

1 2 9 0



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Anderson dos Prazeres Maneca Vieira Lopes

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL CELULÓSICO
A PARTIR DE CASCAS PRÉ-TRATADAS DE
EUCALIPTO E DE LAMAS PRIMÁRIAS**

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química no ramo de Biosistemas, orientada pelo Professor Doutor Jorge Manuel dos Santos Rocha e pela Professora Doutora Cristina Maria dos Santos Gaudêncio Baptista e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Dezembro de 2021



Anderson dos Prazeres Maneca Vieira Lopes

Produção de bioetanol celulósico a partir de cascas pré-tratadas de eucalipto e de lamas primárias

Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado em Engenharia Química, apresentada ao Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.

Orientadores:

Professor Doutor Jorge Manuel dos Santos Rocha

Professora Doutora Cristina Maria dos Santos Gaudêncio Baptista

Instituições:

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

Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta

Financiamento:

Este trabalho foi realizado no âmbito do Projeto Inpactus – Produtos e Tecnologia inovadores a partir do Eucalipto, Projeto N° 21874 financiado no Portugal 2020 através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), Compete 2020, n°246/eixo II/2017.



A parte do trabalho referente às lamas primárias foi realizado no âmbito Projeto Integrado de IC&DT-project MATIS - Materiais e Tecnologias Industriais Sustentáveis (CENTRO-01-0145-FEDER-000014), cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do Programa Operacional Regional do Centro (CENTRO2020)



*Dedico este trabalho à minha mãe
Ana Júlia Maneca (em memória),
pelo amor, apoio, incentivo e por
me ensinar e demonstrar durante
toda a sua existência que a
persistência é o caminho do êxito.*

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação de Mestrado só foi possível devido à colaboração, apoio e incentivo de algumas pessoas que muito gostaria de agradecer.

Primeiramente quero agradecer à minha família toda por todo apoio e ajuda que me deram, pela educação, conhecimento transmitido e esforços realizados para que eu tivesse a oportunidade de estudar e alcançar uma boa formação profissional. Quero agradecer principalmente à minha mãe e às minhas irmãs por sempre terem demonstrado que independentemente das adversidades confiavam e acreditavam em mim. Um muito obrigado, a elas, por serem a minha fonte de forças e pelo apoio tanto a nível psicológico como financeiro mesmo estando distantes.

Em segundo lugar, um especial obrigado à Engenheira Cátia pelo apoio e ajuda, por todos os ensinamentos, partilhas de conhecimento, ajuda no laboratório e principalmente pela disponibilidade demonstrada em ajudar ao longo da realização deste trabalho.

Quero também expressar os meus agradecimentos aos Professores e orientadores, Doutor Jorge Rocha e Doutora Cristina Gaudêncio pela orientação, conhecimentos transmitidos e prontidão em ajudar ao longo da realização deste trabalho.

Estendo ainda o meu agradecimento aos meus amigos, que de uma forma ou de outra me ajudaram neste percurso académico pela amizade, pelos conselhos e pelo apoio dado, e em especial gostaria de agradecer ao Domingos Cortez e à Carla Casela, pelo apoio incondicional em uma das fases mais difíceis da minha vida e, mesmo sem perceber, incentivaram-me muito a terminar esta dissertação pelas perguntas frequentes que faziam sobre a mesma.

Resumo

Devido à escassez dos combustíveis fósseis e as adversidades (aquecimento global e efeito estufa) que a obtenção e uso dos mesmos tem causado no meio ambiente tem se optado cada vez mais pela busca de fontes de energia renovável, mais especificamente os biocombustíveis. A produção de bioetanol a partir de materiais lenhocelulósicos apresenta uma contribuição viável para a geração de energia limpa e sustentável.

Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho é a produção de bioetanol a partir de biomassa lenhocelulósica, nomeadamente pasta de casca de eucalipto pré-tratada com cozimento kraft e lamas primárias (utilizadas com e sem aplicação de pré-tratamento com HCl). Foram estudadas diferentes estratégias de produção de etanol, designadamente sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF – *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) e sacarificação e fermentação em simultâneo não isotérmicas (NSSF – *Non isothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Para ambas as estratégias de produção, usou-se o complexo enzimático Cellic® CTec2 para realizar a hidrólise dos polissacarídeos em monossacarídeos (açúcares fermentáveis) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC® 26602™ para converter os açúcares fermentáveis em etanol. Mantiveram-se constantes algumas variáveis como a consistência da matéria-prima (8 %), massa total de suspensão (350 g) e carga enzimática (25 FPU/gHC). Nos ensaios SSF estudou-se apenas variação do tipo de impulsor (Turbina *Rushton* e tipo âncora). Nos ensaios NSSF estudaram-se: i) a variação de tempo de pré-hidrólise (6 e 24h), ii) a variação da temperatura de fermentação (30 e 38 °C) e iii) a variação do tipo de impulsor. De um modo geral, o processo SSF revelou-se mais eficiente que o processo NSSF por se terem alcançado concentrações mais elevadas de etanol e consequentemente melhores rendimentos de produção. No caso do SSF de pasta kraft de casca, obtiveram-se concentrações de etanol de 35.7 e 33.0 g L⁻¹ quando se usou a Turbina *Rushton* (KA1) e o impulsor âncora (KA2), respetivamente, concluindo assim que o impulsor Turbina *Rushton* foi mais benéfico para a produção de etanol, apesar de ter conduzido a um valor de produtividade ligeiramente menor (1.44 g L⁻¹ h⁻¹, t = 24h) da que se obteve com o impulsor âncora (1.54 g L⁻¹ h⁻¹). Relativamente às lamas primárias, verificou-se claramente a importância do pré-tratamento da matéria-prima, tendo-se obtido concentrações de etanol de 28.0 e 34.3 g L⁻¹ para as lamas não tratadas (LA1) e para as lamas tratadas (LTA1), respetivamente. Verificou-se que o impulsor do tipo âncora aumentou a produtividade de etanol, tendo-se obtido concentrações de etanol de 34.3 (t = 24h) e 33.5 g L⁻¹ (t = 18h) quando se usou a turbina *Rushton* e o impulsor âncora (LTA2), respetivamente.

Relativamente ao processo NSSF, verificou-se vantagem na pré-hidrólise mais prolongada fosse qual fosse a matéria-prima e obtiveram-se concentrações de etanol de 28.3 e 30.1 g L⁻¹ nos ensaios de pasta kraft de casca NK1 (t_{hidrólise} = 6h) e NK2 (t_{hidrólise} = 24h), e de 11.0 e 25.0 g L⁻¹ nos ensaios de lamas primárias tratadas NLT1 (t_{hidrólise} = 6h) e NLT2 (t_{hidrólise} = 24h), respetivamente. Quanto a variação da temperatura de fermentação, para o caso da pasta kraft de casca obtiveram-se concentrações de 28.8 e 29.5 g L⁻¹ de etanol nos ensaios NK1 (t_{hidrólise} = 6h e T_{fermentação} = 30 °C) e NK3 (t_{hidrólise} = 6h e T_{fermentação} = 38 °C), respetivamente. Para o caso das lamas primárias, as concentrações foram de 11.0 e 29.2 g L⁻¹ nos ensaios NLT1 (t_{hidrólise} = 6h e T_{fermentação} = 30 °C) e NLT3 (t_{hidrólise} = 6h e T_{fermentação} = 38 °C), respetivamente. Quanto a variação do tipo de impulsor, para as lamas primárias tratadas a maior concentração de etanol foi obtida quando se usou o impulsor do tipo âncora, tendo-se obtido 32.0 g L⁻¹ de etanol (t_{hidrólise} = 6h e T_{fermentação} = 38 °C). Por outro lado, quando se usou o impulsor Turbina *Rushton* a concentração foi de 29.2 g L⁻¹ (t_{hidrólise} = 6h e T_{fermentação} = 38°C). O mesmo não se verificou para o caso da pasta kraft de casca, onde a concentração de etanol foi maior quando se usou o impulsor turbina *Rushton* (29.5 g L⁻¹ para o ensaio NK3) do que quando se usou o impulsor do tipo âncora (26.3 g L⁻¹ para o ensaio NK5), quando o t_{hidrólise} foi 6h e a T_{fermentação} foi de 38 °C.

Palavras-chave: Bioetanol, Lenhocelulose, SSF, Semi-SSF, NSSF, Pré-tratamento.

Abstract

Due to the scarcity of fossil fuels and the adversities (global warming and the greenhouse effect) that their exploration and use have caused to the environment, the search for renewable energy sources, specifically biofuels, has been increasingly considered. The production of bioethanol from lignocellulosic materials makes a viable contribution to the generation of clean and sustainable energy.

In this context, the main objective of this work is the production of bioethanol from lignocellulosic biomass, namely eucalyptus bark pulp pretreated with kraft cooking and primary sludge (used with and without HCl pretreatment application). Different ethanol production strategies were studied, namely simultaneous saccharification and fermentation (SSF) and non-isothermal simultaneous saccharification and fermentation (NSSF). For both production strategies, the Cellic[®] CTec2 enzyme complex was used to hydrolyze the polysaccharides into monosaccharides (fermentable sugars) and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ATCC[®] 26602TM was used to convert the fermentable sugars into ethanol. Some variables remained constant, such as raw material consistency (8 %), total suspension mass (350 g) and enzyme load (25 FPU/g_{HCl}). In the SSF tests, only variation of the impeller type (*Rushton* turbine and anchor type) was studied. In the NSSF the following operating conditions were studied: i) the pre-hydrolysis time (6 and 24h), ii) the fermentation temperature (30 and 38 °C) and iii) the impeller type. In general, the SSF process proved to be more efficient than the NSSF process, as higher ethanol concentrations and, consequently, better production yields were achieved. In the case of kraft pulp SSF, ethanol concentrations of 35.7 and 33.0 g L⁻¹ when using Rushton Turbine (KA1) and Anchor Impeller (KA2), respectively, thus concluding that the *Rushton* Turbine impeller was more beneficial for ethanol production, although have led to a slightly lower productivity (1.44 g L⁻¹ h⁻¹, t = 24h) than that obtained with the anchor impeller (1.54 g L⁻¹ h⁻¹). Regarding primary sludge, the importance of pre-treatment of the raw material was clearly verified, having obtained concentrations of 28.0 and 34.3 g L⁻¹ for untreated sludge (LA1) and for pre-treated sludge (LTA1), respectively. It was verified that the anchor type impeller increased the ethanol productivity, obtaining ethanol concentrations of 34.3 (t = 24h) and 33.5 g L⁻¹ (t = 18h) in the LTA1 and LTA2 tests, respectively.

Regarding the NSSF process, longer pre-hydrolysis was confirmed as advantageous, whatever the raw material. More specifically, concentrations of 28.3 and 30.1 g L⁻¹ were obtained in the kraft pulp tests NK1 (t_{hydrolysis} = 6h) and NK2 (t_{hydrolysis} = 24h) tests, and of 11.0 and 25.0 g L⁻¹ in the tests of treated primary sludge NLT1 (t_{hydrolysis} = 6h) and NLT2 (t_{hydrolysis}

= 24h) tests, respectively. Concerning the fermentation temperature, for the Kraft bark paste, concentrations of 28.8 and 29.5 g L⁻¹ of ethanol were obtained in the NK1 (t_{hydrolysis} = 6h and T_{fermentation} = 30 °C) and NK3 (t_{hydrolysis} = 6h and T_{fermentation} = 38 °C) tests, respectively. For the primary sludge, the concentrations of ethanol were 11.0 and 29.2 g L⁻¹ in the NLT1 (t_{hydrolysis} = 6h and T_{fermentation} = 30 °C) and NLT3 (t_{hydrolysis} = 6h and T_{fermentation} = 38 °C) tests, respectively. Concerning the impeller type, for the treated primary sludge the highest ethanol concentration was obtained using the anchor type impeller, having obtained 32.0 g L⁻¹ of ethanol (t_{hydrolysis} = 6h and T_{fermentation} = 38 °C). On the other hand, when the *Rushton* Turbine impeller was used, the concentration was 29.2 g L⁻¹ (t_{hydrolysis} = 6h and T_{fermentation} = 38 °C). The same did not happen with the kraft pulp, where the concentration of ethanol was higher using the *Rushton* turbine impeller (29.5 g L⁻¹ for the NK3 test) than using the anchor type impeller (26.3 g L⁻¹ for NK5 test), when t_{hydrolysis} was 6h and T_{fermentation} was 38 °C.

Keywords: Bioethanol, Lignocellulose, SSF, Semi-SSF, NSSF, Pretreatment.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	xi
Nomenclatura.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Objetivos.....	4
2. Revisão bibliográfica.....	5
2.1. Biomassa Lenhocelulósica (BLC) e a sua composição química.....	5
2.2. Processo de conversão de BLC em etanol.....	7
2.2.1. Pré-tratamento da BLC.....	8
2.2.2. Hidrólise enzimática.....	10
2.2.3. Fermentação etanólica.....	11
2.2.4. Métodos de produção de bioetanol de segunda geração.....	13
2.3. Configuração de Biorreatores.....	20
2.3.1. Modos de operação.....	20
2.3.1.1. Operação em descontínuo.....	21
2.3.1.2. Operação semi-descontínua.....	21
2.3.1.3. Operação em contínuo.....	21
2.3.2. Biorreatores de tanque agitado (STBR).....	22
2.3.3. Sistemas de agitação e aquecimento.....	23
3. Materiais e métodos.....	29
3.1. Biomassa lenhocelulósica.....	29
3.2. Enzima e microrganismo usados nos bioprocessos.....	30
3.3. Métodos de produção de bioetanol.....	31
3.3.1. Sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF).....	32
3.3.2. Sacarificação e fermentação em simultâneo não isotérmicas (NSSF).....	33
3.4. Métodos analíticos Os procedimentos necessários para a determinação da atividade enzimática encontram-se no Anexo IX.....	34
3.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	34
3.5. Parâmetros de avaliação da produção de etanol.....	35
4. Análise e discussão de resultados.....	39
4.1. Sacarificação e fermentação em simultâneo.....	39

4.1.1.	Efeito do tipo de impulsor no SSF	39
4.2.	Sacarificação e fermentação simultâneas não isotérmicas (NSSF)	42
4.2.1.	Efeito do tempo de pré-hidrólise	42
4.2.2.	Efeito da temperatura de fermentação	48
4.2.3.	Efeito do tipo de impulsor	51
5.	Conclusões e sugestão de trabalho futuro	57
6.	Referências bibliográficas	59
Anexos		67
Anexo I – Influência da escolha do pré-tratamento da biomassa		67
Anexo II – Estudos SSF e SHF para a obtenção de etanol, encontrados na literatura.....		68
Anexo III – Solução Tampão		70
Anexo IV – Meios de cultura, solução de nutrientes e solução de extrato		70
Anexo V – Condições utilizadas na realização dos ensaios SSF e NSSF.		71
Anexo VI – Produtos secundários obtidos durante os processos SSF e NSSF.....		74
Anexo VII – Resultados dos ensaios SSF e NSSF		76
Anexo VIII – Preparação do DNS modificado		78
Anexo IX – Atividade enzimática		79

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Estrutura de uma biomassa lenhocelulósica (Santos <i>et al.</i> , 2012).....	5
Figura 2.2 - Princípio geral de produção de bioetanol a partir de biomassa lenhocelulósica (Tran <i>et al.</i> , 2019).....	8
Figura 2.3 - Esquema de transformações que sofre a BLC durante o pré-tratamento (Mosier <i>et al.</i> , 2005).....	8
Figura 2.4 -Esquema dos diferentes métodos disponíveis para a produção de bioetanol (Aditiya <i>et al.</i> , 2016; Mejía-Barajas <i>et al.</i> , 2018; Parisutham <i>et al.</i> , 2014).....	13
Figura 2.5 - Concentrações de etanol e glucose ao longo do processo NSSF, aplicando diferentes temperaturas de fermentação. O tempo 0 h equivale ao momento em que foi adicionado o inóculo da levedura, iniciando a etapa de fermentação, sendo que a pré-hidrólise decorreu no intervalo [-12; 0] h (Lu <i>et al.</i> , 2013).....	19
Figura 2.6 - (A) Representação esquemática do biorreator do tanque agitado, (B) Nomenclatura para dimensionamento STBR (WF: Largura dos defletores ou chicanas, WI: Largura do impulsor, DI: Diâmetro do impulsor, DB: Diâmetro do biorreator, HB: Altura do biorreator, HI: Altura entre os impulsores e a parte inferior do biorreator, LI: Comprimento dos impulsores). (Modificado e adaptado de Garcia-Ochoa <i>et al.</i> , 2011).....	23
Figura 2.7 - Modelos de fluxo de impulsores (A) radiais e (B) axiais.	24
Figura 2.8 – Impulsores de fluxo radial e axial: (A) Turbina <i>Rushton</i> e (B) Hélice marinha, respectivamente (Pino <i>et al.</i> , 2018).....	25
Figura 2.9 - Impulsor de (A) <i>ribbon</i> helicoidal e (B) de âncora (Pino <i>et al.</i> , 2018).....	26
Figura 2.10 - Configurações de transferência de calor para biorreatores: a) camisa de aquecimento; b) serpentina externa; c) serpentina helicoidal interna; d) serpentina interna do tipo defletor; e) permutador de calor externo (adaptado de Doran, 2013 b); Fonseca e Teixeira, 2017).....	27
Figura 3.1 - Matéria-prima usada nos ensaios.: (A) Pasta crua Kraft de casca, (B) Lamas primárias e (C) Lamas primárias tratadas com HCl.	29
Figura 3.2 – Vaso reacional/ biorreator utilizado.	31
Figura 3.3 - Impulsores utilizados nos bioprocessos: (A) Turbina <i>Rushton</i> e (B) Âncora com quatro pás retas radiais.	31
Figura 3.4 - Instalação do sistema de agitação mecânica e das ligações à camisa de aquecimento do biorreator.	32
Figura 3.5 - Cromatografia líquida de alta eficiência.....	35

Figura 4.1 - Evolução da concentração de (A) glucose e de (B) etanol nos ensaios SSF de pasta kraft de casca (K) a 38°C, utilizando a turbina de <i>Rushton</i> (A1) e a âncora (A2).....	39
Figura 4.2 - Evolução da concentração de (A) glucose e de (B) etanol nos ensaios SSF de lamas primárias tal qual (L) e tratadas (LT) a 38°C, utilizando a turbina de <i>Rushton</i> (A1) e a âncora (A2).....	41
Figura 4.3 - Perfis de evolução da concentração (A) glucose e de (B) etanol no processo NSSF da pasta kraft de casca, com diferentes tempos de pré-hidrólise (t_h) e temperaturas de operação após inoculação da levedura (T_f): t_h 6h e T_f 30 °C (NK1); t_h 6h e T_f 38 °C (NK3); t_h 24h e T_f 30 °C (NK2); t_h 24h e T_f 38 °C (NK4).....	43
Figura 4.4 - Evolução da concentração de (A) glucose e de etanol no NSSF das lamas primárias, no qual t_h foi 6 e 24h, e T_f de (B) 30 e (C) 38 °C.	45
Figura 4.5 - Produtividades de etanol nos ensaios NSSF de lamas primárias para diferentes tempos de pré-hidrólise (6 e 24h) e temperaturas de fermentação de (A) 30 °C e (B) 38 °C...	47
Figura 4.6 - Evolução da concentração de etanol (A, C) e respectivas produtividades (B, D) no processo NSSF de pasta kraft de casca para diferentes temperaturas de fermentação, $T_f = 30$ °C (NK1 e NK2) e 38 °C (NK3 e NK4), e tempos de pré-hidrólise, t_h de 6h (A, B) e 24h (C, D).	48
Figura 4.7 - Evolução da concentração de etanol (A, C) e respectivas produtividades (B, D) no processo NSSF de lamas primárias tratadas para diferentes temperaturas de fermentação, $T_f = 30$ °C (NLT1 e NLT2) e 38 °C (NLT3 e NLT4), e tempos de pré-hidrólise, t_h de 6h (A, B) e 24h (C, D).....	50
Figura 4.8 - Evolução da concentração de (A) glucose e (B) etanol nos ensaios NSSF de pasta kraft de casca usando o impulsor Turbina <i>Rushton</i> (NK3) e o impulsor tipo âncora (NK5). Condições: $t_h = 6h$ $T_f = 38$ °C.....	51
Figura 4.9 - Produtividade de etanol no processo NSSF de pasta kraft de casca usando os impulsores Turbina <i>Rushton</i> (NK3) e o âncora (NK5). Condições: $t_h = 6h$ $T_f = 38$ °C.	52
Figura 4.10 - Evolução da concentração de (A) glucose e (B) etanol no processo NSSF de lamas primárias tratadas usando os impulsores Turbina <i>Rushton</i> (NLT3) e o âncora (NLT5). Condições: $t_h = 6h$ $T_f = 38$ °C.....	53
Figura 4.11 - Produtividade de etanol obtidas no processo NSSF de lamas primárias tratadas usando os impulsores Turbina <i>Rushton</i> (NLT3) e o tipo âncora (NLT5). Condições: $t_h = 6h$ $T_f = 38$ °C.....	54
Figura IX.1 - Interpolação linear entre os dois pontos que se aproximam das concentrações de enzima que libertaram para as temperaturas de (A) 50 e (B) 38 °C.	83

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Tipos de BLC e a sua composição química.	7
Tabela 2.2 - Processos de tratamento da biomassa lenhocelulósica e as suas vantagens e limitações (Alvira <i>et al.</i> , 2010; Chen <i>et al.</i> , 2017).	9
Tabela 2.3 – Efeito do cozimento kraft na estrutura da biomassa lenhocelulósica (Gírio <i>et al.</i> , 2010; Mood <i>et al.</i> , 2013).	10
Tabela 2.4 – Alguns microrganismos populares para a produção de bioetanol (Gírio <i>et al.</i> , 2010, Tran <i>et al.</i>)	12
Tabela 2.5- Principais características dos processos de produção de bioetanol de segunda geração (Ishola <i>et al.</i> , 2013; Mejía-Barajas <i>et al.</i> , 2018).....	14
Tabela 2.6 - Processos para a produção de etanol e as suas vantagens e desvantagens. (Choudhary <i>et al.</i> , 2016; Yang <i>et al.</i> , 2014).....	15
Tabela 2.7 - Estudos SSF e SHF para a obtenção de etanol usando pasta kraft de eucalipto e lamas como matéria-prima (Bauer <i>et al.</i> , 2012; Boshoff <i>et al.</i> , 2016; Edgardo <i>et al.</i> , 2008; Ko <i>et al.</i> , 2012; Mendes <i>et al.</i> , 2014; Mendes <i>et al.</i> , 2017; Monrroy <i>et al.</i> , 2012; Wistara <i>et al.</i> , 2016)	16
Tabela 2.8 – Estudos de SSF e NSSF usando diferentes BLCs e microrganismos. Condições: temperatura de pré-hidrólise de 50°C no processo NSSF e temperatura de operação de 40°C no processo SSF	17
Tabela 3.1 - Composição química da pasta kraft de casca e das lamas primárias.....	29
Tabela 3.2 - Atividade enzimática da enzima para as temperaturas de 38°C e 50°C.	30
Tabela 3.3 - Condições operatórias variadas nos ensaios SSF.....	33
Tabela 3.4 - Condições operacionais variadas nos ensaios NSSF.....	33
Tabela 4.1 - Resultados obtidos nos ensaios SSF da pasta kraft de casca e das Lamas primárias (tal qual e tratadas com HCl).....	42
Tabela 4.2 - Resultados obtidos nos ensaios NSSF de pasta kraft de casca e lamas primárias (tal qual e tratadas com HCl)	54
Tabela I.1 – Comparação de alguns tipos de materiais lenhocelulósicos e seus métodos de pré-tratamento. (Ravindran e Jaiswal, 2015)	67
Tabela I.2 – Tecnologias mais promissoras de pré-tratamento de BLC (Menon e Rao, 2012)	67

Tabela II.1 – Produção de bioetanol usando eucalipto e outras matérias-primas (Bauer et al., 2012; Edgardo et al., 2008; Ko et al., 2012; Monrroy et al., 2012; Wistara et al., 2016)	68
Tabela II.2 – Lamas de pasta e de papel (PPMS- <i>Pulp and Paper Mill Sludge</i>) (Mendes et al., 2014; Mendes et al., 2017; Boshoff et al., 2016).	69
Tabela IV.1 – Componentes necessários para a preparação dos meios de cultura e da solução de nutrientes.....	70
Tabela V.1 – Condições e os parâmetros utilizados na realização dos ensaios de SSF para a pasta kraft de casca e para um volume de trabalho de 350 mL.	72
Tabela V.2 – Condições e os parâmetros utilizados na realização dos ensaios de SSF para as lamas primárias (tal qual e tratadas com HCl) e para um volume de trabalho de 350 mL	72
Tabela V.3 – Condições e os parâmetros utilizados na realização dos ensaios de NSSF para a pasta kraft de casca e para um volume de trabalho de 350 mL	73
Tabela V.4 – Condições e os parâmetros utilizados na realização dos ensaios de NSSF para as lamas primárias tal qual e para um volume de trabalho de 350 mL.....	73
Tabela V.5 – Condições e os parâmetros utilizados na realização dos ensaios de NSSF para as lamas primárias tratadas e para um volume de trabalho de 350 mL	74
Tabela VI.1 - Subprodutos obtidos durante os bioprocessos (SSF e NSSF) de lamas primárias e de pasta kraft de casca	75
Tabela VII.1 - Resultados obtidos nos ensaios SSF utilizando a pasta kraft de casca e as lamas primárias, com uma consistência de 8 % e carga enzimática de 25 FPU/g _{HC}	76
Tabela VII.2 - Resultados obtidos nos ensaios NSSF de pasta kraft de casca, com uma consistência de 8 % e carga enzimática de 25 FPU/g _{HC}	77
Tabela VII.3 - Resultados obtidos nos ensaios NSSF de lamas primárias, com uma consistência de 8 % e carga enzimática de 25 FPU/g _{HC}	78
Tabela IX.1 - Preparação das soluções enzimáticas diluídas	79
Tabela IX.2 - Componentes adicionados em cada tubo de ensaio e os respectivos volumes utilizados para a determinação	80
Tabela IX.3 - Absorvâncias e respectiva diluição para a determinação da atividade enzimática	81
Tabela IX.4 - Concentração de glucose obtidos através da curva de calibração, massa de glucose libertada pela tira de papel de filtro.....	82

Nomenclatura

[ETOH] – Concentração de etanol	(g L ⁻¹)
Abs _{Amostra} – Absorvância da amostra	
Abs _{Corrigida} – Absorvância corrigida	
Abs _{Branco substrato} – Absorvância do branco substrato	
Abs _{Branco tampão} – Absorvância do branco tampão	
Abs _{Padrão} – Absorvância padrão	
Act _{enzimática} – Atividade enzimática	
AFEX – <i>Ammonia Fiber Expansion</i> (Expansão de fibra de amoníaco)	
BLC – Biomassa lenhocelulósica	
CBP – <i>Consolidated bioprocess</i> (Bioprocesso consolidado)	
Eucalipto – <i>Eucalyptus globulus Labill</i>	
ENSE – Entidade nacional para o setor energético	
FPU – <i>Filter Paper unit</i>	
GEE – Gases de efeito estufa	
GRAS – <i>Generally regarded as safe</i> (Geralmente considerado seguro)	
HC – Hidratos de carbono	
HCl – Ácido clorídrico	
HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)	
HE – Hidrólise enzimática	
IFN6 – 6º Inventário florestal nacional (IFN6)	
LHW – <i>Liquid Hot Water</i> (água quente líquida)	
m _{glucanas} – Massa de glucanas presentes no material, em base seca	(g)
m _{húmida} – Massa húmida	(g)
MS – Material seco	
m _{glucose libertada} – massa de glucose libertada	(g)
m _{glucose libertada média} – massa de glucose libertada média	(g)
m _{suspensão} – Massa de suspensão	(g)
m _{xilanas} – Massa de xilanas presentes no material, em base seca	(g)

NREL – <i>National Renewable Energy Laboratory</i> (Laboratório nacional de energia renovável)	
NSSF – <i>Non Isothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation</i> (sacarificação e fermentação não isotérmicas)	
P_{ETOH} – Produtividade em etanol	(g L ⁻¹ h ⁻¹)
Pinheiro-bravo – <i>Pinus pinaster</i>	
PPMS – <i>Pulp and Paper Mill Sludge</i>	
$R_{\text{NSSF-MS}}$ – Razão de etanol por 100 g de material seco para o processo NSSF	(g _{ETOH} /100g _{MS})
$R_{\text{SSF-MS}}$ – Razão de etanol por 100 g de material seco para o processo SSF	
REN21 – <i>Renewable policy energy network for the 21st century</i> (Rede de Políticas de Energias Renováveis para o Século 21)	
SHCF – <i>Separated Hydrolyse and co-Fermentation</i> (Hidrólise e fermentação separadas)	
SHF – <i>Separated Hydrolyse and Fermentation</i> (Hidrólise e fermentação separadas)	
SSCF – <i>Simultaneous saccharification and co-Fermentation</i> (Sacarificação e co-fermentação simultâneas)	
SSF – <i>Simultaneous saccharification and Fermentation</i> (Sacarificação e fermentação simultâneas)	
S-SSF – Semi-sacarificação e fermentação em simultâneo	
T_f ou $T_{\text{fermentação}}$ – temperatura de fermentação	(° C)
t_f – tempo de fermentação	(h)
t_h ou $t_{\text{hidrólise}}$ – tempo de pré-hidrólise	(h)
$V_{\text{inóculo}}$ – Volume de inóculo	(L)
$V_{\text{solução de nutrientes}}$ – Volume de solução de nutrientes	(L)
$V_{\text{solução enzimática}}$ – Volume de solução enzimática	(L)
$V_{\text{Senzimática diluída}}$ – Volume de solução enzimática diluída	(L)
$V_{\text{tampão total}}$ – Volume de tampão	(L)
V_{trabalho} – Volume de trabalho	(L)
$Y_{\text{ETOH-G}}$ – Rendimento de etanol pela glucose para os processos SSF e NSSF	(%)
Y_{HE} – Rendimento da HE do processo NSSF pelos HC	(%)
Y_{NSSF} – Rendimento em etanol pelos HC presentes no material pelo processo NSSF	(%)
Y_{SSF} – Rendimento em etanol pelos HC presentes no material pelo processo SSF	(%)

1. Introdução

A crise energética da década de 1970 despertou um interesse renovado na síntese de combustíveis e materiais a partir de recursos biológicos. No entanto, esse interesse foi decrescendo nas décadas que se seguiram, enquanto o preço do petróleo diminuiu, causando consequentemente um aumento triplicado no consumo global do mesmo nos anos seguintes (Ragauskas *et al.*, 2006).

Atualmente cerca de 71% da procura da energia mundial é suprida pela utilização de recursos fósseis, como o petróleo (o que tem maior aplicação comercial), o gás natural e o carvão (IEA, 2021). Porém, estes recursos não são renováveis e a sua combustão traz como consequência índices elevados de poluição atmosférica desde a sua fase de extração até ao seu uso final, contribuindo para problemas ambientais como a intensificação do efeito estufa e as alterações climáticas. Estas consequências adversas impulsionaram a busca por biocombustíveis, provenientes de fontes de energia renovável, pois estes não só causam uma redução significativa na emissão de gases de efeito estufa (GEE), mas também melhoram a segurança energética e representam uma melhoria na balança comercial, reduzindo a importação de combustíveis fósseis cada vez mais dispendiosos (Lin *et al.*, 2006). Os biocombustíveis são produzidos a partir de fontes comuns de biomassa, com maior distribuição geográfica que os combustíveis fósseis, conseguindo um aumento da disponibilidade energética. Podem ainda ser denominados como biocombustíveis de primeira, segunda, terceira ou mesmo de quarta geração, dependendo do tipo de biomassa utilizado e de como esta é convertida através dos bioprocessos (Romaní *et al.*, 2013).

A União Europeia estabeleceu um objetivo de até 2020 substituir cerca de 10% do combustível convencional usado no setor de transporte rodoviário por biocombustíveis, ou outro tipo de combustíveis alternativos. Segundo a ENSE (Entidade Nacional para o setor energético) esta meta de incorporação dos biocombustíveis foi cumprida, tendo-se estabelecido um novo valor para 2021 de 11%, segundo o diploma publicado no diário da república no dia 20 de janeiro de 2021. (PCM, 2021)

O bioetanol tem vindo a ganhar espaço entre os biocombustíveis, devido às suas vantagens e aplicações como etanol químico, potável e combustível. Este biocombustível é o mais produzido, correspondendo a cerca de 72% dos 135 milhares de milhão de litros de biocombustível produzidos mundialmente em 2016 (REN21, 2017).

Os Estados Unidos da América (EUA) e o Brasil são os países líderes na produção de bioetanol a partir do milho e da cana-de-açúcar, respetivamente. No ano de 2021 o Brasil

produziu cerca de 32.7 milhares de milhão de litros de bioetanol a partir de cana-de-açúcar como combustível para a indústria, enquanto no ano de 2019 os EUA produziam cerca de 59.7 milhares de milhão de litros de bioetanol a partir do milho (CONAB, 2021; Vidal, 2020).

As tecnologias mais antigas de produção de bioetanol usavam substratos como a cana-de-açúcar e o amido de milho, designando-se por biocombustíveis de primeira geração. No entanto, visto que o custo dessas matérias-primas podia chegar a 40% do custo do bioetanol, passou a explorar-se maioritariamente a utilização de biomassa lenhocelulósica (BLC) presente em resíduos de origem vegetal, para a produção de etanol, o que deu origem aos chamados biocombustíveis de segunda geração. A celulose é um polímero natural, o mais abundante na Terra, de elevado valor económico, que pode ser encontrado em resíduos agrícolas (palha de trigo, bagaço de cana, resíduo de soja), resíduos industriais (indústria da pasta e do papel) resíduos sólidos e em resíduos florestais (Branco *et al.*, 2018). Um outro fator preponderante na substituição das matérias-primas convencionais por BLC presente em resíduos, é que a produção de biocombustíveis de primeira geração compromete a segurança alimentar mundial para a Humanidade, ou seja, compete diretamente com o setor alimentar. Além disso, a BLC tem menor custo, maior distribuição e apresenta benefícios ambientais.

Quando o foco são as espécies florestais, são três as que se destacam em Portugal Continental: eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.), sobreiro (*Quercus suber* L.) e pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*). De acordo com o 6º inventário florestal nacional (IFN6), estas espécies ocupam cerca de 70% da área florestal total. O eucalipto ocupa a maior área florestal, cerca de 26%, seguido das outras duas espécies supracitadas, que ocupam cada uma 22% da área florestal total. Grande parte desta área florestal fornece matéria-prima para a indústria de produção de pasta e papel, e conseqüentemente há uma grande formação de subprodutos e resíduos resultantes da atividade desta indústria. A indústria de pasta e papel é uma das maiores indústrias do mundo, com cerca de 400 milhões de toneladas de papel e cartão e 188 milhões de toneladas de celulose virgem produzidas em 2015. (FAO, 2015; PG Paper, 2018)

Além dos rejeitados, como cascas, galhos e licores negros, o principal resíduo orgânico são as lamas das fábricas de pasta e papel. Segundo o boletim estatístico da associação portuguesa da indústria do papel (CELPA- *Portuguese Paper Industry Association*) de 2015, são produzidas em média cerca de 300 mil toneladas/ano (matéria húmida) de lamas no setor da indústria de pasta e papel. Estas lamas são geralmente aplicadas na agricultura e na compostagem, sendo que a sua eliminação pode originar custos adicionais à empresa que as produz. As lamas primárias são ricas em fibras celulósicas, e como tal podem ser usadas para a obtenção de uma ampla gama de produtos, entre eles, o bioetanol (Mendes *et al.*, 2014). O aproveitamento dessas lamas conduz a benefícios económicos, pois não incluem o custo de

compra e o custo total da bioconversão pode ser reduzido, por se poder eliminar a fase comum de pré-tratamento da biomassa. A grande vantagem que as lamas primárias têm sobre outras matérias-primas lenhocelulósicas é que a estrutura cristalina da celulose foi quebrada durante o processo de fabricação de pasta e é, portanto, passível de hidrólise enzimática (Lynd *et al.*, 2001). No entanto, as lamas primárias possuem uma grande quantidade de cinzas (> 50%), principalmente o carbonato de cálcio (CaCO₃), que podem dificultar o processo de bioconversão, por ligação irreversível de enzimas às cinzas (Boshoff *et al.*, 2016; Mendes *et al.*, 2016). Além disso, a presença do CaCO₃ aumenta o valor do pH das lamas (8-10), tornando-o mais elevado do que o pH ideal de atividade da enzima celulase (~5), e como tal, têm sido feitos pré-tratamentos ácidos com o intuito de diminuir a quantidade deste composto na matéria-prima (Gurram *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2014). A implementação de uma infraestrutura de produção de bioetanol de segunda geração é uma grande oportunidade para valorizar os resíduos e subprodutos provenientes da indústria de pasta e papel.

O processo de produção de etanol a partir de BLC requer quatro etapas principais. Na primeira etapa ocorre o pré-tratamento da biomassa. Na segunda ocorre a sacarificação enzimática da biomassa pré-tratada para produzir monómeros de açúcar. Na terceira etapa os monómeros de açúcares obtidos são fermentados e como consequência produzem etanol, butanol, etc. Na quarta etapa ocorre a destilação para se obter um etanol puro (Choudhary *et al.*, 2016).

Existem vários processos de produção de bioetanol a partir de BLC, sendo que os mais usados são o processo de hidrólise e fermentação separadas (SHF - *Separate Hydrolysis and Fermentation*) e o processo de fermentação e sacarificação em simultâneo (SSF - *Simultaneous Saccharification and Fermentation*). O custo elevado das enzimas hidrolisantes e métodos de pré-tratamento, tornam o processo SHF economicamente inviável (Choudhary *et al.*, 2016). Durante a sacarificação enzimática, as enzimas hidrolíticas estão sujeitas a inibição por *feedback* devido à acumulação de monómeros de açúcar e celobiose no meio, diminuindo a sua eficiência. Essa limitação pode ser ultrapassada pelo processo SSF, pois neste a glucose libertada pela enzima celulase é continuamente convertida em bioetanol, minimizando a inibição por *feedback* (Zaldivar *et al.*, 2001). No entanto, a principal limitação do SSF é a diferença entre as temperaturas ótimas de enzimas hidrolíticas de biomassa (45–50 °C) e dos microrganismos fermentadores (30 °C). Portanto, há uma necessidade de encontrar enzimas hidrolíticas que se adaptem a temperaturas mais baixas e leveduras fermentativas termotolerantes para desenvolver uma tecnologia SSF economicamente viável. A produção em grande escala ainda enfrenta alguns desafios de redução de custos, sendo necessário melhorar a eficiência tecnológica.

Como alternativa, tem sido também estudado ao longo dos anos o método de Sacarificação e fermentação simultâneas não isotérmicas (NSSF - *Nonisothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation*) por apresentar vantagens de ambos os métodos supracitados (Chen e Li, 2013; Chilari *et al.*, 2017; Kádár *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2013; Shahsavarani *et al.*, 2013; Wu e Lee, 1998).

1.1. Objetivos

O objetivo principal do presente trabalho foi o aproveitamento de resíduos lenhocelulósicos provenientes da indústria papelreira, como a casca de eucalipto pré-tratada com cozimento Kraft e as lamas primárias (tal qual e tratadas com HCl), para a obtenção de bioetanol. Para a realização deste objetivo optou-se por:

- Estudar a influência das condições do processo NSSF em descontínuo variando o tempo de pré-hidrólise e a temperatura de fermentação.
- Comparar e verificar qual o melhor método, SSF ou NSSF, para a produção de bioetanol, tendo em vista a sua maximização.
- Comparar e verificar qual a BLC mais promissora para a produção de bioetanol.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Biomassa Lenhocelulósica (BLC) e a sua composição química

A maior parte da celulose na Natureza está na forma de lenhocelulose, uma estrutura complexa de materiais naturais encontrados nas plantas.

De acordo com Wiselogel *et al.* (1996), a biomassa lenhocelulósica é composta essencialmente por três substâncias principais: os polissacarídeos como a celulose e hemiceluloses, que correspondem a cerca de 35-45% e 20-35% do peso seco, respetivamente, e lenhina, que corresponde a cerca de 15-20% do peso seco da biomassa lenhocelulósica. Na Figura 1 está representado um esquema da estrutura da biomassa lenhocelulósica.

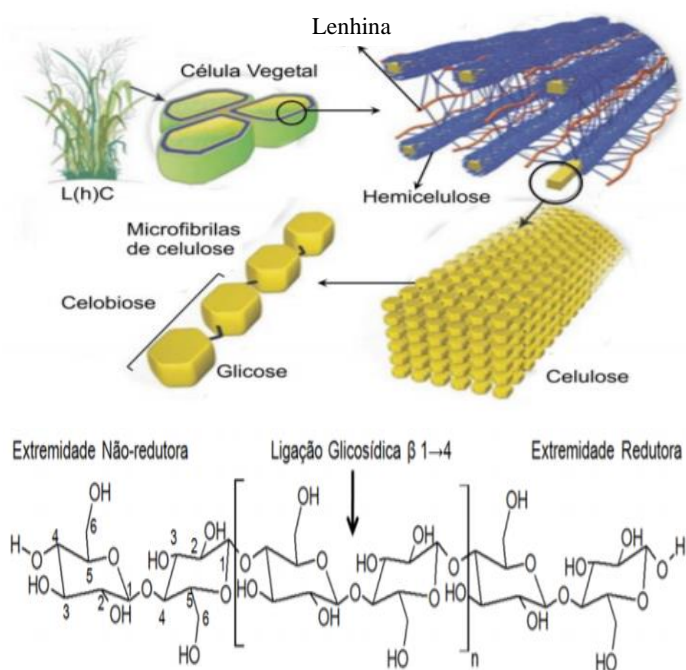


Figura 2.1 - Estrutura de uma biomassa lenhocelulósica (Santos *et al.*, 2012)

O polissacarídeo mais abundante na Natureza e principal composto presente nas células vegetais, a celulose, é um polímero de cadeia longa e linear, constituído por monómeros de D-glucose unidos por ligações glicosídicas β-1,4, que se une paralelamente a outras cadeias através de múltiplas ligações de hidrogénio, formando tubos designados por microfibrilas. Ao formar as microfibrilas de celulose, o número de grupos hidroxilo disponíveis para interagir com a água diminui, o que, conseqüentemente, torna a celulose num componente insolúvel,

apesar da sua polaridade (Eduardo *et al.*, 2009; Souza, 2012). A forte interação entre as cadeias lineares de celulose confere um grau elevado de cristalinidade ao polímero.

No entanto, a estrutura da celulose dentro do material de lenhocelulósico não é uniforme: existem regiões cristalinas, nas quais as microfibrilas de celulose se encontram organizadas e compactas, enquanto nas regiões amorfas se encontram desordenadas e mais suscetíveis a ataques hidrolíticos (Pérez *et al.*, 2002). As microfibrilas de celulose encontram-se rodeadas por hemiceluloses e lenhina. Esta estrutura proporciona uma elevada proteção natural dos polissacarídeos aos ataques hidrolíticos por parte de enzimas e produtos químicos, causando conseqüentemente uma dificuldade na degradação / desconstrução da biomassa lenhocelulósica, importante para a sua conversão em produtos, nomeadamente o etanol. (Eduardo *et al.*, 2009).

As hemiceluloses são polissacarídeos heterogêneos lineares e ramificados, e constituídas por uma combinação aleatória de diferentes monómeros, incluindo pentoses (β -L-arabinose, β -D-xilose), hexoses (β -D-galactose, β -D-glucose, β -D-manose) e ácidos urónicos (D-glucurónico, D-galacturónico, α -D-4-O-metilglucurónico (Morais *et al.*, 2005; Sheehan, 2001). As hemiceluloses mais abundantes na madeira de eucalipto são as xilanas (homopolímeros de xilose). Pelo fato das hemiceluloses apresentarem um considerável grau de ramificação e, portanto, baixa cristalinidade, promove-se uma melhor eficiência ao ataque hidrolítico por enzimas de degradação (Otero *et al.*, 2007).

A lenhina é um polímero fenólico amorfo e altamente ramificado que fornece rigidez à parede celular, servindo como suporte estrutural, resistência aos insetos e resistência à degradação microbiana e química (Tuomela *et al.*, 2000). Por possuir essas propriedades, este polímero constitui um dos principais obstáculos no processo de degradação da BLC.

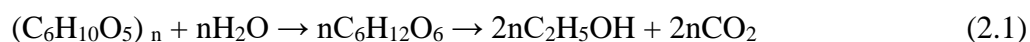
A celulose, as hemiceluloses e a lenhina não estão uniformemente distribuídas nas paredes das células vegetais. A estrutura e a quantidade desses componentes variam de acordo com as espécies, tecidos e maturidade da parede celular. Estes três compostos ocupam cerca de 90% (m/m) da BLC, e os restantes 10% dizem respeito a proteínas, cinzas, óleos, entre outros. A Tabela 2.1 apresenta diferentes tipos de biomassa e a sua respetiva composição química.

Tabela 2.1 - Tipos de BLC e a sua composição química.

BLC		Lenhina (%)	Hidratos de carbono (%)		Referências
			Celulose	Hemiceluloses	
Folhosas (<i>Hardwoods</i>)	Geral	18–25	45–55	24–40	Tran <i>et al.</i> , 2019
	Eucalipto	21.5	54.1	18.4	Isikgor <i>et al.</i> , 2015
Resinosas (<i>Softwoods</i>)	Geral	25–35	45–50	25–35	Tran <i>et al.</i> , 2019
	Pinho	23–29	42–50	24–27	Isikgor <i>et al.</i> , 2015; Menon e Rao, 2012
Herbáceas	Geral	10–30	25–40	25–50	Tran <i>et al.</i> , 2019
	Espiga de milho	15	45	35	Sun e Cheng, 2002
	Palha de trigo	15	30	50	Sun e Cheng, 2002
Lamas primárias	Geral	5-20		45–60	Mendes <i>et al.</i> , 2014

2.2. Processo de conversão de BLC em etanol

O etanol pode ser obtido a partir de qualquer tipo de material que contenha hidratos de carbono que têm a fórmula típica de $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Segue-se a expressão química geral de conversão de hidratos de carbono naturais à base de glucose em bioetanol:



De um modo geral, a produção de bioetanol a partir de biomassa lenhocelulósica envolve três etapas. A primeira consiste num pré-tratamento da matéria-prima para melhorar a suscetibilidade enzimática. A segunda etapa consiste na conversão dos polissacarídeos do material pré-tratado em açúcares fermentáveis (mono e dissacarídeos) através de uma hidrólise enzimática. A terceira etapa envolve a fermentação dos açúcares obtidos na segunda etapa. Por fim, no caso de se pretender obter o bioetanol puro, a mistura final da etapa de fermentação pode ser submetida a um processo de separação por destilação. A Figura 2.2 representa um fluxograma do processo de produção de bioetanol.

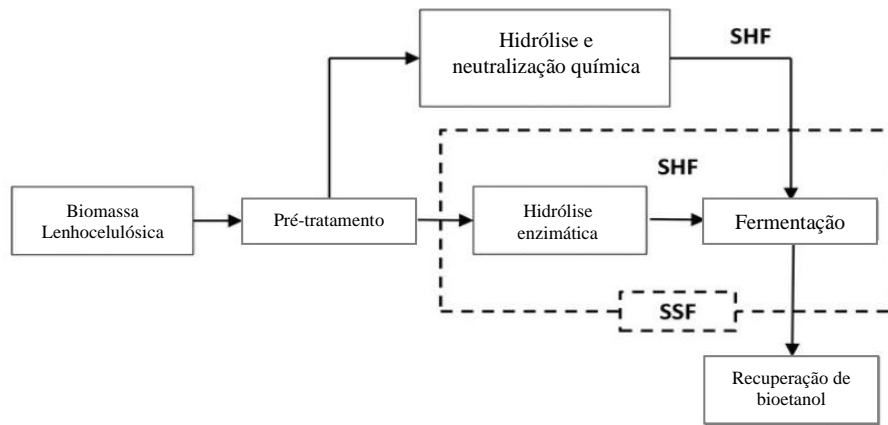


Figura 2.2 - Princípio geral de produção de bioetanol a partir de biomassa lenhocelulósica (Tran *et al.*, 2019)

2.2.1. Pré-tratamento da BLC

O principal objetivo do pré-tratamento é aumentar a acessibilidade e a biodegradabilidade da celulose por ação enzimática e/ou química (Barakat *et al.*, 2013). O pré-tratamento visa então remover a lenhina e as hemiceluloses, resultando também numa diminuição do grau de cristalinidade da celulose e num aumento da porosidade e da área superficial do material lenhocelulósico. (Mosier *et al.*, 2005), aumentando assim a taxa de produção de açúcares fermentáveis para os microrganismos. A Figura 1 mostra como a celulose se torna mais acessível depois do pré-tratamento.

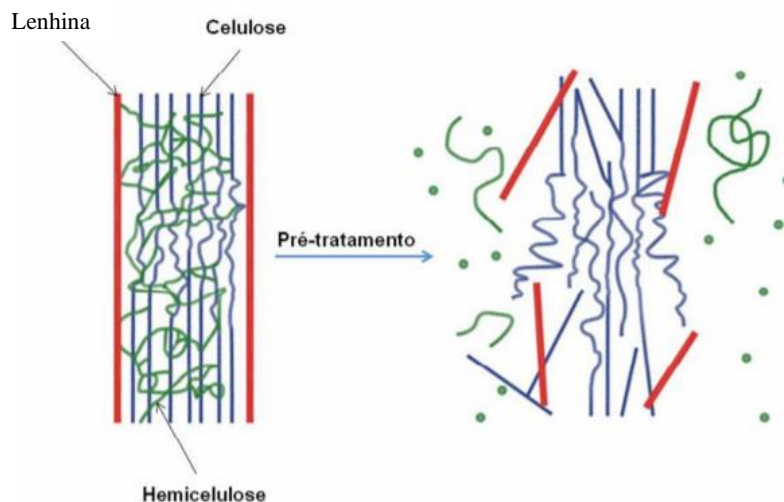


Figura 2.3 - Esquema de transformações que sofre a BLC durante o pré-tratamento (Mosier *et al.*, 2005)

Os métodos de tratamento da BLC dividem-se em categorias distintas, como métodos mecânicos ou físicos (como a moagem, irradiação), químicos (oxidação húmida, ácidos, alcalinos, *organosolv*), físico-químicos (explosão por vapor, explosão por fibra de amónio

(AFEX – *Ammonia Fiber Expansion*), CO₂ supercrítico e respetiva explosão, tratamento com água quente (LHW – *Liquid Hot Water*)) e tratamentos biológicos ou várias combinações destes. Cada um destes métodos tem vantagens e desvantagens, como apresentado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Processos de tratamento da biomassa lenhocelulósica e as suas vantagens e limitações (Alvira *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2017).

Método		Vantagens	Desvantagens
Físico	Em geral	- Reduz a cristalinidade da celulose	- Consumo de energia geralmente superior do que a energia da biomassa inerente; Não há eliminação da lenhina.
Químico	Organosolv	- Hidrolisa a lenhina e as hemiceluloses	- Solventes precisam ser drenados no reator, evaporados, condensados e reciclados; elevado custo.
	Pirólise	- Produz produtos de gás e líquido	- Elevada temperatura; produção de cinzas
	Hidrólise ácida	- Hidrolisa as hemiceluloses em açúcares xilose e outros; altera a estrutura da lenhina	- Custo elevado; corrosão de equipamentos; formação de substâncias tóxicas
	Hidrólise alcalina	- Remove a lenhina e hemiceluloses; aumenta a área da superfície acessível	- Exige longos tempos de permanência; formação de sais irrecuperáveis.
Físico-químico	Explosão por CO ₂	- Aumenta a área superficial acessível; boa relação custo-benefício; não causa formação de compostos inibidores	- Não modifica as hemiceluloses e a lenhina.
	AFEX	- Aumenta a área superficial acessível; remove a lenhina e as hemiceluloses; não produz compostos inibidores	- Não é eficiente para a biomassa com elevado teor de lenhina
	Explosão por vapor	- Degrada as hemiceluloses e a lenhina; boa relação custo-benefício	- Destruição de uma parte da fração de xilanas; rutura incompleta da matriz lenhina-carboidratos; formação de compostos inibidores para microrganismos
Biológico	Em geral	- Degrada a lenhina e hemiceluloses; gasto energético baixo	- Taxa de hidrólise é muito baixa; processo lento

O pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica influencia as etapas subsequentes do processo de produção de bioetanol (sacarificação da celulose e fermentação dos hidrolisados obtidos) e tem grande potencial para a melhoria da eficiência e redução do custo de produção. Portanto, a sua escolha é um fator muito importante na economia do processo. Para que um tratamento seja considerado eficiente, o mesmo deve diminuir a recalcitrância da BLC e o grau de polimerização das moléculas de celulose, tornando-as acessíveis ao processo de hidrólise, maximizar a acessibilidade ao ataque biológico, evitar ou minimizar a formação de subprodutos inibidores dos processos de hidrólise e fermentação e ser economicamente viável, ou seja, minimizar custos e reduzir a necessidade energética (Ussirri e Lal, 2014; Zhang *et al.*, 2004).

A escolha do pré-tratamento também depende da composição química da BLC, e do seu impacto ambiental (Ravindran e Jaiswal, 2015; Menon e Rao, 2012). Nas Tabelas I.1 e I.2 (Anexo I) estão ilustradas a influência da composição química na escolha do pré-tratamento e os métodos de pré-tratamento mais promissores que podem ser comercializados para a indústria de biocombustíveis, respetivamente.

Ao comparar os vários métodos de pré-tratamento, todos os critérios supracitados devem ser tidos em conta. Pode concluir-se por observação da Tabela I.2 que não existe nenhum método de pré-tratamento ideal para BLC. A escolha de cada um deles depende do objetivo que se pretende alcançar.

Um dos tipos de tratamento da BLC já bem implementado é o cozimento kraft, que é um tipo de tratamento alcalino aplicado na maioria das indústrias de pasta e papel. Parte dos materiais lenhocelulósicos em estudo na presente dissertação são pastas resultantes do cozimento kraft de casca de eucalipto. Na Tabela 2.3 é apresentado o efeito deste tipo de pré-tratamento na composição e estrutura química da biomassa lenhocelulósica, bem como as suas limitações.

Tabela 2.3 – Efeito do cozimento kraft na estrutura da biomassa lenhocelulósica (Gírio *et al.*, 2010; Mood *et al.*, 2013).

Efeito	Pré-tratamento
	Cozimento kraft
Aumento da área de superfície acessível	+
Alteração da estrutura da lenhina	+
Baixo consumo de energia	+
Baixos custos de investimento	M
Baixos custos operacionais	M
Elevada digestibilidade da celulose	++
Baixa formação de inibidores	+
Lenhina com elevada qualidade	-
Recuperação elevada de celulose	+
Remoção/solubilização de hemiceluloses	M
Remoção elevada de lenhina	+
Baixos problemas de corrosão	-

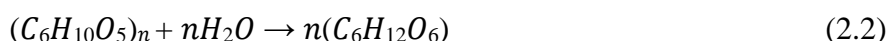
+, positivo; -, negativo; M, efeito moderado

2.2.2. Hidrólise enzimática

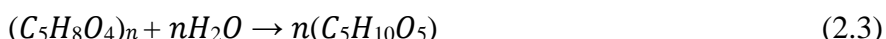
As enzimas celulases são usadas há várias décadas para a produção de bioetanol de segunda geração. A maioria das enzimas apresenta elevada atividade a um pH ácido moderado (pH<5) e pode ser resistente a mais de 40 °C. A celulase não é uma substância única, mas sim um complexo enzimático composto por três grandes grupos de celulases, nomeadamente endoglucanases, exoglucanases, β -glucosidases (Chen, 2015; Eduardo *et al.*, 2009; Hamelinck

et al., 2005). Estas enzimas são responsáveis pela degradação da celulose em açúcares simples e/ou fermentáveis (sacarificação ou hidrólise enzimática), como a glucose (hexose). Se o complexo for também constituído por hemicelulases (xilanases, por exemplo), durante o processo de sacarificação ocorre simultaneamente uma conversão das hemiceluloses presentes no material em xilose (pentose). Ambas as reações de hidrólise são descritas pelas equações (2.2) e (2.3).

Hidrólise da celulose:



Hidrólise das hemiceluloses (xilana):



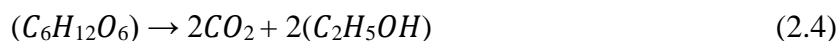
Realizar hidrólise enzimática sem antes fazer o pré-tratamento prévio da BLC resulta normalmente em rendimentos de produção de açúcares fermentáveis à volta dos 20%, enquanto os rendimentos, após o pré-tratamento, costumam exceder os 90%.

Apesar da hidrólise ácida resultar num rendimento superior de produção de açúcar, a hidrólise enzimática num material pré-tratado tem vindo a ser cada vez mais vista como uma alternativa, pois: i) não conduz à formação de produtos de degradação dos monossacarídeos (por exemplo furfural), ii) realiza-se sob condições de reação moderadas, pH entre 4.8 a 5.0 e temperatura entre 45 a 50°C, iii) requer menor consumo de energia, iv) apresenta menor impacto ambiental, v) diminui problemas de corrosão e vi) permite um rendimento elevado de glucose pura com baixa formação de subprodutos (Chen, 2015; Lari *et al.*, 2019; Naggar *et al.*, 2014; Soccol *et al.*, 2011). Apesar de todas as vantagens, é fundamental otimizar as condições de operação tais como temperatura, tempo, pH, carga enzimática e concentração de substrato.

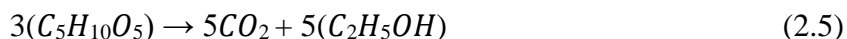
2.2.3. Fermentação etanólica

A fermentação é o processo pelo qual os hidrolisados, provenientes do processo de sacarificação, são submetidos a um agente de fermentação (bactérias, leveduras e fungos) e consequentemente convertidos em bioetanol e outros subprodutos (por exemplo CO₂). De acordo com as reações anaeróbicas a seguir (equações 2.4 e 2.5), cada kg de glucose e xilose pode produzir 0.49 kg de CO₂ e 0.51 kg de etanol (Branco *et al.*, 2018; Hamelinck *et al.*, 2005).

Fermentação de hexoses:



Fermentação de pentoses:



A maioria dos microrganismos de fermentação apresentam elevada actividade metabólica numa gama de temperatura de 30-38 °C (mesófilos). O pH influencia a escolha do microrganismo, ou seja, um pH de 6.5-7.5 é tipicamente essencial para manter o crescimento de bactérias, enquanto os fungos e as leveduras são capazes de resistir em ambientes mais ácidos, com valores de pH de 3.5 a 5.0 e de 3 a 6, respetivamente (Aditiya *et al.*, 2016). Outros fatores como i) a taxa de crescimento do microrganismo e a sua estabilidade genética, ii) termotolerância, iii) tolerância a meios ácidos, iv) produtividade, v) tolerância a inibidores, osmose e álcool, também desempenham um papel importante na escolha do microrganismo para o processo de fermentação (Aditiya *et al.*, 2016; Hamelinck *et al.*, 2005)

Um dos microrganismos mais estudados na produção de etanol de 2ª geração é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cuja temperatura ideal de crescimento é ~30°C (Ortiz-Muñiz *et al.*, 2010). A sua utilização traz algumas vantagens quando comparada com outras leveduras e microrganismos, pois tolera uma faixa ampla de pH, o que torna a sua fermentação menos suscetível a contaminações por bactérias, apresenta uma tolerância superior ao etanol e é um organismo geralmente considerado seguro (GRAS – *generally regarded as safe*) (Nikolić *et al.*, 2013; Prasertwasu *et al.*, 2014). Na Tabela 2.4 são apresentados os microrganismos mais comuns na produção de etanol, e as suas vantagens e desvantagens.

Tabela 2.4 – Alguns microrganismos populares para a produção de bioetanol (Gírio *et al.*, 2010, Tran *et al.*)

Característica	Microrganismo			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Pichia stipitis</i>
Fermentação D-glucose	+	+	+	+
Outra utilização de hexose (D-galactose e D-mannose)	+	-	+	+
Utilização pentose (D-xylose e L-arabinose)	+	-	-	+
Utilização direta da hemicelulose	-	-	-	f
Fermentação anaeróbica	-	+	+	f
Formação de produtos mistos	+	f	f	f
Alta produtividade do etanol (da glucose)	-	+	+	f
Tolerância ao etanol	f	f	+	f
Tolerância aos inibidores derivados da lignocelulose	f	f	+	f
Faixa de pH ácida	-	-	+	f

+, positivo; -, negativo; f, fraco

2.2.4. Métodos de produção de bioetanol de segunda geração

Além da variedade dos métodos de pré-tratamento da BLC, existem vários métodos de produção de bioetanol, nomeadamente sacarificação e fermentação separadas (SHF – *Separate Hydrolysis and Fermentation*) ou simultâneas (SSF – *Simultaneous Saccharification and Fermentation*), sacarificação e co-fermentação separadas (SHCF – *Separate Hydrolysis and co-Fermentation*) ou simultâneas (SSCF – *Simultaneous Saccharification and co-Fermentation*), processamento de biomassa consolidado (CBP – *Consolidated Bioprocess*) e sacarificação, filtração e fermentação simultâneas (SSFF - *Simultaneous Saccharification, Filtration and Fermentation*) (Choudhary *et al.*, 2016; Menon e Rao, 2012; Naggar *et al.*, 2014). Das configurações mencionadas, o SSF é atualmente considerado o método mais promissor para converter a BLC em bioetanol, pois apresenta um rendimento elevado de conversão, sendo realizado normalmente à temperatura de 38°C (Tran *et al.*, 2019).

Na Figura 2.4 estão ilustradas as diferentes configurações de processos para a produção de bioetanol e as suas etapas respetivas.

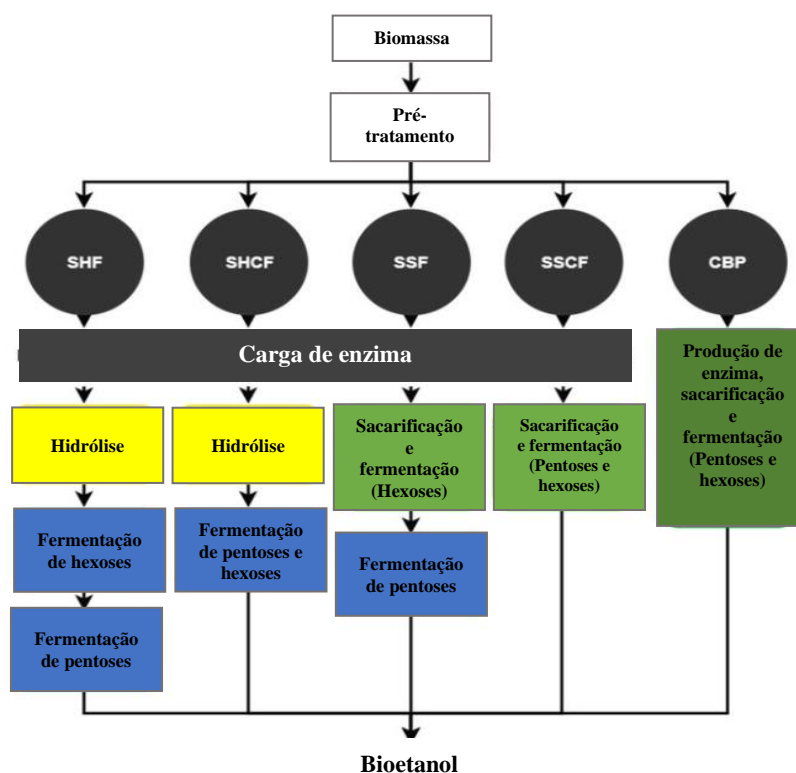


Figura 2.4 -Esquema dos diferentes métodos disponíveis para a produção de bioetanol (Aditiya *et al.*, 2016; Mejía-Barajas *et al.*, 2018; Parisutham *et al.*, 2014)

Na Tabela 2.5 faz-se uma descrição sucinta de cada um dos processos, enquanto a Tabela 2.6 reúne as vantagens e desvantagens de cada um.

Tabela 2.5- Principais características dos processos de produção de bioetanol de segunda geração (Ishola *et al.*, 2013; Mejía-Barajas *et al.*, 2018)

Processo	Características principais
SHF	A hidrólise de biomassa e a fermentação do açúcar são realizadas sequencialmente em biorreatores; neste processo, as temperaturas ideais para a hidrólise enzimática e fermentação são diferentes e é necessário arrefecer os hidrolisados após a hidrólise enzimática e antes de iniciar a fermentação. Para que se consiga consumo de pentoses é necessário adicionar microrganismos capazes de converter pentoses em etanol no final da fermentação da hexose. Este é um dos processos mais caros, com longos tempos, onde pode ocorrer inibição enzimática causada pelos açúcares obtidos.
SHCF	Ao contrário do processo SHF, neste processo, após a hidrólise a fermentação de hexoses e pentoses são realizadas no mesmo biorreator. É necessário utilizar leveduras capazes de metabolizar pentoses ou adicionar um consórcio microbiano que, em conjunto, consegue assimilar tanto as hexoses como as pentoses presentes no meio.
SSF	Combina a hidrólise enzimática e a fermentação das hexoses num único biorreator, aumentando a eficiência da hidrólise enzimática, eliminando a inibição pelo produto, diminuindo o risco de contaminação microbiana por ser um único processo e aumentando a produtividade em bioetanol em comparação com o processo SHF. Os valores de pH e temperatura devem ser bem selecionados, uma vez que os valores ótimos de pH e temperatura das enzimas e leveduras utilizadas são bastante distintos, aplicando-se um compromisso entre ambos. No final da fermentação das hexoses, é necessária a adição de microrganismos capazes de converter pentoses em etanol.
SSCF	Este processo é semelhante ao SSF com a diferença de que utiliza leveduras capazes de fermentar tanto hexoses como pentoses no mesmo biorreator. Isto promove a utilização de uma maior quantidade de substrato, o que pode aumentar a produtividade com relação ao etanol, reduzindo os tempos de cada etapa.
SSFF	Neste processo, a BLC é exposta às enzimas, no vaso de hidrólise, e um filtrado rico em açúcar é transferido para o vaso de fermentação por filtração de fluxo cruzado. O líquido fermentado é bombeado de volta para o vaso de hidrólise, enquanto microrganismo fermentador (espécie floculante) fica retido por sedimentação.
CBP	A produção de enzimas, a hidrólise enzimática e a fermentação dos açúcares estão integradas no mesmo biorreator. Como resultado, a adição de celulases externas não é necessária

Tabela 2.6 - Processos para a produção de etanol e as suas vantagens e desvantagens. (Choudhary *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2014)

Processo	Vantagens	Desvantagens
SHF	<ul style="list-style-type: none"> - A hidrólise e a fermentação são realizadas separadamente a temperaturas ideais 	<ul style="list-style-type: none"> - Custo elevado; - Processo demorado - Enzimas hidrolíticas estão sujeitas à inibição pelo produto final.
SSF	<ul style="list-style-type: none"> - Rendimento elevado de produção de etanol; - Redução do custo de arrefecimento, pois não é necessária uma unidade de refrigeração; - Melhora a eficiência da hidrólise; menor quantidade de enzima necessária - Risco de contaminação reduzido 	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura ótima de enzimas hidrolíticas e leveduras são diferentes; - Eficiência hidrolítica reduzida a temperatura mais baixa; - Concentração de etanol > 0,2 M perturba a adsorção de exoglucanase na celulose e reduz a eficiência hidrolítica; - A presença de complexos de enzimas celulase no mesmo vaso pode afetar o crescimento da levedura; - Dificuldade em reciclar o microrganismo em fermentação, uma vez que é misturado com a biomassa lenhocelulósica.
SSCF	<ul style="list-style-type: none"> - Utilização completa do substrato - Custo de capital reduzido - Elevada produtividade de bioetanol - Remoção contínua de produtos finais de sacarificação - Resolvem o problema de inibição por feedback 	<ul style="list-style-type: none"> - A utilização de xilose requer condições aeróbicas, o que inibe a fermentação da glucose; - Maior afinidade pela glucose impede a metabolização de xilose.
CBP	<ul style="list-style-type: none"> - Redução do investimento de capital - Eliminação de utilidades associadas a produção de enzimas - Recipiente único para sacarificação e fermentação reduz as complexidades operacionais. Simplificação de operação - Redução do risco de contaminação pela redução da concentração de glucose produzida e etanol produzido - Melhoria da eficiência da hidrólise prevenindo a inibição pelo substrato 	<ul style="list-style-type: none"> - Cargas elevadas de sólidos afetam a operação de mistura. - O desenvolvimento de novos microrganismos eficientes capazes de coproduzir enzimas hidrolíticas e fermentação é muito difícil. - Rendimento de etanol consideravelmente baixo.
SSFF	<ul style="list-style-type: none"> - Eficaz na melhoria do desempenho celular - Facilita a utilização completa da biomassa - Tanto a hidrólise de biomassa como a fermentação são realizadas nas suas condições ideais 	<ul style="list-style-type: none"> - O entupimento de filtros de membrana com substrato é o principal desafio - Dificuldade no controlo do processo

No caso do processo SSF, este pode ser influenciado por parâmetros como a composição da BLC, tipo de pré-tratamento, quantidade de inóculo, teor de humidade e pH (Rezania *et al.*, 2017).

Apresenta-se na Tabela 2.7 um resumo de estudos SSF e SHF (presentes nas Tabelas II.1 e II.2 do Anexo II) encontrados na literatura usando as lamas, *Eucalyptus globulus* e outras matérias-primas como substrato.

Tabela 2.7 - Estudos SSF e SHF para a obtenção de etanol usando pasta kraft de eucalipto e lamas como matéria-prima (Bauer et al., 2012; Boshoff et al., 2016; Edgardo et al., 2008; Ko et al., 2012; Mendes et al., 2014; Mendes et al., 2017; Monrroy et al., 2012; Wistara et al., 2016)

Matéria-prima	Método / Modo de operação	Microrganismo	[ETOH] (g L ⁻¹)	P _{ETOH} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y (%)
Pasta kraft de Eucalipto	SHF/-	<i>S. cerevisiae</i>	-	-	96
	SSF/-	K. Marxianus TISTR5925	-	-	92.2
Lamas primárias	SSF/ Batch	<i>S. cerevisiae</i>	22.7	0.94	80.6
	SSF/ Batch	K. Marxianus NCYC 1426	20.7	0.86	73.7
Lamas primárias ^a	SHF/ Batch	Ferm PRO	25 – 30	1.73 – 3.28	94.5 – 95.7
Lamas recicladas de papel ondulado	SSF/ Fed-Batch	<i>S. cerevisiae</i> MH1000	45.5	0.45	78.2
Lamas primárias	SSF/ Fed-Batch	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602	33.3 – 39.7	0.43 – 0.52	39.1 – 46.4

[ETOH], concentração de etanol; P, Produtividade de etanol; Y, rendimento de etanol; ^a, adição de acelerador de poliácridamida catiônica XP10020 durante a hidrólise enzimática.

É crucial utilizar um teor elevado de substrato (e, portanto, de sólidos) para a economia do processo SSF. No entanto, um dos principais problemas associados à utilização de cargas elevadas de sólidos é o aumento da resistência à transferência de massa, potencializado pela dificuldade de se ter uma mistura adequada no início devido à consistência elevada (Chilari *et al.*, 2017). Para ultrapassar este obstáculo e o da incompatibilidade entre as temperaturas ótimas para a hidrólise e para a fermentação, Wu e Lee (1998) sugeriram o processo de sacarificação e fermentação simultâneas não isotérmicas (NSSF – *Nonisothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation*), abordado e analisado nesta dissertação. Este processo possui as vantagens tanto do SSF, como as do SHF, porque utiliza uma pré-hidrólise antes da fermentação e não remove o produto obtido na reação de hidrólise com intuito de induzir o processo SSF. A pré-hidrólise é conduzida sob condições ideais, ou seja, a uma temperatura em que a atividade da enzima é máxima. Neste método, a concentração de substrato não é muito elevada, o que é um benefício, pois concentrações elevadas de substrato durante a fermentação aumentam a possibilidade de aparecimento de substâncias inibidoras que provocam diminuições no rendimento em etanol (Jorgensen *et al.*, 2007). Além disso, este método aumenta a eficiência de conversão enzimática, e consequentemente a produtividade e rendimento do produto, e, para se atingir o mesmo grau de conversão da BLC pode usar-se muitos menos quantidade de enzima do que no processo SSF.

A Tabela 2.8 apresenta um resumo de estudos sobre a produção de bioetanol a partir de BLC encontrados na literatura, usando tanto o processo SSF como o NSSF.

Tabela 2.8 – Estudos de SSF e NSSF usando diferentes BLCs e microrganismos. Condições: temperatura de pré-hidrólise de 50°C no processo NSSF e temperatura de operação de 40°C no processo SSF

Matéria-prima	Microrganismo	Método	t _{hidrólise} (h)	T _{fermentação} (°C)	[EtOH] (g L ⁻¹)	Y _{EtOH}	Referência
Switchgrass	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 26603	NSSF	10-20	-	-	~ 0.620 g/gGlucose	Wu e Lee, 1998
		SSF			16.0*	0.303 g/gCelulose	
Solka Floc 200 (celulose em pó)	<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y01070	SSF	24	30	17.8*	0.337 g/gCelulose	Kádár <i>et al.</i> , 2004
		NSSF			15.1*	0.287 g/gCelulose	
	SSF	16.6*			0.314 g/gCelulose		
	NSSF	6.3*			0.246 g/gCelulose		
Lamas de papel	<i>S. cerevisiae</i>	SSF	24	30	8.8	0.325 g/gCelulose	Kádár <i>et al.</i> , 2004
		NSSF			7.0*	0.259 g/gCelulose	
	SSF	9			0.334 g/gCelulose		
	NSSF	7.0*			0.259 g/gCelulose		
Junco (<i>Reed</i>)	<i>S. cerevisiae</i>		12	36	17.0**	-	Lu <i>et al.</i> , 2013
	<i>S. cerevisiae</i>		18	36	39.4***	-	
Reed (<i>Whole slurry</i>)	<i>S. cerevisiae</i>		12	36	12.0**	-	
Celulose microcristalina	<i>S. cerevisiae</i> <i>TJ14</i>		24	39	45	-	Shahsavara ni <i>et al.</i> , 2013
		NSSF	6	30	~15.49 ^a	0.33 g/gcelulose	
Caule de algodão	Fermento padeiro seco		14	30	~21.85 ^b	14.57 g/100gATCS	Chilari <i>et al.</i> , 2017
			~34.38 ^c		17.40 g/100gATCS		
			~21.68 ^b		14.45 g/100gATCS		
		24	~33.80 ^c		16.94 g/100gATCS		

Y_{EtOH}, rendimento de etanol; *, obtida depois de 72h de fermentação; **, obtida depois de 48h de fermentação; ***, carga enzimática de 30-40 FPU_{celulase}/g_{Reed}; ^a, obtida depois de 24h de fermentação com uma carga enzimática de 40 FPU/g_{celulose} e 15% (m/v) de substrato; ^b, obtida depois de 24h de fermentação com uma carga enzimática de 80 FPU/g_{celulose} e 15% (m/v) de substrato; ^c, obtida depois de 24h de fermentação com uma carga enzimática de 80 FPU/g_{celulose} e 20% (m/v) de substrato; ATCS, caule de algodão tratado com tratamento alcalino (*alkali treated cotton stalks*)

Kádár *et al.* (2004) compararam os métodos SSF e NSSF na produção de etanol, usando diferentes tipos de matéria-prima e de microrganismos fermentadores (Tabela 2.8). O SSF foi mais eficiente com resultados superiores de rendimento e concentração de etanol para ambas as matérias-primas. Quanto ao desempenho das diferentes leveduras aplicadas, não houve diferença significativa observada, obtendo os rendimentos de etanol semelhantes. Quanto ao tipo de matéria-prima, a Solka-Floc (celulose em pó) foi a que permitiu obter uma maior concentração de etanol, devido à concentração de celulose substancialmente mais elevada na sua composição. No entanto, as frações de conversão de celulose calculadas a partir do etanol produzido encontravam-se na mesma gama (58-60%), o que indica que tanto a Solka Floc como as lamas de papel eram substratos adequados para a produção de etanol. Os rendimentos de etanol foram considerados bastante baixos (0.25 – 0.34 g_{etanol}/g_{celulose}), uma vez que cerca de 40% da celulose não foi utilizada, em ambas as matérias-primas. Supõe-se que o alto teor de

matéria seca inicial, 6% em peso de substrato, que pode causar problemas de transferência de massa, pode ter sido responsável pelos baixos rendimentos de etanol obtidos.

Lu *et al.* (2013), estudaram a utilização de junco (*Reed*) no processo de obtenção de bioetanol pelo método NSSF, usando o modo de operação *fed-batch*. A matéria-prima foi pré-tratada a partir do método de *Liquid Hot Water* (LHW), às temperaturas de 180 e 210 °C, dando origem a uma fracção sólida (maioritariamente celulose) e uma fracção líquida (maioritariamente hemiceluloses). Utilizaram a fracção sólida como substrato no NSSF, comparando depois com a utilização conjunta das duas fracções (“lamas” ou *whole slurry*) no mesmo tipo de processo. Os autores obtiveram melhores resultados de concentração de etanol quando aplicaram apenas a fracção sólida (~17 e 20 g L⁻¹, para os casos de pré-tratamento a 180 e 210°C, respetivamente), comparativamente com o uso das “lamas” (~12 g L⁻¹, para o caso do pré-tratamento a 180 °C). Para o caso do pré-tratamento a 210 °C, não verificaram a produção de etanol a partir das “lamas”, apesar de se terem produzido cerca de 14 g L⁻¹ de glucose durante a pré-hidrólise, ou seja, a hidrólise enzimática não foi inibida, mas não houve consumo de glucose por parte do microrganismo fermentador. Tomas-Pejo *et al.* (2008) obtiveram resultados semelhantes. Lu *et al.* (2013) avaliaram também o efeito da temperatura de fermentação ($T_{\text{fermentação}}$) na produção de etanol. Houve um consumo rápido e contínuo da glucose às temperaturas de 33, 36 e 39 °C, mas quando a $T_{\text{fermentação}}$ foi elevada para 42 °C a glucose foi consumida lentamente, apresentando uma taxa de consumo de glucose menor do que nos outros casos. Além disso, a atividade da levedura *S. cerevisiae* decresceu com a elevação da $T_{\text{fermentação}}$ para 42 °C. Na Figura 2.5 estão ilustrados perfis de evolução de etanol e glucose para diferentes temperaturas de fermentação.

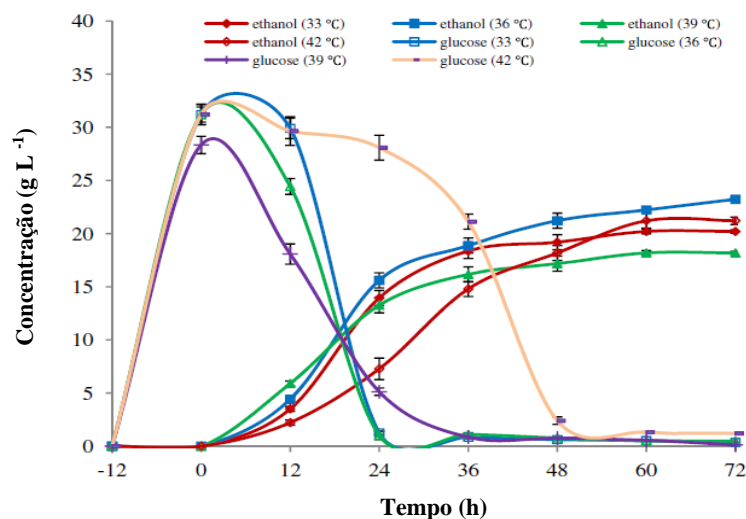


Figura 2.5 - Concentrações de etanol e glicose ao longo do processo NSSF, aplicando diferentes temperaturas de fermentação. O tempo 0 h equivale ao momento em que foi adicionado o inóculo da levedura, iniciando a etapa de fermentação, sendo que a pré-hidrólise decorreu no intervalo [-12; 0] h (Lu *et al.*, 2013).

Os resultados indicam que a concentração de etanol foi mais elevada quando a $T_{\text{fermentação}}$ foi de 36 °C (cerca de 21 g L⁻¹ de etanol durante 48 h de fermentação). Uma concentração máxima de etanol foi depois obtida (39.4 g L⁻¹, para 60 h de fermentação) por estes autores, quando o tempo de pré-hidrólise foi de 18 h com uma carga enzimática de 30-40 FPU_{celulase}/g_{Reed} e a $T_{\text{fermentação}}$ de 36 °C.

Outro estudo mostrou que a *S. cerevisiae* poderia produzir etanol a 39 °C quando 10% de celulose é usada como substrato (Shahsavarani *et al.*, 2013). Shahsavarani *et al.* (2013), estudaram a aplicação da *S. cerevisiae* termotolerante (*S. cerevisiae* TJ14) no processo de obtenção de etanol pelo método NSSF, usando a celulose microcristalina como matéria-prima. Estes autores alcançaram uma concentração de etanol de 45 g L⁻¹ às 100 h de fermentação. A celulase utilizada neste estudo para a realização da sacarificação enzimática foi a Accelerase 1500 (Genencor, Rochester, NY, USA).

Chilari *et al.* (2017) avaliaram a viabilidade da produção de etanol pelo método NSSF, usando caule de algodão pré-tratado como substrato. A enzima utilizada foi a Cellic CTec2 fornecida pela Novozymes Corporation (Dinamarca) e a fermentação foi realizada usando fermento de padeiro seco. O material pré-tratado foi hidrolisado aplicando diferentes cargas de enzima (7 a 80 FPU/g_{celulose}) e 15% (m/v) de substrato, sendo que a maior concentração de glicose (~69 g L⁻¹) foi obtida quando se usou a maior carga enzimática. Quanto à produção de etanol, o aumento da carga enzimática para 40 FPU/g_{celulose} resultou num aumento de produção de etanol. No entanto, quando a carga foi aumentada de 40 para 80 FPU/g_{celulose} não houve aumento significativo na produção de etanol, obtendo-se concentrações de etanol de aproximadamente 15.49 e 15.95 g L⁻¹, respetivamente. Além disso, estes autores avaliaram o efeito da concentração de substrato e do tempo de pré-hidrólise usando em todos os casos 80

FPU/g_{celulose}. Quando o tempo de pré-hidrólise foi alterado de 6 para 14 h, verificou-se um aumento de 33.1% na quantidade de glucose produzida antes do início da fermentação, originando conseqüentemente uma concentração de etanol de 21.85 g L⁻¹ (para 15% (m/v) de substrato). A maior concentração de etanol, 34.38 g L⁻¹, foi obtida quando a concentração de substrato aumentou para 20% (m/v) e o tempo de pré-hidrólise foi de 14 h, como apresentado na Tabela 2.8.

2.3. Configuração de Biorreatores

Um reator biológico ou biorreator é essencialmente constituído por um sistema de agitação, controlo de espuma, sistema de fornecimento de oxigénio, volume de *headspace*, porta de amostragem, sistema de controlo de temperatura e pH, sistema de esterilização e linhas para carregar e esvaziar o reator (Alaghlavi *et al.* 2013).

A seleção do tipo de biorreator e o seu respetivo dimensionamento são etapas específicas, mas podem ser seguidos alguns princípios fundamentais (Wang e Zhong, 2007). É necessário um controlo da temperatura e do pH para garantir as condições ideais requeridas pelo sistema biológico, mais especificamente, para a enzima e para a cultura de microrganismos. Também é necessário garantir uma mistura adequada para que haja interação da enzima com a biomassa, e dos microrganismos com os açúcares fermentáveis, de modo a aumentar a eficiência dos bioprocessos (Gaikwad *et al.*, 2018; Pino *et al.*, 2018). Nestes sistemas, é essencial que haja diminuição das resistências à transferência de massa e calor, e que se avalie a sensibilidade ao cisalhamento, ou seja, o grau de suscetibilidade a forças de corte quando aplicada uma agitação excessiva, que pode causar uma redução na atividade enzimática (Pino *et al.*, 2018; Wang e Zhong, 2007). Um biorreator deve proporcionar um ambiente controlado para aumentar o crescimento celular, a conversão do substrato e a produtividade do processo biológico, fornecer produtos de qualidade elevada e minimizar o custo global de produção dos produtos pretendidos (Gaikwad *et al.*, 2018; Wilkins e Atiyeh, 2012).

2.3.1. Modos de operação

Independentemente da configuração e geometria do biorreator, existem 3 modos de operação principais de acordo como a forma como o substrato é fornecido, nomeadamente: descontínuo (*batch*), semi-descontínuo (*fed-batch*) e contínuo (*continuous*) com e sem recirculação.

2.3.1.1. Operação em descontínuo

O modo de operação em descontínuo é um modo de produção amplamente utilizado em processos de produção de bioetanol. Além disso, é o modo de operação mais usado industrialmente em processos biotecnológicos. Neste modo operacional, o substrato é inicialmente carregado no biorreator sem alimentação adicional ou remoção de substâncias do sistema (geralmente designado por processo fechado), o que implica que o volume permanece constante desde o início até ao final da reação (Asenjo e Yamane, 2015; Chang *et al.*, 2012). Adicionam-se os reagentes no início, e durante a fermentação nenhum outro reagente é adicionado, com exceção das bases ou ácidos caso se pretenda controlar o pH. Por este motivo, a operação em descontínuo apresenta baixos custos e um risco reduzido de contaminação. No entanto, pode ocorrer a acumulação de metabolitos tóxicos que podem limitar o crescimento do sistema biológico, afetando conseqüentemente a formação do produto pretendido (Pino *et al.*, 2018). As concentrações iniciais de substrato podem ter de ser limitadas devido a problemas de inibição por substrato, afetando a produção.

2.3.1.2. Operação semi-descontínua

No modo semi-descontínuo ocorre a adição intermitente de nutrientes durante o processo de sacarificação enzimática, de forma que o processo receba substrato fresco em períodos de tempo estabelecidos (Chang *et al.*, 2012). Este é um modo de operação promissor, pois promove a homogeneização da biomassa do sistema biológico, resultando em rendimentos de conversão superiores do que no processo descontínuo (Furlong, 2015; Hodge *et al.*, 2009). Além disso, evita a consistência excessiva do substrato, o que permite trabalhar com uma carga elevada de sólidos, possibilita um maior período de tempo para ocorrer a hidrólise da biomassa pré-tratada em açúcares fermentáveis, permite aumentar a concentração inicial de substrato e diminuir os problemas de inibição (Chen *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2014).

2.3.1.3. Operação em contínuo

Nos processos de modo contínuo, o substrato é continuamente alimentado ao biorreator e os produtos são continuamente removidos, com a mesma taxa de fluxo de alimentação, desde o início até à fase final, de modo a atingir um estado estacionário, onde o volume de líquido se mantém constante. Eliminam o problema de inibição por substrato, pois permitem minimizar a

concentração do mesmo dentro do reator (Al-Zuhair *et al.*, 2013). Neste modo de operação, o controlo de temperatura é mais simples do que no modo semi-descontínuo (Pino *et al.*, 2018).

A maioria dos processos com microrganismos é realizada em modo descontínuo ou semi-descontínuo, devido à dificuldade e baixa/média capacidade de produção contínua no caso dos processos microbianos industriais (Garcia-Ochoa *et al.*, 2011).

Os reatores de tanques agitados (STBR), colunas de bolhas (BCR), colunas empacotadas, circulação por arejamento (air-lift), leito fixo, leito fluidizado e reatores de membrana de fibra oca (HFR) são algumas das configurações de biorreatores mais usadas, tanto a pequena como a grande escala (Singhal *et al.*, 2018). O biorreator de tanque agitado (STBR) é a configuração de reator mais utilizada nos processos industriais, apresentando diversos benefícios, como robustez, facilidade de operação, bom controlo de temperatura, adequado para viscosidades elevadas e grandes volumes de mistura reacional (Gaikwad *et al.*, 2018; Pino *et al.*, 2018). Visto que na presente dissertação foi utilizado esse tipo de configuração, o biorreator de tanque agitado será descrito com maior detalhe.

2.3.2. Biorreatores de tanque agitado (STBR)

Como o nome já diz, o princípio básico dos biorreatores de tanques agitados (STBR) é a agitação que conduz a condições uniformes de concentração e temperatura em todo o volume do reator. É o tipo de biorreator mais usado em sistemas biológicos, em cerca de 90% dos bioprocessos industriais, tanto microbianos como enzimáticos (Garcia-Ochoa *et al.*, 2011). Consiste num vaso de reação cilíndrico, em vidro ou aço inoxidável, com uma ou mais Turbinas associadas a um veio de agitação. Um impulsor ou mais são montados num eixo ligado a uma caixa de velocidades e a um motor, utilizado para o controlo da velocidade de rotação. O impulsor uniformiza as suspensões auxiliando a transferência de calor e massa. A entrada de energia para a rotação do agitador é um parâmetro económico crucial que determina a sustentabilidade económica do bioprocessos.

Os STBR podem ser construídos por diversos tipos de materiais, nomeadamente vidro, aço inoxidável ou carbonato, sendo que os usados a escala laboratorial são geralmente feitos à base de vidro. No caso de processos aeróbicos, são necessários dispositivos para a injeção de ar ou oxigénio no biorreator, situados na base do mesmo. Na Figura 2.6, encontra-se uma representação esquemática de um STBR com os seus componentes principais e com as dimensões mais importantes que devem ser tidas em conta para o projeto de um biorreator, respetivamente.

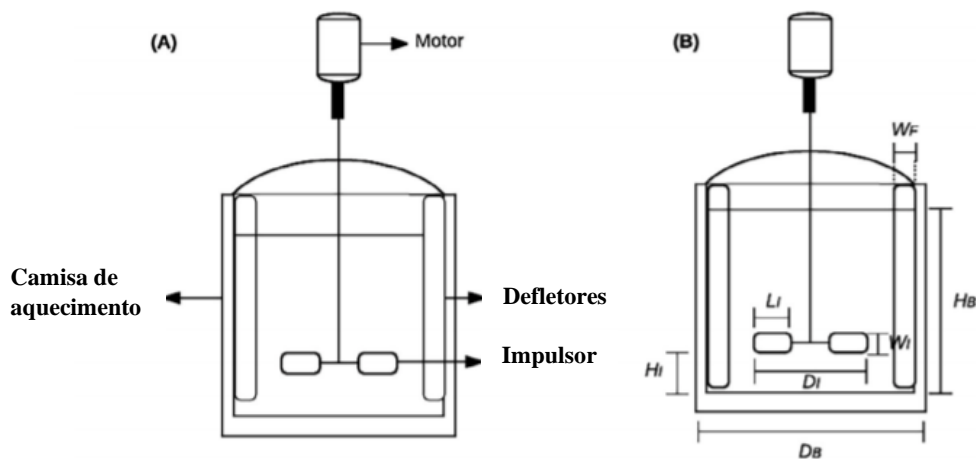


Figura 2.6 - (A) Representação esquemática do biorreator do tanque agitado, (B) Nomenclatura para dimensionamento STBR (WF: Largura dos defletores ou chicanas, WI: Largura do impulsor, DI: Diâmetro do impulsor, DB: Diâmetro do biorreator, HB: Altura do biorreator, HI: Altura entre os impulsores e a parte inferior do biorreator, LI: Comprimento dos impulsores). (Modificado e adaptado de Garcia-Ochoa *et al.*, 2011)

No âmbito do projeto de um STBR, alguns parâmetros normalmente usados são os seguintes:

- Razão entre diâmetro do impulsor e o diâmetro do tanque (DI/DB): 0.3 – 0.6
- Proporção entre a altura do biorreator e o diâmetro do mesmo (HB/DB): 2:1 ou 3:1
- Razão LI/DI : 0.25, WI/DA : 0.2, HI/DA : 1 e WF/DB : 0.1.
- A largura do defletor é 1/10 ou 1/12 do diâmetro do tanque
- Uma lacuna de cerca de 1,5% do diâmetro do tanque é deixada entre a parede e o defletor para evitar a estagnação do fluido perto da parede.

Somente 75–80% do volume dos STBR é preenchido com líquido, de modo que se tenha um espaço livre adequado para a libertação de gotículas dos gases de escape e para acomodar qualquer espuma que se possa formar (Catapano *et al.*, 2009; Garcia-Ochoa *et al.*, 2011). A formação de espuma pode ser reduzida por adição de um agente anti-espuma.

2.3.3. Sistemas de agitação e aquecimento

A agitação confere uma mistura uniforme das células, facilita a transferência de massa e calor durante o processo, e mantém o meio uniforme no fermentador. Têm sido estudados diferentes tipos de sistemas de agitação com o objetivo de aumentar a conversão e reduzir o consumo de energia elétrica (Gaikwad *et al.*, 2018; Pino *et al.*, 2018).

O padrão de fluxo de líquido estabelecido nos reatores agitados depende do projeto do agitador ou impulsor, do tamanho e geometria do vaso e das propriedades do fluido. Existem

dois eixos direcionais para o fluxo, o radial (ou horizontal) e o axial (ou vertical), e como tal existem impulsores de fluxo radiais e impulsores de fluxo axiais (Pino *et al.*, 2018; Wang e Zhong, 2007). Na Figura 2.7 são apresentados os diferentes modelos de fluxo supracitados.

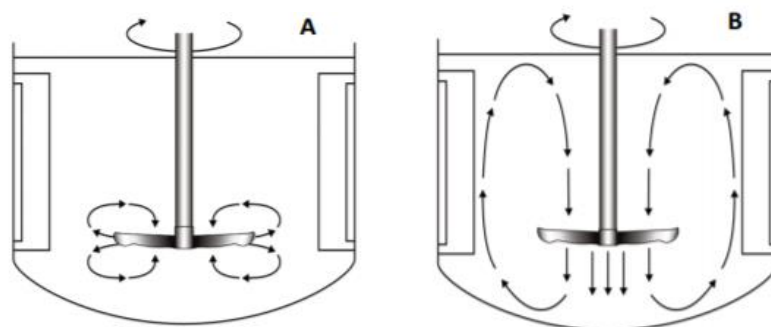


Figura 2.7 - Modelos de fluxo de impulsores (A) radiais e (B) axiais.

A maioria dos biorreatores são equipados com impulsores de fluxo radial. Porém, a grande desvantagem deste é que cria um padrão de mistura em estágios, onde a interação enzima-substrato não é uniforme. Com intuito de ultrapassar este obstáculo, têm sido desenvolvidos diversos sistemas de agitação que combinam impulsionadores axiais e radiais (Carvajal *et al.*, 2012; Caspeta *et al.*, 2014; Correâ *et al.*, 2016; Wang e Zhong, 2007). Para vasos de grande escala, são frequentemente instalados vários impulsores com o intuito de se alcançar mistura homogênea, velocidade de impulsor mais baixa e transferência de massa suficientes. Os defletores são usados para reduzir a ocorrência de vórtice no biorreator. No entanto, é necessário ter cuidado com a velocidade de agitação, pois velocidades elevadas podem danificar ou destruir as células ou determinados catalisadores.

Existem diversas configurações de impulsores que são usados em STBRs para os processos de hidrólise enzimática e fermentação. No entanto, cada um apresenta perfil de fluido específico, padrão de fluxo e desempenho. A seleção deste tipo de equipamentos depende de vários fatores, incluindo a viscosidade da mistura, a necessidade de fluxos de não cisalhamento e a necessidade de correntes líquidas fortes (Pino *et al.*, 2018). Dentro dos vários tipos de impulsores radiais existem a Turbina *Rushton* (Figura 2.8 A), a Turbina de disco de lâmina côncava, o impulsor de três lâminas retas/radiais. Por outro lado, entre os exemplos de impulsores de fluxo axial incluem-se a hélice marinha (Figura 2.8 B) e as Turbinas de três lâminas inclinadas.

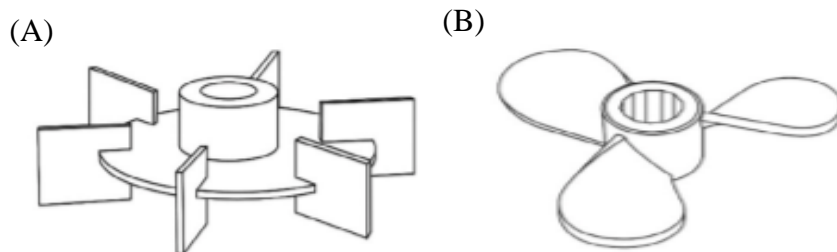


Figura 2.8 – Impulsores de fluxo radial e axial: (A) Turbina *Rushton* e (B) Hélice marinha, respetivamente (Pino *et al.*, 2018)

A Turbina *Rushton* é frequentemente usada em fermentação microbiana devido à sua excelente característica de mistura. Por outro lado, é menos adequada para cultura de células frágeis, pois requer uma velocidade de impulsor bastante elevada para se obter uma mistura suficiente, o que danifica as células sensíveis ao cisalhamento (Catapano *et al.*, 2009). Como já foi referido, o uso deste tipo de impulsor pode resultar num padrão de mistura em estágios, ocorrendo maior transferência de massa junto ao impulsor em relação ao volume de trabalho, onde a interação enzima substrato não é uniforme. Além disso, um estudo feito por Zhang *et al.*, (2010) comprovou que a Turbina *Rushton* não é adequada para fluidos de viscosidade elevada. Os impulsores de fluxo axial são muito usados quando o objetivo é alcançar padrões de mistura aperfeiçoados (Kadic e Heindel, 2014). Além de oferecer melhor homogeneização do meio comparativamente à Turbina *Rushton*, a hélice marinha é um impulsor que apresenta uma elevada capacidade de fluxo e produz padrões de fluxo intermédios. É normalmente utilizada em fluidos de baixa a média viscosidade. Quando o ângulo das lâminas é de 45° da horizontal, sendo que o mesmo pode variar entre 45 a 60°, é provocada uma componente radial de fluxo significativa, independentemente do tamanho ou posição do impulsor. Neste caso, a Turbina de lâminas inclinadas é classificada como um impulsor misto na família axial, tornando-a num excelente dispositivo de mistura, por permitir a diminuição do tempo de mistura, e conseqüentemente a melhoria da transferência de calor e massa (Doran, 2013 a); Kadic e Heindel, 2014).

Nos bioprocessos de produção de etanol a partir de BLC pré-tratada o substrato usado apresenta normalmente viscosidade ou consistência elevada. Em fluidos viscosos, muitas vezes é impossível, por razões mecânicas ou económicas, girar o impulsor com rapidez suficiente para gerar turbulência. Neste caso, impulsores como o impulsor de *ribbon* helicoidal e o impulsor de âncora são considerados como alternativa para proporcionar misturas mais eficientes. Os impulsores de *ribbon* helicoidal (Figura 2.9 A) são usados principalmente para fluidos não newtonianos e substratos com viscosidade elevada que comumente apresentariam dificuldade na sua agitação. Proporcionam uma mistura eficiente e requerem menor consumo de energia (Modenbach e Nokes, 2013; Volynets *et al.*, 2016). Possuem uma maior área de contato superficial, quando comparados com o impulsor de âncora. O impulsor âncora (Figura

2.9 B) é a configuração recomendada para fluidos viscosos, pois as suas pás funcionam como raspadores que evitam a estagnação do material nas paredes do biorreator (Peixoto *et al.*, 2000). Esse tipo de impulsor ajuda a gerar um maior fluxo radial no biorreator.

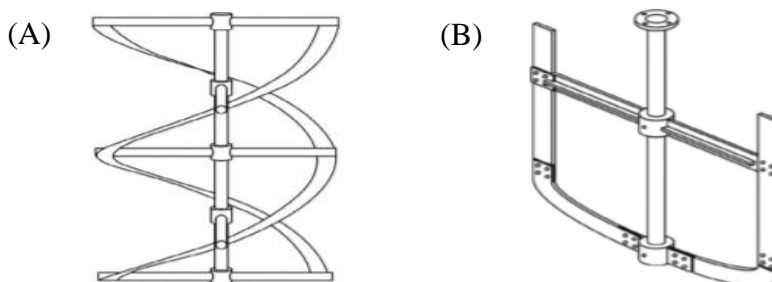


Figura 2.9 - Impulsor de (A) *ribbon* helicoidal e (B) de âncora (Pino *et al.*, 2018)

Independentemente da configuração específica do biorreator, o vaso reacional deve possuir outras características comuns, como um dispositivo de transferência de calor; portas para sensores de pH, temperatura e oxigênio dissolvido. É necessário que haja transferência de calor para que se possa controlar a temperatura, pois o calor da reação e a atividade metabólica das células absorvem ou geram calor (Garcia-Ochoa *et al.*, 2011; Pino *et al.*, 2018). Outro fator chave para o controle de temperatura é que tanto os microrganismos como as enzimas possuem temperaturas ótimas de funcionamento, ou seja, a maioria das fermentações ocorre no intervalo de 30 a 38°C, uma vez que envolvem microrganismos mesófilos, enquanto as hidrólises enzimáticas ocorrem mais frequentemente no intervalo de 45 a 50°C, pelo que é necessário um controle rigoroso da temperatura de cerca de $\pm 1^\circ\text{C}$ (Doran, 2013 b).

Existem diversas formas para fornecer aquecimento e arrefecimento ao biorreator, e cada uma delas depende do tamanho do biorreator. Os reatores de pequena escala (frascos agitados ou *Erlenmeyers*) podem ser colocados em uma incubadora. Os reatores de bancada podem ser constituídos por uma camisa de aquecimento, sendo este o método geralmente utilizado para biorreatores de pequena escala (Catapano *et al.*, 2009; Pino *et al.*, 2018). Os biorreatores de maiores dimensões podem ser equipados com permutador de calor externo, uma camisa de aquecimento ou com uma serpentina, como mostra a Figura 2.10.

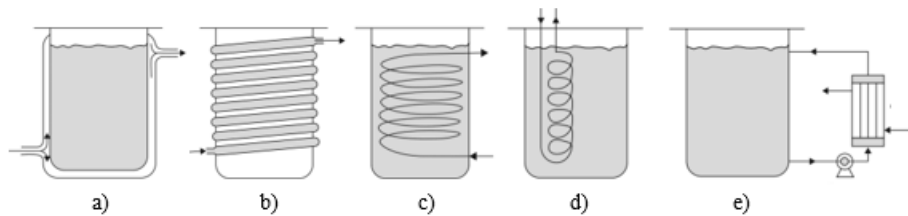


Figura 2.10 - Configurações de transferência de calor para biorreatores: a) camisa de aquecimento; b) serpentina externa; c) serpentina helicoidal interna; d) serpentina interna do tipo defletor; e) permutador de calor externo (adaptado de Doran, 2013 b); Fonseca e Teixeira, 2017).

As bobinas ou serpentinas externas proporcionam baixa área de transferência de calor, por isso são raramente usadas em escala industrial. Por outro lado, as bobinas internas podem ser operadas sob diversas velocidades de agitação do caldo contido dentro do reator e são frequentemente utilizadas em tanques de grande escala, pois fornecem uma área de transferência de calor relativamente grande. No entanto, este tipo de aquecimento apresenta algumas desvantagens, como o crescimento do filme de células na superfície do dispositivo de transferência de calor, interferência na mistura do vaso e dificulta a limpeza do reator (Catapano *et al.*, 2009; Garcia-Ochoa *et al.*, 2011).

As unidades de transferência de calor externas são independentes do reator, são mais fáceis de aumentar e fornecem maior e melhor capacidade de transferência de calor. No entanto, as condições de esterilidade devem ser mantidas, as células devem ser capazes de suportar as forças de cisalhamento, e, em bioprocessos aeróbicos, o tempo de residência no permutador de calor deve ser o menor possível para garantir que o meio não fique isento de oxigênio (Garcia-Ochoa *et al.*, 2011).

3. Materiais e métodos

3.1. Biomassa lenhocelulósica

Para a realização deste trabalho foram utilizadas duas matérias-primas, nomeadamente: i) a pasta de casca de *Eucalyptus globulus* (Figura 3.1 A), obtida através de um pré-tratamento da casca com cozimento kraft e ii) as lamas primárias provenientes da indústria da pasta e do papel, utilizadas tal qual (Figura 3.1 B) e com aplicação de pré-tratamento (Figura 3.1 C) com HCl para a remoção de carbonato de cálcio (CaCO_3).

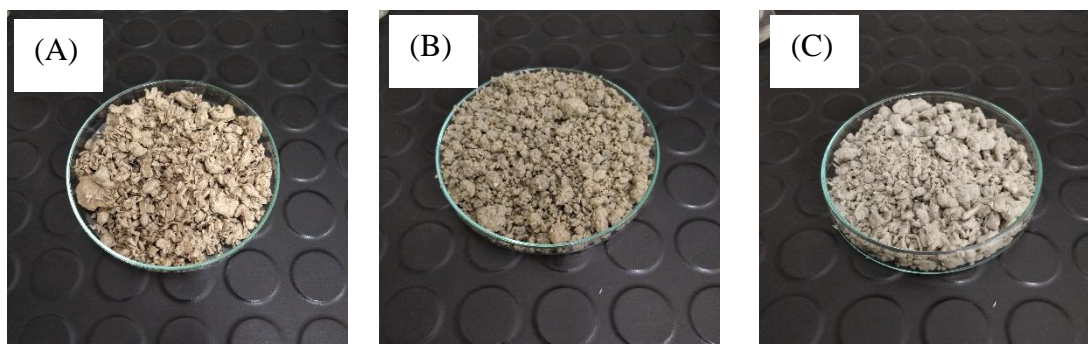


Figura 3.1 - Matéria-prima usada nos ensaios.: (A) Pasta crua Kraft de casca, (B) Lamas primárias e (C) Lamas primárias tratadas com HCl.

A determinação da composição química das diferentes matérias-primas lenhocelulósicas foi feita tendo em conta parâmetros como os teores de sólidos (ou de secura), de hidratos de carbono (celulose e hemiceluloses), de lenhina (solúvel e insolúvel), de cinzas, de CaCO_3 (para o caso das lamas). A caracterização química das matérias-primas foi baseada nos protocolos do Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL – *National Renewable Energy Laboratory*, EUA). Na Tabela 3.1 apresenta-se a composição química determinada para os diferentes tipos de BLC.

Tabela 3.1 - Composição química da pasta kraft de casca e das lamas primárias

Matéria-prima	Secura (g/g)	Composição (% , em base seca)				
		Lenhina total	Glucanas	Xilanas	Cinzas	CaCO_3
Pasta kraft de casca	0.9230	2.6	79.8	15.5	2.1	não determinado
Lamas primárias	0.2344	2.5	62.2	14.3	20.7	17.3
Lamas primárias tratadas com HCl (lote 1)	0.2062	2.6	76.4	16.0	4.3	3.3
Lamas primárias tratadas com HCl (lote 2)	0.2407	2.3	76.1	17.3	3.0	não determinado

3.2. Enzima e microrganismo usados nos bioprocessos

O complexo enzimático utilizado nos ensaios realizados neste trabalho foi a Cellic® CTec2, fornecida pela Novozymes. É um complexo enzimático constituído por uma mistura de celulases, hemicelulases e β -glucosidases e tem intervalos de temperatura e pH ótimos entre 45 – 50 °C e 5.0 – 5.5, respetivamente.

A atividade enzimática foi determinada segundo o método *Filter Paper Unit* (FPU) para as temperaturas de 38 e 50 °C, de acordo com o procedimento padrão do NREL (NREL, 2008) (Anexo IX). O conhecimento acerca da atividade da enzima permite calcular o volume de solução enzimática necessário para obter a carga enzimática estabelecida para os ensaios. A Tabela 3.2 apresenta os valores da atividade enzimática determinados para as duas temperaturas acima referidas.

Tabela 3.2 - Atividade enzimática da enzima para as temperaturas de 38°C e 50°C.

Enzima	Atividade enzimática (FPU/ mL _{enzima})	
	38°C	50°C
Cellic® CTec2	64.91	160.87
Cellic® CTec2*	59.68	176.20

*, novo frasco de enzima.

O microrganismo utilizado neste trabalho para realizar a fermentação dos açúcares simples (nomeadamente glucose) em etanol foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC® 26602 (*American Type Culture Collection*), pois esta levedura consegue fermentar uma ampla gama de hexoses (glucose, manose, galactose) e dissacarídeos (sacarose e maltose).

O inóculo foi preparado de acordo com o meio de cultura universal para leveduras (YM – *Yeast Medium*), composto por 10 g L⁻¹ de glucose, 5 g L⁻¹ de pentose, 3 g L⁻¹ de extrato de malte e 3 g L⁻¹ de extrato de levedura. Foi preparado meio de cultura sólido (YM com 15 g L⁻¹ de agar) para que as leveduras se multiplicassem e pudessem ser conservadas em ambiente refrigerado. Posteriormente, foram preparados meios de cultura líquido em balões de *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 100 mL de caldo YM, onde foram inoculadas células de levedura. As culturas foram mantidas numa incubadora orbital a 30 °C e 150 rpm, durante cerca de 12 h para se atingir a fase de crescimento da levedura. Após incubação, as culturas foram transferidas para os biorreatores, e usadas como inóculo com intuito de dar início à fermentação tanto no processo SSF, como no processo NSSF. O procedimento para a preparação da solução de tampão citrato 0.05 M encontra-se no Anexo III e, os procedimentos para a preparação do meio de cultura líquido, solução de nutrientes e da solução enzimática encontram-se no Anexo IV.

3.3. Métodos de produção de bioetanol

A produção de bioetanol foi realizada seguindo duas estratégias diferentes de integração dos bioprocessos, nomeadamente o método de sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF) e o método de sacarificação e fermentação em simultâneo não isotérmicas (NSSF), sendo que ambos foram realizados em modo descontínuo.

Todos os ensaios foram realizados em biorreatores (600 mL de capacidade, Figura 3.2) com camisa de aquecimento usando diferentes tipos de agitadores ou impulsores, como a Turbina *Rushton* (Figura 3.3 A) e o agitador âncora com quatro pás retas/radiais (Figura 3.3 B). Ambos os impulsores utilizados, são impulsores de fluxo radial. A grande diferença entre os dois é que o segundo cria um fluxo radial mais elevado dentro do reator, provocando consequentemente uma diminuição no tempo necessário para a homogeneização da mistura presente no reator, um aumento da transferência de massa e consequentemente aumento da eficiência da hidrólise enzimática.



Figura 3.2 – Vaso reacional/ biorreator utilizado.

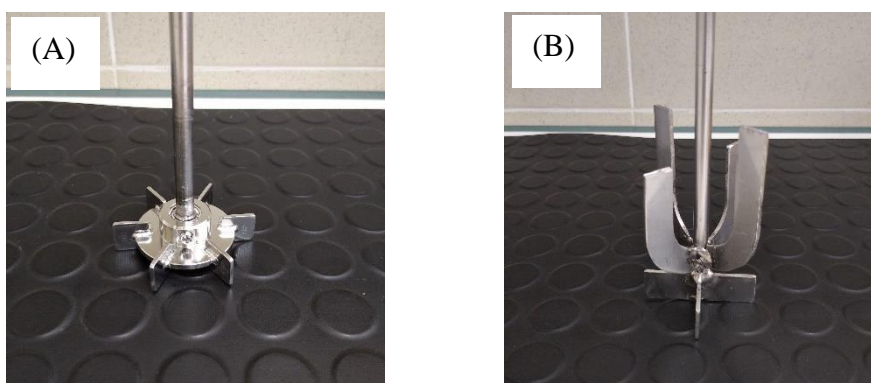


Figura 3.3 - Impulsores utilizados nos bioprocessos: (A) Turbina *Rushton* e (B) Âncora com quatro pás retas radiais.

3.3.1. Sacarificação e fermentação em simultâneo (SSF)

Os ensaios realizados com o processo SSF foram baseados no protocolo do NREL (Dowe e McMillan, 2001) e em trabalhos anteriores (Mendes et al., 2016). A preparação dos ensaios SSF iniciou-se com a pesagem da matéria-prima selecionada no vaso reacional e esterilização da mesma numa autoclave a 121°C durante 15 min. Depois da amostra estar esterilizada e arrefecida, procedeu-se à instalação da tubagem que possibilitou a circulação da água proveniente do banho termostático (Thermonix ® B) pela camisa de aquecimento do biorreator e ligou-se o termostato a 38 °C. O impulsor foi acoplado no veio da cabeça de agitação mecânica (RSLab-13) e colocado no interior do vaso reacional, ajustando-se depois a tampa que sela o reator. De seguida, adicionou-se a solução de tampão citrato de 0.05 M, a solução de extrato enzimático, a solução de nutrientes, o inóculo fresco, previamente preparados e esterilizados, e iniciou-se a operação. Na figura 3.4 está ilustrada a instalação do sistema de agitação e aquecimento do biorreator.

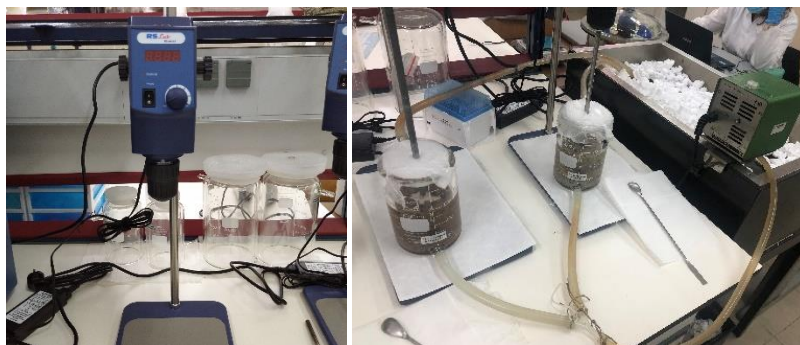


Figura 3.4 - Instalação do sistema de agitação mecânica e das ligações à camisa de aquecimento do biorreator.

Foram estabelecidas algumas condições que se mantiveram constantes para todos os ensaios: massa total de suspensão, $m_{\text{suspensão}}$, (350 g), consistência do substrato (8% ou 8 g_{material seco} em 100 g_{suspensão}), carga enzimática (25 FPU de enzima por grama de hidratos de carbono, FPU/g_{H₂C}), temperatura de operação (38 °C), volume de inóculo (10% do volume de suspensão), concentração de suplementos nutricionais (5 g L⁻¹ de pentose, 3 g L⁻¹ de extrato de malte e 3 g L⁻¹ de extrato de levedura) e velocidade de agitação (~150 rpm). Na Tabela 3.3 estão apresentadas as condições operatórias variadas na realização dos ensaios de SSF para a pasta kraft de casca e para as lamelas primárias.

Tabela 3.3 - Condições operatórias variadas nos ensaios SSF

Ensaio	Variável	
	Matéria-prima	Tipo de impulsor
KA1	Pasta kraft de casca	Turbina <i>Rushton</i>
KA2		Âncora com 4 pás retas/radiais
LA1	Lamas primárias	Turbina <i>Rushton</i>
LTA1	Lamas primárias tratadas	Turbina <i>Rushton</i>
LTA2		Âncora com 4 pás retas/radiais

3.3.2. Sacarificação e fermentação em simultâneo não isotérmicas (NSSF)

Para a realização dos ensaios de sacarificação e fermentação em simultâneo não isotérmicas (NSSF) foram usados os mesmos tipos de agitadores e de biorreator que nos ensaios SSF. Os biorreatores e os passos para a instalação do sistema de agitação e de aquecimento do biorreator são semelhantes aos do processo SSF. A grande diferença entre os ensaios SSF e NSSF é que no segundo existe um tempo de pré-hidrólise, e somente depois deste tempo, pré-estabelecido, é que se adiciona o inóculo fresco e a respetiva solução de nutrientes ao biorreator, com intuito de dar início à fermentação e induzir o SSF. Além disso, a pré-hidrólise e a fermentação são realizadas em temperaturas diferentes. Foram estabelecidas algumas condições para os ensaios, como $m_{\text{suspensão}}$ de 350g, consistência de 8% ($8 \text{ g}_{\text{secas}} / 100 \text{ g}_{\text{suspensão}}$), carga enzimática de 25 FPU/g_{HC}, volume de inóculo igual a 10% do volume de suspensão e velocidade de agitação ~150 rpm. Na Tabela 3.4 apresentam-se as condições operatórias utilizadas na realização dos ensaios de NSSF para a pasta kraft de casca e para as lamas primárias.

Tabela 3.4 - Condições operacionais variadas nos ensaios NSSF

Ensaio	Variável			Tipo de impulsor
	Matéria-prima	Tempo de pré-hidrólise (h)	Temperatura de fermentação (°C)	
NK1	Pasta kraft de casca	6	30	Turbina <i>Rushton</i>
NK2		24	30	
NK3		6	38	
NK4		24	38	
NK5		6	38	
NL1	Lamas primárias	6	30	Turbina <i>Rushton</i>
NL2		24	30	
NLT1	Lamas primárias tratadas	6	30	
NLT2		24	30	
NLT3		6	38	
NLT4		24	38	
NLT5		6	38	

As condições e quantidades utilizadas, tanto nos ensaios SSF como nos NSSF, encontram-se com mais detalhe nas Tabelas do anexo V.

De um modo sucinto, nos ensaios SSF manteve-se a temperatura de operação e variou-se apenas o tipo de agitador/impulsor. Por outro lado, nos ensaios NSSF variou-se o tipo de impulsor, o tempo de pré-hidrólise e a temperatura de fermentação, com intuito de se analisar o efeito de cada um destes parâmetros no processo de obtenção de bioetanol. Durante a pré-hidrólise foi mantida a temperatura de 50 °C, por ser a temperatura ótima de operação da enzima utilizada.

Com exceção dos primeiros ensaios (KA1 e LA1), para ambas as matérias-primas, os ensaios SSF tiveram uma duração de 48h. Por outro lado, os ensaios NSSF tiveram durações de 54 e 72h, quando os tempos de pré-hidrólise foram de 6 e 24h, respectivamente. Foram retiradas amostras periódicas durante ambos os ensaios (SSF e NSSF) para se monitorar o pH, recorrendo ao medidor de pH (WTW inolab plus com o eletrodo SebTix®). As amostras foram colocadas em tubos de ensaio com rolha. De seguida, esses tubos foram colocados num copo com água e gelo durante 5 min. As amostras foram então centrifugadas durante 5 min a 3500 rpm (Hettich ZENTRIFUGEN UNIVERSAL 32). Posteriormente, o sobrenadante das amostras foi utilizado para se fazer a leitura do pH. Depois de feita a leitura, as amostras foram filtradas para tubos eppendorf com filtros de seringa com membrana de nylon 0.22 µm de porosidade, para posterior análise através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3.4. Métodos analíticos

Os procedimentos necessários para a determinação da atividade enzimática encontram-se no Anexo IX.

3.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A produção/consumo de glucose e produção de etanol nos bioprocessos testados foi acompanhada através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Utilizou-se um equipamento KNAUER K-301, constituído por um reservatório que contém a fase móvel, uma bomba de alta pressão, um injetor, uma coluna de separação (com material de enchimento cromatográfico) e um detetor de índice de refração, conectado à estação de dados do computador, que regista o sinal elétrico necessário para gerar o cromatograma e para identificar e quantificar a concentração dos constituintes da amostra (Figura 3.5). A identificação e a avaliação da produção de etanol e de outros compostos presentes na amostra (glucose, xilose, ácido acético, glicerol, etc.) foram feitas através do tempo de retenção na coluna, sendo as suas concentrações determinadas através de curvas de calibração previamente elaboradas. A coluna

utilizada foi a Rezex™ ROA-Organic Acid H+ (300×7.8 mm) mantida num forno a 40 °C, ligada a uma pré-coluna semelhante, mas de diferentes dimensões (50×7.8 mm) mantida à temperatura ambiente. A fase móvel foi uma solução de H₂SO₄ a 0.0025 M bombeada a 0.6 mL/min, previamente preparada com água ultra-pura, filtrada a vácuo com filtros de membrana de Nylon de 0.22 µm de porosidade e desgasificada através de ultrassons durante 15 min.

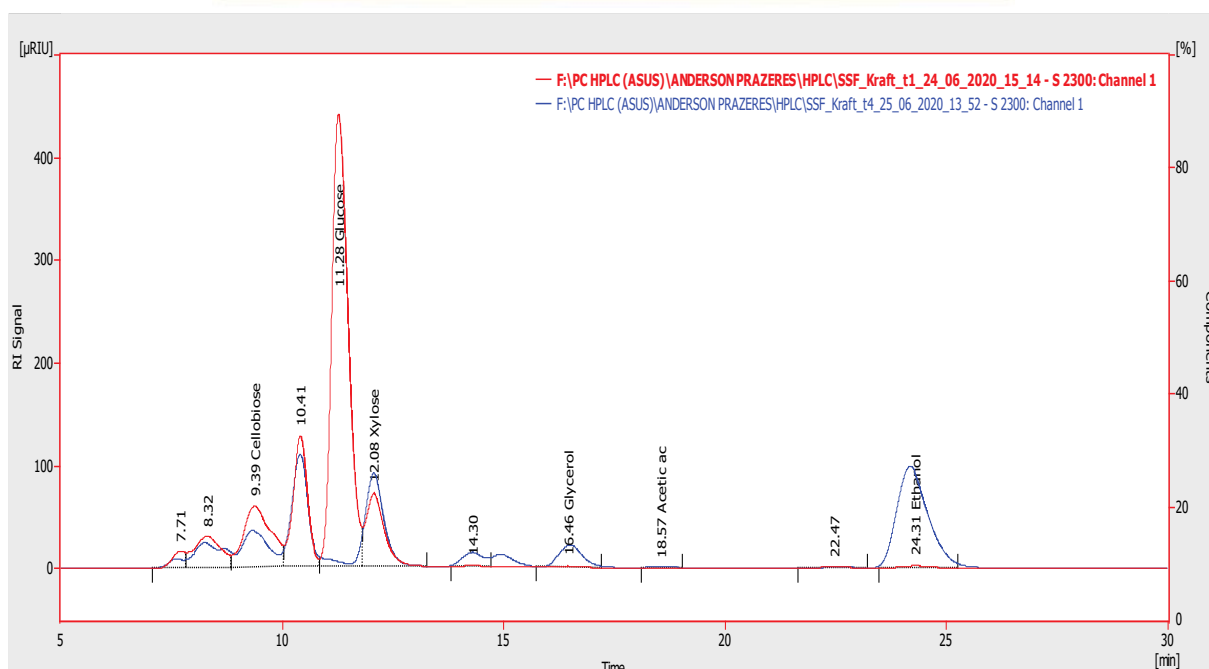
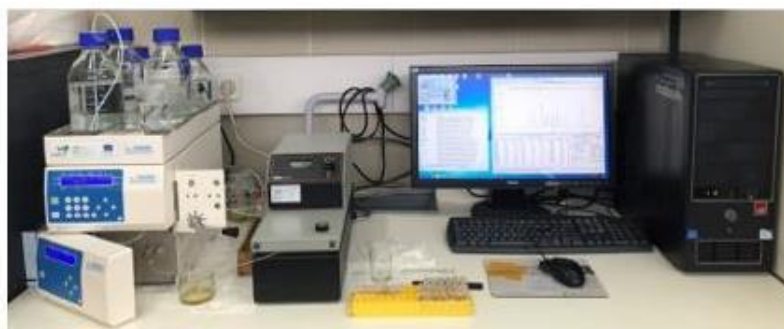


Figura 3.5 - Cromatografia líquida de alta eficiência

3.5. Parâmetros de avaliação da produção de etanol

Os dados obtidos na análise de HPLC foram usados para calcular: i) o rendimento de conversão dos hidratos de carbono da BLC em etanol (equação 3.1, acompanhado da equação auxiliar 3.2), ii) o rendimento de conversão da glucose da BLC em etanol (equação 3.3), razão entre o etanol produzido e matéria-prima, em base seca (equação 3.4), o rendimento relativamente à pré-hidrólise enzimática nos processos NSSF (equação 3.5) e a produtividade de etanol, onde o tempo corresponde ao intervalo temporal que decorreu desde a inoculação até

atingir a concentração de etanol respectiva (equação 3.6). As equações utilizadas para a determinação dos parâmetros referidos anteriormente são as seguintes:

- Rendimento de conversão em etanol (SSF e NSSF):

$$Y_{SSF \text{ ou } NSSF}(\%) = \frac{[ETOH]_t \left(\frac{g_{ETOH}}{L} \right) \cdot V_{ensaio}(mL) \cdot 10^{-3}}{0.51 \cdot m_{húmida}(g_{húmida}) \cdot ST_{média} \left(\frac{g_{MS}}{g_{húmida}} \right) \cdot HC_{HPLC} \left(\frac{g_{HC}}{g_{MS}} \right)} \cdot 100 \quad (3.1)$$

$$HC_{HPLC} = 1.11 \cdot m_{glucanas}_{HPLC} \left(\frac{g_{glucanas}}{g_{MS}} \right) + 1.14 \cdot m_{xilanas}_{HPLC} \left(\frac{g_{xilanas}}{g_{MS}} \right) \quad (3.2)$$

- Rendimento em etanol relativamente ao teor de glucose presente na matéria-prima (SSF e NSSF):

$$Y_{ETOH-G}(\%) = \frac{[ETOH]_t \left(\frac{g_{ETOH}}{L} \right) \cdot V_{ensaio}(mL) \cdot 10^{-3}}{0.51 \cdot m_{húmida}(g_{húmida}) \cdot ST_{média} \left(\frac{g_{MS}}{g_{húmida}} \right) \cdot 1.11 \cdot m_{glucanas}_{HPLC} \left(\frac{g_{glucanas}}{g_{MS}} \right)} \cdot 100 \quad (3.3)$$

- Massa de etanol produzida por 100 g de material seco (SSF e NSSF):

$$R_{SSF \text{ ou } NSSF-MS} \left(\frac{g_{ETOH}}{100g_{MS}} \right) = \frac{[ETOH]_t \left(\frac{g_{ETOH}}{L} \right) \cdot V_{ensaio}(mL) \cdot 10^{-3}}{m_{húmida}(g_{húmida}) \cdot ST_{média} \left(\frac{g_{MS}}{g_{húmida}} \right)} \cdot 100 \quad (3.4)$$

- Rendimento do processo de pré-hidrólise enzimática (NSSF):

$$Y_{HE}(\%) = \frac{[HC_{HPLC}]_{t=0} \left(\frac{g_{HC}}{g_{MS}} \right) \cdot V_{ensaio}(mL) \cdot 10^{-3}}{m_{húmida}(g_{húmida}) \cdot ST_{média} \left(\frac{g_{MS}}{g_{húmida}} \right) \cdot HC_{HPLC} \left(\frac{g_{HC}}{g_{MS}} \right)} \cdot 100 \quad (3.5)$$

- Produtividade (SSF e NSSF):

$$P_{ETOH} \left(\frac{g_{ETOH}}{L \cdot h} \right) = \frac{[ETOH]_t \left(\frac{g_{ETOH}}{L} \right)}{t(h)} \quad (3.6)$$

Onde:

[ETOH] – Concentração de etanol em g/L

HC – Hidratos de carbono

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

$m_{glucanas}$ – Massa de glucanas presentes no material, em base seca

$m_{xilanas}$ – Massa de xilanas presentes no material, em base seca

$m_{\text{húmida}}$ – Massa húmida

MS – Material Seco

P_{ETOH} – Produtividade em etanol

$R_{\text{NSSF-MS}}$ – Razão de etanol por 100 g de material seco para o processo NSSF

$R_{\text{SSF-MS}}$ – Razão de etanol por 100 g de material seco para o processo SSF

$ST_{\text{médio}}$ – Teor de Secura médio

$t(h)$ – No SSF é o tempo total, mas no NSSF é o tempo contabilizado a partir do instante em que se inocula a levedura.

$Y_{\text{ETOH-G}}$ – Rendimento de etanol pela glucose para os processos SSF e NSSF

Y_{HE} – Rendimento da HE do processo NSSF pelos HC

Y_{NSSF} – Rendimento em etanol pelos HC presentes material pelo processo NSSF

Y_{SSF} – Rendimento em etanol pelos HC presentes material pelo processo SSF.

4. Análise e discussão de resultados

4.1. Sacarificação e fermentação em simultâneo

4.1.1. Efeito do tipo de impulsor no SSF

De forma a estudar o impacto do tipo de impulsor no processo de produção de etanol, testaram-se dois agitadores diferentes. Salienta-se que a notação dos ensaios é a que já foi referida na Tabela 3.3. Como já foi dito anteriormente, foram estabelecidas algumas condições que se mantiveram constantes para todos os ensaios: massa total de suspensão, $m_{\text{suspensão}}$, (350 g), consistência do substrato (8% ou 8 g material seco em 100 g suspensão), carga enzimática (25 FPU de enzima por grama de hidratos de carbono, FPU/g_{HC}), temperatura de operação (38 °C), volume de inóculo (10% do volume de suspensão), concentração de suplementos nutricionais (5 g L⁻¹ de pentose, 3 g L⁻¹ de extrato de malte e 3 g L⁻¹ de extrato de levedura) e velocidade de agitação (~150 rpm). A Figura 4.1 mostra a evolução da produção de glucose e etanol, ao longo do tempo utilizando diferentes tipos de impulsores no processo SSF.

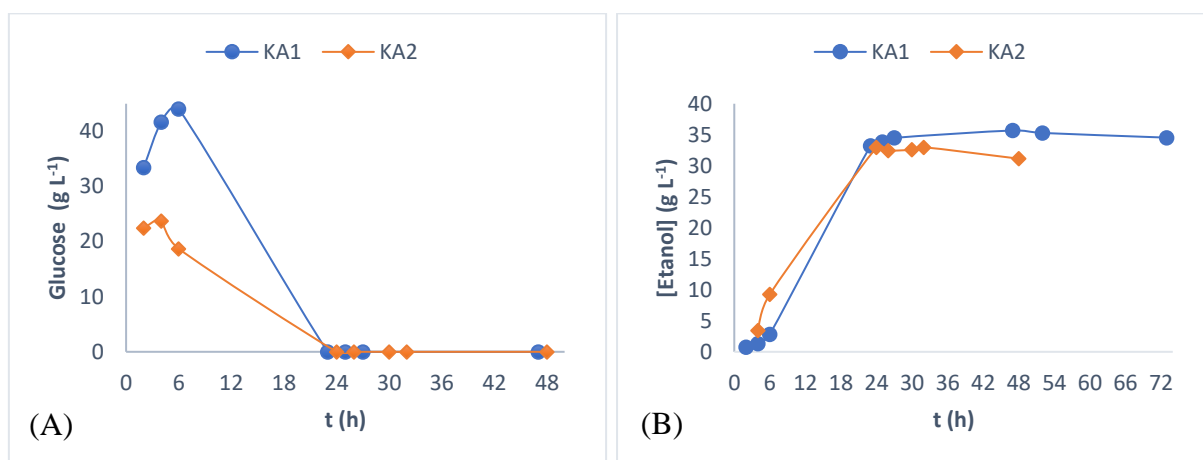


Figura 4.1 - Evolução da concentração de (A) glucose e de (B) etanol nos ensaios SSF de pasta kraft de casca (K) a 38°C, utilizando a turbina de *Rushton* (A1) e a âncora (A2).

Por observação da figura 4.1 A, verifica-se que depois de aproximadamente 24h de operação a quantidade de glucose presente no reator era muito baixa (para todos os ensaios), ou seja, houve um consumo rápido de glucose na etapa inicial da fermentação. Verificou-se durante os ensaios que a utilização do impulsor do tipo âncora acelerou a liquefação, mas a turbina Rushton foi melhor para agitar a mistura reagente depois de liquefeita. Por este motivo, a concentração de glucose na etapa inicial do processo foi maior no ensaio KA1 do que no ensaio KA2. Verifica-se na Figura 4.1 B, que depois das 24h de operação a concentração de etanol atinge um patamar e mantém-se aparentemente constante devido à baixa concentração

de glucose presente no reator. Observa-se que no ensaio KA1 foi detetada uma maior concentração de glucose ($\sim 44 \text{ g L}^{-1}$) do que no ensaio KA2 ($\sim 24 \text{ g L}^{-1}$). No entanto, ambos os ensaios atingiram concentrações de etanol semelhantes, mais especificamente cerca de 33 g L^{-1} ao fim de 23 e 24h de operação nos ensaios KA1 e KA2, respetivamente. No ensaio KA1 atingiu-se uma concentração máxima de 35.7 g L^{-1} de etanol depois de 47h, enquanto no ensaio KA2 a concentração de etanol começou a diminuir já a partir das 32h. Além disso, no ensaio KA1 obteve-se uma produtividade de $1.44 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ às 24h de operação, enquanto no ensaio KA2 a produtividade foi de $1.37 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ às 24h de operação. Verifica-se que a mudança do tipo de agitador tem influência na produção de glucose e de etanol. Pode concluir-se que o maior fluxo radial dentro do reator criado pelo agitador âncora aumentou a velocidade de liquefação da mistura e produção de etanol no SSF. Uma vez que se usou a mesma velocidade de agitação, pode-se concluir que esta não foi a mais adequada para o impulsor âncora pois pode ter danificado ou destruído algumas moléculas de enzima e células de levedura. No caso do ensaio KA1, observou-se ainda que depois de apenas 2h de operação já se começavam a formar pequenas quantidades de alguns subprodutos, nomeadamente ácido acético (0.07 g L^{-1}) e glicerol (0.29 g L^{-1}). Por outro lado, no caso do ensaio KA2 houve apenas formação de 0.65 g L^{-1} de glicerol depois de 6h de operação.

Relativamente à utilização das lamas primárias, estas foram ainda submetidas a um tratamento químico com HCl, e como consequência houve uma diminuição da quantidade de carbonato de cálcio de 17.3 % para 3.3%, em base seca, e um aumento do teor de hidratos de carbono de 76.5% para 92.4%, como apresentado na Tabela 3.1. Portanto, há uma maior disponibilidade de hidratos de carbono para hidrólise e subsequente fermentação no caso das lamas tratadas. Na figura 4.2, estão representados os perfis de evolução de glucose e etanol para as lamas primárias com e sem aplicação de pré-tratamento usando diferentes tipos de impulsor. Sendo que a primeira amostra do ensaio LTA2 apenas foi retirada depois de 16h de operação (devido ao facto de se ter iniciado ao fim do dia), isto explica o facto de não ter sido representado, na figura 4.2 A, a evolução da quantidade de glucose para o referido ensaio.

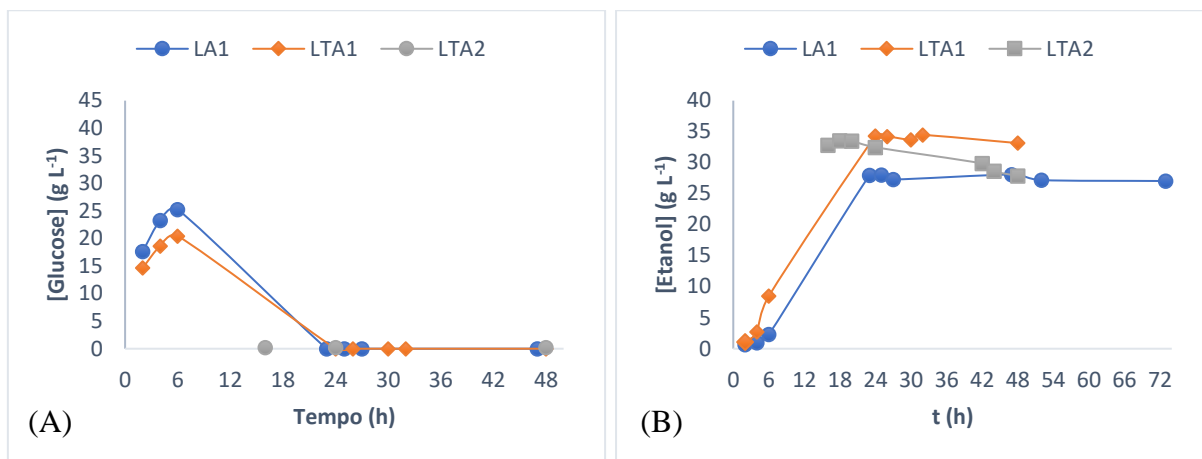


Figura 4.2 - Evolução da concentração de (A) glicose e de (B) etanol nos ensaios SSF de lamas primárias tal qual (L) e tratadas (LT) a 38°C, utilizando a turbina de *Rushton* (A1) e a âncora (A2).

No que diz respeito à concentração máxima de etanol obtida, houve um aumento significativo quando se usaram as lamas tratadas. Produziram-se cerca de 28.0 g L⁻¹ e 34.3 g L⁻¹ de etanol nos ensaios LA1 e LTA1, respectivamente durante 24h de operação, demonstrando-se que a aplicação do pré-tratamento da matéria-prima é muito importante para a eficiência dos processos de obtenção de bioetanol.

Verificou-se que as concentrações máximas de etanol foram semelhantes, independentemente do impulsor utilizado, como era de se esperar, pois usou-se a mesma matéria-prima com a mesma consistência tanto no ensaio LTA1 como no LTA2. Tal como verificado no SSF da pasta kraft de casca, o impulsor de âncora tende a promover um aumento de produtividade, obtendo-se concentrações de etanol elevadas em menor tempo de reação. A concentração máxima de etanol é obtida mais rapidamente, e conseqüentemente o seu decréscimo no caldo de cultura (por falta de glicose) inicia também num menor tempo de reação. Observa-se na figura 4.2 B, essa diminuição na concentração de etanol a partir de 24h de operação no ensaio com o impulsor tipo âncora (LTA2), enquanto no ensaio com a turbina de *Rushton* (LTA1) esse decréscimo iniciou a partir de 32h de reação. Produziram-se cerca de 33.5 e 34.3 g L⁻¹ de etanol nos ensaios LTA2 (depois de 18h de operação) e LTA1 (depois 24h de operação), respectivamente. Embora se tenha atingido uma melhor produtividade, o agitador âncora apresentou valores de rendimentos de etanol ligeiramente inferiores aos que se obtiveram com a turbina *Rushton*, independentemente da matéria-prima utilizada, como apresentado na Tabela 4.1. Dependendo do parâmetro que se quer maximizar, produtividade ou rendimento, a escolha do melhor agitador num processo SSF poderá recair no impulsor tipo âncora, ou na turbina de *Rushton*, respectivamente. Ainda assim, a turbina *Rushton* pode ser considerado o impulsor mais adequado para a obtenção de uma maior concentração de etanol pelo processo SSF, conduzindo a rendimentos de conversão mais elevados.

Tabela 4.1 - Resultados obtidos nos ensaios SSF da pasta kraft de casca e das Lamas primárias (tal qual e tratadas com HCl)

Ensaio	t* (h)	[ETOH] (g L ⁻¹)	Y _{SSF} (%, base açúcares)	Y _{ETOH-G} (%, base glucose)
KA1	47	35.7	82.7	98.7
KA2	24	33.0	76.4	91.2
LA1	23	28.0	80.7	99.3
LTA1	24	34.3	82.0	99.1
LTA2	18	33.5	79.3	97.3

t*, tempo em que se obteve a maior concentração de etanol.

4.2. Sacarificação e fermentação simultâneas não isotérmicas (NSSF)

Como já foi dito anteriormente, alteraram-se duas variáveis do processo NSSF: i) tempo de pré-hidrólise (t_h) e ii) temperatura de operação após a inoculação da levedura/ temperatura de fermentação (T_f), para se estudar o impacto que ambas causariam na eficiência de produção de etanol no processo NSSF. Para além disto, avaliou-se o impacto da alteração do tipo de impulsor (turbina *Rushton* ou âncora) no processo NSSF.

4.2.1. Efeito do tempo de pré-hidrólise

De modo a estudar o efeito do tempo de pré-hidrólise na produção de etanol pelo método NSSF, foram realizados ensaios variando o mesmo entre 6 e 24h, para ambas as matérias-primas em estudo. Salienta-se que a notação dos ensaios é a que já foi referida na Tabela 3.4. Nos ensaios com uma pré-hidrólise de 6h, a adição da levedura no reator, para dar início à fermentação, ocorreu sempre no final do dia, pelo que não foi possível obter amostras antes das 17h do tempo de fermentação (t_f). Por outro lado, nos ensaios em que a pré-hidrólise foi de 24h, a inoculação era feita no dia seguinte e as amostras foram retiradas até 6h depois de se ter dado início à fermentação, ou seja, os longos períodos sem amostragem (~17h) correspondem maioritariamente ao período noturno. Na Figura 4.3, estão ilustrados os perfis de evolução da concentração de glucose durante diferentes tempos de pré-hidrólise (Figura 4.3 A) e a evolução da concentração de etanol durante 48h, após a inoculação, para diferentes temperaturas de fermentação de 30 e 38 °C (Figura 4.3 B), no NSSF da pasta kraft de casca. Em ambos os ensaios, a concentração de glucose diminuiu para próximo do nível zero algumas horas após a inoculação da levedura. A partir daí, o processo é limitado pela hidrólise enzimática.

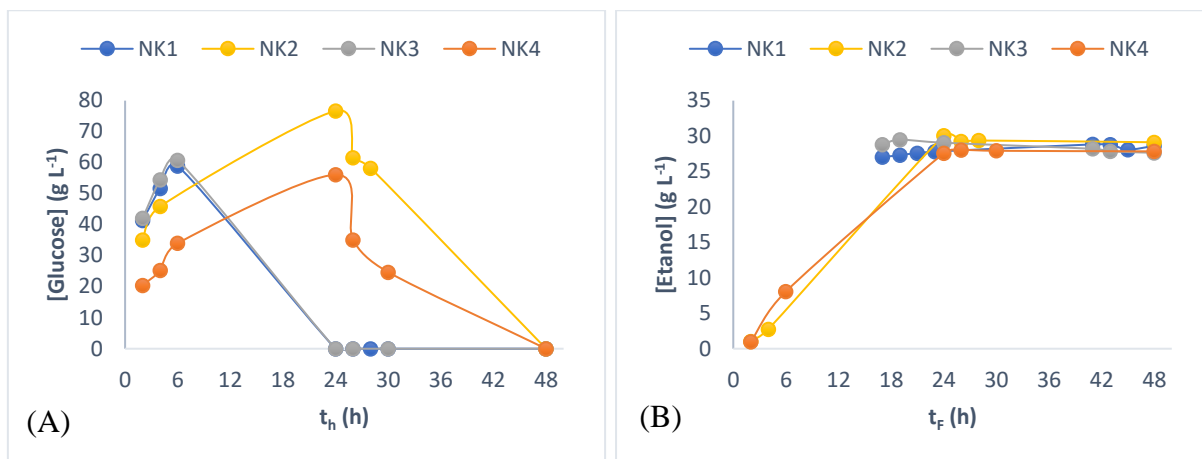


Figura 4.3 - Perfis de evolução da concentração (A) glucose e de (B) etanol no processo NSSF da pasta kraft de casca, com diferentes tempos de pré-hidrólise (t_h) e temperaturas de operação após inoculação da levedura (T_f): t_h 6h e T_f 30 °C (NK1); t_h 6h e T_f 38 °C (NK3); t_h 24h e T_f 30 °C (NK2); t_h 24h e T_f 38 °C (NK4).

Por observação a Figura 4.3 A, verifica-se que houve um decréscimo acentuado na concentração de glucose após a inoculação da levedura, para ambos os tempos de pré-hidrólise. Observa-se que quando a pré-hidrólise foi de 6h (NK1 e NK3) obtiveram-se cerca de $60 g L^{-1}$ de glucose antes da inoculação da levedura no meio reacional. Aumentando o tempo de pré-hidrólise seria expectável obter-se maior concentração de glucose antes do instante da inoculação. Quando se aumentou o tempo de pré-hidrólise para as 24h, obtiveram-se concentrações de glucose de $76.68 g L^{-1}$ e $56.09 g L^{-1}$ nos ensaios NK2 e NK4, respetivamente. Seria de se esperar concentrações semelhantes nos dois ensaios uma vez que se utilizou a mesma matéria-prima, consistência e mesmas condições reacionais, e também mais próximas do valor obtido no ensaio NK2. No entanto, verifica-se a partir da figura 4.3 (B) que foram obtidas concentrações de etanol muito semelhantes nos dois ensaios. As diferenças observadas na concentração de glucose obtida no tempo de pré-hidrólise de 24h poderão ter sido causadas por dificuldades de garantir uma mistura adequada e uniforme entre ensaios no início dos processos, devido à consistência elevada da suspensão. Verifica-se ainda que o NSSF com uma pré-hidrólise de 24h (NK2) produziu uma concentração de etanol ($30.1 g L^{-1}$, depois de 24h de fermentação) ligeiramente superior à obtida no NSSF com 6h de pré-hidrólise (NK1), no qual a concentração mais elevada de etanol foi de $28.8 g L^{-1}$ depois de 48h de fermentação. Esta pequena diferença no valor de concentração de etanol pode ser devida à maior concentração de glucose obtida, no ensaio NK2, antes de se induzir o SSF. Tal como nos ensaios de T_f a 30°C, para temperatura de fermentação de 38 °C os valores de concentração de etanol para ambos os tempos de pré-hidrólise não foram muito diferentes, mais especificamente obtiveram-se concentrações de etanol da ordem dos $29.5 g L^{-1}$ (depois de 26h de fermentação) e $27.6 g L^{-1}$ (depois de 48h de fermentação) nos ensaios NK3 e NK4, respetivamente. Faria mais sentido

obter diferentes concentrações de etanol se a fermentação tivesse ocorrido isoladamente com os hidrolisados obtidos no processo de hidrólise após término às 6h ou 24h (por filtração), em que a concentração final de glucose disponível seria cerca de ~61 e ~56 g L⁻¹, respetivamente. Neste caso (NSSF), após a inoculação da levedura, manteve-se a enzima no reator, pelo que não se pode supor essas concentrações de glucose como finais, sendo que a hidrólise dos polissacarídeos existentes continuou a decorrer, embora provavelmente a uma velocidade mais baixa pelo facto de a temperatura ser inferior à ótima da atividade da enzima (o pH manteve-se sempre por volta do ótimo para a enzima). Portanto, usando sempre a mesma consistência de pasta (sendo que esteve disponível a mesma quantidade inicial de hidratos de carbono nos diferentes ensaios), espera-se que, passado um determinado período, se alcance concentrações aproximadas de etanol nos ensaios.

Nos ensaios NK1, NK2, NK3 e NK4 alcançaram-se produtividades (P) máximas de 1.59 (depois de 17h de fermentação), 1.70 (depois de 17h de fermentação), 1.25 (depois de 24h de fermentação) e 1.15 g L⁻¹ h⁻¹ (depois de 24h de fermentação), respetivamente. No entanto, nos ensaios NK1 e NK3 obtiveram-se produtividades de 1.21 g L⁻¹ h⁻¹ (depois de 24h de fermentação). Estes valores comprovam que a pré-hidrólise mais prolongada (24h) resultou numa produtividade ligeiramente mais elevada e consequentemente num maior valor de concentração de etanol por 100 g de pasta seca (0.38 g_{ETOH}/100g_{MS}, NK2), com exceção do ensaio NK4, como apresentado na Tabela 4.2.

Durante a este processo houve a formação de pequenas quantidades de pequenas quantidades de glicerol, ácido acético e succínico, cujos valores estão ilustrados na Tabela VI.1 (do anexo VI)

Ao contrário dos ensaios com a pasta kraft de casca, nos ensaios com as lamas primárias tal qual, o pH manteve-se sempre por volta de 8 durante a pré-hidrólise, e mesmo depois de se iniciar a fermentação esse valor nunca se aproximou do pH ótimo da enzima e por este motivo não se obtiveram bons resultados de produção de glucose e etanol. Por outro lado, depois das lamas terem sofrido o pré-tratamento com HCl o pH do meio durante a hidrólise manteve-se por volta de 7, e após a inoculação da levedura e início da fermentação o pH foi diminuindo rapidamente até atingir um valor semelhante ou próximo ao do pH ótimo da enzima, devido à menor presença de CaCO₃ no material, à formação de CO₂ e pequenas quantidades de ácidos (acético e succínico). O CO₂ é produzido pelas leveduras ao longo do tempo e é importante para o seu metabolismo, dissolvendo-se no meio reacional, contribuindo para a diminuição do pH. Na Figura 4.4 estão representados os perfis de evolução de glucose e etanol para as lamas primárias, aplicando dois tempos de pré-hidrólise (6 e 24h) e duas temperaturas de fermentação diferentes (30 e 38 °C) durante 48h de fermentação.

Salienta-se que na Figura 4.4 o ensaio NLT2 apenas tem amostragem a partir das 18h pelo facto dos ensaios da pré-hidrólise de 6h (NLT1) e o de 24h terem sido feitos em simultâneo, pois as condições de operação eram as mesmas (temperatura de fermentação $\sim 30^{\circ}\text{C}$). Para que a inoculação ocorresse ao mesmo tempo em ambos os ensaios, o ensaio das 24h teve de começar num dia prévio, e mais especificamente no fim do dia. Portanto, não foi possível retirar amostras.

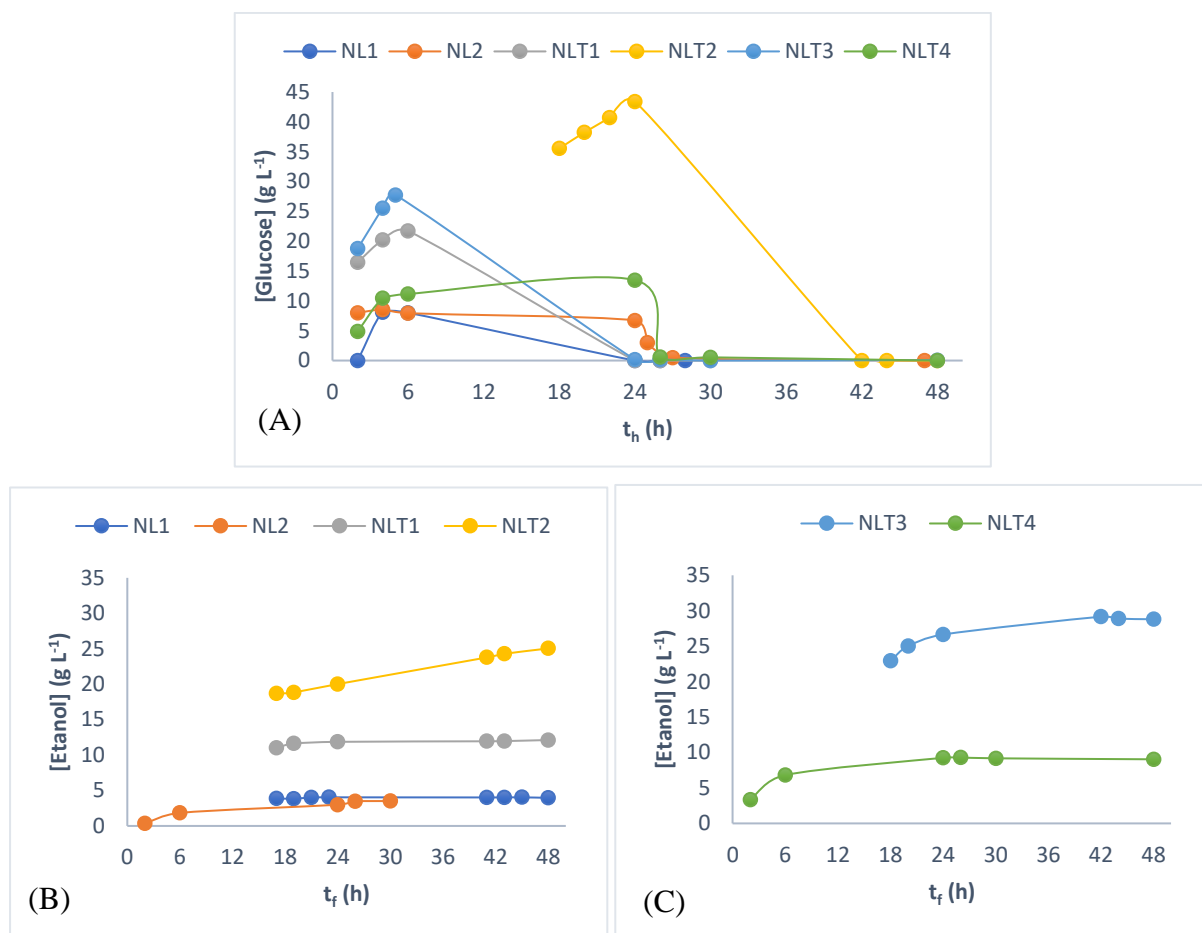


Figura 4.4 - Evolução da concentração de (A) glucose e de etanol no NSSF das lamas primárias, no qual t_h foi 6 e 24h, e T_f de (B) 30 e (C) 38 °C.

Na Figura 4.4 A, observa-se mais uma vez a eficiência do pré-tratamento da matéria-prima nos bioprocessos, tendo-se alcançado resultados de produção de etanol muito mais satisfatórios do que os que se obtiveram antes do pré-tratamento. Verifica-se que antes do pré-tratamento tanto as concentrações máximas de glucose como as de etanol foram semelhantes para os dois ensaios (NL1 e NL2), ou seja, a concentração de glucose mais elevada foi de 8.5 g L⁻¹ depois de 4h de pré-hidrólise, e a as concentrações mais elevadas de etanol foram de 3.9 e 3.5 g L⁻¹ nos ensaios NL1 e NL2, respetivamente e ambas obtidas depois de 17h de fermentação. Observa-se que para as lamas não tratadas, não houve vantagem em aumentar o tempo de pré-

hidrólise para além das 6h devido à elevada quantidade de CaCO_3 (17.3%) presente no material, que traz como consequência um valor elevado de pH e diminuição drástica da atividade da enzima.

Quanto às lamas tratadas, no caso das 6h de pré-hidrólise, quando se diminui a temperatura de 50 °C para 30°C, para dar início à fermentação, acrescentou-se mais um fator opoente à hidrólise enzimática, para além do valor superior de pH, o que provavelmente resultou num decréscimo acentuado da velocidade de hidrólise dos polissacarídeos ainda presentes. Consequentemente a concentração de etanol produzido a partir da glucose disponível após um período de pré-hidrólise de 6h ($\sim 21 \text{ g L}^{-1}$), foi baixa ($\sim 12 \text{ g L}^{-1}$, depois de 17h de fermentação). Para o tempo de pré-hidrólise de 24h, prolongou-se o tempo em que a pré-hidrólise decorreu à temperatura ótima, permitindo assim a obtenção de uma maior concentração de glucose disponível ($\sim 43 \text{ g L}^{-1}$, mesmo a um valor de pH superior a 5) para a fermentação antes da diminuição da temperatura para 30°C (Figura 4.4 B). Consequentemente a concentração de etanol produzido, maioritariamente obtido a partir da glucose disponível, foi mais elevada ($\sim 25 \text{ g L}^{-1}$, depois de 48h de fermentação). A partir deste instante a velocidade de hidrólise provavelmente diminuiu bastante. Observa-se ainda que apesar do ensaio NLT2 ter apresentado maior concentração de glucose do que os outros ensaios (NLT1, NLT3 e NLT4) na fase de pré-hidrólise, não foi o que apresentou a maior concentração de etanol, mas sim o ensaio NLT3 que apresentou uma concentração máxima de etanol de 29.2 g L^{-1} ($t_f = 42\text{h}$) para uma concentração máxima de glucose de 27.7 g L^{-1} (Figura 4.4 C).

De salientar que os ensaios NLT3 e NLT4 foram realizados com um novo lote de lamas tratadas (lote 2), cuja composição está descrita na Tabela 3.1. Observa-se nesta Tabela que houve um decréscimo no teor de lenhina (2.6 para 2.3%) presente na matéria-prima, quando comparado com o lote 1, o que aumentou a disponibilidade dos hidratos de carbono e provavelmente facilitou o processo fermentativo. Outros motivos para se ter obtido menor valor de concentração de etanol no ensaio NLT2 do que no NLT3 podem ser as condições de reação ou a formação de algum composto durante a fermentação que inibiu a levedura de produzir etanol.

O ensaio NLT4 não apresentou resultados satisfatórios (o contrário do que se esperava), tendo ocorrido uma inibição durante a hidrólise enzimática. Vale salientar que, durante a sacarificação enzimática deste ensaio a mistura reacional demorou mais tempo para liquefazer, quando comparado com os outros ensaios de lamas tratadas. No entanto, as amostras continuaram a ser recolhidas, o que não é aconselhável, pois por vezes pode-se estar a retirar muita quantidade de enzima do reator e consequentemente prejudicar a hidrólise. As

concentrações máximas de glucose e de etanol obtidas neste ensaio foram de 13.5 e 9.2 g L⁻¹, respetivamente.

Como não foi possível obter amostras antes das 18h de fermentação para todos os ensaios, optou-se por escolher as 24h como base para comparação dos diferentes estudos. Na fase inicial do processo de fermentação a velocidade de produção de etanol é elevada (>1 g L⁻¹ h⁻¹), devido à maior disponibilidade de nutrientes e para a levedura, ou seja, há um consumo de nutrientes mais elevado na fase inicial de crescimento. Essa velocidade vai diminuindo de acordo com a disponibilidade de nutrientes.

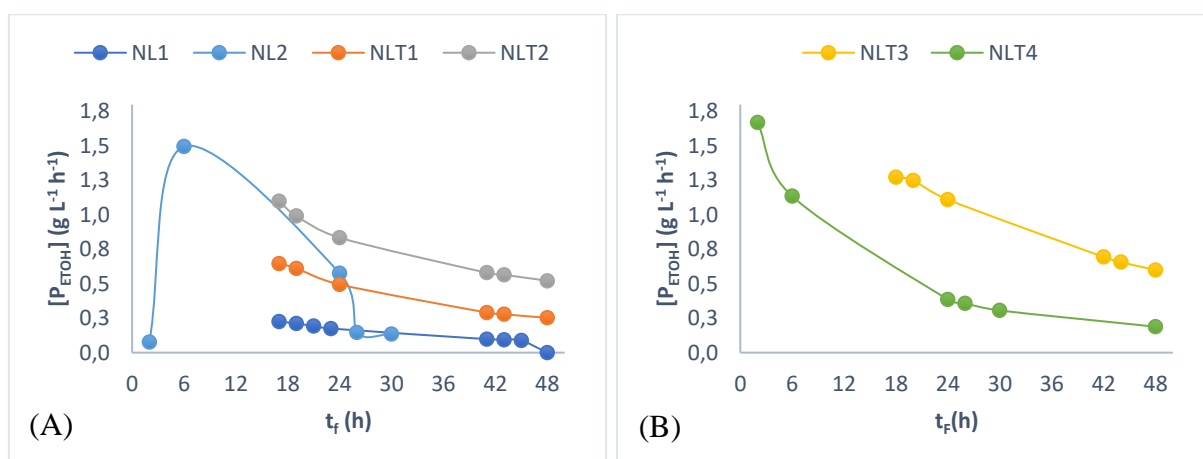


Figura 4.5 - Produtividades de etanol nos ensaios NSSF de lamas primárias para diferentes tempos de pré-hidrólise (6 e 24h) e temperaturas de fermentação de (A) 30 °C e (B) 38 °C.

Analisando a Figura 4.5, onde se representa a produtividade ao longo do tempo, observa-se que os ensaios com as lamas não tratadas (NL1 e NL2) apresentaram valores de produtividade menores (0.18 e 0.58 g L⁻¹ h⁻¹, respetivamente) do que os ensaios com as lamas tratadas para um tempo de fermentação de 24h, como era de se esperar. Observa-se ainda que no ensaio NL2 a produtividade máxima foi de 1.50 g L⁻¹ h⁻¹ para um t_f de 6h.

Quanto ao tempo de pré-hidrólise, observa-se na Figura 4.5 (A) que quando este foi mais elevado (24h), a produtividade também foi mais elevada, devido à maior concentração de glucose obtida nestes ensaios. Para um tempo de fermentação de 24h, obtiveram-se produtividades de 0.49 e 0.83 g L⁻¹ h⁻¹ nos ensaios NLT1 e NLT2, respetivamente. Por outro lado, na Figura 4.5 (B) observa-se que para o ensaio NLT3 e NLT4 as produtividades foram de 0.69 g L⁻¹ h⁻¹ às 42h do tempo de fermentação e 0.39 g L⁻¹ h⁻¹ depois de 24h de fermentação, respetivamente, devido à maior concentração de glucose obtida durante a sacarificação enzimática para o caso da pré-hidrólise mais prolongada.

4.2.2. Efeito da temperatura de fermentação

Com o intuito de avaliar a influência da temperatura de fermentação no processo NSSF, realizaram-se ensaios para ambas as matérias-primas em estudo, fixando o tempo de pré-hidrólise e aplicando duas temperaturas diferentes (30 e 38 °C). A Figura 4.6 mostra a variação da concentração de etanol no reator durante o processo NSSF de pasta kraft de casca e as suas respectivas produtividades.

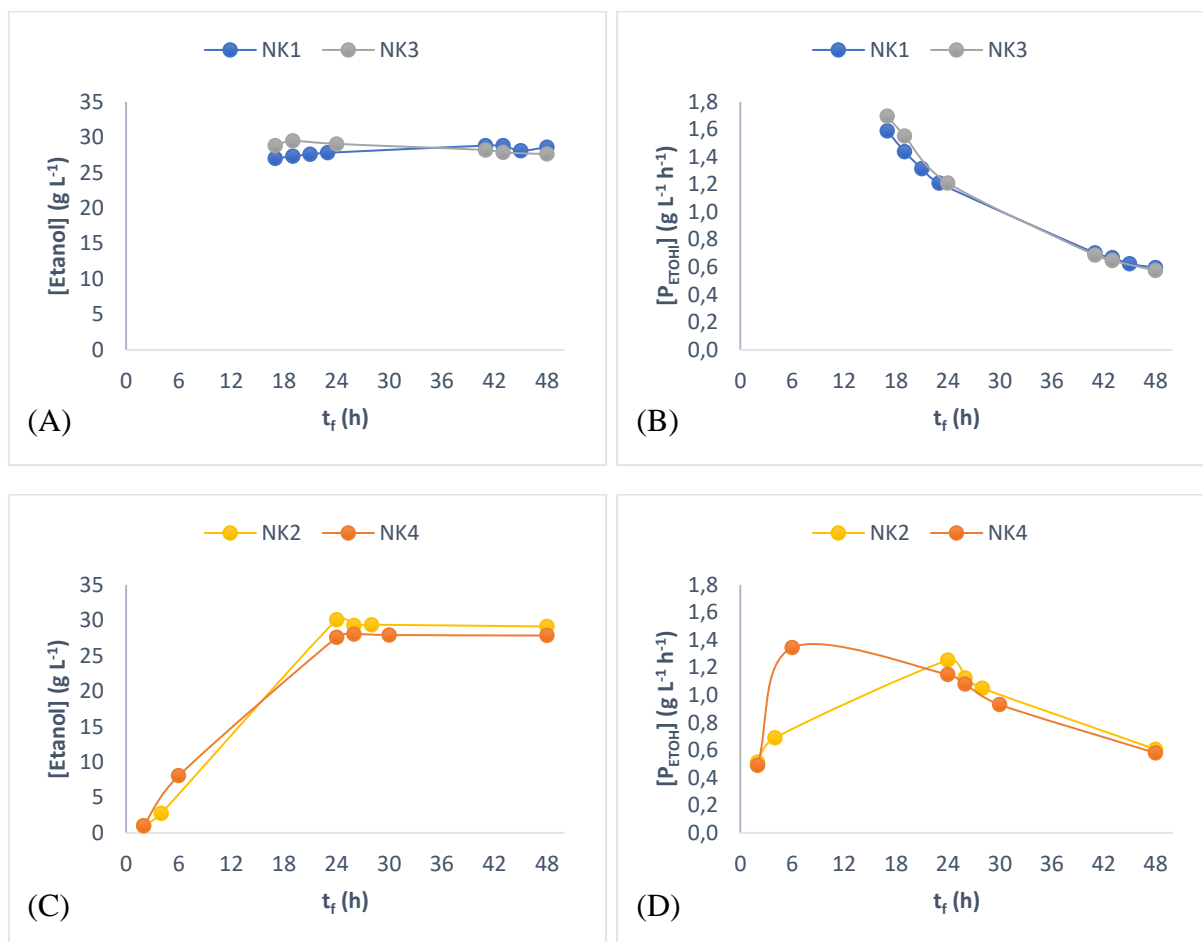


Figura 4.6 - Evolução da concentração de etanol (A, C) e respetivas produtividades (B, D) no processo NSSF de pasta kraft de casca para diferentes temperaturas de fermentação, $T_f = 30$ °C (NK1 e NK2) e 38 °C (NK3 e NK4), e tempos de pré-hidrólise, t_h de 6h (A, B) e 24h (C, D).

Analisando a Figura 4.6 A, observa-se que quando a temperatura de fermentação foi de 38 °C os valores de concentração de etanol obtidos foram ligeiramente semelhantes aos que foram obtidos para a temperatura de 30 °C. Produziram-se cerca 28.8 e 29.5 g L⁻¹ de etanol nos ensaios NK1 e NK3, respetivamente. Isto pode ter acontecido devido ao erro experimental. No ensaio NK3 ($T_f = 38$ °C), alcançou-se mais rapidamente a concentração máxima de etanol e isto deve-se ao facto de se ter trabalhado a uma temperatura mais próxima da temperatura ótima

da enzima (~50 °C), no ensaio NK3, o que aumenta a atividade da enzima e causa conseqüentemente um ligeiro aumento na velocidade de produção de glucose e conseqüentemente de etanol durante a sacarificação e fermentação em simultâneo. Vale salientar que essas concentrações máximas de etanol foram obtidas depois de 41 e 17h de fermentação para os ensaios NK1 e NK3, respetivamente. Na Figura 4.6 B, observa-se que por volta das 18h de fermentação o ensaio NK1 apresentou um valor de produtividade de etanol mais baixo ($1.59 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) do que o ensaio NK3 ($1.70 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Observa-se ainda que até se ultrapassar as 24h de fermentação os valores de produtividade foram sempre mais elevados no ensaio NK3, mas depois disso os valores foram semelhantes para nos dois ensaios até ao fim do processo NSSF.

Analisando a Figura 4.6 C, observa-se um crescimento exponencial da concentração de etanol e entre as 24 e 26h de fermentação, o pico é atingido. Depois de se atingir o pico, a concentração de etanol manteve-se sensivelmente constante ao longo do tempo até ao fim do processo, devido à escassez de glucose no meio. Verifica-se ainda que apesar do ensaio NK4 apresentar muito menor quantidade de glucose produzida durante a pré-hidrólise ($\sim 56 \text{ g L}^{-1}$) do que o ensaio NK2 ($\sim 77 \text{ g L}^{-1}$) as concentrações de etanol não foram muito diferentes. Mais especificamente, obtiveram-se ~ 30 e 28 g L^{-1} de etanol ($t_f = 24\text{h}$) nos ensaios NK2 e NK4, respetivamente. Neste caso, o ensaio NK2 apresentou a concentração mais elevada de etanol, mas a levedura apresentou melhor eficácia de produção de etanol para este processo (NSSF de Pasta kraft de casca) quando se usou a temperatura de 38 °C, como observado na literatura (Mendes *et al.*, 2016). Na Figura 4.6 D, observa-se que para o tempo de fermentação de 24h as produtividades foram de 1.25 e $1.15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para os ensaios NK2 e NK4. Observa-se ainda que depois desse tempo a produtividade do ensaio NK2 manteve-se ligeiramente mais elevada do que a do ensaio NK4 até ao fim do processo.

Na Figura 4.7, observa-se a evolução da concentração de etanol e respetivas produtividades nos ensaios NSSF das lamas primárias tratadas para as temperaturas de fermentação de 30 e 38 °C.

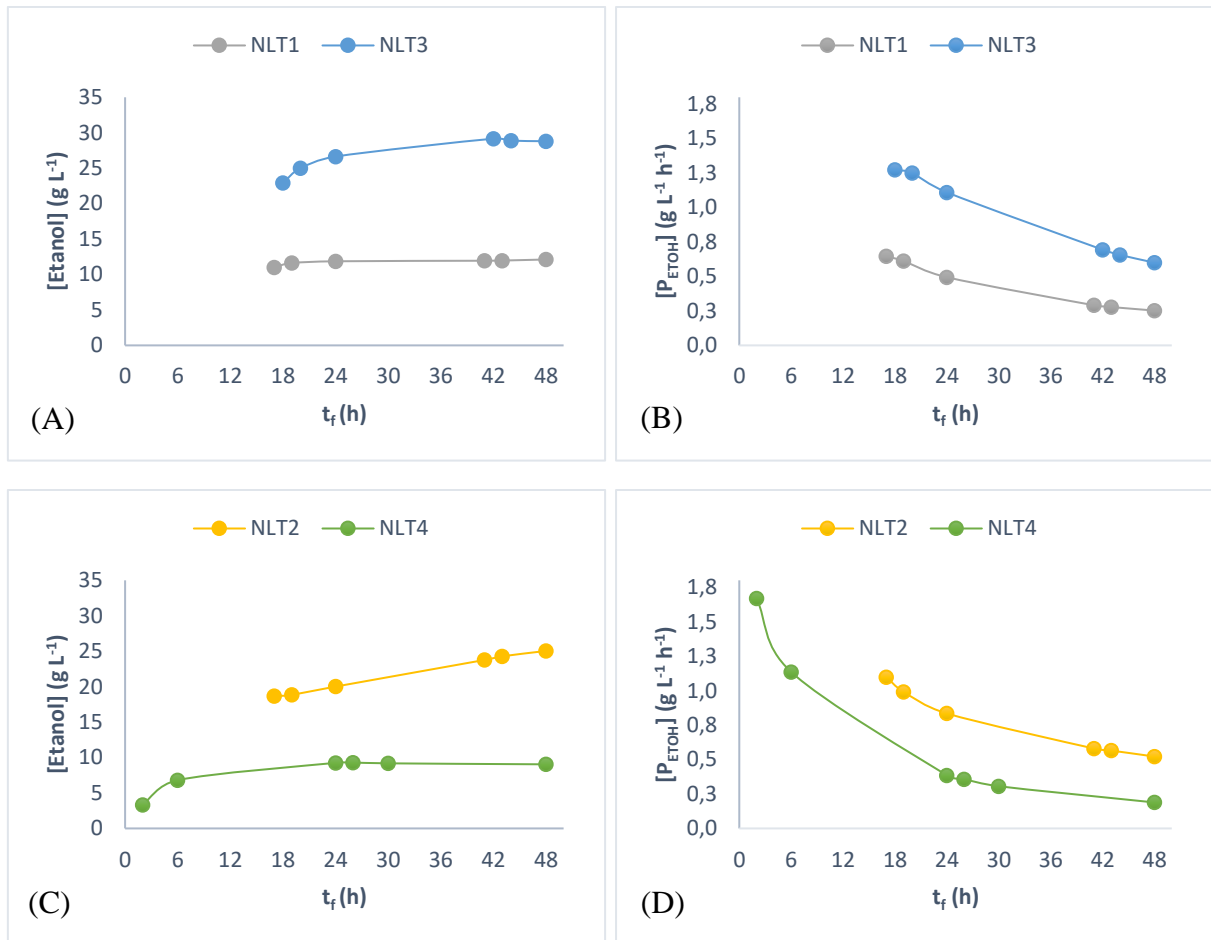


Figura 4.7 - Evolução da concentração de etanol (A, C) e respectivas produtividades (B, D) no processo NSSF de lamas primárias tratadas para diferentes temperaturas de fermentação, T_f = 30 °C (NLT1 e NLT2) e 38 °C (NLT3 e NLT4), e tempos de pré-hidrólise, t_h de 6h (A, B) e 24h (C, D).

Analisando a Figura 4.7 A, observa-se que nos ensaios NLT1 e NLT3 produziu-se cerca de 11 (t_f = 19h) e 29 g L⁻¹ (t_f = 42h) de etanol, respetivamente, ou seja, a levedura apresentou maior eficácia de produção de etanol quando a temperatura de fermentação foi de 38 °C do que quando a mesma foi de 30 °C. A temperatura de 38 °C, tanto a enzima como a levedura apresentam maior atividade e taxa de crescimento, respetivamente, quando comparados com os resultados obtidos para a temperatura de fermentação de 30 °C. Na Figura 4.7 B, observa-se que a maior produção de etanol registada no ensaio NLT3 resultou em valores de produtividade mais elevados. Mais especificamente, obtiveram-se produtividades de 0.67 e 1.27 g L⁻¹ h⁻¹ nos ensaios NLT1 e NLT3, respetivamente, às 18h de fermentação.

Analisando a Figura 4.7 C, observa-se que se produziu uma quantidade mais elevada de etanol (~25 g L⁻¹) quando a temperatura de fermentação foi de 30°C (NLT2). Porém, já foi dito anteriormente que ocorreu alguma adversidade durante o ensaio NLT4 (cujas temperatura de fermentação foi de 38 °C), tendo-se produzido apenas cerca de 9 g L⁻¹ de etanol. Observa-se

ainda que ao contrário dos outros ensaios onde a quantidade de etanol já era quase constante antes de se atingir as 48h de fermentação, no ensaio NLT2 o perfil de evolução de concentração de etanol não chegou a atingir um patamar. Aparentemente, a levedura ainda se encontrava na fase exponencial de crescimento e podia conseqüentemente produzir maior quantidade de etanol se a reação não tivesse sido parada. Na Figura 4.7 D, observa-se, por exemplo, que em 24h de fermentação se obtiveram produtividades de 0.83 e 0.39 g L⁻¹ h⁻¹ nos ensaios NLT2 e NLT4, respetivamente.

4.2.3. Efeito do tipo de impulsor

Com intuito de avaliar o impacto do tipo de impulsor no processo NSSF para ambas as matérias-primas, realizaram-se ensaios usando dois tipos de impulsores diferentes, Turbina *Rushton* e impulsor tipo âncora. Na Figura 4.9, estão ilustrados os perfis de evolução de glucose e etanol no processo NSSF de Pasta kraft de casca usando os impulsores suprarreferidos.

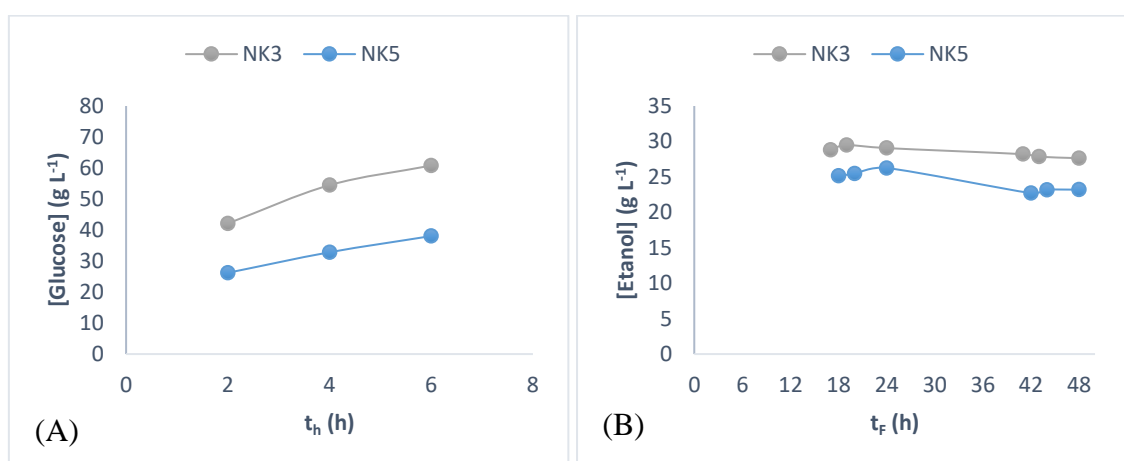


Figura 4.8 - Evolução da concentração de (A) glucose e (B) etanol nos ensaios NSSF de pasta kraft de casca usando o impulsor Turbina *Rushton* (NK3) e o impulsor tipo âncora (NK5). Condições: t_h = 6h T_f = 38 °C.

Analisando a Figura 4.8 A, observa-se que durante a pré-hidrólise o ensaio NK3 apresentou valores de concentração de glucose mais elevados (60.8 g L⁻¹) do que o ensaio NK5 (38.1 g L⁻¹). Observou-se durante os ensaios que quando o impulsor âncora foi usado, a mistura reacional demorou muito menos tempo a liquefazer devido ao maior fluxo radial criado pelo mesmo dentro do reator, mas a eficiência a hidrólise enzimática foi menor. Na Figura 4.8 B, observa-se que a maior concentração de açúcar observada no ensaio NK3 originou uma maior produção de etanol (29.5 g L⁻¹, às 19h de fermentação), quando comparado com o ensaio NK5, onde a concentração mais elevada de etanol foi de 26.3 g L⁻¹ (às 23h de fermentação). Observa-

se ainda que há uma ligeira diminuição da concentração de etanol em ambos os ensaios, devido aos compostos indesejados formados e ao consumo do próprio produto desejado (etanol), por parte da levedura.

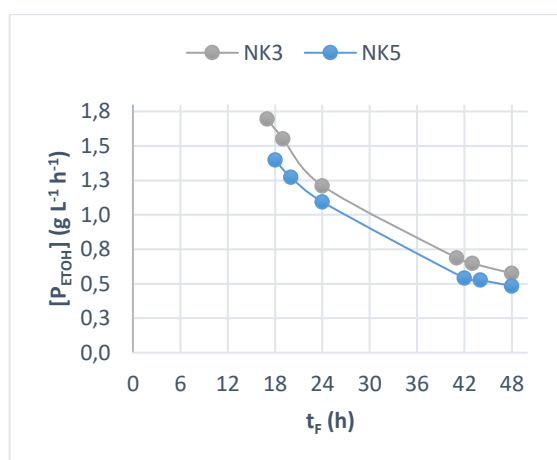


Figura 4.9 - Produtividade de etanol no processo NSSF de pasta kraft de casca usando os impulsores Turbinha *Rushton* (NK3) e o âncora (NK5). Condições: $t_h = 6h$ $T_f = 38^\circ C$.

Na Figura 4.9, observa-se que os maiores valores de produção de etanol suprarreferidos, para o ensaio NK3, resultaram em valores de produtividade de etanol mais elevados (ao longo de todo tempo de fermentação). Observa-se ainda que se obtiveram produtividades de 1.21 e 1.09 $g L^{-1} h^{-1}$ para os ensaios NK3 e NK5, respetivamente, em 24h de fermentação. Os valores de produtividade máxima obtidos foram 1.70 (depois de 17h de fermentação e hidrólise em simultâneo, NK3) e 1.40 $g L^{-1} h^{-1}$ (depois de 18h de fermentação, NK5).

Analisando as duas Figuras anteriores (4.8 e 4.9), conclui-se que o impulsor Turbinha *Rushton* é o mais adequado para obtenção de etanol a partir de pasta kraft de casca pelo processo NSSF.

Posteriormente, testou-se as mesmas condições supracitadas (variação do tipo de impulsor, t_h de 6h e T_f de 38 °C), mas usando as lamas primárias tratadas como matéria-prima. Diferente dos ensaios com a pasta kraft de casca, a mistura presente no reator das lamas primárias apresentou maior viscosidade, e sendo que a incorporação do agitador âncora oferece um maior fluxo radial da mistura dentro do reator, favorecendo a homogeneidade de misturas mais consistentes, espera-se que se produza quantidade mais elevada de açúcar e conseqüentemente de etanol no ensaio NLT5. Observou-se durante os ensaios que quando o impulsor âncora foi usado a mistura reacional demorou muito menos tempo para liquefazer (3h) do que quando se usou o impulsor Turbinha *Rushton* (6h). A Figura 4.10, mostra a evolução das concentrações de glucose e etanol no processo NSSF de lamas primárias tratadas usando dois tipos de impulsores diferentes.

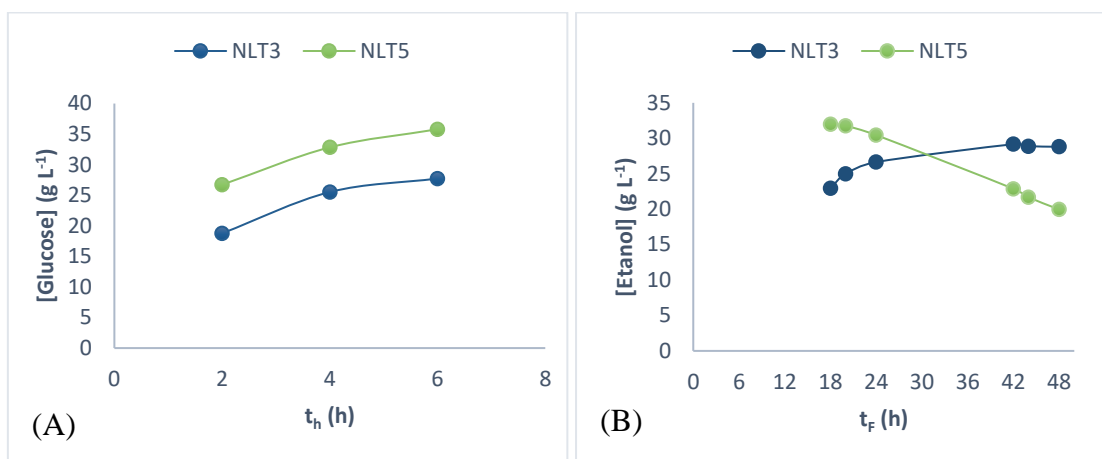


Figura 4.10 - Evolução da concentração de (A) glucose e (B) etanol no processo NSSF de lamas primárias tratadas usando os impulsores Turbina *Rushton* (NLT3) e o âncora (NLT5). Condições: $t_h = 6h$ $T_f = 38^\circ C$.

Analisando a Figura 4.10 A, observa-se que se produziu quantidade mais elevada de glucose no ensaio NLT5 ($35.8 g L^{-1}$) durante a pré-hidrólise do que no ensaio NLT3 ($27.7 g L^{-1}$), comprovando assim a eficiência uso do agitador âncora para a realização da pré-hidrólise das lamas tratadas. Observa-se na Figura 4.10 (B) que se obtiveram concentrações de etanol de cerca de 32.0 (após 18h de fermentação) e $29.2 g L^{-1}$ (após 42h de fermentação) nos ensaios NLT5 e NLT3, respetivamente. Isto demonstra a eficiência do agitador âncora para a produção de etanol pelo processo NSSF de lamas primárias tratadas, pois atingiu-se uma concentração de etanol mais elevada em menos tempo. O perfil apresentado para o ensaio NLT5 não apresenta um pico, pelo que não se pode concluir que essa é a concentração de etanol mais elevada que se podia obter neste ensaio. Observa-se ainda que houve uma queda acentuada na concentração de etanol para o ensaio NLT5, e conclui-se que houve consumo de etanol por parte da levedura por já não haver glucose disponível no meio reacional, pois não se identificaram na amostra analisada no HPLC quantidades elevadas de outros produtos ou contaminantes, como mostra a Tabela VI.1 (Anexo VI).

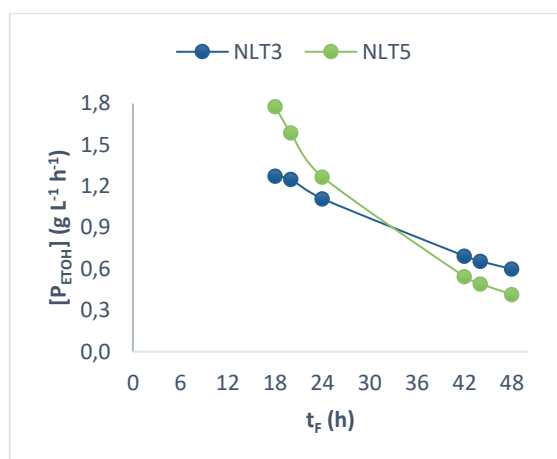


Figura 4.11 - Produtividade de etanol obtidas no processo NSSF de lamas primárias tratadas usando os impulsionadores Turbina Rushton (NLT3) e o tipo âncora (NLT5). Condições: $t_h = 6h$ $T_f = 38^\circ C$.

Analisando a Figura 4.11, observa-se que os maiores valores de produtividade foram obtidos às 18h do tempo de fermentação. Obtiveram-se produtividades de 1,27 e 1,78 $g L^{-1} h^{-1}$ nos ensaios NLT3 e NLT5, respectivamente. Observa-se ainda que a partir das 42h os valores de produtividade do ensaio NLT5 foram menores que os do ensaio NLT3 devido à queda acentuada de concentração de etanol observada na Figura 4.10 B, que ocorreu devido à escassez de nutrientes para a levedura. Para o mesmo tempo de fermentação obteve-se uma produtividade muito mais elevada, o que comprova mais uma vez a eficiência do impulsor tipo âncora neste processo.

Na Tabela 4.2, encontra-se um resumo dos resultados obtidos para todos os ensaios de pasta kraft de casca e de lamas primárias (tal qual e tratadas com HCl), sendo que os resultados encontram-se em maior detalhe no Anexo VII.

Tabela 4.2 - Resultados obtidos nos ensaios NSSF de pasta kraft de casca e lamas primárias (tal qual e tratadas com HCl)

Ensaio	Material	t _h (h)	T _F (°C)	[ETOH] (g L ⁻¹)	Y _{NSSF} (% base açúcares)	Y _{ETOH-G} (% base glucose)	R _{NSSF-MS} (g _{ETOH} /100g _{MS})
NK1	Pasta kraft de casca	6	30	28.8	66.5	79.8	0.36
NK2		24		30.1	69.4	83.2	0.38
NK3		6	38	29.5	68.0	81.6	0.37
NK4		24		27.6	63.6	76.3	0.35
NK5		6		26.3	60.6	72.6	0.33
NL1	Lamas primárias	6	30	3.9	11.0	13.6	0.05
NL2		24		3.5	10.1	12.5	0.04
NLT1	Lamas primárias tratadas	6	30	11.0	26.2	31.8	0.14
NLT2		24		25.0	59.6	72.4	0.31
NLT3		6	38	29.2	69.4	84.3	0.37
NLT4		24		9.3	22.0	26.7	0.12
NLT5		6		32.0	75.3	92.8	0.40

T_F, temperatura de fermentação; t_h, tempo de pré-hidrólise.

Analisando as Tabelas 4.1 e 4.2, conclui-se que o método de obtenção de etanol a partir do processo SSF, tanto para a pasta kraft de casca como para as lamas primárias, foi mais eficiente do que o processo NSSF, tendo-se obtido rendimentos máximos de 82.7 (KA1) e 69.4 % (NK2) para a pasta kraft de casca, e de 82 (LTA1) e 75 % (NLT5) para o caso das lamas primárias tratadas. No entanto, teoricamente, os valores de concentração de etanol e consequentemente os rendimentos deviam ser superiores no processo NSSF, uma vez que a pré-hidrólise e a fermentação foram realizadas nas temperaturas ótimas de funcionamento tanto da enzima como da levedura. Além disso, a aplicação do curto período de pré-hidrólise pode potencializar a conversão da celulose em glucose e, na sequência, em etanol, resultando na diminuição da inibição enzimática. Ademais, o curto processo de pré-hidrólise aumenta a solubilidade do substrato, levando a uma melhor transferência de massa de nutrientes para o microrganismo. Se se conseguissem melhores condições de assepsia durante o carregamento do reator e a retirada das amostras, se se estabelecesse um compromisso entre a velocidade de agitação e a produção de etanol talvez a eficácia do processo NSSF fosse maior. Verificou-se ainda que o valor de concentração máxima de etanol situou-se sempre no intervalo de 30 e 36 g L⁻¹ independentemente da quantidade de glucose obtida durante a hidrólise enzimática, isto devido aos subprodutos formados e devido ao próprio produto principal (etanol) que age também como um inibidor do crescimento da levedura.

Comprova-se mais uma vez a eficiência do pré-tratamento da matéria-prima nos bioprocessos, observado pela diferença de concentrações de glucose e de etanol obtidas nos ensaios de NSSF das lamas primárias tal qual (NL2) e tratadas com HCl (NLT2).

Para o caso do NSSF das lamas primárias tratadas, o maior rendimento de produção de etanol, com base na quantidade de glucose presente no material, foi obtido quando se usou o agitador do tipo âncora. Obtiveram-se rendimentos de 75.3 % (base açúcares/ monossacarídeos) e 92.8 % (base glucose), para uma concentração de etanol de cerca de 32.0 g L⁻¹ e uma produtividade de 1.78 g L⁻¹ h⁻¹ depois de 18h de fermentação (NLT5). Por outro lado, para o caso da Turbina de *Rushton* os rendimentos obtidos foram de 69.4 % (base monossacarídeos) e 84.3 % (base glucose), para uma concentração máxima de etanol de 29.2 g L⁻¹ e uma produtividade de 0.69 g L⁻¹ h⁻¹ obtidas depois de 42h de fermentação (NLT3).

Para as lamas primárias, vale salientar que no processo SSF a hidrólise enzimática e a fermentação ocorriam simultaneamente desde o início da operação, ou seja, embora que em pequenas quantidades já havia formação de ácido carbónico, ácido acético e outros ácidos por causa da fermentação, o que diminui o pH da mistura presente no reator tornando-o mais próximo do pH ótimo da enzima e melhorando consequentemente a eficiência da hidrólise enzimática.

5. Conclusões e sugestão de trabalho futuro

O presente trabalho teve como principal objetivo a valorização de resíduos lenhocelulósicos provenientes da indústria papelreira nacional, nomeadamente casca de *E.globulus* e lamas primárias, como fonte de biomassa e transformá-los em bioprodutos, como o bioetanol de segunda geração. Para se alcançar este objetivo, realizaram-se alguns estudos:

- Avaliação do tipo de impulsor na produção de etanol através do processo SSF. Para o caso da pasta kraft de casca, a turbina *Rushton* foi mais eficiente do que o impulsor âncora por ter conduzido a valores de concentração de etanol e consequentemente rendimentos de conversão mais elevados. No entanto, o agitador âncora conduziu a maior velocidade de produção de etanol. Relativamente à utilização de lamas primárias tratadas, a turbina *Rushton* também foi o agitador mais eficiente. Tal como verificado no SSF da pasta kraft de casca, o impulsor de âncora tende a promover um aumento de produtividade, obtendo-se concentrações de etanol elevadas em menor tempo de reação. Pode-se concluir que a velocidade de agitação não foi a mais adequada para o impulsor âncora pois pode ter danificado ou destruído algumas moléculas de enzima e células de levedura. Dependendo do parâmetro que se pretende maximizar, rendimento ou produtividade, a escolha do melhor tipo de impulsor pode recair na turbina *Rushton* ou no impulsor do tipo âncora, respetivamente.
- Avaliação da influência do pré-tratamento, com HCl, das lamas primárias. Depois de se ter aplicado o pré-tratamento, ocorreu uma diminuição do teor de CaCO_3 originando um material mais rico em hidratos de carbono e mais suscetível ao ataque enzimático. Verificou-se que o teor de CaCO_3 influencia negativamente a produção de etanol, por tornar o material mais alcalino e, consequentemente, diminui drasticamente a atividade da enzima em questão. As lamas primárias tratadas produziram valores de concentração de etanol muito mais elevados do que as lamas tal qual.
- Avaliação da influência do tempo de hidrólise no processo NSSF. Relativamente à pasta kraft de casca e às lamas primárias tratadas, verificou-se vantagem na pré-hidrólise mais prolongada tanto para a produção de glucose como para a de etanol, o que conduziu a rendimentos de conversão mais elevados. Para o caso das lamas tal qual, não se verificou vantagem na pré-hidrólise mais prolongada e as concentrações de etanol obtidas foram semelhantes para ambos os tempos de pré-hidrólise e muito baixas quando comparadas com as concentrações obtidas nos ensaios NSSF de lamas primárias tratadas e, por este motivo, não se realizaram mais nenhum tipo de ensaios NSSF com esse material.

- Avaliação do efeito da temperatura de fermentação no processo NSSF. Relativamente à pasta kraft de casca, para um tempo de pré-hidrólise de 6h, o processo foi mais eficiente quando se usou 38 °C em vez de 30 °C como temperatura de fermentação, tendo-se atingido rendimentos de conversão ligeiramente superiores. Por outro lado, o mesmo não se verificou para o tempo de pré-hidrólise de 24h. Relativamente às lamas primárias tratadas, para um tempo de pré-hidrólise de 6h, o processo foi muito mais eficiente quando a temperatura de fermentação foi de 38 °C.
- Avaliação do tipo de impulsor no processo NSSF. Quanto à pasta kraft de casca, o processo foi mais eficiente quando se usou a turbina *Rushton* tendo-se atingido valores de concentração de etanol, rendimento e produtividades mais elevados. Para o caso das lamas primárias tratadas, o processo foi mais eficiente quando se usou o impulsor do tipo âncora devido ao maior fluxo radial criado pelo mesmo no caldo reacional, o que fez com que se ultrapassasse rapidamente a barreira da viscosidade verificada nas lamas primárias. Salienta-se que este foi o ensaio NSSF em que se obteve a maior concentração de etanol (~32 g L⁻¹, NLT5) e conseqüente maior rendimento verificado (75.3 %, base monossacarídeos) durante todo o trabalho experimental.

Independentemente da matéria-prima e das variáveis estudadas, concluiu-se que o processo SSF é o mais eficiente para a produção de etanol, pelo facto de se terem alcançado melhores valores de concentração de etanol, rendimento e conversão.

O principal objetivo deste trabalho foi atingido, uma vez que se conseguiram valorizar os resíduos provenientes das indústrias papeleiras e se atingiram boas concentrações de bioetanol celulósico. No entanto, ainda há vários estudos que podem ser realizados no futuro:

- Estudar o efeito da velocidade de agitação no processo NSSF utilizando o impulsor âncora;
- Estudar a influência da variação da consistência da matéria-prima;
- Estudar o efeito da percentagem de inóculo e da carga enzimática no processo NSSF;
- Ajustar o pH das lamas primárias antes do início do processo, para que o mesmo esteja mais próximo do pH ótimo da enzima e da levedura;
- Estudar outro tipo de regime no processo NSSF (contínuo ou semi-descontínuo);
- Estudar estirpes geneticamente modificadas de *S. cerevisiae* que consigam metabolizar pentoses, para aumentar o rendimento em etanol.

6. Referências bibliográficas

- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., e Sebayang, A.H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 631–653.
- Adney, B., e Baker, J. (1996). Measurement of Cellulase Activities: Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory (NREL). Disponível em <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42628.pdf>
- Alvira, Pablo & Tomas-Pejo, Elia & Ballesteros, Mercedes & Negro, María. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource technology*, 101, 4851-61.
- Al-Zuhair, S., M. Al-Hosany, Y. Zooba, A. Al-Hammadi, S. Al-Kaabi, (2013). Development of a membrane bioreactor for enzymatic hydrolysis of cellulose, *Renew. Energy*, 56, 85–89.
- Asenjo, J.A., Yamane, T. (2015). Bioreactor Operation Modes, in: C. Press (Ed.), *Bioreact. Syst. Des.*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1994, V.B. Furlong, Automation of a reactor for enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse: computational intelligence-based adaptive control 648. 1-93.
- Asimakopoulos, K., Gavala, H. N., e Skiadas, I. V. (2018). Reactor systems for syngas fermentation processes: A review. *Chemical Engineering Journal*, 348, 732–744.
- Bhatia, S., e Bera, T. (2015). Capítulo 7 - Classical and Nonclassical Techniques for Secondary Metabolite Production in Plant Cell Culture. In Bhatia, S. (ed). *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. Amsterdam, Netherlands: Academic Press, 1st ed., 231–291.
- Barakat A, de Vries H, Rouau X (2013). Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: a review. *Bioresour Technol*, 134, 362-73.
- Boshoff, S., Gottumukkala, L.D., van Rensburg, E., Görgens, J. (2016). Paper sludge (PS) to bioethanol: Evaluation of virgin and recycle mill sludge for low enzyme, high- solids fermentation. *Bioresour. Technol.*, 203, 103–111.
- Branco, R., & Serafim, L., Xavier, A. (2018). Second Generation Bioethanol Production: On the Use of Pulp and Paper Industry Wastes as Feedstock. *Fermentation*. 5, 1-4.

- Carvajal, D., Marchisio, D.L., Bensaid, S., Fino, D. (2012). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomasses via CFD and experiments, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 51, 7518–7525.
- Caspeta, L., Caro-Bermúdez, M. A., Ponce-Noyola, T., & Martinez, A. (2014). Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy*, 113, 277–286.
- Catapano, G., Czermak, P., Eibl, R., Eibl, D., Pörtner, R. (2009). Bioreactor design and scaleup, *Cell Tissue React. Eng.* 173–259.
- Chang, Y.-H., Chang, K.-S., Huang, C.-W., Hsu, C.-L., Jang, H.-D. (2012). Comparison of batch and fed-batch fermentations using corncob hydrolysate for bioethanol production, *Fuel* 97, 166–173.
- Chen, H.-Z., Liu, Z.-H. (2016). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass from low to high solids loading, *Eng. Life Sci.* 17.
- Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., Lin, H., e Han, S. (2017). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*, 160, 196–206.
- Chen, H. (2015). Lignocellulose biorefinery feedstock engineering. 37-86.
- Chilari, D., Dimos, K., Georgoula, G., Paschos, T., Mamma, D., Louloudi, A., Papayannakos, N., & Kekos, D. (2017). Bioethanol Production from Alkali-Treated Cotton Stalks at High Solids Loading Applying Non-Isothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Waste and Biomass Valorization*, 8, 1919-1929.
- Choudhary, J., Singh, S., e Nain, L. (2016). Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, 82–92.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2021). Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Brasília, DF, v. 8, n. 3. Consultado no dia 18/01/2022. Disponível em <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>
- Corrêa, L.J., Badino, A.C., & Cruz, A. (2015). Mixing design for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse: methodology for selection of impeller configuration. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39, 285-294.
- Devarapalli, M., e Atiyeh, H. K. (2015). A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation. *Biofuel Research Journal*, 2(3), 268-280.
- Doran, P. M. (2013 a)). Chapter 8: Mixing. In Doran, P. M. (ed). *Bioprocess Engineering Principles*. Amsterdam, Netherlands.: Academic Press. 2nd ed., 255-332.

- Doran, P. M. (2013 b)). Chapter 9: Heat Transfer. In Doran, P. M. (ed). *Bioprocess Engineering Principles*. Amsterdam, Netherlands.: Academic Press. 2nd ed., 333-377.
- Doran, P. M. (2013 c)). Chapter 14-Reactor Engineering. In Doran, P. M. (ed). *Bioprocess Engineering Principles*. Amsterdam, Netherlands.: Academic Press. 2nd ed., 761-852.
- Dowe, N., e McMillan, J. (2001). *SSF Experimental Protocols-Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation: Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. National Renewable Energy Laboratory (NREL). Disponível em <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42630.pdf>.
- Du, J., Zhang, F., Li, Y., Zhang, H., Liang, J., Zheng, H., Huang, H. (2014). Enzymatic liquefaction and saccharification of pretreated corn stover at high-solids concentrations in a horizontal rotating bioreactor, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 37, 173–181
- Eduardo, S., Luiz, J., Garcia, F. (2009). O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. *BNDES*, 117–155.
- FAO (2015). *Yearbook of Forest Products*. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2017; ISBN 978-92-5-009766-4
- Fonseca, M. M., e Teixeira, J. A. (2017). *Reactores biológicos: Fundamentos e Aplicações*. Lisboa, Portugal: Lidel.
- Furlong, V.B. (2015). Automation of a reactor for enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse: computational intelligence-based adaptive control. Consultado em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/7394>
- Gaikwad, V., Panghal, A., Jadhav, S. T., Sharma, P., Bagal, A., Jadhav, A. N., e Chhikara, N. (2018). Designing of Fermenter and its utilization in food industries. Consultado em: 10.20944/preprints201808.0433.v1.
- Garcia-Ochoa, F., Santos, V.E., Gomez, E. 2.15 – Stirred Tank Bioreactors, *Compr. Biotechnol.*, 2nd, 179–198.
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour Technol.*, 101(13), 4775-800.
- Gurram, R.N., Al-Shannag, M., Lecher, N.J., Duncan, S.M., Singasaas, E.L., Alasrawi, M., (2015). Bioconversion of paper mill sludge to bioethanol in the presence of accelerants or hydrogen peroxide pretreatment. *Bioresour. Technol.*, 192, 529– 539.
- Hamelinck, C., Hooijdonk, G., Faaij, A.P.C. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middleand long-term. *Biomass and Bioenergy*. 28, 384-410.
- Hodge D.B., Karim, M.N., D.J. Schell, J.D. McMillan, Model -based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 152, 88–107.

- IEA (2021). Global Energy Review 2021. Flagship report. Consultado dia 18/01/2022. Disponível em <https://www.iea.org/reports/global-energy-review-2021/renewables>.
- Ishola, M. M., Jahandideh, A., Haidarian, B., Brandberg, T., & Taherzadeh, M. J. (2013). Simultaneous saccharification, filtration and fermentation (SSFF): a novel method for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 133, 68–73.
- Isikgor, F. H., e Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 6 (25), 4497–4559.
- Jorgensen, H., Vibe-Pedersen, J., Larsen, J., Fellby, C., (2007). Liquefaction of lignocelluloses at high-solids concentrations. *Biotechnol. Bioeng.*, 96, 862–870.
- Kádár, Z., Szengyel, Z., Réczey, K. (2004). Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*, 20, 103-110.
- Lari, Z., Ahmadzadeh, H., Hosseini, M. (2019). Cell Wall Disruption: A Critical Upstream Process for Biofuel Production. 21-35.
- Lin, Y., & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(6), 627–642.
- Lu, J., Li, X., Yang, R., Yang, L., Zhao, J., Liu, Y., Qu, Y. (2013). Fed-batch semi-simultaneous saccharification and fermentation of reed pretreated with liquid hot water for bio-ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology*, 144, 539–547.
- Mejía-Barajas, J., Alvarez-Navarrete, M., Saavedra-Molina, A., Jesús, C. G., Valenzuela-Vázquez, U., Amaya-Delgado, L. (2018). Second-Generation Bioethanol Production through a Simultaneous Saccharification-Fermentation Process Using *Kluyveromyces Marxianus* Thermotolerant Yeast. Consultado em: 10.5772/intechopen.78052.
- Mendes, C.V.T.; Rocha, J.M.S.; Menezes, F.F.; Carvalho, M.G.V.S. (2017). Batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of primary sludge from pulp and paper mills. *Environ. Technol.*, 38, 1498–1506.
- Mendes, C.V.T.; Rocha, J.M.S.; Carvalho, M.G.V.S. (2014). Valorization of residual streams from pulp and paper mills: Pretreatment and bioconversion of primary sludge to bioethanol. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 53, 19398–19404.
- Menon, V., Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38, 522–550.

- Modenbach, A., Nokes, S. (2013). Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. *Biomass and Bioenergy*, 56, 526-544.
- Mood, S.H., Golfeshan, A.H., Tabatabaei, M., Jouzani, G.S., Najafi, G.H., Gholami, M., e Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77–93.
- Morais, S. A. L. de; Nascimento, E. A. do; Melo, D. C. (2005). Análise da madeira de *Pinus ocarpa* parte I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. *Sociedade de Investigações Florestais, Viçosa*, 29(3), 461-470.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96, 673-686.
- Muhammad, N.A., Irfana Iqbal, Fatima Riaz, Ahmet Karadag and Meisam Tabatabaei (2019). Different Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass for Use in Biofuel Production, *Biomass for Bioenergy - Recent Trends and Future Challenges*. Consultado em: 10.5772/intechopen.84995.
- Nikolić, S., Mojović, L., Djukić-Vuković, A. (2013). Possibilities of improving the bioethanol production from cornmeal by yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, in *Causes, Impacts and Solutions to Global Warming*, I. Dincer, C. O. Colpan, and F. Kadioglu, Springer, 627–642.
- Ortiz-Muñiz, B., O. Carvajal-Zarrabal, B. Torrestiana-Sanchez, and M. G. Aguilar-Uscanga, (2010). Kinetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 yeast isolated from sugar canemolasses,” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(10), 1361–1367.
- Otero, J. M., Panagiotou, G., e Olsson, L. (2007). Fueling Industrial Biotechnology Growth with Bioethanol. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108, 1–40.
- Patrick, M., e Finn, B. (2008). Modes of Fermenter Operation. In McNeil, B., Harvey, L. M. (eds). *Practical Fermentation Technology*, 1st ed., 69–95.
- Parisutham, V., Kim, T., Lee, S. (2014). Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. *Bioresource technology*. 161-161
- PCM – Presidência do Conselho de Ministros (2021). Decreto-Lei n.º 8/2021. Consultado no dia 18/01/2022. Disponível em <https://files.dre.pt/1s/2021/01/01300/0000300040.pdf>
- Peixoto, S.M.C.; Nunhez, J.R. and Duarte, C.G. (2000). Characterizing the flow of stirred vessels with anchor type impellers. *Braz. J. Chem. Eng.*, 17(4-7), 925-936. ISSN 1678-4383.

- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol.*, 5(2), 53–63.
- PG Paper. (2018). The Global Paper Market-Current Review. Consultado no dia 20/01/2022. Disponível em <https://pgpaper.com/wp-content/uploads/2018/07/Final-The-Global-Paper-Industry-Today-2018.pdf>
- Philippidis, G.P., Smith, T.K., Wyman, C.E. (1993). Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process, 41, 846–853.
- Pino, M. S., Jasso, R. M. R., Michelin, M., Gallegos, A. C. F., Rodriguez, R. M., Teixeira, J. A., e Ruiz, H. A. (2018). Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. *Chemical Engineering Journal*, 347, 119–136.
- Prasertwasu, S., Khumsupan, D., Komolwanich, T., Chaisuwan, T., Luengnaruemitchai, A., Wongkasemjit, S. (2014). Efficient process for ethanol production from Thai Mission grass (*Pennisetum polystachion*), *Bioresource Technology*, 163, 152–159.
- Ravindran, Rajeev & Jaiswal, Amit. (2015). A Comprehensive Review on Pre-treatment Strategy for Lignocellulosic Food Industry Waste: Challenges and Opportunities. *Bioresource technology*. 199. Consultado em: 10.1016/j.biortech.2015.07.106.
- Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., Frederick, W. J., Jr, Hallett, J. P., Leak, D. J., Liotta, C. L., Mielenz, J. R., Murphy, R., Templer, R., & Tschaplinski, T. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5760), 484–489.
- REN21. (2017). Renewables 2016: Global Status Report. Consultado em: <https://doi.org/ISBN978-3-9818107-0-7>
- Rezania, S., Din, Md., Mohd, F., Mohamad, S., Sohaili, J., Mat Taib, S., Mohd, Y., Mohd B., Kamyab, H., & Darajeh, N., Ahsan, A. (2017). Review on Pretreatment Methods and Ethanol Production from Cellulosic Water Hyacinth. *Bioresources.*, 12, 2108-2124.
- Romaní, A., Garrote, G., Ballesteros, I., Ballesteros, M. (2013). Second generation bioethanol from steam exploded *Eucalyptus globulus* wood. *Fuel*. 111. 66–74.
- Santos, F. A., Queiróz, J. H., Colodette, J. L., Fernandes, S. A., Guimarães, V. M., Rezende, S. T. (2012). Potencial de palha de cana-de-açúcar para produção de etanol, *Química Nova*. 35 (5). Consultado em: http://quimicanova.s bq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=3583.
- Shahsavarani, H., Hasegawa, D., Yokota, D., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Boonchird, C., & Harashima, S. (2013). Enhanced bio-ethanol production from cellulosic materials by semi-simultaneous saccharification and fermentation using high

- temperature resistant *Saccharomyces cerevisiae* TJ14. *Journal of bioscience and bioengineering*, 115(1), 20–23.
- Sheehan J. (2001). The road to bioethanol: A strategic perspective of the US Department of Energy's national ethanol program. In: Himmel M, Baker J, Saddler J, editors. *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion*. Washington, D.C: American Chemical Society. 2-25.
- Singhal, G., Verma, V., Bhagyawant, S. S., e Srivastava, N. (2018). Fermentation Technology Prospecting on Bioreactors/Fermenters: Design and Types. In Kuila, A., e Sharma, V.(eds). 65-83.
- Soccol, C., Faraco, V., Karp, S., & Vandenberghe, L., & Thomaz-Soccol, V., Woiciechowski, A., Pandey, A. (2011). Lignocellulosic Bioethanol: Current Status and Future Perspectives. *Biofuels.*, 101-122.
- Souza, F. R. B. (2012). Síntese e caracterização de hemiceluloses catiônicas a partir do reaproveitamento da palha de milho. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Uberlândia. Consultado em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17364/1/d.pdf>
- Sun, Y.; Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11.
- Taherzadeh MJ, Karimi K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int J Mol Sci*. 9(9):1621-51.
- Tesfaw A, y Assefa F. (2014). Current trends in bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, inhibitor reduction, growth variables, Coculture, and immobilization. *International Scholarly Research Notices*. 532852. Consultado em: <https://doi.org/10.1155/2014/532852>
- Tran, T. A. T., Thi Kim Phung Le, T. P. Mai and Nguyen, D. Q. (2019). Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass. Consultado em: [10.5772/intechopen.86437](https://doi.org/10.5772/intechopen.86437)
- Tomas-Pejo, E., Oliva, J.M., Ballesteros, M., Olsson, L. (2008). Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 1122–1131.
- Toumela, M. et al. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 72 (2), 169-183.
- Ussiri, D.A.N., Lal, R. (2014). *Miscanthus* agronomy and bioenergy feedstock potential on minesoils, *Biofuels*, 5:6, 741-770.

- Vidal, F. (2020). Mercado e produção de bioetanol. Consultado no dia 19/01/2022. Disponível em: https://www.bnb.gov.br/documents/80223/6888601/2020_CDS_121.pdf/9ab6ae8-a1f1-2fa5-0c0f-837553f9879f.
- Volynets, B., Ein-Mozaffari, F., & Dahman, Y. (2017). Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. *Green Processing and Synthesis*, 6(1), 1–22.
- Walker, G.M., 2010. Bioethanol: Science and technology of fuel alcohol. Consultado em: https://www.researchgate.net/publication/47528550_Bioethanol_Science_and_Technology_of_Fuel_Alcohol.
- Wang, S. J., Zhong, J. J. (2007). Chapter 6 - Bioreactor Engineering. In Yang, S. T. (ed). *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources: New Technologies and Applications*, 1st ed., 131–161.
- Wilkins, M.R., Atiyeh, H., 2012. Fermentation, in: Dunford, N.T. (Eds.), *Food and industrial bioproducts and bioprocessing*. John Wiley & Sons, Inc. Ames, Iowa, pp. 185.
- Wiselogle, A., Tyson, J., Johnsson, D. (1996). Biomass feedstock resources and composition. In: Wyman CE (ed) *Handbook on bioethanol: production and utilization*. Taylor and Francis, Washington, DC, 105–118
- Wu, Z., Lee, Y. Y. (1998). Nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation for direct conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Applied biochemistry and biotechnology*, 70-72, 479–492
- Yang, T., Kumaran, Amartey, J., S., Maki, M., Li, X., Lu, F. Q. W. (2014). *Biofuels and Bioproducts Produced through Microbial Conversion of Biomass. Bioenergy Research: Advances and Applications*. 71-93.
- Zaldivar, J., Nielsen, J., & Olsson, L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(1-2), 17–34.
- Zhang, Y. P., Lynd, L.R. (2004) *Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. Biotechnology and Bioengineering*, Hanover, 88(7), 797-824.
- Zhang, J., Chu, D., Huang, J., Yu, Z., Dai, G. e Bao, J. (2010). Sacarificação simultânea e fermentação de etanol em sólidos carregadores de milho em um biorreator helicoidal. *Biotecnologia e Bioengenharia*, 105(4), 718–728.

Anexos

Anexo I – Influência da escolha do pré-tratamento da biomassa

Tabela I.1 – Comparação de alguns tipos de materiais lenhocelulósicos e seus métodos de pré-tratamento. (Ravindran e Jaiswal, 2015)

Método	Substrato lenhocelulósico	Composição (%)
Mecânico	Caroço de algodão	Celulose: 80-95 Hemiceluloses: 5-20 Lenhina: 0
Água quente alcalina	Relva	Celulose: 25 Hemiceluloses: 35.7 Lenhina: 6.4
Ácido diluído	Espiga de milho	Celulose: 45 Hemiceluloses: 35 Lenhina: 15
Explosão de vapor catalisada por SO ₂	Palha de trigo	Celulose: 30 Hemiceluloses: 50 Lenhina: 15
Alcalino	Resinosas	Celulose: 45 Hemiceluloses: 35 Lenhina: 25
AFEX	Folhosas	Celulose: 40-55 Hemiceluloses: 24-40 Lenhina: 18-25
Organosolv	Casca de nozes	Celulose: 25-30 Hemiceluloses: 25-30 Lenhina: 30-40

Tabela I.2 – Tecnologias mais promissoras de pré-tratamento de BLC (Menon e Rao, 2012)

Método	Rendimento do açúcar	F. de inibidores	F. de subprodutos	Reutilização de produtos químicos	Aplicabilidade a diferentes matéria-prima	Custo de equipamento	Sucesso à escala piloto
Mecânico	B	-	Não	Não	Sim	A	Sim
Ácidos minerais	A	A	A	Sim	Sim	A	Sim
Alcalino	A	B	A	Sim	Sim	-	Sim
LHW	A	A	B	Não	-	-	Sim
Organosolv	A	A	A	Sim	Sim	A	Sim
Oxidação húmida	A ou B	-	B	Não	-	A	-
Ozonólise	A	B	A	Não	-	A	Não
Explosão de CO ₂	A	B	B	Não	-	A	-
Explosão de vapor	A	A	B	-	Sim	A	Sim
AFEX	A	B	-	Sim	-	A	-
Líquidos iônicos	A/B	B	-	Sim	Sim	-	-

A, Alto; B, Baixo; F, Formação.

Anexo II – Estudos SSF e SHF para a obtenção de etanol, encontrados na literatura.

Tabela II.1 – Produção de bioetanol usando eucalipto e outras matérias-primas (Bauer et al., 2012; Edgardo et al., 2008; Ko et al., 2012; Monrroy et al., 2012; Wistara et al., 2016)

Feedstock	Config	Microorganism	[EtOH] (g·L ⁻¹)	Prod _{vol} (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Y _{ethanol} (g g dw ⁻¹)
<i>E. globulus</i>	SSF	<i>S. cerevisiae</i> IR2T9 ^a	30–38	NA	0.168–0.202 ^b
<i>E. globulus</i>	SSF	<i>S. cerevisiae</i> D5A	5.67	0.033	0.042 ^b
<i>A. confusa</i>			5.88	0.035	0.045 ^b
<i>Populus trichocarpa</i>	SHF	<i>S. cerevisiae</i> wild-type	NA	NA	0.12 ^b
<i>Populus maximowiczii</i>			NA	NA	0.11 ^b
<i>Populus tremula</i>			NA	NA	0.14 ^b
<i>Betula pendula</i>			NA	NA	0.13 ^b
<i>Fagus sylvatica</i>			NA	NA	0.13 ^b
<i>Pinus sylvestrii</i>			NA	NA	0.02 ^b
<i>Pinus sylvestrii</i> ^b			NA	NA	0.20 ^b
Jabon wood			SSF		NA
Feedstock	Config	Microorganism	[EtOH] (g·L ⁻¹)	Prod _{vol} (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Y _{ethanol} (% theoret.)
<i>Pinus radiata</i> ^d	SSF	<i>S. cerevisiae</i> IR2-9a ^a	28	0.388	62
NS	SSF	<i>S. cerevisiae</i> NRRL Y-2034	14.24–17.90	0.15–0.25	68.33–85.90
		<i>C. molischiana</i> ATCC 2516	12.51–18.21	0.19–0.24	60.00–87.38
NS	CBP	<i>S. cerevisiae</i> MT8-1 ^e	0.71	0.010	41.2

[EtOH], Concentração de etanol; Prod_{vol}, Produtividade volumétrica do etanol; Y_{ethanol}, rendimento em etanol; NA, não disponível; NS, não especificado; ^a, térmica aclimatada; ^b, por peso seco de madeira; ^c, por peso seco de pasta; ^d, pasta kraft de casca branqueada; ^e, transformado para expressar cinco genes de celulase.

A Tabela II.1 resume os estudos sobre a produção de bioetanol a partir da celulose da pasta kraft de casca encontrados na literatura. Investigou-se o SSF de pata Kraft de *Eucalyptus globulus* que foram pré-tratadas em diferentes condições. As concentrações de etanol variaram entre 30-38.0 g L⁻¹ e um rendimento máximo de etanol de 0,202 g · (g dw)⁻¹ foi obtido (Monrroy et al., 2012). Outros investigadores isolaram uma estirpe termotolerante de *S. cerevisiae* e testaram para SSF de pasta kraft de casca branqueada de *Pinus radiata*, obtendo uma concentração de etanol de 28 g L⁻¹ com rendimento de etanol de 62%. Alternativamente, um pré-tratamento organosolv foi aplicado, resultando em uma quantidade menor de etanol, 22 g L⁻¹, mas com um rendimento maior de 73% (Edgardo et al., 2008). Bauer e Gibbons (2012) testaram o SSF da pasta kraft de casca usando diferentes dosagens de enzimas para hidrólise. Usando *S. cerevisiae*, um rendimento máximo de etanol de 85,90 ± 5,3% foi alcançado, com uma concentração de etanol de 17,90 ± 0,99 g L⁻¹ e uma produtividade de 0,25 ± 0,015 g/ (L.h).

Tabela II.2 – Lamas de pasta e de papel (PPMS- *Pulp and Paper Mill Sludge*) (Mendes et al., 2014; Mendes et al., 2017; Boshoff et al., 2016).

Type of PPMS	Fermentation	Microorganism	[EtOH] (g·L ⁻¹)	Prod _{vol} (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	Y _{ethanol} (%)
Recycled paper sludge	Batch/SHF	<i>S. cerevisiae</i> PE-2	5.6–6.3	0.47–0.52	67.9–76.8
Primary sludge	Batch/SSF	<i>S. cerevisiae</i>	22.7	0.94	80.6
		<i>K. marxianus</i> NCYC 1426	20.7	0.86	73.7
	Fed-batch/SSF	<i>S. cerevisiae</i> (baker yeast)	40.7	0.52	32.4
		<i>K. marxianus</i> NCYC 1426	24.2	0.31	18.8
Virgin pulp sludge	Fed-batch/SSF	<i>S. cerevisiae</i> MH1000	34.2	0.230	66.9
Corrugated recycled paper sludge			45.5	0.448	78.2
Primary sludge	Batch/SSF	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 26602	41.7–41.9	0.78–0.80	48.9–49.4
	Fed-batch/SSF		33.3–39.7	0.43–0.52	39.1–46.4
Primary sludge ^a	Batch/SHF	<i>FermPro</i> TM	25–30	1.73–3.28	94.5–95.7
Primary sludge ^b	Batch/SHF	<i>S. cerevisiae</i> (baker yeast)	8.3	0.16	64.7
		<i>P. stipitis</i> DSM 3651	10.5	0.20	76.5
Primary sludge ^c	Batch/SHF	<i>S. cerevisiae</i> (baker yeast)	7.1	0.14	0.32
		<i>P. stipitis</i> DSM 3651	8.5	0.16	62.7
Primary sludge	Batch/SHF	<i>S. cerevisiae</i> GIM-2	9.5	0.59	66.5

[EtOH], concentração de etanol; Prod_{vol}, produtividade volumétrica do etanol; Y_{ethanol}, rendimento de etanol; ^a, adição de acelerador de poliácridamida catiônica XP10020 durante a hidrólise enzimática; ^b, tratado com HCl; ^c, ácido gasto tratado.

A Tabela II.2 mostra diferentes estudos de produção de bioetanol a partir de PPMS. Mendes *et al.* (2017) estudaram a produção de etanol a partir de lamas primárias. Analisaram efeito do modo de operação e do uso de leveduras diferentes, nomeadamente *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*, e a *S. cerevisiae* apresentou melhores resultados do que a levedura *K. Marxianus*. O modo *fed-batch* permitiu um carregamento de sólidos de lama e uma carga enzimática mais baixa, fornecendo uma quantidade maior de etanol produzido, mas com rendimentos de etanol mais baixos. Boshoff *et al.* (2016) estudaram o mecanismo *fed-batch* SSF de dois PPMS diferentes. A lama da produção de pasta virgem apresentou alta viscosidade e, portanto, proporcionou menor concentração de etanol e rendimento do que a lama de papelão ondulado reciclado. Esses autores também concluíram que a digestibilidade, a capacidade de retenção de água e a viscosidade foram os principais fatores que afetaram esse lote alimentado com alta carga de sólidos SSF. Mendes *et al.* (2014) estudaram diferentes ácidos inorgânicos e orgânicos para a neutralização do CaCO₃ em lamas primárias, concluindo que o HCl ou ácido gasto foram eficientes, mas liberaram CO₂. As lamas tratadas foram então hidrolisadas enzimaticamente e o hidrolisado obtido foi posteriormente fermentado. Esses autores compararam a levedura de fermentação de hexose *S. cerevisiae* e a levedura de fermentação de hexose e pentose *P. stipitis* para a produção de etanol, uma vez que as lamas resultantes do

processamento de madeiras de eucalipto contêm uma mistura de glucose e xilose, a espécie *P. stipitis* apresentou o melhor desempenho.

Anexo III – Solução Tampão

A solução de tampão citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) foi preparada inicialmente com uma concentração de 1M, sendo posteriormente diluída para a concentração pretendida de 0.05 M. Para a preparação da solução de tampão citrato de 1M de pH 4.5, pesou-se 210 g de ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), dissolvendo-se em 750 mL de água destilada. De seguida adicionou-se cerca de 50 a 60 g de hidróxido de sódio (NaOH) de modo a obter um pH por volta dos 4.4. Adicionou-se água destilada até um volume de 1L de solução. Reajustou-se o valor de pH para 4.5 com hidróxido de sódio (NaOH, em pellets). A solução de tampão citrato de sódio de 0.05 M foi obtida pela adição de 50 mL da solução de 1M em 950 mL de água destilada.

Anexo IV – Meios de cultura, solução de nutrientes e solução de extrato

A preparação do meio de cultura sólido, de 100 mL de solução de nutrientes e de 100 mL meio de cultura líquido teve por base os compostos apresentados na Tabela IV.1 (para 350 mL de solução).

Tabela IV.1 – Componentes necessários para a preparação dos meios de cultura e da solução de nutrientes.

Compostos	Meio sólido	Meio líquido	Solução de Nutrientes
Agar	15.00 (g L ⁻¹)	-	-
Glucose	10.00 (g L ⁻¹)	10.00 (g L ⁻¹)	-
Peptona	5.00 (g L ⁻¹)	5.00 (g L ⁻¹)	175.00 (g L ⁻¹)
Extrato de levedura	3.00 (g L ⁻¹)	3.00 (g L ⁻¹)	105.00 (g L ⁻¹)
Extrato de malte	3.00 (g L ⁻¹)	3.00 (g L ⁻¹)	105.00 (g L ⁻¹)
Água destilada	0.50 (L)	0.10 (L)	-
Solução de tampão citrato	-	-	0.10 (L)

Já havia um inóculo da levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602 previamente cultivado em meio sólido e armazenado em frigorífico.

Para preparar o inóculo fresco de levedura em meio líquido, pesou-se 1 g de glucose, que foi dissolvida em 50 mL de água destilada num balão de *Erlenmeyer* de 250 mL, posteriormente fechado com algodão, folha de papel, papel de alumínio e elástico. De seguida, pesou-se 0.3 g de extrato de malte, 0.3 g de extrato de levedura e 0.5 g de peptona num frasco autoclavável de 100 mL, e de seguida introduziu-se 50 mL de água destilada.

Simultaneamente foi feita a preparação da solução de nutrientes para os ensaios, e para isso pesou-se 1.05 g de extrato de malte, 1.05 g de extrato de levedura e 1.75 g de peptona num frasco autoclavável de 100 mL, introduzindo-se de seguida 100 mL de solução de tampão citrato a 0.05 M. Posteriormente, colocaram-se os frascos referidos numa autoclave a 121 °C durante 15 min. Assim que a operação de esterilização terminou, tiraram-se os frascos da autoclave e deixou-se arrefecer. Perante a chama do bico de *Bunsen*, verteu-se os 50 mL (solução de nutrientes para o inóculo) para o balão *Erlenmeyer* que continha a glucose dissolvida. Com a ajuda de uma ansa, transferiu-se as células de levedura do meio sólido para o meio líquido e fechou-se o frasco, apenas com algodão. Este mesmo frasco, foi colocado numa incubadora a 38°C e 150 rpm durante um período de ~ 14h.

Foram necessários cálculos prévios para se preparar a solução enzimática a utilizar nos ensaios. Parâmetros como a consistência da matéria-prima, volume de ensaio, carga e atividade enzimática foram tidos em conta nos cálculos. Para a preparação desta solução adicionou-se o volume de enzima obtido nos cálculos e de seguida a solução de tampão citrato de 0.05 M, com intuito de se obter 50 mL de solução de enzimática. Posteriormente o frasco é colocado numa incubadora para estabilização térmica da solução. As quantidades a adicionar de cada solução são calculadas a partir das seguintes equações:

$$m_{MS}(g_{MS}) = \frac{\text{Consistência (\%)} * V_{\text{trabalho}}(\text{mL})}{100} \quad (\text{IV.1})$$

$$V_{\text{enzima}}(\text{mL}) = \frac{m_{MS}(g_{MS}) * C_{\text{enzimática}}\left(\frac{\text{FPU}}{g_{MS}}\right)}{A_{\text{enzimática}}\left(\frac{\text{FPU}}{\text{mL}_{\text{enzimática}}}\right)} \quad (\text{IV.2})$$

$$V_{\text{tampão}}(\text{mL}) = V_{\text{solução enzimática}}(\text{mL}) - V_{\text{enzima}}(\text{mL}) \quad (\text{IV.3})$$

Anexo V – Condições utilizadas na realização dos ensaios SSF e NSSF.

Para determinar a quantidade de matéria-prima, solução enzimática e de solução tampão citrato 0.05 M a se usar e cada em ensaio recorreu-se as seguintes equações:

$$m_{MS}(g_{MS}) = \frac{\text{consistência (\%)} * V_{\text{trabalho}}(\text{mL})}{100} \quad (\text{VI.1})$$

$$m_{\text{húmida}}(g_{\text{húmida}}) = \frac{m_{MS}(g_{MS})}{ST_{\text{média}}\left(\frac{g_{MS}}{g_{\text{húmida}}}\right)} \quad (\text{VI.2})$$

$$V_{\text{tampão total}} = V_{\text{trabalho}} - V_{\text{inóculo}} - V_{\text{solução de nutrientes}} - V_{\text{enzima}} - m_{\text{húmida}} \quad (\text{VI.3})$$

O volume de solução enzimática é preparado pela adição de solução tampão citrato 0.05 M ao V_{enzima} (solução viscosa de enzima) necessário para se atingir a carga enzimática desejada até se atingir 50 mL de solução.

De modo a facilitar os cálculos, considerou-se que a matéria-prima tinha uma densidade semelhante à da água (1 g/mL).

Tabela V.1 – Condições e os parâmetros utilizados na realização dos ensaios de SSF para a pasta kraft de casca e para um volume de trabalho de 350 mL.

Matéria-prima	Pasta kraft de casca	
	SSF (38°C)	
Método (T de operação)		
Tipo de impulsor	Turbina <i>Rushton</i>	Âncora com 4 pás retas/radiais
Act.enzimática (FPU/mL enzima)	64.9	59.7
Teor de Secura (g/g)	0.923	0.923
Pasta seca (g)	28.00	28.00
HC (g)	26.68	26.68
m húmida (g)	30.34	30.34
V_{enzima} (mL)	10.28	11.18
$V_{solução\ enzimática}$ (mL)	50.00	50.00
$V_{inóculo}$ (mL)	35.00	35.00
$V_{solução\ de\ nutrientes}$ (mL)	100.00	25.00
$V_{tampão\ total}$ (mL)	134.66	209.66

Os valores de atividade enzimática são referentes a temperatura de 38°C; T, temperatura.

Tabela V.2 – Condições e os parâmetros utilizados na realização dos ensaios de SSF para as lamas primárias (tal qual e tratadas com HCl) e para um volume de trabalho de 350 mL

Matéria-prima	Lamas primárias tal qual	Lamas primárias tratadas	
		SSF (38 °C)	
Método (T de operação)			
Tipo de impulsor	Turbina de <i>Rushton</i>	Turbina <i>Rushton</i>	Âncora com 4 pás retas/radiais
Act.enzimática (FPU/mL enzima)	64.9	59.7	59.7
Teor de Secura (g/g)	0.234	0.206	0.241
Lamas secas (g)	28.00	28.00	28.00
HC (g)	21.42	25.90	25.90
m húmida (g)	119.45	135.79	116.33
V_{enzima} (mL)	8.25	10.85	10.85
$V_{solução\ enzimática}$ (mL)	50.00	50.00	50.00
$V_{inóculo}$ (mL)	35.00	35.00	35.00
$V_{solução\ de\ nutrientes}$ (mL)	100.00	25.00	25.00
$V_{tampão\ total}$ (mL)	45.55	104.21	123.67

Os valores de atividade enzimática (Act.enzimática) são referentes a temperatura de 38°C; T, temperatura

Tabela V.3 – Condições e os parâmetros utilizados na realização dos ensaios de NSSF para a pasta kraft de casca e para um volume de trabalho de 350 mL

Matéria-prima	Pasta kraft de casca				
	NSSF (50°C – 30°C)		NSSF (50°C - 38°C)		
Método (T de hidrólise – T de fermentação)					
Tipo de impulsor	Turbina <i>Rushton</i>		Âncora com 4 pás retas/radiais		
Tempo de pré-hidrólise (h)	6	24	6	24	6
Act.enzimática (FPU/mL enzima)	160.9	247.0	160.9	247.0	<u>176.2</u>
Teor de Secura (g/g)	0.923	0.923	0.923	0.923	0.923
Pasta seca (g)	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00
HC (g)	26.68	26.68	26.68	26.68	26.68
m húmida (g)	30.34	30.34	30.34	30.34	30.34
V enzima (mL)	4.15	2.70	4.15	2.70	3.79
V solução enzimática (mL)	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
V inóculo (mL)	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
V solução de nutrientes (mL)	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
V tampão total (mL)	209.66	209.66	209.66	209.66	209.66

Os valores de atividade enzimática são referentes a temperatura de 50°C

Tabela V.4 – Condições e os parâmetros utilizados na realização dos ensaios de NSSF para as lamas primárias tal qual e para um volume de trabalho de 350 mL

Matéria-prima	Lamas primárias tal qual	
	NSSF (50°C - 30°C)	
Método (T de hidrólise – T de fermentação)		
Tipo de impulsor	Turbina <i>Rushton</i>	
Tempo de pré-hidrólise (h)	6	24
Act.enzimática (FPU/mL enzima)	160.9	160.9
Teor de Secura (g/g)	0.234	0.234
Lamas secas (g)	28.00	28.00
HC (g)	21.42	21.42
m húmida (g)	119.45	119.45
V enzima (mL)	3.33	3.33
V solução enzimática (mL)	50.00	50.00
V inóculo (mL)	35.00	35.00
V solução de nutrientes (mL)	25.00	25.00
V tampão total (mL)	120.55	120.55

Os valores de atividade enzimática são referentes a temperatura de 50°C

Tabela V.5 – Condições e os parâmetros utilizados na realização dos ensaios de NSSF para as lamas primárias tratadas e para um volume de trabalho de 350 mL

Matéria-prima	Lamas primárias tratadas			
	NSSF (50°C - 30°C)		NSSF (50°C - 38°C)	
Método (T de hidrólise – T de fermentação)	Turbina <i>Rushton</i>		Âncora com 4 pás retas/radiais	
Tipo de impulsor				
Tempo de pré-hidrólise (h)	6	24	6	24
Act.enzimática (FPU/mL enzima)	247.0		247.0	
Teor de Secura (g/g)	0.206		0.206	
Lamas secas (g)	28.00		28.00	
HC (g)	25.90		25.90	
m húmida (g)	135.79		135.79	
V enzima (mL)	2.62		2.62	
V solução enzimática (mL)	50.00		50.00	
V inóculo (mL)	35.00		35.00	
V solução de nutrientes (mL)	25.00		25.00	
V tampão total (mL)	104.21		104.21	

Os valores de atividade enzimática são referentes a temperatura de 50°C

Anexo VI – Produtos secundários obtidos durante os processos SSF e NSSF.

Nestes processos, o metabolismo das leveduras pode levar também à formação de glicerol, celobiose, ácido succínico e ácido acético. Através das análises no HPLC foi possível observar a formação destes compostos, através da realização das curvas de calibração de modo a conseguir determinar as suas concentrações.

Tabela VI.1 - Subprodutos obtidos durante os bioprocessos (SSF e NSSF) de lamas primárias e de pasta kraft de casca

Processo	Ensaio	Material	t _h (h)	T _r (°C)	Concentração (g L ⁻¹)			
					Ácido acético	Glicerol	Ácido succínico	Celobiose
SSF	KA1	Pasta	-	38	0.77	5.20	-	8.73
	KA2	kraft de casca	-		-	1.47	0.34	2.13
	LA1	Lamas primárias	-		4.47	3.95	-	4.61
	LTA1	-	-		0.64	2.70	0.32	1.86
	LTA2	-	-		-	3.23	-	1.76
NSSF	NK1	Pasta kraft de casca	6	30	0.51	2.20	-	-
	NK2		24		1.02	5.70	4.05	-
	NK3		6		0.80	6.00	-	-
	NK4	24	38	0.97	5.99	0.80	-	
	NK5	6		0.67	5.57	-	0.87	
	NL1	Lamas primárias	6	30	1.87	1.75	-	1.05
	NL2	-	24		1.48	0.43	0.09	2.02
	N.LT1	Lamas primárias tratadas	6		2.89	1.76	1.62	3.17
	N.LT2		24		0.36	4.35	-	1.84
	N.LT3		6		0.83	7.67	8.76	3.46
N.LT4	24	38	1.29	3.87	1.18	0.92		
N.LT5	6		0.71	3.60	-	2.10		

O ácido acético, um ácido alifático, é formado pela hidrólise do grupo acetil presente nas hemiceluloses. A sua presença no meio fermentativo ocasiona um aumento no consumo de ATP pela levedura, nessas condições, parte do ATP que seria utilizado para o crescimento ou fermentação é desviado para manutenção de seu pH interno. A Celobiose é um forte inibidor para as enzimas celulases que pode impedir a sinergia entre os componentes individuais das mesmas. Portanto, manter uma baixa concentração de celobiose no reator é extremamente importante no processo SSF. Wu e Lee (1998), concluíram que uma carga enzimática de 25 FPU/g_{glucanas} é suficiente para evitar o acúmulo de celobiose no reator durante a sacarificação enzimática. Este acúmulo ocorre devido à atividade insuficiente das β-glucosidases.

Anexo VII – Resultados dos ensaios SSF e NSSF

Tabela VII.1 - Resultados obtidos nos ensaios SSF utilizando a pasta kraft de casca e as lamas primárias, com uma consistência de 8 % e carga enzimática de 25 FPU/gHC.

Ensaio	t (h)	pH	[ETOH] (g L ⁻¹)	R _{SSF-MS} (g _{ETOH} / g _{materialseco})	Y _{ETOH-G} (%)	Y _{SSF} (%)	P (g L ⁻¹ h ⁻¹)
KA1	2	5.45	0.8	0.01	2.08	1.74	0.38
	4	5.42	1.3	0.02	3.68	3.07	0.33
	6	5.36	2.8	0.04	7.84	6.54	0.47
	23	5.13	33.2	0.42	91.91	76.63	1.44
	25	5.11	33.8	0.42	93.57	78.01	1.35
	27	5.11	34.5	0.43	95.43	79.56	1.28
	47	5.02	35.7	0.45	98.74	82.32	0.76
	52	4.94	35.3	0.44	97.65	81.41	0.68
	73	4.64	34.5	0.43	95.55	79.66	0.47
KA2	2	5.42	0.9	0.01	2.37	1.98	0.43
	4	5.26	3.4	0.04	9.54	7.95	0.86
	6	5.17	9.3	0.12	25.68	21.41	1.55
	24	5.05	33.0	0.41	91.18	76.02	1.37
	26	5.02	32.5	0.41	89.79	74.86	1.25
	30	5.03	32.6	0.41	90.18	75.18	1.09
	32	5.03	33.0	0.41	91.25	76.07	1.03
	48	4.95	31.1	0.39	86.17	71.84	0.65
	LA1	2	7.18	0.7	0.01	2.32	1.88
4		7.05	1.0	0.01	3.49	2.83	0.25
6		6.92	2.3	0.03	8.14	6.58	0.38
23		6.88	28.0	0.35	99.27	80.31	1.22
25		7.06	28.0	0.35	99.46	80.46	1.12
27		7.05	27.3	0.34	96.90	78.39	1.01
47		6.67	28.1	0.35	99.66	80.63	0.60
52		6.60	27.2	0.34	96.52	78.08	0.52
73		7.07	27.0	0.34	95.99	77.65	0.37
LTA1	2	6.16	1.1	0.01	3.06	3.04	0.53
	4	5.89	2.7	0.03	7.86	7.81	0.68
	6	5.72	8.5	0.11	24.54	24.38	1.42
	24	5.39	34.3	0.43	99.13	98.50	1.43
	26	5.38	34.2	0.43	98.93	98.30	1.32
	30	5.38	33.7	0.42	97.45	96.83	1.12
	32	5.39	34.4	0.43	99.56	98.93	1.08
	48	4.76	33.2	0.41	95.81	95.21	0.69
	LTA2	16	5.14	32.8	0.41	95.15	77.14
18		5.15	33.5	0.42	96.91	78.88	1.86
20		5.17	33.5	0.42	96.78	78.77	1.67
24		5.10	32.5	0.41	93.84	76.38	1.35
42		5.08	29.9	0.37	86.28	70.23	0.71
44		5.04	28.6	0.36	82.72	67.33	0.65
48		4.94	27.9	0.35	80.49	65.51	0.58

Tabela VII.2 - Resultados obtidos nos ensaios NSSF de pasta kraft de casca, com uma consistência de 8 % e carga enzimática de 25 FPU/gHC.

Ensaio	t (h)	pH	[ETOH] (g L ⁻¹)	R _{NSSF-MS} (g _{ETOH} /g _{materialseco})	Y _{ETOH-G} (%)	Y _{NSSF} (%)	P _{ETOH} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	t _r (h)
NK1	2	5.19	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	4	5.40	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	6	5.40	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	24	5.15	27.0	0.34	74.76	62.33	1.59	17
	26	5.14	27.3	0.34	75.58	63.01	1.44	19
	28	5.13	27.6	0.35	76.37	63.67	1.31	21
	30	5.13	27.8	0.35	76.96	64.16	1.21	23
	48	5.04	28.8	0.36	79.76	66.50	0.70	41
	50	5.04	28.8	0.36	79.72	66.46	0.67	43
	52	5.04	28.1	0.35	77.76	64.83	0.62	45
	54	5.06	28.6	0.36	79.15	65.99	0.60	48
NK2	2	5.38	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	4	5.37	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	24	5.19	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	26	5.18	1.0	0.01	2.84	2.37	0.51	2
	28	5.03	2.8	0.03	7.64	6.37	0.69	4
	48	4.50	30.1	0.38	83.22	69.38	1.25	24
	50	4.58	29.3	0.37	80.95	67.48	1.13	26
	52	4.48	29.4	0.37	81.27	67.76	1.05	28
	72	4.39	29.1	0.36	80.59	67.19	0.61	48
	NK3	2	5.11	-	0.00	0.00	0.00	0.00
4		5.40	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
6		5.38	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
24		5.11	28.8	0.36	79.73	66.47	1.69	17
26		5.03	29.5	0.37	81.60	68.03	1.55	19
30		4.93	29.1	0.36	80.41	67.04	1.21	24
48		4.44	28.2	0.35	78.04	65.06	0.69	41
50		4.41	27.8	0.35	77.05	64.24	0.65	43
54		4.83	27.6	0.35	76.47	63.75	0.58	48
NK4		2	5.35	-	0.00	0.00	0.00	0.00
	4	5.33	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	6	5.34	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	24	4.71	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	26	4.76	1.0	0.01	2.71	2.26	0.49	2
	30	4.64	8.1	0.10	22.31	18.60	1.34	6
	48	4.14	27.6	0.34	76.32	63.63	1.15	24
	50	4.23	28.0	0.35	77.61	64.71	1.08	26
	54	4.29	27.9	0.35	77.27	64.42	0.93	30
	72	4.26	27.8	0.35	77.05	64.23	0.58	48
NK5	2	5.40	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	4	5.35	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	6	5.38	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	24	5.13	25.2	0.31	69.64	58.05	1.48	-
	26	5.09	25.4	0.32	70.41	58.70	1.34	17
	30	5.10	26.2	0.33	72.63	60.55	1.14	19
	48	4.33	22.7	0.28	62.85	52.40	0.87	23
	50	4.35	23.2	0.29	64.14	53.48	0.77	26
	54	-	-	0.00	0.00	0.00	0.00	30

Tabela VII.3 - Resultados obtidos nos ensaios NSSF de lamas primárias, com uma consistência de 8 % e carga enzimática de 25 FPU/g_{HC}.

Ensaio	t (h)	pH	[ETOH] (g L ⁻¹)	R _{NSSF-MS} (g _{ETOH} / g _{materiaiseco})	Y _{ETOH-G} (%)	Y _{NSSF} (%)	P _{ETOH} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	t _r (h)	
NL1	2	-	-	-	-	-	-	-	
	4	8.36	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-	
	6	7.99	-	0.05	13.81	11.18	0.65	-	
	24	7.00	3.9	0.05	13.62	11.02	0.23	17	
	26	7.28	3.8	0.05	14.29	11.56	0.21	19	
	28	7.38	4.0	0.05	14.33	11.59	0.19	21	
	30	7.57	4.0	0.05	14.27	11.54	0.17	23	
	48	7.12	4.0	0.05	14.27	11.55	0.10	41	
	50	7.20	4.0	0.05	14.32	11.59	0.09	43	
	52	7.11	4.0	0.05	14.06	11.37	0.09	45	
	54	6.85	4.0	0.00	0.00	0.00	0.00	48	
NL2	2	8.33	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-	
	4	5.50	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-	
	6	8.54	-	0.00	1.25	1.01	0.06	-	
	24	6.79	0.4	0.02	6.52	5.28	0.08	-	
	25	6.28	1.8	0.04	10.62	8.59	1.50	2	
	27	6.39	3.0	0.04	12.27	9.92	0.58	6	
	47	6.45	3.5	0.04	12.47	10.09	0.15	24	
	52	6.30	3.5	0.04	12.55	10.15	0.14	26	
	73	6.57	3.5	0.00	0.00	0.00	0.00	30	
	NLT1	2	7.40	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
		4	7.50	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
6		7.82	-	0.00	0.00	0.00	0.00	17	
24		6.34	11.0	0.14	31.79	26.17	0.65	19	
26		6.44	11.6	0.15	33.60	27.65	0.61	24	
30		5.83	11.9	0.15	34.29	28.22	0.49	41	
48		4.94	11.9	0.15	34.51	28.40	0.29	43	
50		4.93	12.0	0.15	34.59	28.47	0.28	48	
54		4.87	12.1	0.15	35.02	28.82	0.25	-	
NLT2		18	5.57	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
		20	5.06	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	22	4.73	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-	
	24	4.55	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-	
	42	4.64	19	0.23	53.97	44.41	1.10	17	
	44	4.66	18.8	0.24	54.44	44.80	0.99	19	
	48	4.67	20.0	0.25	57.85	47.61	0.83	24	
	66	4.61	23.8	0.30	68.70	56.54	0.58	41	
	68	4.61	24.3	0.30	70.17	57.75	0.56	43	
	72	4.59	25.0	0.31	72.37	59.56	0.52	48	
	NLT3	2	7.31	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
4		7.25	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-	
5		7.10	-	0.00	0.00	0.00	4.59	-	
24		4.88	22.9	0.29	66.28	54.55	1.27	18	
26		4.63	25.0	0.31	72.27	59.47	1.25	20	
30		4.46	26.6	0.33	77.01	63.38	1.11	24	
48		4.26	29.2	0.36	84.29	69.37	0.69	42	
50		4.27	28.9	0.36	83.48	68.70	0.66	44	
54		3.96	28.8	0.36	83.25	68.51	0.60	48	
NLT4		2	7.21	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
		4	7.36	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
	6	7.69	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-	
	24	5.96	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-	
	26	5.71	3.3	0.04	9.65	7.94	1.67	2	
	30	5.45	6.8	0.09	19.68	16.20	1.13	6	
	48	4.36	9.2	0.12	26.73	22.00	0.39	24	
	50	4.33	9.3	0.12	26.85	22.10	0.36	26	
	54	4.36	9.2	0.11	26.54	21.84	0.31	30	
	72	4.32	9.0	0.11	26.13	21.51	0.19	48	
	NLT5	2	6.45	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-
4		6.53	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-	
6		6.63	-	0.00	0.00	0.00	0.00	-	
24		5.29	32.0	0.40	92.84	75.27	1.78	18	
26		5.35	31.8	0.40	92.17	74.72	1.59	20	
30		4.99	30.5	0.38	88.35	71.63	1.27	24	
48		4.77	22.9	0.29	66.39	53.82	0.54	42	
50		4.76	21.7	0.27	62.88	50.98	0.49	44	
54		4.70	20.0	0.25	57.92	46.96	0.42	48	

Anexo VIII – Preparação do DNS modificado

Mediu-se 708 mL de água destilada numa proveta. De seguida pesou-se 153 g de tartarato duplo de sódio e potássio num copo de vidro de 1L, onde foi dissolvido em cerca de 350 mL da água destilada previamente medida. Este passo foi realizado numa placa de agitação e aquecimento, de modo a facilitar a sua dissolução. Pesou-se 4.15 g de metabissulfito de sódio, que foi dissolvido em cerca de 50 mL da água destilada previamente medida, sendo

posteriormente adicionado à solução de tartarato duplo de sódio e potássio no copo de 1L. De seguida, pesou-se 9.9 g de hidróxido de sódio (NaOH) num copo de 200 mL, ao qual se adicionou cerca de 150 mL água destilada previamente medida, de forma a facilitar a sua dissolução. Pesou-se 5.3 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), que foi sendo adicionado aos poucos à solução de NaOH, mantida em banho-maria, para facilitar a dissolução do DNS a quente. Após estar completamente dissolvido foi adicionado à solução contida no copo de vidro de 1L, estando este em banho-maria. Após estar tudo completamente dissolvido, introduz-se 3.8 mL de fenol previamente fundido a 50 °C no copo de 1L e adiciona-se o restante da água destilada que sobrou. Depois de arrefecer o conteúdo no copo de 1L, verte-se para um frasco âmbar e reserva-se até a sua utilização (Adney e Baker, 1996).

Anexo IX – Atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática da Cellic[®] Ctec2 preparam-se diferentes diluições de solução enzimática, como ilustrado na Tabela IX.1. Foram determinadas atividades enzimáticas para duas temperaturas diferentes: 38 °C, pelo facto do SSF ser realizado a esta temperatura e 50 °C, pelo facto da pré-hidrólise do processo NSSF ter sido realizada a 50 °C.

Iniciou-se por cortar tiras de papel de filtro para serem usadas como substrato, cujas dimensões eram: 6 cm de comprimento e 1 cm de largura.

A diluição 1:100 foi feita num balão volumétrico de 20 mL e posteriormente foi colocada num frasco e usada para preparar as restantes diluições.

Tabela IX.1 - Preparação das soluções enzimáticas diluídas

F _d	Solução enzimática (mL)	Tampão citrato de sódio 0.05 M (mL)
1:100	0.2	19.8
1:150		0.5
1:200		1
1:250		1.5
1:350		2.5
1:400	1 (1:100)	3
1:450		3.5
1:500		4
1:600		5
1:660		5.6

F_d – Fator de diluição.

Depois de preparadas as diluições, as mesmas foram colocadas numa incubadora, a temperatura que se pretendia determinar a atividade enzimática, durante alguns minutos.

A análise da amostra para cada diluição foi feita em duplicado, o que explica a existência dos tubos de ensaio A e B e, além disso, para cada diluição havia um tubo de ensaio onde se preparou o branco da amostra (padrão), cujos componentes podem ser observados na Tabela IX.2.

Tabela IX.2 - Componentes adicionados em cada tubo de ensaio e os respectivos volumes utilizados para a determinação

Tubo de ensaio	F _d	Componentes
i		Branco tampão – 1.5 mL de tampão
ii		Branco substrato – 1.5 mL de tampão citrato + papel
1	1:150	
2	1:200	
3	1:250	
4	1:350	A: 1 mL tampão + 0.5 mL solução enzimática (da respetiva diluição) + substrato
5	1:400	B: 1 mL tampão + 0.5 mL solução enzimática (da respetiva diluição) + substrato
6	1:450	Padrão: 1 mL tampão + 0.5 mL solução enzimática (da respetiva diluição)
7	1:500	
8	1:600	
9	1:660	

F_d – Fator de diluição.

Colocou-se 1.5 mL da solução tampão citrato de 0.05 M nos tubos de ensaio devidamente identificados (i, branco tampão e ii, branco substrato). Posteriormente, colocou-se 1 mL de tampão nos tubos de 1 a 9 e nos respetivos brancos. De seguida, adicionou-se 0.5 mL das soluções enzimáticas diluídas, que acabavam de sair da incubadora, a cada um desses tubos de ensaio, agitaram-se os mesmos no vortex (Heidolph Reax 200) e posteriormente foram colocados os tubos na incubadora (Stuart S1600) a 38 e 50 °C (durante 60 min) com intuito de determinar a atividade enzimática e conseqüentemente a quantidade enzima a adicionar nos processos SSF e NSSF, respetivamente. Ao fim dos 60 minutos, introduziu-se 3 mL do componente DNS, previamente preparado (Anexo VIII), a cada um dos tubos de ensaio (desde o i até ao 9 e os respetivos brancos). Taparam-se os tubos e agitou-se os mesmos no vortex. De seguida, colocaram-se os tubos num recipiente com água a ferver durante 5 minutos. Posteriormente retiraram-se os tubos e colocaram-se num banho de água fria durante 5 minutos. Após os 5 minutos, retirou-se 0.2 mL de solução contida em cada tubo, colocou-se em cuvetes de plástico e adicionou-se 2.5 mL de água destilada. Usou-se um espectrofotómetro (Vis-NIR

spectrophotometer ENSINA), utilizando um comprimento de onda de 540 nm (UV-Vis), para determinação glucose libertada durante a 60 min de hidrólise enzimática do substrato usado. Na Tabela IX.3 estão ilustrados os valores das absorvâncias lidas no espectrofotômetro e a absorvância corrigida através da Equação IX.1

$$\text{Abs Corrigida} = \text{Abs Amostra} - \text{Abs Padrão} - \text{Abs Branco substrato} \quad (\text{IX.1})$$

Tabela IX.3 - Absorvâncias e respetiva diluição para a determinação da atividade enzimática

Data	Abs Branco Substrato (nm)	F _d	Abs	Abs Amostra (540 nm)	Abs corrigida
04.06.2020	0,041	500	0.160	0.494	0.293
		500	0.160	0.574	0.373
		600	0.128	0.447	0.278
		600	0.128	0.456	0.287
		660	0.026	0.406	0.339
		660	0.026	0.500	0.433
		350	0.099	0.516	0.353
		350	0.099	0.599	0.436
16.06.20	0.064	400	0.098	0.584	0.422
		400	0.098	0.564	0.402
		450	0.088	0.562	0.410
		450	0.088	0.539	0.387
		300	0.131	0.776	0.571
		300	0.131	0.804	0.599
18.06.20	0.074	350	0.104	0.766	0.588
		350	0.104	0.746	0.568
		400	0.099	0.683	0.510
		400	0.099	0.668	0.495

F_d – Fator de diluição.

Curva de calibração, previamente preparada, utilizada para determinar a concentração de açúcares redutores em equivalentes de glucose presentes na amostra:

$$\text{Glucose}_{\text{curva}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = 8.9435 * \text{Abs Corrigida} + 0.1615 \quad (\text{IX.2})$$

De modo a determinar a quantidade de glucose libertada pelo substrato durante 60 min de sacarificação enzimática, recorreu-se a Equação (IX.3)

$$m_{\text{glucose libertada}} (\text{mg}) = \text{Glucose}_{\text{curva}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) * V_{\text{Senzimática diluída}} (\text{mL}) \quad (\text{IX.3})$$

De seguida, analisaram-se as massas de glucose obtidas e identificaram-se quais as duas concentrações (volumétricas) de enzima, calculadas pela Equação (IX.4), que libertaram aproximadamente 2 mg de glucose, efetuando-se uma interpolação linear entre dois pontos. Através da interpolação desses 2 pontos (onde um tem de ser maior que 2 e outro menor que 2), determinou-se a concentração volumétrica de enzima que liberta 2.0 mg de glucose a 50 °C (Equação IX.5) e a 38°C (Equação IX.6)

$$\text{Enzima} \left(\frac{\text{mL}_{\text{Senzimática}}}{\text{mL}_{\text{Senzimática diluída}}} \right) = \frac{1}{F_d} \quad (\text{IX.4})$$

Na Tabela IX.4 estão apresentados os valores obtidos e calculados, mencionados anteriormente.

Tabela IX.4 - Concentração de glucose obtidos através da curva de calibração, massa de glucose libertada pela tira de papel de filtro

$T_{\text{incubação}}$ (°C)	F_d	Glucose curva (mg/mL)	$V_{\text{Senzimática diluída}}$ (mL)	m glucose libertada (mg)	m glucose libertada média (mg)	[Enzima] (mL/mL)
50	500	2.78	0.5	1.39	1.57	0.002
		3.50	0.5	1.75		
	600	2.65	0.5	1.32	1.34	0.0017
		2.73	0.5	1.36		
	660	3.19	0.5	1.60	1.81	0.0015
		4.03	0.5	2.02		
	350	3.32	0.5	1.66	1.84	0.0029
		4.06	0.5	2.03		
	400	3.94	0.5	1.97	1.92	0.0025
		3.76	0.5	1.88		
	450	3.83	0.5	1.91	1.86	0.0022
		3.62	0.5	1.81		
	300	5.27	0.5	2.63	2.70	0.0033
		5.52	0.5	2.76		
	350	5.42	0.5	2.71	2.67	0.0029
		5.24	0.5	2.62		
400	4.72	0.5	2.36	2.33	0.0025	
	4.59	0.5	2.29			
38	150	4.714	0.5	2.36	2.26	0.0067
		4.338	0.5	2.17		
	200	3.462	0.5	1.73	1.79	0.0050
		3.685	0.5	1.84		
	250	3.667	0.5	1.83	1.85	0.0040
		3.748	0.5	1.87		

F_d – Fator de diluição.

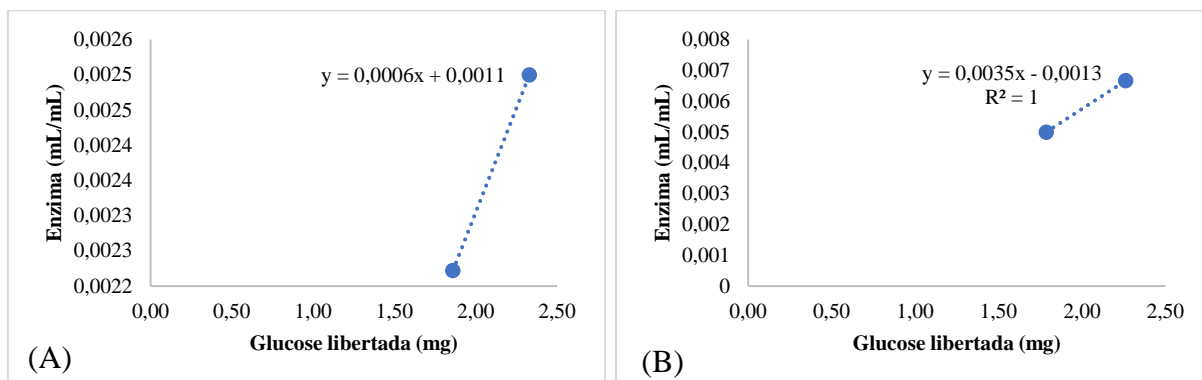


Figura IX.1 - Interpolação linear entre os dois pontos que se aproximam das concentrações de enzima que libertaram 2 mg de glucose para as temperaturas de (A) 50 e (B) 38 °C.

$$\text{Enzima}_{\text{libertando 2 mg de glucose}} \left(\frac{\text{mL}_{\text{Senzimática}}}{\text{mL}_{\text{Senzimática diluída}}} \right) = 0,0006 * m_{\text{glucose libertada}}(\text{mg}) + 0,0011 \quad (\text{IX.5})$$

$$\text{Enzima}_{\text{libertando 2 mg de glucose}} \left(\frac{\text{mL}_{\text{Senzimática}}}{\text{mL}_{\text{Senzimática diluída}}} \right) = 0,0035 * m_{\text{glucose libertada}}(\text{mg}) + 0,0013 \quad (\text{IX.6})$$

Onde: $m_{\text{glucose libertada}} = 2 \text{ mg}$

A concentração de enzima que libertou aproximadamente 2 mg de glucose calculada pela equação anterior é 0.0023 (mL/mL) e 0.0057 para as temperaturas de 50 e 38 °C, respetivamente. Através deste valor, foi possível determinar a atividade enzimática calculada a temperatura na qual as soluções enzimáticas foram incubadas (Equação IX.7).

$$\text{Act}_{\text{enzimática}} \left(\frac{\text{FPU}}{\text{mL}_{\text{Senzimática}}} \right) = \frac{0,37 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mL}_{\text{Senzimática diluída}}} \right)}{\text{Enzima}_{\text{libertando 2 mg de glucose}} \left(\frac{\text{mL}_{\text{Senzimática}}}{\text{mL}_{\text{Senzimática diluída}}} \right)} \quad (\text{IX.7})$$

O valor 0.37 é obtido através da massa de 2.0 mg de equivalentes de glucose libertadas, da massa molar da glucose (180 g/mol), do volume de enzima diluída usado ($V_{\text{Senzimática diluída}} = 0.5 \text{ mL}$) e do tempo de incubação (60 min), conforme demonstra a Equação IX.8

$$0,37 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mL}_{\text{Senzimática diluída}}} \right) = \frac{\frac{2 \text{ (mg)}}{180 \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)} * 10^3 \left(\frac{\text{g}}{\text{mg}} * \frac{\mu\text{mol}}{\text{mol}} \right)}{60(\text{min}) * 0,5 \text{ mL}_{\text{Senzimática diluída}}} \quad (\text{IX.8})$$