dos açúcares degradam-se quimicamente e formam inibidores como o furfural

(degradação de pentoses) e o hidroximetilfurfural (degradação de hexoses). Apesar disso, a digestão da celulose no subsequente processo de hidrólise enzimática é elevada, podendo ser total (Volynets *et al*, 2017).

O uso de reagentes alcalinos, como o hidróxido de sódio (NaOH), o hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) ou o amoníaco (NH_3) remove a lenhina e partes das hemiceluloses, o que melhora significativamente a acessibilidade das enzimas à celulose. Este processo pode ser feito a temperaturas baixas mas o tempo de reação é superior a outros tratamentos (Volynets *et al*, 2017).

Como a eficiência destes métodos é elevada e o seu tempo de operação é relativamente curto, estes métodos têm sido aplicados industrialmente. No entanto, estes métodos são muito agressivos e também consomem reagentes adicionais, o que aumenta os gastos económicos.

2.2.1.3 Pré-tratamentos biológicos

Os pré-tratamentos biológicos fazem uso da atividade de microrganismos para degradar compostos da biomassa lenhocelulósica.

Alguns fungos (*white rot fungi*, por exemplo – Figura 7) são capazes de produzir peroxidases (E.C. 1.11.1.7), que são enzimas capazes de degradar a lenhina por reações de oxidação-redução. Outros microrganismos são capazes de produzir lacases (E.C. 1.10.3.2), outro tipo de oxidoredutases que contêm cobre como co-factor. Estas enzimas atuam sinergisticamente com as peroxidases quebrando ligações dos grupos fenólicos da lenhina (Sindhu *et al*, 2016).

Figura 7 – White rot fungi no tronco de uma árvore (Joseph OBrien, USDA Forest Service, Bugwood.org).

Estes tratamentos têm um baixo custo energético e o seu uso complementa outros métodos de pré-tratamento pois não gera inibidores, nem recorre ao uso de compostos químicos (Volynets *et al*, 2017). Para além disso, estes tratamentos também não libertam compostos tóxicos para o meio ambiente nem produzem efluentes durante a operação (Bhutto *et al.*, 2017). Apesar destas vantagens, estes tratamentos não são considerados viáveis. Estes tratamentos têm tempos de operação muito longos, de dias a semanas, que afetam diretamente a produtividade do processo global e requerem um local amplo para a sua atuação, o que afeta diretamente a economia do processo (Bhutto *et al.*, 2017). Para além disso, como estes processos estão

relacionados com a atividade metabólica dos microrganismos, parte dos açúcares são consumidos pelos microrganismos para o seu crescimento. Este consumo resulta em rendimentos mais baixos quando comparados com outros tipos de pré-tratamentos.

2.2.2 Complexidade da biomassa lenhocelulósica

A biomassa lenhocelulósica é um composto orgânico complexo que tem evoluído ao longo do tempo a fim de se adaptar às adversidades do meio que árvores e outras plantas têm de suportar. Assim sendo, apresenta várias resistências que dificultam a sua degradação por atividade enzimática dos microrganismos, afetando negativamente a eficiência de processos biológicos.

A estrutura supremolecular da celulose na biomassa começa nas chamadas fibrilas elementares de celulose (~3 nm) que se associam em grupos de quatro, formando uma fibrila de celulose (~12 nm). É à superfície dessas fibrilas que a hemicelulose se liga, em monocamada, através de pontes de hidrogénio. Por sua vez, quatro fibrilas associam-se formando as microfibrilas de celulose (25x25 nm). A lenhina forma ligações covalentes com a hemicelulose, envolvendo as microfibrilas e conferindo rigidez à biomassa – Figura 8. (Chen, 2014).

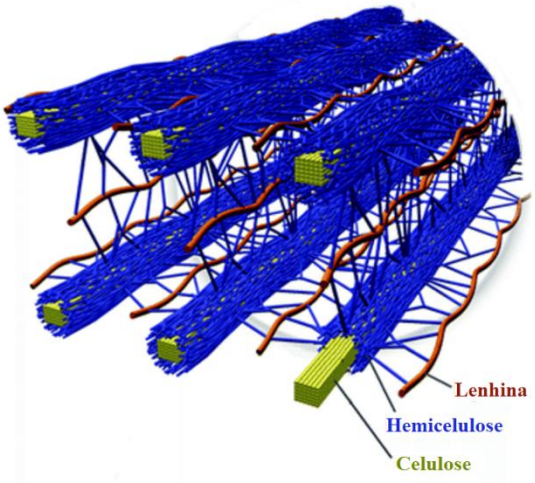


Figura 8 – Microestrutura da biomassa lenhocelulósica (adaptado de Brandt *et al.*, 2013).

Para a hidrólise enzimática ser eficaz, é necessário aumentar a área de contacto entre a celulose e as enzimas presentes no meio reativo. A área de superfície pode ser então classificada em interna e externa. A área de superfície interna está associada ao volume dos poros da microestrutura e ao espaço vazio resultante do enrolamento das fibras elementares de celulose. A área de superfície externa, por sua vez, diz respeito ao formato e tamanho das partículas.

A utilização de água ou outros solventes polares provoca o inchaço das fibras, aumentando significativamente a área interna. Por outro lado, a secagem das fibras pode resultar na contração dos poros, reduzindo a área de superfície e, consequentemente, dificultar a hidrólise enzimática (Taherzadeh e Karimi, 2008).

Correlacionada com a área de superfície, a cristalinidade da celulose pode ser um fator importante para a hidrólise enzimática. Cerca de dois terços da celulose encontra-se numa forma

cristalina, uma zona ordenada e compacta, onde existe muito pouco espaço entre fibrilas e o volume dos poros é muito reduzido. Por sua vez, a restante celulose encontra-se numa forma denominada amorfa, onde a área de superfície interna é muito superior. Devido a esta diferença de áreas, tem sido sugerido que a hidrólise enzimática se inicia pela zona amorfa, seguindo-se posteriormente a hidrólise mais lenta da zona cristalina (Taherzadeh e Karimi, 2008).

Devido às pontes de hidrogénio formadas entre a hemicelulose e a celulose, a área superficial externa da celulose é reduzida significativamente. No entanto, a hemicelulose pode ser hidrolisada pela ação de hemicelulases, que são normalmente incluídas nas misturas enzimáticas comercialmente disponíveis, como a Cellic CTec2™.

A lenhina, contudo, é mais difícil de remover. Ao contrário dos outros dois componentes, a lenhina é hidrofóbica e, como os envolve, impede o inchaço das fibras e fortalece a macroestrutura da celulose. É por esta razão que se admite que a lenhina é a principal causa para a recalcitrância da biomassa lenhocelulósica. A remoção da lenhina é o fator principal para o aumento da eficiência da hidrólise enzimática pois a sua remoção expõe grande parte dos poros da celulose, bem como zonas sem hemicelulose. No entanto, em alguns casos a lenhina dissolvida é referida como um inibidor de algumas enzimas hidrolíticas, como as celulases, as xilanases e as glucosidases (Taherzadeh e Karimi, 2008).

2.3 Hidrólise Enzimática

A hidrólise é um tipo de reação química em que um composto é dividido pela adição de moléculas de água. As ligações glicosídicas presentes na maioria dos polissacarídeos são ligações que podem ser sujeitas a hidrólise.

O processo de hidrólise enzimática, com enfoque na produção de açúcares, é também denominado de sacarificação na literatura. Para o material lenhocelulósico, os açúcares produzidos mais conhecidos são a glucose e a xilose, que são produtos intermediários na obtenção de álcoois, como o etanol, e adoçantes, como o xilitol e sorbitol.

O mecanismo de hidrólise enzimática da celulose pode ser dividido em três passos sequenciais. O primeiro consiste na adsorção das celulases, que se encontram no meio líquido, à celulose. O segundo consiste na biodegradação da celulose por parte das enzimas, originando açúcares simples como, por exemplo, a celobiose. O último passo consiste na desadsorção das celulases e o seu retorno para o meio líquido (Taherzadeh e Karimi, 2008). É devido a este mecanismo que a introdução de um processo de pré-tratamento é de elevada importância para a acessibilidade das enzimas ao material lenhocelulósico.

A sacarificação por via biológica recorre ao uso de enzimas, catalisadores biológicos, que aceleram reações bioquímicas. Para melhorar o efeito destes catalisadores, o processo deve ter em conta as condições ótimas das enzimas a fim de otimizar o processo de global produção.

2.3.1 Enzimas

As enzimas são proteínas que catalisam reações químicas que ocorrem na célula. Estas estão presentes em organismos vivos, e destacam-se pela sua especificidade, sendo divididas em 6 categorias de acordo com o seu potencial catalítico. Essas categorias são, as oxidorredutases (classe 1), que catalisam reações de oxidação-redução, as transferases (classe 2), que transferem grupos químicos entre compostos, as hidrolases (classe 3), que catalisam reações de hidrólise, as liases (classe 4), que quebram ou formam ligações químicas por processos diferentes das hidrolíticas, as isomerases (classe 5), que catalisam a transformação de um composto no seu isómero e as ligases (classe 6), que promovem ligações entre compostos, normalmente por condensação.

As celulases são um tipo de hidrolases que hidrolisam as ligações β(1→4), presentes nas cadeias de celulose, e identificam-se em três tipos diferentes, as exo-1,4-β-D-glucanases (EC 3.2.1.91), que hidrolisam a partir dos grupos localizados nas extremidades das cadeias, as endo-1,4-β-D-glucanases (EC 3.2.1.4), que hidrolisam o interior das cadeias aleatoriamente e as β-glucosidases (EC 3.1.1.21) que são responsáveis por separar os monómeros de celobiose, obtendo-se a glucose como produto (Volynets *et al*, 2017).

Neste trabalho foi utilizado um extrato enzimático, Cellic CTec 2™, fornecido pela empresa Novozymes™, que consiste numa mistura de celulases e hemicelulases. A presença de hemicelulases na mistura promove a hidrólise das hemiceluloses o que, por sua vez, não só expõe mais a celulose à ação das celulases como também liberta pentoses e hexoses, que são açúcares redutores e fermentáveis. Segundo a folha de especificações da mistura Cellic CTec 2™, o pH ótimo encontra-se compreendido entre 5,0 e 5,5 enquanto a temperatura ótima de operação situa-se entre os 45 e 50ºC.

2.4 Fermentação

A capacidade de utilizar e transformar energia é uma das características fundamentais dos sistemas vivos. Essa capacidade advém da atividade metabólica, o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células, que consome e liberta energia através da atividade biossintética, anabolismo, e da degradação de moléculas, catabolismo.

Parte da energia libertada é aprisionada sob a forma de energia química para posteriormente ser utilizada nas diversas atividades celulares. A maioria da energia libertada provém de reações de redução-oxidação, sendo o composto redutor aquele que fornece energia ao composto oxidado. Quanto mais reduzido estiver o composto (maior carga negativa), não só contém mais energia como maior é a sua tendência a fornecer eletrões (Mendes Faia e Torres Castro, 1998).

Os organismos podem ser classificados como quimioheterotróficos ou quimioautotróficos se o seu processo metabólico parte de reações de redução-oxidação e usam como fontes de eletrões compostos orgânicos ou inorgânicos, respetivamente. Por outro lado, se captam energia eletromagnética da luz e usam como fontes de eletrões compostos orgânicos ou inorgânicos, classificam-se como fotoheterotróficos ou fotoautotróficos.

A fermentação é um processo metabólico intrínseco a todos os seres vivos e consiste em reações de redução-oxidação onde tanto o dador como o recetor de eletrões são ambos compostos orgânicos.

No caso da fermentação alcoólica, parte da energia produzida é armazenada em ligações de elevado potencial químico nas moléculas de adenosina-trifosfato (ATP), produzindo-se 2 ATP's por mole de glucose fermentada.

Da fermentação alcoólica da glucose ($C_6H_{12}O_6$) resulta em duas moles de dióxido de carbono (CO_2) e duas moles de etanol (C_2H_5OH), representada na equação (1).

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 \quad (1)$$

Nas reações de glicólise, o dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD^+) é reduzido a NADH + H^+. Uma vez que as células contêm um número limitado deste composto, a oxidação de glucose seria completamente interrompida caso todos os NAD^+ fossem reduzidos. Para evitar tal ocorrência, o NADH reduz o acetaldeído, originando etanol e regenerando o NAD^+.

Para as leveduras capazes de iniciar os processos de fermentação alcoólica, o seu metabolismo produz duas moles de ATP que é essencial para o seu crescimento, no entanto, são produzido etanol e dióxido de carbono, que são produtos de valor acrescentado para

processos industriais (como a produção de vinho e produção de pão) (Mendes Faia e Torres Castro, 1998).

2.4.1 Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF)

A fermentação de hidratos de carbono é normalmente utilizada em processos de produção e comercialização de etanol uma vez que é um processo económico ou amigo do meio ambiente (Wang *et al.*, 2012).

Tal como o próprio nome indica, o processo de SSF é um processo biotecnológico onde os processos de hidrólise enzimática e fermentação ocorrem em simultâneo e a ideia foi patenteada por William Frederick Gauss, Shuzo Suzuki e Motoyoshi Takagi a 20 de Setembro de 1974 (US3990944).

A implementação do processo de SSF requer especial atenção a certos fatores sendo a temperatura de operação o ponto mais importante para o processo de SSF. Em geral, a temperatura ótima das celulases no processo de hidrólise enzimática da celulose ronda os 50-55ºC. Por seu turno, a temperatura ótima das estirpes de levedura ou bactérias situa-se perto dos 35ºC para a fermentação. A esta temperatura a quantidade de açúcares produzida pelas enzimas, não só é muito inferior, como acaba por se tornar a reação mais lenta. Por essa razão, usa-se no SSF uma temperatura intermédia onde a reação de hidrólise seja o mais rápido possível sem pôr em causa a integridade dos microrganismos.

A carga inicial de substrato é também de elevada importância em processos de SSF. A utilização de elevadas cargas iniciais de substrato não só dificulta a transferência de calor e massa da mistura como também aumenta a concentração de inibidores formados pelos tratamentos aplicados. No entanto, uma maior quantidade de substrato também leva a uma maior quantidade de etanol no final do processo. Para contornar estes problemas, pode-se optar por uma estratégia *fed-batch* onde o substrato vai sendo carregado em determinados intervalos de tempo. Esta estratégia reduz o impacto de inibidores e o efeito da lenhina é reduzido significativamente.

Na produção de etanol, apesar desta estratégia alcançar elevadas produções, o tempo de reação também é muito elevado, obtendo-se velocidades de produção inferiores a 1 g L^{-1} h^{-1}. Por esta razão, a implementação desta estratégia carece de um estudo de otimização prévio a fim de tornar a produção de etanol economicamente viável (Wang *et al.*, 2012).

3. Materiais e métodos

3.1 Materiais

A metodologia utilizada neste trabalho encontra-se dividida em quatro fases distintas sendo elas a caracterização da matérias-primas, a hidrólise enzimática, a sacarificação e fermentação simultâneas, e a quantificação dos produtos.

Nesta secção, antes de se relatar o procedimento utilizado durante este trabalho, é descrita a matéria-prima, a celulase e a levedura utilizada.

3.1.1 Material Lenho-celulósico

A biomassa lenho-celulósica utilizada no decorrer deste trabalho foi cedida pela Europac™ de Viana do Castelo, uma empresa dedicada ao fabrico de embalagens de papel e cartão. Esta empresa utiliza como matéria-prima fibra virgem celulósica à qual é adicionada papel e cartão reciclado.

A biomassa lenhocelulósica utilizada neste trabalho tinha por base cerca de 75% fibras de pinheiro (*Pinus pinaster*) e cerca de 25% fibras de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). A primeira matéria-prima, denominada neste trabalho como ‘fibra virgem’ (FV), era constituída apenas por esta mistura de fibras e foi utilizada como referência durante todo o processo reacional em estudo. A segunda matéria-prima e principal alvo de estudo, constituem lamas primárias de um processo de cozimento (fibras perdidas p.e. ao longo de processos de lavagem e recolhidas após o sedimentador primário de efluentes. Para além da base de fibras celulósicas, continham também diversas fibras recicladas e vários produtos a elas associados, provenientes de outros processos não seletivos de recolha e reciclagem, e distintos das fibras lenhocelulósicas (encontrou-se esferovite, plásticos, fibras têxteis e ainda vidros). Este material foi denominado neste trabalho por ‘lamas compostas’ (LC).

Uma vez que a base da biomassa lenhocelulósica era composta maioritariamente por fibras de pinheiro, ambas as matérias-primas foram tratadas como *softwoods* durante todo o estudo aqui relatado.

3.1.2 Celulase Cellic CTec 2™

Classificam-se como hidrolases todas as enzimas que catalisam a cissão de ligações químicas com recurso a moléculas de água. As celulases são então um tipo de hidrolases que quebram as ligações glicosídicas β(1→4) presentes na celulose.

São conhecidos três tipos de celulases, as exo-1,4-β-D-glucanases (EC 3.2.1.91) que quebram as ligações partindo do final das cadeias, as endo-1,4-β-D-glucanases (EC 3.2.1.4) que quebram aleatoriamente ligações no interior da cadeia celulósica, e as β-glucosidases (EC 3.1.1.21) que são responsáveis por hidrolisar celobiose e oligomeros mais curtos produzindo glucose (Volynets *et al*, 2017).

Segundo a ficha técnica, disponibilizada pela Novozymes™, a celulase Cellic CTec 2™ caracteriza-se por uma mistura de celulases e hemicelulases. A vantagem da sua utilização está na elevada atividade enzimática, bem como poder ser utilizada em diversas matérias-primas de origem celulósica. Em estudos feitos pela empresa, o pH ótimo de operação situa-se entre os 4,5 e 5,5, enquanto a temperatura ótima de operação encontra-se perto dos 50 ºC.

3.1.3 Levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602™

Para a biossíntese de etanol, os açúcares obtidos a partir da hidrólise enzimática têm de ser fermentados. Essa fermentação é normalmente feita através da atividade metabólica de culturas etanologénicas de leveduras ou bactérias.

As leveduras são microrganismos unicelulares eucariontes e pertencem ao reino *Fungi.* Apesar das leveduras serem capazes de obter energia por respiração, consumindo o oxigénio presente no meio, a sua atividade metabólica mais interessante é a fermentação alcoólica, incentivada pela ausência, ou limitação, de oxigénio e produzindo etanol.

Figura 9 – Levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Murtey e Ramasamy, 2016).

Neste trabalho foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 9) encomendada a partir da *American Type Culture Collection*. É uma cultura anaeróbica facultativa e a temperatura ideal de operação situa-se nos 30ºC.

3.2 Caracterização das matérias-primas

A caracterização das matérias-primas foi feita a partir de protocolos propostos pela *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) especificamente para a quantificação de hidratos de carbono e de lenhina presente nas matérias-primas.

Iniciou-se por medir a secura da biomassa. Para tal, pesaram-se quantidades de ambas as matérias-primas em recipientes de alumínio que, de seguida, foram colocadas numa estufa a 105ºC durante, 12 h. Após decorrido esse tempo, as amostras foram colocadas num exsicador, a fim de arrefecerem sem absorverem vapor de água, e posteriormente pesadas. A secura foi calculada seguindo a equação (1).

$$Secura = \frac{m_{seca}}{m_{humida}} \qquad (1)$$

Após obtida a secura do material, colocaram-se pequenas amostras em vários cadinhos para a determinação do teor de cinzas. Depois de pesadas as quantidades de material, os cadinhos foram colocados numa mufla e submetidos a uma temperatura de 575ºC durante 12h. Em seguida, as amostras foram colocadas num exsicador para arrefecerem. O teor de cinzas foi calculado utilizando a equação (2).

$$Cinzas\ (\%) = \frac{m_{575^{o}C}}{m_{seca}} \times 100 \qquad (2)$$

Para a determinação do teor de lenhina, o material seco foi moído e peneirado até se obter amostras de matéria-prima cujo tamanho de partículas estivesse compreendido entre 0,18 e 0,81 micrómetros. Essas amostras foram depois sujeitas a uma hidrólise ácida com ácido sulfúrico a 72% (m/m) e a uma temperatura de 30ºC durante 1 hora e, posteriormente, a outra hidrólise ácida com ácido sulfúrico a 4% (m/m) e a uma temperatura de 121ºC durante mais 1 hora.

Concluído o processo, as amostras foram filtradas, com recurso a um sistema de filtração associado a uma bomba de vácuo, separando a fase sólida do hidrolisado. A fase sólida foi pesada e colocada numa estufa a 105ºC até ao dia seguinte a fim de determinar o teor de lenhina insolúvel. Entretanto foram colocadas amostras dos hidrolisados em tubos de ensaio e foi feita a leitura da absorvância, levando essas amostras a um espectrofotómetro UV-vis, a 205

nm de comprimento de onda e em cuvetes de quartzo de modo a calcular o teor de lenhina solúvel.

$$Lenhina\ insolúvel\ (\%) = \frac{m_{sólido}}{m_{seca}} \times 100 \qquad (3)$$

$$Lenhina\ solúvel\ (\%) = \frac{\frac{Abs}{110} \times Fator\ de\ Diluição}{m_{seca}} \times 100 \qquad (4)$$

$$Lenhina\ total\ (\%) = Lenhina\ insolúvel\ (\%) + Lenhina\ solúvel\ (\%) \qquad (5)$$

O teor de hidratos de carbono foi calculado de duas formas. A primeira, a mais rápida, foi feita pela subtração para 100 do teor de lenhina total e do teor de cinzas – Eq. (6).

$$Hidratos\ de\ Carbono\ (\%) = 100 - Lenhina\ (\%) - Cinzas(\%) \qquad (6)$$

A segunda forma recorreu a uma estimativa com recurso ao processo de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Uma vez que a hidrólise química recorreu a um ácido forte, o pH dos hidrolisados obtidos foi muito baixo (pH inferior a 1), pelo que se recorreu a uma neutralização dos hidrolisados utilizando carbonato de cálcio, $CaCO_3$, a fim de elevar o pH da solução para entre 5 e 6.

Depois de obtido um pH dentro desse intervalo para cada hidrolisado, deixou-se repousar durante várias horas para deixar o precipitado sedimentar, retirando-se o sobrenadante para um tubo Eppendorf, que prosseguiu para a análise por cromatografia.

As análises cromatográficas recorreram ao uso de duas colunas distintas. A primeira, a coluna Rezex™ RPM-Monosaccharide, cuja resina contém iões Pb^{2+} e a segunda, a coluna Rezex™ ROA-Organic Acid, cuja resina contém iões H^+. Foi necessária a utilização de ambas as colunas devido aos tempos de retenção coincidentes de alguns açúcares simples, e, também, devido à segunda coluna permitir identificar facilmente o etanol presente, para o caso da sacarificação e fermentação simultâneas.

Obtidas as concentrações dos açúcares simples, admitiu-se que toda a glucose provinha apenas de celulose, enquanto os restantes açúcares (arabinose, xilose, manose e galactose) pertencem à hemicelulose.

3.2.1 Índice Kappa

O teor de lenhina obtido na caracterização das matérias-primas revelou-se elevado e, por essa razão, sentiu-se a necessidade de se confirmar esse valor. Para tal, decidiu-se fazer um teste sobre o índice kappa da fibra virgem. Uma vez que é um teste iterativo, é necessário repetir várias vezes até se obter um valor significativo.

Num copo de 400 mL, introduziu-se 150 mL de água destilada e uma quantidade de fibra virgem, e colocou-se o copo num banho termostático a 25ºC. Noutro copo foram pipetados 20 mL de uma solução de permanganato de potássio a 0,01 M e 20 mL de ácido sulfúrico a 2 M que foi depois vertido para o primeiro copo agitando-se este, com a ajuda de um agitador mecânico, durante 10 min de forma a promover a oxidação da lenhina presente na matéria-prima.

No final desse tempo adicionaram-se 10 mL de iodeto de potássio a 1 M no intuito de parar a reação de oxidação e procedeu-se à titulação com tiossulfato de sódio a 0,05 M usando-se indicador de amido. Repetiram-se ensaios até que o volume de tiossulfato de sódio utilizado na titulação fosse próximo de 10 mL sendo alterada a quantidade inicial de matéria-prima em cada iteração. O valor do índice kappa é calculado segundo a fórmula (7).

$$IK = \frac{C \times d}{m_{seca}} \qquad (7)$$

$$C = 0{,}5 \times (V_b - V_t) \times \frac{[Na_2S_2O_3]}{5 \times [KMnO_4]} \qquad (8)$$

Sendo C calculado segundo a fórmula apresentada em (8), onde V_b é o volume titulado no ensaio de branco e V_t é o volume titulado do ensaio com matéria-prima. Uma vez que a molaridade de tiossulfato de sódio é 5 vezes superior à de permanganato de potássio, a razão $[Na_2S_2O_3]/(5x[KMnO_4])$ é igual a 1. Já d é um fator de correção que depende do valor de C sendo igual a 1 quando C é igual a 5. A metodologia para o cálculo do índice kappa encontra-se no anexo A.

3.2.2 Fibra virgem lavada e extraída

Devido ao elevado teor de lenhina obtido na caracterização decidiu-se proceder à lavagem da fibra virgem e, também, submetê-la a um processo de extração utilizando água e etanol como solventes.

Para a lavagem, colocaram-se aproximadamente 300 g de fibra virgem num copo, juntou-se 1 L de água morna mexendo-se vigorosamente durante alguns minutos e, depois, filtrou-se o material. Repetiu-se este processo mais duas vezes, utilizando-se 3 L de água no total. De seguida procedeu-se à caracterização da matéria-prima segundo a metodologia descrita na secção 3.2.

Para o processo de extração pesou-se cerca de 10 g de fibra virgem lavada, para cada amostra, que foram colocadas num *soxhlet* ligado a um balão de ebulição e a um condensador. Foram medidos e colocados cerca de 190 mL de solvente em cada balão e utilizou-se água fria no condensador. O procedimento durou entre 4 a 6 horas. Em seguida, colocaram-se os balões de ebulição com o solvente na estufa a 105ºC durante a noite e, no dia seguinte, pesaram-se os extratos obtidos para cada amostra. Procedeu-se à caracterização destes extratos segundo a metodologia descrita na secção 3.2, exceto a determinação da secura devido à escassez da fibra virgem lavada e extraída.

3.2.3 Tratamentos às lamas compostas

O tratamento às lamas compostas exigiu um maior esforço devido ao elevado número de compostos presentes nas lamas. Por isso, utilizou-se o processo de extração com recurso a diclorometano (solvente polar com baixo ponto de ebulição) e acetona (solvente comum apolar) e decidiu-se, ainda, aplicar um tratamento alcalino de hidróxido de sódio mais aditivos (fosfato dissódico e fosfato monopotássico) no intuito de remover tintas e iões metálicos da matéria-prima.

O método de extração utilizado foi similar ao apresentado na secção 3.2.2, apenas alterando os solventes utilizados de água e etanol para diclorometano e acetona.

O tratamento alcalino fez-se a uma consistência de 3%, ou seja, em cada 100 g de mistura 3 g eram lamas secas. Pesando-se 10 g de massa seca necessitou-se de 333 mL de água (sendo admitida a massa específica da água igual a 1 kg L) para satisfazer a consistência necessária.

$$Consistência\ (\%) = \frac{m_{seca}}{m_{suspensão}} \times 100 \qquad (9)$$

O hidróxido de sódio é uma base forte e barata, daí a sua opção para este tratamento. A quantidade medida desta base foi de cerca de 3% em relação à quantidade de massa seca, ou seja, foi utilizada uma carga de 0,3 g de hidróxido de sódio nos tratamentos alcalinos.

Segundo a patente 'US20060102299A1' a quantidade de fosfatos a adicionar ao tratamento alcalino deve ser compreendida entre 0,2 e 1% da massa seca a utilizar nos tratamentos. Estes aditivos são responsáveis por dispersar tintas e separar iões metálicos da biomassa lenhocelulósica. Por essa razão, utilizou-se uma massa de 0,05 g de fosfato dissódico e de fosfato monopotássico, que corresponde a 0,5% da lama seca utilizada.

Para este tratamento alcalino as lamas foram colocadas num copo juntamente com a água e utilizou-se um agitador mecânico. Depois, foi vertido o hidróxido de sódio dissolvido em água, seguido pelo aditivo e deixou-se a agitar durante 90 minutos. Terminado o tempo, filtrou-se a mistura e procedeu-se à lavagem do filtrado até a água de lavagem sair límpida.

Os materiais obtidos nesta secção partiram diretamente para um ensaio de hidrólise enzimática, sem caracterização prévia, com o intuito de se comparar e escolher o melhor tratamento para as lamas primárias fornecidas.

3.2.4 Atividade Enzimática

Os processos biotecnológicos são processos que se baseiam na utilização de enzimas e microrganismos para originar produtos valiosos. A atividade enzimática é um parâmetro de elevada importância para quantificar o potencial catalítico de uma enzima. Por isso, foi utilizado o método de filter paper unit (FPU) segundo um protocolo proposto pelo NREL.

Para o cálculo desse parâmetro foram recortadas tiras de papel de filtro com 1 cm de largura e 6 cm de comprimento e submergidas em 1 mL de solução tampão a 0,05 M (anexo B) em tubos de ensaio. Depois criaram-se várias diluições da enzima Cellic CTec 2™ com solução tampão e pipetaram-se 0,5 mL dessas soluções para os tubos de ensaio perfazendo um volume total de 1,5 mL. Os tubos foram depois tapados com algodão e papel de alumínio.

De seguida, os tubos foram colocados numa estufa a 50ºC, para determinar a atividade enzimática à temperatura ótima da hidrólise enzimática, durante 1 hora com agitação orbital de 150 rpm. No final desse tempo, os tubos foram retirados da estufa e foram recolhidas amostras de cada unidade. A essas amostras foram adicionados 3 mL de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (anexo B e C) e os tubos foram mergulhados em água a ferver durante 5 min

de modo a promover a reação química do DNS com os açúcares redutores (glucose) provenientes da hidrólise enzimática das fibras de celulose constituintes do papel de filtro. Ao fim de 5 min exatos os tubos foram colocados num banho gelado para parar a reação de oxidação-redução.

De seguida as amostras foram colocadas em cuvetes de plástico e levadas ao espetrofotómetro UV-vis lendo-se a absorvância a um comprimento de onda de 540 nm, usando como branco solução tampão sem enzima, submetido ao mesmo tratamento. Posteriormente foi calculada a concentração em equivalentes de glucose pelo uso da curva de calibração. O cálculo da atividade enzimática é obtido através da equação (10).

$$Atividade_T = \frac{0{,}37}{Enzima_{2g}} FPU/mL \qquad (10)$$

Os valores obtidos para as atividades enzimáticas foram de 160,9 FPU/mL para a temperatura de 50ºC e de 60,7 FPU/mL para a temperatura de 38ºC. No anexo D encontram-se os dados auxiliares e o cálculo das atividades enzimáticas para ambas as temperaturas.

3.3 Hidrólise Enzimática

Tal como a caracterização das matérias-primas, os ensaios de hidrólise enzimática tiveram por base o protocolo da *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) sobre sacarificação enzimática com baixo teor de sólidos.

Para dar início aos ensaios de hidrólise, é necessário definir-se a carga inicial de substrato. Assim sendo, optou-se por definir a carga inicial de hidratos de carbono ($Load_{HC}$) em 2,5%, ou seja, em 100 g de suspensão, 2,5 g são hidratos de carbono, tornando a equação (11), válida para o cálculo da massa húmida de cada matéria-prima e cada amostra.

$$m_{húmida} = \frac{Load_{HC}}{Hidratos\ de\ Carbono \times Secura} \qquad (11)$$

O cálculo do volume de enzima a utilizar em cada amostra relaciona-se com a quantidade de hidratos de carbono carregados em cada amostra. Admitindo uma carga enzimática de 15 FPU ($Carga_{Enzima}$) por cada grama de hidratos de carbono na carga inicial de substrato, o volume de enzima é possível ser calculado através da equação (12).

$$V_{Enzima} = \frac{Load_{HC} \times Carga_{Enzima}}{Atividade_T} \qquad (12)$$

É necessário alertar para o facto de que a carga inicial de hidratos de carbono depende da massa total de suspensão, variando linearmente com a massa de suspensão da amostra. Por outro lado, a atividade enzimática, parâmetro calculado na secção 3.2.4, também depende da temperatura ($Atividade_T$) o que influencia o volume de enzima a carregar em cada amostra.

De seguida, as matérias-primas foram pesadas e colocadas em balões Erlenmeyer identificados, e foi-lhes adicionada a solução tampão citrato a 0,05 M. Depois, tanto os balões como as soluções de enzima foram pré-aquecidos numa estufa a 50ºC, a temperatura ótima de operação. Após esse tempo, a solução enzimática foi adicionada a cada Erlenmeyer e estes foram devidamente vedados com papel alumínio.

Este processo teve uma duração de dois dias, sendo retiradas amostras de 30 em 30 min durante as primeiras 3 h de operação, e depois às 4,5, 6, 24, 30 e 48 h de operação.

Para cada amostragem foram retirados 2 mL do meio reacional e colocado numa centrifugadora a 3500 rpm durante 5 min a fim de separar rapidamente a fase sólida da fase líquida. Partindo da fase líquida, diluíram-se as amostras e pipetou-se 0,5 mL de cada amostra diluída para tubos de ensaio separados onde se adicionou 1 mL de água destilada e 3 mL de reagente DNS e, de seguida, foram tapados e colocados em banho de água a ferver durante 5 min. No final desses 5 min os tubos foram colocados num banho de gelo para arrefecerem.

Depois de arrefecidos, procedeu-se à leitura das concentrações de açúcares redutores recorrendo ao espectrofotómetro seguindo a metodologia descrita na secção 3.2.4, pipetando-se 0,2 mL de cada amostra para cuvetes de plástico onde foram adicionados 2 mL de água destilada. A leitura da absorvância foi feita a um comprimento de onda de 540 nm respeitando a curva de calibração e obtendo-se as concentrações em equivalentes de glucose para cada amostra. Uma vez obtida a concentração de açúcares em cada amostra, calculou-se o rendimento teórico da operação de hidrólise pela equação (13).

$$Rendimento_{hidrólise}(\%) = \frac{[Glucose]}{1{,}111 \times \left(\frac{m_{seca}}{V_{suspensão}}\right) \times HC_{\%}} \times 100 \qquad (13)$$

O parâmetro 1,111 corresponde ao fator de conversão de celulose em glucose. Como a concentração de açúcares é medida em equivalente de glucose (e nem todos os açúcares simples obtidos são hexoses), o rendimento calculado é um valor superior ao real e pode ser ligeiramente superior a 100%. No anexo E encontra-se um exemplo de cálculo do rendimento teórico de hidrólise.

3.4 Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF)

O processo de sacarificação e fermentação simultâneas engloba o processo de hidrólise enzimática e o processo de fermentação alcoólica (produção de etanol) no mesmo equipamento. A levedura utilizada neste processo foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602™ cuja temperatura ótima de operação é cerca de 30ºC. Como a enzima Cellic CTec 2™ apresenta atividade máxima a 50ºC, escolheu-se para este processo uma temperatura de compromisso de 38ºC.

A matéria-prima (fibra virgem e lamas compostas tratadas) foi pesada e colocada em balões Erlenmeyer com solução tampão citrato a 0,05 M, devidamente vedados com algodão e papel de alumínio, para dificultar a entrada de ar. Paralelamente foi preparado um inóculo de levedura em fase exponencial de crescimento. A levedura foi colocada num meio de cultura apropriada e colocada numa incubadora à temperatura de 38ºC durante a noite.

Antes de se iniciar o processo de SSF, os balões Erlenmeyer e as soluções de nutrientes foram esterilizados numa autoclave a uma temperatura de 121ºC durante 15 minutos. Depois de arrefecerem juntou-se a levedura, e as soluções de enzima e nutrientes nos frascos aos balões com a matéria-prima em condições de assepsia na proximidade de um bico de Bunsen. Os balões foram depois colocados numa incubadora orbital a 38ºC e iniciado o processo de SSF.

A amostragem foi feita às 6, 24, 30, 48, 54 e 72 horas de operação. Tal como no processo de hidrólise enzimática, retiraram-se cerca de 2 mL de cada meio reacional e foram levadas a uma centrifugadora durante 5 min a 3500 rpm. Depois de decantada a fase líquida, utilizou-se o método de DNS para quantificar a concentração de glucose no meio reacional.

A quantificação de etanol recorreu ao método de HPLC utilizando a coluna Rezex™ ROA-Organic Acid. Através da largura do pico foram obtidas as concentrações correspondentes dos açúcares presentes e do etanol no meio reacional, recorrendo a calibração prévia, permitindo calcular a conversão sequencial dos hidratos de carbono em etanol.

$$Rendimento_{etanol}(\%) = \frac{[Etanol]}{0{,}51 \times 1{,}111 \times \left(\frac{m_{seca}}{V_{suspensão}}\right) \times HC_{\%}} \times 100 \qquad (14)$$

A equação (14) representa o cálculo do rendimento teórico da produção simultânea de etanol pela levedura e enzima. O parâmetro 0,51 na equação é obtido através da estequiometria da reação (1 molécula de glucose produz 2 moléculas de etanol) e da razão entre as massas molares de ambos os compostos (180,16 g/mol para a glucose e 46,07 g/mol para o etanol). O volume de suspensão, por sua vez, é obtido quando se divide a massa da suspensão pela massa

específica da mistura, que se admitiu ser próxima de 1 kg L^{-1}. No anexo E encontra-se um exemplo de cálculo do rendimento teórico de etanol.

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização dos Materiais

4.1.1 Lamas Compostas e Fibra Virgem

O primeiro passo da caracterização das matérias-primas foi a determinação da secura. No anexo F encontram-se os dados auxiliares da caracterização destes materiais.

Seguindo o protocolo, depois de pesadas as amostras secas obtiveram-se os valores de secura média apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de secura para ambas as matérias-primas.

Material	**Secura$_{média}$ (g/g)**
Lamas Compostas	0,3417
Fibra Virgem	0,3049

Segundo o teor de secura, as lamas compostas são mais secas/contêm menos água que a fibra virgem. Este valor já era esperado, uma vez que esta matéria-prima continha outros compostos para além das fibras, particularmente hidrofóbicos, como plásticos e fibras têxteis, com menos capacidade de reter água.

O segundo passo foi a quantificação de lenhina e cinzas para a determinação indireta de hidratos de carbono presentes nas matérias-primas. Para tal, foram pesadas amostras das matérias-primas e, enquanto umas foram incineradas para a determinação do teor de cinzas, outras amostras foram submetidas ao processo de hidrólise ácida para a quantificação de lenhina.

Admitiu-se que tanto a celulose como a hemicelulose foram solubilizadas no meio ácido. Com o auxílio de uma bomba de vácuo, filtraram-se as amostras e quantificou-se o precipitado, depois de ter sido seco a 105ºC durante a noite, admitindo-se que esta fração era unicamente lenhina insolúvel.

Das amostras sujeitas a incineração, o resíduo pesado no final representa a quantidade de compostos inorgânicos na matéria-prima. Estes compostos foram considerados inertes para os processos de hidrólise enzimática e SSF.

Na Tabela 2 estão representados os teores de lenhina, solúvel e insolúvel, bem como o teor de cinzas da matéria-prima e o teor de hidratos de carbono, obtidos por diferença recorrendo à equação (6).

Tabela 2 – Teores de Lenhina, Cinzas e Hidratos de Carbono para as lamas compostas (LC) e fibra virgem (FV).

Material	**$Lenhina_{insolúvel}$ (%)**	**$Lenhina_{solúvel}$ (%)**	**$Lenhina_{total}$ (%)**	**Cinzas (%)**	**HC (%)**
LC	18,88	0,89	19,77	7,44	72,59
FV	13,59	0,90	14,48	1,38	84,13

Como se pode reparar, o teor de hidratos de carbono nas lamas é significativamente inferior ao teor obtido para a fibra virgem. Essa diferença advém do elevado teor de cinzas e lenhina insolúvel presente na matéria-prima que estão relacionados aos lixos orgânicos e inorgânicos presentes das lamas compostas.

Apesar disso, o teor de lenhina obtido para ambas as matérias-primas foi muito elevado. Para confirmar esse valor decidiu submeter-se a fibra virgem, a matéria-prima de referência, ao teste índice kappa.

Esse teste é um método que permite estimar a quantidade de lenhina residual numa amostra de pasta, normalmente para verificar a eficiência do cozimento (grau de deslenhificação). Para tal, a lenhina presente reage com permanganato, equação (15), oxidando-a, e, ao fim de 10 minutos, o permanganato que não reagiu é determinado por iodometria, equação (16).

$$MnO_4^- + lenhina \rightarrow Mn^{2+} + lenhina\ oxidada \qquad (15)$$

$$2MnO_4^- + 16H^+ + 10I^- \rightarrow 2Mn^{2+} + 8H_2O + 5I_2 \qquad (16)$$

Após a adição de iodeto de potássio, reagente da iodometria, a suspensão é titulada com uma solução aferida de tiossulfato de sódio a 0,2 M. É utilizado o indicador de amido para acompanhar esta titulação, parando quando a solução fica incolor, anotando o volume da solução aferida consumida.

O procedimento é repetido até se obter um volume de titulado de 10 mL. Utilizando as equações (7) e (8), apresentadas na secção 3.2.1, o valor do índice kappa para a fibra virgem foi de 96,84. Este valor é muito elevado e, seguindo a relação geral entre a lenhina total e o valor de índice kappa, apresentada no anexo A, verifica-se que o teor de lenhina total da fibra virgem é de 14,53%, o que justifica os valores obtidos na caracterização da fibra-virgem.

O passo final da caracterização das matérias-primas foi a quantificação direta por HPLC dos açúcares resultantes de uma hidrólise química. Os hidrolisados, devido ao baixo pH, tiveram que ser submetidos a uma neutralização com carbonato de cálcio ($CaCO_3$) de modo a não danificar a resina da coluna cromatográfica. O carbonato de cálcio é uma base que permitiu aumentar o valor de pH para um valor favorável compreendido entre 5 e 6.

Nas figuras seguintes (Fig. 10 a Fig. 13) são apresentados os cromatogramas dos hidrolisados da caracterização química para cada matéria-prima e usando cada uma das duas colunas cromatográficas.

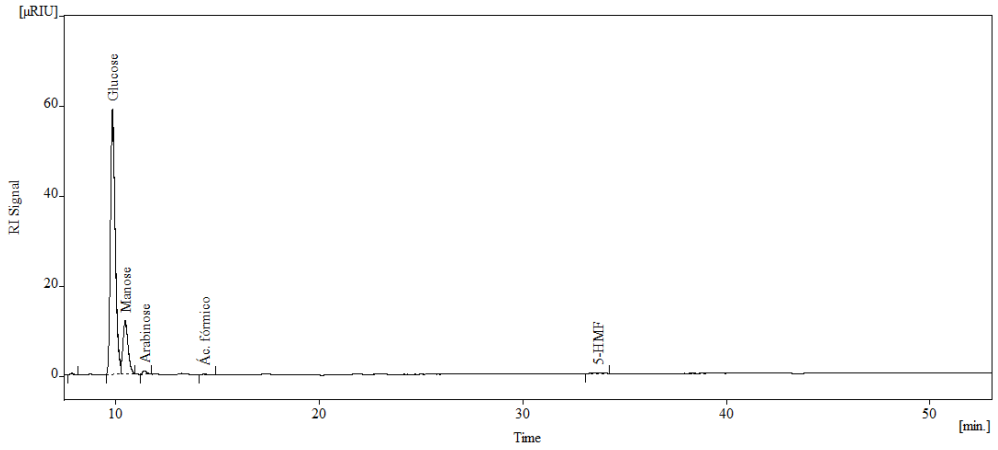


Figura 10 – Cromatograma obtido do hidrolisado da fibra virgem (FV) utilizando a coluna REZEX™ ROA-Organic Acid (H^+).

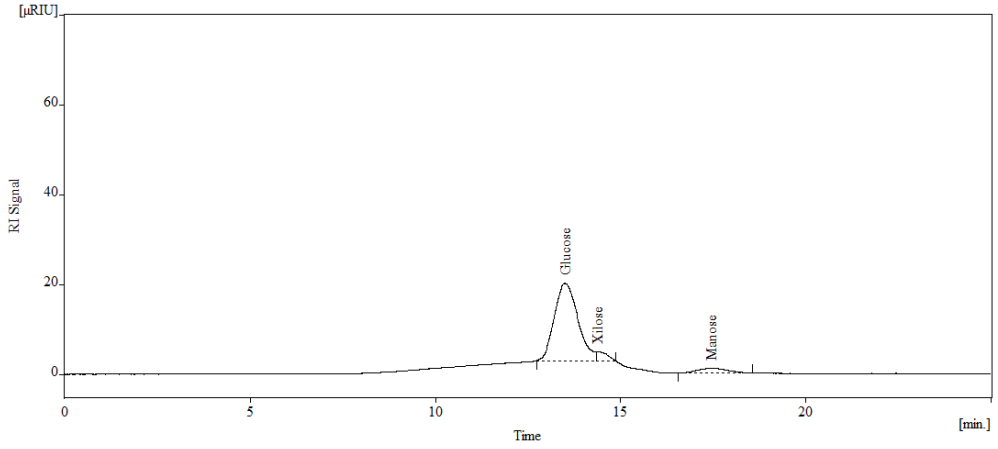


Figura 11 – Cromatograma obtido do hidrolisado da fibra virgem (FV) utilizando a coluna REZEX™ RPM-Monosaccharide (Pb^{2+}).

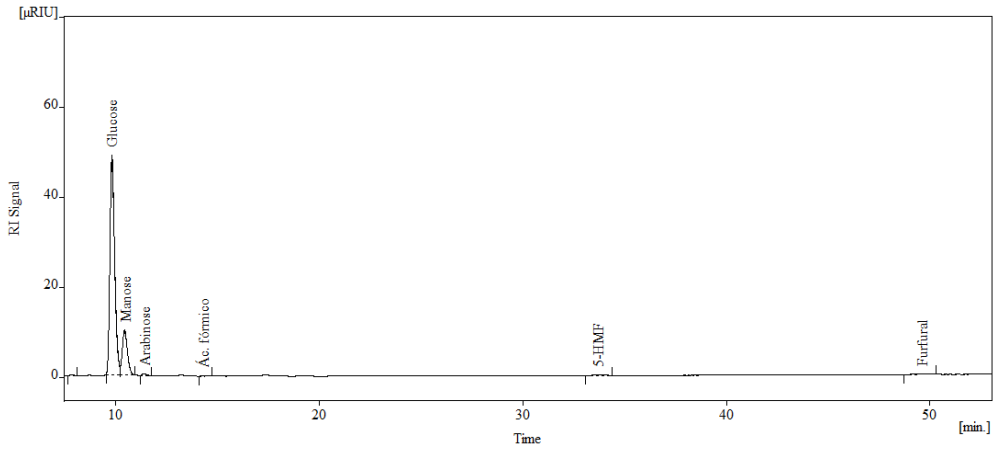


Figura 12 – Cromatograma obtido do hidrolisado das lamas compostas (LC) utilizando a coluna REZEX™ ROA-Organic Acid (H^+).

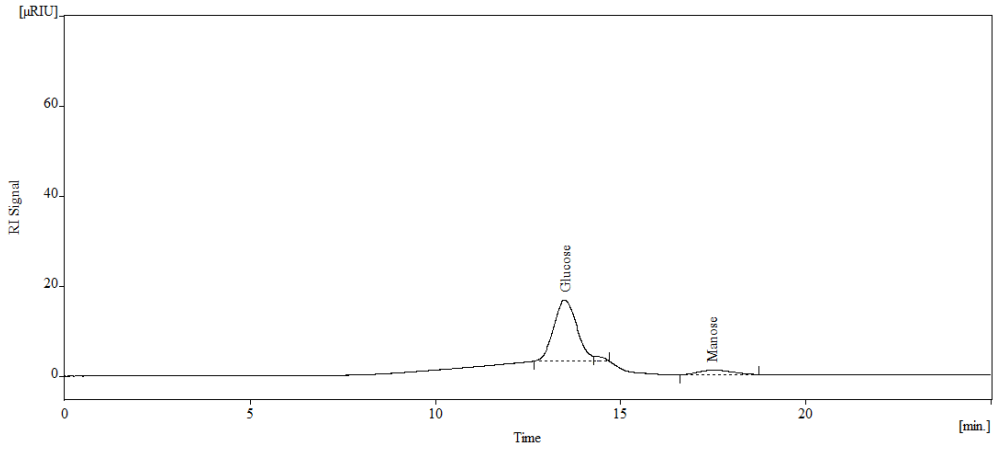


Figura 13 – Cromatograma obtido do hidrolisado das lamas compostas (LC) utilizando a coluna REZEX™ RPM-Monosaccharide (Pb^{2+}).

Como se pode reparar, os picos correspondentes aos monossacarídeos nos cromatogramas da fibra virgem são mais elevados quando comparados aos picos nos cromatogramas das lamas primárias compostas.

Fazendo uso das curvas de calibração dos açúcares para estas colunas cromatográficas, obtiveram-se os valores correspondentes à percentagem de celulose e hemicelulose em ambas as matérias-primas (Tabela 3). A quantificação da celulose e hemicelulose admitiu a relação entre manose e glucose nas glucomananas ser de 4,15 para 1 (Yamamoto *et al.*, 2015).

Tabela 3 – Teores de Celulose e Hemicelulose nas matérias-primas obtidas pelo método HPLC.

Materiais	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Total HC (%)
Lamas Primárias	45,59	15,50	61,10
Fibra Virgem	58,98	17,36	76,34

Os valores obtidos por este método foram mais baixos para ambas as matérias-primas. Era esperado um baixo teor de hidratos de carbono para as lamas primárias compostas devido à presença de compostos intrusivos. No entanto, a quantidade total de açúcares obtida na fibra virgem é inferior à esperada.

Perante a hipótese da fibra virgem trazer extratáveis, decidiu-se fazer a lavagem da fibra virgem e submetê-la ao processo de extração, previamente ignorado.

4.1.2 Fibra Virgem Lavada e Extraída

A lavagem da fibra virgem consistiu em colocar a matéria-prima em água destilada morna, misturando-a vigorosamente, e, de seguida, filtrando-a. O volume de água destilada utilizado em cada lavagem foi de 1 L, repetindo-se mais duas vezes (total de 3 L), para cada 300 g de fibra virgem.

Por sua vez, a extração da fibra virgem seguiu o protocolo proposto pela *NREL* da caracterização das matérias-primas, utilizando-se como solventes água destilada e etanol a 95%. No final, os extratos foram quantificados, como explicitado na secção 3.2.2, resultando em cerca de 2,5% de extratos presentes na fibra virgem, ou seja, em cada 100 g de fibra virgem 2,5 g correspondem a extratos.

Infelizmente, como o processo de extração usa apenas 10 g de matéria-prima por amostra, uma quantidade muito reduzida, não se conseguiu medir nem a secura do material extraído nem o teor de cinzas. Por essa razão, a secura foi calculada para a fibra virgem lavada, cujo valor foi de 0,234 g/g, e todos os extratos equivaliam a cinzas.

De seguida, foram feitas as hidrólises ácidas e calculados os teores de lenhina e cinzas, representados na Tabela 4.

Tabela 4 – Teores de Lenhina, Cinzas e Hidratos de Carbono na fibra virgem lavada e extraída.

Material	**Lenhina$_{insolúvel}$ (%)**	**Lenhina$_{solúvel}$ (%)**	**Lenhina$_{total}$ (%)**	**Cinzas (%)**	**HC (%)**
FV Lavada	13,33	0,71	13,93	0,97	85,10
FV Extraída	12,34	0,52	12,86	2,50	84,64

Como se pode observar, o teor de hidratos de carbono (obtido por diferença) é ligeiramente superior para as fibras virgem lavadas e extraídas relativamente à fibra virgem tal e qual (Tabela 2). No entanto, repara-se que a fibra virgem extraída contém um teor de hidratos

de carbono inferior à fibra virgem lavada, possivelmente como resultado de alguma solubilização nos solventes usados na extração.

Depois, recorreu-se à hidrólise química e avaliação por HPLC para determinar o teor de celulose e hemicelulose em ambas as fibras tratadas (Figuras 14 e 15). Após a neutralização dos hidrolisados, obtiveram-se os valores das concentrações dos hidratos de carbono apresentados na Tabela 5.

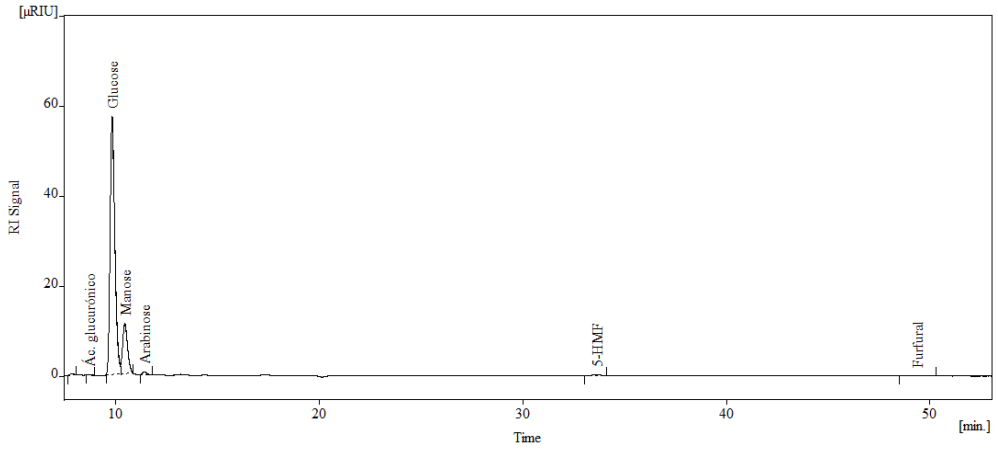


Figura 14 – Cromatograma obtido do hidrolisado da Fibra Virgem Extraída (FV_E) utilizando a coluna REZEX™ ROA-Organic Acid (H^+).

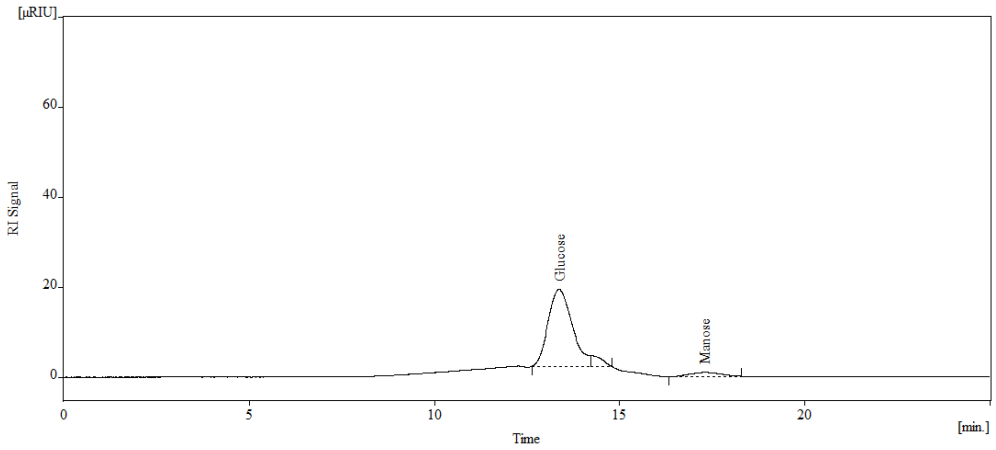


Figura 15 – Cromatograma obtido do hidrolisado da Fibra Virgem Extraída (FV_E) utilizando a coluna REZEX™ RPM-Monosaccharide (Pb^{2+}).

Tabela 5 – Teores de Celulose e Hemicelulose na fibra virgem lavada e extraída pelo método HPLC.

Materiais	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Total (%)
FV Lavada	60,30	16,99	77,29
FV Extraída	61,40	15,86	77,26

Comparando estes valores com os valores da fibra virgem original (Tabela 3), os resultados obtidos foram ligeiramente melhores. No entanto, o processo de extração, não só é

mais demorado, como não compensa o esforço adicional quando comparado à fibra virgem tal e qual e/ou à fibra virgem lavada. Por essa razão, foi utilizada a fibra virgem lavada como matéria de referência nos processos de hidrólise enzimática e ensaios de SSF, uma vez que a lavagem da matéria-prima não é muito demorada e é simples de se realizar.

4.1.3 Tratamento das Lamas Compostas

A escolha do tratamento mais eficaz para as lamas está correlacionado com a quantidade de açúcares produzidos pelo processo de hidrólise enzimática das matérias-primas que sofreram os tratamentos.

Dentro desses processos, a destintagem por tratamento alcalino com hidróxido de sódio com recurso a fosfato monopotássico destacou-se favoravelmente obtendo-se um rendimento de hidrólise significativamente superior ao obtido com as lamas originais. Por essa razão, efetuou-se a caracterização das lamas compostas recorrendo a este tratamento.

O processo de destintagem foi efetuado com cerca de 600 g de matéria-prima de cada vez, por essa razão, foi necessário medir o teor de secura todas as vezes que o tratamento alcalino foi elaborado. Os valores de secura, a 105ºC, estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Valores de secura para cada ensaio de tratamento alcalino.

Material	**Secura$_{média}$ (g/g)**
LC + KH_2PO_4 (1)	0,2886
LC + KH_2PO_4 (2)	0,3020
LC + KH_2PO_4 (3)	0,1722

Após o tratamento alcalino foi calculada a secura e prosseguiu-se com a hidrólise ácida para a determinação do teor de lenhina, de acordo com a secção 3.2. Esses valores estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 – Teores de Lenhina e Hidratos de Carbono nas lamas compostas sujeitas ao processo de destintagem com tratamento alcalino e fosfato monopotássico.

Material	**Lenhina$_{insolúvel}$ (%)**	**Lenhina$_{solúvel}$ (%)**	**Lenhina$_{total}$ (%)**	**HC (%)**
LC + KH_2PO_4	16,88	0,70	17,57	<82,43

Comparando o efeito deste pré-tratamento com o valor da lenhina da LC não tratada (Tabela 2), verifica-se que o teor de lenhina é inferior para as lamas tratadas. Contudo, e uma

vez que não se determinou o teor de cinzas, o teor de hidratos de carbono é inconclusivo por este método. Por essa razão, prosseguiu-se para a quantificação direta de açúcares pelo método de HPLC (Figuras 16 e 17). Na Tabela 8 estão representados esses valores.

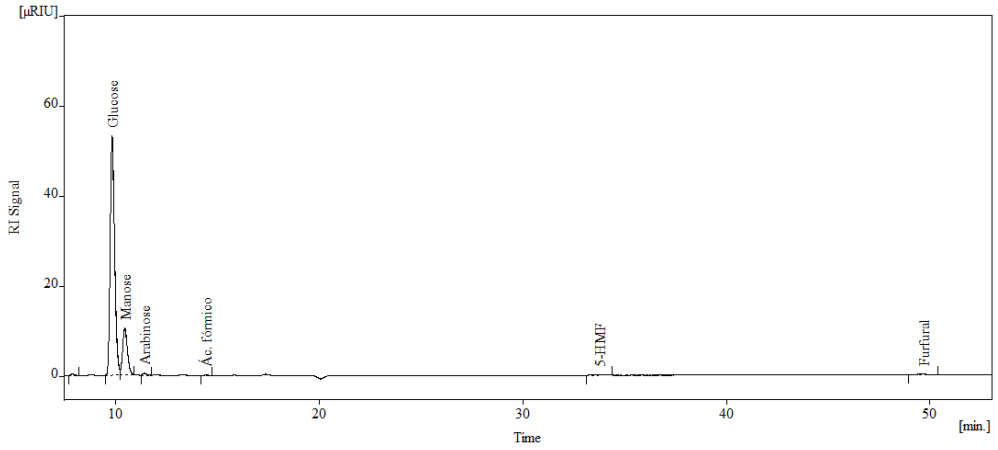


Figura 16 – Cromatograma obtido do hidrolisado das lamas compostas tratadas (LC_K) utilizando a coluna REZEX™ ROA-Organic Acid (H^+).

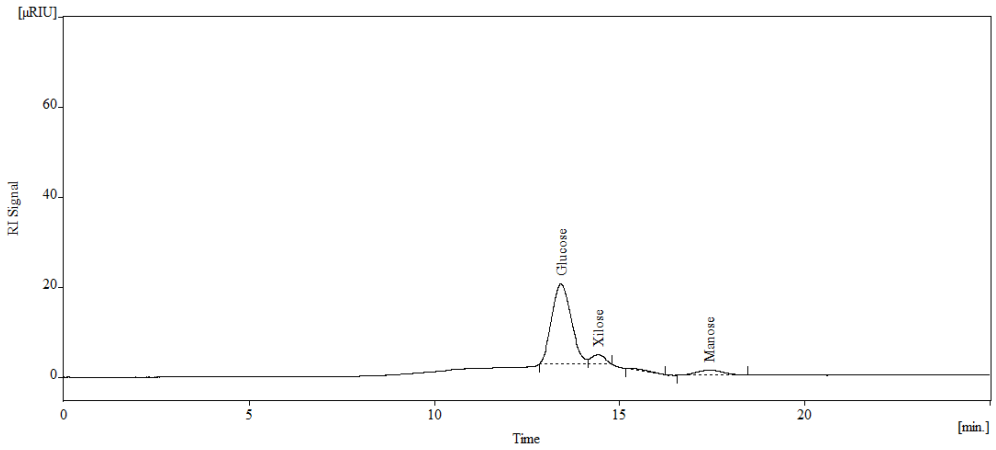


Figura 17 – Cromatograma obtido do hidrolisado das lamas compostas tratadas (LC_K) utilizando a coluna REZEX™ RPM-Monosaccharide (Pb^{2+}).

Tabela 8 – Teores de Celulose e Hemicelulose nas lamas compostas sujeitas ao processo de destintagem com tratamento alcalino e fosfato monopotássico pelo método HPLC.

Materiais	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Total (%)
LC + KH_2PO_4	48,90	13,54	62,44

Comparando estas lamas com as lamas originais (Tabela 3), observa-se que o teor de hidratos de carbono é um pouco superior (+1,3%). No entanto, pelo rendimento obtido na hidrólise enzimática é possível que este tratamento tenha sido benéfico pela remoção de inibidores da reação de hidrólise. Por isso, decidiu-se utilizar o tratamento de destintagem às lamas primárias.

4.2 Hidrólise Enzimática

4.2.1 Influência do tipo de agitação: orbital, mecânica e magnética

Todos os ensaios foram realizados com uma consistência de 3% de massa seca (3g de massa seca por cada 100g de suspensão total), à temperatura de 50ºC e com uma carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono. No anexo G encontram-se todos os ensaios realizados de hidrólise enzimática.

Os ensaios de hidrólise foram acompanhados pela quantificação dos açúcares simples libertados pelo método do DNS e expressos em equivalentes de glucose. Foi traçado o perfil da reação de hidrólise para cada ensaio.

Tendo em conta a composição da mistura reagente, com um elevado conteúdo de sólidos e correspondente dificuldade de homogeneização, decidiu-se comparar diferentes tipos de agitação (orbital, mecânica e magnética) no intuito de se avaliar o seu efeito na cinética de hidrólise.

A agitação orbital utilizou uma incubadora, onde foram colocados os balões Erlenmeyer e agitados a uma velocidade de 150 rpm (Figura 19) A agitação mecânica fez uso de uma hélice montada a um motor que permitiu regular a velocidade de rotação. Utilizou-se a posição 4 da escala presente para a agitação mecânica (Figura 21). A agitação magnética, por sua vez, recorreu a placas magnéticas que permitiam regular a velocidade de agitação do magneto. Utilizou-se uma velocidade de agitação de 500 rpm durante a primeira hora de reação, reduzindo-se depois para 250 rpm até ao fim do processo reacional (Figura 23).

Os ensaios com agitação orbital foram realizados utilizando uma massa de suspensão de 250 g, à temperatura de 50ºC, com uma carga de hidratos de carbono de 2,5 % e a uma carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono. Para este ensaio foram feitas duas réplicas para cada matéria-prima.

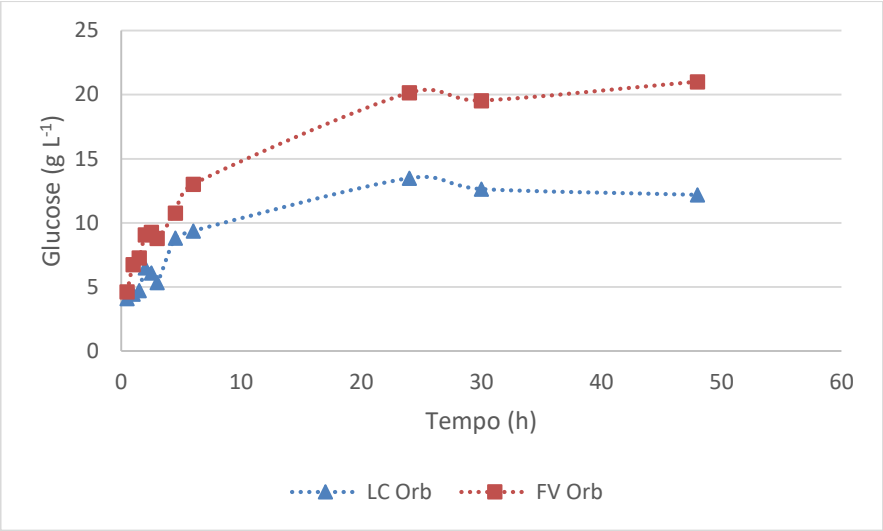


Figura 18 – Perfis médios da hidrólise enzimática de lamas compostas e fibra virgem com recurso a agitação orbital.

Nos ensaios com agitação orbital (Figura 18), obteve-se uma concentração máxima de equivalentes de glucose de 13,5 g L^{-1} para as lamas compostas e uma concentração de 20,1 g L^{-1} para a fibra virgem às 24 h de operação. Estes valores representam uma diferença de rendimento, calculados pela equação (11) superior a 20%.

A Tabela 9 mostra os valores da concentração de açúcares, e respetivos rendimentos de hidrólise, obtidos para os ensaios com agitação orbital às 24 h de reação.

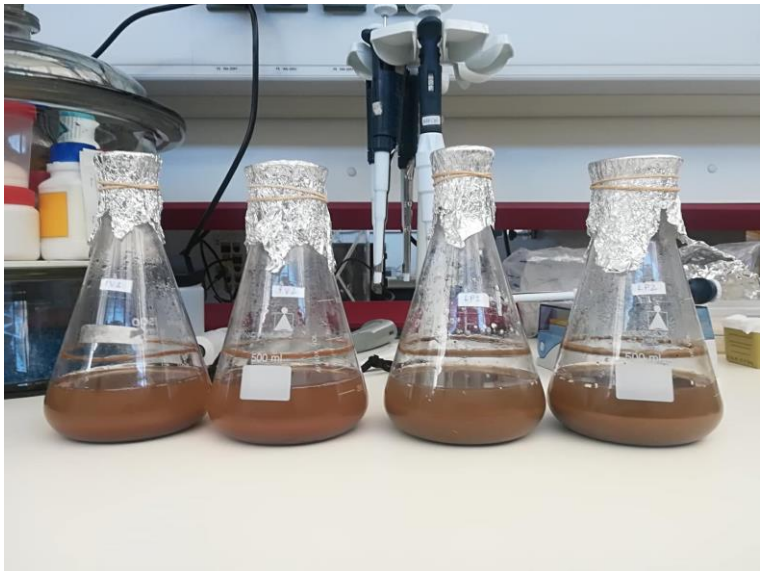


Figura 19 – Ilustração do resultado final do ensaio realizado com agitação orbital. Os dois Erlenmeyers à esquerda continham fibra virgem (FV) e os dois Erlenmeyers à direita continham lamas compostas (LC).

Tabela 9 – Concentração de açúcares simples e respetivos rendimentos às 24 h de reação para o ensaio de hidrólise enzimática com agitação orbital.

Matéria-Prima	Glucose (g L^{-1})	η (g L^{-1} h^{-1})	η (%)
FV	20,15	0,84	78,77
LC	13,50	0,56	57,59

Para os ensaios com recurso à agitação mecânica (Figura 20), devido às suas limitações, a massa de suspensão para estes ensaios foi de 250 g para ambas as matérias-primas, mantendo-se a temperatura nos 50 ºC e a carga enzimática de 15 FPU por grama de hidratos de carbono. Este ensaio utilizou apenas uma réplica para cada matéria-prima.

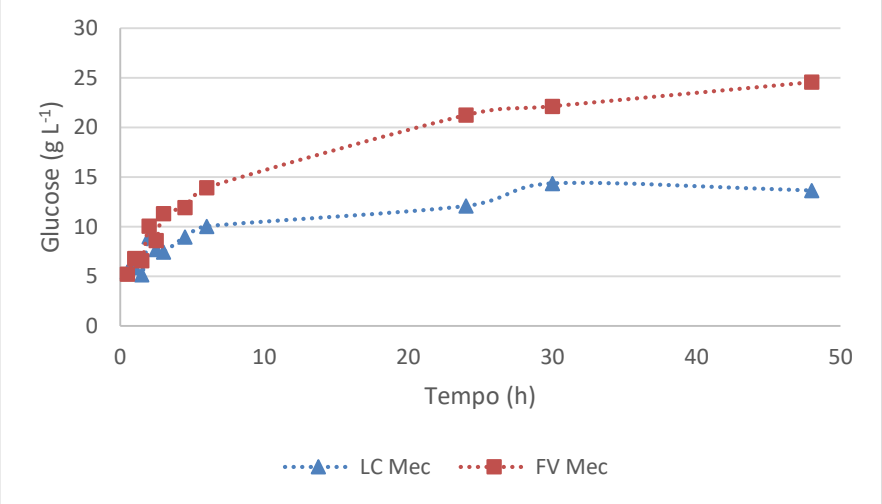


Figura 20 – Perfis da hidrólise enzimática da fibra virgem (FV) e das lamas compostas (LC) usando agitação mecânica.

Nos ensaios com agitação mecânica, a concentração de equivalentes de glucose foi de 12,1 g L^{-1} para as lamas compostas e de 21,3 g L^{-1} para a fibra virgem, para as 24 h de reação. Com esta agitação, a diferença entre os rendimentos de cada matéria-prima foi de 31,7%. Na Tabela 10 estão apresentados os valores de concentração e rendimento para cada matéria-prima obtidos às 24 h de reação.

Figura 21 – Ilustração do ensaio realizado com agitação mecânica. À esquerda, a fibra virgem (FV) e à direita, as lamas compostas originais (LC).

Tabela 10 – Concentração de açúcares simples e respetivos rendimentos, às 24 h de reação, para o ensaio de hidrólise enzimática com agitação mecânica.

Matéria-Prima	**Glucose (g L^{-1})**	**η (g L^{-1} h^{-1})**	**η (%)**
FV	21,25	0,89	83,36
LC	12,08	0,50	51,66

Utilizando-se este tipo de agitação repara-se que a fibra virgem é quase toda hidrolisada. Isso permite sugerir que a utilização deste tipo de agitação favorece mais a hidrólise do que a agitação orbital. No entanto, no que diz respeito às lamas compostas, esta agitação diminui a eficácia de hidrólise em quase 6% (Tabelas 9 e 10).

Os ensaios com recurso a agitação magnética padeceram das mesmas limitações que os ensaios realizados com agitação mecânica. Por essa razão, estes ensaios também tiveram uma massa total de suspensão de 250 g para ambas as matérias-primas. A temperatura também se manteve nos 50ºC e a carga enzimática utilizada foi de 15 FPU por grama de hidratos de carbono. Para este ensaio, a fibra virgem apenas teve uma réplica enquanto as lamas compostas tiveram duas réplicas.

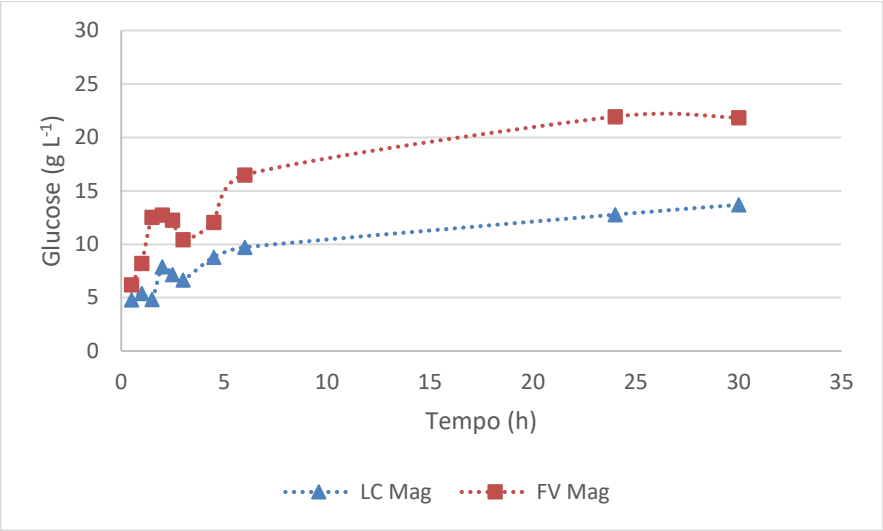


Figura 22 – Perfis da hidrólise enzimática da fibra virgem (FV) e das lamas compostas (LC) usando agitação magnética.

No ensaio realizado com este tipo de agitação (Figura 22), os valores obtidos para as lamas compostas foram muito inferiores, na ordem dos 50% de rendimento de produção de açúcares simples. Por essa razão, sentiu-se necessidade de se repetir esse ensaio e confirmar esses resultados. No entanto, devido a problemas logísticos, não foi possível retirar as amostras deste ensaio às 48 h de reação. Por essa razão apenas são apresentados os perfis de hidrólise enzimática até às 30 h de reação.

Pelos dados obtidos, as lamas conduziram a uma concentração máxima de açúcares superior a 13,5 g L^{-1} enquanto a fibra virgem chegou a uma concentração de quase 22 g L^{-1}. Estas concentrações demonstram uma diferença perto de 27% no rendimento entre as matérias-primas. Na Tabela 11 encontram-se os valores máximos de concentração e rendimentos relativos à agitação magnética.

Figura 23 – Ilustração do ensaio realizado com agitação magnética. À esquerda, fibra virgem (FV) e à direita, as lamas compostas originais (LC).

Tabela 11 – Concentração de açúcares simples e respetivos rendimentos teóricos, às 24 h de reação, para o ensaio de hidrólise enzimática com agitação magnética.

Matéria-Prima	**Glucose (g L^{-1})**	**η (g L^{-1} h^{-1})**	**η (%)**
FV	21,94	0,91	85,89
LC	12,78	0,53	54,57

Quando comparados os três tipos de agitação (Figuras 24 e 25), as diferenças não foram declaradamente significativas talvez devido à pequena escala de operação. A agitação mecânica destaca-se como sendo o tipo de agitação com maior potencial uma vez que produziu maiores concentrações de açúcares, seguida pela agitação magnética e, por fim, pela agitação orbital.

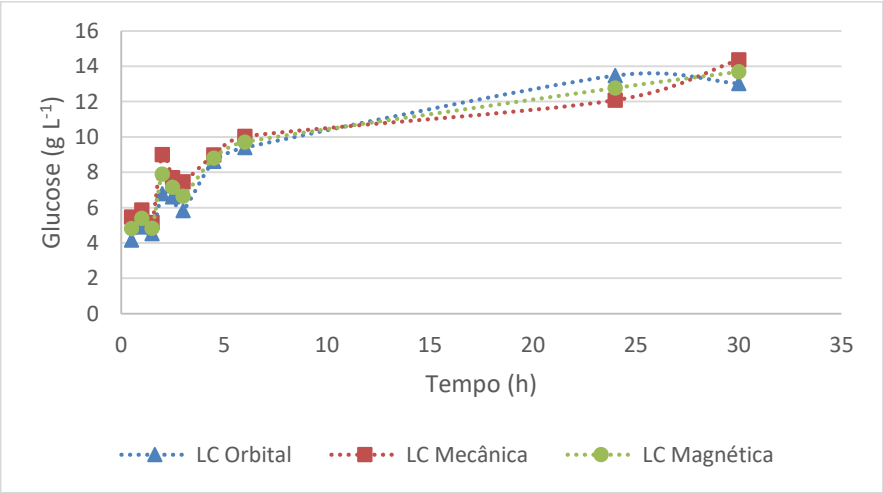


Figura 24 – Perfis da hidrólise enzimática das lamas compostas usando agitação orbital, mecânica e magnética.

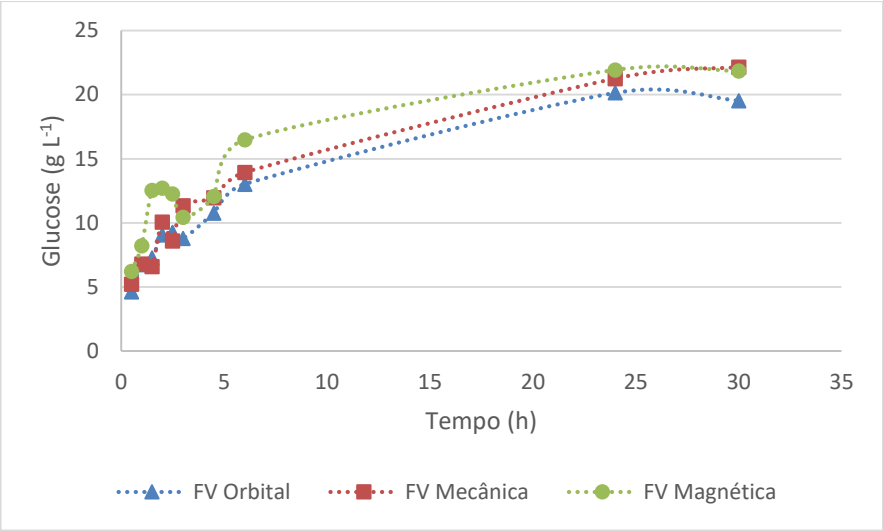


Figura 25 – Perfis da hidrólise enzimática da fibra virgem usando agitação orbital, mecânica e magnética.

Perante estes dados, pode concluir-se que o tipo de agitação avaliado (orbital, mecânico e magnético) não influencia diretamente a cinética de hidrólise enzimática, quer da fibra virgem, quer das lamas primárias compostas. No entanto, destaca-se que estes ensaios foram feitos à escala laboratorial, onde problemas como a heterogeneidade da mistura são pouco relevantes. Futuramente, pode estudar-se a influência do tipo de agitação em sistemas maiores, num estudo de *scale-up*.

4.2.2 Tratamentos das Lamas Compostas

A escolha do tratamento mais eficaz fez-se através de uma análise comparativa dos perfis de hidrólise obtidos com lamas tratadas e com lamas compostas originais.

Estes ensaios foram feitos com uma massa de suspensão de 100 g e agitação orbital, a uma carga de hidratos de carbono de 2,5%, à temperatura de 50ºC e com a carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono. Para este ensaio, as lamas sujeitas a processos de extração com diclorometano e acetona tiveram duas réplicas enquanto os ensaios realizados às lamas sujeitas a tratamento alcalino e adição de fosfatos apenas tiveram uma réplica cada.

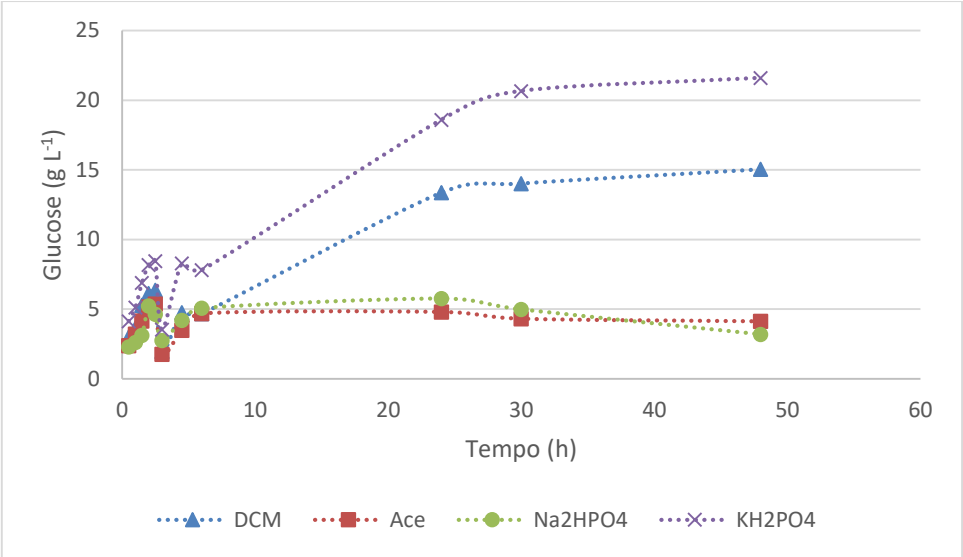


Figura 26 – Perfis de hidrólise enzimática das lamas compostas tratadas: Extração com Diclorometano (DCM); Extração com Acetona (ACE); Destintagem com Fosfato de Sódio (Na_2HPO_4); Destintagem com Fosfato de Potássio (KH_2PO_4). Ensaios realizados com uma carga de hidratos de carbono de 2,5% e com carga enzimática de 15 FPU por grama de hidratos de carbono.

Como se pode observar na Figura 26, a extração com acetona e a destintagem com fosfato de sódio conduziram a concentrações de açúcares simples muito inferiores – 4,8 g L^{-1} e 5,8 g L^{-1}, às 24h, respetivamente – quando comparadas com a produção de açúcares obtida para as lamas compostas originais – 15,2 g L^{-1} (Tabela 9). A extração com recurso a diclorometano apresentou, uma produção mais próxima, de 13,37 g L^{-1}, às 24 h de reação.

O tratamento de destintagem recorrendo a fosfato de potássio, por sua vez, superou a produção obtida pelas lamas compostas originais ao fim de 24h com o valor de 18,6 g L^{-1}. Para além disso, ao contrário das lamas compostas originais, a produção não abrandou passadas 24 horas da hidrólise, tendo-se obtido uma concentração de açúcares no final da reação de 21,6 g L^{-1}.

Estes valores permitem concluir que o tratamento mais eficaz, para estas lamas, é a destintagem com recurso a fosfato monopotássico. Por essa razão, procedeu-se à caracterização das lamas primárias com este tratamento como descrito na secção 4.1.2.

Depois de obtida a caracterização, repetiu-se o ensaio de hidrólise enzimática usando estas lamas tratadas como matéria-prima. As lamas compostas não tratadas foram realizadas com três réplicas enquanto as lamas tratadas apenas tiveram duas réplicas para este ensaio.

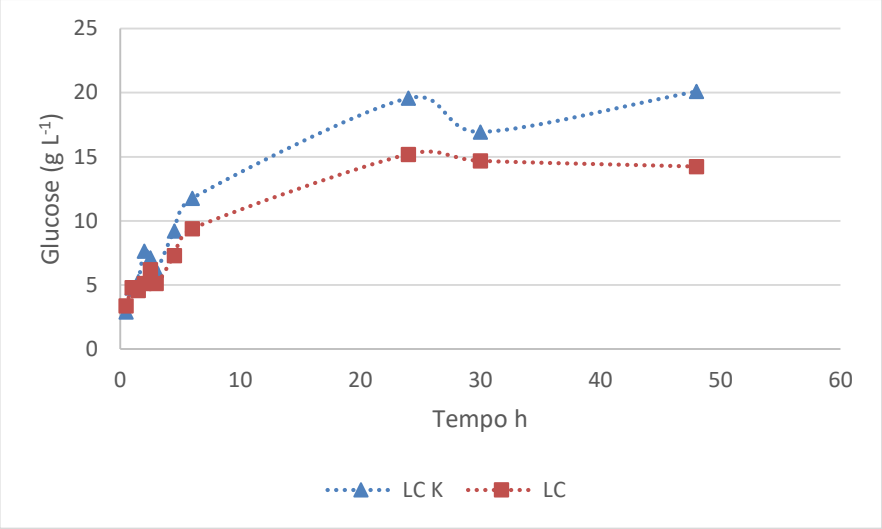


Figura 27 – Perfis de hidrólise enzimática das lamas compostas originais (LC) e com tratamento com fosfato de potássio (LC K) para uma carga inicial de hidratos de carbono de 2,5%.

Segundo a Figura 27 observa-se um aumento significativo da concentração ao fim de 24h de processo. O tratamento com fosfato de potássio conduziu a uma concentração de açúcar de 19,6 g L^{-1} às 24 horas, um aumento de quase 29% em relação às lamas compostas originais, onde se obteve uma concentração de 15,2 g L^{-1}.

Através dos valores obtidos na caracterização das matérias-primas observou-se que o aumento da percentagem de hidratos de carbono entre estas duas matérias-primas é pouco significativo (a percentagem passou de 61,10%, Tabela 3, para 62,44%, Tabela 8). Assim, conclui-se que as tintas presentes na matéria-prima original são efetivos inibidores da hidrólise enzimática e este tratamento é vantajoso para a produção de açúcares simples.

4.2.3 Consistência de 6% de massa de suspensão

Obtidos os rendimentos da hidrólise enzimática para uma carga de hidratos de carbono de 2,5% decidiu-se aumentar a carga inicial da matéria-prima e discutir o efeito dessa alteração.

Para tal decidiu-se aumentar a consistência da matéria-prima para 6 % (6 gramas de matéria seca por 100 g de mistura). Esta alteração traduziu-se em valores de carga de hidratos de carbono de 5,05% para a 'fibra virgem' e de 4,95% para as lamas compostas. Apenas se realizou este ensaio às lamas sujeitas ao tratamento com fosfato de potássio uma vez que a produção de açúcares nesta matéria-prima tinha sido superior. Para este ensaio, foram feitas duas réplicas para cada matéria-prima.

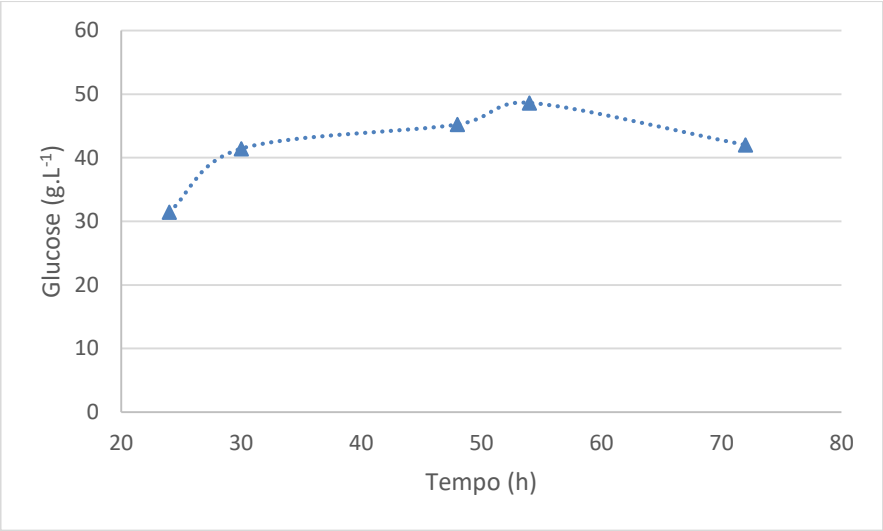


Figura 28 – Perfil de hidrólise enzimática da fibra virgem para uma consistência de 6%.

No ensaio a esta consistência (Figura 28) obtiveram-se resultados favoráveis para a fibra virgem, com uma concentração de açúcares máxima de 48,7 g L^{-1}, o que corresponde a um rendimento de hidrólise de 94,3% que é significativamente superior ao rendimento obtido nos ensaios com uma carga de hidratos de carbono inicial de 2,5%.

No entanto, em relação às lamas compostas tratadas, os resultados obtidos por colorimetria foram muito inferiores mesmo comparados aos valores obtidos com uma carga de hidratos de carbono de 2,5%. É possível que, e por lapso, como se utilizou o mesmo fator de diluição, a lei de Beer-Lambert não foi respeitada, obtendo-se valores de absorção inferiores ao limite da equação (absorção ótica <0,1 A), tornando-os inválidos. Por outro lado, pode-se sugerir que o aumento da carga de massa inicial traz consigo mais inibidores e obstáculos para a degradação enzimática a esta consistência. Por essa razão, não foi possível obter conclusões significativas para os ensaios a esta consistência. No entanto, os resultados obtidos para este ensaio encontram-se apresentados no ensaio 7 do anexo G.

4.3 Sacarificação e Fermentação Simultâneas

O processo integrado de sacarificação e fermentação em simultâneo foi usado com as três matérias-primas em estudo: a fibra virgem, lamas compostas e lamas tratadas com fosfato monopotássico.

Foram estudadas duas consistências (3 e 6%) e duas cargas enzimáticas (15 e 10 FPU/g de hidratos de carbono). Todos os ensaios realizados foram feitos em duplicado, ou seja, duas réplicas por matéria-prima.

O processo de SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*, na literatura inglesa), como o próprio nome indica, faz coincidir o processo de sacarificação com o processo de fermentação. Uma vez que a fermentação neste caso de estudo é uma fermentação alcoólica, este processo permite transformar a matéria-prima em etanol à medida que esta é hidrolisada em açúcares. No entanto, devido às necessidades metabólicas por parte da estirpe *Saccharomyces cerevisiae*, foi necessário enriquecer a mistura inicial com uma solução de nutrientes e proteínas, como fontes de azoto.

A temperatura utilizada para este processo foi de 38ºC e a última amostragem destes ensaios foi feita às 72h sempre que foi possível.

4.3.1 SSF com consistência de 3% e carga enzimática de 15 FPU/g_{HC}

A carga enzimática utilizada neste ensaio foi de 15 FPU/g de hidratos de carbono e a consistência das matérias-primas foram de 3% (3 gramas de massa seca em cada 100 gramas de suspensão). Todos os ensaios realizados de SSF encontram-se no anexo H.

As variáveis a acompanhar foram a concentração de etanol e o rendimento da transformação da matéria-prima em etanol. Para estes ensaios é necessário salientar que devido à escassez de lamas tratadas, as réplicas das lamas compostas com tratamento com fosfato monopotássico tiveram uma massa de suspensão total de 100 g (Figura 30), enquanto as lamas compostas originais e a fibra virgem, para a consistência de 3%, tiveram uma massa de suspensão total de 250 g (Figura 29).

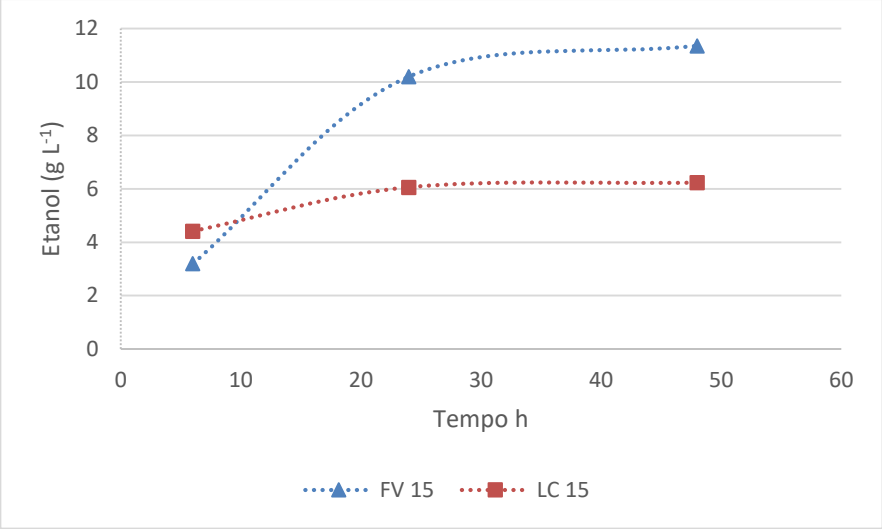


Figura 29 – Perfis de concentração de etanol obtidos com fibra virgem (FV) e lamas compostas (LC) a 15 FPU/g de hidrato de carbono, a consistência de 3% e com uma massa de suspensão de 250 g.

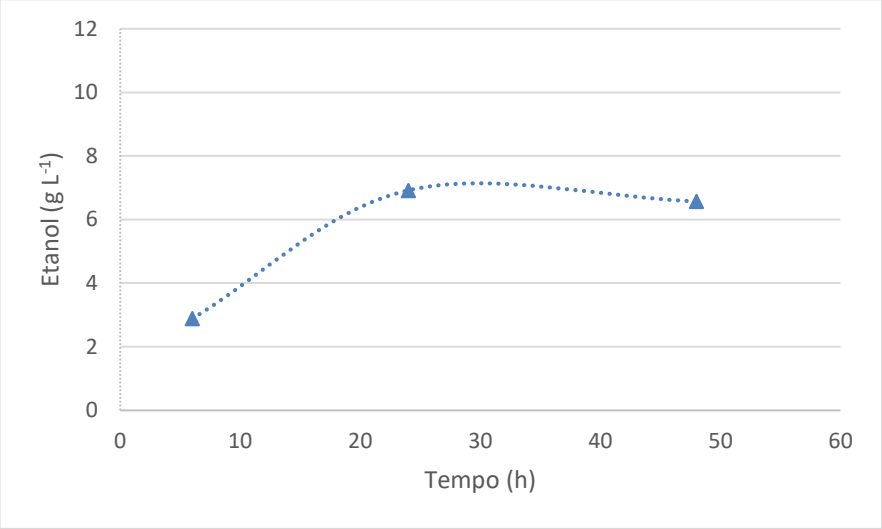


Figura 30 – Perfil de concentração de etanol obtido com lamas tratadas com fosfato de potássio a 15 FPU/g de hidratos de carbono, consistência de 3% e com uma massa de suspensão de 100 g.

A quantificação de etanol foi realizada com o uso da metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência, com a coluna REZEX™ ROA-Organic Acid (H^+) que é capaz de separar etanol de misturas com açúcares simples.

Através desse método, a primeira amostragem, feita às 6 horas de reação, revela valores de concentração de glucose de 9,6 g L^{-1} para a fibra virgem e de 0,5 g L^{-1} para as lamas compostas originais. As lamas com tratamento alcalino e fosfato de potássio obtiveram uma concentração de glucose de 7,7 g L^{-1}. Esses dados encontram-se apresentados no anexo H.

Ao nível de concentrações de etanol, as lamas compostas com tratamento alcalino e adição de fosfato monopotássico apresentam uma concentração máxima de etanol de 6,9 g L^{-1}, após decorridas 24h de reação, e diminui progressivamente a partir desse tempo até ao final da

reação (Figura 30). Já os ensaios realizados com a fibra virgem e lamas compostas (Figura 29), a concentração de etanol obtida às 24h de reação foi de 10,2 g L^{-1} e 5,0 g L^{-1}, respetivamente.

O elevado rendimento das lamas que foram sujeitas ao tratamento alcalino e adição de fosfato monopotássico está relacionado com a massa total de suspensão inferior, comparada com as outras duas matérias-primas. Uma vez que havia uma menor massa de suspensão, a liquidificação foi mais rápida e também a quantidade de inibidores e dificuldades na acessibilidade das enzimas aos hidratos de carbono foram diminuídas.

4.3.2 SSF com consistência de 3% e carga enzimática de 10 FPU/g_{HC}

Depois de terminado o ensaio utilizando a uma carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono, decidiu-se diminuir a carga para 10 FPU/g de hidratos de carbono. A temperatura ótima de operação da enzima encontra-se nos 50ºC e a atividade enzimática diminui com a redução da temperatura para 38ºC. Mesmo assim a diminuição da carga enzimática permitiria economizar a suspensão de enzimas, que tem o seu interesse em termos económicos.

Tal como nos ensaios com carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono, as lamas compostas com tratamento tiveram uma massa de suspensão total de 100 g, enquanto a fibra virgem e as lamas compostas tiveram uma massa total de suspensão de 250 g.

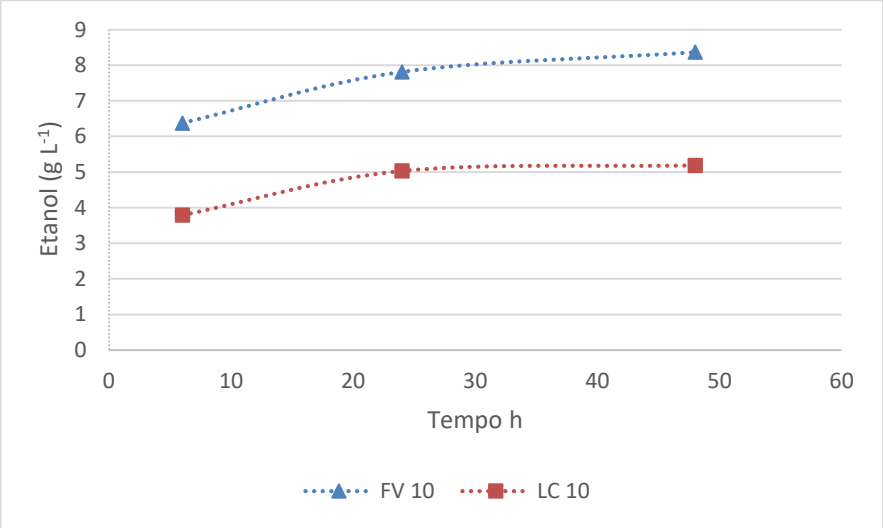


Figura 31 – Perfis de concentração de etanol obtidos com fibra virgem (FV) e lamas compostas (LC) a 10 FPU/g de hidrato de carbono, a consistência de 3% e com uma massa de suspensão de 250 g.

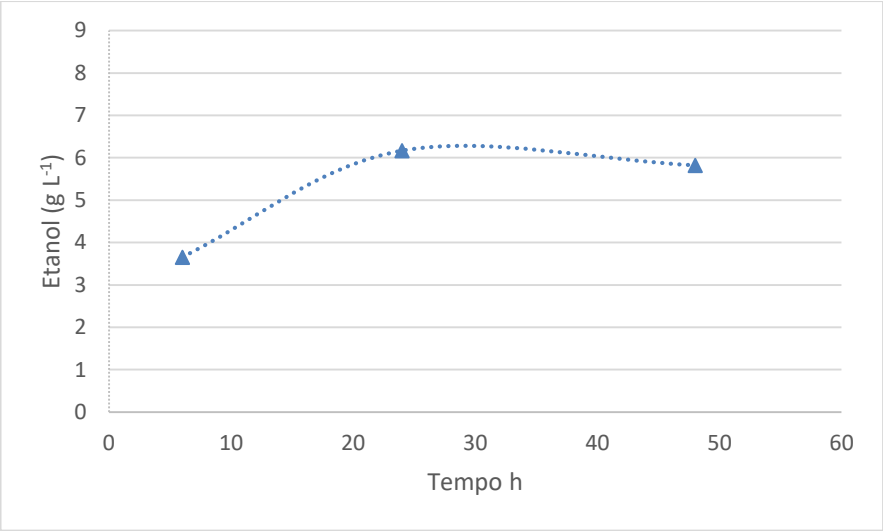


Figura 32 – Perfil de concentração de etanol obtido com lamas tratadas com fosfato de potássio a 10 FPU/g de hidratos carbono, consistência de 3% e com uma massa de suspensão de 100 g.

Com a diminuição da carga enzimática repara-se que a produção de etanol foi, como esperado, inferior para todas as matérias-primas que no ensaio com a carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono.

No ensaio da fibra virgem, a concentração máxima com a nova carga enzimática foi de 7,8 g L^{-1} às 24 h de reação (Figura 31), enquanto no ensaio com maior carga enzimática (Figura 29), obteve-se um máximo, para o mesmo tempo, de 10,2 g L^{-1}, uma redução de 23,5% de produção. Do mesmo modo, no ensaio com lamas compostas, o efeito da diminuição de carga enzimática foi menor, diminuindo a concentração máxima de etanol de 6,1 g L^{-1} (Figura 29) para 5,0 g L^{-1} (Figura 31), uma diminuição de 18%.

No entanto, as lamas compostas com tratamento alcalino obtiveram uma diminuição pouco significativa. O valor máximo de concentração no ensaio com a maior carga enzimática foi de 6,9 g L^{-1} (figura 30) e de 6,2 g L^{-1} (Figura 32), para o ensaio com a menor carga enzimática, ambas recolhidas às 24 h de reação, uma diminuição de 10%. Isto mostra que a redução de carga enzimática de 15 para 10 FPU por grama de hidratos de carbono não afeta significativamente a produção de etanol em SSF com lamas tratadas com fosfato monopotássico. Na Tabela 12 são apresentados os valores de concentração de etanol para ambos os ensaios SSF utilizando uma consistência de 3%.

Tabela 12 – Concentrações de etanol obtidas, às 24h de reação, para os ensaios de SSF para ambas as cargas enzimáticas e para uma consistência de 3%.

Matéria-Prima	**15 FPU/g_{HC}**	**10 FPU/g_{HC}**
FV	10,2	7,8
LC	6,1	5,0
LC K	6,9	6,2

4.3.3 SSF com consistência de 6% e carga enzimática de 15 FPU/g_{HC}

Após obtidos os resultados de SSF com as diferentes cargas enzimáticas, decidiu-se aumentar a quantidade de matéria-prima para uma consistência de 6% (em cada 100 g de suspensão, 6 g são de massa seca).

Apesar dos resultados obtidos na secção 4.2.3 não terem sido favoráveis para as lamas compostas tratadas, devido ao aumento de inibidores e inertes, é possível que com a utilização do processo de SSF, o efeito desses inibidores e inertes seja atenuada.

Os ensaios realizados a esta consistência foram feitos a uma temperatura de 38ºC, durante um tempo de reação de 72 h, com carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono e uma massa total de suspensão de 100 g. Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 33.

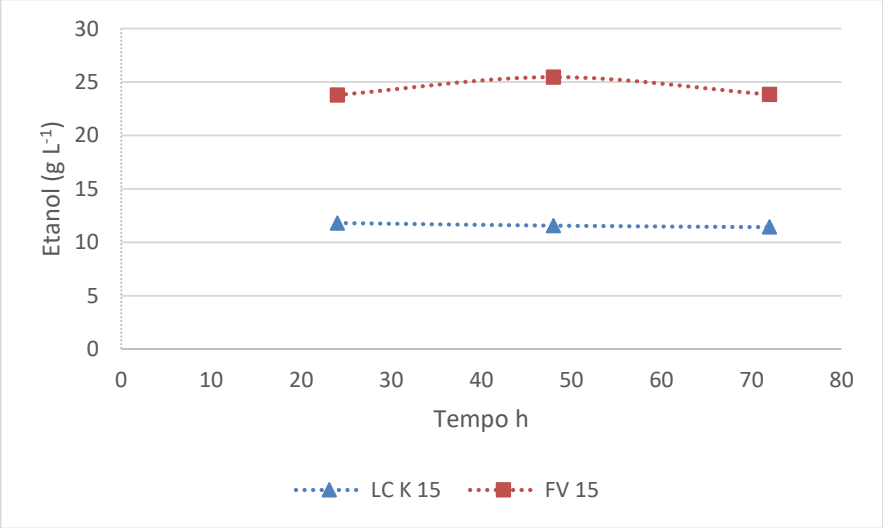


Figura 33 – Perfis de concentração de etanol obtidos da fibra virgem (FV) e lamas com tratamento com fosfato de potássio (LC K) a 15 FPU/g e consistência de 6%.

Com o aumento da carga inicial de massa, as primeiras amostras foram apenas retiradas às 24h após o início do processo, uma vez que às 6 h de reação as misturas ainda não se encontravam liquidificadas, obtendo-se uma concentração de etanol de 11,8 g L^{-1} para as lamas primárias tratadas nesse tempo, sendo essa também a concentração máxima de etanol no ensaio.

Segundo a estequiometria da reação de conversão de glucose em etanol, para se obter 1 grama de etanol é necessário fornecer 1,955 gramas de glucose, ou seja, para se obter essa concentração de etanol, a quantidade de açúcar que foi consumido foi de 23,1 g L^{-1}, que é um valor muito superior ao obtido na hidrólise enzimática para a mesma consistência (13,6 g L^{-1}, valor apresentado no anexo G, ensaio 7). Pode-se então concluir que é mais benéfico utilizar-

se o processo de SSF que o processo de hidrólise enzimática e fermentação em separado quando se recorre a esta consistência nesta matéria-prima.

Reparando nos perfis de concentração de etanol, Figura 33, foram obtidos valores de concentração superiores relativamente ao ensaio onde foi utilizada uma consistência de 3% (Figuras 29 e 30). Este perfil era esperado, uma vez que como existe uma massa inicial superior de matéria-prima, também existe mais celulose e hemicelulose, que por sua vez são hidrolisadas em açúcares e, de seguida, fermentados para dar etanol.

4.3.4 SSF com consistência de 6% e carga enzimática de 10 FPU/g_{HC}

Após esta análise, realizou-se um ensaio utilizando-se uma carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono no intuito de ver se se verifica a mesma tendência que nos ensaios realizados a 3% de consistência.

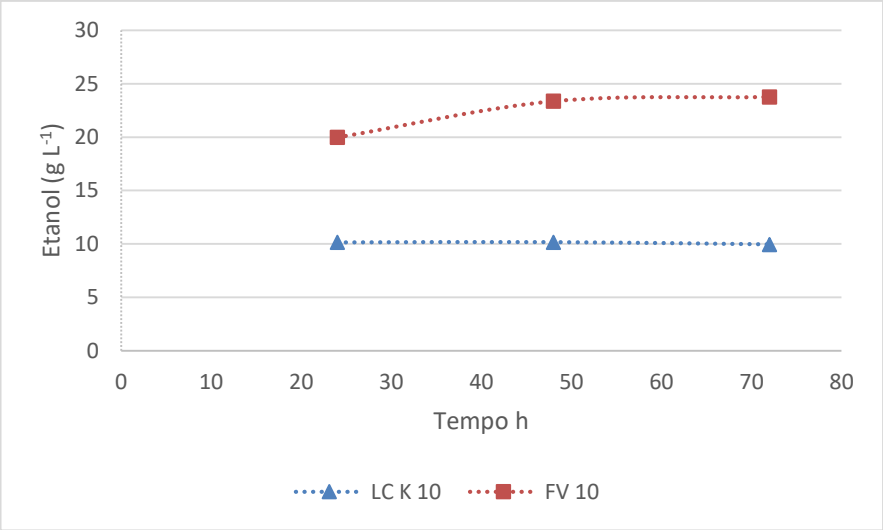


Figura 34 – Perfis de concentração de etanol obtidos da fibra virgem (FV) e lamas com tratamento com fosfato de potássio (LC K) a 10 FPU/g e consistência de 6%.

Como se pode reparar na figura 34, os perfis mantêm essencialmente a mesma tendência com a diminuição da carga enzimática para 10 FPU/g de hidratos de carbono. Contudo, ao se utilizar uma carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono (Figura 33), a concentração de etanol é superior, obtendo-se um 23,8 g L^{-1} de etanol para as 24h de reação. No entanto, sendo utilizada uma carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono, para o mesmo tempo foi obtido um valor de 20 g L^{-1} de etanol.

Em relação às lamas compostas observaram-se as mesmas diminuições que a fibra virgem, onde o valor máximo obtido de etanol para uma carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono foi de 11,8 g L^{-1} (Figura 33) e uma concentração máxima de 10,1 g L^{-1} para a carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono (Figura 34). Novamente repara-se que a diminuição da carga enzimática tem efeito reduzido nesta matéria-prima.

Na Tabela 13 são apresentados os valores de concentração de etanol para ambos os ensaios SSF utilizando uma consistência de 6%.

Tabela 13 – Concentrações de etanol obtidas, às 24h de reação, para os ensaios de SSF para ambas as cargas enzimáticas e para uma consistência de 6%.

Matéria-Prima	**15 FPU/g_{HC}**	**10 FPU/g_{HC}**
FV	23,79	19,98
LC K	11,79	10,14

Analisando os dados obtidos através do método de cromatografia líquida de alta eficiência, repara-se que a concentração de glucose e outros açúcares fermentáveis diminuem ao longo do processo enquanto a concentração de etanol se mantém relativamente constante. Isto é justificado pelo aumento da concentração de xilitol na mistura, um subproduto da fermentação obtido pela fermentação de xilose presente no meio de mistura. Esses valores podem ser encontrados no ensaio 4 e 5 do anexo H.

Pode-se então concluir que o aumento da consistência é capaz de produzir valores superiores de etanol, contudo, esse aumento não é muito significativo.

5. Conclusão e propostas de trabalhos futuros

Através da caracterização feita neste trabalho, confirma-se a presença de compostos exógenos nas lamas primárias compostas, fornecidas pela empresa de produção de papel *kraft*, que são inibidores dos processos biológicos usados na sua valorização.

Foram realizados 4 tipos de tratamentos às lamas compostas onde se destacou o tratamento alcalino com adição de fosfato monopotássico. Depois realizou-se um ensaio de hidrólise enzimática com estas lamas tratadas, obtendo-se uma concentração de açúcares de 19,6 g L^{-1} (Figura 17) que comparado à concentração de açúcares obtida pelas lamas não tratadas, 15,2 g L^{-1} (Figura 17), representa um aumento de 29% na produção de açúcares.

Foi também estudada a influência do tipo de agitação, recorrendo a agitação orbital, mecânica e magnética, sobre a homogeneização da mistura. Estes ensaios permitiram concluir que o tipo de agitação utilizado não influencia significativamente o processo de hidrólise enzimática, à escala laboratorial.

Em relação aos ensaios de SSF realizados, foram analisados os efeitos da consistência e da carga enzimática. Esses dados estão representados na Tabela 14.

Tabela 14 – Concentrações de etanol obtidas, às 24h de reação, para as lamas compostas tratadas (LC K) e não tratadas (LC), para ambas as consistências e cargas enzimáticas (se aplicável).

Matéria-Prima	**Consitência (%)**	**Carga Enzimática (FPU/g_{HC})**	**Etanol (g L^{-1})**
LC	3	10	5,0
		15	6,1
LC K	3	10	6,2
		15	6,9
	6	10	10,1
		15	11,8

Pode-se concluir que a alteração da carga enzimática tem um efeito muito pouco significativo na produção de etanol enquanto o aumento da consistência traz consigo valores de produção de etanol também superiores. Perante estes resultados, pode concluir-se que o tratamento alcalino com adição de fosfato monopotássico é benéfico para estas lamas.

Para trabalhos futuros, a otimização da produção de etanol a partir destas lamas compostas é essencial para a sua aplicação a nível industrial. A aplicação de uma metodologia semi-contínua (*fed-batch*) para o processo de hidrólise enzimática pode ultrapassar a baixa produção de açúcares a consistências mais elevadas utilizadas neste trabalho.

6. Bibliografia

Andrade, C., Dias Junior, A., Brito, J., Protasio, T., Trugilho, P. and Melo, I. (2017). Waste wood of urban origin for energy use. *Revista Árvore*, 41(2), 1-8.

Azevedo, A., Alexandre, J., Pessanha, L., Manhães, R., de Brito, J. and Marvila, M. (2019). Characterizing the paper industry sludge for environmentally-safe disposal. *Waste Management*, 95, 43-52.

Bajpai, P. (2018). Pulping Fundamentals. *Biermann's Handbook of Pulp and Paper*. Bajpai, P. ed, 295-351.

Bhutto, A., Qureshi, K., Harijan, K., Abro, R., Abbas, T., Bazmi, A., Karim, S. and Yu, G. (2017). Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. *Energy*, 122, 724-745.

BP (2018). Statistical Review of World Energy. 67th Edition.

Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J. and Welton, T. (2013). Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*, 15(3), 550-583.

Chen, H., (2014). Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose. In: *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. Chen, H. ed.

Demirbas, A. and Demirbas, M. (2010). Algae Energy. *Green Energy and Technology*. Demirbas, A and Demirbas, M. ed, 1-27.

Jiang, L., Zheng, A., Zhao, Z., He, F., Li, H. and Wu, N. (2016). The comparison of obtaining fermentable sugars from cellulose by enzymatic hydrolysis and fast pyrolysis. *Bioresource Technology*, 200, 8-13.

Karimi, K. and Taherzadeh, M. (2016). A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. Bioresource Technology, 203, 348-356.

Loow, Y., Wu, T., Md. Jahim, J., Mohammad, A. and Teoh, W. (2016). Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. *Cellulose*, 23(3), 1491-1520.

Maitan-Alfenas, G., Visser, E. and Guimarães, V. (2015). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*, 1, 44-49.

Mendes Faia, A. and Torres Castro, L. (1998). Metabolismo Microbiano Produtor de Energia. In: *Microbiologia - Volume 1*., W. Canas Ferreira and J. Carlos Sousa, ed., Lidel.

Mu, L., Wu, J., Matsakas, L., Chen, M., Vahidi, A., Grahn, M., Rova, U., Christakopoulos, P., Zhu, J. and Shi, Y. (2018). Lignin from hardwood and softwood biomass as a lubricating additive to ethylene glycol. *Molecules*, 23(3), 537-547.

Murtey, M. and Ramasamy, P. (2016). Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy – Life Sciences. *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences*.

Olofsson, K., Bertilsson, M. and Lidén, G. (2008). A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1(1), 7-21.

Pelaez-Samaniego, M. and Englund, K. (2016). Production of sugars from wood waste materials via enzymatic hydrolysis. *Waste and Biomass Valorization*, 8(3), 883-892.

Przybysz Buzała, K., Kalinowska, H., Przybysz, P. and Małachowska, E. (2017). Conversion of various types of lignocellulosic biomass to fermentable sugars using kraft pulping and enzymatic hydrolysis. *Wood Science and Technology*, 51(4), 873-885.

Sindhu, R., Binod, P. and Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology*, 199, 76-82.

Sun, S., Sun, S., Cao, X. and Sun, R. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*, 199, 49-58.

Taherzadeh, M. and Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(9), 1621-1651.

Volynets, B., Ein-Mozaffari, F. and Dahman, Y. (2017). Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. *Green Processing and Synthesis*, 6, 1-22.

Wang, Y., Bian, X. and Zhou, L. (2012). Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) of cellulose from lignocellulise for 2nd bioethanol production: A Review. *Advanced Materials Research*, 512-515,464-467.

Yamamoto, N., Ueda-Wakagi, M., Sato, T., Kawasaki, K., Sawada, K., Kawabata, K., Akagawa, M. and Ashida, H. (2015). Measurement of Glucose Uptake in Cultured Cells. *Current Protocols in Pharmacology*, 12.14 (1-26).

Yang, M., Li, W., Liu, B., Li, Q. and Xing, J. (2010). High-concentration sugars production from corn stover based on combined pretreatments and fed-batch process. *Bioresource Technology*, 101(13), 4884-4888.

Zhang, X., Qin, W., Paice, M. and Saddler, J. (2009). High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates. *Bioresource Technology*, 100(23), 5890-5897.

Zhu, L., O'Dwyer, J., Chang, V., Granda, C. and Holtzapple, M. (2008). Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresource Technology*, 99(9), 3817-3828.

Anexo A – Procedimento protocolar do teste de índice Kappa

Reagentes:

Ácido sulfúrico (2 M);
Iodeto de potássio (1 M);
Tiossulfato de sódio (0,05 M);
Permanganato de potássio (0,01 M);
Água destilada;
Indicador de amido.

Metodologia:

Pesar com precisão de 0,1 mg, uma quantidade de fibra que consuma cerca de 50% da solução de permanganato de potássio do ensaio em branco (ensaio sem fibra). Introduzir a fibra pesada num copo de 400 mL e adicionar 150 mL de água destilada.
Colocar o copo com o seu conteúdo num banho termostático a uma temperatura de 25ºC, segurando-o com uma pinça e ligar o agitador.
Pipetar para um copo de 100 mL, 20,0 mL de permanganato de potássio e 20,0 mL de ácido sulfúrico.
Aquecer a mistura até à temperatura de 25ºC e adicionar à suspensão de fibra, ligando o cronómetro.
Lavar o copo com 10 mL de água e adicionar à suspensão. O volume final da suspensão com a fibra deve ser 200 mL.
Interromper a reação ao fim de 10 minutos pela adição de 10 mL de iodeto de potássio.
Titular o iodo libertado com tiossulfato de sódio, com o auxílio de indicador de amido, até a solução ficar clara/transparente.
Registar o volume titulado e repetir ensaios até se obter dois ensaios consecutivos onde o volume titulado seja 10 mL, alterando a massa de fibra se o volume registado.

Tabela 15 – Fator de correção d para o cálculo do IK. (d = 0,89301+0,021456×C).

C (mL)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	0,958	0,960	0,962	0,964	0,966	0,968	0,970	0,973	0,975	0,977
4	0,979	0,981	0,983	0,985	0,987	0,989	0,991	0,994	0,996	0,998
5	1,000	1,002	1,004	1,006	1,009	1,011	1,013	1,015	1,017	1,019
6	1,022	1,024	1,026	1,028	1,030	1,033	1,035	1,037	1,039	1,042

$$Lenhina\ Total\ (\%) = 0{,}15 \times IK$$

Anexo B – Preparação das soluções de tampão citrato 0,05 M e reagente DNS

Preparação do tampão citrato 0,05 M:

Reagentes:

Ácido cítrico monohidratado;

Hidróxido de sódio;

Água destilada.

Metodologia:

Pesar 210 g de ácido cítrico monohidratado e adicionar 750 mL de água destilada.

De seguida, adicionar hidróxido de sódio até se atingir um pH de 4,3.

Adicionar mais água destilada até se obter 1 L, adicionando hidróxido de sódio, se necessário, para manter o pH perto de 4,5. Obtém-se solução tampão citrato a 1 M.

Por fim, colocar 50 mL da solução tampão citrato a 1 M e adicionar 950 mL de água destilada para se obter solução tampão citrato a 0,05 M.

Preparação do reagente de DNS:

Reagentes:

Ácido 3,5-dinitroselicílico;

Hidróxido de sódio;

Tartarato duplo de potássio e sódio;

Metabissulfito de sódio;

Fenol;

Água destilada.

Metodologia;

Misturar 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1416 mL de água destilada.

Depois de dissolvidos, numa *hotte*, adicionar 306 g de tartarato duplo de potássio e sódio, 8,3 g de metabissulfito de sódio e 7,6 mL de fenol (fundido a 50 ºC), mexendo até a solução ficar homogénea.

Anexo C – Curvas de calibração para a glucose, usando diferentes soluções DNS

O reagente DNS reage com qualquer açúcar redutor, pelo que, numa mistura de monossacarídeos, se determinou o teor de equivalentes de glucose. Para isso, é necessário construir uma curva de calibração usando glucose. Como foram usadas diferentes soluções de DNS, foram também construídas diferentes curvas de calibração. Para tal, dissolveu-se cerca de 0,1 g de glucose em 20 mL de água destilada (o que equivale a uma concentração próxima de 5 g L^{-1}).

Em vários tubos de ensaio, pipetaram-se diferentes volumes dessa solução, em duplicado, diluindo com tampão citrato até se obter um volume de 0,5 mL de solução de glucose (Tabela 16)

Depois, adicionou-se 3 mL de solução DNS, misturando com auxílio de um vórtex, e colocados os tubos de ensaio dentro de um banho em água a ferver durante 5 minutos. Findo esse tempo, os tubos foram retirados da água a ferver e postos em água com gelo por mais cinco minutos.

Depois, foram retirados 0,2 mL de mistura para uma cuvete, adicionando 2,5 mL de água destilada, e levadas ao espectrofotómetro UV-Vis para a leitura da absorvância a 540 nm de comprimento de onda. Os dados obtidos estão representados nas Tabelas 16 a 18 e as curvas de calibração obtidas estão representadas nas Figuras 35 a 37.

1ª Solução DNS:

Tabela 16 – Dados de auxílio ao cálculo da curva de calibração usando a 1ª solução DNS. Massa glucose pesada = 0,1085 g.

Tubo	Stock (mL)	Solução Tampão (mL)	C_{Glu} (g L^{-1})	Abs-A (A)	Abs-B (A)	$Abs_{Média}$ (A)
1	0,10	0,40	1,09	0,0940	0,0964	0.0952
2	0,20	0,30	2,17	0,2213	0,2063	0.2138
3	0,25	0,25	2,71	0,2791	0,2813	0.2802
4	0,30	0,20	3,26	0,3245	0,3380	0.3313
5	0,40	0,10	4,34	0,4333	0,4461	0.4397
6	0,50	0,00	5,43	0,5830	0,5509	0.5670

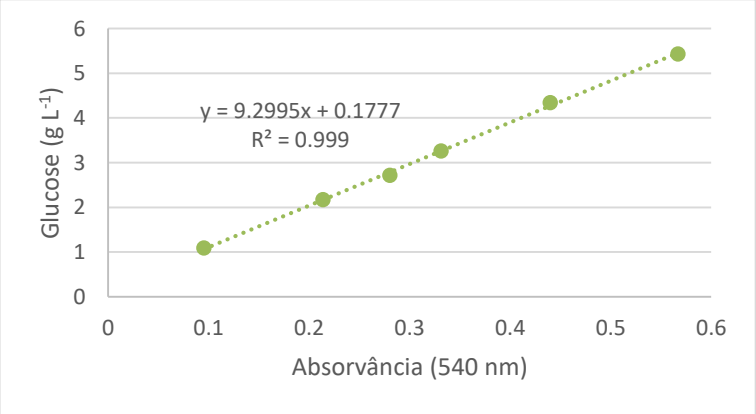


Figura 35 – Curva de calibração usando a 1ª solução DNS. Massa de glucose pesada = 0,1085 g.

2ª Solução DNS:

Tabela 17 – Dados de auxílio ao cálculo da curva de calibração usando a 2ª solução DNS. Massa glucose pesada = 0,105 g.

Tubo	Stock (mL)	Solução Tampão (mL)	C_{Glu} (g L^{-1})	Abs-A (A)	Abs-B (A)	$Abs_{Média}$ (A)
1	0,10	0,40	1,05	0,0863	0,0827	0,0845
2	0,20	0,30	2,10	0,2087	0,1891	0,1989
3	0,25	0,25	2,63	0,2851	0,2531	0,2691
4	0,30	0,20	3,15	0,2986	0,3091	0,3039
5	0,40	0,10	4,20	0,4273	0,4103	0,4188
6	0,50	0,00	5,25	0,5236	0,5116	0,5176

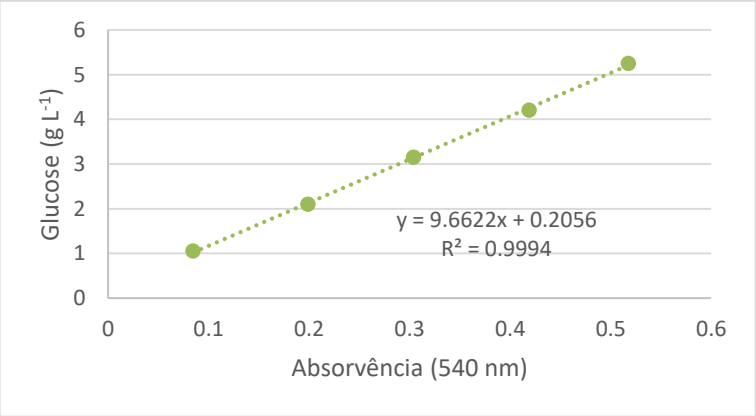


Figura 36 – Curva de calibração usando a 2ª solução DNS. Massa de glucose pesada = 0,105 g.

3ª Solução DNS:

Tabela 18 – Dados de auxílio ao cálculo da curva de calibração usando a 3ª solução DNS. Massa glucose pesada = 0,1062 g.

Tubo	Stock (mL)	Solução Tampão (mL)	C_{Glu} (g L^{-1})	Abs-A (A)	Abs-B (A)	$Abs_{Média}$ (A)
1	0,10	0,40	1,06	0,0946	0,0809	0,0878
2	0,20	0,30	2,12	0,1991	0,2009	0,2000
3	0,25	0,25	2,66	0,2490	0,2652	0,2571
4	0,30	0,20	3,19	0,3215	0,3115	0,3165
5	0,40	0,10	4,25	0,4258	0,4125	0,4192
6	0,50	0,00	5,31	0,5345	0,5603	0,5474

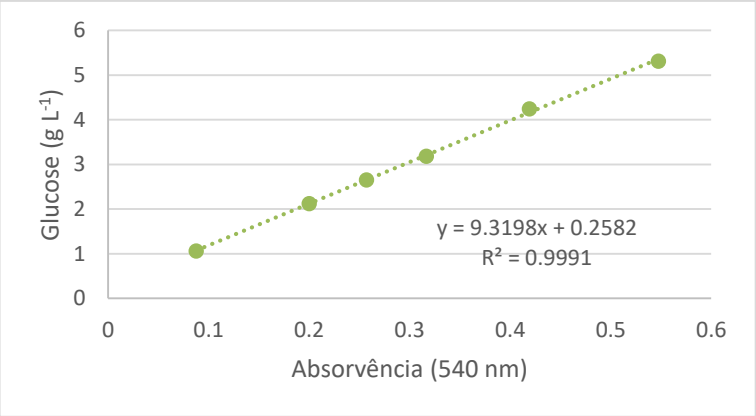


Figura 37 – Curva de calibração usando a 3ª solução DNS. Massa de glucose pesada = 0,1062 g.

Anexo D – Dados auxiliares do cálculo da atividade enzimática e curva de calibração

Tabela 19 – Dados auxiliares para o cálculo da atividade enzimática para a temperatura de 50ºC.

Diluição	Abs (540nm)	Glucose (mg	Volume	Glucose (mg)	$Glucose_{med}$	Enzima (mL mL^{-1})
401	0,4383	4,25	0,5	2,13	2,10	0,0025
401	0,4275	4,15	0,5	2,08		
501	0,3892	3,80	0,5	1,90	1,85	0,0020
501	0,3699	3,62	0,5	1,81		
601	0,2592	2,59	0,5	1,29		
601	0,2455	2,46	0,5	1,23	1,35	0,0017
601	0,3086	3,05	0,5	1,52		

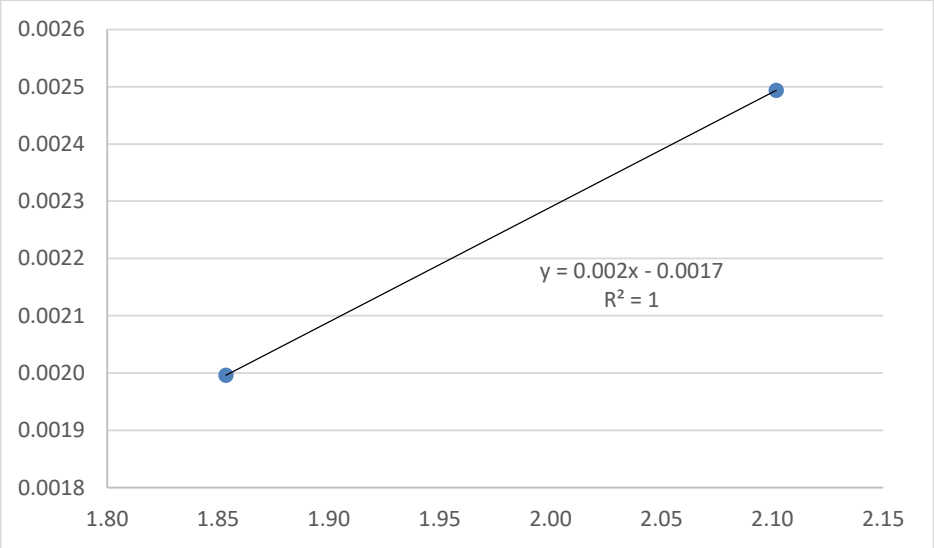


Figura 38 – Curva de calibração da atividade enzimática a 50ºC.

Recorrendo à expressão linear, o volume de enzima que corresponde a 2 mg de glucose libertada é 0,0023 mL de Enzima por mL de solução. Através da equação (10), pode-se então calcular a atividade enzimática.

$$Atividade_{50ºC} = \frac{0{,}37}{Enzima_{2g}} = \frac{0{,}37}{0{,}0023} = 160{,}9\ FPU/mL$$

Tabela 20 – Dados auxiliares para o cálculo da atividade enzimática para a temperatura de 38ºC.

Diluição	Abs (540nm)	Glucose (mg	Volume	Glucose (mg)	$Glucose_{med}$	Enzima (mL mL^{-1})
151	0,4386	4,26	0,5	2,13		
151	0,4767	4,61	0,5	2,31	2,09	0,0066
151	0,3776	3,69	0,5	1,84		
201	0,3997	3,89	0,5	1,95		
201	0,3301	3,25	0,5	1,62	1,80	0,0050
201	0,3737	3,65	0,5	1,83		

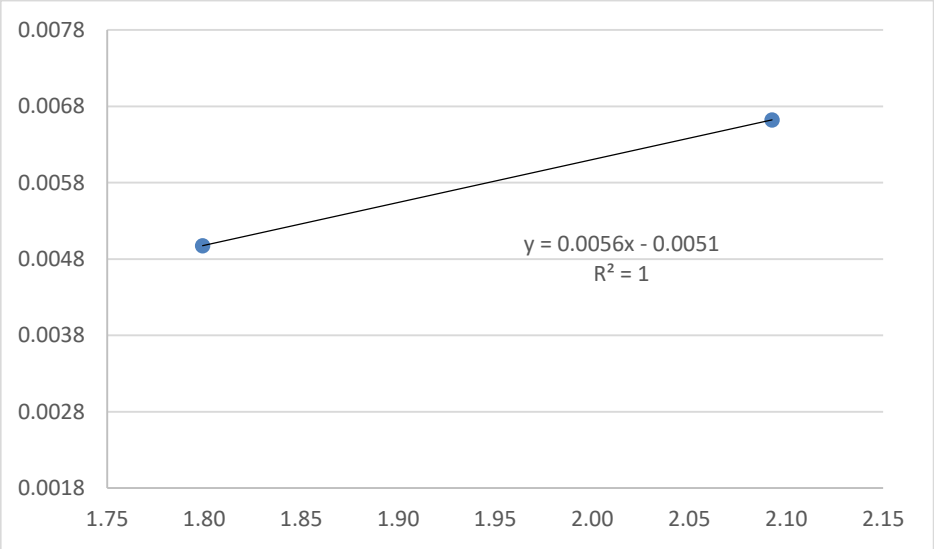


Figura 39 – Curva de calibração da atividade enzimática a 38ºC.

Recorrendo à expressão linear, o volume de enzima que corresponde a 2 mg de glucose libertada é 0,0061 mL de Enzima por mL de solução. Através da equação (10), pode-se então calcular a atividade enzimática.

$$Atividade_{50ºC} = \frac{0{,}37}{Enzima_{2g}} = \frac{0{,}37}{0{,}0061} = 60{,}7\ FPU/mL$$

Anexo E – Exemplificação dos cálculos dos rendimentos teóricos de hidrólise e etanol

Para o cálculo do rendimento teórico de hidrólise, tem-se a equação 13, apresentada de seguida.

$$Rendimento_{hidrólise}(\%) = \frac{[Glucose]}{1{,}111 \times \left(\frac{m_{seca}}{V_{suspensão}}\right) \times HC_{\%}} \times 100 \qquad (13)$$

Como:

$$m_{seca} = m_{húmida} \times Secura; \qquad V_{suspensão} = \frac{m_{suspensão}}{1000};$$
$$HC_{\%} = Celulose\ (\%) + Hemicelulose\ (\%);$$

Substituindo as variáveis na equação e utilizando os valores obtidos no primeiro ensaio de hidrólise enzimática para a amostra das lamas compostas e decorridas 0,5h de reação então tem-se os seguintes valores:

$$Rendimento_{hidrólise}(\%) = \frac{3{,}488}{1{,}111 \times \left(\frac{m_{húmida} \times Secura}{\frac{V_{húmida}}{1000}}\right) \times (0{,}4559 + 0{,}1550)} \times 100$$

$$= \frac{3{,}488}{1{,}111 \times \left(\frac{10{,}08 \times 0{,}3417}{\frac{100}{1000}}\right) \times 0{,}6109} \times 100$$

$$= \frac{3{,}488}{1{,}111 \times \left(\frac{10{,}08 \times 0{,}3417}{0{,}1}\right) \times 0{,}6109} \times 100$$

$$= \frac{3{,}488}{1{,}111 \times 34{,}4 \times 0{,}6107} \times 100 = \frac{3{,}488}{23{,}348} \times 100 = 14{,}94\%$$

Do mesmo modo, o rendimento teórico de etanol tem-se através da equação 14.

$$Rendimento_{etanol}(\%) = \frac{[Etanol]}{0{,}51 \times 1{,}111 \times \left(\frac{m_{seca}}{V_{suspensão}}\right) \times HC_{\%}} \times 100 \qquad (14)$$

Utilizando os valores do primeiro ensaio de SSF para as lamas compostas e substituindo as variáveis pelas apresentadas anteriormente, tem-se:

$$Rendimento_{etanol}(\%)$$

$$= \frac{4{,}262}{0{,}51 \times 1{,}111 \times \left(\frac{m_{húmida} \times Secura}{\frac{V_{húmida}}{1000}}\right) \times (0{,}4559 + 0{,}1550)} \times 100$$

$$= \frac{4{,}262}{0{,}51 \times 1{,}111 \times \left(\frac{25{,}23 \times 0{,}3417}{\frac{250}{1000}}\right) \times 0{,}6109} \times 100$$

$$= \frac{4{,}262}{0{,}51 \times 1{,}111 \times \left(\frac{8{,}62}{0{,}25}\right) \times 0{,}6109} \times 100$$

$$= \frac{4{,}262}{0{,}51 \times 1{,}111 \times 34{,}48 \times 0{,}6109} \times 100 = \frac{4{,}262}{11{,}93} \times 100 = 35{,}73\%$$

Anexo F – Dados obtidos da caracterização das matérias-primas

Tabela 21 – Dados obtidos para o cálculo da secura das matérias-primas.

Material	Amostra	$m_{Húmida}$ (g)	$m_{caixa+secos}$ (g)	$m_{caixa\ vazia}$ (g)	m_{Secos} (g)	Secura (g/g)	$Secura_{média}$ (g/g)
Lamas Compostas	1	1,1278	70,0635	69,6746	0,3889	0,3448	0,3417
	2	1,0281	72,1073	71,7626	0,3447	0,3353	
	3	1,1215	66,7893	66,4024	0,3869	0,3450	
Fibra Virgem	1	0,5043	17,9426	17,7542	0,1884	0,3736	0,3434
	2	0,5228	26,1575	25,9732	0,1843	0,3525	
	3	0,5547	27,9416	27,7730	0,1686	0,3039	
Fibra Virgem Lavada	1	1,0039	73,2276	72,9944	0,2332	0,2323	0,2339
	2	1,0196	73,8385	73,5987	0,2398	0,2352	
	3	1,0105	66,6390	66,4024	0,2366	0,2341	
Fibra Virgem Extraída	1	1,0330	43,2176	42,2442	0,9734	0,9423	0,9374
	2	1,0082	40,8853	39,9389	0,9464	0,9387	
	3	1,0112	72,5009	71,5593	0,9416	0,9312	
Lama tratada KH2PO4 (1)	1	0,5067	18,6332	18,4880	0,1452	0,2866	0,2886
	2	0,5028	16,9669	16,8208	0,1461	0,2906	
Lama tratada KH2PO4 (2)	1	0,5069	19,0733	18,9224	0,1509	0,2977	0,3020
	2	0,5018	18,6404	18,4898	0,1506	0,3001	
	3	0,5035	17,6593	17,5042	0,1551	0,3080	
Lama tratada KH2PO4 (3)	1	1,0250	17,0043	16,8212	0,1831	0,1786	0,1722
	2	1,0123	27,4431	27,2714	0,1717	0,1696	
	3	1,0175	17,9271	17,7559	0,1712	0,1683	

Tabela 22 – Dados obtidos durante incineração das matérias-primas.

Material	Amostra	m_{Seca} (g)	$m_{cadinho575ºC}$ (g)	$m_{cadinho+cinzas575ºC}$ (g)	m_{Cinzas} (g)	Cinzas (%)	$Cinzas_{média}$ (%)
Lamas Compostas	1	0,5106	42,0892	42,1287	0,0395	7,74	7,44
	2	0,5065	32,6514	32,6884	0,0370	7,31	
	3	0,5118	42,4944	42,5317	0,0373	7,29	
Fibra Virgem	1	0,5090	26,5413	26,5481	0,0068	1,34	1,38
	2	0,5080	23,3242	23,3320	0,0078	1,54	
	3	0,5175	40,2540	40,2606	0,0066	1,28	
Fibra Virgem Lavada	1	1,0289	32,6491	32,6604	0,0113	1,10	0,97
	2	1,0282	42,0895	42,0986	0,0091	0,89	
	3	1,0283	26,5425	26,5519	0,0094	0,91	

Tabela 23 – Dados obtidos durante o processo de hidrólise ácida das matérias-primas.

Material	Amostra	$m_{seca\ 40ºC}$ (g)	$m_{cadinho+filtro\ 105ºC}$ (g)	$m_{cadinho+filtro+resíduo\ 105ºC}$ (g)	$m_{resíduos}$ (g)	Lenhina insolúvel (%)	Lenhina insolúvel$_{média}$ (%)
Lamas Compostas (1)	1	0,3045	35,8494	35,9077	0,0583	20,33	18,88
	2	0,3044	35,0812	35,1318	0,0506	17,65	
	3	0,3021	35,2516	35,3047	0,0531	18,67	
Fibra Virgem	1	0,3048	35,2633	35,3011	0,0378	13,62	13,59
	2	0,3064	35,8750	35,9139	0,0389	13,95	
	3	0,3022	35,5797	35,6160	0,0363	13,19	
Lamas Compostas (2)	1	0,3062	35,9465	36,0011	0,0546	18,94	19,07
	2	0,3059	35,0897	35,1445	0,0548	19,02	
	3	0,3054	34,7098	34,7652	0,0554	19,26	
Fibra Virgem Lavada	1	0,3153	35,8461	35,8848	0,0387	13,48	13,22
	2	0,3040	35,2289	35,2665	0,0376	13,59	
	3	0,3126	35,5500	35,5858	0,0358	12,58	
Fibra Virgem Extraída	1-A	0,3048	34,7013	34,7362	0,0349	12,58	12,34
	1-B	0,3030	35,2351	35,2691	0,0340	12,33	
	2-A	0,3043	35,5351	35,5687	0,0336	12,13	
	2-B	0,3064	35,8347	35,8693	0,0346	12,40	
	3-A	0,3047	35,0629	35,0969	0,0340	12,26	
	3-B	0,3063	35,4211	35,4556	0,0345	12,37	
Lamas tratada KH2PO4 (1)	1	0,3064	35,0652	35,1359	0,0707	24,83	25,84
	2	0,3118	35,4116	35,4876	0,0760	26,23	
	3	0,3033	35,2187	35,2932	0,0745	26,44	
Lamas tratada KH2PO4 (2)	1	0,3002	37,5427	37,5900	0,0473	16,96	16,88
	2	0,3029	38,9486	38,9959	0,0473	16,81	
	3	0,3032	37,2166	37,2641	0,0475	16,86	

Tabela 24 – Valores obtidos através do espectrofotómetro UV-Vis para o cálculo da lenhina solúvel.

Material	Amostra	$m_{seca\ 40ºC}$ (g)	Diluição	Absorvância (205 nm)	Lenhina solúvel (g/L)	Lenhina solúvel (%)	$Lenhina\ solúvel_{média}$ (%)
Lama Composta (1)	1-A	0,3045	10	0,3388	0,0308	0,93	0,89
	1-B	0,3045	10	0,3332	0,0303	0,92	
	2-A	0,3044	10	0,3115	0,0283	0,86	
	2-B	0,3044	10	0,3150	0,0286	0,87	
	3-A	0,3021	10	0,3222	0,0293	0,89	
	3-B	0,3021	10	0,3150	0,0286	0,87	
Fibra Virgem	1-A	0,3048	10	0,2845	0,0259	0,81	0,90
	1-B	0,3048	10	0,2931	0,0266	0,83	
	2-A	0,3064	10	0,3430	0,0312	0,97	
	2-B	0,3064	10	0,3371	0,0306	0,95	
	3-A	0,3022	10	0,3127	0,0284	0,90	
	3-B	0,3022	10	0,3182	0,0289	0,91	
Lama Composta (2)	1-A	0,3062	10	0,3091	0,0281	0,85	0,89
	1-B	0,3062	10	0,3037	0,0276	0,83	
	2-A	0,3059	10	0,3671	0,0334	1,01	
	2-B	0,3059	10	0,3589	0,0326	0,98	
	3-A	0,3054	10	0,2828	0,0257	0,78	
	3-B	0,3054	10	0,3276	0,0298	0,90	
Fibra Virgem Lavada	1-A	0,3153	10	0,3020	0,0275	0,83	0,71
	1-B	0,3153	10	0,3153	0,0287	0,87	
	2-A	0,3040	10	0,2203	0,0200	0,63	
	2-B	0,3040	10	0,2508	0,0228	0,72	
	3-A	0,3126	10	0,1775	0,0161	0,49	
	3-B	0,3126	10	0,2713	0,0247	0,75	
Fibra Virgem Extraída	1-A	0,3048	10	0,1956	0,0178	0,56	0,52
	1-B	0,3030	10	0,1830	0,0166	0,52	
	2-A	0,3043	10	0,1872	0,0170	0,53	
	2-B	0,3064	10	0,1956	0,0178	0,55	
	3-A	0,3047	10	0,1788	0,0163	0,51	
	3-B	0,3063	10	0,1574	0,0143	0,45	

Tabela 24 – Valores obtidos através do espectrofotómetro UV-Vis para o cálculo da lenhina solúvel (cont.).

Material	Amostra	$m_{seca\ 40ºC}$ (g)	Diluição	Absorvância (205 nm)	Lenhina solúvel (g/L)	Lenhina solúvel (%)	$Lenhina\ solúvel_{média}$ (%)
Lamas tratadas KH_2PO_4 (1)	1-A	0,3064	10	0,2506	0,0228	0,69	0,66
	1-B	0,3064	10	0,2352	0,0214	0,65	
	2-A	0,3118	10	0,2307	0,0210	0,63	
	2-B	0,3118	10	0,2307	0,0210	0,63	
	3-A	0,3033	10	0,2352	0,0214	0,66	
	3-B	0,3033	10	0,2428	0,0221	0,68	
Lamas tratadas KH_2PO_4 (2)	1-A	0,3002	10	0,2407	0,0219	0,68	0,70
	1-B	0,3002	10	0,2481	0,0226	0,70	
	2-A	0,3029	10	0,2556	0,0232	0,72	
	2-B	0,3029	10	0,2496	0,0227	0,70	
	3-A	0,3032	10	0,2481	0,0226	0,69	
	3-B	0,3032	10	0,2437	0,0222	0,68	

Tabela 25 – Hidratos de carbono obtidos por diferença.

Material	Lenhina insolúvel (%)	Lenhina solúvel (%)	Cinzas (%)	Hidratos de Carbono (%)
Lama Composta	18,88	0,90	7,44	72,59
Fibra Virgem	13,59	0,91	1,38	84,13
Fibra Virgem Lavada	13,22	0,71	0,97	85,10
Lamas tratadas KH_2PO_4 (2)	16,88	0,70	n.d.	< 82,43

Tabela 26 – Teores de celulose, hemicelulose, açúcares simples e produtos de reação obtidos pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (%).

	Lamas Compostas	Fibra virgem	Fibra virgem	Fibra virgem	Lamas tratadas
Glucose	52,86	67,81	69,22	69,63	55,54
Xilose	2,45	4,17	4,04	7,08	5,61
Manose	9,14	9,43	9,22	5,84	5,01
Arabinose	0,88	1,10	1,14	1,18	0,85
Grupos acetilo	2,63	2,24	2,14	2,25	2,49
Ácidos urónicos	0,48	0,58	0,60	0,46	0,48
5-HMF	0,66	0,65	0,75	0,67	0,68
Furfural	0,60	< l.d.	1,02	0,76	0,70
Celulose	45,59	58,98	60,30	61,40	48,90
Hemicelulose	15,50	17,38	16,99	15,86	13,54

Anexo G – Ensaios de Hidrólise Enzimática realizados

Tabela 27 – Dados auxiliares para cada amostra com massa de suspensão total de 100 g.

Amostra	HC (g)	$m_{húmida}$ (g)	V_{Enzima} (mL)	$V_{tampão}$ (mL)	Consistência (%)	$M_{suspensão}$ (g)
Lamas compostas	2,5	10,08	0,233	89,69	3,44	100
Fibra virgem lavada	2,5	12,69	0,233	87,07	2,97	100
Lamas tratadas KH_2PO_4	2,5	17,61	0,233	82,15	3,03	100

Tabela 28 – Dados auxiliares para cada amostra com massa de suspensão total de 250 g.

Amostra	HC (g)	$m_{húmida}$ (g)	V_{Enzima} (mL)	$V_{tampão}$ (mL)	Consistência (%)	$M_{suspensão}$ (g)
Lamas compostas	6,25	25,20	0,583	224,22	3,44	250
Fibra virgem lavada	6,25	31,73	0,583	217,69	2,97	250
Lamas tratadas KH_2PO_4	6,25	44,03	0,583	205,39	3,03	250

Tabela 29 – Dados auxiliares para cada amostra com massa de suspensão total de 100 g.

Amostra	HC (g)	$m_{húmida}$ (g)	V_{Enzima} (mL)	$V_{tampão}$ (mL)	Consistência (%)	$M_{suspensão}$ (g)
Lamas compostas	4,35	17,56	0,406	82,03	6	100
Fibra virgem lavada	5,05	25,65	0,471	73,88	6	100
Lamas tratadas KH_2PO_4	4,95	34,84	0,462	64,70	6	100

Tabela 30 – Parâmetros auxiliares das matérias-primas.

Amostra	Secura (g/g)	CH (g/g)	Celulose (g/g)	Hemiceluloses (g/g)
Lamas compostas	0,3417	0,7258	0,4559	0,1550
Fibra virgem lavada	0,2339	0,8421	0,5898	0,1738
Lamas tratadas KH_2PO_4	0,1722	0,8243	0,4890	0,1354

Ensaio 1:

Tabela 31 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas com uma massa de suspensão de 100g e agitação orbital. Réplica 1, massa húmida pesada = 10,08 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,4158	3,488	14,92
1,0	5	0,0846	4,306	18,42
1,5	5	0,1006	4,311	18,44
2,0	5	0,0891	5,031	21,52
2,5	5	0,1212	6,064	25,94
3,0	5	0,1400	5,022	21,48
3,5	5	0,1378	6,040	25,84
4,5	5	0,1508	7,101	30,37
6,0	5	0,1704	8,547	36,56
24,0	5	0,2902	14,168	60,61
30,0	5	0,2956	13,912	59,51
48,0	5	0,2727	13,020	55,69

Tabela 32 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas com uma massa de suspensão de 100g e agitação orbital. Réplica 2, massa húmida pesada = 10,12 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,4151	3,482	14,84
1,0	5	0,1026	5,143	21,91
1,5	5	0,1205	5,236	22,31
2,0	5	0,0959	5,348	22,79
2,5	5	0,1286	6,408	27,30
3,0	5	0,1465	5,324	22,67
3,5	5	0,1576	6,961	29,66
4,5	5	0,1622	7,631	32,51
6,0	5	0,1962	9,746	41,53
24,0	5	0,3135	15,252	64,98
30,0	5	0,3263	15,340	65,36
48,0	5	0,3219	15,307	65,22

Tabela 33 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas com uma massa de suspensão de 100g e agitação orbital. Réplica 3, massa húmida pesada = 10,22 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,3801	3,156	13,32
1,0	5	0,0978	4,920	20,76
1,5	5	0,0976	4,171	17,60
2,0	5	0,0882	4,990	21,05
2,5	5	0,1232	6,157	25,98
3,0	5	0,1397	5,008	21,13
3,5	5	0,1463	6,436	27,15
4,5	5	0,1515	7,133	30,10
6,0	5	0,1997	9,909	41,81
24,0	5	0,3335	16,182	68,27
30,0	5	0,3147	14,801	62,45
48,0	5	0,3019	14,377	60,66

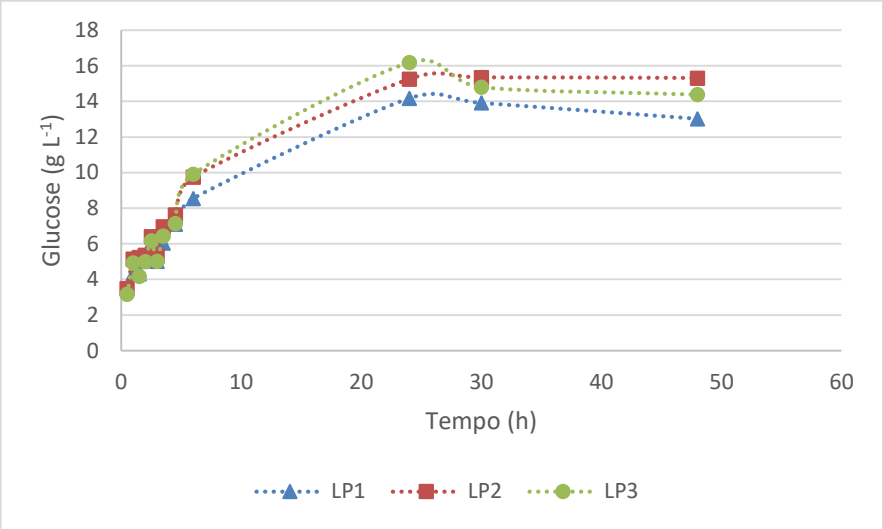


Figura 40 – Perfis de concentração de glucose de todas as réplicas do ensaio de hidrólise enzimática de lamas compostas com uma massa de suspensão total de 100 g e agitação orbital.

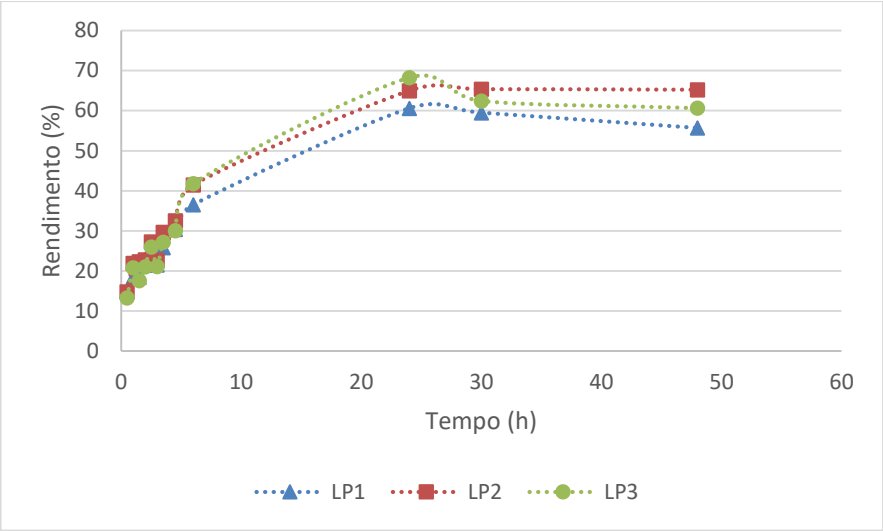


Figura 41 – Perfis de rendimento teórico de todas as réplicas do ensaio de hidrólise enzimática de lamas compostas com uma massa de suspensão total de 100 g e agitação orbital.

Tabela 34 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de fibra virgem com uma massa de suspensão de 100g e agitação orbital. Réplica 1, massa húmida pesada = 12,69 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,6067	5,264	20,65
1,0	5	0,1723	8,384	32,89
1,5	5	0,1770	7,863	30,85
2,0	5	0,1837	9,430	37,00
2,5	5	0,1487	7,342	28,81
3,0	5	0,2261	9,026	35,41
3,5	5	0,2431	10,937	42,91
4,5	5	0,2695	12,620	49,51
6,0	5	0,3003	14,587	57,23
24,0	5	0,4534	21,757	85,36
30,0	5	0,4302	20,171	79,14
48,0	5	0,5166	24,360	95,58

Tabela 35 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de fibra virgem com uma massa de suspensão de 100g e agitação orbital. Réplica 2, massa húmida pesada = 12,73 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,5414	4,656	18,21
1,0	5	0,1490	7,301	28,55
1,5	5	0,1674	7,417	29,01
2,0	5	0,1699	8,788	34,37
2,5	5	0,2020	9,821	38,41
3,0	5	0,2198	8,733	34,15
3,5	5	0,2497	11,243	43,97
4,5	5	0,2633	12,332	48,23
6,0	5	0,2861	13,926	54,47
24,0	5	0,4480	21,505	84,11
30,0	5	0,4814	22,552	88,20
48,0	5	0,5118	24,137	94,40

Tabela 36 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de fibra virgem com uma massa de suspensão de 100g e agitação orbital. Réplica 3, massa húmida pesada = 12,75 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,5860	5,071	19,80
1,0	5	0,1126	5,608	21,90
1,5	5	0,1586	7,008	27,36
2,0	5	0,1634	8,486	33,14
2,5	5	0,2128	10,323	40,31
3,0	5	0,2145	8,486	33,14
3,5	5	0,2237	10,035	39,19
4,5	5	0,2640	12,364	48,28
6,0	5	0,2928	14,238	55,60
24,0	5	0,4127	19,864	77,57
30,0	5	0,4113	19,292	75,34
48,0	5	0,4629	21,864	85,38

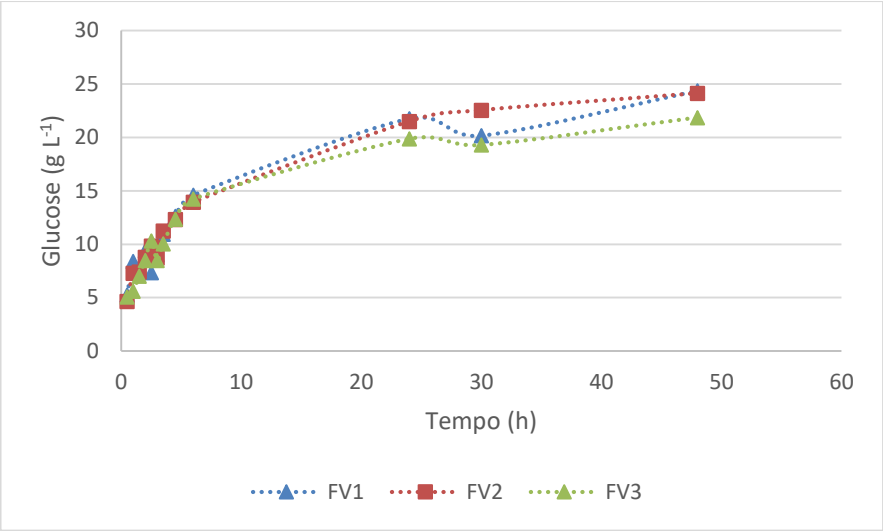


Figura 42 – Perfis de concentração de glucose de todas as réplicas do ensaio de hidrólise enzimática de fibra virgem com uma massa de suspensão total de 100 g e agitação orbital.

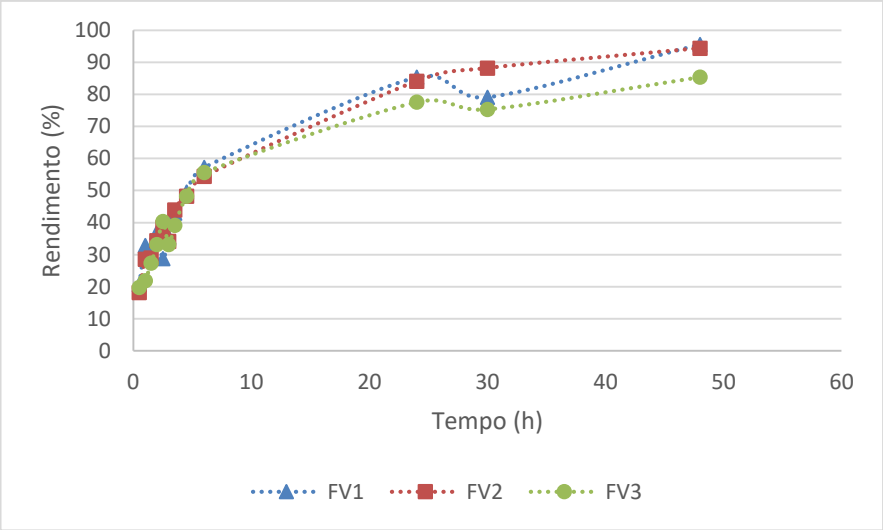


Figura 43 – Perfis de rendimento teórico de todas as réplicas do ensaio de hidrólise enzimática de fibra virgem com uma massa de suspensão total de 100 g e agitação orbital.

Ensaio 2:

Tabela 37 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas com uma massa de suspensão de 250g e agitação orbital. Réplica 1, massa húmida pesada = 25,26 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,4550	4,024	17,17
1,0	5	0,0719	3,965	16,92
1,5	5	0,1073	4,907	20,94
2,0	5	0,1077	6,231	26,59
2,5	5	0,1039	5,569	23,77
3,0	5	0,1301	4,845	20,67
4,5	5	0,1822	8,999	38,41
6,0	5	0,1783	9,366	39,97
24,0	5	0,2635	13,536	57,76
30,0	5	0,2482	12,270	52,36
48,0	5	0,2379	11,951	51,00

Tabela 38 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas com uma massa de suspensão de 250g e agitação orbital. Réplica 2, massa húmida pesada = 25,29 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,4688	4,157	17,72
1,0	5	0,0915	4,912	20,94
1,5	5	0,0993	4,521	19,27
2,0	5	0,1191	6,782	28,91
2,5	5	0,1256	6,618	28,21
3,0	5	0,1506	5,835	24,87
4,5	5	0,1743	8,618	36,73
6,0	5	0,1789	9,395	40,05
24,0	5	0,2621	13,468	57,41
30,0	5	0,2638	13,024	55,51
48,0	5	0,2479	12,434	53,00

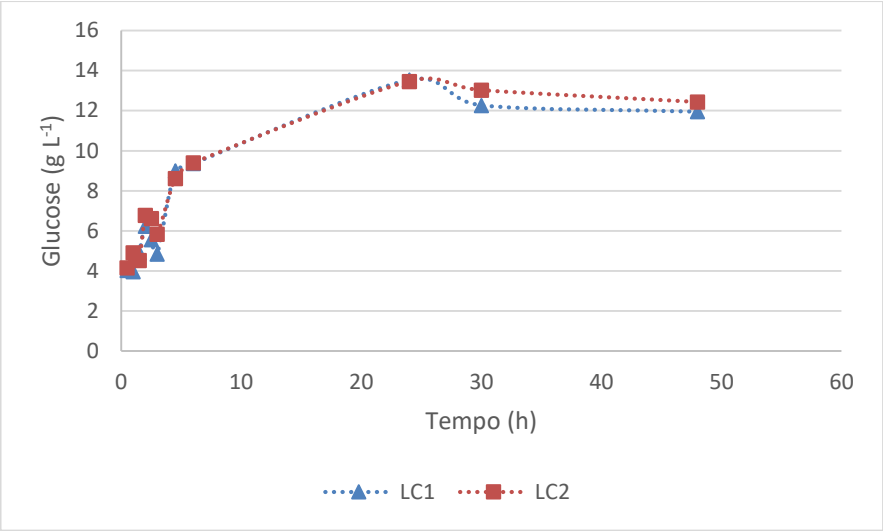


Figura 44 – Perfis de concentração de glucose de todas as réplicas do ensaio de hidrólise enzimática de lamas compostas com uma massa de suspensão total de 250 g e agitação orbital.

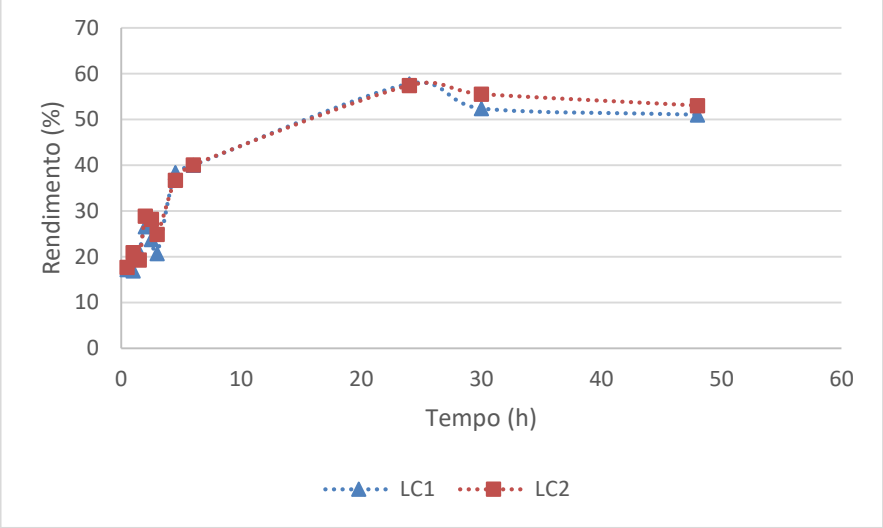


Figura 45 – Perfis de rendimento teórico de todas as réplicas do ensaio de hidrólise enzimática de lamas compostas com uma massa de suspensão total de 250 g e agitação orbital.

Tabela 39 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de fibra virgem com uma massa de suspensão de 250g e agitação orbital. Réplica 1, massa húmida pesada = 31,80 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,4988	4,447	17,41
1,0	5	0,1197	6,275	24,56
1,5	5	0,1465	6,801	26,62
2,0	5	0,1702	9,251	36,21
2,5	5	0,1758	9,043	35,40
3,0	5	0,1930	7,883	30,86
4,5	5	0,2281	11,217	43,90
6,0	5	0,2467	12,671	49,60
24,0	5	0,3811	19,217	75,22
30,0	5	0,3706	18,183	71,17
48,0	5	0,3803	18,831	73,71

Tabela 40 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de fibra virgem com uma massa de suspensão de 250g e agitação orbital. Réplica 2, massa húmida pesada = 31,87 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,5330	4,778	18,66
1,0	5	0,1388	7,197	28,11
1,5	5	0,1659	7,738	30,22
2,0	5	0,1632	8,912	34,81
2,5	5	0,1856	9,516	37,17
3,0	5	0,2306	9,700	37,88
4,5	5	0,2094	10,313	40,28
6,0	5	0,2614	13,381	52,26
24,0	5	0,4196	21,077	82,32
30,0	5	0,4270	20,908	81,66
48,0	5	0,4707	23,198	90,60

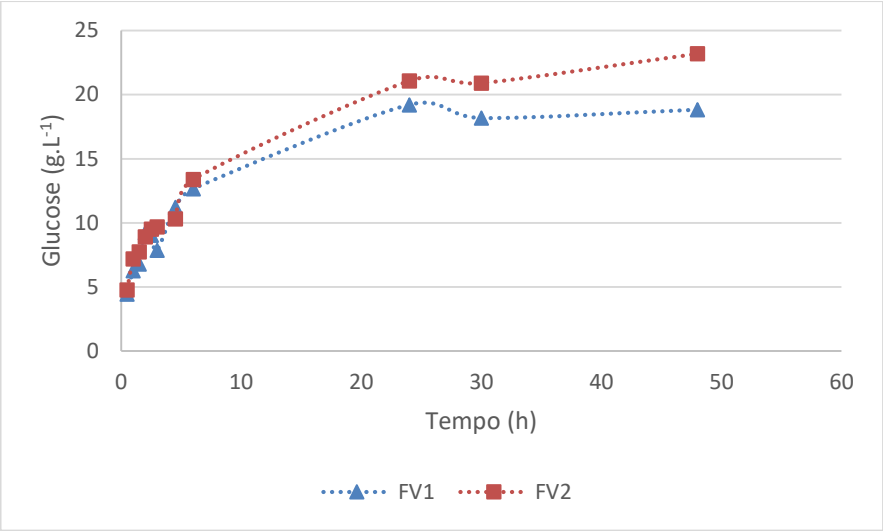


Figura 46 – Perfis de concentração de glucose de todas as réplicas do ensaio de hidrólise enzimática de fibra virgem com uma massa de suspensão total de 250 g e agitação orbital.

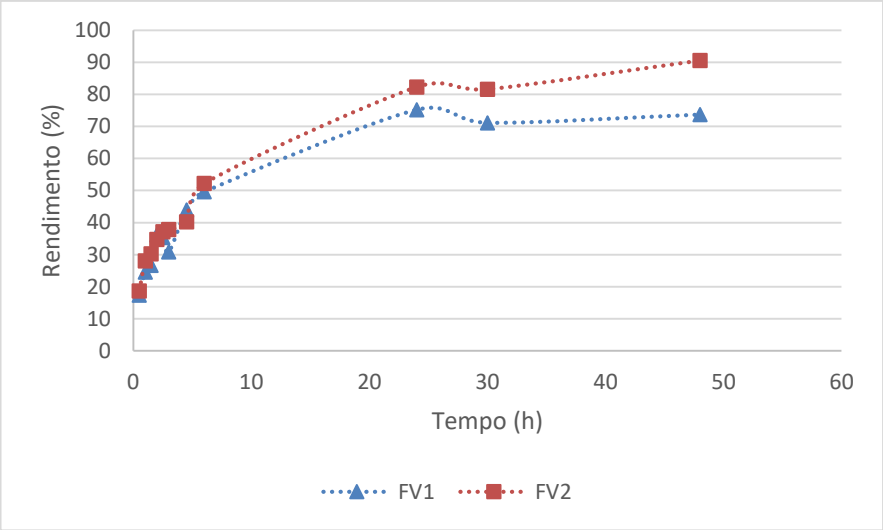


Figura 47 – Perfis de rendimento teórico de todas as réplicas do ensaio de hidrólise enzimática de fibra virgem com uma massa de suspensão total de 250 g e agitação orbital.

Ensaio 3:

Tabela 41 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas com uma massa de suspensão de 250g e agitação mecânica. Massa húmida pesada = 25,22 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,6036	5,460	23,34
1,0	5	0,1112	5,864	25,06
1,5	5	0,1124	5,154	22,03
2,0	5	0,1649	8,994	38,45
2,5	5	0,1480	7,700	32,91
3,0	5	0,1842	7,458	31,88
4,5	5	0,1818	8,980	38,38
6,0	5	0,1921	10,033	42,88
24,0	5	0,2335	12,086	51,66
30,0	5	0,2915	14,362	61,39
48,0	5	0,2729	13,642	58,31

Tabela 42 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de fibra virgem com uma massa de suspensão de 250g e agitação mecânica. Massa húmida pesada = 31,73 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,5786	5,218	20,47
1,0	5	0,1306	6,801	26,68
1,5	5	0,1423	6,598	25,88
2,0	5	0,1871	10,067	39,49
2,5	5	0,1668	8,608	33,77
3,0	5	0,2644	11,333	44,46
4,5	5	0,2434	11,956	46,90
6,0	5	0,2729	13,937	54,67
24,0	5	0,4232	21,251	83,36
30,0	5	0,4526	22,145	86,87
48,0	5	0,4991	24,570	96,38

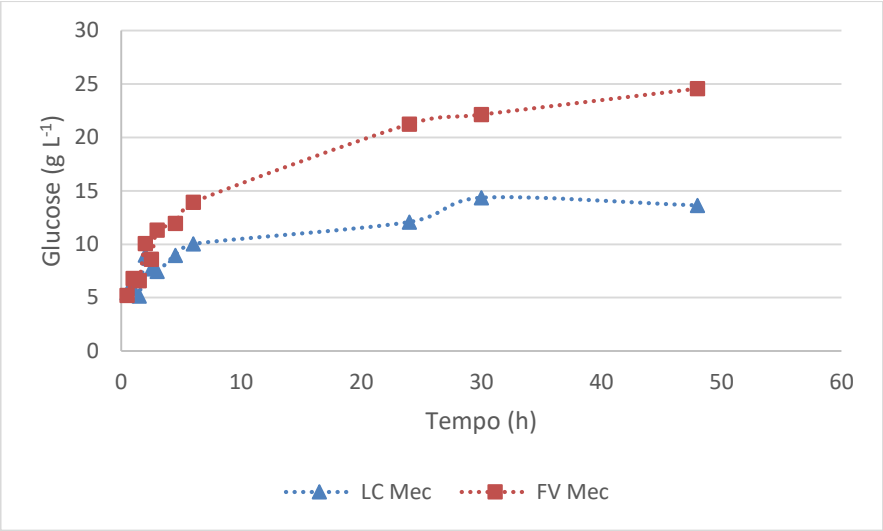


Figura 48 – Perfis de concentração de glucose do ensaio de hidrólise enzimática para ambas as matérias-primas com uma massa de suspensão total de 250 g e agitação mecânica.

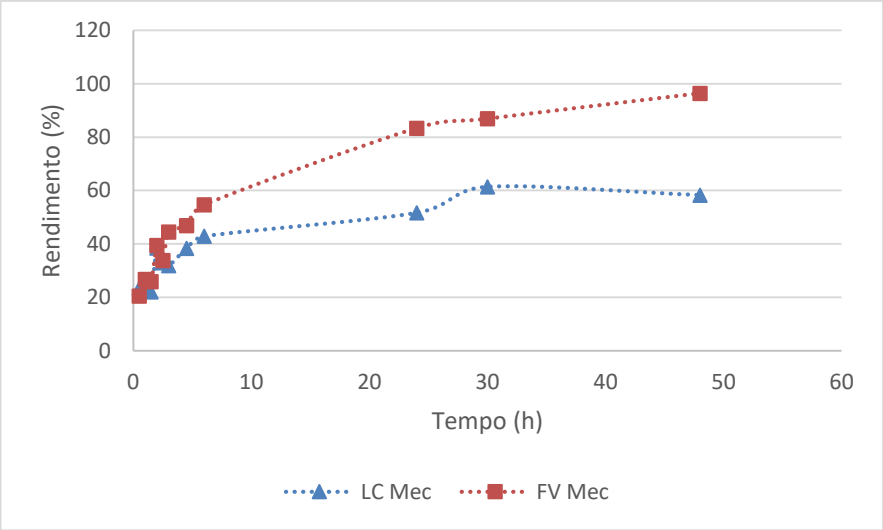


Figura 49 – Perfis de rendimento teórico do ensaio de hidrólise enzimática para ambas as matérias-primas com uma massa de suspensão total de 250 g e agitação mecânica.

Ensaio 4:

Tabela 43 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas com uma massa de suspensão de 250g e agitação magnética. Réplica 1, massa húmida pesada = 25,23 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,4688	4,157	17,76
1,0	5	0,0915	4,912	20,99
1,5	5	0,0993	4,521	19,32
2,0	5	0,1191	6,782	28,98
2,5	5	0,1256	6,618	28,27
3,0	5	0,1506	5,835	24,93
4,5	5	0,1743	8,618	36,82
6,0	5	0,1789	9,395	40,14
24,0	5	0,2621	13,468	57,54
30,0	5	0,2638	13,024	55,65

Tabela 44 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas com uma massa de suspensão de 250g e agitação magnética. Réplica 2, massa húmida pesada = 25,25 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,6036	5,460	23,31
1,0	5	0,1112	5,864	25,03
1,5	5	0,1124	5,154	22,00
2,0	5	0,1649	8,994	38,40
2,5	5	0,1480	7,700	32,87
3,0	5	0,1842	7,458	31,84
4,5	5	0,1818	8,980	38,34
6,0	5	0,1921	10,033	42,83
24,0	5	0,2335	12,086	51,60
30,0	5	0,2915	14,362	61,31

Tabela 45 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de fibra virgem com uma massa de suspensão de 250g e agitação magnética. Massa húmida pesada = 31,80 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,6818	6,215	24,33
1,0	5	0,1600	8,222	32,18
1,5	5	0,2651	12,531	49,05
2,0	5	0,2422	12,729	49,82
2,5	5	0,2427	12,275	48,05
3,0	5	0,2459	10,439	40,86
4,5	5	0,2457	12,067	47,23
6,0	5	0,3256	16,483	64,52
24,0	5	0,4375	21,942	85,89
30,0	5	0,4465	21,850	85,53

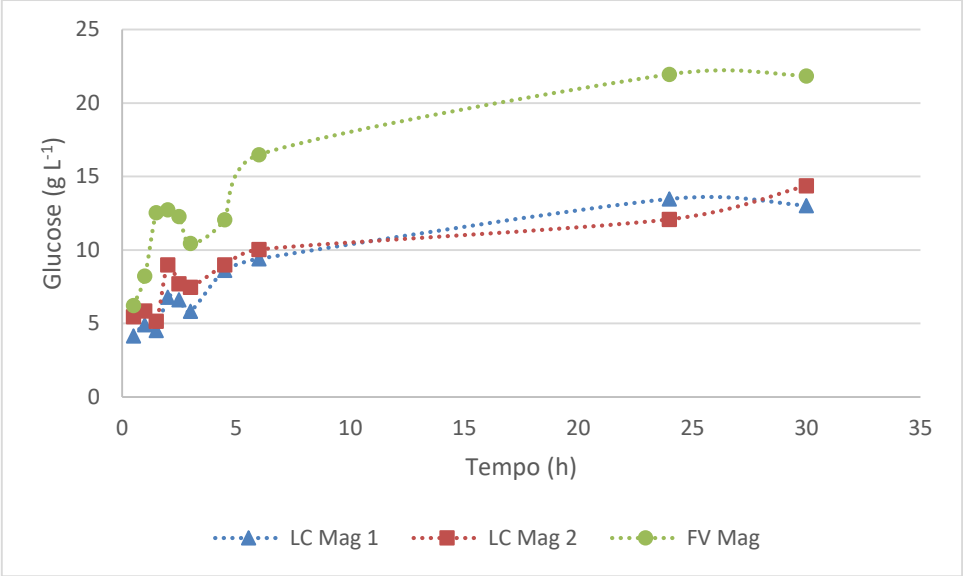


Figura 50 – Perfis de concentração de glucose do ensaio de hidrólise enzimática para ambas as matérias-primas com uma massa de suspensão total de 250 g e agitação magnética.

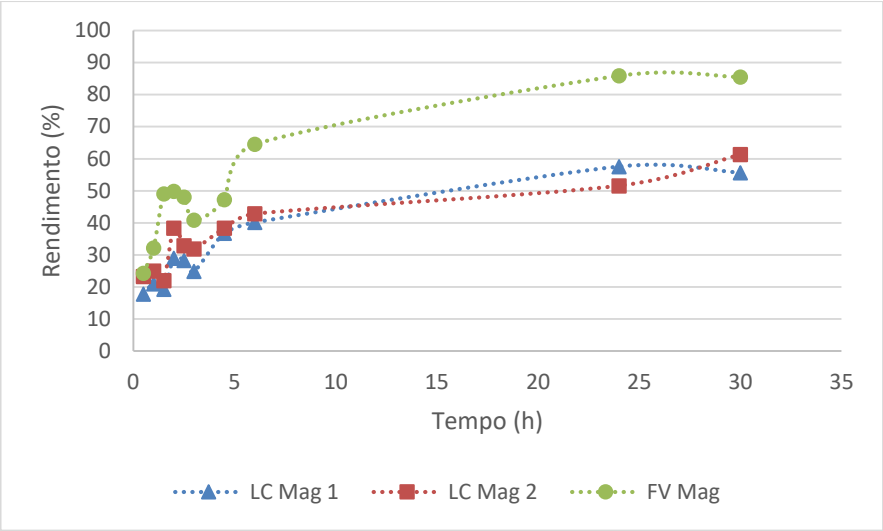


Figura 51 – Perfis de rendimento teórico do ensaio de hidrólise enzimática para ambas as matérias-primas com uma massa de suspensão total de 250 g e agitação magnética.

Ensaio 5:

Tabela 46 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a extração com diclorometano. Réplica 1, massa húmida pesada = 10,46 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,3502	2,965	10,69
1,0	5	0,0629	3,705	13,36
1,5	5	0,1091	5,117	18,45
2,0	5	0,1150	6,650	23,98
2,5	5	0,1253	6,669	24,05
3,0	5	0,0786	2,572	9,28
4,5	5	0,0814	4,283	15,44
6,0	5	0,0802	4,763	17,17
24,0	5	0,1498	8,057	29,05
30,0	5	0,1626	8,146	29,37
48,0	5	0,1593	8,164	29,44

Tabela 47 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a extração com diclorometano. Réplica 2, massa húmida pesada = 9,89 g..

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,3552	3,011	12,89
1,0	5	0,0618	3,654	15,64
1,5	5	0,1128	5,289	22,64
2,0	5	0,1037	6,123	26,21
2,5	5	0,1189	6,370	27,27
3,0	5	0,0655	1,962	8,40
4,5	5	0,0916	4,758	20,37
6,0	5	0,0787	4,693	20,09
24,0	5	0,2638	13,369	57,23
30,0	5	0,2887	14,022	60,03
48,0	5	0,3069	15,042	64,40

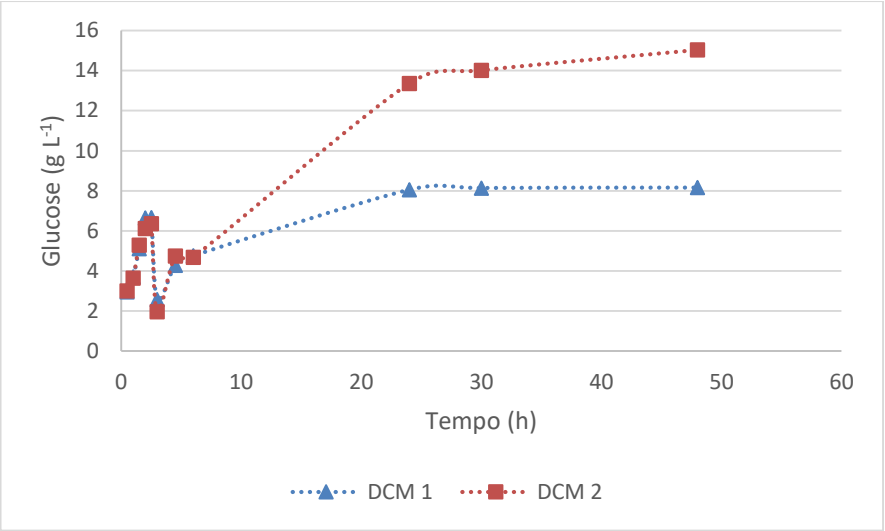


Figura 52 – Perfis de concentração de glucose do ensaio de hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a extração com diclorometano.

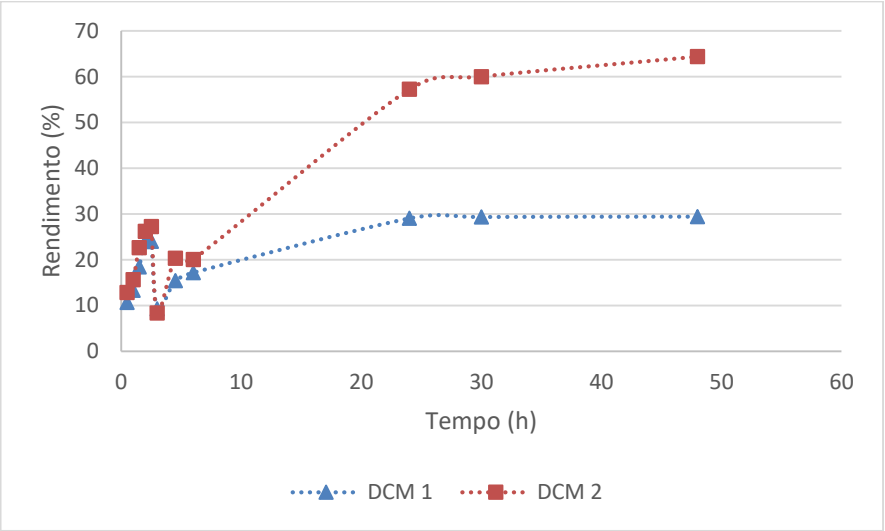


Figura 53 – Perfis de rendimento teórico do ensaio de hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a extração com diclorometano

Tabela 48 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a extração com acetona. Réplica 1, massa húmida pesada = 10,92 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,2360	1,900	6,84
1,0	5	0,0450	2,871	10,34
1,5	5	0,0852	4,003	14,41
2,0	5	0,0777	4,912	17,69
2,5	5	0,0879	4,926	17,74
3,0	5	0,0446	0,988	3,56
4,5	5	0,0516	2,894	10,42
6,0	5	0,0726	4,408	15,87
24,0	5	0,0655	4,129	14,87
30,0	5	0,0629	3,500	12,60
48,0	5	0,0649	3,765	13,56

Tabela 49 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a extração com acetona. Réplica 2, massa húmida pesada = 9,88 g..

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,3427	2,895	12,40
1,0	5	0,0597	3,556	15,24
1,5	5	0,0915	4,297	18,41
2,0	5	0,0889	5,434	23,28
2,5	5	0,1070	5,816	24,92
3,0	5	0,0784	2,563	10,98
4,5	5	0,0773	4,092	17,53
6,0	5	0,0848	4,977	21,33
24,0	5	0,0945	5,480	23,48
30,0	5	0,0981	5,140	22,03
48,0	5	0,0806	4,497	19,27

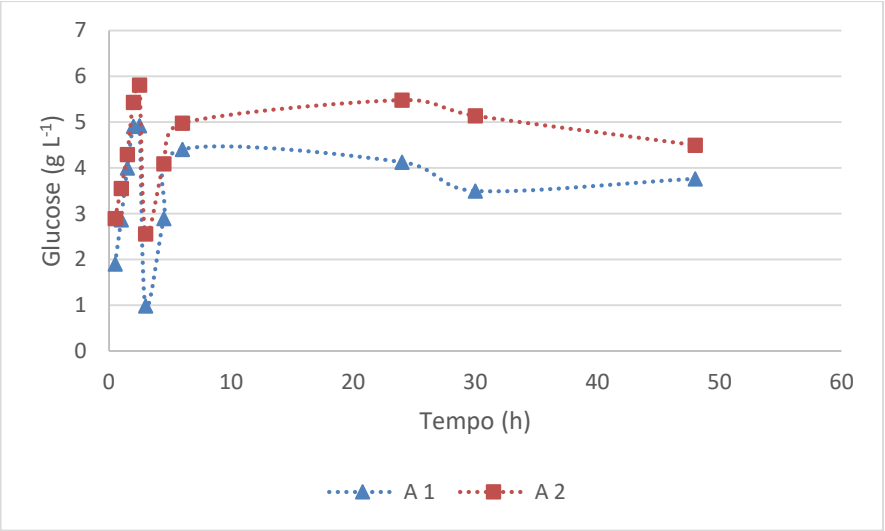


Figura 54 – Perfis de concentração de glucose do ensaio de hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a extração com acetona.

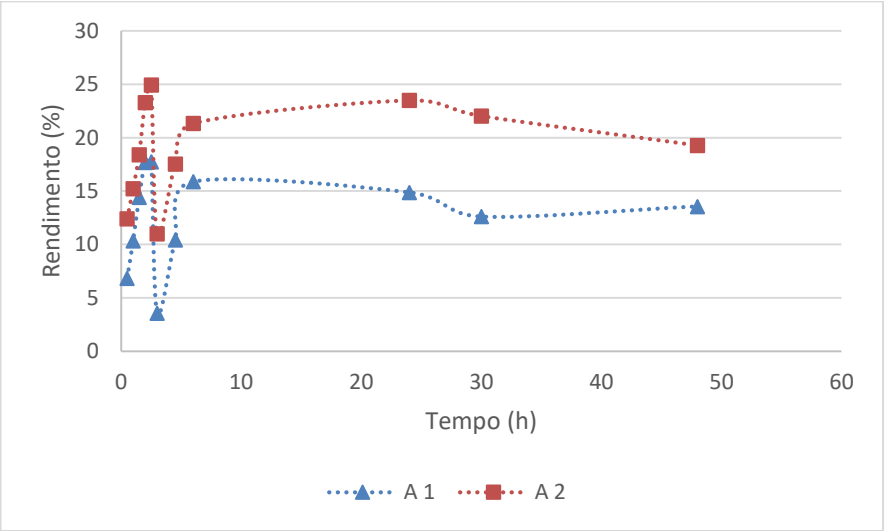


Figura 55 – Perfis de rendimento teórico do ensaio de hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a extração com acetona.

Tabela 50 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a tratamento alcalino com adição de fosfato de sódio. Massa húmida pesada = 15,09 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,2781	2,293	9,82
1,0	5	0,0396	2,619	11,22
1,5	5	0,0664	3,127	13,40
2,0	5	0,0845	5,229	22,40
2,5	5	0,0818	4,641	19,89
3,0	5	0,0825	2,754	11,80
4,5	5	0,0799	4,213	18,05
6,0	5	0,0871	5,084	21,78
24,0	5	0,1007	5,769	24,72
30,0	5	0,0949	4,991	21,38
48,0	5	0,0528	3,202	13,72

Tabela 51 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a tratamento alcalino com adição de fosfato de sódio. Massa húmida pesada = 13,08 g..

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,4762	4,139	16,15
1,0	5	0,0933	5,121	19,99
1,5	5	0,1474	6,902	26,94
2,0	5	0,1480	8,188	31,96
2,5	5	0,1638	8,463	33,03
3,0	5	0,0992	3,532	13,79
4,5	5	0,1673	8,286	32,34
6,0	5	0,1458	7,820	30,52
24,0	5	0,3761	18,603	72,61
30,0	5	0,4312	20,662	80,65
48,0	5	0,4477	21,604	84,32

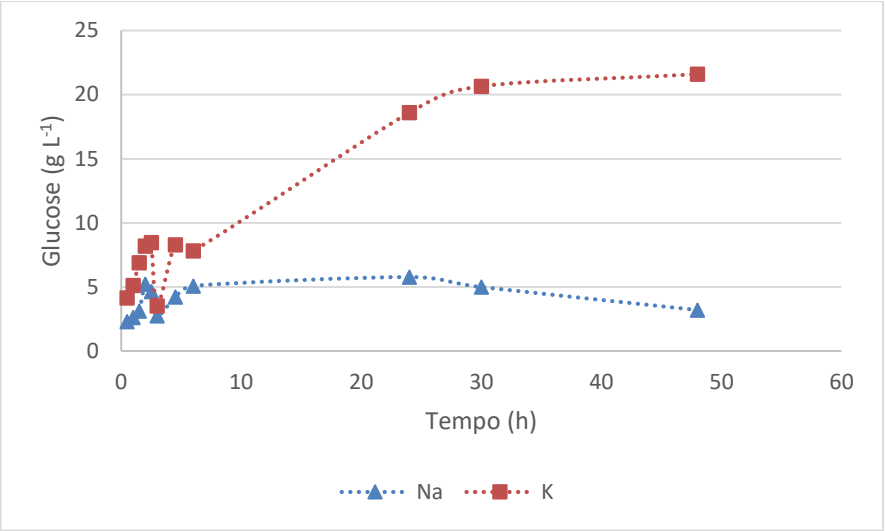


Figura 56 – Perfis de concentração de glucose do ensaio de hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a tratamento alcalino com adição de fosfato de sódio (Na) e fosfato de potássio (K).

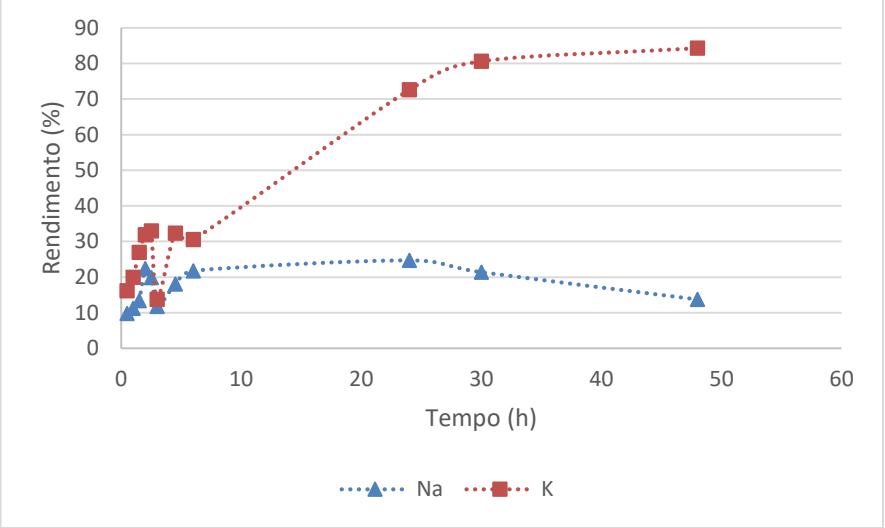


Figura 57 – Perfis de rendimento teórico do ensaio de hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a tratamento alcalino com adição de fosfato de sódio (Na) e fosfato de potássio (K).

Ensaio 6:

Tabela 52 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a tratamento alcalino com adição de fosfato de potássio. Réplica 1, massa húmida pesada = 11,93 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,3539	2,999	12,55
1,0	5	0,0919	5,056	21,17
1,5	5	0,1133	5,312	22,24
2,0	5	0,1287	7,288	30,51
2,5	5	0,1391	7,312	30,61
3,0	5	0,1395	5,410	22,65
4,5	5	0,1986	9,744	40,79
6,0	5	0,2507	12,708	53,20
24,0	5	0,3930	19,792	82,85
30,0	5	0,3299	16,217	67,89
48,0	5	0,4209	20,792	87,04

Tabela 53 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a tratamento alcalino com adição de fosfato de potássio. Réplica 2, massa húmida pesada = 11,93 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
0,5	1	0,3334	2,808	11,76
1,0	5	0,0801	4,506	18,86
1,5	5	0,1120	5,252	21,99
2,0	5	0,1446	8,029	33,61
2,5	5	0,1306	6,915	28,95
3,0	5	0,1708	6,869	28,75
4,5	5	0,1763	8,705	36,44
6,0	5	0,2103	10,825	45,32
24,0	5	0,3841	19,362	81,05
30,0	5	0,3598	17,661	73,93
48,0	5	0,3922	19,406	81,23

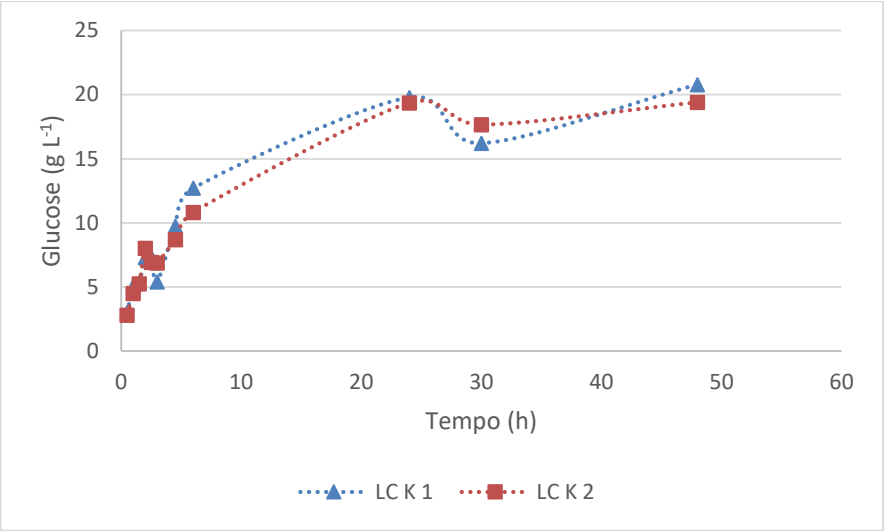


Figura 58 – Perfis de concentração de glucose do ensaio de hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a tratamento alcalino com adição de fosfato de potássio.

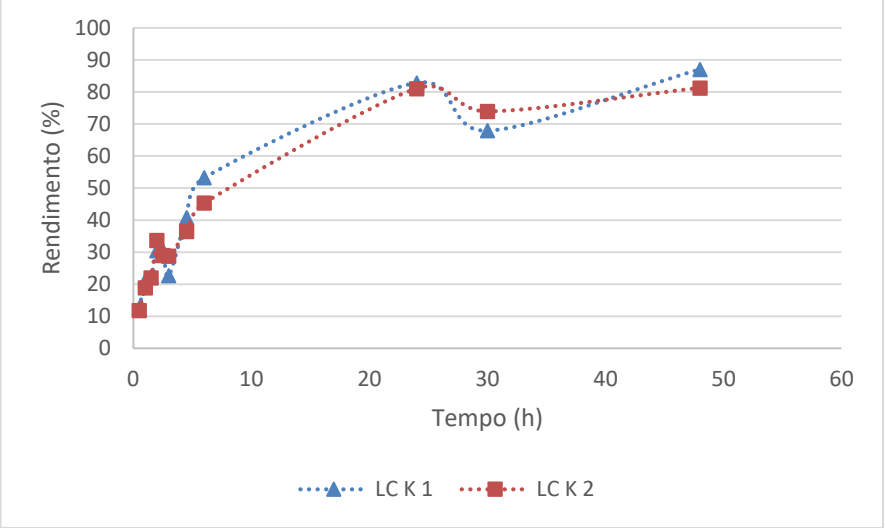


Figura 59 – Perfis de rendimento teórico do ensaio de hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a tratamento alcalino com adição de fosfato de potássio.

Ensaio 7:

Tabela 54 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a tratamento alcalino com adição de fosfato de potássio para uma consistência de 6% e com massa total de suspensão de 100 g. Réplica 1, massa húmida pesada = 34,86 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
24	10	0,0324	3,400	8,16
30	20	0,0519	5,590	13,42
48	20	0,0493	9,873	23,70
54	20	0,0109	6,211	14,91
72	20	0,0053	5,296	12,72

Tabela 55 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a tratamento alcalino com adição de fosfato de potássio para uma consistência de 6% e com massa total de suspensão de 100 g. Réplica 2, massa húmida pesada = 34,84 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
24	10	0,0508	4,904	11,78
30	20	0,0614	6,366	15,29
48	20	0,0614	11,850	28,47
54	20	0,0560	13,583	32,63
72	20	0,0072	5,607	13,47

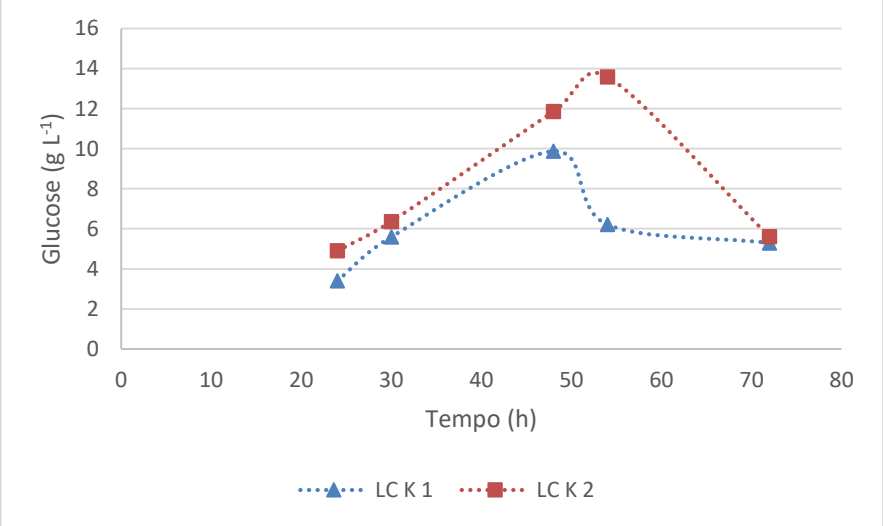


Figura 60 – Perfis de concentração de glucose do ensaio de hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a tratamento alcalino com adição de fosfato de potássio para uma consistência de 6% e com massa total de suspensão de 100 g.

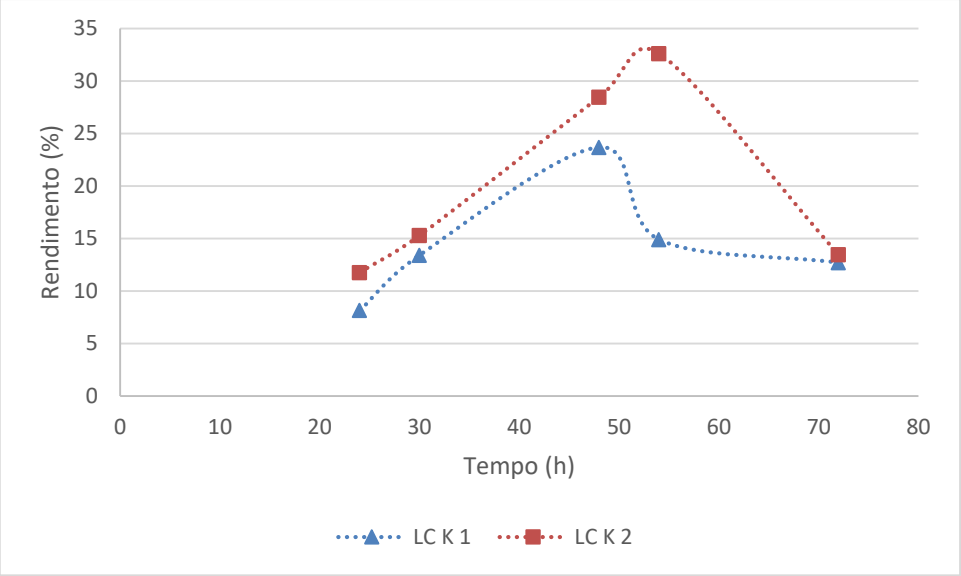


Figura 61 – Perfis de rendimento teórico do ensaio de hidrólise enzimática de lamas compostas sujeitas a tratamento alcalino com adição de fosfato de potássio para uma consistência de 6% e com massa total de suspensão de 100 g.

Tabela 56 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática de fibra virgem para uma consistência de 6% e com massa total de suspensão de 100 g. Réplica 1, massa húmida pesada = 17,50 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
24	10	0,3302	29,199	56,58
30	20	0,2274	41,351	80,13
48	20	0,2498	45,045	87,29
54	20	0,2728	48,461	93,91
72	20	0,2494	41,760	80,92

Tabela 57 – Dados obtidos para a hidrólise enzimática fibra virgem para uma consistência de 6% e com massa total de suspensão de 100 g. Réplica 2, massa húmida pesada = 17,42 g.

tempo (h)	Diluição	DO (540 nm)	[Eqs glucose] (g/L)	Rendimento (%)
24	10	0,3851	33,685	65,35
30	20	0,2284	41,515	80,54
48	20	0,2522	45,437	88,15
54	20	0,2751	48,837	94,75
72	20	0,2525	42,266	82,00

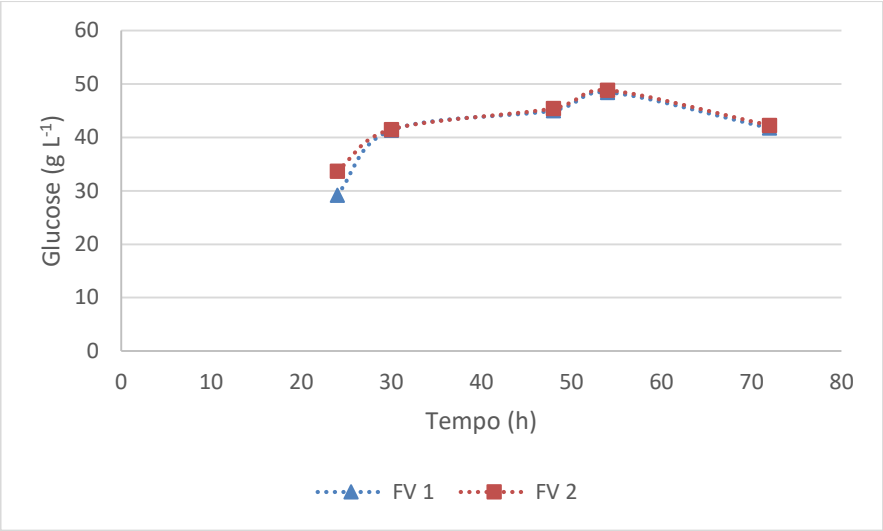


Figura 62 – Perfis de concentração de glucose do ensaio de hidrólise enzimática de fibra virgem para uma consistência de 6% e massa de suspensão de 100 g.

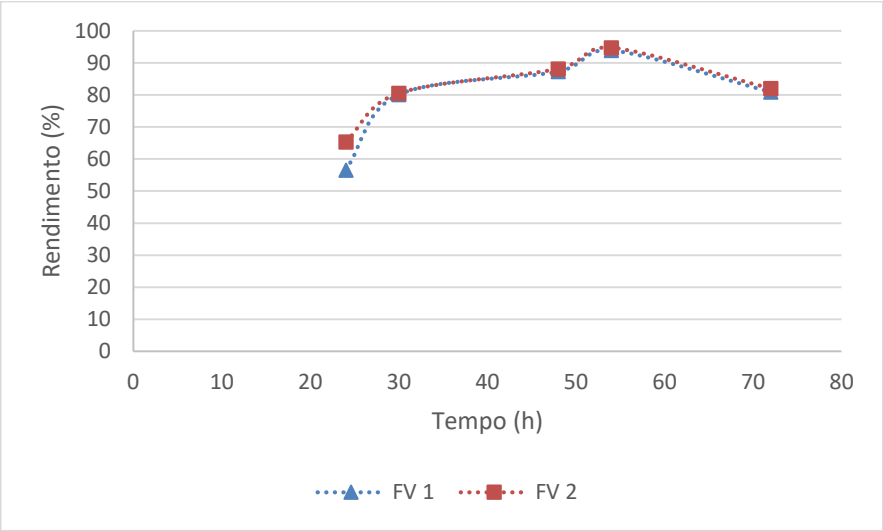


Figura 63 – Perfis de rendimento teórico do ensaio de hidrólise enzimática de fibra virgem para uma consistência de 6% e massa de suspensão de 100 g.

Anexo H – Ensaios de SSF realizados

Tabela 58 – Dados auxiliares para cada amostra com massa de suspensão total de 100 g, carga enzimática de 15 FPU/g de hidrato de carbono e carga inicial de hidratos de carbono de 2,5%.

Amostra	HC (g)	$m_{húmida}$ (g)	V_{Enzima} (mL)	$V_{inóculo}$ (mL)	$V_{nutrientes}$ (mL)	$V_{tampão}$ (mL)	Consistência (%)	$M_{suspensão}$ (g)
Lamas compostas	2,5	10,08	0,616	10	2	89,30	3,44	100
Fibra virgem lavada	2,5	12,69	0,616	10	2	86,69	2,97	100
Lamas tratadas KH_2PO_4	2,5	17,61	0,616	10	2	81,77	3,03	100

Tabela 59 – Dados auxiliares para cada amostra com massa de suspensão total de 250 g, carga enzimática de 15 FPU/g de hidrato de carbono e carga inicial de hidratos de carbono de 2,5%.

Amostra	HC (g)	$m_{húmida}$ (g)	V_{Enzima} (mL)	$V_{inóculo}$ (mL)	$V_{nutrientes}$ (mL)	$V_{tampão}$ (mL)	Consistência (%)	$M_{suspensão}$ (g)
Lamas compostas	6,25	25,20	1,539	25	5	223,26	3,44	250
Fibra virgem lavada	6,25	31,73	1,539	25	5	216,73	2,97	250
Lamas tratadas KH_2PO_4	6,25	44,03	1,539	25	5	204,43	3,03	250

Tabela 60 – Dados auxiliares para cada amostra com massa de suspensão total de 100 g, carga enzimática de 10 FPU/g de hidrato de carbono e carga inicial de hidratos de carbono de 2,5%.

Amostra	HC (g)	$m_{húmida}$ (g)	V_{Enzima} (mL)	$V_{inóculo}$ (mL)	$V_{nutrientes}$ (mL)	$V_{tampão}$ (mL)	Consistência (%)	$M_{suspensão}$ (g)
Lamas compostas	2,5	10,08	0,493	10	2	90,73	3,44	100
Fibra virgem lavada	2,5	12,69	0,493	10	2	86,68	2,97	100
Lamas tratadas KH_2PO_4	2,5	17,61	0,493	10	2	89,57	3,03	100

Tabela 61 – Dados auxiliares para cada amostra com massa de suspensão total de 250 g, carga enzimática de 10 FPU/g de hidrato de carbono e carga inicial de hidratos de carbono de 2,5%.

Amostra	HC (g)	$m_{húmida}$ (g)	V_{Enzima} (mL)	$V_{inóculo}$ (mL)	$V_{nutrientes}$ (mL)	$V_{tampão}$ (mL)	Consistência (%)	$M_{suspensão}$ (g)
Lamas compostas	6,25	25,20	1,026	25	5	223,77	3,44	250
Fibra virgem lavada	6,25	31,73	1,026	25	5	217,24	2,97	250
Lamas tratadas KH_2PO_4	6,25	44,03	1,026	25	5	204,94	3,03	250

Tabela 62 – Dados auxiliares para cada amostra com massa de suspensão total de 100 g, carga enzimática de 15 FPU/g de hidrato de carbono e consistência de 6%.

Amostra	$m_{húmida}$ (g)	V_{Enzima} (mL)	$V_{inóculo}$ (mL)	$V_{nutrientes}$ (mL)	$V_{tampão}$ (mL)	HC (%)	$M_{suspensão}$ (g)
Lamas compostas	17,56	1,073	10	2	81,37	4,35	100
Fibra virgem lavada	25,65	1,244	10	2	73,10	5,05	100
Lamas tratadas KH_2PO_4	19,87	1,218	10	2	78,91	4,95	100

Tabela 63 – Dados auxiliares para cada amostra com massa de suspensão total de 100 g, carga enzimática de 10 FPU/g de hidrato de carbono e consistência de 6%.

Amostra	$m_{húmida}$ (g)	V_{Enzima} (mL)	$V_{inóculo}$ (mL)	$V_{nutrientes}$ (mL)	$V_{tampão}$ (mL)	HC (%)	$M_{suspensão}$ (g)
Lamas compostas	17,56	0,715	10	2	81,73	4,35	100
Fibra virgem lavada	25,65	0,830	10	2	73,52	5,05	100
Lamas tratadas KH_2PO_4	19,87	0,812	10	2	79,32	4,95	100

Tabela 64 – Parâmetros auxiliares das matérias-primas.

Amostra	Secura (g/g)	CH (g/g)	Celulose (g/g)	Hemiceluloses (g/g)
Lamas compostas	0,3417	0,7258	0,4559	0,1550
Fibra virgem lavada	0,2339	0,8421	0,5898	0,1738
Lamas tratadas KH_2PO_4	0,1722	0,8243	0,4890	0,1354

Ensaio 1:

Tabela 65 – Dados obtidos do ensaio de SSF de lamas compostas com carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 250 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 1, massa húmida pesada = 25,23 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
6	0,470	0,106	1,103	0,871	0,254	0,352	4,262	< l.d.	36,06
24	0,173	0,083	1,151	0,599	0,560	0,251	5,513	0,416	46,65
30	0,060	0,090	1,287	0,422	0,777	0,134	6,111	0,824	51,71
48	< l.d*.	0,026	0,759	0,376	0,943	0,022	5,983	1,382	50,62
54	< l.d.	0,037	0,641	0,373	0,935	0,021	5,700	1,561	48,23

* < l.d. – Inferior ao limite de detecção.

Tabela 66 – Dados obtidos do ensaio de SSF de lamas compostas com carga de hidratos de carbono de 2,5, com massa total de suspensão de 250 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 2, massa húmida pesada = 25,29 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
6	0,050	0,067	0,961	0,723	0,248	0,379	4,576	0,049	38,63
24	< l.d.	0,028	1,108	0,450	0,641	0,227	6,607	0,637	55,77
30	0,025	0,090	1,185	0,399	0,739	0,164	6,651	0,888	56,14
48	< l.d.	0,022	0,651	0,340	0,885	0,047	6,483	1,257	54,73
54	0,006	0,022	0,575	0,424	0,880	0,028	6,419	1,563	54,19

Tabela 67 – Dados obtidos do ensaio de SSF de fibra virgem com carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 250 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 1, massa húmida pesada = 31,76 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
6	9,629	0,238	2,511	0,968	0,141	0,179	2,296	< l.d.	17,82
24	< l.d.	0,270	1,987	0,638	0,225	0,426	10,947	1,607	84,96
30	0,034	0,320	2,008	0,635	0,240	0,356	11,177	2,078	86,75
48	0,092	0,384	1,243	0,620	0,198	0,093	11,944	2,907	92,70
54	0,053	0,398	1,044	0,546	0,180	0,043	11,735	3,130	91,08

Tabela 68 – Dados obtidos do ensaio de SSF de fibra virgem com carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 250 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 2, massa húmida pesada = 31,76 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
6	4,110	0,246	2,248	0,501	0,182	0,295	4,109	< l.d.	31,89
24	< l.d.	0,251	1,768	0,437	0,210	0,284	9,456	1,120	73,39
30	0,126	0,321	1,946	0,517	0,205	0,225	9,805	1,443	76,10
48	0,045	0,343	1,139	0,460	0,160	0,039	10,763	2,655	83,54
54	< l.d.	0,327	1,061	0,435	0,161	0,022	11,408	2,754	88,54

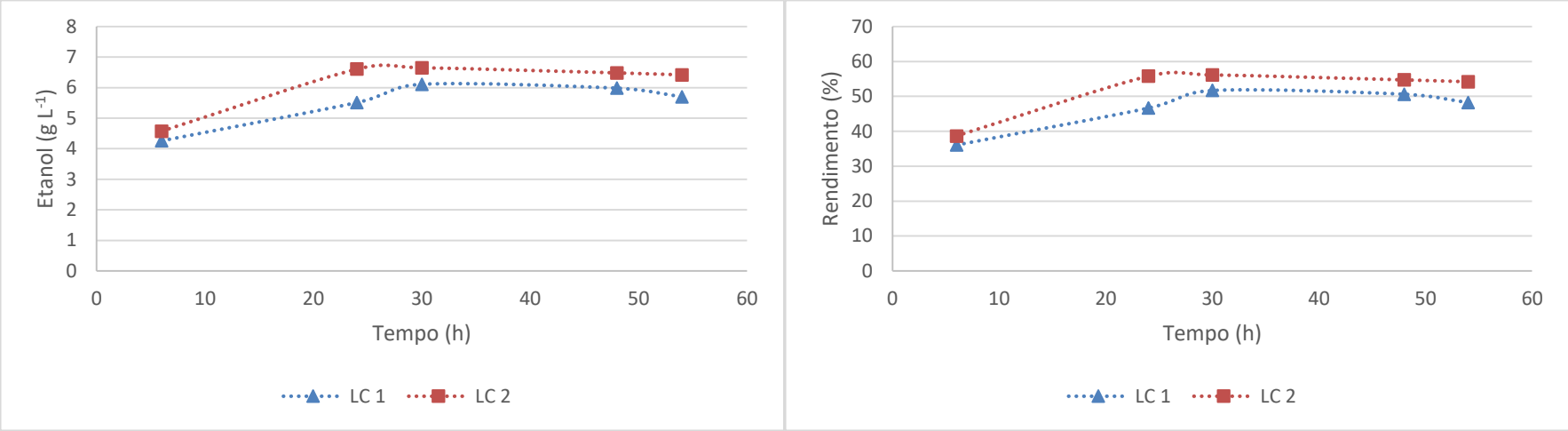


Figura 64 – Perfis de concentração de etanol (esquerda) e de rendimento teórico (direita) do ensaio de SSF de lamas compostas para uma carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 250 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono.

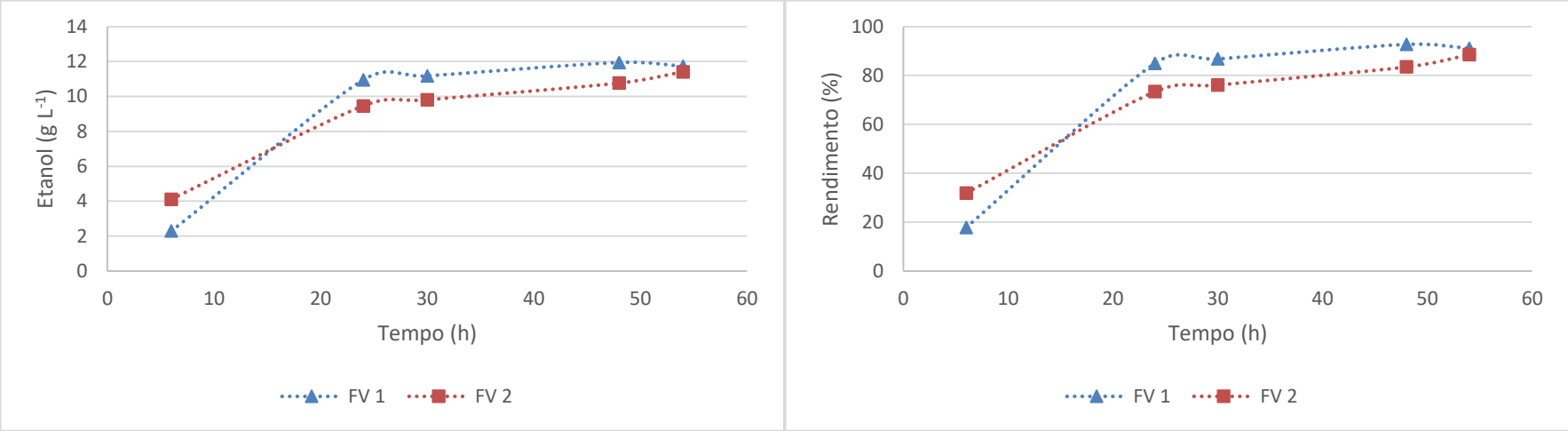


Figura 65 – Perfis de concentração de etanol (esquerda) e de rendimento teórico (direita) do ensaio de SSF de fibra virgem para uma carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 250 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono.

Ensaio 2:

Tabela 69 – Dados obtidos do ensaio de SSF de lamas compostas com carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 250 g e carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 1, massa húmida pesada = 25,25 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
6	0,099	0,079	0,894	0,665	0,309	0,283	4,046	0,065	34,21
24	0,910	0,139	1,087	0,492	0,550	0,189	5,164	0,442	43,66
48	0,189	0,036	0,734	0,332	0,795	0,047	5,212	0,884	44,07
54	0,138	0,094	0,600	0,349	0,753	0,053	3,460	0,933	29,25

Tabela 70 – Dados obtidos do ensaio de SSF de lamas compostas com carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 250 g e carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 2, massa húmida pesada = 25,24 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
6	0,060	0,070	0,764	0,520	0,508	0,138	3,539	0,452	29,93
24	0,065	0,091	1,026	0,390	0,623	0,132	4,901	0,527	41,45
48	0,048	0,148	0,929	0,294	0,967	0,049	5,167	1,097	43,70
54	0,023	0,145	0,782	0,257	1,163	0,033	5,003	1,284	42,32

Tabela 71 – Dados obtidos do ensaio de SSF de fibra virgem com carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 250 g e carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 1, massa húmida pesada = 31,76 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
6	0,387	0,285	2,361	0,748	0,223	0,400	6,157	0,104	47,79
24	0,214	0,269	2,125	0,609	0,199	0,346	7,587	0,719	58,89
48	0,189	0,373	1,465	0,515	0,147	0,174	7,175	2,486	55,69
54	0,138	0,380	1,255	0,527	0,145	0,108	8,555	2,417	66,40

Tabela 72 – Dados obtidos do ensaio de SSF de fibra virgem com carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 250 g e carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 2, massa húmida pesada = 31,74 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
6	0,395	0,261	2,136	0,724	0,198	0,325	6,597	0,592	51,23
24	0,266	0,353	2,152	0,619	0,233	0,374	8,040	0,988	62,44
48	0,181	0,400	1,505	0,536	0,184	0,221	9,557	2,119	74,22
54	0,154	0,401	1,210	0,500	0,160	0,133	10,422	2,505	80,94

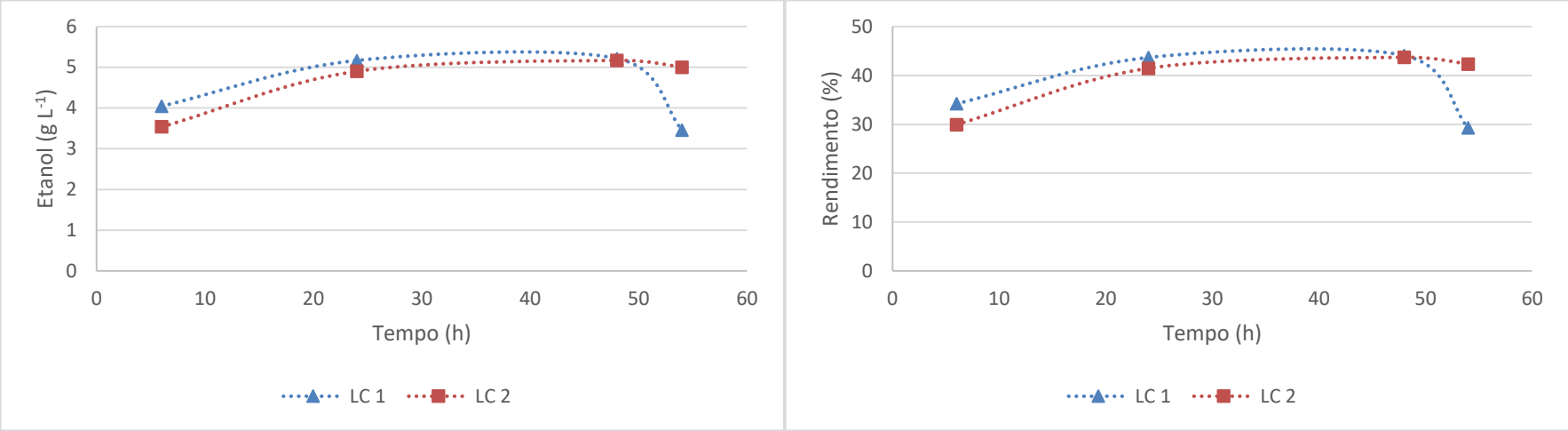


Figura 66 – Perfis de concentração de etanol (esquerda) e de rendimento teórico (direita) do ensaio de SSF de lamas compostas para uma carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 250 g e carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono.

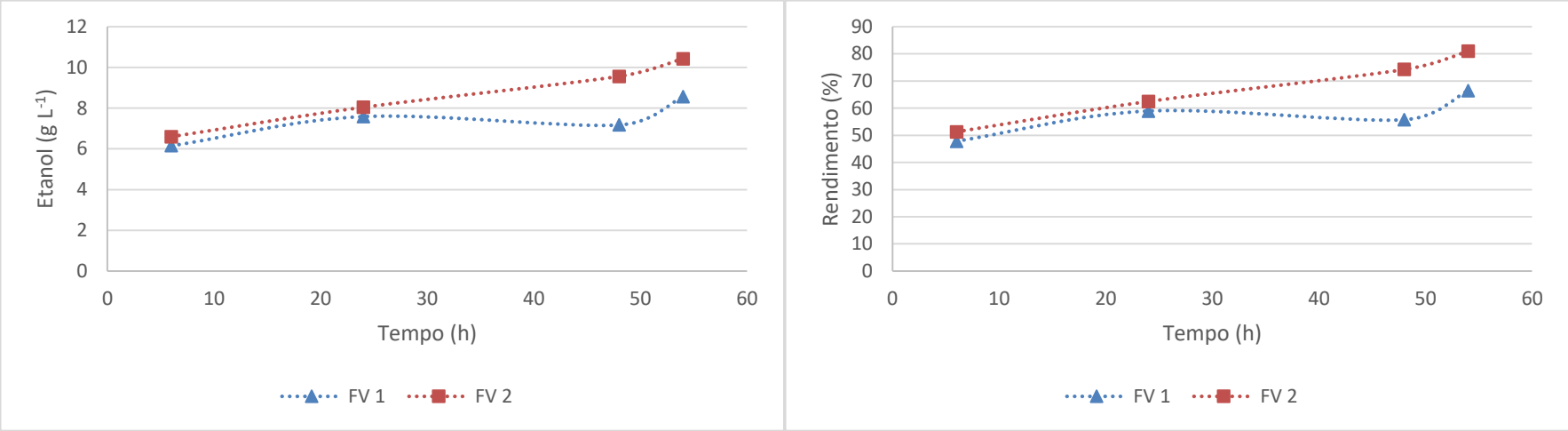


Figura 67 – Perfis de concentração de etanol (esquerda) e de rendimento teórico (direita) do ensaio de SSF de fibra virgem para uma carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 250 g e carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono.

Ensaio 3:

Tabela 73 – Dados obtidos do ensaio de SSF de lamas compostas com tratamento alcalino e adição de fosfato de potássio com carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 1, massa húmida pesada = 11,39 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
6	1,130	0,171	1,794	0,867	0,513	0,167	4,342	0,066	36,03
24	0,151	0,228	1,632	0,436	1,088	0,017	6,991	0,773	58,01
48	0,042	0,242	0,938	0,375	0,923	0,023	6,515	1,647	54,06
72	< l.d.	0,176	0,610	< l.d.	0,827	0,018	5,584	1,915	46,34

Tabela 74 – Dados obtidos do ensaio de SSF de lamas compostas com tratamento alcalino e adição de fosfato de potássio com carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 2, massa húmida pesada = 11,39 g.

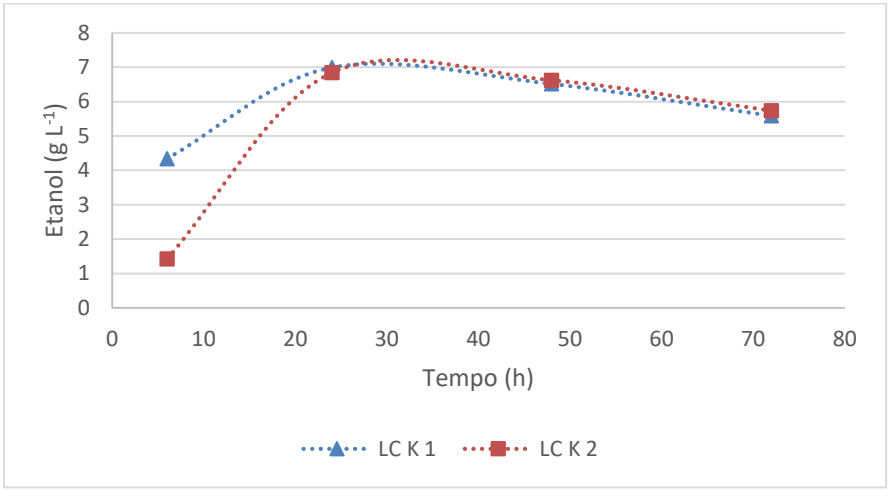
tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
6	7,735	0,190	1,837	1,114	0,525	0,040	1,428	0,069	11,85
24	0,143	0,238	1,855	0,468	1,589	0,018	6,843	0,582	56,78
48	0,046	0,085	1,194	0,394	1,016	0,024	6,624	1,569	54,97
72	0,005	0,225	0,512	0,350	0,312	0,016	5,737	2,245	47,61

Tabela 75 – Dados obtidos do ensaio de SSF de lamas compostas com tratamento alcalino e adição de fosfato de potássio com carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 1, massa húmida pesada = 11,40 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
6	2,709	0,174	1,534	0,761	0,549	0,058	2,743	0,062	22,74
24	0,171	0,222	1,799	0,289	1,311	0,046	6,220	0,607	51,57
48	0,010	0,140	1,069	0,220	0,853	0,014	6,070	1,284	50,32
72	< l.d.	0,123	0,584	0,271	0,296	0,017	5,097	2,051	42,26

Tabela 76 – Dados obtidos do ensaio de SSF de lamas compostas com tratamento alcalino e adição de fosfato de potássio com carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 2, massa húmida pesada = 11,39 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
6	0,382	0,174	1,572	0,621	0,432	0,065	4,567	0,140	37.90
24	0,133	0,105	1,388	0,297	0,705	0,015	6,114	0,836	50.73
48	0,036	0,131	0,710	0,280	0,377	0,015	5,572	1,897	46.24
72	0,040	0,063	0,273	< l.d.	0,521	0,033	4,578	2,555	37.99



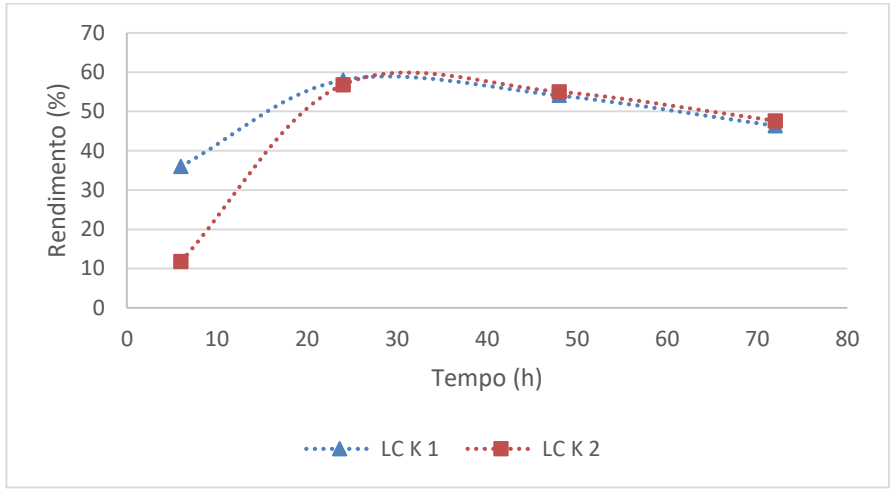
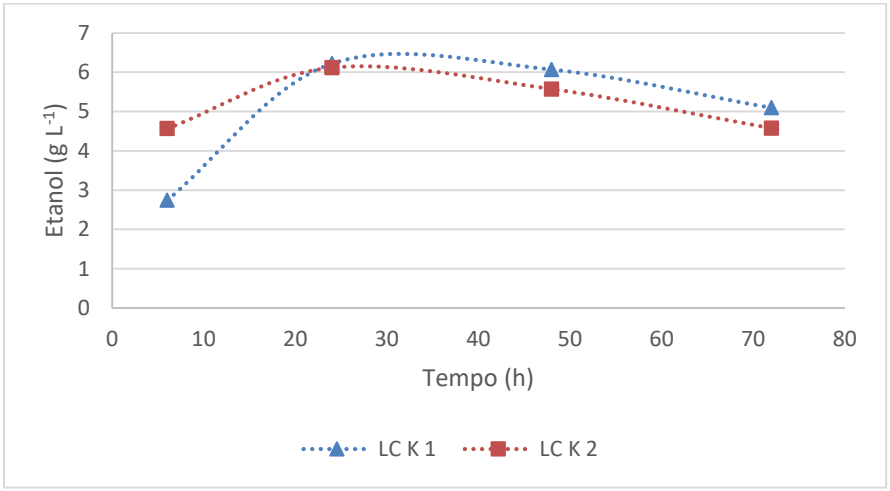


Figura 68 – Perfis de concentração de etanol (esquerda) e de rendimento teórico (direita) do ensaio de SSF de lamas compostas com tratamento alcalino e fosfato de potássio com carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono.



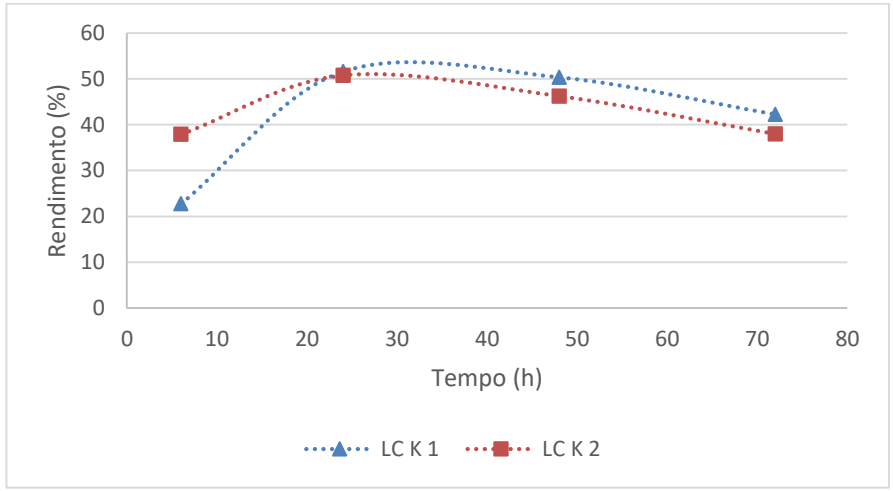


Figura 69 – Perfis de concentração de etanol (esquerda) e de rendimento teórico (direita) do ensaio de SSF de lamas compostas com tratamento alcalino e fosfato de potássio com carga de hidratos de carbono de 2,5%, com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono.

Ensaio 4:

Tabela 77 – Dados obtidos do ensaio de SSF de fibra virgem com consistência de 6%, com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 1, massa húmida pesada = 25,65 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
24	0,235	0,695	4,471	0,848	0,453	1,197	23,463	2,418	90,19
48	0,106	0,746	2,116	1,279	0,606	0,872	25,548	5,617	98,21
54	0,074	0,660	1,177	1,192	0,659	0,658	23,299	7,484	89,56

Tabela 78 – Dados obtidos do ensaio de SSF de fibra virgem com consistência de 6%, com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 2, massa húmida pesada = 25,65 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
24	0,306	0,737	4,497	0,842	0,447	1,400	24,125	2,566	92,74
48	0,170	0,690	1,973	1,331	0,674	1,253	25,384	5,525	97,58
54	0,078	0,551	1,019	1,146	0,692	0,797	24,369	7,197	93,68

Tabela 79 – Dados obtidos do ensaio de SSF de fibra virgem com consistência de 6%, com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 1, massa húmida pesada = 25,65 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
24	0,248	0,658	4,385	0,539	0,355	1,143	20,065	2,283	77,13
48	0,146	0,696	2,279	1,104	0,378	0,655	24,140	5,391	92,80
72	0,105	0,668	1,268	1,035	0,299	0,139	24,782	6,890	95,26

Tabela 80 – Dados obtidos do ensaio de SSF de fibra virgem com consistência de 6%, com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 2, massa húmida pesada = 25,65 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
24	0,268	0,662	4,287	0,590	0,350	1,084	19,891	2,360	76,43
48	0,144	0,663	2,096	1,059	0,343	0,533	22,594	5,177	86,82
72	0,110	0,651	1,204	0,767	0,275	0,166	22,769	6,501	87,49

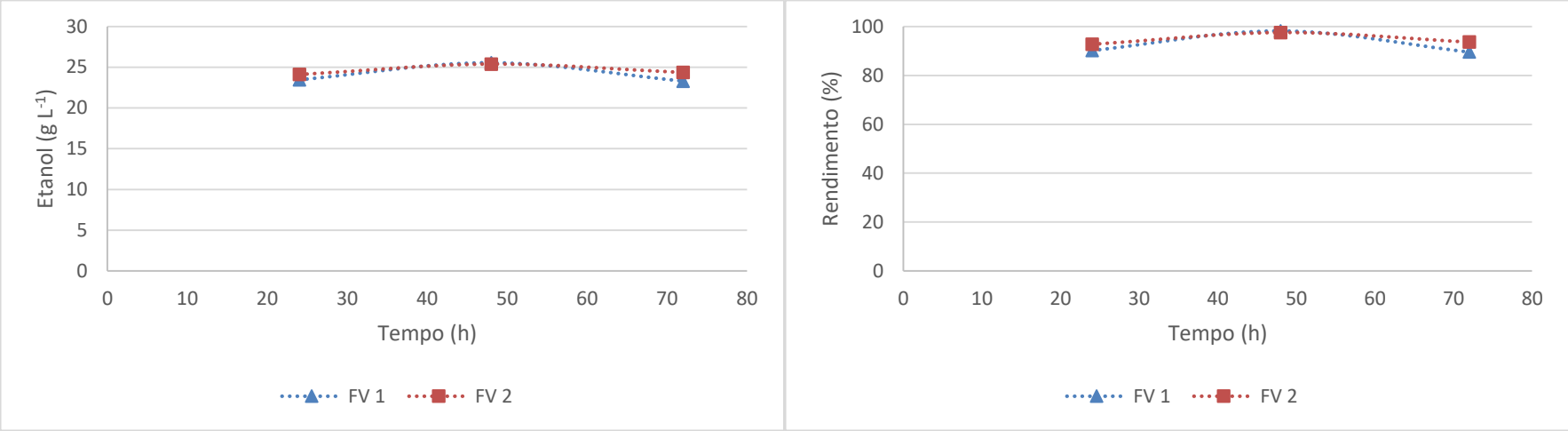


Figura 70 – Perfis de concentração de etanol (esquerda) e de rendimento teórico (direita) do ensaio de SSF de fibra virgem para uma consistência de 6% com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono.

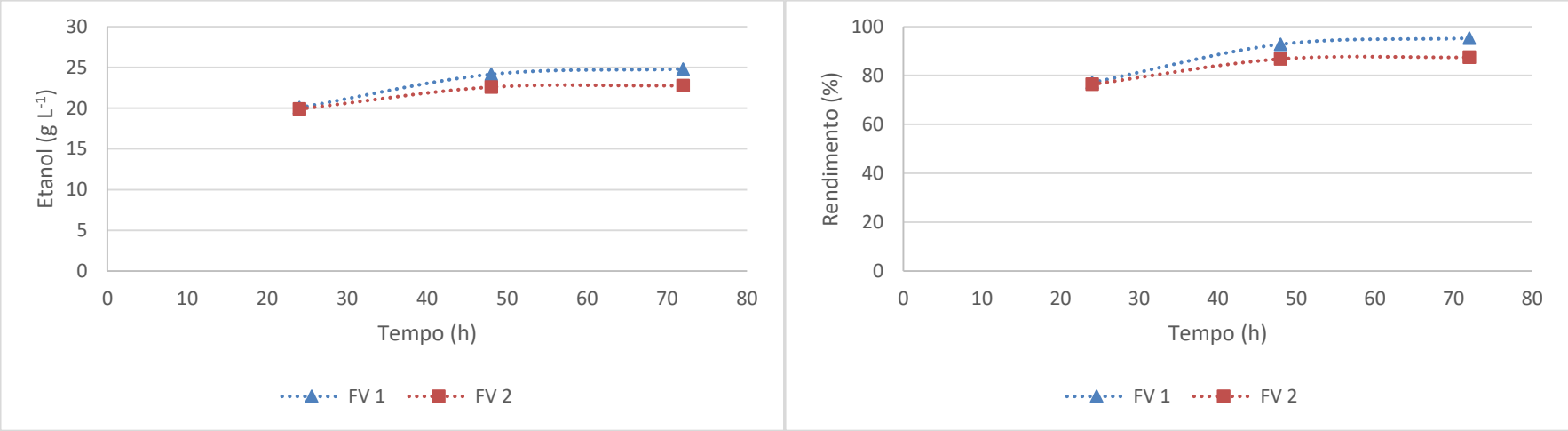


Figura 71 – Perfis de concentração de etanol (esquerda) e de rendimento teórico (direita) do ensaio de SSF de fibra virgem para uma consistência de 6% com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono.

Ensaio 5:

Tabela 81 – Dados obtidos do ensaio de SSF de lamas compostas com tratamento alcalino e adição de fosfato de potássio com consistência de 6%, com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 1, massa húmida pesada = 20,27 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
24	0,177	0,262	2,315	0,992	1,360	0,875	11,974	2,293	56,96
48	0,051	0,294	1,074	0,937	2,210	0,746	11,471	3,716	54,57
72	< l.d.	0,244	0,629	0,914	1,898	0,521	11,095	4,255	52,78

Tabela 82 – Dados obtidos do ensaio de SSF de lamas compostas com tratamento alcalino e adição de fosfato de potássio com consistência de 6%, com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 2, massa húmida pesada = 20,27 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
24	0,165	0,285	2,551	1,033	1,762	1,003	11,611	1,319	55,24
48	0,059	0,315	1,594	1,024	3,564	1,027	11,635	3,166	55,35
72	0,056	0,283	1,411	0,951	3,632	0,904	11,740	3,354	55,85

Tabela 83 – Dados obtidos do ensaio de SSF de lamas compostas com tratamento alcalino e adição de fosfato de potássio com consistência de 6%, com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 1, massa húmida pesada = 20,27 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
24	0,178	0,305	2,823	0,839	1,465	0,893	10,403	1,064	49,49
48	0,061	0,306	1,851	0,877	3,595	0,904	10,675	2,971	50,78
72	0,043	0,329	1,437	0,815	4,113	0,921	10,402	3,444	49,49

Tabela 84 – Dados obtidos do ensaio de SSF de lamas compostas com tratamento alcalino e adição de fosfato de potássio com consistência de 6%, com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono. Réplica 2, massa húmida pesada = 20,27 g.

tempo (h)	Glucose (g/L)	Arabinose (g/L)	Manose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ác acético (g/L)	Glicerol (g/L)	EtOH (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento (%)
24	0,198	0,284	2,565	0,710	1,271	0,671	9,883	1,309	47,02
48	0,080	0,331	1,297	0,688	2,062	0,524	9,663	3,461	45,97
72	0,036	0,231	0,673	0,698	1,351	0,217	9,514	4,306	45,26

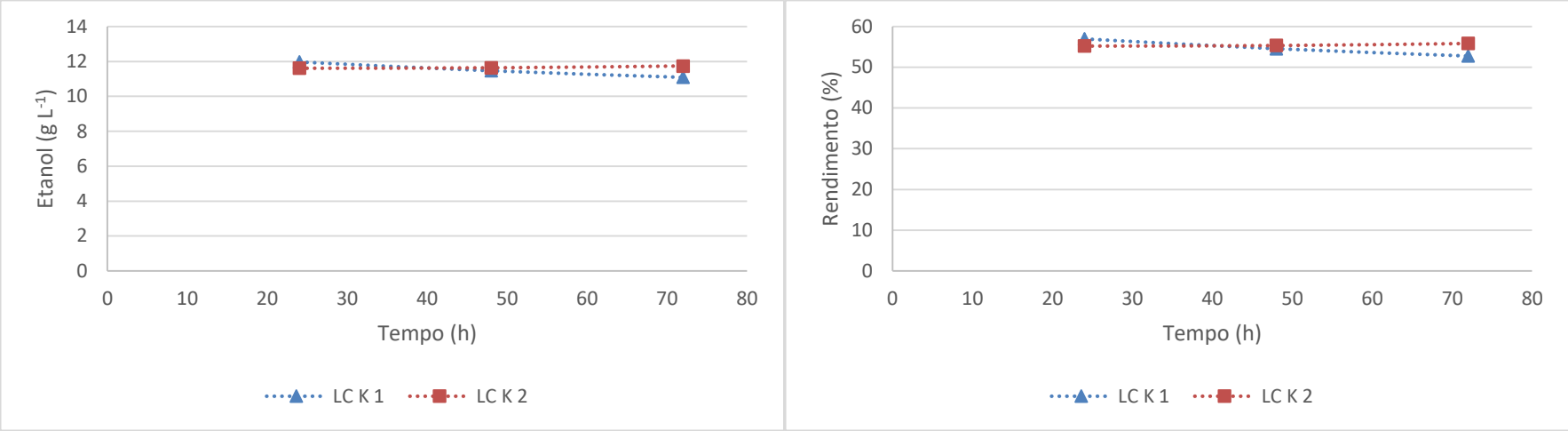


Figura 72 – Perfis de concentração de etanol (esquerda) e de rendimento teórico (direita) do ensaio de SSF de lamas compostas com tratamento alcalino e fosfato de potássio com consistência de 6% com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 15 FPU/g de hidratos de carbono.

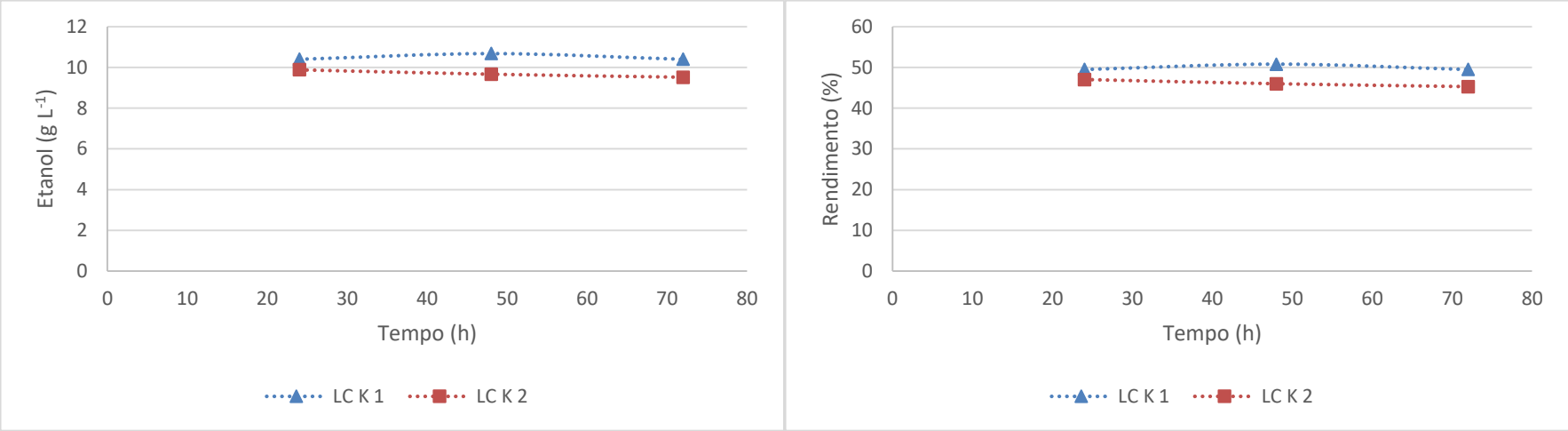


Figura 73 – Perfis de concentração de etanol (esquerda) e de rendimento teórico (direita) do ensaio de SSF de lamas compostas com tratamento alcalino e fosfato de potássio com consistência de 6% com massa total de suspensão de 100 g e carga enzimática de 10 FPU/g de hidratos de carbono.