



Joana Cláudia Almeida Santos

Aproveitamento dos hidratos de carbono constituintes da palha de cereais para a produção de bioetanol

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

Setembro de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Joana Cláudia Almeida Santos

Aproveitamento dos hidratos de carbono constituintes da palha de cereais para a produção de bioetanol

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

Supervisores:

Professora Doutora Maria da Graça Videira Sousa Carvalho
Professor Doutor Jorge Manuel dos Santos Rocha

Instituição:

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

Coimbra
2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Tereza de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Chegado ao fim este percurso, não poderia deixar de agradecer a colaboração de todos os que permitiram que a realização deste trabalho fosse possível.

Gostaria de agradecer aos meus orientadores, Professora Doutora Graça Carvalho e Professor Doutor Jorge Rocha, pelo tempo dedicado à orientação e supervisão da presente dissertação.

À Engenheira Cátia Mendes por toda a ajuda, pelos ensinamentos e boa disposição proporcionada.

Aos meus amigos agradeço os momentos partilhados ao longo destes anos, todo o apoio e incentivo. Um especial obrigada à Rafaela Rodrigues e à Virginie Xavier pela amizade e companheirismo nesta fase final.

De forma muito especial, agradeço a toda a minha família pela compreensão nos momentos de ausência, pela confiança, carinho e pelo apoio demonstrado ao longo de toda esta etapa.

A todos, um muito obrigada!

RESUMO

Com o elevado crescimento populacional aumentou o consumo de combustíveis fósseis e com estes a produção de CO₂. Na tentativa de reduzir estas emissões é imprescindível enveredar pelo uso de combustíveis alternativos, como o bioetanol. Este é o biocombustível mais utilizado no setor dos transportes e pode ser produzido a partir de resíduos de biomassa lenhocelulósica, tirando partido da sua abundância e do seu baixo custo. No presente trabalho utilizou-se uma matéria-prima abundante na zona do Baixo Mondego, a palha de arroz (PA), para a produção de bioetanol. A produção de bioetanol a partir de material lenhocelulósico é constituída por quatro etapas: o pré-tratamento, a hidrólise dos hidratos de carbono a açúcares simples, a fermentação dos açúcares em etanol e a sua purificação. Para este fim foi estudado o pré-tratamento alcalino, tendo sido realizados diversos ensaios em que se analisou a influência da concentração de NaOH, da temperatura, do tempo e ainda do pré-tratamento prévio com HCl. Nos ensaios de pré-tratamento cujas condições operatórias levaram à obtenção de melhores resultados de redução do teor de lenhina e de hidrólise enzimática (121°C, 2 horas e 120 e 150 mg_(NaOH)/g_(PA)) foram sujeitos a um aumento de escala. Para isso, foi utilizada uma autoclave de maiores dimensões e o pré-tratamento foi realizado em frascos de 1 L em vez de 250 mL. Após caracterização do material sólido obtido, verificou-se que se obteve uma percentagem de deslenhificação de 87.8 e 90.4% nos ensaios realizado com 120 e com 150 mg_(NaOH)/g_(PA), respetivamente. Procedeu-se depois à hidrólise enzimática da biomassa com o complexo enzimático Cellic CTec2. Foram realizados ensaios de hidrólise enzimática em regime descontínuo e semi-descontínuo durante 72 horas, tendo-se concluído que estes não eram viáveis para a carga de hidratos de carbono estabelecida. Em alternativa foram realizados ensaios de SSF (*Simultaneous Saccharification & Fermentation*) em regime semi-descontínuo, onde se utilizou o mesmo complexo enzimático e a levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602. Nestes obteve-se uma produção de etanol de 30.9 e 42.1 g/L, com uma produtividade de 0.64 e 0.38 g/(L h) e rendimento de conversão glucose-etanol de 69.3 e 95.3%, usando no pré-tratamento 120 e 150 mg_(NaOH)/g_(PA), respetivamente. Realizou-se ainda um ensaio de SSF com um meio nutricional alternativo sintético em que se obteve uma concentração máxima de etanol de 33.3 g/L, uma produtividade de 0.46 g/(L h) e um rendimento de 70.4%. Concluindo, foram alcançados os objetivos inicialmente propostos para o presente trabalho, tendo-se obtido uma produção de etanol satisfatória com os pré-tratamentos usados com a palha de arroz numa primeira fase de testes.

Palavras-chave: biomassa lenhocelulósica, pré-tratamento, NaOH, bioetanol, SSF, *S. cerevisiae*.

ABSTRACT

With the high population growth, the consumption of fossil fuels has increased and consequently the production of CO₂. In an attempt to reduce these emissions, it is essential to look for alternative fuels, such as bioethanol. This is the most used biofuel in the transport sector and can be produced from lignocellulosic biomass waste, due to its abundance and its low cost. In the present work an abundant raw material from Baixo Mondego zone was used, rice straw (RS), for the production of bioethanol. The production of bioethanol from lignocellulosic material consists of four stages: pre-treatment, hydrolysis of carbohydrates to simple sugars, fermentation of sugars in ethanol and its purification. For this purpose, the alkaline pre-treatment was studied, and several tests were carried out in order to evaluate the influence of NaOH concentration, temperature, time and previous pre-treatment with HCl. Pretreatment trials leading to the highest lignin reduction and enzyme hydrolysis (121°C, 2 hours and 120 and 150 mg_(NaOH)/g_(RS)) were scaled up. In this case, a larger autoclave was used and pretreatment was carried out in 1 L flasks instead of 250 mL. After the characterization of the obtained solid material, it was found that a delignification percentage of 87.8 and 90.4% was obtained in the assays performed with 120 and 150 mg_(NaOH)/g_(RS), respectively. The enzymatic hydrolysis of the biomass was then performed with the Cellic CTec2 enzyme complex. Enzymatic hydrolysis assays were performed in a batch and semi-batch regime for 72 hours, and it was concluded that these were not viable for the established carbohydrate quantity. Alternatively, SSF assays were performed in a semi-discontinuous regime, where the same enzyme complex and the yeast *S. cerevisiae* ATCC 26602 were used. Using the pre-treated samples produced with 120 and 150 mg_(NaOH)/g_(RS), a concentration of 30.9 and 42.1 g/L of ethanol was obtained, with a productivity of 0.64 and 0.38 g/(L h) and a glucose-ethanol conversion efficiency of 69.3 and 95.3%, respectively. An SSF test was also performed with a synthetic alternative nutrient medium in which was a maximum ethanol concentration 33.3 g/L was obtained, as well as a productivity of 0.46 g/(Lh) and a conversion efficiency of 70.4%. In conclusion, the objectives initially proposed for the present work were reached and a satisfactory ethanol production was obtained with this preliminary approach used to pre-treat the rice straw.

Keywords: lignocellulosic biomass, pre-treatment, NaOH, bioethanol, SSF, *S. cerevisiae*.

ÍNDICE

Resumo.....	i
Abstract	iii
Índice de tabelas	vii
Índice de figuras	ix
Nomenclatura	xi
1. Introdução.....	1
1.1 Âmbito e motivação	1
1.2 Objetivos.....	3
1.3 Organização da dissertação	4
2. Revisão bibliográfica.....	5
2.1 Valorização de resíduos agrícolas	5
2.2 Composição e estrutura da biomassa lenhocelulósica.....	6
2.2.1 Celulose.....	7
2.2.2 Hemiceluloses	8
2.2.3 Lenhina.....	9
2.2.4 Extratáveis e cinzas	11
2.2.5 Palha de arroz.....	12
2.3 Produção de bioetanol a partir de biomassa lenhocelulósica	13
2.3.1 Tecnologias de pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica	14
2.3.2 Hidrólise dos hidratos de carbono celulósicos	25
2.3.3 Fermentação	27
2.3.4 Estratégias de hidrólise e de fermentação	29
3. Materiais e métodos	33
3.1 Caracterização química da palha de arroz.....	33
3.2 Extrato enzimático.....	34
3.3 Microrganismos usados em SSF	34
3.4 Pré-tratamento da palha de arroz.....	35
3.4.1 Pré-tratamento com NaOH.....	37
3.4.2 Pré-tratamento com HCl e combinado com NaOH.....	38
3.5 Procedimento de hidrólise enzimática.....	39
3.6 Processo SSF	41

3.7	Parâmetros de hidrólise enzimática e fermentação	42
3.8	Métodos analíticos	43
3.8.1	Cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC)	43
3.8.2	Método de determinação dos açúcares redutores (DNS).....	44
4.	Resultados e discussão.....	45
4.1	Caraterização química da palha de arroz	45
4.2	Pré-tratamento com NaOH.....	46
4.2.1	Ensaio preliminares de hidrólise enzimática.....	49
4.3	Pré-tratamento com HCl e combinado com NaOH	51
4.4	Aumento de escala dos pré-tratamentos.....	52
4.5	Ensaio de hidrólise enzimática	57
4.6	Ensaio de SSF.....	59
5.	Conclusão e sugestões de trabalho futuro.....	67
6.	Referências bibliográficas	71
	Anexos	83
	Anexo I – Caraterização química da palha de arroz.....	85
	Anexo II –Ensaio de hidrólise enzimática e de fermentação.....	91
	Anexo III – Quantificação de compostos por HPLC	93
	Anexo IV – Preparação do tampão citrato e do reagente DNS-modificado	94
	Anexo V – Concentração de açúcares, produtos e subprodutos no processo de SSF	95

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade de resíduos agrícolas produzidos anualmente (adaptado de Saini et al., 2015).....	5
Tabela 2. Composição mássica de diferentes tipos de biomassa lenhocelulósica.....	7
Tabela 3. Composição química da palha de arroz.....	12
Tabela 4. Diferentes condições de pré-tratamento da palha de arroz (PA) e seus resultados. (*).....	24
Tabela 5. Resultados de hidrólise enzimática (HE), SHF e SSF da palha de arroz (PA).....	31
Tabela 6. Atividade enzimática do complexo enzimático Cellic CTec 2 a 38 e a 50°C.....	34
Tabela 7. Composição do meio de cultura líquido para leveduras.....	35
Tabela 8. Composição do meio de cultura líquido alternativo para leveduras.....	35
Tabela 9. Condições de operação dos ensaios de pré-tratamento da palha de arroz (PA) com NaOH.....	37
Tabela 10. Condições de operação dos ensaios de pré-tratamento com HCl e combinado com NaOH.....	38
Tabela 11. Condições de operação dos ensaios de hidrólise enzimática.....	40
Tabela 12. Condições de operação dos ensaios de SSF.....	42
Tabela 13. Especificações para análise das amostras por HPLC.....	44
Tabela 14. Composição química da matéria-prima.....	45
Tabela 15. Condições operatórias e caracterização química da palha de arroz (PA) original e do material sólido resultante do pré-tratamento com NaOH.....	47
Tabela 16. Resultados dos ensaios de pré-tratamento da palha de arroz (PA) realizados com HCl (H) e com HCl seguido de NaOH (HN).....	51
Tabela 17. Resultados dos pré-tratamentos com aumento de escala.....	53
Tabela 18. Composição dos licores alcalinos resultantes dos pré-tratamentos com aumento de escala.....	56
Tabela 19. Resultados de SSF em semi-descontínuo com palha de arroz proveniente do ensaio NA8 e NA9 em meio normal ou alternativo.....	64
Tabela 20. Condições e quantidades utilizadas nos ensaios de hidrólise enzimática.....	91
Tabela 21. Condições e quantidades utilizadas nos ensaios de SSF.....	92
Tabela 22. Tempo de retenção, declive e fator de correlação da curva de calibração dos compostos estudados.....	93

Tabela 23. Concentrações de açúcares, produtos e subprodutos ao longo do tempo do processo de SSF obtidos por HPLC.....	95
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da produção de bioetanol a partir da biomassa lenhocelulósica (adaptado de IFPEN).....	2
Figura 2. Esquema da composição da biomassa lenhocelulósica (adaptado de Fengel e Wegener, 1984).	7
Figura 3. Estrutura da molécula de celulose (adaptado de Smook, 2002).	8
Figura 4. Estrutura e fórmula abreviada da glucuronoxilana, onde Xlyp: β -D-xilopiranosose, Me-GlcpA: ácido 4-O-metil- α -D-glucopiranosose-urónico e Ac: grupo acetilo (Ek et al., 2009).	9
Figura 5. Fórmula estrutural da lenhina de uma folhosa (Floch et al., 2015).	10
Figura 6. Complexo LCC numa herbácea (adaptado de Buranov e Mazza, 2008).	11
Figura 7. Estrutura da palha de arroz antes e após o pré-tratamento (adaptado de Santos et al., 2013).	14
Figura 8. Esquema da quebra de ligações: a) α -aril-éter e b) β -aril-éter da lenhina e c) éster entre hidratos de carbono e lenhina, por ação do pré-tratamento alcalino (adaptado de Fengel & Wegener, 1984; Chundawat et al., 2010).	23
Figura 9. Esquema do mecanismo de atuação do complexo enzimático de celulasas na hidrólise da celulose (adaptado de Ogeda e Petri, 2010).	26
Figura 10. Esquema experimental para a determinação da composição química da palha de arroz.	33
Figura 11. Representação esquemática dos pré-tratamentos.	36
Figura 12. Representação esquemática dos ensaios de hidrólise enzimática.	39
Figura 13. Representação esquemática dos ensaios de SSF.	41
Figura 14. Teor de lenhina da biomassa pré-tratada com NaOH em cada ensaio e respetivo desvio padrão.	48
Figura 15. Rendimento de hidrólise enzimática da palha de arroz original moída (carga enzimática de 15 FPU/gPA -PAM) e nos materiais resultantes dos pré-tratamentos N5 a N9 (carga enzimática de 20 FPU/gPA), após a sua moagem: a) PAM, NM5, NM6 e NM7; b) NM7, NM8 e NM9.	49
Figura 16. Efeito da moagem da palha de arroz pré-tratada (NM) no rendimento de hidrólise enzimática, resultante dos ensaios a) N5; b) N6, com uma carga enzimática de 20 FPU/gPA.	50

Figura 17. Cromatogramas obtidos por HPLC da palha de arroz a) original, b) resultante do ensaio NA8 e c) resultante do ensaio NA9.	54
Figura 18. a) Palha de arroz tal qual (1.00-5.66 mm); palha de arroz resultante do b) ensaio NA8; c) ensaio NA9.....	56
Figura 19. Fotografias dos ensaios no início (a) e c)) e no final (b) e d)) do processo de hidrólise enzimática com palha de arroz proveniente dos ensaios NA8 e NA9, respetivamente.	58
Figura 20. Rendimento de hidrólise enzimática em semi-descontínuo do ensaio NA8 ao longo do tempo.....	58
Figura 21. Evolução da concentração de açúcares e de produtos ao longo do tempo de SSF com palha de arroz obtida nos ensaios a) NA8 e b) NA9.	60
Figura 22. Cromatogramas obtidos por HPLC dos ensaios de SSF com palha de arroz original (PA) e pré-tratada (NA8 e NA9).....	62
Figura 23. Concentração de açúcares e produtos ao longo do tempo de SSF com meio de nutrientes alternativo e palha de arroz pré-tratada (NA8).....	63

NOMENCLATURA

Simbologia	Grandeza	Unidades
Abs	Absorvância a 205 nm	Adimensional
b	Comprimento da célula de quartzo	cm
bio-ETBE	Bio-eteretil-terc-butílico	-
bio-MTBE	Bio-etermetil-terc-butílico	-
CaO	Óxido de cálcio	-
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio	-
CBP	Bioprocesso Consolidado	-
C _{HPLC}	Concentração de um monossacarídeo determinada por HPLC	g/L
CO ₂	Dióxido de carbono	-
DNS	Ácido 3,5 – dinitrosalicílico	-
EBTP	European Biofuels - Technology Platform	-
ENMC	Entidade Nacional para o Mercado de Combustíveis	-
ETBE	Éter etil-terc-butílico	-
EtOH	Etanol	-
EUA	Estados Unidos da América	-
fc	Fator de correção anidro	Adimensional
FD	Fator de diluição	Adimensional
Fe ₂ O ₃	Óxido de ferro (III)	-
f _{Gluc}	Fração mássica de glucanas na palha de arroz pré-tratada	Adimensional
f _{HC}	Fração mássica de hidratos de carbono na palha de arroz pré-tratada	Adimensional
GEE	Gases com Efeito Estufa	-
HC	Hidratos de carbono	-
HCl	Ácido clorídrico	-
HMF	5-Hidroximetilfurfural	-
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	-

Simbologia	Grandeza	Unidades
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico	-
H ₂ O	Água	-
KOH	Hidróxido de potássio	-
K ₂ O	Óxido de potássio	-
m _{Ext_EtOH}	Massa de extrativos removidos com etanol	g
m _{Lenhina_ins}	Massa de lenhina insolúvel	g
m _{PAH}	Massa de palha de arroz húmida	g
m _{PAI}	Massa de palha de arroz incinerada a 575 °C	g
m _{PAS}	Massa de palha de arroz seca a 105 °C	g
MTBE	Éter metil-terc-butílico	-
NaOCl	Hipoclorito de sódio	-
NaClO ₂	Clorito de sódio	-
NaOH	Hidróxido de Sódio	-
NAA8	Ensaio NA8 usando meio nutricional alternativo na etapa de fermentação	-
NA9 e NA9	Ensaio NA8 e NA9 sujeitos a hidrólise enzimática em regime descontínuo	-
NA8' e NA9'	Ensaio NA8 e NA9 sujeitos a hidrólise enzimática em regime descontínuo	-
NH ₄ OH	Hidróxido de amónia	-
NM5 a NM9	Amostras dos ensaios N5 a N9 moídas antes da etapa de hidrólise enzimática	-
NREL	Laboratório Nacional de Energia Renovável	-
N1 a N9	Ensaio de pré-tratamento alcalino	-
P	Produtividade	g/(L h)
P ₂ O ₅	Óxido de fósforo	-
SHF	Hidrólise e Fermentação em Separado	-
SiO ₂	Dióxido de sílica	-
SSF	Hidrólise e Fermentação em Simultâneo	-
TAPPI	Associação Técnica da Indústria da Pasta e do Papel	-

Simbologia	Grandeza	Unidades
UE	União Europeia	-
$V_{\text{Hidrolisado}}$	Volume de hidrolisado	mL
Y (EtOH)	Rendimento de conversão de hidratos de carbono em etanol	Adimensional
Y' (EtOH)	Rendimento de conversão de glucose em etanol	Adimensional
ϵ	Absortividade	L/(g cm)
ω	Agitação	Ciclos/min
$\eta_{\text{Hidrólise Enzimática}}$	Rendimento da hidrólise enzimática	Adimensional
% (m/m)	Percentagem massa/massa	Adimensional
% (m/v)	Percentagem massa/volume	g/(100 mL)
% (v/v)	Percentagem volume/volume	Adimensional

1. INTRODUÇÃO

1.1 ÂMBITO E MOTIVAÇÃO

O crescimento da população e o aumento do seu nível de vida levou ao aumento da velocidade do consumo de combustíveis fósseis, a um nível que a natureza não os consegue repor. Um outro problema do consumo destes combustíveis é o aumento das emissões de gases com efeito de estufa (GEE) que são um dos principais propulsores para as alterações climáticas. Consequentemente, é necessário encontrar alternativas mais sustentáveis para a produção de energia (Eby e Montenegro, 2009).

Em Portugal, já se enveredou pela utilização de energias renováveis para efeitos de produção de energia elétrica, tais como a energia eólica, solar e hídrica; no entanto, a curto prazo, estas não constituem uma alternativa viável aos combustíveis líquidos, visto a energia elétrica não poder ser utilizada na maioria dos motores que constituem os veículos atualmente (motores de combustão interna). A União Europeia fixou para 2020, através da Diretiva 2009/28/EC, de 23 de Abril de 2009, que todos os estados membros utilizassem, no mínimo, 10% de energia renovável no setor rodoviário, como são exemplo os biocombustíveis (ENMC). Estes combustíveis são produzidos a partir de biomassa e, em larga escala, permitem reduzir quer a dependência dos combustíveis fósseis, como a emissão de GEE, dado que a biomassa utiliza CO₂ para o crescimento celular (Santos et al., 2012). Segundo o Decreto-Lei n.º 62/2006, de 21 de março, são considerados dez tipos de biocombustíveis, o biodiesel, o biogás, o bioetanol, o biometanol, o bioéter dimetílico, o bio-ETBE, o bio-MTBE, os biocombustíveis sintéticos, o bio-hidrogénio e o óleo vegetal puro (Portal Energia). A produção destes é uma vantagem da biorrefinaria integrada, pois tira partido de todos os componentes presentes na biomassa (celulose, hemicelulose, lenhina e extratáveis, para além da glucose, frutose, amido e dos óleos, consoante os casos) e dos produtos intermediários, melhorando a economia global do processo e minimizando o desperdício (Abraham et al., 2016).

O bioetanol, C₂H₅OH, é o biocombustível mais produzido no mundo, seguido do biodiesel (OECD/FAO, 2015). O biodiesel é obtido a partir de sementes oleaginosas, como a colza, o óleo de palma, a soja, o girassol e o amendoim. A vantagem deste combustível de 1ª geração é que pode ser usado simples ou misturado, por exemplo, com o gasóleo de origem fóssil. O bioetanol é utilizado usualmente numa mistura denominada E10, 10% de bioetanol e 90% de gasolina, sem que seja necessária a modificação dos motores. No caso destes serem

modificados para este efeito é possível aumentar a percentagem de bioetanol utilizada até 85%, ou mesmo até 100%. A produção de bioetanol pode ser feita a partir de três diferentes grupos de matérias-primas, surgindo o bioetanol de 1^a, 2^a e de 3^a geração. O de 1^a geração é feito a partir de culturas de açúcar (cana de açúcar, beterraba e sorgo) e de culturas amiláceas (milho, trigo, cevada, centeio, batata e mandioca); o de 2^a geração é produzido a partir de resíduos florestais e agrícolas (plantas gramíneas, eucalipto, pinheiro, salgueiro e palhas); e o de 3^a geração é produzido a partir de algas (FAO, 2008; EIA).

O grande inconveniente do bioetanol de 1^a geração é o aumento do preço dos alimentos, competindo com a utilização humana e animal, enquanto no de 2^a geração é a resistência da biomassa à biodegradação ou à hidrólise devido à matriz de hemiceluloses e lenhina que envolve a celulose. No entanto, esta última classe consiste numa melhor oportunidade uma vez que contribui para a sustentabilidade ambiental (Amnuaycheewa et al., 2016; Singh et al., 2016).

De entre todas as fontes de biomassa lenhocelulósica disponível, as palhas de cereais são renováveis e menos recalcitrantes, existem em elevada quantidade e são baratas. Uma vez que são produzidos anualmente cerca de 700-1 111 milhões de toneladas de palha de arroz em todo o mundo e que apenas 20% dessa biomassa é utilizada, a palha de arroz é uma alternativa promissora para a produção de bioetanol (FAO, 2014; Singh et al., 2016).

As principais etapas para a produção de bioetanol a partir de biomassa lenhocelulósica são o pré-tratamento da matéria-prima, a hidrólise dos polissacarídeos em açúcares simples, a fermentação dos açúcares em etanol e a sua purificação. Estas fases encontram-se esquematizadas na Figura 1.

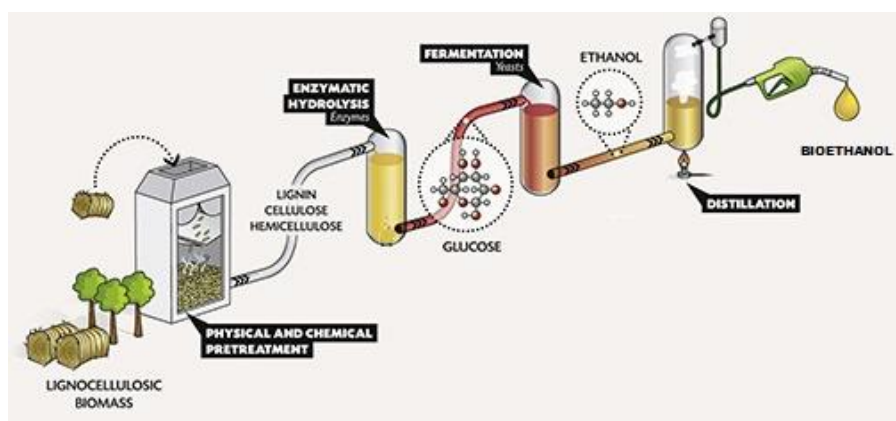


Figura 1. Esquema da produção de bioetanol a partir da biomassa lenhocelulósica (adaptado de IFPEN).

O pré-tratamento é uma das etapas mais importantes deste processo. Ele tem como objetivos a diminuição da cristalinidade da celulose, a remoção de lenhina, e ainda o aumento da área da superfície da biomassa, que facilita o acesso aos polissacarídeos durante a sua hidrólise. Esta é uma das etapas mais relevantes, relativamente ao custo do processo e também porque afeta a eficiência das etapas posteriores (Binod et al., 2010).

Após o pré-tratamento, os passos seguintes são a hidrólise ácida ou enzimática e a fermentação. A hidrólise ácida é a mais utilizada. Contudo, se o objetivo final for um processo fermentativo, não é a mais vantajosa pois ocorre a formação de compostos de degradação que inibem os microrganismos na fase posterior e por esse motivo é necessária uma fase de purificação. A hidrólise enzimática e a fermentação podem ocorrer em separado (SHF) ou em simultâneo (SSF). As vantagens do SSF em relação ao SHF são, essencialmente, o facto de se conseguir reduzir a inibição causada pelo produto da hidrólise, uma vez que a glucose é utilizada continuamente pelos microrganismos, e a redução dos custos de investimento, visto ser necessário apenas um reator ao invés de dois. A desvantagem deste processo são as diferentes temperaturas ótimas da hidrólise e da fermentação. Esta desvantagem pode ser ultrapassada utilizando-se leveduras que possuam uma capacidade fermentativa próxima do intervalo de temperatura ótima das enzimas (45-50°C) (Balat, 2011; Choudhary e Nain, 2016).

1.2 OBJETIVOS

O desenvolvimento deste trabalho teve como principal objetivo o aproveitamento dos hidratos de carbono provenientes da palha de cereais, mais concretamente da palha de arroz, para a produção de bioetanol.

Portugal é o quarto maior produtor europeu de arroz produzindo cerca de 162 Mt/ano. Deste cultivo provém uma enorme quantidade de resíduos, só na região centro de Portugal são produzidas anualmente cerca de 29.5 a 44.2 kt/ano de palha de arroz (FAO, 2014; INE, 2014).

Com o intuito de aproveitar esses resíduos, foi necessário selecionar um pré-tratamento e as respetivas condições operatórias. Foi estudado o pré-tratamento por hidrólise alcalina com hidróxido de sódio (NaOH), o pré-tratamento por hidrólise ácida com ácido clorídrico (HCl) e o pré-tratamento combinado com HCl seguido de NaOH, onde se variaram vários parâmetros operatórios. Em seguida, estudou-se ainda a influência do tipo de processo (SHF e SSF), em regime *batch* ou *fedbatch*, na produção de bioetanol.

1.3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação encontra-se dividida em cinco capítulos. No primeiro é feita uma pequena introdução, onde se enquadra, no contexto atual, a temática desta dissertação e onde são referidos os principais objetivos do trabalho experimental. No segundo capítulo é apresentada uma revisão bibliográfica, focando a valorização de resíduos agrícolas, a composição da biomassa lenhocelulósica e os processos necessários até à sua conversão em bioetanol. O terceiro capítulo consiste na apresentação dos materiais, técnicas e procedimentos experimentais adotados. No quarto capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos, ficando o último capítulo destinado às conclusões e às sugestões de trabalhos futuros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS

Com o crescimento da população mundial as atividades agrícolas têm vindo a aumentar, levando conseqüentemente a um aumento na produção de resíduos agrícolas, nomeadamente de palhas de cereais como centeio, trigo, arroz, caules de milho e de girassol e resíduos provenientes das podas de videiras e de árvores de fruto. Estes são tradicionalmente descartados de formas pouco sustentáveis (a maior parte é queimado a céu aberto nos terrenos agrícolas), resultando em conseqüências negativas para o ambiente (Saini et al., 2015). Na Tabela 1 apresenta-se a produção anual dos quatro resíduos agrícolas mais gerados no mundo.

Tabela 1. Quantidade de resíduos agrícolas produzidos anualmente (adaptado de Saini et al., 2015).

Resíduo Agrícola	Quantidade (Mt/ano)
Palha de trigo	354
Palha de arroz	731
Palha de milho	128
Bagaço de cana-de-açúcar	181

De forma a valorizá-los, vários projetos foram surgindo, por exemplo, o projeto europeu SOSTRICE para valorização energética da palha de arroz, o projeto BIODEN para a valorização e aproveitamento da palha de arroz, o projeto ProEthanol 2G para a produção de bioetanol a partir de palha de trigo e de bagaço e palha de cana, o RICEVALOR para a valorização de resíduos da produção e processamento de arroz, a construção de eco-painéis a partir de palha/casca de arroz, entre tantos outros (SOSTRICE, 2014; ITeCons; LNEG, 2011).

Estes resíduos, dos quais 70 a 90% é lenhocelulose, são uma matéria-prima bastante promissora para a produção de bioenergia, quer através de processos termoquímicos (pirólise, gaseificação, liquefação e combustão), quer por processos biológicos, como a fermentação e a digestão anaeróbia (Eckert et al., 2013; Saini et al., 2015).

Tendo em conta a necessidade atual de incorporação de biocombustíveis nos transportes terrestres, os resíduos lenhocelulósicos representam uma matéria-prima promissora para a produção de bioetanol, pois estão disponíveis em grande quantidade, possuem um baixo custo

e, para além disso, ajudam na mitigação das alterações climáticas, reduzindo as emissões de CO₂ (Saini et al., 2015).

Nesse sentido, já começam a existir algumas fábricas de demonstração que produzem bioetanol de 2^a geração, embora a tecnologia de produção ainda não se encontre totalmente desenvolvida, devido aos elevados teores de lenhina e de cinzas nas palhas que dificultam a sua conversão em açúcares fermentáveis. Na Europa destacam-se: a Clariant, na Alemanha, e a Inbicon, na Dinamarca, que utilizam como matéria-prima a palha de trigo, e a Abengoa, em Espanha, e a BetaRenewables, em Itália, que utilizam como matéria-prima a palha de arroz (EBTP). Em Portugal ainda não existe nenhuma unidade de produção de bioetanol de 2^a geração.

De entre os quatro resíduos agrícolas mencionados anteriormente, a palha de arroz é o mais abundante e, como tal, é também o que possui um maior potencial de produção de bioetanol, podendo-se produzir cerca de 205 mil milhões de litros por ano. Desta forma, é possível reduzir a dependência dos combustíveis fósseis e a problemática ambiental da sua eliminação através da queima, que é usada visto este resíduo ser produzido em grande quantidade e possuir um conteúdo nutricional baixo (Sarkar et al., 2012; Saini et al., 2015).

2.2 COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DA BIOMASSA LENHOCELULÓSICA

A biomassa lenhocelulósica é formada por uma estrutura recalcitrante e fibrosa, constituída maioritariamente por compostos de elevado peso molecular (celulose, hemiceluloses e lenhina) intercaladas com compostos orgânicos e inorgânicos de baixo peso molecular (extratáveis e cinzas, respetivamente) (Fengel e Wegener, 1984). As fibrilas de celulose que constituem a biomassa são formadas a partir de polímeros de glucose que estabelecem ligações de hidrogénio e de van der Waals entre si, encontrando-se estas fibrilas envoltas numa matriz de hemiceluloses e de lenhina (Sjöström, 1993; Balat, 2011). A representação esquemática da composição da biomassa é apresentada na Figura 2.

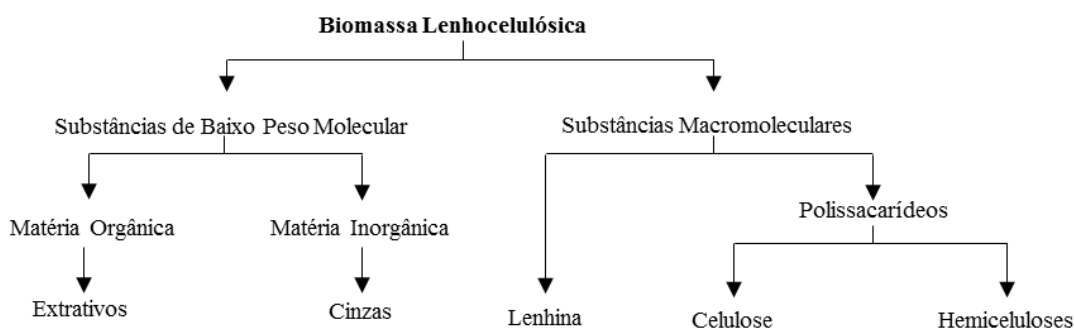


Figura 2. Esquema da composição da biomassa lenhocelulósica (adaptado de Fengel e Wegener, 1984).

A composição e a forma como estes compostos se combinam entre si varia de espécie para espécie, e há diferenças notórias entre madeiras de folhosas, de resinosas ou gramíneas. As variações dentro da mesma espécie são, essencialmente, devidas à genética, às diferentes condições ambientais de crescimento, entre outros fatores (Sjöström, 1993; Balat, 2011; Brandt et al., 2013). Na Tabela 2 apresentam-se as composições típicas de diferentes tipos de biomassa lenhocelulósica.

Tabela 2. Composição mássica de diferentes tipos de biomassa lenhocelulósica.

Tipo de biomassa	Composição mássica (% , em base seca)				Referência
	Hidratos de Carbono (Hemiceluloses + Celulose)	Lenhina	Cinzas	Extrativos	
<u>Madeira de resinosas</u>					
Pinheiro	66.5	27.7	0.3	2.9 ^{a)}	Hamelinck et al. (2005)
Abeto (<i>Picea abies L.</i>)	69.6	29.7	n.d.	0.6 ^{b)}	Bertaud e Holmbom et al. (2004)
<u>Madeira de folhosas</u>					
Eucalipto	62.6	27.7	1.3	4.3 ^{a)}	Hamelinck et al. (2005)
Carvalho branco	67.3	23.2	0.6	n.d.	Kim, (2004)
<u>Gramíneas</u>					
Palha de milho	65.2	16.7	6.3	n.d.	Kim, (2004)
Palha de arroz	59.1	17.5	11.3	14.0 ^{a)}	Castro et al. (2016)

n.d. - não definido; ^{a)} Não referido, mas visto ter-se baseado em protocolos NREL, terá sido extração sequencial com H₂O/EtOH;

^{b)} Extração com acetona (TAPPI).

2.2.1 Celulose

A celulose é o constituinte principal da matéria lenhocelulósica. O seu teor varia com o tipo de biomassa e, tipicamente, está compreendido entre 30 a 60% (m/m) (Brandt et al., 2013).

Trata-se de um homopolímero linear, constituído por unidades de β -D-glucose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, sendo por isso a unidade de repetição a celobiose (duas moléculas de β -D-glucose), como apresentado na Figura 3. A fórmula geral da celulose é $(C_6H_{10}O_5)_n$, onde n representa o grau de polimerização médio. Este valor, varia de espécie para espécie, com a sua natureza e com a localização da celulose na parede celular, estando compreendido entre 1 000 e 50 000 unidades (Sjöström, 1993; Balat, 2011; Jung et al., 2015).

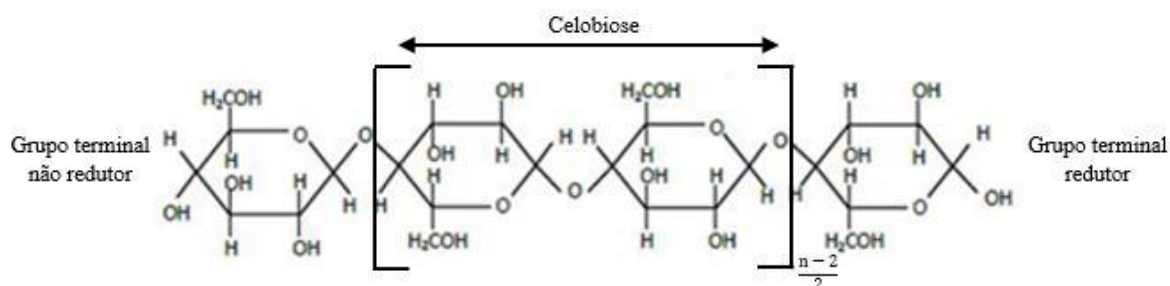


Figura 3. Estrutura da molécula de celulose (adaptado de Smook, 2002).

Nas extremidades da cadeia de celulose, os grupos hidroxilo diferem nas suas reatividades, um possui um caráter redutor e o outro não redutor. Os grupos hidroxilo que existem ao longo de toda a cadeia da celulose, três por cada molécula de β -D-glucose, são responsáveis pelas ligações de hidrogénio intra e intermoleculares. A agregação de várias moléculas de celulose dá origem a microfibrilas, onde alternam zonas cristalinas e zonas amorfas. Esta estrutura confere às fibras de celulose uma elevada resistência e faz com que sejam insolúveis em água e em grande parte dos solventes orgânicos (Sjöström, 1993).

2.2.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses constituem cerca de 20 a 40% (m/m) da biomassa lenhocelulósica. Contrariamente à celulose, são um heteropolímero, são amorfas, ramificadas e de cadeia mais curta (Brandt et al., 2013).

Os principais tipos de ligações entre os monómeros das hemiceluloses são do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ e este polímero apresenta um grau de polimerização entre 100 a 200. As hemiceluloses são constituídas por pentoses (D-xilose e L-arabinose), por hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose), e por ácidos urónicos em menor quantidade (ácido glucurónico e galacturónico). Se o principal açúcar deste polímero for uma pentose, é designado por pentosana, se for uma hexose denomina-se hexosana. Nas palhas de cereais, similarmente ao que acontece nas madeiras das folhosas, as hemiceluloses dominantes são as glucuronoxilanas, xilanas com

ligações laterais de ácidos metilglucurônicos e de grupos acetilo (Balat, 2011; Brandt et al., 2013). A sua estrutura é apresentada na Figura 4.

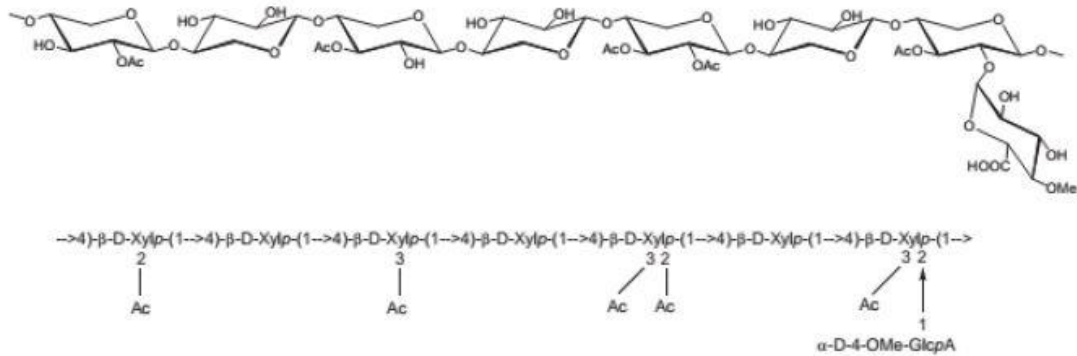


Figura 4. Estrutura e fórmula abreviada da glucuronoxilana, onde Xlyp: β -D-xilopiranosse, Me-GlcA: ácido 4-O-metil- α -D-glucopiranosse-urónico e Ac: grupo acetilo (Ek et al., 2009).

O facto de as hemiceluloses possuïrem uma estrutura curta e amorfa faz com que possuam um elevado potencial de ligação à água, ficando os seus grupos hidroxilos mais acessíveis, o que facilita a sua solubilização. Para além disso possuem também grupos carboxílicos, provenientes dos ácidos urónicos, que, sendo facilmente ionizáveis, fazem com que as fibras suspensas em meio aquoso sejam afetadas pela temperatura, pH e pela natureza do contra ião (Sjöström, 1993; Carvalho, 1999).

2.2.3 Lenhina

A lenhina constitui cerca de 15 a 30% (m/m) da biomassa lenhocelulósica, é responsável por unir as fibras entre si e aumenta a resistência da biomassa a ataques químicos ou biológicos. É um polímero aromático, hidrofóbico, amorfo, confere cor à biomassa e possui elevada rigidez, uma vez que tem uma estrutura reticulada, constituída por ligações duplas (Fengel e Wegener, 1984).

Esta macromolécula é sintetizada por reações de polimerização a partir dos álcoois sinapílico, coniferílico e *p*-cumarílico (Sjöström 1993). As subunidades que incorporam estes precursores são designadas de seringilo, guaiacilo e *p*-hidroxifenilo, consoante possuam dois, um ou nenhum grupo metoxilo, respetivamente (Brand et al., 2013). Na Figura 5 está apresentado um excerto da fórmula estrutural da lenhina típica de uma folhosa.

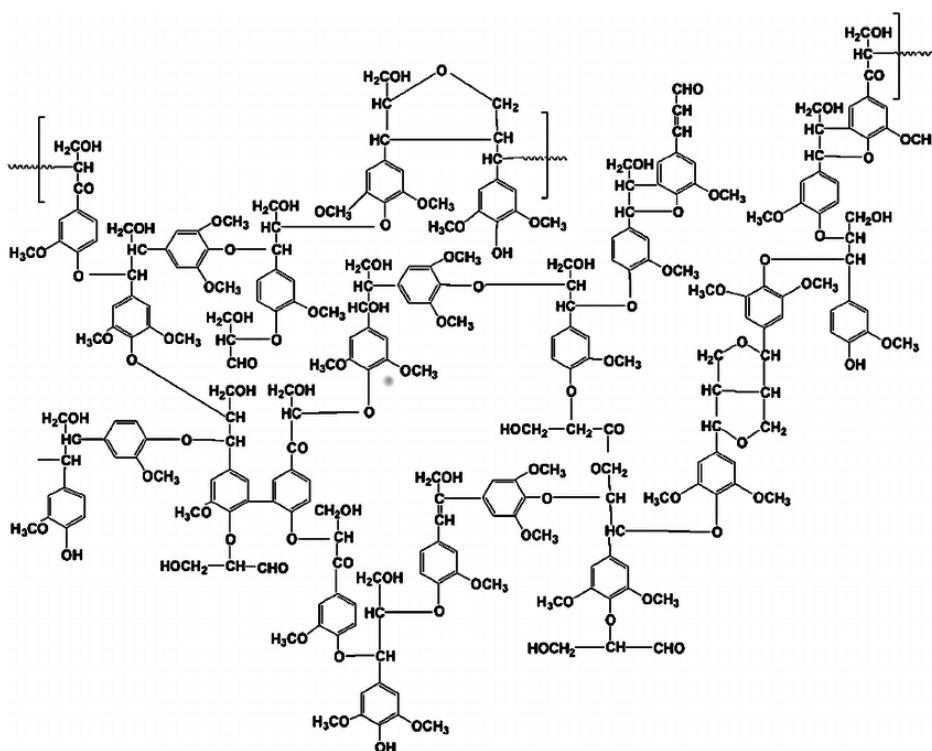


Figura 5. Fórmula estrutural da lenhina de uma folhosa (Floch et al., 2015).

Estas unidades estão ligadas de uma forma complexa e aleatória, através de ligações covalentes, variando a sua proporção com a localização da parede celular, a espécie, o tipo e idade das células (Sjöström, 1993; Carvalho 1999). Geralmente, as plantas gramíneas possuem um teor de lenhina inferior à madeira de folhosas, que por sua vez é inferior à das resinosas (Jorgensen et al., 2007). Nas primeiras encontram-se os três tipos de lenhina, S (siringilo), G (guaiacilo) e H (p-hidroxifenilo), existindo uma maior proporção de lenhina do tipo H, comparativamente às restantes (Ek et al., 2009).

A facilidade de deslenhificação está relacionada com a ligação entre as unidades aromáticas. As ligações são mais fáceis de quebrar quando existem ligações do tipo éter, uma vez que a estrutura fica mais aberta. Por outro lado, quando existem ligações carbono-carbono os monómeros ficam mais próximos uns dos outros, ficando a estrutura da lenhina mais condensada e dificultando a quebra das ligações (Fengel e Wegener, 1984; Carvalho, 1999).

Nos processos de deslenhificação ocorre a ruptura das ligações α e β -aryl-éter (mais abundantes) fenólicas e não fenólicas, havendo um aumento progressivo da dissolução da lenhina. Depois de um determinado grau de deslenhificação (cerca de 2% nas madeiras de folhosas) o processo deve ser interrompido com o intuito de não degradar excessivamente hidratos de carbono. Isto porque a lenhina residual forma um complexo com as hemiceluloses (complexo carboidratos-lenhina, LCC) através de ligações éster ou éter, sendo estas,

respetivamente, hidrolisáveis ou estáveis em meio alcalino. Este complexo em herbáceas é estruturalmente diferente, a lenhina encontra-se ligada ao ácido ferúlico por ligações éter e o ácido ferúlico liga-se aos hidratos de carbono (arabinoxilanas) por ligações éster, denominando-se por complexo lenhina/fenólico-carboidratos (Figura 6) (Sjöström, 1993; Carvalho, 1999; Buranov e Mazza, 2008).

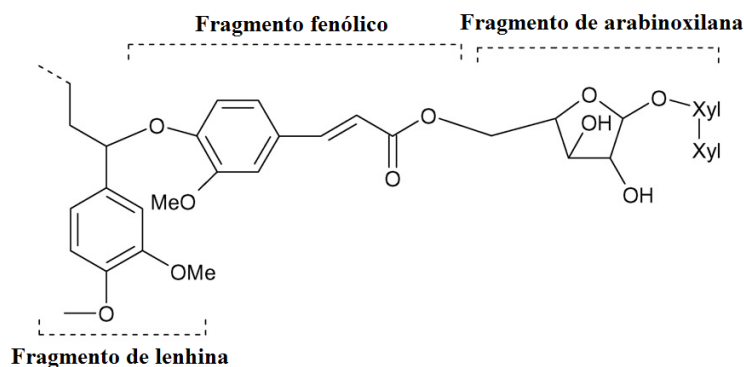


Figura 6. Complexo LCC numa herbácea (adaptado de Buranov e Mazza, 2008).

2.2.4 Extratáveis e Cinzas

Para além dos componentes macromoleculares (celulose, hemiceluloses e lenhina), a biomassa lenhocelulósica também possui, embora em menor percentagem, compostos de baixo peso molecular, tais como extratáveis e cinzas. Os extratáveis são compostos de origem orgânica, enquanto as cinzas são de origem inorgânica, e a sua proporção varia de espécie para espécie e mesmo dentro da mesma espécie (Ek et al., 2009).

Os extratáveis são compostos solúveis em água ou em solventes orgânicos, como o etanol e a acetona. A biomassa lenhocelulósica possui uma grande variedade destes compostos, nomeadamente ácidos gordos, aminoácidos, proteínas, pectinas, açúcares simples, compostos polifenólicos, ceras e resinas. Os extratáveis são uma reserva energética e protegem a planta do ataque de insetos e microrganismos, tendo, no entanto, a desvantagem de inibirem os processos de conversão da biomassa (Fengel e Wegener, 1984; Sjöström, 1993).

As cinzas são os resíduos que resultam da combustão dos compostos orgânicos e oxidação dos inorgânicos. São constituídas essencialmente por silício, sódio, potássio, cálcio, fósforo, enxofre, ferro e magnésio. Estes componentes são absorvidos pelas plantas a partir dos solos, e por este motivo a sua proporção varia com o ambiente de crescimento (Nogueira e Rendeiro, 2008; Chen, 2014).

2.2.5 Palha de Arroz

A palha de arroz provém de um vegetal do género *Oryza*, de onde derivam cerca de 22 espécies, destacando-se a *Oryza glaberrima* e a *Oryza sativa* L. como as mais produzidas para consumo humano. Desta última, as variedades mais produzidas na Europa são a Japónica (Carolino) e a Índica (Aguilha), sendo que por cada quilograma de grão de arroz colhido se obtém cerca de 1 a 1.5 kg de palha de arroz (Abraham et al., 2016).

Consoante a variedade, os fertilizantes utilizados, as épocas sazonais e as regiões em que o arroz é cultivado e colhido, assim varia a qualidade e a composição química da palha de arroz (Abraham et al., 2016). Na Tabela 3 encontram-se reunidas composições químicas deste tipo de biomassa, obtidos a partir da literatura.

Tabela 3. Composição química da palha de arroz.

Composição mássica (% , em base seca)				Referência
Hidratos de Carbono (Hemiceluloses + Celulose)	Lenhina	Cinzas	Extrativos	
65.5	17.2	11.4	n.d.	Mussatto e Roberto (2002)
60.7	21.9	9.2	7.9 ^{b)}	Rodriguez et al. (2008)
55.0	25.3	10.5	n.d.	Chang et al. (2011)
57.5	18.3	n.d.	n.d.	Hou et al. (2012)
60.2	16.2	n.d.	n.d.	Zhu et al. (2015)
64.3	15.3	n.d.	n.d.	Amnuaycheewa et al. (2016)
59.1	17.5	11.3	14.0 ^{a)}	Castro et al. (2016)

n.d. - não definido; ^{a)} Não referido, mas visto ter-se baseado em protocolos NREL, terá sido extração sequencial com H₂O/EtOH;

^{b)} Extração sequencial H₂O/EtOH-Benzeno (TAPPI).

No geral os constituintes principais da palha de arroz são a celulose, 32 a 47%, as hemiceluloses, 19 a 27%, e a lenhina, 15.3 a 25.3%, sendo as hemiceluloses constituídas maioritariamente por xilose, 14.8 a 20.2%. O teor de cinzas neste tipo de palha é bastante superior ao das restantes palhas de cereais, cerca de 9.2 a 11.4%, e este componente é geralmente constituído por cerca de 75% de SiO₂, 10% de K₂O, 3% de P₂O₅, 3% de Fe₂O₃, 1.3% de CaO e

pequenas quantidades de Mg, S e Na (Mussatto e Roberto, 2002; Rodriguez et al., 2008; Binod et al., 2010; Chang et al., 2011; Amnuaycheewa et al., 2016).

O elevado teor em hidratos de carbono da palha de arroz, que podem ser facilmente hidrolisados em açúcares fermentáveis, faz com que seja uma matéria-prima promissora para a produção de bioetanol (Binod et al., 2010).

2.3 PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASSA LENHOCELULÓSICA

O setor dos transportes é responsável pelo consumo de 50% do petróleo e por 25% das emissões globais de CO₂. Tendo em conta a previsão do aumento das emissões de GEE para a atmosfera, o aumento do preço da extração do petróleo e a Diretiva Europeia que fixa a obrigatoriedade de incorporação de 10% de energia renovável nos transportes rodoviários, é imprescindível desenvolver alternativas aos combustíveis de origem fóssil (AIE, 2010).

Em resposta a esta problemática destacam-se os biocombustíveis, nomeadamente o bioetanol. Os seus maiores produtores mundiais são o Brasil, os EUA e a China. Este biocombustível, quando incorporado numa mistura de 10% com gasolina, reduz as emissões de GEE em cerca 12-19% (Muradin e Foltynowicz, 2014).

Comparativamente à gasolina, o bioetanol possui um índice de octanas superior, melhorando a capacidade antidetonante da gasolina e reduzindo a adição de promotores do índice de octano poluentes, como o chumbo (Balat, 2011). Possui também limites de inflamabilidade mais alargados, maior calor de vaporização, velocidade de chama superior e contém cerca de 35% de oxigénio. Estas propriedades permitem uma taxa de compressão mais elevada, uma maior eficiência da combustão e a redução da emissão de óxidos de azoto. No entanto, este biocombustível tem a desvantagem de possuir uma densidade energética inferior à da gasolina, ser miscível com a água, corrosivo, tóxico para os ecossistemas e possuir baixa pressão de vapor. Possui, também, um baixo índice de ceteno o que, acrescido do seu elevado calor latente de vaporização, impede a sua autoignição, não sendo, por isso, adequada a sua mistura com gasóleo (Gupta e Demirbas, 2010).

O bioetanol proveniente de biomassa lenhocelulósica, é o único combustível líquido que não contribui diretamente para a emissão de GEE (Muradin e Foltynowicz, 2014). O processo de produção deste biocombustível, a partir da matéria-prima anteriormente referida, consiste em quatro etapas: 1) pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica, 2) hidrólise (ácida ou

enzimática) da celulose e hemiceluloses em açúcares fermentáveis, 3) fermentação dos açúcares em etanol, utilizando microrganismos (bactérias, leveduras ou fungos), e 4) a purificação do produto final. A etapa de pré-tratamento permite aumentar a eficiência da hidrólise, mas, por outro lado, é um dos passos mais caros do processo. Por este motivo, os biocombustíveis de 2ª geração são ainda duas a três vezes mais caros que os combustíveis fósseis (Binod et al., 2010; Abraham et al., 2016).

O conceito de biorrefinaria integrada surge neste seguimento e consiste na exploração plena de todos os componentes da biomassa. Por exemplo, para além da produção de bioetanol a partir dos hidratos de carbono, também se pode utilizar a lenhina para produzir energia necessária às diferentes etapas do processo e construir uma instalação de digestão anaeróbia usando as águas residuais, produzindo simultaneamente biogás. A adoção deste conceito terá como consequência um aumento da viabilidade económica do processo (Abraham et al., 2016).

2.3.1 Tecnologias de pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica

A biomassa lenhocelulósica é constituída, essencialmente, por uma rede de celulose, hemiceluloses e lenhina fortemente ligada entre si, que lhe confere uma elevada resistência contra o ataque de agentes químicos, enzimáticos ou microbianos. De forma a reduzir a recalcitrância da biomassa e a separar seletivamente os seus componentes, para que possam ser transformados em produtos de valor acrescentado, é necessária uma etapa de pré-tratamento. Na Figura 7 encontra-se esquematizado o efeito pretendido com a aplicação deste processo (Alvira et al., 2010).

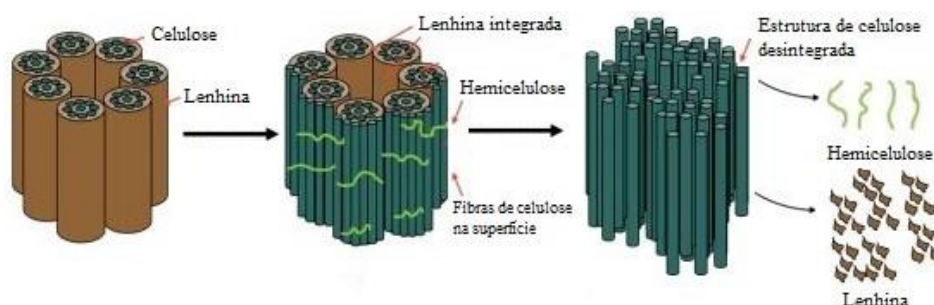


Figura 7. Estrutura da palha de arroz antes e após o pré-tratamento (adaptado de Santos et al., 2013).

Tal como referido anteriormente, esta constitui uma das etapas mais caras do processo, mas é imprescindível aplicá-la, porque afeta o rendimento e os custos do processo de conversão bioquímica. Com esta etapa é possível aumentar a eficácia do processo de hidrólise, uma vez

que a celulose e as hemiceluloses ficam mais acessíveis ao ataque ácido ou enzimático. É importante realçar que utilizando a biomassa lenhocelulósica ao natural, dificilmente a eficiência da hidrólise enzimática ultrapassaria os 20% (Kim, 2004; Alvira et al., 2010).

A eficácia do pré-tratamento é avaliada com base no desempenho da hidrólise. No geral, um pré-tratamento ideal deve ter em conta os seguintes requisitos (Jorgensen et al., 2007; Kumar e Wyman, 2009; Balat, 2011):

- Eficiência elevada para diferentes tipos de biomassa lenhocelulósica;
- Minimizar a degradação de açúcares;
- Minimizar a produção de compostos inibidores à hidrólise e fermentação;
- Diminuir o teor de lenhina na biomassa lenhocelulósica;
- Ser desnecessária uma etapa de redução do tamanho de partículas;
- Minimizar o consumo de energia e químicos;
- Permitir a recuperação da lenhina e de outros compostos;
- Apresentar uma boa relação benefício/custo;
- Ser possível o seu *scale-up* industrial.

A escolha de um processo de tratamento é difícil, uma vez que não existe um que seja universal. O tipo de tratamento e o seu grau de severidade devem ser adequados à composição e à estrutura do material lenhocelulósico com o objetivo de isolar a celulose e as hemiceluloses e evitar a formação de compostos inibidores (Alvira et al., 2010; Balat, 2011). Existe um vasto leque de pré-tratamentos que podem ser utilizados no tratamento de biomassa lenhocelulósica podendo estes ser classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. Nem todos serão abordados nas secções seguintes, como por exemplo o tratamento com sulfito, a pirólise, a gaseificação e os ultrassons, por não serem os mais adequados à finalidade deste trabalho (Kumar e Sharma, 2017).

• **Pré-Tratamentos Físicos**

Fragmentação Mecânica

A fragmentação mecânica tem como objetivo a redução do tamanho das partículas, aumentando a área específica e diminuindo o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose. Desta forma, consegue-se também minimizar as limitações à transferência de massa e de calor durante o processo de hidrólise. Este tratamento mecânico, dependendo do tamanho final da partícula pretendido, consiste na combinação de estilhamento (10-30 mm), moagem e/ou trituração (0.2-2 mm). Estudos referem que uma redução adicional do tamanho da

biomassa abaixo dos 0.4 mm não tem efeito significativo no rendimento da hidrólise. A redução do tamanho de partícula é conseguida através da utilização de moinhos de bolas, de rolos, de facas ou de martelos. As maiores desvantagens deste tratamento estão relacionadas com os elevados gastos energéticos e com a incapacidade de remover lenhina (Sun e Cheng, 2002; Alvira et al., 2010; Kumar e Sharma, 2017).

Extrusão

A extrusão é um método de pré-tratamento físico, novo e promissor, que consiste no aquecimento, mistura, cisalhamento e compressão da biomassa lenhocelulósica em simultâneo. À medida que os materiais passam pelo canal extrusor vão sofrendo alterações físicas e químicas, como o aumento da área de superfície e da porosidade e a redução de cristalinidade da celulose. Este tratamento apresenta inúmeras vantagens, entre as quais o facto de ser contínuo e de fácil adaptação à escala industrial, não produzir efluentes nem produtos de degradação dos açúcares e adaptar-se aos diferentes tipos de biomassa. No entanto, ainda é uma tecnologia em desenvolvimento e apresenta um elevado consumo de energia (Alvira et al., 2010; Zhang et al., 2015).

Irradiação

O pré-tratamento por irradiação consiste na aplicação de radiação (raios gama, raios micro-ondas ou feixes de electrões) sobre a biomassa lenhocelulósica. Devido à quebra de ligações entre as unidades de celulose existe o aumento da área superficial das partículas e a diminuição o grau de polimerização da celulose. Consequentemente, existe um maior rendimento de produção de monossacarídeos durante a hidrólise. Apesar disso, é um processo muito dispendioso para poder ser aplicado a processos industriais (Binod et al., 2010; Singh et al., 2016).

- **Pré-Tratamentos Químicos**

Pré-Tratamento Ácido

O objetivo do pré-tratamento ácido passa por solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa e tornar a celulose mais acessível ao ataque enzimático. O ácido pode ser utilizado na forma concentrada ou diluída, sendo que os mais utilizados são o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o ácido clorídrico (HCl), podendo também usar-se o ácido fosfórico (H_3PO_4) ou o nítrico (HNO_3).

Com a utilização deste pré-tratamento acresce a necessidade de neutralizar o ácido antes das etapas seguintes de hidrólise e fermentação (Alvira et al., 2010; Zhu et al., 2015).

O pré-tratamento com ácido concentrado ocorre a temperaturas próximas dos 40°C e concentrações de ácido entre 30 a 70%. É um processo pouco recomendado, visto ser bastante perigoso, causar problemas de corrosão nos equipamentos e produzir compostos inibidores que afetam o metabolismo dos microrganismos fermentativos, tais como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural (HMF) que são produtos de degradação das pentoses e das hexoses, respetivamente, e compostos aromáticos provenientes da degradação da lenhina. Para além disso, e uma vez que existem alguns custos associados à sua neutralização, é fundamental a recuperação dos ácidos para a viabilidade económica do processo. Devido ao elevado investimento e aos custos de manutenção, o interesse de aplicação deste pré-tratamento à escala industrial é reduzido (Alvira et al., 2010; Kumar e Sharma, 2017).

O tratamento com ácido diluído pode ser utilizado como um pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica tendo como objetivo a hidrólise enzimática subsequente ou pode mesmo ser utilizado para a produção de açúcares fermentáveis. É um tratamento menos severo e mais adequado a uma possível aplicação industrial. Este pré-tratamento pode ser aplicado de duas formas distintas: temperaturas elevadas ($T > 160^{\circ}\text{C}$), carga de sólidos baixa (5-10% m/m), tempo de residência de 5 minutos e regime de operação contínuo ou temperaturas moderadas ($T < 160^{\circ}\text{C}$), carga de sólidos elevada (10-40% m/m), tempo de residência de 30-90 minutos e regime de operação descontínuo. Embora em menor quantidade que com ácido concentrado, quando se utiliza ácido diluído também se produzem compostos de degradação. Apesar deste método melhorar significativamente a hidrólise da celulose, os seus custos são mais elevados comparativamente a outros tratamentos (Alvira et al., 2010; Kumar e Sharma, 2017).

Estudos recentes apontam o ácido maleico ou o fumárico em substituição dos ácidos inorgânicos, uma vez que produzem menores quantidades de inibidores e apresentam uma eficiência elevada (Jung et al., 2015; Amnuaycheewa et al., 2016).

Pré-Tratamento Alcalino

No pré-tratamento alcalino, ocorre a dissolução da lenhina presente na biomassa lenhocelulósica e, adicionalmente, são removidos os grupos acetilo e os ácidos urónicos. Desta forma, existe um aumento da área da superfície interna e uma diminuição do grau de polimerização e da cristalinidade da celulose. Esta alteração estrutural é conseguida uma vez que, na presença de uma base ocorrem reações de saponificação. Estas causam a quebra das

ligações éster intermoleculares, entre xilanas e lenhina ou outras hemiceluloses, aumentando a porosidade da biomassa e conseqüentemente a sua deslenhificação (Alvira et al., 2010; Binod et al., 2010).

A eficiência do pré-tratamento alcalino depende do conteúdo de lenhina dos materiais, demonstrando maior eficácia em resíduos agrícolas. Neste tratamento, podem ser usadas soluções aquosas de diversas bases, sendo as mais usuais as soluções de hidróxido de sódio (NaOH), de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ou de amônia (NH_4OH). É um processo que não requer condições severas, pode ocorrer à temperatura ambiente ou a temperaturas elevadas e o seu tempo de residência pode variar de segundos a dias. De entre as quatro bases referidas, as soluções aquosas de NaOH são as que têm sido mais estudadas, tendo-se verificado que são as mais eficazes para estes tratamentos. Porém, a cal hidratada ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) é um composto que acarreta menos custos e requisitos de segurança, e, para além disso, pode ser recuperada do hidrolisado pela reação com CO_2 , e ser novamente reconvertida a cal (Kumar e Wyman, 2009; Balat, 2011; Gu et al, 2015).

Pré-Tratamento Oxidativo

O pré-tratamento oxidativo tem como objetivo a remoção de hemiceluloses e lenhina, aumentando a acessibilidade à celulose. Isto acontece por meio de várias reações: substituição eletrofílica, deslocamento de cadeias laterais, quebras de ligações éter ou clivagem oxidativa de núcleos aromáticos. Os agentes oxidantes mais utilizados são o peróxido de hidrogénio e o ácido paracético, e, sendo o segundo um dos agentes mais seletivos para a lenhina, evitam-se perdas de celulose. No entanto, este pré-tratamento tem a desvantagem de produzir compostos aromáticos inibidores para os bioprocessos subsequentes, resultantes da oxidação da lenhina (Alvira et al., 2010; Binod et al., 2010).

Pré-Tratamento com Líquidos Iónicos

O pré-tratamento do material lenhocelulósico utilizando líquidos iónicos tem sido alvo de diversos estudos. Estes são uma nova classe de solventes compostos por catiões orgânicos e aniões inorgânicos característicos por possuírem, dependendo dos seus constituintes, elevada polaridade, estabilidade térmica e química, baixa pressão de vapor e permanecerem no estado líquido numa larga gama de temperaturas. Supõe-se que os líquidos iónicos competem com os vários compostos lenhocelulósicos, dissolvendo simultaneamente os hidratos de carbono e a lenhina. Posteriormente, é possível recuperar a celulose relativamente pura, precipitando-a pela

adição de água, etanol ou acetona. O acetato de 1-etil-3-metilimidazólio ([EMIM][OAc]) e o 1,3-dimetilimidazólio-dimetilfosfato ([MMIM][(MeO)₂PO₂]) são exemplos de líquidos iônicos sem cloro na sua constituição, sendo por isso menos corrosivos que os demais. Os fatores que limitam a utilização destes denominados “solventes verdes” prendem-se, principalmente, com o seu custo e com a dificuldade na sua recuperação e reutilização após o tratamento (Alvira et al., 2010; Chang et al., 2016; Kumar e Sharma, 2017).

Ozonólise

A ozonólise é um processo que recorre ao uso de ozono para pré-tratar a biomassa lenhocelulósica. O ozono degrada eficazmente a lenhina, deixando a celulose intacta, sem produzir compostos inibidores e, conseqüentemente, aumentando o rendimento da hidrólise. A ozonólise é um processo que ocorre à temperatura ambiente, mas requer elevadas quantidades de ozono, o que a torna num tratamento dispendioso (Kumar e Wyman, 2009; Alvira et al., 2010).

Organosolv

O *organosolv* é um método de pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica que tem como objetivo dissolver a lenhina, podendo esta ser utilizada, por exemplo, na produção de energia, e para além disso, ocorre a hidrólise das hemiceluloses, deixando a celulose mais acessível e permitindo a redução da carga enzimática na etapa seguinte. Neste método, utilizam-se solventes orgânicos (etanol, metanol, álcool tetrahidrofúril, acetona, ácido fórmico ou etilenoglicol), aos quais pode ser adicionado um catalisador ácido (HCl, H₂SO₄, ácido oxálico, acetilsalicílico ou salicílico). A severidade deste processo depende da matéria-prima a tratar. Utilizam-se temperaturas compreendidas entre os 180 e 195°C, um tempo de operação entre 30 a 90 minutos e uma concentração de solvente de 2 a 10% (Alvira et al., 2010; Binod et al., 2010; Kumar e Sharma, 2017). O processo *organocell* é constituído por dois estágios usando soluções de metanol com cerca de 50%. No segundo estágio adiciona-se hidróxido de sódio (30% m/m, base biomassa) que permite a remoção da lenhina (Lindner e Wegener, 1988). A principal desvantagem destes métodos prende-se com a presença dos solventes utilizados, que podem causar fenómenos de inibição durante a hidrólise enzimática e a fermentação (Alvira et al., 2010; Binod et al., 2010; Kumar e Sharma, 2017).

Água Líquida Sobreaquecida

A água líquida sobreaquecida (LHW) é um pré-tratamento hidrotérmico que utiliza apenas água como reagente, o que desde logo é uma vantagem, pois não são necessários equipamentos com material anticorrosivo. Este processo ocorre sob pressão (no máximo 15 MPa) de forma a manter a água no estado líquido a temperaturas elevadas (170-230°C), durante cerca de 15 minutos. Os grupos acetilo e ácidos urónicos associados às hemiceluloses são libertados. Estes compostos diminuem o pH do meio e catalisam a reação de hidrólise das hemiceluloses, o que, dependendo das condições operatórias, pode conduzir à formação de furfural e de HMF. No entanto, este problema pode ser minimizado se o pH for mantido entre 4 e 7. Com este tratamento consegue-se a dissolução de 22 a 60% da biomassa, a remoção de 22% da celulose e grande parte das hemiceluloses. As desvantagens deste método de pré-tratamento prendem-se com os elevados gastos de água e de energia (Alvira et al., 2010; Balat, 2011; Kumar e Sharma, 2017).

- **Pré-Tratamentos Físico-Químicos**

Explosão a Vapor

A explosão a vapor é o pré-tratamento hidrotérmico mais utilizado em biomassa lenhocelulósica. Esta tecnologia consiste na injeção de vapor saturado de alta pressão sobre a biomassa (sem necessidade de redução excessiva do tamanho de partícula), aumentando a temperatura até cerca de 160 a 260°C e mantendo-a durante alguns segundos a minutos, dependendo do tipo de material. Isto faz com que ocorra hidrólise e libertação das hemiceluloses. Posteriormente, a pressão é rapidamente reduzida até à pressão atmosférica, o que provoca a rutura da matriz de lenhina, aumentando a acessibilidade à celulose. Tal como acontece no tratamento com água líquida sobreaquecida, há formação de compostos inibidores da hidrólise e da fermentação. A explosão a vapor, comparativamente à fragmentação mecânica, requer menos de 70% da energia gasta (Alvira et al., 2010; Balat, 2011; Wood et al., 2016). Para além da formação de compostos inibidores, a explosão a vapor tem como desvantagem a necessidade de lavagem da biomassa pré-tratada, havendo perdas de matéria entre 20 a 25% (Fang et al., 2011).

De forma a melhorar o desempenho deste processo, pode utilizar-se um catalisador ácido, como H₂SO₄, SO₂ ou CO₂. Esta alteração é comparada a um pré-tratamento com ácido diluído, resultando na remoção completa das hemiceluloses, na diminuição da produção de inibidores

(visto a temperatura processual ser mais baixa) e na melhoria da hidrólise enzimática do resíduo sólido (Jorgensen et al., 2007; Kumar e Sharma, 2017; Alvira et al., 2010).

Explosão de Fibras com Amoníaco (AFEX)

A explosão com amoníaco é um pré-tratamento físico-químico semelhante à explosão a vapor, pelo que o tamanho da partícula também não necessita de ser muito reduzido para manter a sua eficácia. A biomassa lenhocelulósica é aquecida, utilizando amoníaco anidro no estado líquido (1 a 2 kg por kg de biomassa seca), até uma temperatura entre 60 e 100°C, a uma pressão superior a 3 MPa, durante cerca de 30 a 60 minutos, havendo de seguida uma descompressão brusca. A rápida expansão do gás de amoníaco provoca a dilatação e a rutura das fibras lenhocelulósicas, modificando ou removendo a fração de lenhina e ficando com um material sólido pré-tratado, constituído essencialmente por celulose (com menor cristalinidade) e hemiceluloses. Nos vários estudos realizados, este método revelou-se eficaz no tratamento de materiais com teores de lenhina mais baixos (caso das palhas de cereais), permitindo obter rendimentos de hidrólise superiores a 90%, visto não ocorrer a formação de compostos inibidores. De modo a reduzir os custos processuais e a minimizar o impacto ambiental, o amoníaco deve ser recuperado e reutilizado (Alvira et al., 2010; Binod et al., 2010; Kumar e Sharma, 2017).

Explosão com CO₂ Supercrítico

Neste método de tratamento da biomassa lenhocelulósica, o CO₂ em solução aquosa forma ácido carbónico, que favorece a hidrólise das hemiceluloses. O conceito de pré-tratamento com explosão utilizando CO₂ supercrítico é muito semelhante ao método AFEX e à explosão a vapor, e surge no sentido de reduzir os custos e a formação de inibidores relativamente àqueles métodos. Para além disso, o CO₂ não é tóxico, não é inflamável e pode ser facilmente recuperado. No entanto, este método ainda não é aplicável à escala industrial por não ser economicamente viável (Alvira et al., 2010).

- **Pré-Tratamentos Biológicos**

Grande parte dos microrganismos existentes não são capazes de degradar e utilizar celulose e hemiceluloses. Neste pré-tratamento, utiliza-se o único tipo que evoluiu no sentido de degradar lenhina, pela ação de enzimas, tais como peroxidases e lacases, convertendo-a em CO₂. Esse microrganismo é um fungo filamentosso designado por fungo de podridão branca, do

qual são exemplo as seguintes espécies: *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pleurotus ostreatus*. Comparativamente a outros métodos de pré-tratamento, este é realizado à temperatura ambiente, não utiliza compostos químicos, possui um baixo consumo energético e é considerado um processo eficiente e ecológico. No entanto, apresenta algumas desvantagens como existir a possibilidade dos fungos consumirem celuloses e hemiceluloses, serem inibidos por compostos derivados da lenhina e o facto de ser um processo muito lento, tornando-o pouco atrativo para aplicação à escala industrial (Binod et al., 2010; Balat, 2011; Kumar e Sharma, 2017).

- **Seleção do pré-tratamento mais adequado à palha de arroz**

Como já foi referido, a escolha do pré-tratamento deve ter em conta a diversidade e variabilidade do tipo de biomassa. Neste trabalho, como a matéria-prima utilizada é palha de arroz, não é necessário um tratamento tão severo como se se tratasse de madeira de folhosas ou de resinosas, uma vez que este material não possui uma estrutura tão rígida e tem, na sua constituição, um menor teor de lenhina. O método de pré-tratamento alcalino apresenta inúmeras vantagens, entre elas, o elevado rendimento em açúcares, a baixa formação de inibidores, condições de operação pouco severas, utilização de temperaturas baixas, aplicabilidade à escala industrial e a possibilidade de reutilização dos reagentes utilizados. Para além disso, e comparativamente aos tratamentos hidrotérmicos ou com ácido, o pré-tratamento alcalino aumenta a digestibilidade da celulose, solubiliza mais eficazmente a lenhina e solubiliza menos celulose e hemiceluloses (Alvira et al., 2010; Menon e Rao, 2012). Tendo em conta as vantagens apresentadas e os equipamentos disponíveis, a presente dissertação vai dar destaque ao tratamento alcalino como método de pré-tratamento da palha de arroz para a produção de bioetanol. Aliado ao tratamento alcalino é necessária uma fragmentação mecânica prévia, sendo que esta deve ser sempre a menor possível, de forma a minimizar os custos energéticos do processo (Balat, 2011; Harun e Geok, 2016). Na Figura 8 está esquematizado o mecanismo de quebra de ligações α e β -aril-éter em estruturas com grupos fenólicos livres (mais abundantes em gramíneas) e das ligações entre hidratos de carbono e lenhina, pela aplicação do pré-tratamento alcalino.

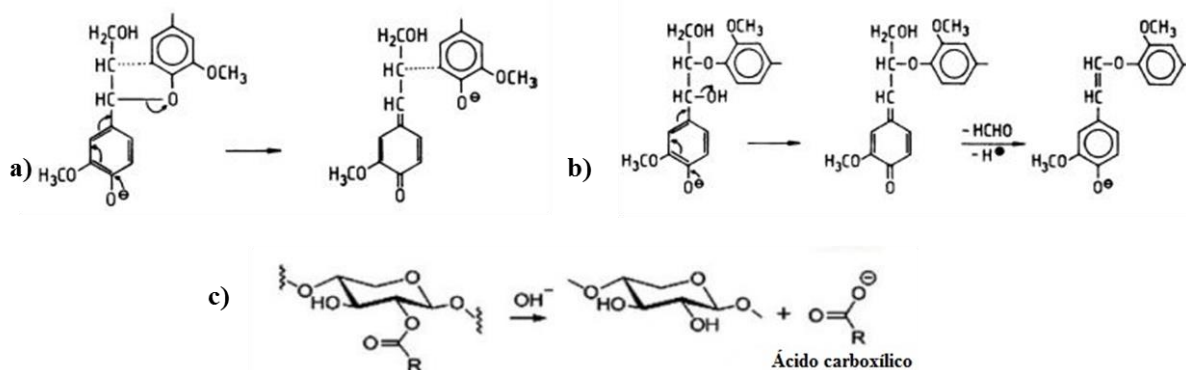


Figura 8. Esquema da quebra de ligações: a) α -aril-éter e b) β -aril-éter da lenhina e c) éster entre hidratos de carbono e lenhina, por ação do pré-tratamento alcalino (adaptado de Fengel & Wegener, 1984; Chundawat et al., 2010).

Na Tabela 4 encontram-se apresentadas as condições e os principais resultados obtidos de diferentes pré-tratamentos presentes na literatura. Por vezes, e dependendo das propriedades requeridas para a utilização final do material, pode existir a combinação do tratamento alcalino com outros, da mesma ou de outra natureza, como por exemplo, o tratamento alcalino seguido do tratamento com ácido diluído (como o exemplo mostrado na Tabela 4). Desta forma, é possível aplicar o conceito de biorrefinaria integrada, uma vez que: i) com o licor do tratamento alcalino são removidos os grupos acetilo, os ácidos urónicos e uma parte significativa de lenhina, que pode ser precipitada e utilizada para produção de energia; ii) no licor do tratamento ácido são solubilizadas as hemiceluloses que, sendo previamente neutralizadas, podem ser fermentadas; iii) a fração sólida contendo celulose pode ser sujeita a uma hidrólise seguida de fermentação (Binod et al., 2010; Abraham et al., 2016).

O tratamento com hipoclorito de sódio também é um tratamento alcalino, mas este reagente funciona, igualmente, como agente de branqueamento, pelo que pode ser aplicado sozinho ou, para melhores resultados, como complemento de outro pré-tratamento, quando o objetivo é reduzir o teor de lenhina insolúvel. A aplicação deste composto assemelha-se ao pré-tratamento oxidativo (Remli et al., 2014; Nasri-Nasrabadi et al., 2014).

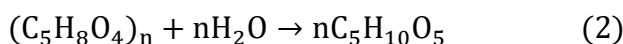
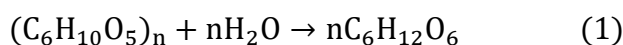
Tabela 4. Diferentes condições de pré-tratamento da palha de arroz (PA) e seus resultados. (*)

Pré-tratamento	Condições operatórias				Resultados	Referência
	Partícula	[Reagentes]	S/L ou [PA]	T; t; P; A		
Alcalino: NaOH	1-2 cm	2 %	1:4	85°C; 1h	Remoção de hemiceluloses (61.1%) e lenhina (36.2%)	Zhang e Cai (2008)
Ácido diluído (1ª etapa) Explosão a vapor (2ª etapa)	2 cm	1-8.0% (m/m)	15% (m/m)	125-165°C; 2-5 min 180°C; 20min; 9.8bar	Rendimento total de hidrólise de 75%	Chen et al. (2011a)
Alcalino: Ca(OH) ₂	<0.5 mm	5% (m/m)	1:4	120°C; 1h	38.0 g/L de etanol produzido no SSF (rendimento 85.2%)	Watanable et al. (2012)
Líquidos Iônicos: [Ch][AA] IIs	50-400 µm	1g _{LI} /50 mg _{PA}	5% (m/m)	90 °C; 0.5-34 h	Remoção de lenhina de 61.3%, 53-72% de resíduo recuperado, rendimento em glucose de 71-87% e de xilose de 33-42%	Hou et al. (2012)
Alcalino: NaOH	2 mm	2% 5% (m/v)	1:10	121°C; 15min; 15psi	Rendimento de açúcares simples 70.1%	Remli et al. (2014)
Alcalino: KOH	2 mm	2% 5% (m/v)	1:10	121°C; 15min; 15psi	Rendimento de açúcares simples 74.7%	
Alcalino: Ca(OH) ₂	2 mm	2% 5% (m/v)	1:10	121°C; 15min; 15psi	Rendimento de açúcares simples 68.6%	
Alcalino: NaOCl	2 mm	2% 5% (m/v)	1:10	121°C; 15min; 15psi	Rendimento de açúcares simples 57.1%	
Autohidrólise (1ª etapa) <i>Organosolv</i> etanol água (2ª etapa)	<6 mm	6.7-71.9%(m/m)	1:10 (m/m)	195-220°C; 0-24 h 30°C; 150 rpm	Aumento da digestibilidade enzimática 33% (não tratada) para 86% (combinado)	Moniz et al. (2015)
Alcalino: NH ₄ OH	0.3-1mm	5–20%	1:10	120°C; 60 min	Remoção parcial de lenhina e 78.4% de rendimento de açúcares simples	Swain e Krishnan,(2015)
Extrusão (1ª etapa) Alcalino: Ca(OH) ₂ (2ª etapa)	20–40 mesh	5-15% (m/m _{PA})	2 kg 5% (m/v)	120 rpm 25°C; 72h	Rendimento de glucose até 67% e de xilose até 50% [Ca(OH) ₂] ótima = 8%	Gu et al. (2015)
Ácido: ácido maleico	<1 mm	0.2-7% (m/v)	17-25% ST	150-190 °C; 0-30 min	Pouca lenhina removida, formação de inibidores e rendimento de glucose até 89.3%	Jung et al. (2015)
Alcalino:NaOH (1ª etapa) Ácido:H ₂ SO ₄ (2ª etapa)	1 cm×1 mm	0.2-0.8% (m/v) 0.5-1.5% (m/v)	1:6 8 10 1:10	50-70°C; 45min 121°C; 30-90min	Remoção de grupos acetilo (98.8%), lenhina (42.3%) e cinzas (66.7%). Perda de glucanas (2.8%) e hemiceluloses (8.1%)	Castro et al. (2016)
Alcalino:NaOH	2 mm	2% 6% 12% (m/v)	1:20	55°C; 1h	Remoção máxima de lenhina de 79.6%	Harun e Geok (2016)

(*) Todos os pré-tratamentos apresentados são precedidos de uma fragmentação mecânica; S/L – razão sólido/líquido; [PA] - concentração palha de arroz; T - temperatura; t - tempo; P - pressão; A – agitação.

2.3.2 Hidrólise dos hidratos de carbono celulósicos

Após a etapa de pré-tratamento da biomassa lenhocelulósica, e de forma a avaliar a eficiência deste tratamento na conversão dos hidratos de carbono em açúcares simples para poderem ser fermentados, realiza-se uma etapa de hidrólise (Balat, 2011). Esta consiste na quebra das ligações glicosídicas e de hidrogénio nas frações de celulose e hemiceluloses, reduzindo-as a monossacarídeos, hexoses e hexoses e pentoses, respetivamente. As equações químicas (1) e (2) traduzem a reação de hidrólise da celulose e hemiceluloses (Hamelinck et al., 2005; Balat, 2011; Singh et al., 2016).



Os processos de hidrólise mais comuns são por via química, hidrólise ácida, ou por via biológica, hidrólise enzimática. Em ambas existem vários modos de operação, sendo que a escolha do mais apropriado deve ter em conta a origem do material lenhocelulósico, o microrganismo utilizado na etapa seguinte de fermentação e, não menos importante, a economia do processo (Ogeda e Petri, 2010). O tipo de hidrólise mais utilizado para palha de arroz com vista à produção de bioetanol é a hidrólise enzimática (Binod et al., 2010).

Hidrólise ácida

A hidrólise ácida é dos processos de hidrólise química mais utilizados, em que se utiliza ácido sulfúrico, nítrico, fosfórico ou clorídrico como catalisador. Estes ácidos podem ser utilizados concentrados ou diluídos de forma semelhante ao descrito na secção dos pré-tratamentos (Hamelinck et al., 2005; Balat, 2011).

Na hidrólise com ácido concentrado utilizam-se concentrações entre 10-30% (no caso do H₂SO₄ pode mesmo chegar aos 72%) e temperaturas de operação baixas, à volta dos 40°C. Com este método obtém-se um elevado rendimento em glucose, cerca de 90%. No entanto, este processo possui um longo tempo de residência, elevado consumo de ácido e de energia na sua recuperação, causa a corrosão dos equipamentos e ainda ocorre a formação de compostos inibidores (Balat, 2011).

Na hidrólise com ácido diluído utilizam-se concentrações abaixo de 1% e temperaturas elevadas, que podem chegar aos 215°C. Comparativamente à hidrólise com ácido concentrado,

esta possui um tempo de residência muito mais baixo (de alguns segundos a minutos), mas, por outro lado, produz uma maior quantidade de compostos inibidores e um menor rendimento em glucose, cerca de 50 a 70% (Hamelinck et al., 2005; Balat, 2011).

Hidrólise enzimática

O processo de hidrólise enzimática recorre ao uso de catalisadores biológicos, denominados enzimas. As celulasas são as enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose. Elas são produzidas tanto por fungos como por bactérias, mas, comercialmente, as mais produzidas são a partir de espécies fúngicas como *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* (Ogeda e Petri, 2010; Balat, 2011). De forma a ocorrer uma hidrólise completa da celulose são necessárias pelo menos três classes de celulasas a operar: as endo- β -1,4-glucanases, as exoglucanases e as β -glucosidases. As endo- β -1,4-glucanases quebram as ligações internas β -1,4-glicosídicas presentes em zonas amorfas da cadeia de celulose, criando extremidades livres na cadeia. As exoglucanases, ou celobiohidrolases, atuam sobre as extremidades livres da cadeia e libertam unidades de celobiose. As β -glucosidases hidrolisam as unidades de celobiose produzindo glucose (Ogeda e Petri, 2010; Balat, 2011). O mecanismo de atuação destas três classes de enzimas encontra-se esquematizado na Figura 9.



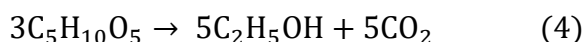
Figura 9. Esquema do mecanismo de atuação do complexo enzimático de celulasas na hidrólise da celulose (adaptado de Ogeda e Petri, 2010).

Este tipo de enzimas possui uma atividade enzimática ótima para pH entre 4 e 5 e uma temperatura entre 45 e 55°C, o que, comparativamente à hidrólise ácida é uma vantagem, visto não promover a corrosão dos equipamentos (Sun e Cheng, 2002; Ogeda e Petri, 2010; Balat, 2011). Existem vários fatores que afetam a hidrólise enzimática da celulose, entre os quais, as condições de operação (pH, temperatura, carga enzimática e carga de sólidos), o substrato, a inibição das β -glucosidases pela glucose e das exoglucanases pela celobiose e a presença de compostos de degradação dos açúcares e da lenhina provenientes da etapa de pré-tratamento. Dependendo de todos estes fatores, com um processo de hidrólise enzimática consegue-se um rendimento de glucose que pode atingir 95% (Jorgensen et al., 2007; Balat, 2011).

Para a hidrólise das hemiceluloses, devido à sua heterogeneidade, são necessários sistemas enzimáticos mais complexos. Estes têm na sua composição as endo-1,4-β-D-xilanases, as 4-β-D-xilosidases, as acetil-xilano-esterases e as α-L-arabinosidases (Jorgensen et al., 2007). O ideal seria conjugar a ação das celulases e das hemicelulases de forma a aumentar a produção de açúcares fermentáveis e a reduzir o desperdício de monossacarídeos (Ogeda e Petri, 2010; Balat, 2011).

2.3.3 Fermentação

O processo de fermentação pode ser realizado recorrendo a um conjunto variado de microrganismos como leveduras, bactérias ou fungos, que a partir de açúcares fermentáveis produzem etanol ou outros produtos de valor acrescentado (Balat, 2011). Pela estequiometria das reações de fermentação de hexoses (glucose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose) em etanol, equações (3) e (4), respetivamente, a produção teórica máxima é de 0.51 kg de etanol e 0.49 kg de dióxido de carbono por kg de açúcar consumido (Hamelinck et al., 2005).



Na prática, este rendimento é inferior, pois o microrganismo também consome monossacarídeos na multiplicação e manutenção celular.

Microrganismo

A seleção do tipo de microrganismo a usar deve ter em conta uma série de requisitos, nomeadamente: uma produção de bioetanol superior a 90% do seu valor teórico, uma tolerância ao etanol superior a 40 g/L e uma produtividade superior a 1 g/(Lh). O microrganismo deve ainda ter a capacidade de crescer em meios de cultura pouco dispendiosos, em pH ácido ou temperaturas elevadas, de forma a evitar contaminações, e deve ser resistente à presença de inibidores (Balat, 2011; Azhar et al., 2017).

Algumas bactérias como a *Escherichia coli*, a *Klebsiella oxytoca* e a *Zymomonas mobilis*, têm sido alvo de diversos estudos. Elas possuem capacidade de fermentar eficientemente glucose a etanol e de forma mais rápida que as leveduras, sendo que a *Escherichia coli*, e a *Klebsiella oxytoca* têm capacidade de metabolizar todos os açúcares provenientes da biomassa

lenhocelulósica. No entanto, estas bactérias apresentam algumas desvantagens como a baixa tolerância a inibidores e ao etanol, assim como o facto de serem cultivadas em pH neutro ou ligeiramente alcalino (Balat, 2011).

No que respeita às leveduras, a *Saccharomyces cerevisiae*, mais conhecida como fermento de padeiro, é o microrganismo fermentativo mais utilizado em processos industriais de produção de bioetanol. Ela fermenta eficientemente hexoses e dissacarídeos, como a sacarose e a maltose. Esta levedura chega a atingir concentrações de etanol no caldo de fermentação de cerca de 162 g/L, mas apresenta a desvantagem de não possuir capacidade de fermentar pentoses. Como alternativa surge a *Saccharomyces* geneticamente modificada que tem capacidade de fermentar hexoses e pentoses, no entanto estas estirpes ainda não estão comercialmente disponíveis e possuem problemas de estabilidade. De forma a ultrapassar esta limitação já se começam a utilizar leveduras com capacidade de fermentar simultaneamente hexoses e pentoses, como a *Pichia stipitis*, *Candida parapsilosis*, a *Pachysolen tanophilus* e a *Candida shehatae*. Contudo, estas são mais intolerantes a inibidores, ao etanol e a variações de pH, em comparação à *Saccharomyces cerevisiae* (Mendes et al., 2009; Mendes et al., 2011; Balat, 2011; Azhar et al., 2017).

Regime de Operação

O processo de fermentação pode ser realizado em regime de operação descontínuo (*batch*), semi-descontínuo (*fed-batch*) ou contínuo. A escolha do tipo de regime mais indicado depende, essencialmente, da cinética dos microrganismos, do tipo de matéria-prima e da economia do processo. Em regime descontínuo é adicionada uma determinada quantidade de meio de cultura e todos os nutrientes necessários no reator, sendo estes inoculados com o microrganismo e colocados à temperatura ótima para que ocorra a fermentação. Este método permite manter as condições de assepsia mais facilmente e requer menos controlo, mas possui algumas desvantagens como a inibição do crescimento celular devido à elevada concentração do substrato, altos custos de operação e baixa produtividade. No regime de operação semi-descontínuo a alimentação é inserida contínua ou periodicamente até atingir o limite estipulado. Este método é o mais utilizado industrialmente. Permite melhores rendimentos e produtividades do que em descontínuo, assim como resolve a inibição causada pela elevada concentração do substrato e aumenta a concentração de células viáveis e o tempo de vida da cultura microbiana. No regime de operação contínuo existe a entrada contínua de substrato e nutrientes e a saída de células, etanol e açúcares não fermentados. Este método permite aumentar a produtividade em

etanol de 2 para 6 g/(Lh) comparativamente ao regime em descontínuo. O facto do etanol ser um metabolito primário, isto é, ser formado durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo, é uma grande vantagem para a aplicação do regime de operação contínuo. No entanto, não é muito utilizado porque as células microbianas são sensíveis a elevadas concentrações de etanol (Carlile, *et al.*, 2001; Chandel *et al.*, 2007; Balat, 2011; Azhar *et al.*, 2017).

2.3.4 Estratégias de Hidrólise e de Fermentação

De modo a eliminar a acumulação de açúcares que inibem as enzimas e a aumentar a produção de bioetanol, os processos de hidrólise e fermentação podem ser integrados. As três estratégias mais utilizadas são: a hidrólise e fermentação em separado (SHF), a hidrólise e fermentação em simultâneo (SSF) e o bioprocesso consolidado (CBP).

Hidrólise e Fermentação em Separado (SHF)

No processo de hidrólise e fermentação em separado, a hidrólise enzimática da fração pré-tratada de biomassa lenhocelulósica ocorre num reator diferente da fermentação. Dependendo do microrganismo utilizado, poderá ou não haver fermentação simultânea de hexoses e pentoses, processo denominado por co-fermentação. A grande vantagem do SHF é o facto de ambos os processos ocorrerem com uma composição química ou nutricional e um teor de sólidos adequado, assim como o pH e a temperatura, 45-55°C e 30-38°C, para a hidrólise e para a fermentação, respetivamente. É de realçar que estes são valores típicos e, como tal, variam com o tipo de microrganismo utilizado. Por outro lado, com a utilização deste processo ocorre a inibição das β -glucosidases pela elevada concentração de glucose na etapa de hidrólise, sendo necessário utilizar uma menor carga de sólidos e maior carga de enzimas para minimizar este problema (Balat, 2011; Paulová *et al.*, 2015).

Hidrólise e Fermentação em Simultâneo (SSF)

No processo de hidrólise e fermentação em simultâneo os dois processos referidos decorrem simultaneamente no mesmo reator. Este processo aumenta o rendimento de produção de etanol e elimina o efeito inibitório da glucose, uma vez que à medida que decorre a hidrólise o microrganismo fermentativo consome os seus produtos. Para além disto, permite o aumento do rendimento da hidrólise, a redução da carga enzimática necessária, a diminuição do tempo

de processamento e o decréscimo dos custos processuais. No entanto, este método possui a desvantagem da redução da temperatura ótima de hidrólise de 50°C para cerca de 38°C, de forma a ficar mais próxima da temperatura ótima de fermentação dos microrganismos, que é cerca de 30°C. Esta variação tem como consequência a diminuição da taxa de conversão enzimática. Como alternativa, podem utilizar-se microrganismos geneticamente modificados ou termotolerantes. Tal como no SHF, no SSF também pode ocorrer co-fermentação, logo que se utilize um microrganismo com capacidade de fermentar simultaneamente hexoses e pentoses (Balat, 2011; Paulová et al., 2015).

Bioprocesso Consolidado (CBP)

O bioprocesso consolidado consiste na realização simultânea da produção de enzimas, hidrólise e co-fermentação por um único microrganismo. Entre as vantagens deste método destaca-se a redução significativa dos custos processuais. No entanto, ainda não foi encontrado um microrganismo com os atributos necessários. Entre os que apresentam um maior potencial para a produção de bioetanol por CBP destacam-se a *E. coli*, a *Z. mobilis*, a *K. oxytoca* e *S. cerevisiae*, sendo que terão de sofrer modificações genéticas de forma a serem estáveis, produtivas e não produzirem um elevado número de produtos secundários (Hamelinck et al., 2005; Balat, 2011; Paulová et al., 2015).

Na Tabela 5 estão presentes alguns resultados de processos de hidrólise enzimática, SHF e SSF de palha de arroz (PA), utilizando métodos de pré-tratamento alcalino.

Tendo em conta todas as vantagens apresentadas e a disponibilidade de equipamentos no laboratório, no trabalho experimental realizado optou-se pelo pré-tratamento da palha de arroz com NaOH, com HCl e com HCl seguido de NaOH. Dos tratamentos alcalinos resulta um material sólido constituído por polímeros de celulose e hemiceluloses. Por esse motivo, é de todo o interesse utilizar o complexo enzimático Cellic CTec2 no processo de hidrólise enzimática, uma vez que é constituído por celulasas, hemicelulasas e β -glucosidasas. A *Saccharomyces cerevisiae*, embora possua a desvantagem de não fermentar pentoses, foi o microrganismo selecionado para o processo de fermentação, visto ter a capacidade de produzir etanol até uma concentração de cerca de 20% (v/v) (o equivalente a 162 g/L) no caldo de fermentação, ser tolerante à presença de inibidores e de etanol e possuir a capacidade de crescer em meios de pH ácido.

Tabela 5. Resultados de hidrólise enzimática (HE), SHF e SSF da palha de arroz (PA).

Pré-Tratamento	E.H.F.	Substrato	Enzima	Microrganismo	T; t; A; pH	Rendimento	Referência
Extrusão/ Ácido diluído	HE	2% (m/v) PA	Spezyme CP (20 FPU/g _{celulose})	-	50 °C; 72 h; 100 rpm; 4.8	80%	Chen et al. (2011b)
NaOH	HE	5% (m/v) PA	Celluclast 1.5L (10 FPU/g _{PA})	-	50°C;72h; 150rpm;4.8	55.5 g _{açúcar} /L	Remli et al. (2014)
KOH	HE	5% (m/v) PA	Celluclast 1.5L (10 FPU/g _{PA})	-	50°C;72h; 150rpm;4.8	59.9 g _{açúcar} /L	
Ca(OH) ₂	HE	5% (m/v) PA	Celluclast 1.5L (10 FPU/g _{PA})	-	50°C;72h; 150rpm;4.8	41.5 g _{açúcar} /L	
NaOCl	HE	5% (m/v) PA	Celluclast 1.5L (10 FPU/g _{PA})	-	50°C;72h; 150rpm;4.8	21.1 g _{açúcar} /L	
NH ₄ OH	HE	10% (m/v) PA	Cellic CTec2 (30 FPU/g _{PA}) Cellic HTec2 (30 FPU/g _{PA})	-	50°C;72h; 150rpm;4.8	69.4 g _{açúcar} /L	Swain e Krishnan (2015)
Ácido diluído	HE	2.5% (m/v) PA	Celluclast 1.5L (20 FPU/g _{PA}) Novozyme 188 (100 CBU/g _{PA})	-	45 °C; 72 h; 200 rpm ;4.7	0.43g _{açúcar} /g _{PA}	Amnuaycheewa et al. (2016)
Líquidos iônicos	HE	2.5% PA	NS220086 (50 FPU/g _{PA}) NS221118 (40 CBU/g _{PA})	-	50 °C; 72h; 150rpm; 4.8	30 – 35%	Chang et al. (2016)
Explosão a vapor	HE	5% (m/v) PA	Cellic® CTec2 Cellic® HTec2 (0-22 FPU/g _{celulose})	-	50 °C; 96 h; 5.0	> 80% para Cellic CTec2 >7 FPU/g _{celulose}	Wood et al. (2016)
Ca(OH) ₂	SSF	20% (m/m) PA	Celluclast 1.5L (12 FPU/g _{PA}) Novozyme 188 (30 CBU/g _{PA})	<i>S. cerevisiae</i> NBRC 0224 (livre)	30°C; 72h	38.0 g _{EiOH} /L	Watanable et al.(2012)
				<i>S.cerevisiae</i> NBRC0224 (imobilizada)	30°C; 72h	34.3 g _{EiOH} /L	
NH ₄ OH	SHF	Hidrolisado: 51.4g _{glucose} /L; 16.4g _{xilose} /L; 1.5g _{arabinose} /L	-	<i>S.cerevisiae</i> MTCC1033	30°C;18h; 200rpm	21.0 g _{EiOH} /L	Swain e Krishnan (2015)
				<i>C. tropicalis</i> Y-27290	30°C;18h; 200rpm	26.2 g _{EiOH} /L	
NaOH/ H ₂ SO ₄	SSF	8.0% (m/v) PA	Cellic CTec2 (20 PU/g _{celulose})	<i>K. marxianus</i> NRRY-6860	43 °C;48h	20.4 g _{EiOH} /L	Castro et al.(2016)
Explosão a vapor	SSF	5.0% (m/v) PA	Cellic CTec2 (20 FPU/g _{bs})	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 2826	25 °C; 96 h	90%	Wood et al. (2016)
Na ₂ CO ₃	SSF	5.0% (m/v) PA	Celluclast 1.5L (20 FPU/g _{PA}) Novozyme 188 (30 IU/g _{PA})	<i>S. cerevisiae</i> CCUG 53310	38°C; 72 h; 80rpm	0.18 g _{EiOH} /g _{PA}	Salehi et al. (2012)

E.H.F. - Estratégia de Hidrólise e Fermentação; T - temperatura; t - tempo; A - agitação

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARATERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE ARROZ

A matéria-prima utilizada neste trabalho é palha de arroz proveniente do cultivo de arroz Carolino na região do Baixo Mondego, pertencente à espécie *Oriza sativa* L. e subespécie Japónica. A sua caracterização química foi realizada tendo em conta os seguintes parâmetros: teor de sólidos e de cinzas, extrativos em etanol, lenhina solúvel e insolúvel e hidratos de carbono. Esta caracterização, bem como a preparação das amostras foram realizadas tendo em conta os protocolos do Laboratório Nacional de Energia Renovável dos EUA: NREL/TP-510-42620, NREL/TP-510-42621, NREL/TP-510-42622, NREL/TP-510-42619, NREL/TP-510-42618. A forma como estes parâmetros foram determinados encontra-se esquematizada na Figura 10 e o protocolo detalhado no Anexo I.

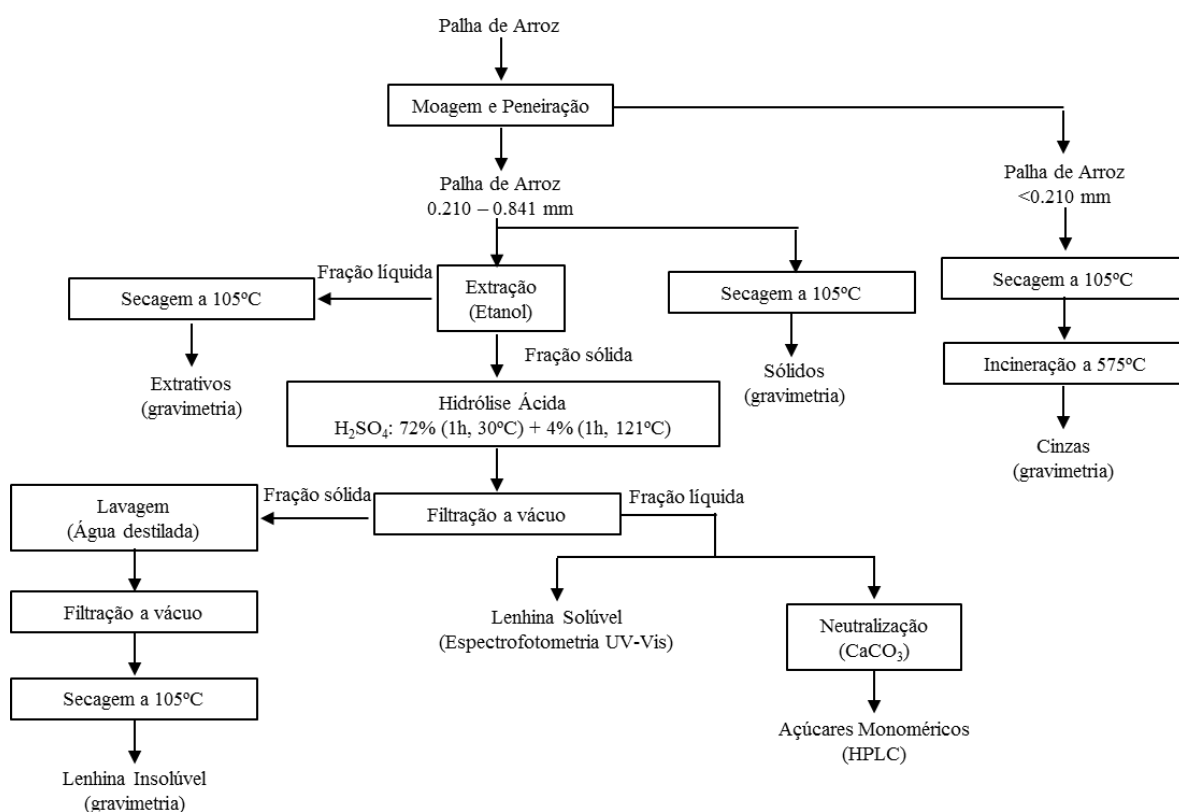


Figura 10. Esquema experimental para a determinação da composição química da palha de arroz.

3.2 EXTRATO ENZIMÁTICO

Com o intuito de hidrolisar os hidratos de carbono em açúcares fermentáveis utilizou-se o complexo enzimático Cellic CTec2 fornecido pela Novozymes. Este é constituído por celulasas, hemicelulasas e β -glucosidasas e a temperatura para a qual a sua atividade é máxima está compreendida entre 45 e 50°C com o pH do meio de cerca de 5.0 a 5.5.

A atividade enzimática foi previamente avaliada para a temperatura de 38°C (temperatura a que ocorre o SSF) e para 50°C (temperatura ótima a que ocorre a hidrólise enzimática) (Ghose, 1987; Mendes et al., 2016). Na Tabela 6 estão presentes os valores da atividade enzimática para as temperaturas referidas.

Tabela 6. Atividade hidrolítica do complexo enzimático Cellic CTec 2 a 38 e a 50°C.

Enzima	Atividade enzimática (FPU/mL de solução de enzima)	
	38°C	50°C
	Cellic CTec 2	59.7

A unidade FPU (Filter Paper Unit) na qual se traduz a atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima necessário para, a partir da hidrólise de 50.0 mg de papel de filtro, produzir 2.0 mg de glucose durante 1 hora de reação.

3.3 MICRORGANISMOS USADOS EM SSF

No presente trabalho utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 nos ensaios de SSF. Antes de cada ensaio é preparado o inóculo em meio líquido para que a levedura se multiplique e seja posteriormente adicionada ao processo. A preparação do meio de cultura é realizada em frascos autoclaváveis de 100 mL, sendo que a solução de glucose deve ser esterilizada (autoclave a 121°C durante 15 minutos) em separado dos outros nutrientes. No final, os nutrientes são adicionados num erlenmeyer esterilizado junto à chama do bico de Bunsen, são inoculados com a levedura e tapados com algodão hidrófobo e papel de alumínio (para reduzir a entrada de oxigénio). A cultura é então colocada numa incubadora orbital durante cerca de 12 horas a 30°C e 150 rpm. A composição do meio de cultura utilizado está presente na Tabela 7.

Tabela 7. Composição do meio de cultura líquido para leveduras (adaptado do site da ATCC).

Meio de cultura líquido	Concentração (g/L)
Glucose	10
Extrato de malte	3
Extrato de levedura	3
Peptona	5
Água	Até perfazer o volume determinado

Com o intuito de reduzir os custos processuais foi testado o uso de um meio de cultura alternativo, cuja composição química se encontra na Tabela 8.

Tabela 8. Composição do meio de cultura líquido alternativo para leveduras (adaptado de Saghbini et al., 2001).

Meio de cultura líquido	Concentração (g/L)
Glucose	10
Sulfato de amónio	5
Hidrogenofosfato de potássio anidro	1
Sulfato de magnésio heptahidratado	0.5
Cloreto de sódio	0.1
Cloreto de cálcio dihidratado	0.1
Água	Até perfazer o volume determinado

A preparação do meio de cultura alternativo e do inóculo é realizada da mesma forma que o anterior, sendo que a esterilização dos sulfatos e dos cloretos deve ser realizada separadamente.

3.4 PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DE ARROZ

A palha de arroz utilizada nos pré-tratamentos foi previamente moída (moinho Restch modelo 5657) e peneirada de forma a obter uma gama de tamanhos de partícula compreendida entre 1.00 e 5.66 mm. O procedimento experimental utilizado no pré-tratamento da palha de arroz encontra-se esquematizado na Figura 11.

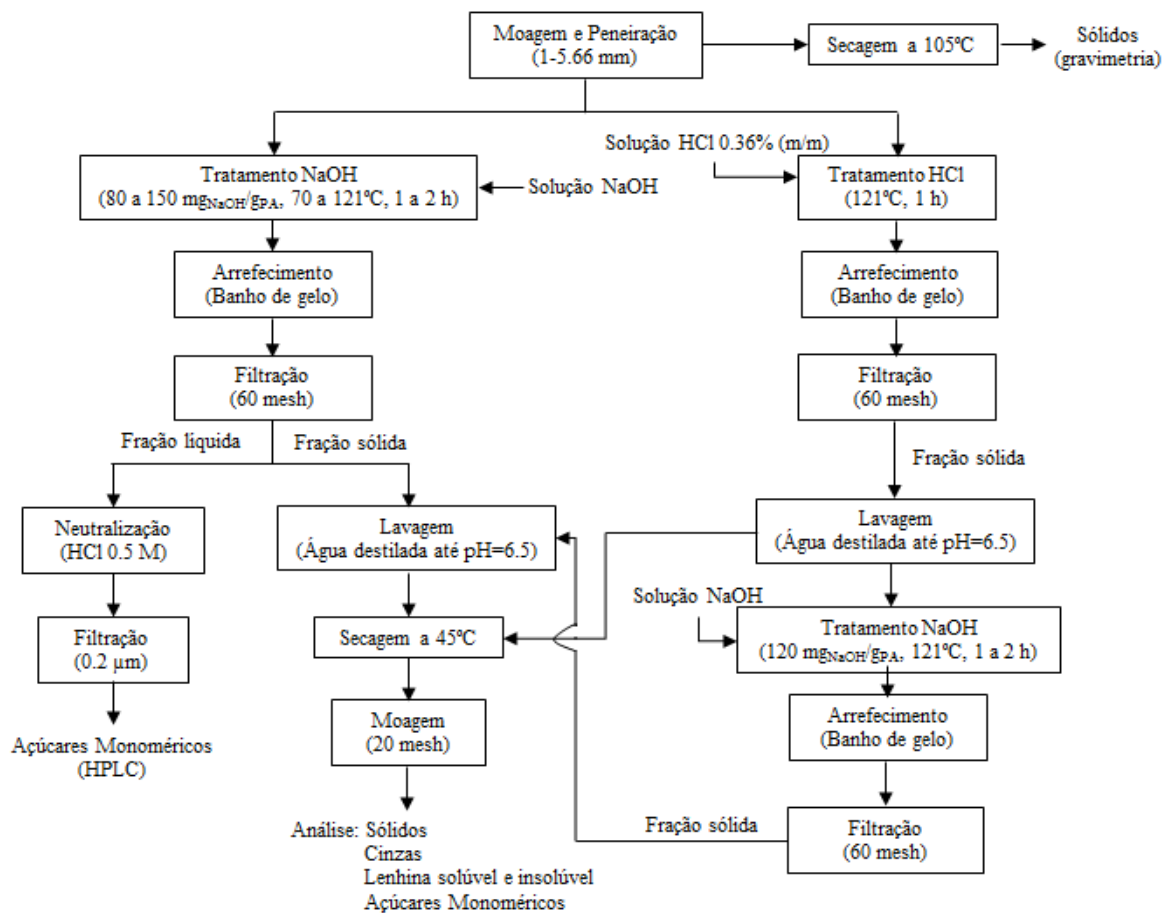


Figura 11. Representação esquemática dos pré-tratamentos.

Nalguns ensaios foi determinado o rendimento do processo de pré-tratamento para se poder contabilizar o material dissolvido (equação 5):

$$\text{Rendimento}_{\text{Pré-tratamento}} = \frac{\text{massa PA pré-tratada (g)}}{\text{massa PA original (g)}} \times 100 \quad (5)$$

O componente dissolvido/removido com o pré-tratamento é contabilizado através do balanço mássico a cada componente (equação 6):

Componente removido (%)

$$= \frac{\text{fração mássica}_{\text{Componente PA original}} - \text{fração mássica}_{\text{Componente PA pré-tratada}}}{\text{fração mássica}_{\text{Componente PA original}}} \times 100 \quad (6)$$

A fração mássica do componente em PA pré-tratada na base PA original é calculada através da multiplicação do valor da fração mássica desse componente na PA pré-tratada pelo rendimento do pré-tratamento.

3.4.1 Pré-tratamento com NaOH

As amostras de palha de arroz previamente moídas (1.00-5.66 mm) foram submetidas a um pré-tratamento com NaOH. Numa primeira fase utilizaram-se 5 g de biomassa (base seca) e um volume de 150 mL de solução de NaOH, o que se traduz numa razão líquido/sólido de 30. Nas experiências realizadas foi variada a temperatura, a concentração da solução, o tempo de pré-tratamento e a agitação. Tendo em conta as condições e os resultados dos tratamentos alcalinos apresentados por Remli et al. (2014) e Harun e Geok (2016), Tabela 4, optou-se por aumentar a razão líquido/sólido (de 10 e 20 para 30, valor a ser otimizado no futuro), diminuir a carga alcalina (reduzindo os gastos com reagentes) e fez-se variar a temperatura e o tempo do tratamento para identificar as condições que levassem à obtenção dos melhores resultados em conjunto com os menores gastos possíveis. As condições dos diferentes ensaios realizados estão presentes na Tabela 9.

Tabela 9. Condições de operação dos ensaios de pré-tratamento da palha de arroz (PA) com NaOH.

Ensaio	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9
T (°C)	70	70	90	90	121	121	121	121	121
[NaOH] mg/g _{PA}	80	100	80	100	80	100	100	120	150
t (h)	1	1	1	1	1	1	2	2	2
ω (ciclos/min)	100	100	100	100	0	0	0	0	0

Os ensaios até T=90°C foram feitos num banho de água onde se usaram balões erlenmeyer de 250 mL e os ensaios a T=121°C foram realizados numa autoclave em frascos de vidro de 250 mL. Numa segunda fase foram selecionados os ensaios em que se obtiveram melhores resultados, N8 e N9, e foi realizado um pequeno aumento de escala, tendo sido repetida a reação num frasco de 1 L com 900 mL de solução de NaOH e 30 g de palha de arroz em base seca, ensaios NA8 e NA9 (de modo a obter-se quantidade suficiente de palha pré-tratada a utilizar nos ensaios de SHF e SSF). No final do tratamento, os frascos foram colocados num banho de

gelo para parar a reação, seguidamente o seu conteúdo foi filtrado utilizando uma malha de 60 mesh e o licor (fração líquida) foi neutralizado com uma solução de HCl a 0.5 M até pH entre 5 e 6. Posteriormente foi filtrado por um filtro de seringa de 0.2 μm e injetado na coluna de HPLC para determinação dos açúcares dissolvidos. A fração sólida pré-tratada foi lavada com água destilada até pH=6.5, depois foi seca a 45°C durante cerca de 16 horas e foi moída (20 mesh). Por fim, seguindo o protocolo utilizado para a caracterização química da palha de arroz tal qual, foi determinado o teor de sólidos, de cinzas, a lenhina solúvel e insolúvel e os hidratos de carbono na amostra de palha de arroz pré-tratada.

3.4.2 Pré-tratamento com HCl e combinado com NaOH

Em ambas as variações do pré-tratamento utilizou-se 5 g de palha de arroz (base seca) previamente moída (1.00 - 5.66 mm) e uma relação líquido/sólido de 30. O pré-tratamento ácido seguido de alcalino é realizado com o intuito de verificar de que forma esta combinação poderia ser mais vantajosa na remoção de lenhina e no aumento da fração de celulose na biomassa em relação ao pré-tratamento alcalino. De forma a ser possível esta comparação, optou-se por utilizar uma concentração 120 $\text{mg}_{\text{NaOH}}/\text{g}_{\text{PA}}$ (concentração usada no ensaio N8). A concentração de ácido foi definida tendo em conta a utilizada por Barana et al. (2016) num pré-tratamento semelhante para fracionamento da biomassa lenhocelulósica e a gama de concentrações utilizada por Jung et al. (2015) e Castro et al. (2016). As diferentes condições em que se realizaram os ensaios estão presentes na Tabela 10.

Tabela 10. Condições de operação dos ensaios de pré-tratamento com HCl e combinado com NaOH.

Ensaio	H1	HN1	HN2
[HCl] (% m/m)	0.36	0.36	0.36
t_{HCl} (h)	1	1	1
[NaOH] $\text{mg}/\text{g}_{\text{PA}}$	-	120	120
t_{NaOH} (h)	-	1	2

Os três ensaios apresentados foram realizados a $T=121^\circ\text{C}$ na autoclave em frascos de vidro de 250 mL. O primeiro ensaio, H1, foi realizado apenas com HCl a 0.36% (m/m) durante uma hora. Nos ensaios HN1 e HN2 foi realizado igualmente o tratamento com HCl durante uma hora, o material sólido pré-tratado foi lavado com água destilada até que esta no final da lavagem possua um pH=6.5 e foi submetido a segundo pré-tratamento com NaOH. Este foi

realizado a 121°C, com uma concentração de 120 mg_{NaOH}/g_{PA} durante uma hora, ensaio NH1, ou durante duas horas, ensaio NH2.

No final de cada ensaio os frascos de vidros foram colocados num banho de gelo com o intuito de parar a reação. Posteriormente a palha de arroz foi filtrada (60 mesh) e lavada com água destilada até pH=6.5. De seguida foi colocada a secar a 45°C durante 16 horas e foi moída (20 mesh). No final, determinou-se o teor de sólidos, de cinzas, a lenhina solúvel e insolúvel e os hidratos de carbono na amostra de palha de arroz pré-tratada de acordo com os protocolos utilizados na caracterização da palha de arroz tal qual.

3.5 PROCEDIMENTO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O procedimento experimental utilizado nos ensaios de hidrólise enzimática encontra-se esquematizado na Figura 12.

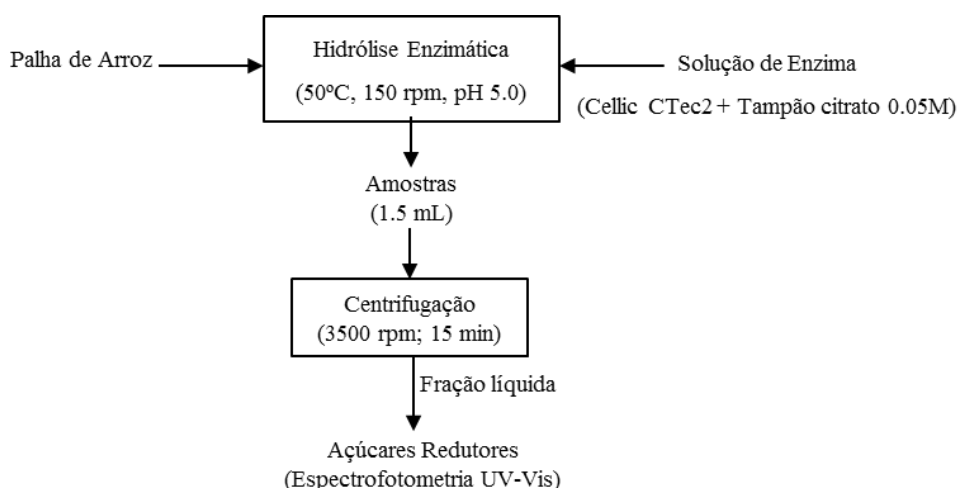


Figura 12. Representação esquemática dos ensaios de hidrólise enzimática.

Nos ensaios de hidrólise enzimática começou por se estudar a influência do teor de lenhina da palha de arroz pré-tratada no rendimento da hidrólise, com o intuito de avaliar a eficácia do pré-tratamento realizado. Para o efeito utilizou-se palha proveniente do ensaio N7, N8 e N9 moída (0.841 mm – NM7, NM8 e NM9). Para comparar com esses ensaios e comprovar a sua ineficiência, realizou-se também um ensaio de hidrólise enzimática com palha de arroz tal qual moída (0.841 mm - PAM). Realizaram-se também ensaios utilizando a palha pré-tratada dos ensaios N5 e N6 tal qual e moída, 0.210-0.841 mm (NM5 e NM6), de forma a avaliar a influência do processo de moagem. Nestes ensaios preliminares de hidrólise

enzimática, efetuados para avaliação da eficácia do pré-tratamento aplicado, a carga enzimática utilizada foi 20 FPU/g_{HC}, seguindo o protocolo NREL/LAP-009. Com a palha de arroz resultante dos pré-tratamentos com aumento de escala, NA8 e NA9, realizaram-se novos ensaios de hidrólise enzimática em diferentes condições, nomeadamente a carga de enzima aplicada (15 FPU/g_{HC}, de acordo com o estudo efetuado por Mendes et al., 2016). Estes ensaios decorreram de modo a testar a viabilidade técnica do processo SHF sobre a palha de arroz pré-tratada. As condições em que se realizou cada um destes ensaios estão presentes na Tabela 11, onde o substrato é referido como “Hidratos de carbono presentes na amostra – HC”, tendo por base a sua quantidade determinada por HPLC nas amostras pré-tratadas e na palha original.

Tabela 11. Condições de operação dos ensaios de hidrólise enzimática.

Ensaio	N5	NM5	N6	NM6	NM7 ^(*)	NM8 ^(*)	NM9 ^(*)	PAM	NA8'	NA9'	NA8	NA9
Massa HC (g)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	6.95	6.95	6.95	6.95
Carga total de sólidos (%)	3.20	3.20	2.85	2.85	3.45	3.37	3.07	4.49	15.94	15.98	15.94	15.98
Carga enzimática (FPU/g _{HC})	20	20	20	20	20	20	20	15	15	15	15	15
t Hidrólise (h)	24	24	24	24	24	24	24	24	72	72	72	72
V _{Total} (mL)	20	20	20	20	20	20	20	20	50	50	50	50
Regime de operação	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	S	S

D – Descontínuo; S – Semi-descontínuo; ^(*) – Ensaios realizados em duplicado.

Estes ensaios foram realizados em balões erlenmeyer de 50 mL para os ensaios preliminares e 150 mL para os restantes. Nos ensaios preliminares estabeleceu-se um volume de suspensão de 20 mL, uma massa de hidratos de carbono (HC) de 0.5 g e uma carga enzimática de 20 FPU/g_{HC}. Nos segundos ensaios estabeleceu-se um volume de suspensão de 50 mL, utilizou-se uma massa de 6.95 g de hidratos de carbono e 15 FPU/g_{HC}. Nos ensaios realizados em regime semi-descontínuo as adições de palha de arroz e de solução enzimática foram feitas no início do processo de hidrólise e por mais três vezes, no final de se retirarem as três primeiras amostras. Os valores detalhados de todas as quantidades utilizadas em cada ensaio estão presentes no Anexo II.

No balão começou-se por colocar a palha de arroz. Em paralelo, colocou-se o volume necessário de enzima num tubo de ensaio e adicionou-se tampão citrato a 0.05 M (pH=5) até perfazer o volume de solução enzimática requerido. Ambos foram colocados numa incubadora

orbital até a sua temperatura estabilizar nos 50°C. Posteriormente, a solução enzimática foi adicionada à palha de arroz e a mistura foi colocada numa incubadora a 50°C e 150 rpm. Durante o tempo em que decorreu a hidrólise foram retiradas amostras de 1.5 mL. Estas foram centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi analisado pelo método de determinação dos açúcares redutores modificado (DNS-modificado).

3.6 PROCESSO SSF

O procedimento experimental utilizado nos ensaios de SSF da palha de arroz encontra-se esquematizado na Figura 13.

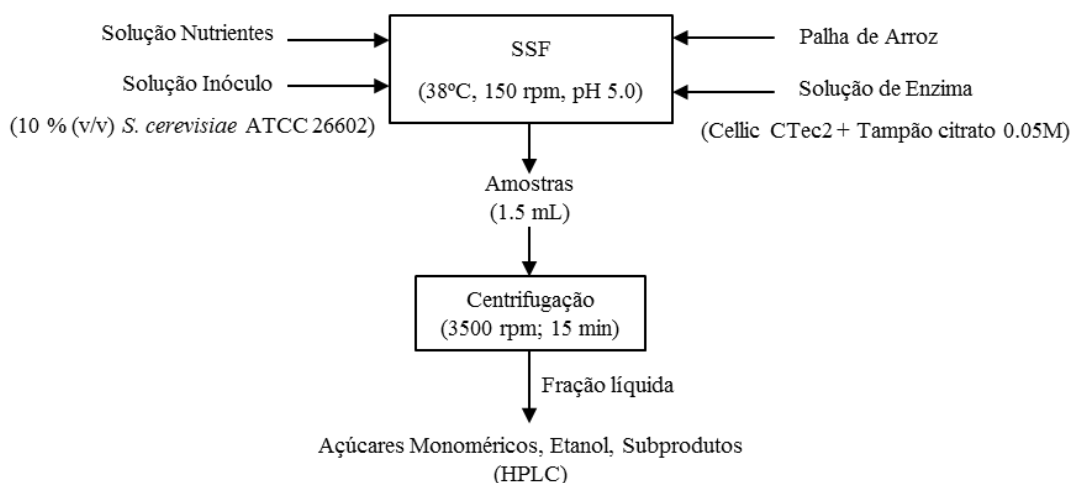


Figura 13. Representação esquemática dos ensaios de SSF.

Para os ensaios de SSF foram utilizados balões de erlenmeyer de 150 mL previamente esterilizados na autoclave durante 15 minutos a 121°C, assim como o restante material utilizado. Para estes ensaios estabeleceu-se uma carga enzimática de 15 FPU/g_{HC} (Mendes et al., 2016). Começou por se adicionar à palha de arroz, previamente esterilizada, tampão citrato a 0.05 M para que o pH do meio se mantivesse à volta de 5. Posteriormente, adicionou-se a solução de nutrientes, a enzima e o inóculo de levedura. Depois de tudo ter sido adicionado ao balão em condições de assepsia, este foi tapado com algodão hidrófobo e com papel de alumínio. De seguida foi colocado numa incubadora orbital a 38°C e 150 rpm durante 72 horas. Ao longo do tempo foram retiradas amostras de 1.5 mL e analisadas por HPLC.

Com exceção do ensaio com palha de arroz tal qual (PA – realizado em descontínuo), os ensaios de SSF foram realizados em semi-descontínuo, sendo que a adição de palha de arroz e

de solução enzimática foi realizada no início da fermentação (7.4 a 8.3 g de PA, dependendo do ensaio, e 0.36 mL de enzima) e por mais três vezes (7.4 a 8.3 g de PA e 0.36 mL de enzima, em cada uma), a seguir a serem retiradas as três primeiras amostras. No ensaio NA8 variou-se a composição da solução de nutrientes com o intuito de minimizar os custos do processo (ensaio NAA8). Na Tabela 12 estão presentes as condições dos ensaios realizados. As quantidades utilizadas em cada ensaio encontram-se detalhadas no Anexo II.

Tabela 12. Condições de operação dos ensaios de SSF.

Ensaio	NA8 ^(*)	NAA8 ^(*)	NA9	PA
Massa HC (g)	5.68	5.68	5.68	0.50
Carga total de sólidos (%)	13.05	13.05	13.05	4.49
V _{Total} (mL)	50	50	50	20
Regime de operação	S	S	S	D

D – Descontínuo; S – Semi-descontínuo; ^(*) – Ensaios realizados em duplicado.

3.7 PARÂMETROS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E FERMENTAÇÃO

De forma a avaliar e a comparar os diferentes ensaios de hidrólise realizados foi calculado o rendimento da hidrólise enzimática, $\eta_{\text{Hidrólise Enzimática}}$, pela equação 7, sendo 1.1 o fator global de conversão mássica de hidratos de carbono em açúcares redutores, o qual é obtido tendo em conta a relação estequiométrica da equação 1, e f_{HC} é a fração de hidratos de carbono na palha de arroz pré-tratada. Este rendimento foi calculado tendo em conta os resultados obtidos pelo método de DNS-modificado.

$$\eta_{\text{Hidrólise Enzimática}}(\%) = \frac{[\text{Eqs. Glucose}](\text{g/L})}{1.1 \times f_{\text{HC}} \times [\text{Palha de arroz}](\text{g/L})} \times 100 \quad (7)$$

Da mesma forma, para avaliar a eficiência do processo de SSF, assim como o efeito da alteração das condições operatórias, procedeu-se ao cálculo do rendimento da conversão de biomassa em etanol e da produtividade do processo fermentativo. A equação 8 apresenta a fórmula de cálculo do rendimento teórico em etanol do processo SSF, sendo 0.51 o fator de conversão mássica de açúcares fermentáveis em etanol, dado pela relação estequiométrica da

equação 3, 1.1 o fator global de conversão mássica dos hidratos de carbono presentes na mistura em açúcares monoméricos e f_{HC} a fração de hidratos de carbono na palha de arroz pré-tratada.

$$Y(\text{ETOH})(\%) = \frac{[\text{EtOH}]_t(\text{g/L})}{1.1 \times 0.51 \times f_{HC} \times [\text{Palha de arroz}](\text{g/L})} \times 100 \quad (8)$$

Uma vez que o microrganismo utilizado apenas metaboliza hexoses, foi calculado ainda o rendimento em etanol com base na concentração de glucose presente em cada ensaio, equação 9, sendo 0.51 o fator de conversão mássica de glucose em etanol, 1.14 o fator de conversão de celulose em glucose e f_{Gluc} a fração mássica de glucanas na palha de arroz pré-tratada.

$$Y'(\text{ETOH})(\%) = \frac{[\text{EtOH}]_t(\text{g/L})}{0.51 \times 1.14 \times f_{Gluc} \times [\text{Palha de arroz}](\text{g/L})} \times 100 \quad (9)$$

A produtividade foi calculada pela equação 10. Este é um parâmetro que relaciona a concentração de etanol produzida num determinado intervalo de tempo da fermentação.

$$P(\text{g}/(\text{Lh})) = \frac{[\text{EtOH}]_t(\text{g/L})}{t(\text{h})} \quad (10)$$

3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.8.1 Cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC)

O método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizado para quantificar os açúcares monoméricos que constituem a palha de arroz antes e após os pré-tratamentos. Permite também determinar a quantidade de açúcares e de produtos de degradação formados com os pré-tratamentos e os açúcares e o etanol presentes no caldo de fermentação do processo de SSF.

A identificação e quantificação dos compostos é realizada com base no tempo de retenção destes na coluna. Para esse efeito foram construídas curvas de calibração para a celobiose, glucose, xilose, arabinose, manose, galactose, etanol, xilitol, glicerol, HMF, furfural e ácido acético, Anexo III.

O equipamento utilizado para essas quantificações é da marca Knauer modelo k-301 e as suas especificações estão presentes na Tabela 13.

Tabela 13. Especificações para análise das amostras por HPLC.

Pré-coluna	PL HI-PLEX ca
Coluna	Aminex HPX-87P, BioRad
Temperatura do forno	80 – 85 °C
Eluente	Água ultrapura filtrada a vácuo (0.2 µm) e desgaseificada nos ultrassons (15 min)
Caudal	0.6 mL/min

3.8.2 Método de determinação dos açúcares redutores (DNS)

De forma a determinar os açúcares redutores utilizou-se o método DNS-modificado. Este consiste em adicionar 1 mL de tampão citrato a 0.05 M num tubo de ensaio juntamente com 0.5 mL de amostra (se necessário diluída com tampão citrato) e 3 mL de reagente DNS modificado (o seu modo de preparação está presente no Anexo IV). O tubo é agitado, colocado num banho de água a ferver durante 5 minutos e de seguida é colocado em gelo durante mais 5 minutos para parar a reação. Numa cuvete adiciona-se 0.2 mL desta solução e 2.5 mL de água destilada. Posteriormente mede-se a absorvância num espectrofotómetro UV-Vis a 540 nm. O composto que absorve luz neste comprimento de onda é o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que resulta da reação de oxidação-redução entre o açúcar e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). O branco utilizado é a solução de tampão citrato 0.05 M que foi submetido ao mesmo tratamento que as amostras. A concentração de açúcares redutores é determinada através da curva de calibração que relaciona a absorvância com a concentração de glucose em soluções-padrão (equação 11).

$$[\text{Eqs. Glucose}](\text{mg/mL}) = 8.9771 \times \text{DO}(540 \text{ nm}) + 0.0104 \quad R^2 = 0.9992 \quad (11)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação e discussão dos resultados está organizada em seis subcapítulos. No primeiro são apresentados os resultados da caracterização química da palha de arroz utilizada, tal como a sua discussão. O segundo é dedicado ao pré-tratamento deste tipo de biomassa com NaOH, assim como a determinação da sua eficiência com base em ensaios de hidrólise enzimática. No terceiro subcapítulo são apresentados e discutidos os pré-tratamentos com HCl e com HCl e NaOH. No quarto subcapítulo são selecionados os melhores pré-tratamentos realizados e são apresentados e discutidos os resultados do seu aumento de escala. Por fim, o quinto e o sexto subcapítulos são dedicados aos ensaios de hidrólise enzimática e de SSF, respetivamente.

4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE ARROZ

A caracterização química da palha de arroz foi realizada segundo o procedimento descrito na secção 3.1. Da análise por HPLC constatou-se que a matéria-prima utilizada é constituída por 49.9% de açúcares, dos quais 33.3% são polímeros de glucose e 14.6% são polímeros de xilose. O segundo maior componente deste material é lenhina, cerca de 23.0%. A Tabela 14 apresenta a composição química, em base seca, da palha de arroz utilizada. Os ensaios foram realizados em duplicado.

Tabela 14. Composição química da matéria-prima.

Composição	Quantidade (% m/m) ^(*)
Glucanas	33.3 ± 0.3
Xilanas	14.6 ± 0.1
Galactanas	n.i.
Mananas	n.i.
Arabinanas	2.0 ± 0.2
Lenhina	23.0 ± 0.2
• Solúvel	3.0 ± 0.0
• Insolúvel	20.0 ± 0.1
Cinzas	21.0 ± 0.4
Extrativos	7.1 ± 0.5

(*) - base seca, média de duas determinações e respetivo desvio padrão; n.i.- não identificado.

De acordo com a revisão bibliográfica efetuada (Tabela 3), a palha de arroz é constituída por 32 a 47% de celulose, 19 a 27% de hemiceluloses, das quais 14.8 a 20.2% é xilose, 15.3 a 25.3% de lenhina e 9.2 a 11.4% de cinzas. Comparativamente a estes valores a composição química da palha de arroz determinada no presente trabalho está dentro da média à exceção do teor de xilanas que é ligeiramente inferior e o teor de cinzas que é bastante superior. Comparando com os exemplos específicos apresentados na Tabela 3 referentes aos trabalhos de Rodriguez et al. (2008) e Castro et al. (2016), os valores de hidratos de carbono totais e de lenhina estão concordantes, mas o teor de extrativos é inferior e o teor de cinza é bastante superior. Quando comparamos o teor de xilanas e arabinanas determinado por Castro et al. (2016) com o determinado no presente trabalho verificamos que este é ligeiramente inferior (19.9 vs 14.6% para as xilanas e 3.9 vs 2.0% para as arabinanas). A diferença no teor de extrativos reside no facto de nos trabalhos supramencionados ter sido aplicada uma extração sequencial H₂O/EtOH (protocolo NREL) ou extração H₂O/EtOH-Benzeno (norma TAPPI), enquanto que no presente trabalho, se efetuou apenas uma extração com etanol (protocolo NREL modificado). O facto de se usar água na extração faz com que também se dissolvam alguns hidratos de carbono, dando como resultado um valor mais elevado de extrativos quando se realiza esta sequência. O elevado teor de cinzas comparativamente aos exemplos da Tabela 3 pode ser devido às diferentes épocas e regiões em que o arroz é cultivado e colhido ou às diferentes quantidades e variedades de fertilizantes adicionados.

4.2 PRÉ-TRATAMENTO COM NaOH

O objetivo do pré-tratamento do material lenhocelulósico com NaOH consiste na remoção da lenhina do material lenhocelulósico e no aumento da digestibilidade da celulose, deixando os hidratos de carbono mais acessíveis às etapas de hidrólise e fermentação para a produção de bioetanol. Nos diversos ensaios realizados utilizaram-se 5 g de palha de arroz, em base seca, e uma relação líquido/sólido de 30, tendo sido variada a temperatura de operação, a concentração de NaOH e o tempo de tratamento. Para avaliar a composição de lenhina no material sólido pré-tratado resultante de cada ensaio, procedeu-se à sua caracterização química. Os resultados obtidos estão presentes na Tabela 15. De realçar que, de forma a verificar a reprodutibilidade de cada ensaio, estes foram todos realizados em duplicado.

Tabela 15. Condições operatórias e caracterização química da palha de arroz (PA) original e do material sólido resultante do pré-tratamento com NaOH.

Ensaio	N1	N2	N3	N4	N5	PA	
T (°C)	70	70	90	90	121	-	
[NaOH] mg/g _{PA}	80	100	80	100	80	-	
t (h)	1	1	1	1	1	-	
Composição (% m/m) ^(*)	Glucanas	51.1 ± 1.9	52.0 ± 1.3	50.8 ± 1.3	54.0 ± 0.5	57.2 ± 0.9	33.3 ± 0.3
	Xilanas	16.5 ± 0.2	16.8 ± 2.4	17.3 ± 0.3	16.4 ± 0.3	16.5 ± 0.5	14.6 ± 0.1
	Arabinanas	7.5 ± 0.7	6.3 ± 0.5	8.8 ± 1.0	8.8 ± 1.9	7.4 ± 0.4	2.0 ± 0.2
	Lenhina	16.1 ± 0.3	14.8 ± 0.7	15.6 ± 0.7	12.6 ± 0.1	12.5 ± 0.2	23.0 ± 0.2
	• Solúvel	2.2 ± 0.0	2.0 ± 0.0	1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.0	1.4 ± 0.0	3.0 ± 0.0
	• Insolúvel	13.9 ± 0.3	12.8 ± 0.7	13.7 ± 0.6	10.9 ± 0.0	11.1 ± 0.2	20.0 ± 0.1
	Cinzas	4.9 ± 0.2	4.0 ± 0.2	5.3 ± 0.2	5.1 ± 1.77	6.2 ± 0.4	21.0 ± 0.4

(*) - base seca, média de duas determinações e respetivo desvio padrão.

Tabela 15. Condições operatórias e caracterização química da palha de arroz (PA) original e do material sólido resultante do pré-tratamento com NaOH (continuação).

Ensaio	N6	N7	N8	N9	PA	
T (°C)	121	121	121	121	-	
[NaOH] mg/g _{PA}	100	100	120	150	-	
t (h)	1	2	2	2	-	
Composição (% m/m) ^(*)	Glucanas	62.4 ± 2.6	60.1 ± 0.7	59.6 ± 0.5	64.8 ± 0.5	33.3 ± 0.3
	Xilanas	16.2 ± 0.4	19.9 ± 0.2	19.3 ± 0.1	20.4 ± 0.3	14.6 ± 0.1
	Arabinanas	8.7 ± 0.8	2.2 ± 0.0	2.2 ± 0.0	3.2 ± 0.2	2.0 ± 0.2
	Lenhina	8.7 ± 0.0	9.6 ± 0.2	7.3 ± 0.5	4.3 ± 0.6	23.0 ± 0.2
	• Solúvel	1.1 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.0	3.0 ± 0.0
	• Insolúvel	7.6 ± 0.0	8.3 ± 0.2	6.1 ± 0.5	3.5 ± 0.6	20.0 ± 0.1
	Cinzas	4.2 ± 0.2	6.1 ± 0.5	4.8 ± 0.5	3.7 ± 0.2	21.0 ± 0.4

(*) - base seca, média de duas determinações e respetivo desvio padrão.

Analisando os resultados presentes na Tabela 15 verifica-se que com os vários ensaios realizados se consegue uma remoção de cinzas, ficando o material sólido pré-tratado com um teor deste composto de cerca de 6.2 a 3.7%, consoante as condições de tratamento. Mais importante ainda, é a redução da fração de lenhina da biomassa, uma vez que este é um dos compostos responsáveis pela inibição dos processos biológicos subsequentes. Nas condições utilizadas o material pré-tratado possui um teor de lenhina compreendido entre 16.1 e 4.3%. Como consequência, ocorre um aumento da fração de hidratos de carbono (soma da celulose e hemiceluloses) de 50.0% (palha de arroz original) para 75.2 a 86.6%, dependendo da severidade do ensaio de pré-tratamento. É de salientar que, apesar dos ensaios N5 a N9 apresentarem melhores resultados, estes foram realizados na autoclave onde existe a limitação da ausência de

agitação, dificultando o processo de transferência de massa, comparativamente aos ensaios N1 e N4.

Na Figura 14 é apresentada a forma como varia a fração de lenhina da palha de arroz com a concentração de NaOH, a temperatura e o tempo reação em cada ensaio de pré-tratamento.

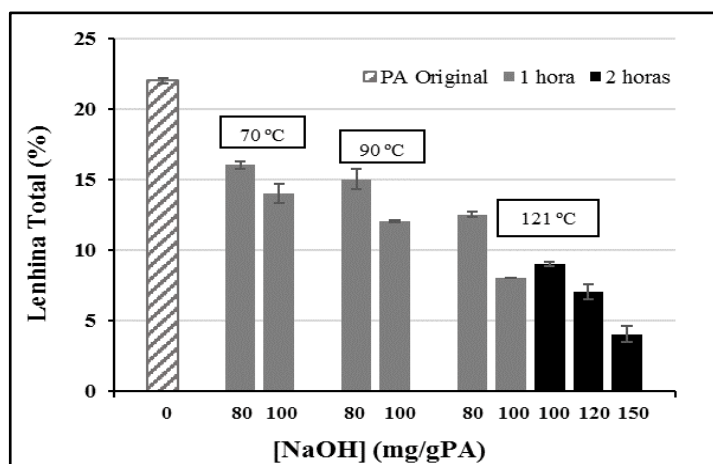


Figura 14. Teor de lenhina da biomassa pré-tratada com NaOH em cada ensaio e respectivo desvio padrão.

Para as concentrações de 80 e 100 $\text{mg}_{\text{NaOH}}/\text{g}_{\text{PA}}$ e 1 hora de reação existe uma diminuição significativa do teor de lenhina com o aumento da temperatura de 70 até 121°C, sendo muito mais acentuada na concentração mais elevada.

Analisando agora o efeito do aumento do tempo de reação, de 1 para 2 horas, para uma concentração de 100 $\text{mg}_{\text{NaOH}}/\text{g}_{\text{PA}}$ a 121°C, constata-se que o teor de lenhina é semelhante, mas ocorre uma diminuição do teor de arabinanas (Tabela 15). Estando a lenhina ligada à arabinose no complexo LCC, esta redução de arabinose arrasta consigo alguma lenhina a ela ligada, permitindo melhorar o rendimento de hidrólise a partir do ensaio N6. Asghar et al. (2015) e Harun e Geok (2016), utilizando palha de trigo e de arroz, respectivamente, depararam-se com a mesma situação ao realizarem experiências idênticas, com NaOH. Verificaram que, para uma mesma concentração e temperatura, o aumento do tempo de reação não é por vezes sinónimo de diminuição do teor de lenhina, ocorrendo a perda de hidratos de carbono.

Já com o aumento da concentração para 120 e 150 $\text{mg}_{\text{NaOH}}/\text{g}_{\text{PA}}$ obtém-se uma biomassa com os menores teores de lenhina de entre os ensaios realizados, cerca 7.3 e 4.3%, respetivamente. Poder-se-á concluir que a temperatura e a concentração de NaOH são os fatores que têm maior influência na deslenhificação da palha de arroz. Uma vez que o aumento destes fatores encarece fortemente o processo, existe a necessidade de, no futuro, otimizar a

temperatura, o tempo e a carga alcalina utilizada, assim como estudar a viabilidade do processo pela utilização de bases mais baratas, como o $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

4.2.1 Ensaios preliminares de hidrólise enzimática

Com o intuito de verificar de que forma o teor de lenhina na biomassa pré-tratada afeta o processo de bioconversão dos hidratos de carbono (HC) a açúcares fermentáveis foram realizados ensaios de hidrólise enzimática. Estes foram realizados em descontínuo durante 24 horas, tendo-se utilizado uma carga enzimática de 20 FPU/g_{HC}, 0.5 g de hidratos de carbono e tampão citrato até perfazer 20 mL de volume. A influência do teor de lenhina no rendimento de hidrólise enzimática pode ser observada na Figura 15, ao longo de 24h, para a palha de arroz original moída (PAM) e para os materiais pré-tratados provenientes dos ensaios N5 a N9, após a sua moagem (NM5 a NM9).

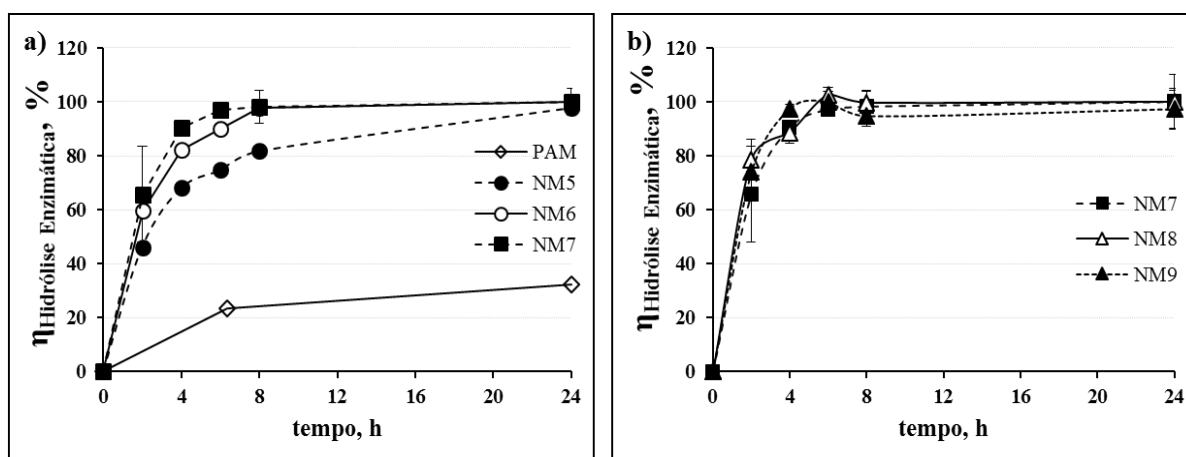


Figura 15. Rendimento de hidrólise enzimática da palha de arroz original moída (carga enzimática de 15 FPU/g_{PA} -PAM) e nos materiais resultantes dos pré-tratamentos N5 a N9 (carga enzimática de 20 FPU/g_{PA}), após a sua moagem: **a)** PAM, NM5, NM6 e NM7; **b)** NM7, NM8 e NM9.

Pela análise da Figura 15 a) verifica-se que, embora a carga enzimática utilizada tenha sido ligeiramente menor à dos restantes ensaios, o ensaio de hidrólise enzimática da palha de arroz original (teor de lenhina de 23.0%) não é viável, obtendo-se um rendimento de apenas 32.4% ao final de 24 horas. Com a redução do teor de lenhina de 12.5 (ensaio NM5, Figura 15 a)) para 4.3% (ensaio NM9, Figura 15 b)) no material lenhocelulósico pré-tratado, verifica-se um aumento significativo da velocidade de hidrólise enzimática. A hidrólise completa dos hidratos de carbono ocorre apenas passadas 24 horas no ensaio NM6, enquanto que nos ensaios NM7, NM8 e NM9 ocorre por volta das 8, 6 e 4 horas, respetivamente.

A biomassa proveniente dos ensaios N8 e N9 possui um menor teor de lenhina e para, além disso, foi a partir desta que se obtiveram os melhores resultados em termos de velocidade de conversão de hidratos de carbono. Por esse motivo, foram selecionadas as condições destes ensaios para ser realizado o aumento de escala dos pré-tratamentos da palha de arroz para posterior hidrólise e fermentação.

Foi também testado o efeito do tamanho das partículas de palha de arroz pré-tratada através da sua moagem (0.841 mm). Os resultados foram comparados com a hidrólise enzimática da palha de arroz original (sem pré-tratamento), usando uma carga enzimática de 15 FPU/g_{HC} do mesmo complexo enzimático Cellic CTec2. A Figura 16 apresenta a evolução do rendimento da hidrólise enzimática ao longo de 24 horas, para os ensaios N5, N6 e para os correspondentes materiais moídos NM5 e NM6.

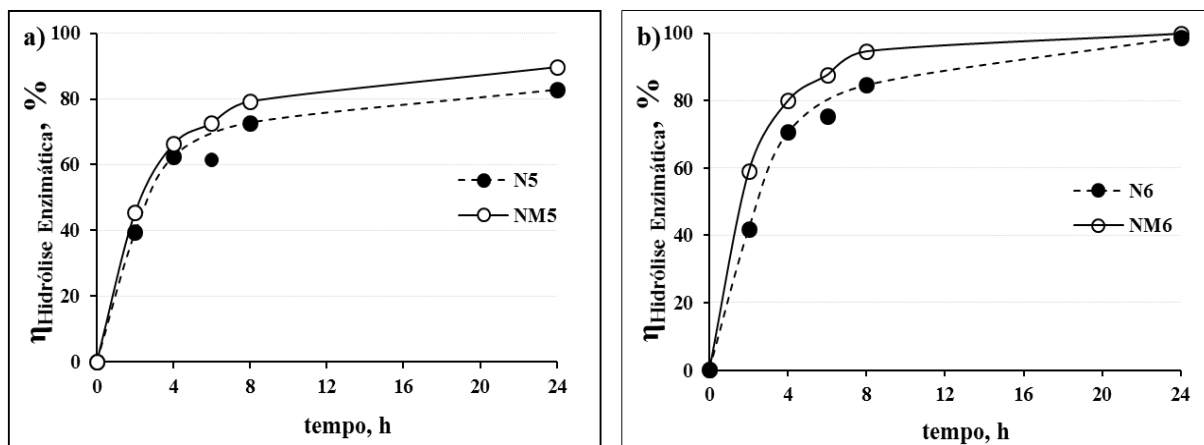


Figura 16. Efeito da moagem da palha de arroz pré-tratada (NM) no rendimento de hidrólise enzimática, resultante dos ensaios a) N5; b) N6, com uma carga enzimática de 20 FPU/g_{PA}.

Pela análise da Figura 16 a) verifica-se que decorridas 8 horas do processo de hidrólise enzimática da palha de arroz pré-tratada já tinham sido convertidos em açúcares redutores cerca de 73.0 e 79.6% dos hidratos de carbono provenientes dos ensaios N5 e NM5, respetivamente. No final de 24 horas os rendimentos obtidos foram de 83.1% no ensaio N5 e 90.1% no ensaio NM5. Nos ensaios N6 e NM6 ao final de 8 horas de hidrólise obtiveram-se rendimentos de 86.1 e 96.3%, respetivamente, Figura 16 b). Ao fim de 24 horas foi atingida a conversão completa dos hidratos de carbono. Constata-se também, através da comparação dos resultados obtidos nos diversos ensaios, que a moagem prévia da biomassa antes da hidrólise enzimática acelera o processo de conversão dos hidratos de carbono a açúcares simples. No entanto, visto esta diferença não ser muito significativa e os processos de moagem serem bastante dispendiosos, a

etapa de moagem não foi realizada nos ensaios de hidrólise enzimática que são apresentados nas secções seguintes.

4.3 PRÉ-TRATAMENTO COM HCl E COMBINADO COM NaOH

O pré-tratamento com ácido diluído tem como objetivo a solubilização da fração hemicelulósica da biomassa, na tentativa de eliminar as porções ligadas à lenhina, consideradas por alguns autores (Chundawat et al., 2010) como as responsáveis pela baixa eficiência da hidrólise enzimática. Se, aliado a este pré-tratamento, for aplicada uma segunda etapa com NaOH, induz-se a remoção de lenhina e um aumento da digestibilidade da celulose, o que favorece as etapas de hidrólise enzimática e fermentação. Nos ensaios realizados utilizaram-se 5 g de palha de arroz (base seca), uma relação líquido/sólido de 30, uma concentração de HCl de 0.36% (m/m) e 1 h de tratamento. As variações realizadas incidiram na aplicação, ou não, de uma segunda etapa de pré-tratamento com uma solução de 120 mg_{NaOH}/g_{PA} durante uma ou duas horas. Os ensaios foram realizados em duplicado. De forma a avaliar a composição da fração sólida pré-tratada foi realizada a sua caracterização química - Tabela 16.

Tabela 16. Composição da fração sólida da palha de arroz (PA) pré-tratada com HCl (H) e com HCl seguido de NaOH (HN).

Ensaio	H1	HN1	HN2	PA	
[NaOH] mg/g _{PA}	-	120	120	-	
t _{NaOH} (h)	-	1	2	-	
Composição (% m/m) ^(*)	Glucanas	52.0 ± 4.1	75.1 ± 0.3	83.8 ± 1.9	33.3 ± 0.3
	Xilanas	3.4 ± 0.8	n.i.	n.i.	14.6 ± 0.1
	Arabinanas	n.i.	n.i.	n.i.	2.0 ± 0.2
	Lenhina	31.7 ± 0.1	14.6 ± 0.9	11.0 ± 1.7	23.0 ± 0.2
	• Solúvel	1.3 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	3.0 ± 0.0
	• Insolúvel	30.4 ± 0.1	14.0 ± 0.8	10.3 ± 1.8	20.0 ± 0.1
	Cinzas	11.8 ± 0.3	8.1 ± 0.5	5.9 ± 3.2	21.0 ± 0.4

(*) - base seca, média de duas determinações e respetivo desvio padrão; n.i.- não identificado.

Analisando os resultados presentes na Tabela 16, constata-se que, para o ensaio realizado apenas com HCl (H1), tal como era esperado, existiu um aumento da fração de lenhina da biomassa devido à remoção de outros compostos como cinzas e hemiceluloses, sendo que a fração de arabinanas foi dissolvida na totalidade. Quando sobre este material pré-tratado é efetuado um segundo pré-tratamento com NaOH durante uma hora (ensaio HN1) observa-se que as hemiceluloses são dissolvidas na sua totalidade, que diminui o teor de cinzas e que há

uma redução significativa de lenhina, ficando o material com cerca de 14.6%. Com o aumento do tempo de reação com NaOH de uma para duas horas, verifica-se uma diminuição dos teores de lenhina e de cinzas na biomassa lenhocelulósica, obtendo-se um material com cerca de 11.0 e 5.9% destes componentes, respetivamente. Com este pré-tratamento, e devido à remoção dos componentes acima referidos, obtém-se um material sólido pré-tratado proveniente do ensaio HN2 com um teor de glucanas de 83.8%, quando na palha de arroz original era de 33.3%.

Comparando os resultados do ensaio HN2 com os do ensaio N8 (pré-tratamento com 120 mg_{NaOH}/g_{PA} durante duas horas) anteriormente apresentado (Tabela 15) verifica-se que no primeiro a biomassa lenhocelulósica pré-tratada possui um teor de lenhina bastante superior ao do segundo, cerca de 11.0 vs 7.3%. Além disso, a percentagem mássica de material não dissolvido no pré-tratamento é no máximo 40% ($33.3 \times 100 / 83.8$ tendo por base o teor de glucanas, caso não fossem dissolvidas), quando no ensaio N8 é potencialmente superior. Tendo em consideração que este tipo de tratamentos tem como objetivo o aumento da digestibilidade da biomassa, nomeadamente através da remoção de lenhina (compostos que provocam inibição dos processos de hidrólise enzimática e fermentação – Harun e Geok, (2016) e Castro et al. (2016)) com o máximo aproveitamento dos hidratos de carbono, pode-se concluir que o ensaio N8 é mais vantajoso do que o HN2, para além de que no ensaio HN2 existe um maior gasto de tempo, reagentes e de energia.

4.4 AUMENTO DE ESCALA DOS PRÉ-TRATAMENTOS

Selecionados os tratamentos com os quais se conseguiu um menor teor de lenhina na palha de arroz tratada, bem como uma maior velocidade de hidrólise enzimática (N8 e N9), foi realizado um aumento de escala. Para estes ensaios mantiveram-se todas as variáveis processuais (carga de sólidos, concentração, temperatura e tempo), diferindo apenas no facto de a reação passar a ocorrer num frasco autoclavável de 1 L ao invés de 250 mL, serem pré-tratados em cada *batch* 30 g de palha de arroz em vez de 5 g e o tratamento ocorrer numa autoclave de maiores dimensões. Os ensaios foram realizados em duplicado e os resultados da caracterização química do material sólido pré-tratado estão presentes na Tabela 17.

Tabela 17. Resultados dos pré-tratamentos com aumento de escala.

	Ensaio	Sólidos Pré-Tratados		PA
		NA8	NA9	
Composição (% m/m) ^(*)	Glucanas	60.4 ± 6.5	59.8 ± 1.5	33.3 ± 0.3
	Xilanas	24.0 ± 0.9	23.7 ± 0.2	14.6 ± 0.1
	Arabinanas	2.9 ± 1.3	4.1 ± 0.4	2.0 ± 0.2
	Lenhina	6.5 ± 0.1	5.3 ± 0.6	23.0 ± 0.2
	• Solúvel	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.0	3.0 ± 0.0
	• Insolúvel	5.7 ± 0.1	4.5 ± 0.5	20.0 ± 0.1
	Cinzas	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.8	21.0 ± 0.4
Lenhina removida (%)		87.8	90.4	-
Rendimento (%)		43.0 ± 1.3	42.0 ± 2.5	-

(*) - base seca, média de duas determinações e respetivo desvio padrão.

Comparando o efeito do aumento de escala dos ensaios N8 e N9 (i.e., NA8 e NA9) verifica-se que no ensaio NA8 a biomassa obtida possui um menor teor de lenhina e de cinzas comparativamente ao ensaio N8, enquanto no ensaio NA9 a biomassa obtida tem uma maior fração de lenhina e uma menor fração de cinzas em relação à resultante do ensaio N9. Embora a temperatura e o tempo de duração de ambos os tratamentos (ensaios NA8 e NA9) sejam teoricamente os mesmos (121°C e 2 horas e iguais a N8 e N9), estes foram realizados em momentos diferentes, usando maiores quantidades e uma autoclave maior, com velocidade de aquecimento diferente e sem um nível de controlo de temperatura tão avançado.

Confrontando os resultados (NA8 e NA9) com os obtidos por Zhang e Cai (2008) e Harun e Geok (2016) verifica-se que com o aumento da temperatura e do tempo de reação se consegue obter uma maior deslenhificação da biomassa com menor gasto de reagentes. Por exemplo, Harun e Geok (2016) obteve uma remoção de lenhina de 79.6% utilizando uma solução de NaOH a 12% (m/v) e 55°C durante 1 hora, enquanto no presente trabalho se obtiveram valores superiores, cerca de 87.8 e 90.4%, com uma solução de 0.4 ou 0.5% (correspondente a 120 ou 150 mg_{NaOH}/g_{PA}), respetivamente, a 121°C durante 2 horas. No entanto, foi usada uma relação líquido/sólido de 30 em vez de 20, utilizada por Harun e Geok (2016). Esta relação deve, por isso ser otimizada no futuro, assim como o tempo de reação. No contexto de biorrefinaria integrada é muito mais vantajoso utilizar uma carga de NaOH mais reduzida (minimizando os consumos de reagentes) e uma temperatura mais elevada, pois consegue-se igualmente uma eficaz redução no teor de lenhina e esta pode ser utilizada para a produção de energia, minimizando os consumos energéticos do processo.

Comparando os valores dos rendimentos obtidos com os pré-tratamentos (43 e 42% nos ensaios NA8 e NA9, respetivamente) verifica-se que estes são bastante semelhantes. Fazendo um balanço de massa constata-se que este valor não é muito elevado devido à extensa remoção de lenhina (87.8 e 90.4%) e de cinzas (95.2 e 95.4%), que faz diminuir a massa de material sólido pré-tratado. No ensaio NA8 existe uma perda de 22.1 e 24.7% e no ensaio NA9 de 29.5 e 31.8% de glucanas e xilanas, respetivamente. No ensaio NA9 a perda de açúcares é maior devido à maior severidade do tratamento, utiliza-se uma concentração de NaOH mais elevada.

Na Figura 17 estão presentes os cromatogramas obtidos por HPLC com a composição de açúcares que constitui a palha de arroz original e a resultante dos pré-tratamentos NA8 e NA9.

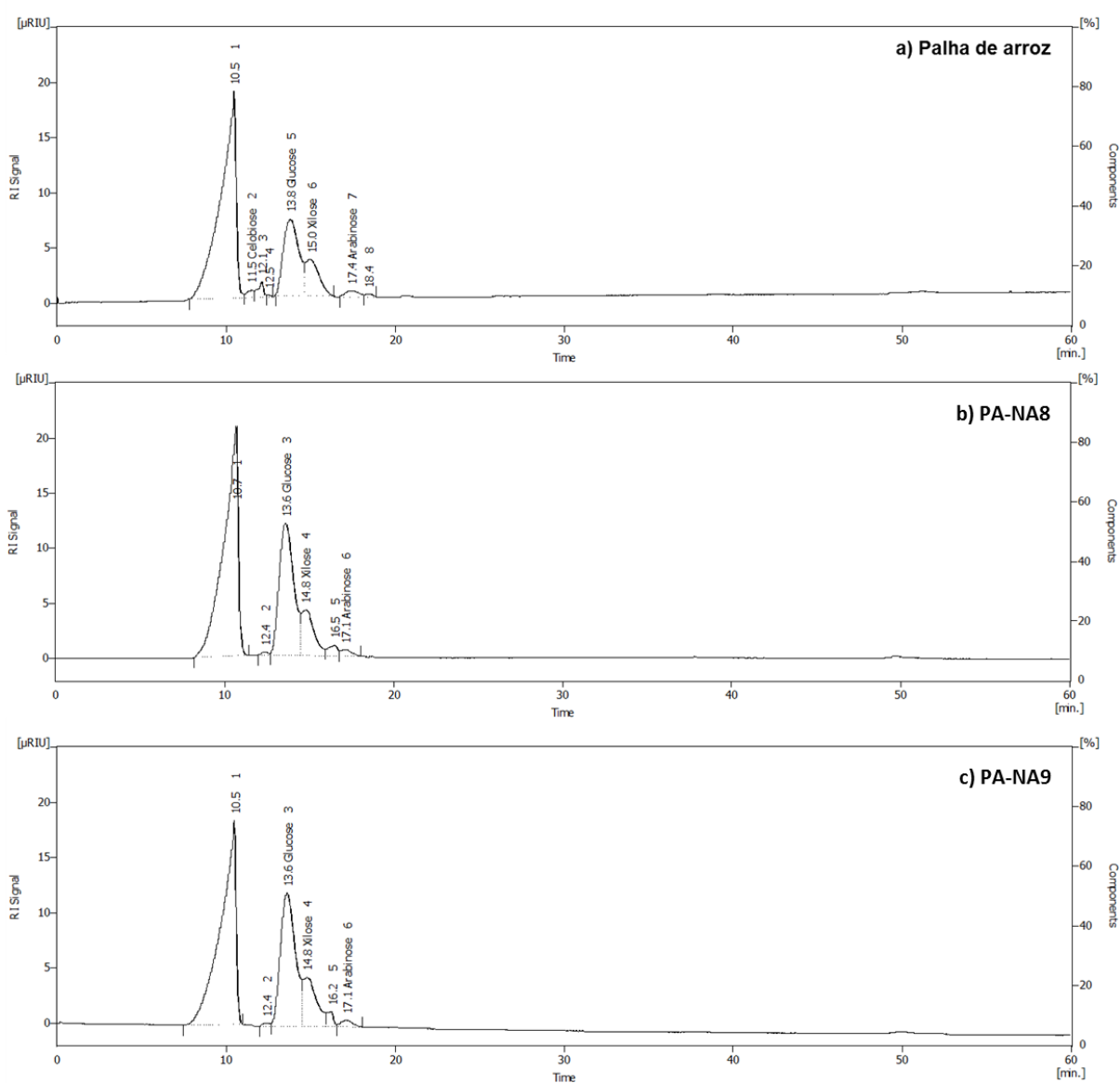


Figura 17. Cromatogramas obtidos por HPLC da palha de arroz **a)** original, **b)** resultante do ensaio NA8 e **c)** resultante do ensaio NA9.

Da análise da Figura 17 a) resultante da caracterização da palha de arroz verifica-se que, para além dos picos identificados: celobiose (11.5 min), glucose (13.8 min), xilose (15.0 min) e arabinose (17.4 min), também existe a deteção de picos que não foram identificados. De forma a verificar se algum destes picos provém do ácido sulfúrico utilizado na hidrólise ácida (etapa utilizada na caracterização química da palha de arroz) fez-se a neutralização de uma solução de H_2SO_4 a 4% com $CaCO_3$ e injetou-se na coluna de HPLC. Constatou-se então que o pico com tempo de retenção de aproximadamente 10.5 min era resultado da presença de compostos provenientes da neutralização do H_2SO_4 . Antes do pico da glucose também foram detetados dois picos (aproximadamente aos 12.1 e aos 12.5 min). Estes provavelmente resultam da presença de oligómeros que, tal como a celobiose, não foram totalmente hidrolisados. Por volta dos 51 min também é visível um pequeno pico que pode ser devido à presença de furfural. Comparando os cromatogramas resultantes do pré-tratamento da palha de arroz (NA8 e NA9, Figura 17 b) e c), respetivamente) com o cromatograma da palha original (Figura 17 a)) verifica-se que existe uma redução acentuada dos picos com tempo de retenção compreendido entre 11.5 e 12.5 min, pelo que se conclui que está a ocorrer a hidrólise quase completa dos oligómeros. Quanto ao pico da glucose é notório que este é mais acentuado na palha de arroz pré-tratada, no entanto com o aumento da severidade do tratamento (NA8 para NA9) ocorre uma ligeira diminuição. O mesmo se verifica em relação ao pico da xilose. Relativamente à arabinose verifica-se que existe um ligeiro aumento em relação à palha de arroz tal qual com ambos os pré-tratamentos. Contudo, este aumento pode ser devido à sobreposição deste pico com o do ácido acético (~16.5 min), o que é mais notório no ensaio NA9, uma vez que existe uma ligeira diminuição do pico da glucose e da xilose e o da arabinose aumenta. Por este motivo no futuro deve ser utilizada uma coluna de HPLC diferente, que consiga uma melhor separação destes compostos.

Na Figura 18 está presente a palha de arroz que foi utilizada nos pré-tratamentos (1.00 - 5.66 mm) e a obtida após os ensaios NA8 e NA9.



Figura 18. a) Palha de arroz tal qual (1.00-5.66 mm); palha de arroz resultante do b) ensaio NA8; c) ensaio NA9.

O aspeto final da palha de arroz obtida pelo ensaio NA8 e NA9 é bastante semelhante, as pequenas diferenças que se observam são devidas ao maior ou menor teor de humidade da amostra que faz com que existam maiores ou menores aglomerados de palha.

Para além da caracterização da matéria sólida pré-tratada também se realizou a análise por HPLC dos licores negros alcalinos, estando os resultados apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Composição dos licores alcalinos resultantes dos pré-tratamentos com aumento de escala.

Ensaio		Licores Negros Alcalinos	
		NA8	NA9
pH		10.81	11.03
Composição (mg/mL)	Celobiose	0.711 ± 0.078	0.678 ± 0.061
	Glucose	1.201 ± 0.070	1.204 ± 0.050
	Xilose	0.517 ± 0.010	0.670 ± 0.056
	Arabinose	0.024 ± 0.004	0.022 ± 0.006

Os licores obtidos foram neutralizados, filtrados e injetados na coluna de HPLC, tendo a lenhina ficado retida no filtro. Analisando os resultados obtidos para os ensaios NA8 e NA9 (Tabela 18) confirma-se a ocorrência da solubilização de alguns hidratos de carbono. Fazendo um balanço de massa aos hidratos de carbono na palha original, no material sólido tratado e no licor residual obtido verifica-se alguma discrepância dado que a fração de hidratos de carbono solubilizada foi de 25.0 e 26.4% (ensaios NA8 e NA9) se esta for contabilizada nos sólidos, enquanto se obteve 14.7 e 15.5% ao usar os valores obtidos na caracterização dos licores. Esta diferença é devida, muito provavelmente, à existência de oligómeros nos licores e à formação de compostos de degradação dos açúcares (que, em quantidades muito pequenas, não são detetados pelo HPLC).

Com o intuito de melhorar a economia do processo no futuro poderia ser realizada a precipitação da lenhina com ácido para que possa ser reaproveitada. Este componente não

consta na Tabela 18 uma vez que ele foi removido aquando da filtração do licor para injeção na coluna de HPLC.

4.5 ENSAIOS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A palha de arroz pré-tratada com NaOH resultante dos ensaios NA8 e NA9 foi submetida a um processo de hidrólise enzimática com o intuito de se realizar posteriormente a fermentação do hidrolisado obtido (processo SHF). Os ensaios foram realizados em balões erlenmeyer de 150 mL utilizando uma carga de 15 FPU/g_{HC} do complexo enzimático Cellic CTec2 e 6.95 g de hidratos de carbono (equivalente a 139 g/L) a 50°C.

Numa primeira fase os ensaios foram realizados em regime descontínuo (NA8' e NA9'). Porém, findas as 72 horas definidas para os ensaios, a palha de arroz ainda não se encontrava liquefeita, pelo que não foi possível retirar nenhuma amostra para análise. Isto ocorre devido à elevada carga de sólidos que dificulta a agitação da mistura de palha de arroz, complexo enzimático e tampão citrato.

De forma a contornar esta dificuldade foram mantidas as condições em que se realizaram os ensaios anteriores, mas optou-se pelo regime de operação em semi-descontínuo (ensaios NA8 e NA9). Neste regime dever-se-ia ter procedido a uma adição inicial de hidratos de carbono de 1.74 g (cerca de 8.7 g/L) e de 0.175 mL da solução de enzima referida anteriormente; quando a mistura se encontrasse liquefeita, dever-se-ia adicionar porções de hidratos de carbono e da solução enzimática em períodos sucessivos até perfazer a massa total definida acima. Contudo, mesmo com a alteração do regime de operação, no ensaio NA8 fez-se apenas a adição de mais uma porção de substrato e enzima, enquanto no ensaio NA9 não se realizou nenhuma adição extra ao longo das 72 horas de hidrólise. Na Figura 19 estão presentes fotografias do início e do final do processo de hidrólise enzimática para os ensaios NA8 e NA9 em semi-descontínuo.

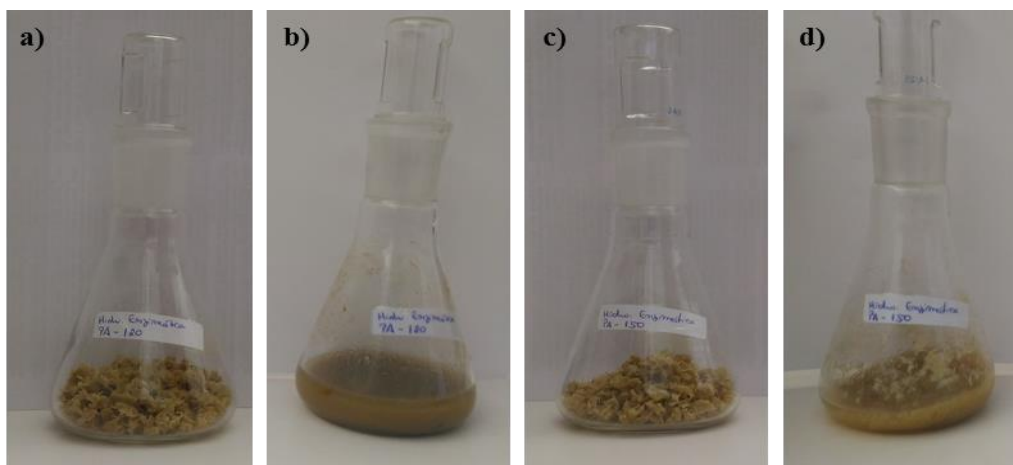


Figura 19. Fotografias dos ensaios no início (a) e c) e no final (b) e d) do processo de hidrólise enzimática com palha de arroz proveniente dos ensaios NA8 e NA9, respetivamente.

Pela análise da Figura 19 verifica-se que ao final das 72 horas do processo de hidrólise enzimática a palha de arroz proveniente do ensaio de pré-tratamento NA9 ainda não se encontrava liquefeita, mesmo sem ter sido efetuada adição de substrato para além do valor da massa inicial. Estes resultados não eram os esperados, até porque a palha de arroz utilizada neste ensaio possuía um teor de lenhina inferior à que foi utilizada no ensaio NA8. No ensaio NA8 foi adicionada uma porção de substrato decorridas aproximadamente 32 horas de hidrólise, estando no final de 72 horas a mistura liquefeita. Para além desta, não foram realizadas mais adições de palha de arroz uma vez que se tinha estipulado uma duração de 72 horas para o ensaio completo.

Na Figura 20 apresenta-se a evolução do rendimento de hidrólise enzimática ao longo do tempo. Este valor foi calculado com base na concentração de equivalentes de glucose obtido pelo método de determinação de açúcares redutores, DNS-modificado.

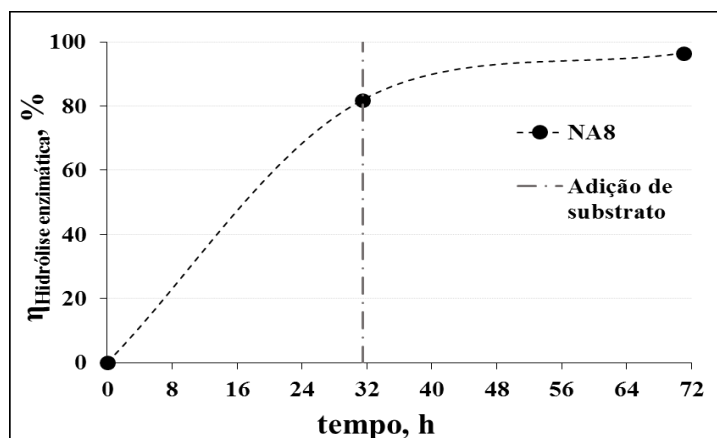


Figura 20. Rendimento de hidrólise enzimática em semi-descontínuo do ensaio NA8 ao longo do tempo.

Pela análise da Figura 20 verifica-se que o rendimento de hidrólise enzimática aumenta ao longo do tempo, sendo este aumento mais acentuado nas primeiras 32 horas. No final das 72 horas obtém-se um rendimento máximo de hidrólise de 96.4% e uma concentração de equivalentes de glucose de 125 g/L.

Uma vez que em 72 horas apenas foram hidrolisados metade dos hidratos de carbono que era previsto, conclui-se que esta via não é a mais viável devido ao elevado tempo requerido. Consequentemente, não foi realizada a etapa subsequente de fermentação do hidrolisado obtido.

4.6 ENSAIOS DE SSF

Os ensaios de hidrólise enzimática e fermentação em simultâneo (SSF) foram realizados em regime semi-descontínuo. A utilização deste regime de operação tem como objetivo maximizar a concentração de etanol produzida, atenuando a dificuldade de agitação inicial da mistura constituída por palha de arroz, enzimas e leveduras. Para além disso, a realização do processo SSF evita a inibição do complexo enzimático pelo excesso de açúcares, uma vez que estes vão sendo convertidos pelas leveduras, e a utilização do regime semi-descontínuo promove uma maior interação entre as enzimas e os hidratos de carbono.

Os ensaios foram realizados a 38°C em balões de 150 mL, utilizando um total de 5.68 g de hidratos de carbono (cerca de 114 g/L), uma carga de 15 FPU/g_{HC} do complexo enzimático Cellic CTec2 e a levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602 em fase exponencial de crescimento. Começou-se por fazer uma adição inicial de enzima de 1.43 g de hidratos de carbono (64 g/L) e quando toda a palha de arroz se encontrava liquefeita foi feita uma nova adição até perfazer a massa total de hidratos de carbono estabelecida. No final de todas as adições de substrato e de enzima o caldo fermentativo tinha um volume de 50 mL.

Ensaio com meio nutricional normal

Nos primeiros ensaios realizados (NA8 e NA9) utilizou-se o meio nutricional mais comum para o crescimento da *S. cerevisiae* (cuja composição está presente na secção 3.3), uma solução constituída por extrato de malte, de levedura e peptona para fornecimento dos nutrientes necessários, sendo a fonte de carbono a glucose proveniente da hidrólise dos hidratos de carbono da palha de arroz pré-tratada. A evolução da concentração de açúcares, produtos e subprodutos ao longo das 72 horas do processo de SSF em regime semi-descontínuo para os

ensaios NA8 e NA9 é mostrada na Figura 21. Os valores apresentados na Figura 21 a) correspondem à média de dois ensaios.

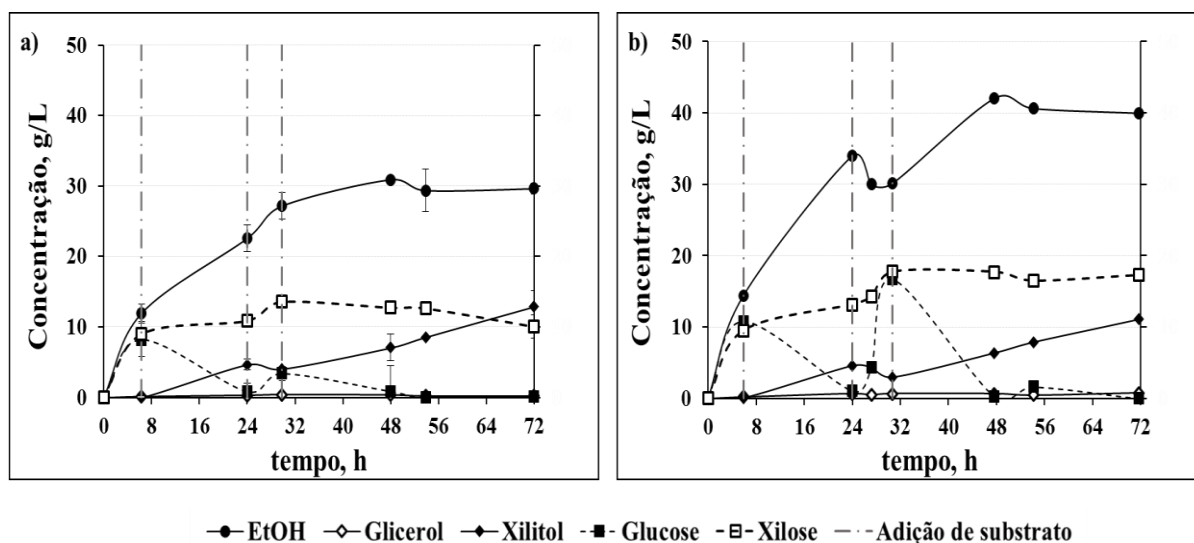


Figura 21. Evolução da concentração de açúcares e de produtos ao longo do tempo de SSF com palha de arroz obtida nos ensaios a) NA8 e b) NA9.

A Figura 21 apresenta a evolução da concentração de etanol (produto principal), de xilitol e de glicerol (subprodutos), de glucose e de xilose (açúcares monoméricos) ao longo de todo o processo de SSF utilizando palha de arroz pré-tratada proveniente dos ensaios NA8 e NA9 (Figura 21 a) e b), respetivamente). Em ambos os ensaios o tempo que a palha de arroz demorou a liquefazer foi o mesmo, tendo por isso as adições de substrato sido realizadas na mesma altura.

Para o ensaio NA8 verifica-se que, decorridas 6.3 horas, a velocidade de fermentação já tinha ultrapassado a velocidade de hidrólise enzimática, possuindo o caldo fermentativo 8.2 g/L de glucose e 12.0 g/L de etanol. Isto pode ser afirmado uma vez que inicialmente não existia etanol no meio e atendendo à estequiometria da reação de fermentação: por cada kg de glucose consumida produzem-se 0.51 kg de etanol. A concentração máxima de etanol é atingida passadas 48 horas do início da fermentação, obtendo-se 30.9 g/L. Posteriormente, a concentração diminuí ligeiramente, mantendo-se relativamente constante, 29.6 g/L entre as 54 e as 72 horas. Analisando a Figura 21 a), verifica-se que este decréscimo na concentração de etanol ocorre quando toda a glucose já foi consumida, isto é, passa a existir escassez de açúcares fermentáveis pela *S. cerevisiae* e muito provavelmente o etanol começou a ser consumido por ela. A variação de xilose no caldo fermentativo é pouco significativa visto este monossacarídeo não ser metabolizado pela levedura, embora na sua presença a xilose possa ser reduzida a xilitol, como já foi comprovado noutros trabalhos (Lebeau et al. 1997; Latif and Rajoka, 2001). Este

é produzido essencialmente quando a concentração de glucose no meio de cultura é pequena, ou seja, em condições extremas de crescimento, e atinge a sua concentração máxima às 72 horas, 12.9 g/L. Para além do xilitol é ainda produzido glicerol, embora em quantidades muito pequenas (no máximo 0.4 g/L).

Pela análise da Figura 21 b) verifica-se igualmente que, passadas 5.8 horas do arranque do processo SSF, a velocidade de fermentação dos açúcares monoméricos já era superior à velocidade de hidrólise, existindo no caldo de fermentação uma concentração de 10.8 g/L de glucose e 14.4 g/L de etanol. Decorridas 48 horas de fermentação foi atingida a concentração máxima de etanol para este ensaio, 42.1 g/L. De igual forma que no ensaio NA8, depois de atingida a concentração máxima deste produto, esta diminui ligeiramente (até 40.0 g/L às 72 horas). Para além de etanol, no final do processo SSF existe xilose (17.3 g/L), glicerol (0.8 g/L) e xilitol (11.1 g/L).

Comparando os resultados obtidos nos dois ensaios realizados (NA8 e NA9) verifica-se que em ambos se atinge uma concentração máxima de etanol às 48 horas, embora no ensaio NA9 a concentração obtida seja cerca de 10 g/L superior. Além disso, verifica-se que a velocidade de hidrólise enzimática é significativamente superior no ensaio NA9; por exemplo, com a adição de substrato às 24 horas existe um aumento de 15.6 g/L na concentração de glucose até às 30 horas, enquanto que no ensaio NA8 este aumento é de apenas 1.7 g/L. Tendo em conta estes resultados é possível concluir que uma pequena variação no teor de lenhina da palha de arroz (6.5 vs 5.3% no ensaio NA8 e NA9, respetivamente) tem uma influência significativa no processo SSF para a produção de etanol, limitando a acumulação intermediária de açúcares.

Com o objetivo de comparar e comprovar a ineficácia do processo SSF na ausência da etapa de pré-tratamento foi realizado um ensaio utilizando palha de arroz tal qual (1.00-5.66 mm - PA). Este foi realizado em descontínuo e utilizando uma massa de hidratos de carbono bastante inferior, cerca de 0.45 g (22 g/L), de forma a evitar o problema de agitação anteriormente referido. As restantes variáveis processuais foram mantidas iguais às dos ensaios NA8 e NA9. Neste ensaio com PA tal qual foi produzido etanol com uma concentração máxima de 1.2 g/L passado 6 horas do início da fermentação (Anexo V). Atingidas as 72 horas essa quantidade de etanol foi, muito provavelmente, consumida na sua totalidade pelas leveduras. Em nenhuma das três amostras retiradas ao longo do tempo foi possível determinar a concentração de glucose. A Figura 22 mostra os cromatogramas obtidos por HPLC com a

composição de açúcares, produto e subprodutos resultantes dos ensaios de SSF com palha de arroz original (PA) e resultante dos pré-tratamentos NA8 e NA9.

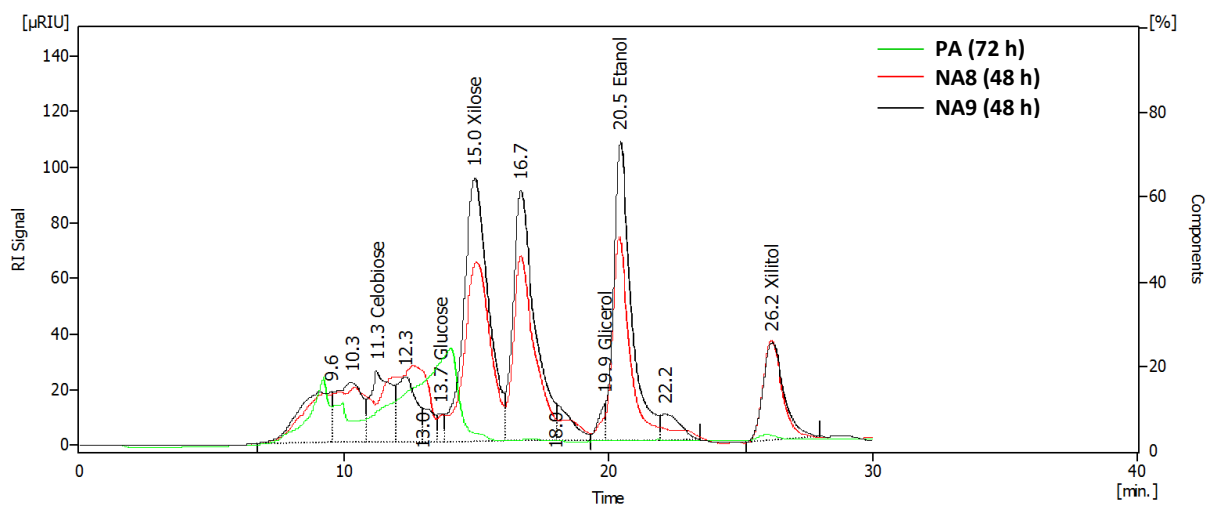


Figura 22. Cromatogramas obtidos por HPLC dos ensaios de SSF com palha de arroz original (PA) e pré-tratada (NA8 e NA9).

Pela análise da Figura 22 verifica-se que ao fim de 72 horas do processo SSF aplicado à palha de arroz tal qual, não existe a presença de etanol no caldo de fermentação. Existe uma quantidade muito pequena de xilose e de xilitol e não é possível determinar a concentração de glucose no meio uma vez que ocorreu a sobreposição de diversos picos (muito provavelmente resultantes da presença de oligómeros). Consequentemente, conclui-se que o processo SSF da palha de arroz original não é viável, sendo fundamental a realização de uma etapa de pré-tratamento para a eficácia deste processo. Comparando o cromatograma obtido para o ensaio NA8 com o do NA9 (em ambos decorridas 48 horas desde o início da fermentação) verifica-se que não ocorreu a hidrólise completa dos oligómeros, existindo um pico identificado como celobiose e mais três picos não identificados que podem ter resultado da presença de compostos semelhantes. Para além destes, existe um pico não identificado aos 16.7, aos 18 e aos 22.2 min. Analisando a Figura 22 constata-se também que findas 48 horas do processo de SSF já não existe glucose no meio (tanto no ensaio NA8 como no NA9), existindo, no entanto, celobiose, o que nos leva a concluir que não ocorreu a hidrólise total dos hidratos de carbono. Em ambos, a produção de xilitol é muito semelhante, mas a concentração de xilose é maior no ensaio NA9, assim como a concentração de etanol. Com base nestes dados conclui-se que, em termos de produção de etanol, o ensaio NA9 é mais vantajoso em relação ao NA8.

Ensaio com meio nutricional alternativo

Com o intuito de diminuir os custos processuais realizou-se um ensaio (em duplicado) de SSF com palha de arroz proveniente do ensaio NA8 com um meio nutricional alternativo, substituindo-se o extrato de malte, de levedura e peptona por sulfato de amônio e de magnésio heptahidratado, hidrogenofosfato de potássio anidro, cloreto de sódio e cloreto de cálcio dihidratado. Todas as outras variáveis processuais foram as mesmas dos ensaios realizados anteriormente (NA8 e NA9). A evolução da concentração de açúcares e produtos ao longo das 72 horas do processo SSF em semi-descontínuo está mostrada na Figura 23.

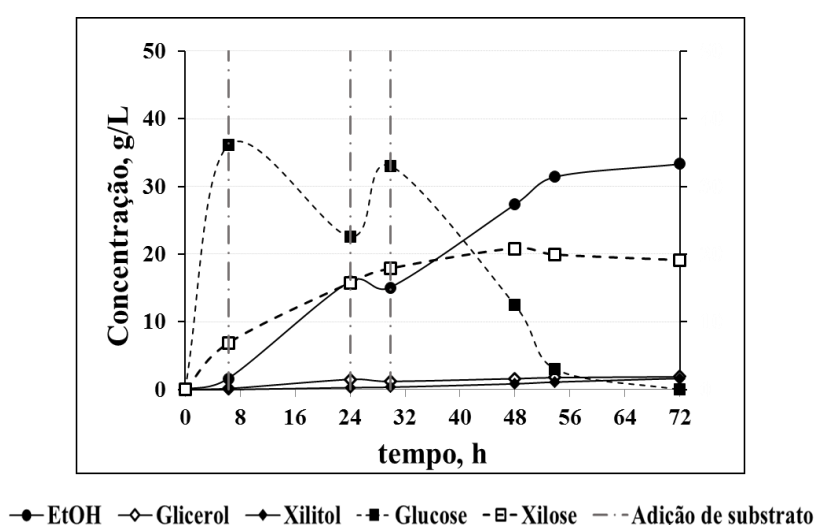


Figura 23. Concentração de açúcares e produtos ao longo do tempo de SSF com meio de nutrientes alternativo e palha de arroz pré-tratada (NA8).

Pela análise da Figura 23 verifica-se que, passadas 6.3 horas do início do processo SSF, a concentração de etanol era de apenas 1.6 g/L e a concentração de glucose 36.1 g/L. Visto inicialmente não existirem açúcares individuais, conclui-se que no início da reação a velocidade de hidrólise enzimática foi superior à velocidade de fermentação. A concentração máxima de etanol foi atingida apenas às 72 horas, cerca de 33.3 g/L. Conclui-se também que, mesmo prolongando o tempo de fermentação, este valor não iria aumentar, uma vez que no meio já não existia glucose. No final do processo SSF existia ainda uma concentração de 19.1 g/L de xilose, 1.6 g/L de xilitol e 1.9 g/L de glicerol.

Comparativamente ao ensaio NA8 (meio nutricional normal) verifica-se que foi produzida uma quantidade ligeiramente superior de etanol (33.3 vs 30.9 g/L em NAA8 e NA8, respetivamente) embora sejam necessárias mais 24 horas até que seja atingido este valor. Pela

comparação da Figura 23 com a Figura 21 a), observa-se que a velocidade de fermentação é visivelmente menor nas primeiras 32 horas, o que é justificado pelo facto do meio nutricional utilizado não ser o preferencial ao crescimento e multiplicação da levedura, levando à ocorrência de uma fase de adaptação da levedura. É notória também a maior concentração de glicerol produzida (1.9 e 0.2 g/L em NAA8 e NA8, respetivamente) e a menor produção de xilitol (1.6 e 12.9 g/L em NAA8 e NA8). A baixa produção de xilitol pode ser explicada pelo facto de este composto apenas ser produzido quando a levedura está num meio com condições nutricionais extremas (neste caso sem glucose, uma vez que esta levedura só metaboliza hexoses) e isto só acontece nas últimas 24 horas do processo. Para além disso, comparando o intervalo de tempo e as concentrações de glucose existentes, conclui-se também, pela comparação com o ensaio NA8, que o meio nutricional tem influência na maior ou menor produção de subprodutos.

Na Tabela 19 está registado o tempo para o qual a concentração de etanol produzida foi máxima, o valor dessa concentração, a produtividade e o rendimento em etanol com base na concentração de hidratos de carbono e com base na glucose disponível. No Anexo V estão apresentadas todas as concentrações de açúcares e produtos determinadas por HPLC ao longo das 72 horas do processo de SSF.

Tabela 19. Resultados de SSF em semi-descontínuo com palha de arroz proveniente do ensaio NA8 e NA9 em meio normal ou alternativo.

Ensaio	NA8	NAA8	NA9	PA
Nutrientes	Normal	Alternativo	Normal	Normal
t_{SSF} (h) ^(*)	48	72	48	6.3
[EtOH] (g/L)	30.9	33.3	42.1	1.2
P (g/(L h))	0.64	0.46	0.88	0.19
Y (EtOH) (%)	48.4	51.2	64.5	9.3
Y' (EtOH) (%)	69.3	74.7	95.3	14.1

(*) - tempo de SSF com o qual se obteve uma concentração máxima de etanol, tendo sido utilizado no calculo dos restantes parâmetros.

Através da análise da Tabela 19 comprova-se desde logo que a realização do processo SSF com palha de arroz sem pré-tratamento prévio é altamente inviável, pois são produzidas apenas 1.2 g/L de etanol com uma produtividade de 0.19 g/(L h). Comparando os resultados obtidos com meio nutricional normal e alternativo (NA8 e NAA8) verifica-se que, com a

utilização do meio alternativo, existe um aumento da concentração máxima de etanol produzida (30.9 vs 33.3 g/L nos ensaios NA8 e NAA8, respectivamente) e do rendimento, sendo este de 48.4 e 51.2% em termos de conversão de hidratos de carbono para o ensaio NA8 e NAA8, respectivamente, e 69.3 e 74.7% em termos de conversão de glucose para os mesmos ensaios. No entanto, existe uma diminuição da produtividade de 0.64 para 0.46 g/(L h), o que é uma desvantagem e pode inviabilizar a utilização do meio nutricional alternativo que seria economicamente uma boa alternativa. Comparando também os resultados obtidos com o ensaio NA8 e NA9 verifica-se, tal como já tinha sido referido anteriormente, que uma pequena diferença no teor de lenhina da palha de arroz pré-tratada tem bastante influência nos resultados do processo SSF. Com uma diferença de 1.2% no teor de lenhina (6.5 e 5.3% na palha de arroz resultante do ensaio NA8 e NA9, respectivamente) obtém-se uma produção de etanol superior em 11.2 g/L, uma produtividade 0.24 g/(L h) superior e um rendimento de produção de etanol 16.1% superior em termos de conversão de hidratos de carbono e 26% em termos de conversão de glucose. Tendo por base estes resultados, conclui-se que o ensaio mais promissor é o NA9 (de entre os que foram realizados), pois com este consegue-se obter a maior concentração de etanol, produtividade e rendimento de conversão de hidratos de carbono e glucose: 42.1 g/L, 0.88 g/(L h), 64.5% e 95.3%, respectivamente. Em ensaios futuros, os parâmetros definidos para a realização deste ensaio devem ser otimizados, como por exemplo, a carga enzimática utilizada, a concentração de hidratos de carbono e a consistência, de forma a aumentar o rendimento de produção de etanol e a produtividade do processo.

5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES DE TRABALHO FUTURO

O presente trabalho teve como objetivo a valorização dos hidratos de carbono de uma matéria-prima abundante na zona do Baixo Mondego, a palha de arroz, para a produção de bioetanol.

Numa primeira fase foi realizado um pré-tratamento alcalino da palha de arroz com o intuito de remover lenhina e deixar a celulose mais acessível. Com os ensaios de pré-tratamento realizados com NaOH verificou-se que a concentração, a temperatura e o tempo são fatores que têm uma grande influência no processo de deslenhificação da biomassa. Destes concluiu-se que o N8 e o N9 (ensaios realizados a 121°C, durante 2 horas e com uma concentração de NaOH de 120 e 150 mg/g_{PA}, respetivamente) são os mais promissores para a realização dos processos seguintes de hidrólise e fermentação. Esta conclusão foi tirada com base em ensaios preliminares de hidrólise enzimática nos quais se verificou que com os tratamentos selecionados se consegue atingir a hidrólise da totalidade dos hidratos de carbono e mais rapidamente do que com a palha de arroz proveniente de outras condições de pré-tratamento. Para além destes ensaios de hidrólise enzimática foi realizado um com palha tal qual, de forma a analisar o efeito do pré-tratamento. Este permitiu que se concluísse que a etapa de pré-tratamento é fundamental para a eficiência deste processo, uma vez que utilizando a palha de arroz original apenas se atinge um rendimento de hidrólise enzimática de 32.4%. Com palha de arroz obtida do ensaio N5 e N6 analisou-se ainda a influência da moagem prévia da biomassa pré-tratada (0.841 mm em vez de 1.00-5.66 mm) na eficiência do processo de hidrólise enzimática. Com estes resultados constatou-se que as diferenças não eram significativas, não compensando assim os gastos energéticos associados ao processo de moagem.

Na tentativa de eliminar as frações hemicelulósicas ligadas à lenhina efetuou-se um pré-tratamento com HCl combinado com NaOH, tendo sido estudada a variação do tempo de pré-tratamento. Comparativamente aos resultados obtidos apenas com NaOH concluiu-se que o tratamento combinado não é viável uma vez que existe um maior consumo de energia e de reagentes e que o teor de lenhina do material sólido obtido foi superior.

Numa segunda fase, foi efetuado um aumento de escala do ensaio N8 e N9, tendo-se confirmado que a percentagem de remoção de lenhina era maior, tal como era esperado, no ensaio NA9 (90.4 vs 87.8% em NA9 e NA8, respetivamente). No entanto, uma vez que estes ensaios foram realizados em momentos diferentes e numa autoclave maior sem um nível de controlo da temperatura tão avançado quanto o da autoclave utilizada nos ensaios em pequena

escala, verificou-se que a variação dos resultados do ensaio N8 para NA8 e N9 para NA9 não foram concordantes.

Findo o pré-tratamento, avaliou-se de que forma o regime de operação (descontínuo ou semi-descontínuo) influenciava o processo de hidrólise enzimática. Destes ensaios concluiu-se que, para a massa de hidratos de carbono definida (6.95 g), o processo em descontínuo era inviável, uma vez que passadas 72 horas o material sólido (PA tratada) não se encontrava liquefeito, apresentando um aspeto bastante semelhante ao do início do processo. Para a hidrólise enzimática em semi-descontínuo estabeleceu-se uma massa inicial de 1.74 g em hidratos de carbono. Após as 72 horas estabelecidas para o processo, a palha de arroz ainda não se encontrava liquefeita no caso do ensaio NA9. No ensaio NA8 foi feita uma segunda adição de substrato aproximadamente às 32 horas, mas esta apenas liquefez às 72 horas, pelo que ficaram em falta duas adições de substrato por forma a atingir a massa total que se pretendia hidrolisar. Consequentemente, concluiu-se que o processo de hidrólise enzimática não é viável em nenhum dos regimes de operação estudados, muito provavelmente devido às dificuldades de agitação que dificultam a interação entre a enzima e o substrato.

Avaliou-se então a viabilidade do processo de SSF em semi-descontínuo para a produção de etanol. Este foi realizado com palha de arroz tal qual e resultante do pré-tratamento NA8 e NA9. No primeiro concluiu-se, como era esperado, que a utilização deste tipo de biomassa sem pré-tratamento prévio era inviável, tendo sido produzido 1.2 g/L de etanol em 72 horas, com uma produtividade de 0.19 g/(L h). Com a palha de arroz pré-tratada produziu-se, no final de 48 horas, 30.9 e 42.1 g/L de etanol nos ensaios NA8 e NA9, respetivamente. Estes resultados são bastante satisfatórios nesta primeira abordagem à utilização da palha de arroz proveniente do Baixo Mondego para a produção de bioetanol, tendo-se obtido uma produtividade de 0.64 e 0.88 g/(L h) e um rendimento de conversão de glucose em etanol de 69.3 e 95.3% nos ensaios NA8 e NA9, respetivamente. Com estes resultados conclui-se ainda que uma pequena variação no teor de lenhina da palha de arroz (6.53 vs 5.27 nos ensaios NA8 e NA9, respetivamente) tem uma influência significativa na quantidade de etanol produzida.

Com o intuito de reduzir os custos do processo SSF avaliou-se a viabilidade da utilização de um meio nutricional alternativo de mais baixo custo. Neste ensaio (NAA8) utilizou-se palha de arroz proveniente do ensaio NA8 e no final de 72 horas deste processo conseguiu-se a produção de mais 2.4 g/L de etanol. No entanto, existe um decréscimo da produtividade de 0.64 para 0.46 g/(L h) para o ensaio NA8 e NAA8, respetivamente, pelo que se conclui que a utilização do meio nutricional alternativo tem de ser estudada mais detalhadamente, no sentido

de entender se a redução de custo é suficientemente compensatória em relação à diminuição da produtividade.

O trabalho experimental realizado foi de encontro aos objetivos inicialmente propostos, tendo-se conseguido uma produção de bioetanol com concentração e produtividade interessantes, a partir de palha de arroz. No entanto, em trabalhos futuros existem várias variáveis que devem ser otimizadas no futuro, no sentido de reduzir os custos processuais e aumentar a concentração e a produtividade de produção de etanol. Sugere-se então que seja analisada a viabilidade de se utilizar uma base mais barata como o Ca(OH)_2 no pré-tratamento, em vez de se usar NaOH. Para além disso, é necessário otimizar o tempo de pré-tratamento, a temperatura e a relação líquido/sólido utilizada. No que diz respeito ao processo SSF, deve ser estudada a viabilidade de utilizar o meio nutricional alternativo com a palha de arroz proveniente do ensaio NA9, assim como o aumento da carga de hidratos de carbono e da consistência do meio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, A., Mathew, A. K., Sindhu, R., Pandey, A., e Binod, P. (2016). Potential of rice straw for bio-refining: An overview. *Bioresource Technology*, 215, 29–36.
- AIE – Agencia Internacional de Energia (2010) Sustainable production of second-generation biofuels. OECD/IEA, Paris.
- Alvira, P., Ballesteros, M., e Negro, M. J. (2010). Bioresource Technology Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis : A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851–4861.
- Amnuaycheewa, P., Hengaroonprasan, R., Rattanaporn, K., Kirdponpattara, S., Cheenkachorn, K., e Sriariyanun, M. (2016). Enhancing enzymatic hydrolysis and biogas production from rice straw by pretreatment with organic acids. *Industrial Crops and Products*, 87, 247–254.
- Asghar, U., Irfan, M., Iram, M., Huma, Z., Nelofer, R., Nadeem, M. & Syed, Q. (2015). Effect of alkaline pretreatment on delignification of wheat straw. *Natural Product Research*, 29, 125-131.
- ATCC - *American Type Culture Collection* - ATCC Medium: 200 YM Medium, <https://www.lgcstandards-atcc.org/>, consultado em 2/06/2017
- Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M. & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production : A review. *Biochemistry and Biophysics Reports* 10, 52–61.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52, 858-875.

- Barana, D., Salanti, A., Orlandi, M., Ali, D. S. & Zoia, L. (2016). Biorefinery process for the simultaneous recovery of lignin, hemicelluloses, cellulose nanocrystals and silica from rice husk and *Arundo donax*. *Industrial Crops and Products*, 86, 31–39
- Bertaud, F., e Holmbom, B. (2004). Chemical composition of earlywood and latewood in Norway spruce heartwood , sapwood and transition zone wood. *Wood Sci Technol*, 38, 245–256.
- Binod, P., Sindhu, R., Singhanía, R. R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R. K. & Pandey, A. (2010). Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresource Technology*, 101(13), 4767–4774.
- Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J., Welton, T. (2013). Descontruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*, 15 (3), 537-848.
- Brown, L, Torget, R. (1996). Laboaratory Analytical Procedure LAP-009: Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. NREL-Ethanol Project.
- Buranov, A. U. & Mazza, G. (2008). Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial crops and products*, 28, 237–259.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (2001). *The Fungi*. Academic Press.
- Carvalho, M. G.V.S. (1999). “Efeito das Variáveis de Cozimento nas Características Químicas de Pastas Kraft de *Eucalyptus globulus*.” Tese de Doutorado, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Castro, R.C.A., Fonseca, B.G., Santos, H.T.L., Ferreira, I.S., Mussatto, S.I., Roberto, I.C. (2016). Alkaline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicellulose and cellulose. *Industrial Crops and Products*. (disponível online, DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.08.053)
- Chandel, A. K., Es, C., Rudravaram, R., Narasu, M. L., Rao, V., & Ravindra, P. (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an

appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology* 2, 14–32.

Chang, K.-L., Thitikorn-amorn, J., Hsieh, J.-F., Ou, B.-M., Chen, S.-H., Ratanakhanokchai, K., Huang, P.-J., Chen, S.-T. (2011). Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, 35:90-95.

Chang, K., Chen, X., Han, Y., Wang, X., Potprommanee, L., Ning, X., ... Lin, Y. (2016). Synergistic effects of surfactant-assisted ionic liquid pretreatment rice straw. *Bioresource Technology*, 214, 371–375.

Chen, W.H., Pen, B.-L., Yu, C.-T., Hwang, W.-S. (2011a). Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 102, 2916-2924.

Chen, W.-H., Xu, Y.-Y., Hwang, W.-S., Wang, J.-B. (2011b). Pretreatment of rice straw using an extrusion/extraction process at bench-scale for producing cellulosic ethanol. *Bioresource Technology*, 102, 10451-10458.

Chen, H. (2014). *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. Springer Netherlands, 1st Edition. p-25-69.

Choudhary, J., Singh, S., & Nain, L. (2016). Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, 82–92.

Chundawat, S.P.S., Vismeh, R., Sharma, L.N., Humpala, J.F., da Costa Sousa, L., Chambliss, C.K., Jones, A.D., Balan, V. e Dale, B.E. (2010). Multifaceted characterization of cell wall decomposition products formed during ammonia fiber expansion (AFEX) and dilute acid based pretreatments. *Bioresource Technology* 101, 8429-8438.

Diretiva n.º 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Abril de 2009, relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis que altera e

subsequentemente revoga as Diretivas 2001/77/CE e 2003/30/CE. Jornal Oficial da União Europeia L 140 de 5/6/2009, p. 16-62.

EBTP - European Biofuels - Technology Platform. Flagship (first-of-a-kind commercial) and demonstration cellulosic ethanol facilities, <http://www.biofuelstp.eu/>, consultado em 24/04/2017

Eby, M., Zickfeld, K., & Montenegro, A. (2009). Lifetime of Anthropogenic Climate Change : Millennial Time Scales of Potential CO₂ and Surface Temperature Perturbations. *Journal of climate*, 22, 2501–2511.

EIA-U.S. Energy Information Administration, <https://www.eia.gov>, consultado em 7/06/2017

Eckert, C.T., Frigo, E.P., Bastos, R.K., Junior, A.M., Mari, A.G., & Cabral, A.C. (2013). Biomassa Residual Vegetal. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, 4, 32-44.

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

ENMC-Entidade Nacional para o Mercado de Combustíveis, <http://www.enmc.pt>, consultado em 16/06/2017

Fang, H., Deng, J. & Zhang, X. (2011). Continuous steam explosion of wheat straw by high pressure mechanical refining system to produce sugars for bioconversion. *Bioresources* 6(4), 4468-4480.

FAO. (2008). The state of food and agriculture. *Food and Agriculture Organization of United States*. (disponível online, <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0100e/i0100e.pdf>)

FAO. (2014). The state of food and agriculture. *Food and Agriculture Organization of United States*. (disponível online, <http://www.fao.org/3/a-i4040e.pdf>)

- Fengel, D. & Wegener, G. (1984). *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*, Walter de Gruyter, Berlin.
- Floch, A. L., Jourdes, M. & Teissedre, P. (2015). Polysaccharides and lignin from oak wood used in cooperage: Composition, interest, assays: A review. *Carbohydrate Research* 417, 94–102
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulases activities. *Pure & Applied Chemistry* 59, 257-268
- Gu, Y., Zhang, Y., e Zhou, X. (2015). Effect of Ca(OH)₂ pretreatment on extruded rice straw anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 196, 116–122.
- Gupta R. B., Demirbas A. (2010). *Gasoline, diesel, and ethanol biofuels from grasses and plants*. Cambridge University Press, New York.
- Hamelinck, C., Faaij, A., Å, C. N. H., & Hooijdonk, G. Van. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass : Techno-economic performance in short- , middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28, 384–410.
- Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, a, Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). NREL/TP-510-42620-Preparation of Samples for Compositional Analysis: Laboratory Analytical Procedure (LAP). *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*.
- Harun, S., & Geok, S. K. (2016). Effect of Sodium Hydroxide Pretreatment on Rice Straw Composition. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(21). (disponível online, DOI: 10.17485/ijst/2016/v9i21/95245)
- Hou, X.-D., Smith, T.J., Li, N., Zong M.-H. (2012). Novel renewable ionic liquids as highly effective solvents for pretreatment of rice straw biomass by selective removal of lignin. *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 2848-2493.

IFPEN-IFP Energies nouvelles. Producing fuels from biomass, <http://www.ifpennergiesnouvelles.com>, consultado em 15/06/2017

INE - Instituto Nacional de Estatística. “Estatísticas Agrícolas - 2014”, <https://www.ine.pt/>, consultado em 17/04/2017

ITeCons - Instituto de Investigação e Desenvolvimento Tecnológico em Ciências da Construção. “Identificação de oportunidades de melhoria na ecoeficiência da atividade agrícola do Baixo Mondego”, <http://itecons.uc.pt>, consultado em 24/04/2017

Jorgensen H., Kristensen J. B., Felby C. (2007) Enzymatic conversion of lignocellulosic into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 1, 119-134.

Jung, S.-J., Kim, S.-H., Chung, I.-M. (2015). Comparison of lignin, cellulose, and hemicellulose contents for biofuels utilization among 4 types of lignocellulosic crops. *Biomass and Bioenergy*, 83, 322-327.

Kim, T. H. (2004). Bioconversion of Lignocellulosic Material Into Ethanol: Pretreatment, Enzymatic Hydrolysis, and Ethanol Fermentation. PhD thesis, Auburn University, Auburn, USA.

Kumar, R., e Wyman, C. E. (2009). Effects of Cellulase and Xylanase Enzymes on the Deconstruction of Solids from Pretreatment of Poplar by Leading Technologies. *Wiley InterScience*.

Kumar, A. K., e Sharma, S. (2017). Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 7.

Latif, F., Rajoka, M.I. (2001). Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. *Bioresource Technology*, 77, 57-63.

- Lebeau, T., Jouenne, T., Junter, G.-A. (1997). Fermentation of D-xylose by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, *19*, 615-618.
- Lindner, A. & Wegener, G. (1988). Characterization of lignins from organosolv pulping according to the organocell process. 1. Elemental analysis, nonlignin portions and functional-groups. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, *8*(3), 323-340.
- LNEG - Laboratório Nacional de Energia e Geologia. (2011). Relatório de atividades. (disponível em, <http://www.lneg.pt/download/6162/LNEG%20RA%202011.pdf>)
- Mendes, C.V.T., Baptista, C.M.S.G., Rocha, J.M.S., Carvalho, M.G.V.S. (2009). Prehydrolysis of *Eucalyptus globulus* Labill. Hemicelluloses prior to pulping and fermentation of the hydrolysates with the yeast *Pichia stipitis*. *Holzforschung*, *63*, 737-743.
- Mendes, C.V.T., Rocha, J.M.S., Soares, B.I.G., Sousa, G.D.A., Carvalho, M.G.V.S. (2011). Extraction of hemicelluloses prior to kraft cooking: A step for an integrated biorefinery in the pulp mill. *O Papel*, *72*(9), 79-83.
- Mendes, C.V.T., Cruz, C.H.G., Reis, D.F.N., Carvalho, M.G.V.S., Rocha, J.M.S. (2016). Integrated bioconversion of pulp and paper primary sludge to second generation bioethanol using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602. *Bioresource Technology* *220*: 161-167.
- Menon, V., e Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose : Biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, *38*(4), 522–550.
- Moniz, P., Lino, J., Duarte, L.C., Roseiro, L.B., Boeriu, C.G., Pereira, H., Carvalheiro, F. (2015). Fractionation of hemicelluloses and lignin from rice straw by combining autohydrolysis and optimised mild organosolv delignification. *BioResources*, *10*, 2626-2641.
- Muradin, M., e Foltynowicz, Z. (2014). Potential for Producing Biogas from Agricultural Waste

in Rural Plants in Poland. *Sustainability*, 6, 5065–5074.

Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2002). Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. *Biotecnologia, Ciência E Desenvolvimento*, 28(January), 34–39.

Nasri-Nasrabadi, B., Behzad, T. & Bagheri, R. (2014). Extraction and Characterization of Rice Straw Cellulose Nanofibers by an Optimized Chemomechanical Method. *Journal of Applied Polymer Science*, 131, 40063.

Nogueira, M. F. M.; Rendeiro, G. (2008). Caracterização Energética da Biomassa Vegetal. Barreto, Eduardo José Fagundes (Coord). Combustão e Gaseificação da Biomassa Sólida: Soluções Energéticas para a Amazônia. Brasília: Ministério de Minas e Energia. p. 52-63.

OECD/FAO. (2015). “Biofuels”, in OECD-FAO Agricultural Outlook 2015, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-13-en

Ogeda, T. L. e Petri, D. F. S. (2010). Hidrólise enzimática da biomassa. *Química Nova*, 33(7), 1549-1558.

Paulová, L., Patáková, P., Branská, B., Rychtera, M., & Melzoch, K. (2015). Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnology Advances*, 33, 1091-1107.

Portal Energia: Tipos de Biocombustíveis, <https://www.portal-energia.com>, consultado em 17/06/2017

Remli, N. A. M., Shah, U. K. M., Mohamad, R. & Abd-Aziz, S. (2014). Effects of Chemical and Thermal Pretreatments on the Enzymatic Saccharification of Rice Straw for Sugars Production. *BioResources*, 9(1), 510–522.

Rodriguez, A., Moral, A., Serrano, L., Labidi, J., & Jimenez, L. (2008). Rice straw pulp obtained by using various methods. *Bioresource Technology*, 99(8), 2881–2886.

- Sagbini, M., Hoekstra, D., & Gautsch, J. (2001). Media Formulations for Various Two-Hybrid Systems. In P. N. MacDonald, Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols. Springer. Vol. 177, pp. 15-39.
- Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *Biotech*, 5(4), 337–353.
- Salehi, S.M.A., Karimi, K., Behzad, T., Poornejad, N. (2012). Efficient conversion of rice straw to bioethanol using sodium carbonate pretreatment. *Energy & Fuels*, 26, 7354-7361.
- Santos, F. A, Queiróz, J. H. De, Colodette, J. L., Fernandes, S. a, & Guimarães, V. M. (2012). Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quimica Nova*, 35(5), 1004–1010.
- Santos, Q., Doughari, J. H., Nybom, S., Ojumu, T. V, Amodu, O. S., Tasheva, K., & Petre, M. (2013). Environmental biotechnology - new approaches and prospective applications. InTech DTP team, edited by Marian Petre. p. 73-87. (disponível online, <http://dx.doi.org/10.5772/56068>)
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., & Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37(1), 19–27.
- Singh, R., Srivastava, M., & Shukla, A. (2016). Environmental sustainability of bioethanol production from rice straw in India: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 202–216.
- Sjöström, E. (1993). "Wood Chemistry - Fundamentals and Applications." San Diego: Academic Press, 2nd Edition.
- Sluiter, A, Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., ... Nrel, J. W. (2008a). NREL/TP-510-42621-Determination of total solids in biomass and total dissolved solids

in liquid process samples: Laboratory Analytical Procedure (LAP). *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008b). NREL/TP-510-42622-Determination of ash in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*.

Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008c). NREL/TP-510-42619-Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2012d). NREL/TP-510-42618-Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*.

Smook, G. (2002). Handbook for pulp & paper technologist, Angus Wild Publication Ins.

SOSTRICE. (2014). Project, <http://www.sostrice.eu/en/project/>, consultado em 24/04/2017

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

Swain, M. R., & Krishnan, C. (2015). Improved conversion of rice straw to ethanol and xylitol by combination of moderate temperature ammonia pretreatment and sequential fermentation using *Candida tropicalis*. *Industrial Crops & Products*, 77, 1039–1046.

Walker, G.M. (2010). Bioethanol: Science and technology of fuel alcohol. 1st edition, p. 63-66. (disponível online, <http://bookboon.com>)

Watanabe, I., Miyata, N., Ando, A., Shiroma, R., Tokuyasu, K., & Nakamura, T. (2012). Ethanol production by repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of alkali-treated rice straw using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells.

Bioresource Technology, 123, 695–698.

Wood, I. P., Cao, H.-G., Tran, L., Cook, N., Ryden, P., Wilson, D. R., Moates, G. K., Collins, S. R. A., Elliston, A. & Waldron, K. W. (2016). Comparison of saccharification and fermentation of steam exploded rice straw and rice husk. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 193.

Zhang, Q., e Cai, W. (2008). Enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated rice straw by *Trichoderma reesei* ZM4-F3. *Biomass and Bioenergy*, 32,1130–1135.

Zhang, Y., Chen, X., Gu, Y., & Zhou, X. (2015). A physicochemical method for increasing methane production from rice straw: Extrusion combined with alkali pretreatment. *Applied Energy* 160, 39–48.

Zhu, S., Huang, W., Huang, W., Wang, K., Chen, Q., Wu, Y. (2015). Pretreatment of rice straw for ethanol production by a two-step process using dilute sulfuric acid and sulfomethylation reagent. *Applied Energy*, 154, 190-196.

ANEXOS

ANEXO I – CARATERIZAÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE ARROZ

De forma a caracterizar quimicamente a amostra de biomassa lenhocelulósica foi necessário, em primeiro lugar, preparar a amostra e determinar alguns parâmetros, tais como: o teor de sólidos e de cinzas, os extratáveis, a lenhina total e o teor de hidratos de carbono. As metodologias utilizadas para a determinação desses parâmetros estão descritas no presente anexo, tendo sido baseadas em protocolos do NREL (Laboratório Nacional de Energia Renovável, EUA).

A. Preparação das amostras (Hames et al., 2008)

1. Moer as amostras de palha de arroz (moinho Retsch - Modelo 5657).
2. Peneirar as amostras com quatro peneiras de porosidade 0.210, 0.841, 1.00 e 5.66 mm.
3. Guardar as amostras em sacos por tamanhos. Num guardar a biomassa com tamanho inferior a 0.210 mm, noutra a que passa na peneira de 0.841 mm e é retida na de 0.210 mm, noutra a biomassa com tamanho entre 0.841 e 1.00 mm e noutra a biomassa com tamanho compreendido entre 1.00 e 5.66 mm.

B. Determinação do teor de sólidos (Sluiter et al., 2008a)

1. Pesar, com precisão de 0.1 mg, 0.5 a 2 g de amostra de palha de arroz com tamanho compreendido entre 0.210 e 0.841 mm, dentro de uma caixa de vidro tarada.
2. Colocar a caixa com a amostra na estufa a 105 ± 3 °C durante cerca de 12 horas (geralmente, durante a noite).
3. Retirar a caixa da estufa, colocá-las num exsiccador durante 20 minutos e pesá-la. Remover a amostra seca da caixa e pesá-la.
4. A percentagem de sólidos é dada pela razão entre a massa de palha de arroz seca a 105°C (m_{PAS}) e a palha de arroz húmida (m_{PAH}) a multiplicar por 100, equação 12.

$$\text{teor de sólidos (\%)} = \frac{m_{PAS} \text{ (g)}}{m_{PAH} \text{ (g)}} \times 100 \quad (12)$$

5. Efetuar este procedimento em duplicado e fazer a média dos teores de sólidos obtidos.

C. Determinação do teor de cinzas (Sluiter et al., 2008b)

1. Colocar na mufla um cadinho de porcelana devidamente identificado, a 575 ± 25 °C durante o tempo necessário para não existir variação da sua massa (mínimo 4 horas).
2. Retirar o cadinho da mufla para um exsiccador e aguardar 20 minutos até que este arrefeça.
3. Pesá-lo com uma precisão de 0.1 mg.
4. Pesá-lo, dentro do cadinho, 0.5 a 0.2 g de amostra de palha de arroz, com tamanho inferior a 0.210 mm.
5. Colocar o cadinho com a amostra na mufla e programar uma rampa de temperatura. Rampa desde a temperatura ambiente até 105 °C e manter nesta temperatura durante 12 minutos. Aumentar gradualmente a temperatura durante 15 minutos até atingir 250 °C e mantê-la por 30 minutos. Aumentar novamente a temperatura durante 20 minutos até atingir 575 °C e permanecer a esta temperatura por 10 horas. Permitir que a temperatura desça até aos 105 °C até que as amostras sejam retiradas da mufla.
6. Remover o cadinho da mufla, coloca-lo num exsiccador durante 20 minutos e pesá-lo.
7. A percentagem de cinzas é dada pela razão entre a massa de palha de arroz incinerada (m_{PAI}) e a palha de arroz seca (m_{PAS}) a multiplicar por 100, equação 13.

$$\text{teor de cinzas (\%)} = \frac{m_{PAI} \text{ (g)}}{m_{PAS} \text{ (g)}} \times 100 \quad (13)$$

8. Efetuar este procedimento em duplicado e fazer a média dos teores de cinzas obtidos.

D. Determinação dos extrativos (Sluiter et al., 2008c)

1. Pesá-lo cerca de 10 g, com precisão de 0.1 mg, de amostra de palha de arroz, com tamanho compreendido entre 0.210 e 0.841 mm, num cartucho de extração.
2. Colocar algumas esferas de vidro dentro de um balão de vidro, de forma a evitar ebulições muito bruscas, e colocar também 190 ± 5 mL de etanol 95 % (v/v).
3. Colocar o balão na manta de aquecimento, ajustá-lo ao Soxhlet, colocar o cartucho de extração dentro deste aparelho e ligar o Soxhlet ao condensador.
4. Depois de ocorrer o primeiro ciclo de extração, verificar se ocorrem cerca de quatro a cinco ciclos por hora durante cerca de quatro horas. Caso isto não aconteça, alterar a temperatura da manta.

5. Colocar na estufa a 105 ± 3 °C caixas de vidro com tampa a secar durante cerca de 4 horas. No final, coloca-las num exsiccador, aguardar vinte minutos e pesá-las.
6. Terminada a extração, fazer a destilação do etanol contido no balão até este ficar com cerca de 25 mL, transferir o seu conteúdo para cada caixa e levar à estufa a 105 ± 3 °C durante cerca de 6 horas. Deixar arrefecer num exsiccador durante 20 minutos e pesar o que se obteve para quantificar os extrativos removidos com etanol.
7. A percentagem de extrativos é determinada pela razão entre a massa de extrativos removida com etanol ($m_{\text{Ext_EtOH}}$) e a palha de arroz seca (m_{PAS}) a multiplicar por 100, equação 14.

$$\text{extrativos (\%)} = \frac{m_{\text{Ext_EtOH}} \text{ (g)}}{m_{\text{PAS}} \text{ (g)}} \times 100 \quad (14)$$

8. Lavar a palha de arroz contida no cartucho com etanol e colocar a secar a 45°C durante cerca de 16h.
9. Efetuar este procedimento em duplicado e fazer a média dos extrativos obtidos.

E. Determinação dos hidratos de carbono e da lenhina (Sluiter et al, 2012d)

Hidrólise ácida

1. Inserir um cadinho filtrante de vidro na estufa a 105 ± 3 °C durante cerca de 4 horas.
2. Pesar, aproximação de 0.1 mg, 3.00 mg de palha de arroz pré-extraída num tubo de centrifuga.
3. Adicionar 3.00 ± 0.001 mL de ácido sulfúrico a 72% (m/m) no tubo e misturar. Colocar o tubo num banho de água a 30 ± 3 °C durante 60 minutos e agitar a cada 5 a 10 minutos, sem retirar a amostra do banho.
4. Retirar o tubo do banho e verter o seu conteúdo para um frasco autoclavável, onde se dilui o ácido sulfúrico para 4% (m/m) pela adição de 84.00 ± 0.04 g de água ultrapura.
5. Colocar o frasco na autoclave a 121 °C durante uma hora.
6. Retirar o cadinho filtrante da estufa, colocá-lo num exsiccador durante 20 minutos e pesá-lo.
7. Retirar o frasco da autoclave e deixar arrefecer. Filtrar o seu conteúdo a vácuo usando o cadinho filtrante previamente seco. Armazenar o filtrado recolhido num frasco.

8. Lavar com 50 mL de água destilada quente (diminui o tempo de filtração) o frasco retirado da autoclave, de forma a remover todos os sólidos presentes, e filtrar através do cadinho.

Determinação da lenhina insolúvel

9. Colocar o cadinho filtrante de vidro com os resíduos na estufa a 105 ± 3 °C durante cerca de 12 horas (geralmente, durante a noite).
10. Retirar o cadinho da estufa, coloca-lo num exsiccador durante 20 minutos e pesá-lo.
11. A percentagem de lenhina insolúvel é determinada pela razão entre a massa de lenhina insolúvel ($m_{\text{Lenhina_ins}}$) e a palha de arroz seca (m_{PAS}) a multiplicar por 100. No entanto, para termos a percentagem de lenhina solúvel em relação à amostra original é necessário ter em conta a percentagem de extrativos que se removeram. Este valor é dado pela equação 15. A massa de lenhina insolúvel é dada pela equação 16.

$$\text{lenhina insolúvel (\%)} = \frac{m_{\text{Lenhina_ins}} \text{ (g)}}{m_{\text{PAS}} \text{ (g)}} \times (100 - \text{extrativos (\%)}) \quad (15)$$

$$m_{\text{Lenhina_ins}} = m_{\text{cadinho de vidro+filtro+lenhina ins}} - m_{\text{cadinho de vidro+filtro}} \quad (16)$$

12. Efetuar este procedimento em duplicado e fazer a média da lenhina insolúvel obtida.

Determinação da lenhina solúvel

13. Colocar 0.5 mL do filtrado recolhido no passo 7 num tubo de ensaio e adicionar 4.5 mL de água ultrapura, agitando de seguida (diluição 1:10).
14. Noutro tubo de ensaio colocar 0.5 mL de ácido sulfúrico a 4% e adicionar 4.5 mL de água ultrapura (branco).
15. Utilizando uma célula de quartzo, medir a absorvância da amostra contida em cada tudo no espectrofotómetro a 205 nm. Caso a absorvância não se encontre entre 0.2 e 0.8, limites da lei de *Beer Lambert*, alterar o fator de diluição (FD) até conseguir um valor dentro deste intervalo. Esta medição deve ser feita no máximo até 6 horas após a realização da hidrólise ácida.
16. A percentagem de lenhina solúvel é determinada pela relação entre a absorvância a 205 nm (Abs), o fator de diluição utilizado, o volume de hidrolisado ($V_{\text{Hidrolisado}}=87$ mL), a absortividade, ϵ , da lenhina (110 L/(g cm)), o comprimento da célula ($b=1$

cm), a massa de palha de arroz seca e ainda é necessário contabilizar a quantidade de extrativos que foi removida em relação à amostra original. Esta percentagem é calculada com base na equação 17.

$$\text{lenhina solúvel (\%)} = \frac{\text{Abs} \times \text{FD} \times V_{\text{Hidrolisado}}(\text{L})}{\varepsilon \left(\frac{\text{L}}{\text{g cm}} \right) \times b(\text{cm}) \times m_{\text{PAS}}(\text{g})} \times (100 - \text{extrativos (\%)}) \quad (17)$$

17. Efetuar este procedimento em duplicado e fazer a média da lenhina solúvel obtida.
18. A percentagem de lenhina total é dada pela soma da lenhina insolúvel com a solúvel, como apresentado na equação 18.

$$\text{lenhina total (\%)} = \text{lenhina insolúvel (\%)} + \text{lenhina solúvel (\%)} \quad (18)$$

Determinação dos hidratos de carbono

19. Neutralizar, utilizando carbonato de cálcio (CaCO_3), cerca de 15 a 20 mL do licor de hidrólise, filtrado obtido no passo 7, para cada amostra até um pH entre 5 e 6.
20. Deixar sedimentar o precipitado, fazer a decantação do líquido, filtrar com um filtro de seringa com porosidade de 0.2 μm e acondicionar em dois tubos eppendorf, um para injeção no HPLC e outro para congelar, no caso de ser necessário repetir alguma injeção, uma vez que o período de conservação destas amostras é de apenas 2 semanas no frigorífico.
21. Fazer a injeção da amostra no HPLC, neste caso o tempo de injeção entre amostras é de cerca de uma hora para verificar se para além dos hidratos de carbono também existe furfural ou hidroximetilfurfural (produtos de degradação da xilose e da glucose, respetivamente), uma vez que estes compostos possuem maiores tempos de retenção.
22. Determinar a percentagem de hidratos de carbono presentes na amostra de palha de arroz, equação 19. Para isso é necessário ter em conta a concentração dos monossacarídeos obtida por HPLC (C_{HPLC}), o volume de hidrolisado, o fator de correção anidro (fc), a massa de palha de arroz seca e ainda é necessário contabilizar a quantidade de extrativos que foi removida em relação à amostra original.

hidratos de carbono(%)

$$= \frac{C_{\text{HPLC}}(\text{g/mL}) \times V_{\text{Hidrolisado}}(\text{mL}) \times f_c}{m_{\text{PAS}}(\text{g})} \times (100 - \text{extrativos} (\%)) \quad (19)$$

O valor de f_c varia consoante seja relativo a uma pentose (xilose e arabinose) ou a uma hexose (glucose, manose e galactose), sendo:

$$f_c (\text{pentoses}) = 0.88$$

$$f_c (\text{hexoses}) = 0.90$$

ANEXO II – ENSAIOS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E DE FERMENTAÇÃO

Quantidades utilizadas nos ensaios de hidrólise enzimática

Para a preparação dos ensaios de hidrólise enzimática, primeiramente foi necessário estabelecer qual a carga enzimática e o volume a utilizar. Posto isto, e conhecendo o valor da atividade enzimática a 50°C (148 FPU/mL) determina-se o volume de enzima e de tampão citrato a utilizar. As reações de hidrólise enzimática ocorrem a 50°C e 150 rpm. As condições e todas as quantidades utilizadas estão presentes na Tabela 20.

Tabela 20. Condições e quantidades utilizadas nos ensaios de hidrólise enzimática.

Ensaio	N5	NM5	N6	NM6	NM7^(*)	NM8^(*)	NM9^(*)	PAM	NA8'	NA9'	NA8	NA9
Massa HC (g)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	6.95	6.95	6.95	6.95
Massa PA (g)	0.64	0.64	0.57	0.57	0.75	0.74	0.67	1.0	36.1	40.4	36.1	40.4
Carga total de sólidos (%)	3.20	3.20	2.85	2.85	3.45	3.37	3.07	4.49	15.94	15.98	15.94	15.98
Carga enzimática (FPU/g _{HC})	20	20	20	20	20	20	20	15	15	15	15	15
V _{Enzima} (mL)	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.053	0.700	0.700	0.700	0.700
V _{Tampão} (mL)	19.292	19.292	19.362	19.362	19.182	19.192	19.262	18.947	13.30	8.900	13.300	8.900
V _{Total} (mL)	20	20	20	20	20	20	20	20	50	50	50	50
t _{hidrólise} (h)	24	24	24	24	24	24	24	24	72	72	72	72
Regime de operação	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	S	S

D – Descontínuo; S – Semi-descontínuo; ^(*) – Ensaios realizados em duplicado.

Quantidades utilizadas nos ensaios de SSF

As reações de SSF ocorrem a 38°C e 150 rpm durante 72 horas. Para a preparação dos ensaios de SSF, foi necessário estabelecer qual a carga enzimática, o volume de inóculo, de nutrientes e o volume total a utilizar. Tendo em conta o valor da atividade enzimática a 38°C (59.7 FPU/mL) determina-se o volume de enzima e de tampão citrato a utilizar. As condições e todas as quantidades utilizadas estão presentes na Tabela 21.

Tabela 21. Condições e quantidades utilizadas nos ensaios de SSF.

Ensaio	NA8^(*)	NAA8^(*)	NA9	PA
Massa HC (g)	5.68	5.68	5.68	0.5
Massa PA (g)	29.5	29.5	33.0	1.0
V _{Enzima} (mL)	1.43	1.43	1.43	1.43
V _{Tampão} (mL)	12.07	12.07	8.57	14.77
V _{Inóculo} (mL)	5	5	5	2
V _{Nutrientes} (mL)	2.0	2.0	2.0	0.8
V _{Total} (mL)	50	50	50	20
Regime de operação	S	S	S	D

D – Descontínuo; S – Semi-descontínuo; ^(*) – Ensaios realizados em duplicado.

ANEXO III – QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POR HPLC

O método de HPLC tem por objetivo a identificação e quantificação dos compostos constituintes de uma amostra através do seu tempo de retenção. Esta é injetada na pré-coluna, é arrastada pelo eluente e ao atravessar o detetor existe uma mudança do índice de refração do eluente causada pelas moléculas que constituem a amostra, o que permite a sua identificação. Antes da injeção destas amostras é necessária a elaboração de curvas de calibração. Estas são construídas através da injeção sucessiva de soluções padrão com diferentes concentrações do composto em estudo no HPLC. Na Tabela 22 estão presentes os tempos de retenção de cada um dos compostos estudados assim como o declive da curva de calibração e o fator de correlação.

Tabela 22. Tempo de retenção, declive e fator de correlação da curva de calibração dos compostos estudados.

Composto	Tempo de Retenção (min)	Declive (mRIU.s/ (mg/mL))	r²
Celobiose	11.390	0.31043	0.998
Glucose	13.713	0.32624	0.999
Xilose	14.873	0.35215	0.999
Galactose	15.060	0.34193	0.999
Ácido Acético	15.257	0.36436	0.997
Manose	15.363	0.33668	0.999
Arabinose	17.117	0.33622	0.999
Glicerol	20.140	0.23996	0.999
Etanol	20.300	0.12174	0.999
Xilitol	26.227	0.29646	0.999
HMF	38.793	0.35405	0.999
Furfural	51.013	0.32869	0.999

ANEXO IV – PREPARAÇÃO DO TAMPÃO CITRATO E DO REAGENTE DNS-MODIFICADO

Preparação do tampão citrato 0.05 M

Na preparação do tampão citrato começou-se por preparar uma solução a 1 M e pH entre 4.5 e 5 e no final fez-se uma diluição até 0.05 M. Para isso pesou-se 105 g de ácido cítrico monohidratado e dissolveu-se em 350 mL de água destilada. De seguida adicionou-se NaOH (cerca de 30 g) até atingir um pH=4.5 e água destilada até perfazer 500 mL. No final verificou-se se o pH está compreendido entre 4 e 5 (no caso de não estar, adicionar NaOH) e procedeu-se à diluição da solução até uma concentração de 0.05 M.

Preparação do reagente DNS-modificado

Na preparação do reagente DNS-modificado começou-se por adicionar 5.3 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 9.9 g de NaOH a 708 mL de água destilada. Depois de tudo solubilizado adicionou-se 153 g de sais de Rochelle e 3.8 mL de fenol (fundido a 50°C).

ANEXO V – CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES, PRODUTOS E SUBPRODUTOS NO PROCESSO DE SSF

Na Tabela 23 estão presentes os valores obtidos por HPLC da concentração de glucose, xilose, arabinose, etanol, xilitol e glicerol ao longo do tempo do processo de SSF nos ensaios realizados, assim com a produtividade e o rendimento de etanol calculados com base nas referidas concentrações.

Tabela 23. Concentrações de açúcares, produtos e subprodutos ao longo do tempo do processo de SSF obtidos por HPLC.

Ensaio	Tempo (h)	[Glucose] (g/L)	[Xilose] (g/L)	[Arabinose] (g/L)	[EtOH] (g/L)	[Xilitol] (g/L)	[Glicerol] (g/L)	P (g/(L.h))	Y (EtOH) (%)	Y' (EtOH) (%)
NA8	6.3	8.16	9.01	1.20	11.97	n.i.	0.13	1.89	36.6	53.4
	24	1.68	10.89	n.i.	22.59	4.64	0.28	0.94	46.2	67.3
	27.2	2.24	12.18	n.i.	23.61	4.87	0.25	0.87	40.3	58.8
	29.8	3.38	13.57	n.i.	27.17	4.04	0.36	0.91	47.2	67.6
	48	0.88	12.75	n.i.	30.91	7.04	0.32	0.64	48.4	69.3
	53.8	n.i.	12.65	n.i.	29.38	8.54	0.40	0.55	45.2	65.9
	72	0.31	10.05	n.i.	29.64	12.88	0.19	0.41	45.6	66.4
NA9	5.8	10.80	9.50	2.94	14.35	n.i.	0.21	2.46	39.1	57.8
	24	1.08	13.16	n.i.	34.01	4.57	0.66	1.42	65.6	97.0
	27.2	4.34	14.23	n.i.	29.99	4.33	0.51	1.10	49.9	73.8
	30.7	16.70	17.73	n.i.	30.15	2.94	0.67	0.98	50.2	74.2
	47.7	0.30	17.70	n.i.	42.09	6.35	0.66	0.88	64.5	95.3
	54.2	1.62	16.48	n.i.	40.67	7.87	0.45	0.75	62.3	92.1
	71.7	n.i.	17.25	n.i.	40.00	11.08	0.75	0.56	61.3	90.6
NAA8	6.3	36.08	6.88	0.96	1.61	n.i.	0.10	0.26	4.9	7.2
	24	22.58	15.73	n.i.	15.96	0.28	1.50	0.67	32.6	47.6
	29.8	32.99	17.83	n.i.	15.06	0.34	1.19	0.51	26.2	37.5
	48	12.46	20.82	n.i.	27.34	0.84	1.61	0.57	42.8	61.3
	53.8	3.05	19.89	n.i.	31.41	1.10	1.77	0.58	48.3	70.4
	72	n.i.	19.07	n.i.	33.31	1.63	1.90	0.46	51.2	74.7
PA	6.3	n.i.	n.i.	0.03	1.19	n.i.	0.10	0.19	9.3	14.1
	24	n.i.	0.61	0.05	0.13	0.03	n.i.	0.01	1.0	1.6
	72	n.i.	0.18	0.04	n.i.	0.18	n.i.	0.00	0.0	0.0

— Adição de substrato; n.i. – não identificado.